



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Alteraciones en la expresión génica relacionadas  
con miogénesis inducidas *in vitro* por productos  
de excreción-secreción de *Trichinella spiralis***

Tesis que presenta

**M en C Lizbeth Hernández Ancheyta**

para obtener el Grado de

**Doctora en Ciencias**

en la Especialidad de

**Genética y Biología Molecular**

Director de tesis:

**Dr. Javier Hernández Sánchez**

Ciudad de México

Enero de 2018

## **Director de tesis**

Dr. Javier Hernández Sánchez  
Departamento de Genética y Biología Molecular  
CINVESTAV

## **Asesores de tesis**

Dra. María del Rosario Salinas Tobón  
Departamento de Inmunología  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas  
Instituto Politécnico Nacional

Dra. Rosa María del Refugio Bermúdez Cruz  
Departamento de Genética y Biología Molecular  
CINVESTAV

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe  
Departamento de Genética y Biología Molecular  
CINVESTAV

Dra. Patricia Talamás Rohana  
Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular  
CINVESTAV

Dr. Everardo Curiel Quesada  
Departamento de Bioquímica  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas  
Instituto Politécnico Nacional

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante la realización de este trabajo, el cual fue llevado a cabo en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

## Agradecimientos

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este momento.

A mis padres, por los valores que me inculcaron y que me hacen ser quien soy, por su infinito apoyo y sus palabras de aliento, sin ustedes ésto no habría sido posible.

A mis hermanos Fabián y Diego, son parte fundamental de mi vida.

A Juan Carlos, mi compañero de vida, por su amor e incondicional apoyo en cada paso personal y profesional, y por animarme siempre a emprender nuevos retos.

Al Dr. Javier Hernández Sánchez, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por su todo su apoyo durante la realización de este proyecto y por procurar siempre el bienestar personal y profesional de sus estudiantes. Los años de maestría y doctorado en su laboratorio me dejaron grandes enseñanzas.

A la Dra. María del Rosario Salinas Tobón, por todas sus enseñanzas y atenciones durante la maestría y doctorado, el tiempo que me dedicó y su apoyo fueron muy importantes para mí.

A mi comité tutorial: Dr. Luis Kameyama, Dra. Rosa Ma. Bermúdez, Dra. Patricia Talamás y Dr. Everardo Curiel, por su constancia y atención durante todo el desarrollo de este proyecto, sus aportaciones y sugerencias enriquecieron este trabajo.

A mis amigos que se convirtieron en familia: Dr. Manuel Castillo, Dra. Minerva Mata y Dra. Ángeles Romero, por todas sus asesorías y consejos, por su tiempo. Contar con su amistad es de lo más valioso que me dejó CINVESTAV.

A mis *roomies*: Juan de Dios, Giovanni y Luis, por su amistad, compañía y apoyo en los buenos y malos momentos.

A mis amigos y compañeros de generación, por hacer más agradable ésta experiencia.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Marisol, Salma, Nubia, Lizdy, Krystal, Carlos, Sergio y Andrea, por los momentos compartidos, por su amistad y su apoyo durante estos años.



# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1 <i>Trichinella spiralis</i> .....	3
1.1.1 Ciclo de vida de <i>T. spiralis</i> .....	3
1.1.2 Productos de excreción-secreción de la larva muscular de <i>T. spiralis</i> .....	9
1.2 Músculo Esquelético .....	11
1.2.1 Miogénesis .....	13
1.2.2 Auto-renovación de las células satélite.....	14
1.2.3 Cultivo primario de células miogénicas.....	16
1.3 Vía de señalización Wnt .....	16
1.3.1 Vía de señalización canónica Wnt.....	16
1.3.2 Vías de señalización Wnt no canónicas.....	17
1.3.3 Regulación de miogénesis por la vía Wnt.....	19
2. ANTECEDENTES .....	21
3. JUSTIFICACIÓN .....	24
4. HIPÓTESIS .....	24
5. OBJETIVOS .....	25
5.1 OBJETIVO GENERAL .....	25
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
6.1 Cultivo primario de miocitos .....	26
6.1.1 Digestión enzimática de músculo de ratón neonato.....	26
6.1.2 Diferenciación de mioblastos a miotubos.....	26
6.2 Obtención de Productos de Excreción-Secreción (PES) de larva muscular (LM) de <i>T. spiralis</i> .....	27
6.3 Extracción de RNA.....	27
6.4 Microarreglos de DNA.....	28
6.4.1 Impresión, hibridación y lectura .....	28
6.4.2 Manejo y análisis estadístico de los datos .....	28
6.4.3 Análisis biológico-ontológico.....	29

6.5 Ensayos de proliferación.....	30
6.6 Análisis de expresión por qRT-PCR.....	30
6.7 Inmunofluorescencia indirecta .....	32
6.8 Fraccionamiento de G-Actina y F-Actina.....	32
6.9 Ensayos de Western Blot.....	33
6.10 Ensayos de Co-inmunoprecipitación.....	34
6.11 Análisis estadístico .....	34
7. RESULTADOS.....	35
7.1 Desarrollo del cultivo primario de miocitos .....	35
7.2 Análisis de los cambios en el transcriptoma inducidos por PES en el cultivo primario de miocitos .....	37
7.2.1 Microarreglos de expresión .....	37
7.3 Análisis estadístico de los microarreglos de expresión .....	39
7.3.1 Procesamiento de los datos crudos.....	39
7.3.2 Cálculo de la abundancia relativa de los transcritos .....	41
7.3.3 Determinación de diferencias en la abundancia de los transcritos.....	42
7.3.4 Análisis de las réplicas experimentales SWAP .....	43
7.3.5 Interpretación ontológica de los procesos alterados por el tratamiento con PES .....	45
7.4 Análisis del citoesqueleto de actina y de la cadena pesada de miosina (MHC) como marcador de diferenciación en células tratadas con PES .....	48
7.4.1 Expresión de MHC en cultivos primarios de miocitos tratados con PES.....	48
7.4.2 Expresión de $\alpha$ -Actina en cultivos primarios de miocitos tratados con PES .....	50
7.5 Proliferación celular en cultivos primarios de miocitos tratados con PES .....	55
7.6 Expresión de factores de regulación miogénica en cultivos primarios de miocitos ..	58
7.7 Papel de la vía Wnt en los cambios inducidos en las células musculares tratadas con PES de <i>T. spiralis</i> .....	64
8. DISCUSIÓN .....	69
9. CONCLUSIONES.....	75
10. PERSPECTIVAS.....	76
11. ANEXO .....	77
12. BIBLIOGRAFÍA .....	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i> .....	5
Figura 2. Cambios observados durante la formación del complejo larva muscular célula nodriza.....	7
Figura 3. Angiogénesis y formación de la célula nodriza.....	9
Figura 4. Estructura del tejido muscular.....	11
Figura 5. Organización de la fibra muscular.....	12
Figura 6. Representación esquemática de la miogénesis y los factores reguladores relacionados con cada fase.....	15
Figura 7. Vías de señalización Wnt.....	18
Figura 8. Regulación transcripcional a través de la interacción de Pax7 y Barx2 con el complejo $\beta$ -catenina-TCF.....	20
Figura 9. Morfología de las células del cultivo primario en diferentes etapas de diferenciación.....	36
Figura 10. Efecto del tratamiento con PES (50 $\mu$ g adicionados los días 1 y 5 de cultivo) en las células del cultivo primario de miocitos a los 8 días de diferenciación.....	37
Figura 11. Procesamiento estadístico de los datos crudos del microarreglo.....	40
Figura 12. Descripción de los cálculos usados en el análisis de microarreglos.....	41
Figura 13. Distribución normal de los datos del microarreglo e interpretación del valor Z.....	45
Figura 14. Categorías ontológicas representadas por transcritos con niveles de expresión alterados.....	46
Figura 15. Procesos biológicos y rutas metabólicas representadas por transcritos con niveles de expresión alterados.....	47
Figura 16. Expresión de la cadena pesada de miosina (MHC) en cultivos primarios de miocitos con y sin tratamiento de PES de LM de <i>T. spiralis</i> a diferentes tiempos de diferenciación.....	49
Figura 17. La expresión de MHC disminuye en cultivos primarios de miocitos tratados con PES de LM de <i>T. spiralis</i> .....	50
Figura 18. Cuantificación de la expresión relativa de $\alpha$ -Actina.....	51

Figura 19. La expresión de $\alpha$ -ACTINA aumenta en cultivos primarios de miocitos tratados con PES de LM de <i>T. spiralis</i> .....	51
Figura 20. Distribución de $\alpha$ -ACTINA en cultivos primarios de miocitos con y sin tratamiento de PES de LM de <i>T. spiralis</i> .....	52
Figura 21. Fraccionamiento de G-ACTINA y F-ACTINA en cultivos primarios de miocitos.....	53
Figura 22. Fraccionamiento de G-ACTINA y F-ACTINA en cultivos primarios de miocitos con y sin tratamiento con PES.....	54
Figura 23. Cuantificación de expresión relativa de <i>Trim32</i> y <i>Timosina <math>\beta</math>4</i> .....	55
Figura 24. El tratamiento con PES incrementa la proliferación celular.....	57
Figura 25. Amplificación por PCR de genes de regulación miogénica.....	58
Figura 26. Ejemplo de las curvas de rango dinámico para qRT-PCR.....	59
Figura 27. Ejemplo de las curvas de disociación obtenidas para cada uno de los genes a validar por qRT-PCR.....	60
Figura 28. Cuantificación de la expresión relativa de genes reguladores de miogénesis.....	60
Figura 29. Cinética de expresión de PAX7, MYF5 y MIOGENINA en cultivos primarios de miocitos.....	62
Figura 30. Expresión de PAX7, MYF5 y MIOGENINA en cultivos primarios de miocitos con y sin tratamiento con PES.....	64
Figura 31. Niveles de interacción de PAX7 y BARX2 con $\beta$ -CATENINA en cultivos tratados con PES.....	66
Figura 32. Detección de $\beta$ -CATENINA fosforilada en cultivos primarios tratados con PES.....	67
Figura 33. Expresión relativa de <i>Ctnnbip</i> en cultivos primarios tratados con PES.....	68



## RESUMEN

La infección de *Trichinella spiralis* al músculo esquelético culmina con la formación de la célula nodriza. Por estudios realizados en músculo infectado y en la línea celular C2C12, se ha implicado la participación de los productos de excreción-secreción (PES) de la larva muscular (LM) durante este proceso. En el presente trabajo, se desarrollaron cultivos primarios de mioblastos murinos con el objetivo de evaluar los cambios inducidos por los PES de LM en células musculares. El análisis mediante microarreglos de expresión reveló alteraciones en genes que participan en diferenciación de células musculares, proliferación, organización de citoesqueleto, transcripción, ciclo celular y apoptosis, así como en vías de señalización como MAPK, JaK-STAT, Wnt y PI3K-Akt. Algunos de estos cambios de expresión fueron validados por otras metodologías, como qRT-PCR y western blot, confirmando que los PES de LM inducen una mayor proliferación de células musculares, disminuyen la expresión de MHC e incrementan la expresión de  $\alpha$ -ACTINA, favoreciendo su acumulación en su forma monomérica (G-Actina). Se encontraron alteraciones en la expresión de factores de transcripción involucrados en regulación miogénica (*Pax7*, *Myf5*, y *Mef2c*). De igual manera, se encontró una mayor interacción entre PAX7 y  $\beta$ -CATENINA, lo que indica cómo los PES de LM alteran el curso de la diferenciación de células musculares y favorecen su proliferación. Los resultados del presente trabajo proporcionan nueva información acerca de cómo *T. spiralis* puede alterar el curso normal de reparación del músculo esquelético para concretar la formación de la célula nodriza.

## ABSTRACT

*Trichinella spiralis* infection in skeletal muscle culminates with nurse cell formation. The participation of excretory-secretory products of the muscle larvae (ML-ESP) has been implicated in this process through different studies performed in infected muscle and the muscle cell line C2C12. In this work, we developed primary myoblast cultures to analyze the changes induced by ML-ESP in muscle cells. Microarray analyses revealed expression changes in muscle cell differentiation, proliferation, cytoskeleton organization, cell motion, transcription, cell cycle, apoptosis and signaling pathways like MAPK, Jak-STAT, Wnt, and PI3K-Akt. Some of these changes were further evaluated by other methodologies, such as qRT-PCR and western blot, confirming that ML-ESP treated primary mouse myoblasts undergo increased proliferation, decreased expression of MHC and up-regulation of  $\alpha$ -ACTIN, which accumulated as G-Actin. In addition, changes in relevant muscle transcription factors (*Pax7*, *Myf5*, and *Mef2c*) were also observed. Also, a higher interaction between PAX7 and  $\beta$ -CATENIN was found, indicating how the myoblast differentiation switched to proliferation. Taken together, these results provide new information about how *T. spiralis* could alter the normal process of skeletal muscle repair after ML invasion to accomplish nurse cell formation.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 *Trichinella spiralis*

*T. spiralis* es el agente causal de la trichinellosis, una zoonosis de amplia distribución mundial adquirida por el consumo de carne contaminada cruda o mal cocida (Despommier *et al.*, 2005; Ilic *et al.*, 2012). La carne de cerdo es la principal fuente de infección para el humano en México (Ortega *et al.*, 2000).

*T. spiralis* es un helminto que produce una infección duradera en el hospedero, estableciéndose en el músculo esquelético. Dependiendo de la especie del hospedero, el parásito puede permanecer exitosamente hasta la muerte del mismo (como en el caso de los roedores) o durante meses e incluso años en el caso de los humanos (Despommier, 1993; Mitreva *et al.*, 2006).

### 1.1.1 Ciclo de vida de *T. spiralis*

El ciclo de vida de *T. spiralis* consiste en una fase entérica de mudas y reproducción comprendida entre el punto en que la larva infectiva se libera del quiste y la producción de la nueva generación de larvas recién nacidas (L1 inmadura) por el adulto hembra, y una fase parenteral con migración sistémica e infección muscular por la larva inmadura L1 y el desarrollo del complejo larva muscular (larva L1 madura)-célula nodriza (Riva *et al.*, 2007).

#### **Fase entérica**

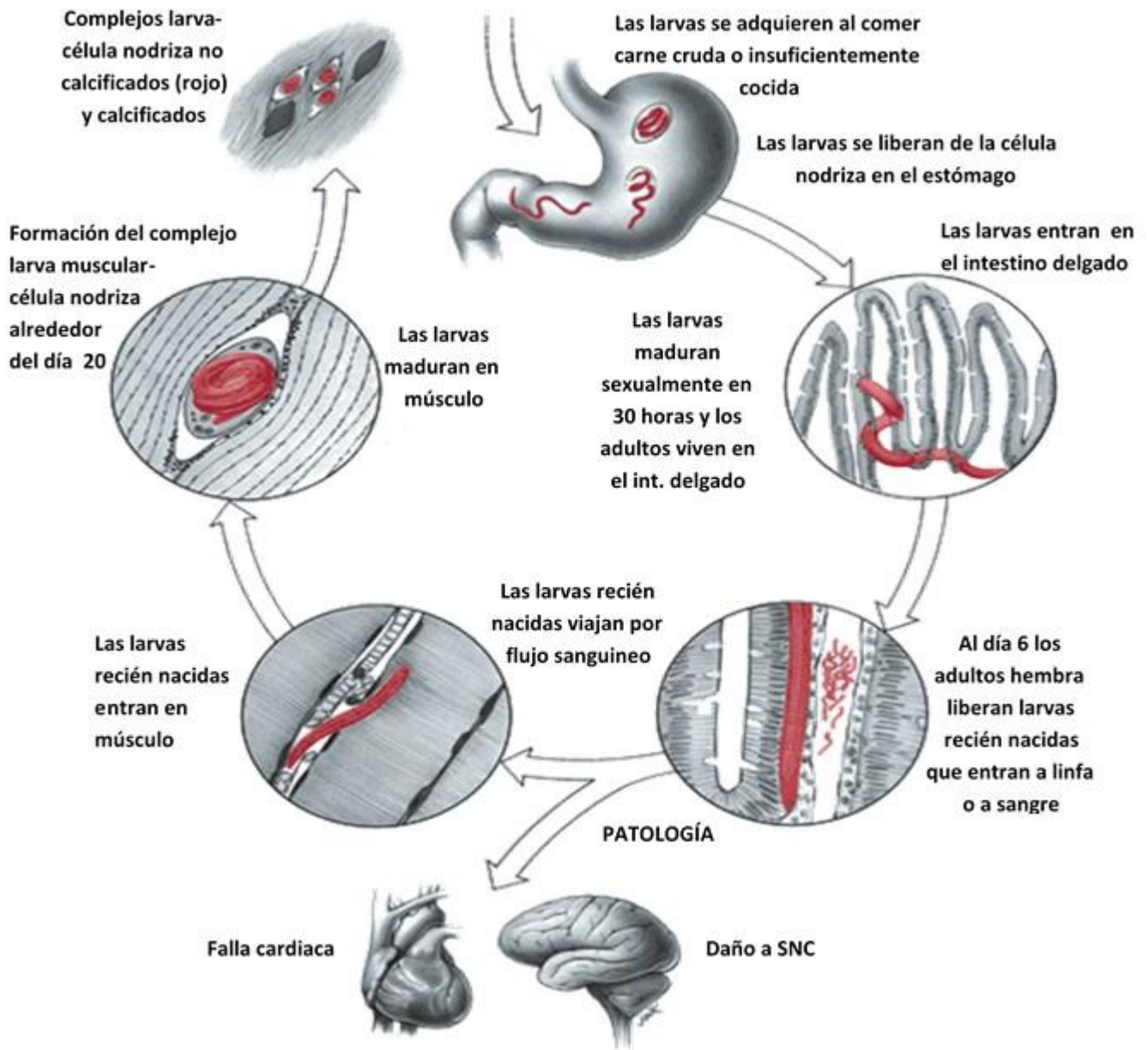
Las larvas musculares enquistadas (L1 infectantes) al ser ingeridas por un hospedero se liberan de los tejidos musculares que las rodean y de la cápsula por acción de la pepsina y del ácido clorhídrico gástrico (Steward *et al.*, 1987; Katz *et al.*, 1989; Riva *et al.*, 2007). Llegan al intestino delgado, penetran el epitelio intestinal

y en 30 horas, luego de 4 mudas de la cutícula (pasan por L1-L4), se desarrollan en adultos macho o hembra.

El adulto hembra mide aproximadamente 3 mm por 36  $\mu$ m de diámetro y el adulto macho mide aproximadamente 1.5 mm de largo por 36  $\mu$ m de diámetro (Despommier, 1983; Mitreva *et al.*, 2006; Riva *et al.*, 2007). Los adultos macho y hembra vuelven al lumen intestinal y la cópula se produce a partir del día 2 post infección (p.i.). Los adultos hembra penetran las células epiteliales de la mucosa y hacia el día 6 ó 7 p.i. comienzan a liberar larvas recién nacidas (LRN), las cuales miden aproximadamente 0.08 mm por 7  $\mu$ m de diámetro (Stewart *et al.*, 1987; Despommier *et al.*, 2005; Riva *et al.*, 2007). El adulto hembra produce entre 500 y 1500 LRN durante su permanencia en el intestino hasta que se expulsa debido a la respuesta inmune del hospedero (Mitreva *et al.*, 2006).

### **Fase parenteral**

Las LRN migran hacia los vasos sanguíneos y linfáticos ubicados en la lámina propia gracias a su estilete bucal y continúan su migración vía sangre y linfa, llegan a la sección derecha del corazón, a los pulmones, al corazón izquierdo y desde allí se distribuyen hacia todo el organismo (Mitreva *et al.*, 2006; Riva *et al.*, 2007). Aunque las LRN no parecen tener un tropismo por algún tipo de célula y muchas células de diferentes tipos mueren durante la invasión, las células de músculo estriado son la excepción, pues el parásito puede permanecer en ellas por largo tiempo (Figura 1) (Despommier, 1990), nutriéndose selectivamente del glucógeno muscular acumulado. La larva adquiere infectividad a los 17 días de haber penetrado la célula muscular. El metabolismo de la larva infectiva es anaeróbico (Despommier, 1998; Riva *et al.*, 2007).



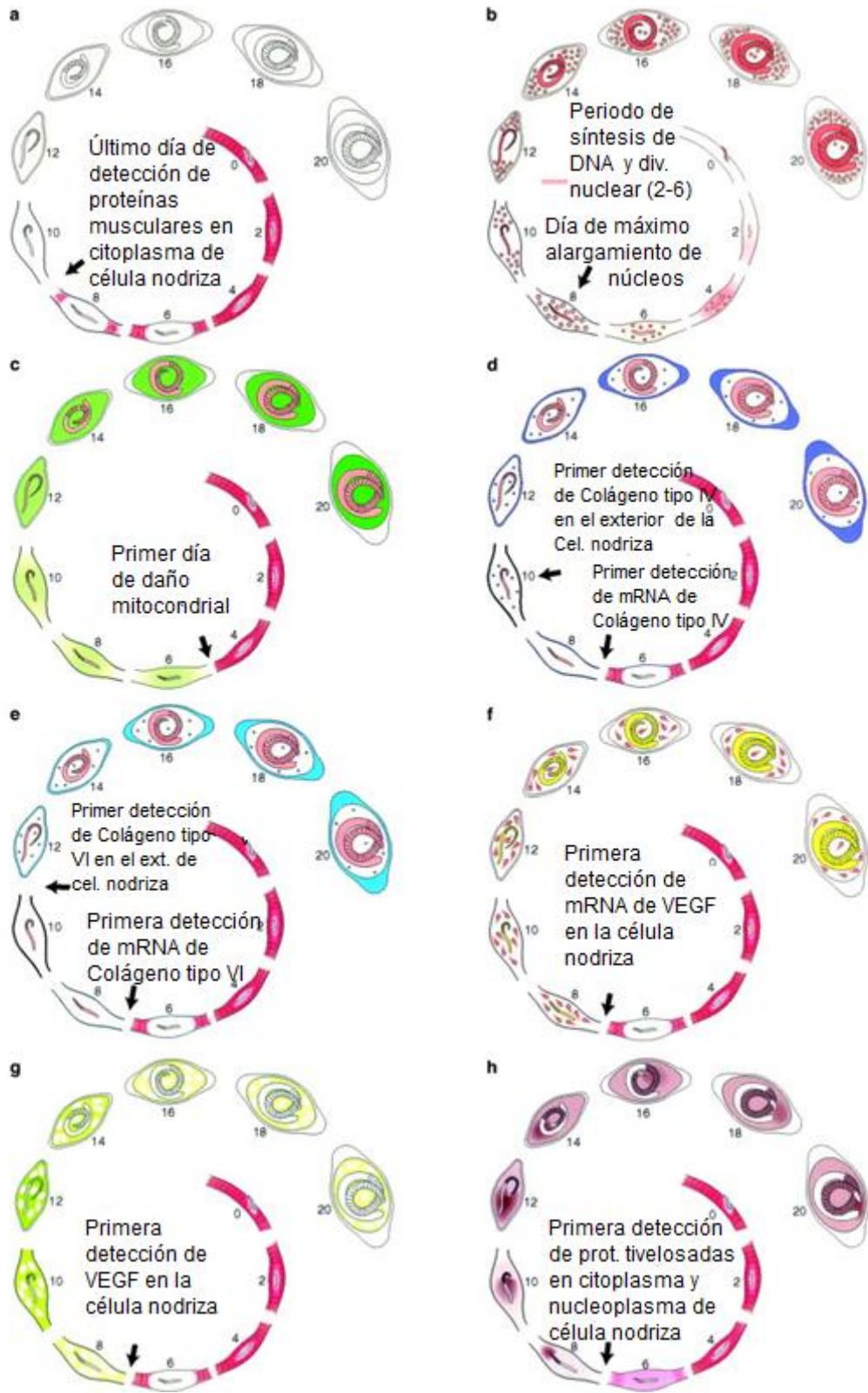
**Figura 7. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis* (Despommier *et al.*, 2005).**

Las larvas migratorias que han llegado al músculo esquelético penetran en las miofibrillas mediante el uso de su estilote bucal. Durante la maduración de la larva, los PES se ubican en el citoplasma y en el núcleo de la célula infectada y se desencadenan una serie de modificaciones celulares que determinan la formación de una unidad anatómica independiente y especializada denominada complejo

célula nodriza-larva muscular, la cual corresponde a una porción de la fibra infectada cuya morfología y fisiología están dramáticamente alteradas (Despommier, 1993; Riva *et al.*, 2007). La célula nodriza es típicamente fusiforme, mide entre 250–400  $\mu\text{m}$  y contiene a la LM enrollada (Figura 1). Su función es permitir el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de la larva, pues favorece la obtención de nutrientes, exportación de desechos y aísla a la larva de la respuesta inmune del hospedador (Despommier, 1993; Riva *et al.*, 2007).

Morfológicamente la célula infectada pierde la apariencia estriada característica de las células musculares. A nivel ultraestructural los cambios que ocurren son: 1) la disolución y la pérdida total de las miofibrillas (Despommier, 1975), la proliferación de las células satélite (Wu, 2001), 2) el incremento de organelos, incluyendo retículo endoplásmico liso y rugoso, mitocondrias las cuales se observan vacuoladas, lisosomas y un núcleo alargado con nucléolo bien definido. Este último cambio se ha asociado con la inducción de la replicación del DNA de la célula muscular (Despommier, 1975). La reentrada en el ciclo celular lleva a la acumulación de un complemento nuclear 4N, que no culmina en cariocinesis; este arresto en aparente fase G2/M persiste por meses y/o años (Jasmer, 1993) y 3) la producción de una cápsula de colágeno (Polvere, 1997).

El colágeno que rodea el complejo célula nodriza-parásito es predominantemente de dos tipos, IV y VI, los cuales son sintetizadas por la célula nodriza (Polvere, 1997). El comienzo de la síntesis de mRNA de colágeno tipo IV y VI se observa en los días 7 y 8. La síntesis de colágeno tipo IV cesa alrededor del día 26, mientras que la síntesis de colágeno tipo VI continúa a través de la infección a bajos niveles (Despommier, 1998). El encapsulamiento larvario se completa aproximadamente a los 30 días p.i. A partir de los 90 días puede iniciarse el depósito de calcio en las paredes del quiste y la L1 madura se mantiene viable siempre y cuando la calcificación no sea total. Dentro de la cápsula, la L1 madura permanece con vida varios años (Figura 2).

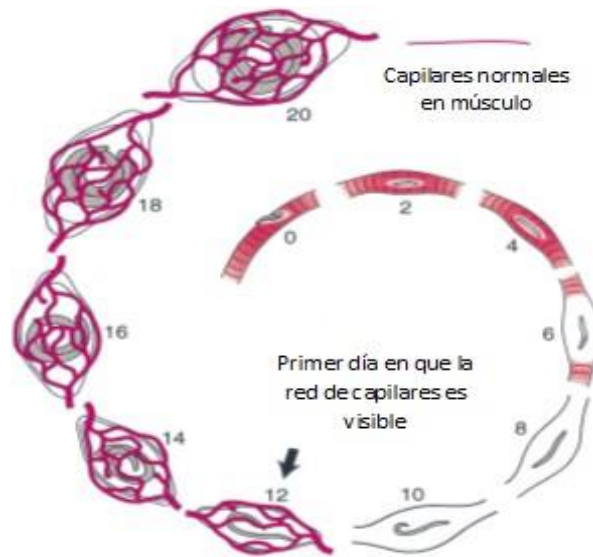


**Figura 8. Cambios observados durante la formación del complejo larva muscular-célula nodriza (Despommier, 1998)**

Para que la relación parásito-hospedero persista durante mucho tiempo, el parásito debe permanecer metabólicamente activo adquiriendo nutrientes y eliminando desechos (Despommier, 1993). El mecanismo por el cual *T. spiralis* cumple con estos requerimientos es promoviendo la angiogénesis, lo cual puede implicar un evento hipóxico inicial dentro o cerca de la célula nodriza. La hipoxia en muchas situaciones lleva a una sobreexpresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el cual puede inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Además del estado de hipoxia, otro factor que puede inducir un incremento de VEGF es TIMOSINA  $\beta$ 4, una proteína multifuncional con la capacidad de promover angiogénesis (Grant *et al.*, 1999; Lv *et al.*, 2013). Se encontró que la expresión de TIMOSINA  $\beta$ 4 en músculo esquelético se eleva desde etapas tempranas de la infección por *T. spiralis* y se mantiene así hasta después de que culmina la formación de la célula nodriza, lo que sugiere su participación en el desarrollo y mantenimiento de la célula nodriza (Kang *et al.*, 2011). El mRNA de *Vegf* se puede detectar en el citoplasma de la célula nodriza en desarrollo alrededor del día 7 después de que la larva recién nacida entra a las células musculares, aunque la señal del mRNA es más fuerte a los 15 días (Figura 2). Una vez que termina la formación de los nuevos vasos sanguíneos los niveles de VEGF permanecen constantemente bajos, lo cual permite un estado de permeabilidad vascular que representa una ventaja para la permanencia prolongada del parásito en el hospedero (Figura 3) (Despommier, 1998). La angiogénesis cesa alrededor del día 26 después de que la larva invadió la célula muscular.





**Figura 11. Angiogénesis y formación de la célula nodriza**  
(Despommier, 1998)

### 1.1.2 Productos de excreción-secretión de la larva muscular de *T. spiralis*

Las proteínas excretadas-secretadas por los parásitos intracelulares son buenos candidatos para elucidar los mecanismos que median la interacción parásito-célula muscular y el desarrollo de la célula nodriza.

La larva muscular liberada de las células musculares infectadas excreta o secreta alrededor de 40 proteínas (Jasmer, 1990) en un período de 24 h de cultivo. Entre las más abundantes están las proteínas glicosiladas con un carbohidrato inmunodominante, D-tivelosa (3,6-dideoxi arabinohexosa) (Wisnewski *et al.*, 1993). Los esticocitos que constituyen a la glándula esofágica, denominada esticosoma, producen algunas de las proteínas de excreción-secretión. Si algunas de estas proteínas son liberadas dentro de las células infectadas, podrían mediar su reorganización y reprogramarlas genéticamente (Jasmer, 2006).

Hasta el momento se ha encontrado evidencia de que la glicoproteína de 43 KDa (gp43) y otras proteínas antigénicamente relacionadas se encuentran en el núcleo

y en el citoplasma de la célula nodriza (Despommier *et al.*, 1990; Vassilatis *et al.*, 1992; Yao *et al.*, 1998), al igual que las proteínas SML-1 y SML-2, siendo SML-2 un péptido pequeño procesado a partir de un precursor por metaloproteasas contenidas dentro de los mismos productos de excreción-secreción de la larva muscular (PES) (Guiliano *et al.*, 2009).

Se han observado diversos tipos de actividades bioquímicas en los PES de la larva muscular, incluyendo unión a DNA (Mak *et al.*, 2001), actividades de endonucleasa (Mak *et al.*, 1999), proteasa (Criado *et al.*, 1992; Romaris *et al.*, 2002), cinasa (Gounaris *et al.*, 2001) y 5'-nucleotidasa (Gounaris, 2002).

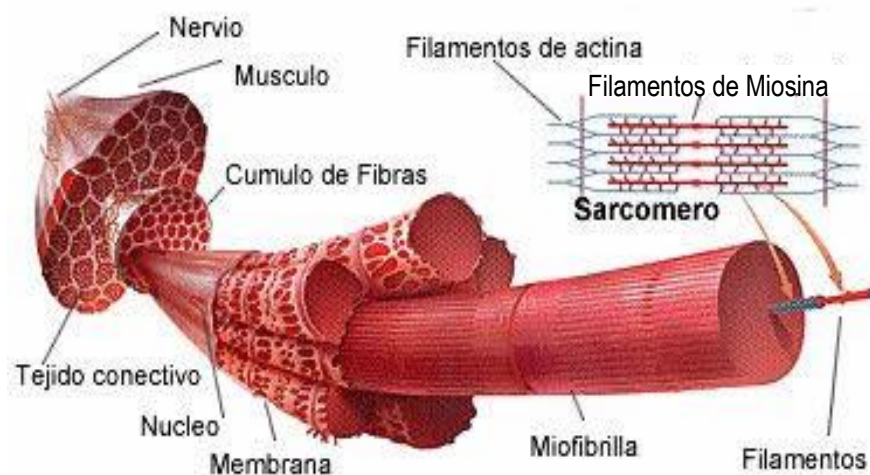
Además, dentro de los PES de *T. spiralis* se reportó recientemente la presencia de la proteína TsUBE2L3, la cual tiene la capacidad de actuar como una enzima E2 de conjugación de ubiquitina y como una E3 ligasa, reemplazando a sus ortólogos en mamífero y dando como resultado la estabilización de proteínas motoras, sarcoméricas y de matriz extracelular debido a una menor ubiquitinación (White *et al.*, 2016).

Hasta el momento, sólo se han estudiado las actividades biológicas de los PES de la larva muscular, debido a la complejidad de su composición. Aunque se cuenta con la mayor parte de la secuencia del genoma de *T. spiralis*, determinar los genes cuyas proteínas se liberan es complicado y hasta el momento se ha optado por la identificación de las proteínas de excreción-secreción mediante espectrometría de masas. Por medio de electroforesis en 2 dimensiones y espectrometría de masas se identificaron 43 péptidos (Robinson y Conolly, 2005), los cuales representan sólo 13 proteínas diferentes, de las cuales 4 ya habían sido reportadas, 3 fueron proteínas predichas como productos de excreción-secreción y 6 se asignaron como proteínas putativas codificadas por ESTs (*expressed sequence tags*). Este estudio evidenció la presencia de gran variedad de isoformas, atribuibles a modificaciones post-traduccionales, *splicing* o procesamiento de proteínas.

Las células musculares responden a los productos de excreción-secreción de la larva L1 en una forma diferente a como responden a otros factores que producen daño (Wu *et al.*, 2005). Aunque se ha comparado este proceso con el de regeneración muscular porque involucra procesos de activación y proliferación de células satélite, diferenciación y control de ciclo celular (Wu *et al.*, 2008), el mecanismo por el cual los productos de excreción-secreción de la larva L1 interrumpen el proceso de miogénesis e inducen la formación de la célula nodriza aún no se conoce.

## 1.2 Músculo Esquelético

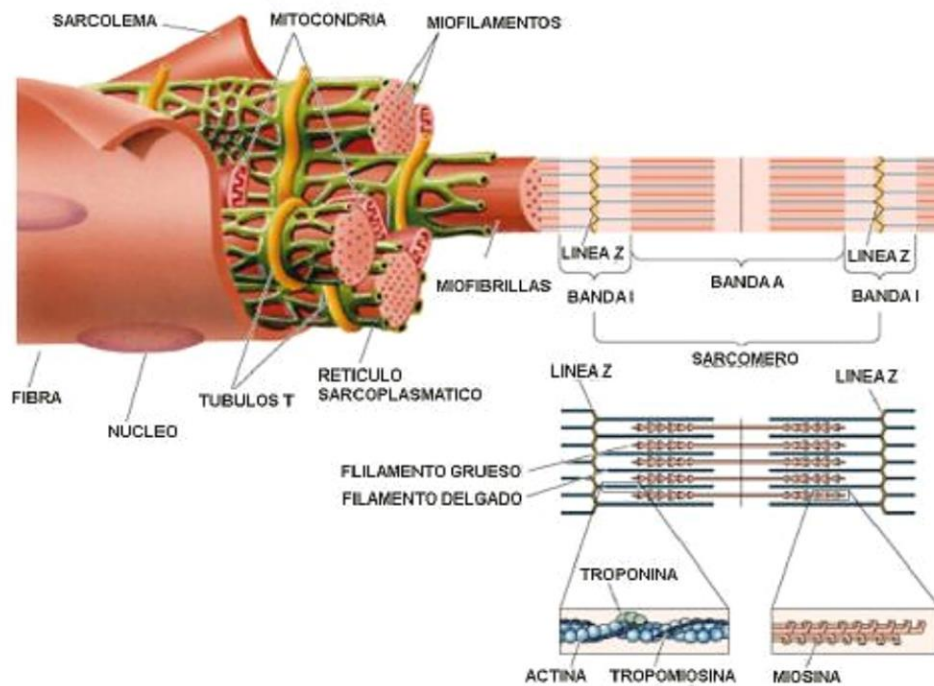
El músculo esquelético constituye el tejido más abundante y representa 40-50% del peso corporal total en el humano. Este tejido se integra por fibras que a su vez se componen de miofibrillas agrupadas en haces que se extienden longitudinalmente en dirección al movimiento. Cada miofibrilla consiste de prolongados y finos haces de miofilamentos que muestran un patrón estructural que se repite cada 2.5  $\mu\text{m}$ ; estas unidades repetidas se denominan sarcómeros. Cada miofilamento está formado por moléculas de actina y miosina polimerizadas las cuales son responsables de la contracción (Figura 4).



**Figura 12. Estructura del tejido muscular** (www.si-educa.net)

Los filamentos de actina y miosina se superponen parcialmente, por lo que las miofibrillas muestran bandas claras y oscuras en forma alterna. Las bandas que solo contienen filamentos de actina se denominan bandas I; las bandas oscuras contienen filamentos de miosina y en sus extremos, filamentos de actina. La zona en que los filamentos de actina se superponen a los de miosina se denomina banda A. La porción central de la banda A es la banda H. Los extremos de los filamentos de actina se fijan a los discos Z. El disco Z cruza transversalmente la miofibrilla y de una a otra fijando las miofibrillas en la fibra muscular (véase figura 5; Guyton y Hall, 2007).

Las estriaciones que coinciden con las bandas Z y proteínas como  $\alpha$ -Actinina, Vinculina, Talina e integrinas, éstas últimos receptores de adhesión transmembranales han sido llamadas costámeros. Los costámeros se definen como regiones del sarcolema unidos a la matriz extracelular y son de importancia durante la conducción de fuerza durante la contracción muscular.



**Figura 14. Organización de la fibra (magisnef.wordpress.com).  
muscular**

### 1.2.1 Miogénesis

La generación de músculo es un proceso regulado por múltiples mecanismos extrínsecos e intrínsecos durante todas las etapas del desarrollo. El músculo esquelético en los vertebrados se forma en el embrión a partir del mesodermo, el cual se segmenta en somitos (Le Grand *et al.*, 2007). Durante el desarrollo del embrión, la parte dorsal del somito se convierte en dermomiótomo y las células que lo componen expresan *Pax3* y *Pax7*. La porción de células del dermomiótomo que madura a miótomo se caracteriza por la expresión de *MyoD* y *Myf5* y son éstas células las que se comprometen con el linaje miogénico y dan origen a mioblastos que proliferan y que cuando están completamente diferenciados, salen del ciclo celular y se fusionan con otros para formar miofibras multinucleadas (Apponi *et al.*, 2001; Bentzinger *et al.*, 2012).

Durante el desarrollo y crecimiento postnatal, los mioblastos se derivan de células precursoras de músculo residentes, llamadas células satélite. Las células satélite son mitóticamente quiescentes y residen en un nicho entre la lámina basal y el sarcolema de sus miofibras asociadas. En condiciones de daño o ante estímulos de crecimiento, las células satélite se activan, proliferan y dan origen a mioblastos, los cuales se diferencian y salen del ciclo celular, para después fusionarse a las miofibras dañadas ya existentes o bien entre ellos para formar nuevas miofibras (Charge *et al.*, 2004). La característica morfológica fundamental de estas células es que son de calibre más pequeño y presentan núcleos localizados centralmente (Zammit, 2004).

La regulación de la miogénesis a nivel molecular ha sido parcialmente establecida. Se han descrito factores reguladores extrínsecos e intrínsecos. Dentro de los factores extrínsecos se encuentran vías de señalización que dirigen la estructura de los tejidos desde la etapa embrionaria hasta la adulta, tales como las vías de Notch y Wnt, mientras que los factores intrínsecos comprenden la actividad de reguladores

transcripcionales, factores remodeladores de la cromatina (Bentzinger *et al.*, 2012) y de las interacciones jerárquicas entre éstos factores.

Hasta el momento es claro que una serie de factores de transcripción que conforman la familia de los factores reguladores de la miogénesis llamados MRFs (MYOD, MYF5, MYOG y MRF4) juega un papel crítico; estas proteínas cuentan con un dominio básico que les permite unirse al DNA y un dominio hélice-asa-hélice que les permite heterodimerizar con proteínas E (Bentzinger *et al.*, 2012). En ausencia de MYF5 y MYOD las células en el somito no se vuelven mioblastos y adoptan otros destinos celulares (Buckingham *et al.*, 2003), mientras que la diferenciación de los mioblastos a fibras musculares está regulada por MYOD, MRF4 (*Myf6*) y particularmente Miogenina (MYOG). Otros factores de transcripción también juegan un papel importante en este proceso, en especial la familia MEF2 (Black *et al.*, 1998), que controla la transcripción de genes involucrados en diferenciación muscular como *Myog* y *Mrf4*.

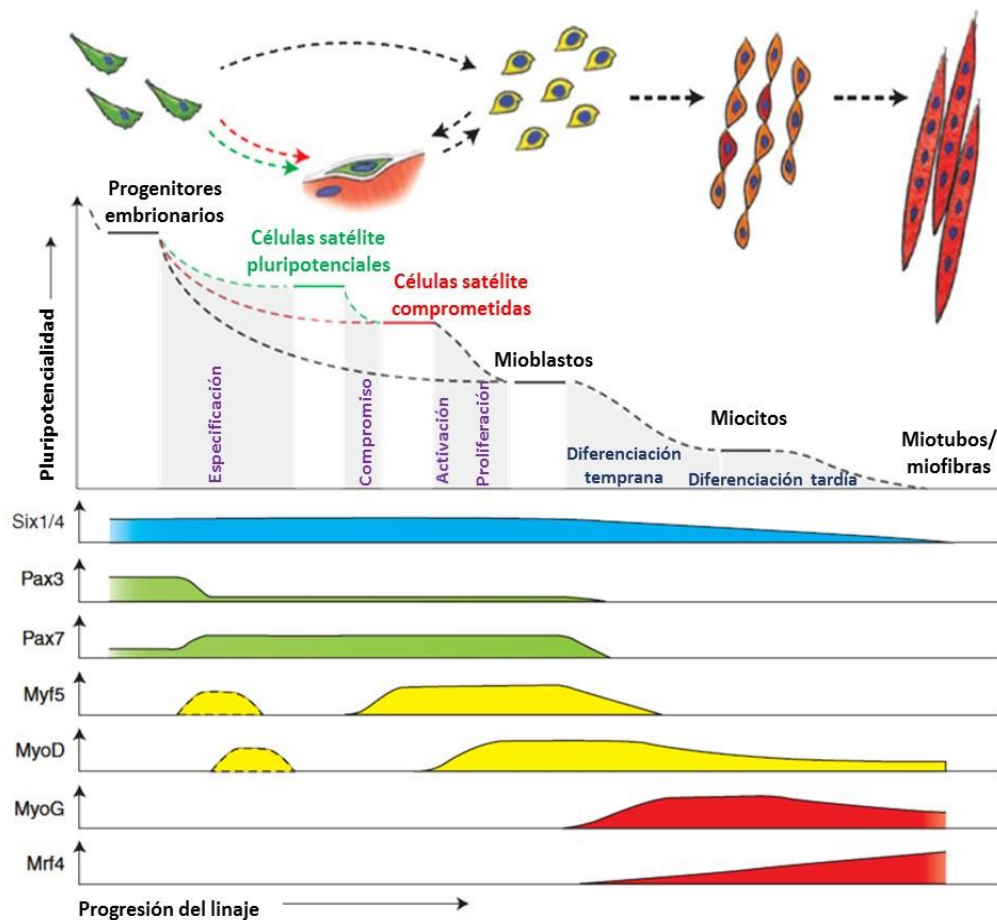
Además de la participación de diversos factores de regulación transcripcional, para la formación adecuada de los miotubos es necesario que las proteínas que forman el citoesqueleto se re-arreglen, principalmente Actina y Miosina (Bandman, 1992). Alteraciones en la polimerización de Actina pueden afectar la diferenciación de las células musculares. La G-Actina (Globular) se incrementa en células que proliferan, mientras que la F-Actina (Filamentosa) está involucrada en la formación de las fibras de estrés y en la diferenciación. Por lo tanto, la proporción de G/F Actina es muy importante durante el curso de la diferenciación (Rao, 2002; Khurana y Dey, 2003).

### **1.2.2 Auto-renovación de las células satélite**

Después de la activación, las células satélite dejan su nicho y salen de la lámina basal, inician ciclo celular y co-expresan *Pax7*, *Myf5* y *Myod-1*. Los descendientes de las células satélite activadas, los mioblastos esqueléticos, llevan a cabo múltiples rondas de división y la mayoría de ellas dejan de expresar *Pax7*, expresan

miogenina y se diferencian para fusionarse y formar miofibras multinucleadas (Zammit *et al.*, 2004; Le Grand *et al.*, 2007).

Una subpoblación de esos mioblastos seguirá expresando Pax7, perderá la expresión de marcadores miogénicos y eventualmente dejarán el ciclo celular. Son estas células las que se ha postulado representan a las células satélite con capacidad de auto-renovación y son las principales o únicas mediadoras de la regeneración de músculo en el adulto (Figura 6).



**Figura 15. Representación esquemática de la miogénesis y los factores reguladores relacionados con cada fase (Modificado de Bentzinger *et al.*, 2012)**

### **1.2.3 Cultivo primario de células miogénicas**

El cultivo de células musculares es una técnica valiosa para estudiar el crecimiento muscular y su diferenciación a nivel celular. Las condiciones establecidas de cultivo proveen un ambiente relativamente controlado, en donde la morfología, la proliferación y la diferenciación, así como la tasa de síntesis y degradación de proteínas, pueden ser estudiadas y monitoreadas de forma más fácil y precisa que en el tejido muscular de un animal (Dayton *et al.*, 1987).

De todas las células que constituyen el tejido muscular, sólo los mioblastos tienen capacidad de proliferación y son las únicas que van a sobrevivir en el medio de cultivo. El número de mioblastos es máximo en el momento de nacimiento del individuo y disminuye progresivamente con la edad (Fernández *et al.*, 1992). No obstante a las dificultades que representa obtener un cultivo primario, éste resulta un buen modelo de estudio, ya que permite la observación del proceso de proliferación, de diferenciación y de fusión de las células para dar lugar a los miotubos, con lo cual se logra un reflejo cercano de lo que ocurre *in vivo*.

## **1.3 Vía de señalización Wnt**

La familia Wnt está constituida por un conjunto de glicoproteínas que modulan la proliferación celular, la actividad de células pluripotenciales y el destino que adoptarán estas células en diferentes tejidos embrionarios y adultos (Wagers, 2008). En mamíferos se han reportado 19 proteínas Wnt (Nusse, 2008; Barker, 2008) que, aunque tienen homología en su secuencia de aminoácidos presentan diferentes funciones de señalización.

### **1.3.1 Vía de señalización canónica Wnt**

La vía de señalización canónica Wnt involucra a la proteína  $\beta$ -Catenina. En ausencia de Wnt,  $\beta$ -Catenina es blanco de un conjunto proteico multimérico denominado complejo de destrucción, conformado por Axina, *Adenomatous polyposis coli* (APC),



casein cinasa 1 (CK-1) y la Glucógeno sintasa cinasa (GSK) $3\beta$ . APC recluta y estabiliza a  $\beta$ -Catenina al complejo de destrucción, donde es fosforilada primero por CK-1 en Ser345, Ser33 y Ser37 y posteriormente en Thr41 por (GSK) $3\beta$  (Barker, 2008; Rao y Kühl, 2010). Estas fosforilaciones marcan a  $\beta$ -catenina para su ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma.

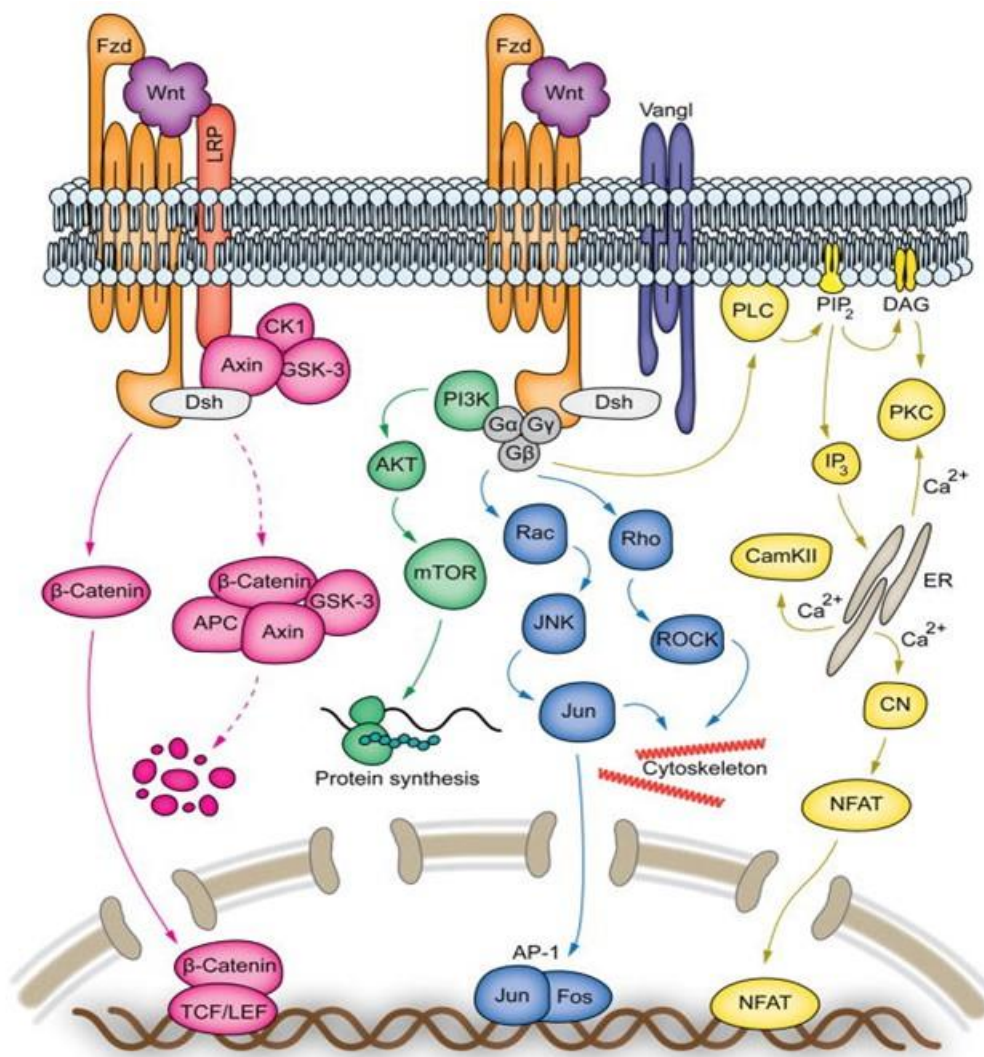
En presencia de algunos ligandos Wnt, se inicia una cascada de eventos en la membrana plasmática por la unión de Wnt a los receptores Frizzled, lo cual resulta en el desensamble del complejo de destrucción y la estabilización de  $\beta$ -Catenina. La  $\beta$ -Catenina citoplasmática se acumula y eventualmente es importada al núcleo, donde funciona como co-activador de factores de transcripción de la familia TCF/LEF (Figura 7, en rosa) (Barker, 2008; Rao y Kühl, 2010). Los genes blanco de TCF/LEF están involucrados en la regulación de la proliferación celular, el mantenimiento de células pluripotenciales o en la diferenciación.

### **1.3.2 Vías de señalización Wnt no canónicas**

Las actividades de señalización de Wnt independientes de  $\beta$ -Catenina constituyen vías de señalización no canónicas, las cuales están menos caracterizadas que la vía canónica. Como ejemplo se encuentran las cascadas de señalización PCP, Wnt/ $Ca^{2+}$  y PI3K/AKT/mTOR (Figura 7, en verde).

La cascada Wnt/PCP regula los cambios en la organización del citoesqueleto, los cuales son necesarios para la migración y la polarización celular. Los componentes centrales de esta vía incluyen a Fzd, Vangl, Dsh y Prickle (Vladar *et al.*, 2009). La interacción entre estos factores en la vía de señalización Wnt puede resultar en la activación de GTPasas Rac y Rho, lo cual conduce a la remodelación del citoesqueleto y/o a la inducción de genes blanco de Jun (James *et al.*, 2008) (Figura 7, en azul).

La vía Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  ha sido relacionada en múltiples funciones, entre ellas la adhesión celular y el movimiento celular durante la gastrulación. En esta cascada, la unión de Wnt a los receptores Fzd induce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Figura 7, en amarillo). El incremento intracelular de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  activa la calcineurina, induciendo la activación de NFAT (Hogan *et al.*, 2003). Además, se ha reportado que la unión de Wnt7 a Fzd7 activa directamente la vía AKT/mTOR (Von Maltzahn *et al.*, 2012), lo que provoca hipertrofia en las miofibras.



**Figura 7. Vías de señalización Wnt** (ver descripción en el texto) (Von Maltzahn *et al.*, 2012)

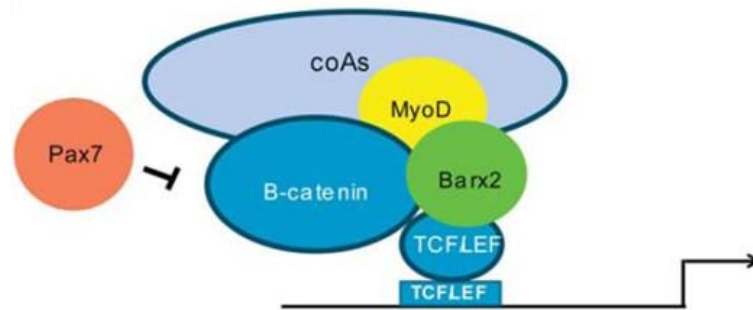
### 1.3.3 Regulación de miogénesis por la vía Wnt

La vía de señalización Wnt controla la expresión de factores de regulación miogénica (MRF's) durante el desarrollo del músculo en la etapa embrionaria, ya que la deficiencia de *Wnt1* y *Wnt3* provoca que el dermomiótomo no se desarrolle bien y disminuya la expresión de *Pax3* y *Myf5* (Ikeya y Takada, 1998). A su vez, la expresión de *Myod-1* es inducida por *Wnt7a* y *Wnt6* (Tajbakhsh *et al.*, 1998).

En el músculo esquelético adulto la vía de señalización canónica de Wnt regula la diferenciación de las células satélite y la vía no canónica regula la auto renovación de las células satélite y el crecimiento de las fibras musculares (Von Maltzahn *et al.*, 2012).

El daño en músculo esquelético produce un aumento en la señalización por la vía Wnt, elevando la expresión de *Wnt5a*, *5b*, *7a* y *7b* de acuerdo a observaciones en células CD45+ pluripotenciales derivadas de músculo en regeneración (Poleskaya *et al.*, 2003), siendo la diferenciación y fusión de mioblastos para la formación de los miotubos la principal función de esta vía durante la regeneración del músculo, ya que se ha observado que en presencia de antagonistas de Wnt (sFRP3) se inhibe la formación de miotubos y disminuye la expresión de Miogenina y *Mrf4* (Vyas *et al.*, 2002).

Además, *Pax7* ha sido reportado recientemente como un regulador negativo de la diferenciación de células musculares a través de su interacción con  $\beta$ -Catenina (Zhuang *et al.*, 2014) (Figura 8). La vía canónica de Wnt induce la expresión de *Barx2*, el cual tiene la capacidad de interaccionar con el complejo de proteínas formado por  $\beta$ -Catenina y TCF/LEF. *Pax7* puede antagonizar la unión de *Barx2* a  $\beta$ -Catenina, dando como resultado la desregulación de genes blanco de Wnt y una mayor proliferación de células musculares. Por otro lado, *Wnt3a* puede inhibir la expresión de *Pax7* a nivel de proteína (Hulin *et al.*, 2016).



**Figura 8. Regulación transcripcional a través de la interacción de Pax7 y Barx2 con el complejo  $\beta$ -catenina-TCF** (Zhuang *et al.*, 2014)

## 2. ANTECEDENTES

Se ha propuesto que la invasión del tejido muscular por *T. spiralis* desencadena dos eventos principales: la des-diferenciación en la porción de músculo infectada y los cambios específicos en la expresión genómica de los mionúcleos, que conllevan a una transformación de la porción de tejido afectada hacia la célula nodriza y la activación y proliferación de las células satélite. Estos eventos están mediados por un amplio espectro de moléculas efectoras que aún no se han caracterizado por completo, las cuales se producen al inicio de la invasión del músculo, destruyen el ambiente existente en la célula del hospedero y construyen un nuevo hábitat para el parásito (Ko *et al.*, 1994; Ko *et al.*, 1999).

Los efectos *in vitro* de *T. spiralis* en células musculares, se han estudiado utilizando un modelo de cultivo primario de miocitos. Así, se encontró que cuando los productos de excreción/secreción de la LRN y de LM se añadieron a cultivos de 5 días, inducen cambios morfológicos y estructurales en los miotubos, los cuales adquirieron una apariencia más granular y presentaron la formación de nódulos, mientras que al ser añadidos a cultivos de 3 días, los miotubos se volvieron más delgados y perdieron la capacidad de formar redes. Efectos similares se obtuvieron al cultivar miocitos en presencia de LRN. Por el contrario, los PES de parásitos adultos no tuvieron ningún efecto (Leung *et al.*, 1997), sugiriendo que los PES de LRN y de L1 tienen reguladores negativos del desarrollo muscular. Sin embargo, este trabajo se limitó al estudio morfológico de las células musculares.

La infección intracelular de *T. spiralis* causa un severo daño en las células musculares que resulta en la activación y proliferación de las células satélite. Esto ha justificado el estudio de los cambios en la expresión de genes involucrados en el desarrollo muscular, utilizando tejido muscular de ratón infectado con *T. spiralis*. Se ha observado que a consecuencia de la infección por *T. spiralis* los niveles de expresión de *Myog* y *Myod-1* aumentan, alcanzando su punto máximo a los 13 y 18 días post-infección respectivamente, mostrando una cinética similar a la que se

observa como consecuencia de daño muscular o bien durante la des-diferenciación. Sin embargo, los niveles de *Mrf4*, responsable del mantenimiento del fenotipo muscular, permanecieron sin cambios significativos (Wu *et al.*, 2001).

Para investigar los genes responsables de la formación de la célula nodriza, se realizó un análisis del tejido infectado con *T. spiralis* para detectar mediante microarreglos los genes con niveles de expresión alterados en comparación con el tejido no infectado. Se analizaron 1176 genes, que incluyeron genes responsables de diferenciación celular, proliferación, ciclo celular y apoptosis. Algunos de los cambios principales se observaron en NFAT, el cual es un gen relacionado con la diferenciación celular y el crecimiento, que tuvo una expresión 10 veces mayor como consecuencia de la infección por *T. spiralis*. Asimismo, el gen de la proteína TNF-R1, asociada a apoptosis, tuvo un incremento de 12 veces en su expresión. La expresión de ciclinas D2, D3, C, E1 y B2 y de diversos factores de crecimiento como IGF (*Insulin-like growth factor*), FGF (*Fibroblast growth factor*) y BMP (*Bone morphogenetic proteins*) también mostraron un aumento (Wu *et al.*, 2005).

Este estudio se amplió posteriormente, al evaluar 30,000 genes y comparar los efectos de la infección por *T. spiralis* y *T. pseudospiralis* en la expresión genética de las células musculares. En ambos casos se observó un aumento en la expresión de *Pax7* y desmina, genes que se activan durante el desarrollo muscular cuando las células satélite están activas y hay proliferación, miogénesis y regeneración, así como de genes involucrados en la diferenciación miogénica, como *Mef2c* (*Myocyte enhancer factor 2C*) y galectina y genes asociados al control del ciclo celular como retinoblastoma 1 y p21 (Wu *et al.*, 2008). Por otro lado, en células C2C12, derivadas de mioblastos murinos, tratadas con PES de LM la expresión de *Myod-1*, miogenina y *p21* disminuyeron como consecuencia del tratamiento mientras que los niveles de ciclina D1 aumentaron (Bai *et al.*, 2011)

Estos estudios demuestran que la infección por *T. spiralis* ocasiona cambios en la expresión de diversos genes involucrados en la regulación de ciclo celular,

miogénesis y apoptosis, entre otros. Sin embargo, existen algunas contradicciones entre los estudios realizados *in vivo* e *in vitro*; tal es el caso de los niveles de *Myod-1*. Cabe mencionar que la diferencia entre estos resultados puede ser atribuida al modelo utilizado y a las diferentes etapas durante el proceso de la formación de la célula nodriza que fueron analizadas, ya que los estudios *in vitro* se realizaron en una línea celular, que debido a su procedencia podría sufrir alteraciones en la regulación de los factores relacionados con la miogénesis, mientras que los estudios *in vivo* se realizan con RNA extraído de tejido muscular infectado, el cual pudo incluir diferentes tipos celulares.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

En estudios previos se han reportado alteraciones en la expresión de genes en músculo infectado por *T. spiralis*, sin embargo, estos cambios corresponden a una etapa donde la célula nodriza ya ha sido completamente formada. Para conocer los cambios que ocurren en las células musculares en las etapas iniciales de la infección, correspondientes a la proliferación y diferenciación de los mioblastos es necesario utilizar otros modelos de estudio. Por lo anterior, el análisis de la expresión genética de cultivos primarios tratados con PES de LM de *T. spiralis* permitirá determinarlas alteraciones en diversos procesos biológicos involucrados en los cambios asociados a la infección de *T. spiralis* en músculo esquelético durante la etapa que abarca la proliferación hasta la re-programación de las células musculares para permitir la formación de la célula nodriza.

### **4. HIPÓTESIS**

Los PES de LM de *T. spiralis* inducen cambios en factores de regulación miogénica y afectan vías que regulan la proliferación y la diferenciación de las células musculares.



## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar los cambios de expresión génica relacionados con miogénesis inducidos por productos de excreción-secreción de *Trichinella spiralis* en un modelo de cultivo primario de mioblastos.

### 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ⌘ Analizar la expresión génica de células musculares tratadas con PES de LM de *T. spiralis*
- ⌘ Evaluar la remodelación del citoesqueleto de actina y la expresión de un marcador de diferenciación (MHC) en células tratadas con PES de *T. spiralis*
- ⌘ Evaluar la proliferación celular en cultivos tratados con PES de *T. spiralis*
- ⌘ Comprobar las alteraciones en los niveles de expresión de diferentes factores de regulación miogénica en células musculares tratadas con PES de LM de *T. spiralis*
- ⌘ Evaluar el papel de la vía WNT en los cambios inducidos en células tratadas con PES de *T. spiralis*

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Cultivo primario de miocitos**

#### **6.1.1 Digestión enzimática de músculo de ratón neonato**

Se obtuvo el músculo de las patas posteriores de 4 ratones neonatos de 2-4 días de edad, en una caja Petri de 60 mm con 1 ml de la solución PBS-A (PBS 1x, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml y anfotericina B 250 µg/ml) y el tejido obtenido se lavó con la solución de PBS-A 4 veces. La digestión se realizó usando una versión modificada del método publicado por Das et al. en el 2007 para lo cual se agregó la tripsina-verseno 0.25% diluida 1:5 en PBS-PE (PBS 1x, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml) y se incubó a 32 °C en baño de agua durante 120 min. Una vez transcurrido el tiempo de la digestión se agregó medio de proliferación (MME (In vitro), Suero bovino fetal (SBF, IPAA) 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml y MEM aminoácidos esenciales 1X) para inactivar la tripsina. El tejido se disgregó mecánicamente con pipeta Pasteur, se sedimentó durante 3 minutos y posteriormente se recuperaron 6 ml de la suspensión en un tubo cónico y se repitió la disgregación hasta obtener 12 ml de la suspensión celular la cual se dividió en 2 tubos para la estratificación en medio de proliferación [MME (In Vitro), penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml, Albumina Sérica Bovina 4% (ASB) (Sigma)]. Enseguida, se centrifugó cada tubo a 1500 rpm 10 min y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron, se recuperó la suspensión celular de ambos tubos y se determinó la concentración y la viabilidad celular con la tinción con Azul Tripano al 0.4% en PBS.

#### **6.1.2 Diferenciación de mioblastos a miotubos**

Las células obtenidas se sembraron a una densidad de 52,083 cel/cm<sup>2</sup> (500,000 células en cada pozo de la placa de 6) en un volumen final de 4 ml de medio de proliferación. Las células se cultivaron en una incubadora a 37°C y 5% de

CO<sub>2</sub>. Transcurridas 24 horas, se retiró el medio en su totalidad y se sustituyó por medio de diferenciación conservando 4 ml como volumen final y realizando cambios parciales (~2 ml) de medio cada 4 días. El cultivo se mantuvo por 8 días en medio de diferenciación [DMEM (PAA), SBF (PAA) 3%, SBA 7% suplementado con penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml, glutamax 200mM (Gibco) y MEM aa(Gibco)], en una incubadora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

## **6.2 Obtención de Productos de Excreción-Secreción (PES) de larva muscular (LM) de *T. spiralis***

Los PES de larva muscular se obtuvieron de larvas musculares de *T. spiralis*(MSUS/MEX/91/CM-91) a partir de ratones CD-1 infectados, al menos 30 días después de la infección de acuerdo a protocolos previamente reportados (Gamble *et al*, 1988; Appleton *et al*, 1993). Brevemente, las LM se recuperaron del músculo de ratones infectados mediante una digestión ácida con pepsina, posteriormente se incubaron en medio RPMI 1640 libre de suero suplementado con penicillina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml, a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Después de 72 h de incubación, se recolectó el sobrenadante, se filtró con una membrana de 0.2 µm, se precipitó con sulfato de amonio y se dializó con PBS 1x. Se determinó la concentración de las proteínas obtenidas mediante el método de Bradford y se verificó su integridad mediante SDS-PAGE. Los PES obtenidos se alicuotaron y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

## **6.3 Extracción de RNA**

El RNA total de los cultivos primarios se extrajo utilizando TRIZOL (In vitro) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y el RNA obtenido se trató con DNAsa I (Fermentas) y se purificó por el método de fenol-cloroformo como se describió previamente (Sambrook, 1989). La pureza del RNA se determinó mediante el del

espectrofotómetro (proporción 1.8-2.0 en absorbancias 260/280 y 260/230) y su integridad se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa con formaldehído.

## **6.4 Microarreglos de DNA**

### **6.4.1 Impresión, hibridación y lectura**

Las laminillas fueron impresas con la biblioteca de oligonucleótidos (65 nt) de ratón (Sigma-Genosys) en la Unidad de Microarreglos de DNA del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Esta biblioteca tiene una cobertura de 22,000 ORFs transcritos del genoma de ratón. La impresión y ejecución de los experimentos de microarreglos fue realizada por el personal técnico de la unidad. Brevemente, se utilizaron 10 µg de RNA total como molde para transcripción reversa y marcaje simultáneo del cDNA, con los fluoróforos Cy3 o Cy5 según fuera el caso. Los productos se cuantificaron por espectrofotometría y se ajustaron a la misma concentración, previa validación de que la eficiencia de incorporación de la marca fue similar. Los microarreglos fueron hibridados y lavados según las especificaciones locales. La lectura de los microarreglos se llevó a cabo mediante el sistema de lectura confocal laser ScanArray 4000 de Packard BioChips y la cuantificación se realizó con el programa Array Pro Analyzer.

### **6.4.2 Manejo y análisis estadístico de los datos**

El manejo general de los datos y la generación de archivos de entrada se realizó en hojas de cálculo de Excel 2010 (Microsoft). El análisis estadístico de los datos crudos se realizó con el programa GenArise (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>) (Gómez *et al.*, 2006), e incluyó la corrección de fondo, el promedio de los spots réplica y la normalización con el algoritmo Locfit. Este algoritmo se utilizó para calcular la media y la desviación estándar para cada uno de los datos y así definir

el valor de z, el cual indica el número de desviaciones estándar que separan a cada uno de los datos con respecto a la media,

$$z_i = [R_i - \text{media}(R)] / \text{sd}(R)$$

donde  $z_i$  es el valor de z para cada elemento,  $R_i$  es el log-ratio de cada elemento, and  $\text{sd}(R)$  es la desviación estándar del log-ratio. Los archivos de salida fueron analizados manualmente en Excel 2010 (Microsoft), para calcular los valores de expresión relativa (valor de R), así como los filtros estadísticos (de signo y de proporciones cruzadas) para incorporar la réplica swap, como se describe en la sección de resultados. Utilizando el valor de z como referencia, los genes con un z-score mayor a 2 desviaciones estándar por arriba o por debajo de la media se tomaron como genes con expresión alterada significativamente.

### **6.4.3 Análisis biológico-ontológico**

Una vez calculados los valores de expresión, se realizó un análisis funcional de los transcritos cuyo nivel resultó alterado. Este análisis consistió en clasificarlos por categorías de acuerdo a los procesos o estructuras biológicas en los que participan sus productos, posteriormente se identificaron las categorías biológicas que tuvieron mayor número de representantes. Para esto se siguieron las estrategias descritas a continuación:

Para realizar una clasificación automática de los transcritos de acuerdo con la Ontología Genética (GO, Gene Ontology), se utilizó el servidor AmiGO (The Gene Ontology Consortium, 2000). La herramienta GO Term Enrichment se utilizó para evaluar e identificar los términos de ontología genética representados significativamente por el conjunto de genes cuya expresión se encontró alterada mediante el análisis de microarreglo. El archivo de entrada consistió en una lista de genes cuyo valor de Z fuera superior a 2 o menor a -2.

Con el fin de identificar las vías metabólicas o componentes celulares más representados en el conjunto de transcritos alterados, se utilizó la herramienta de

búsqueda Search & Color Pathway de la base de datos KEGG2 (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>) (Ogata *et al.*, 1999), para esto se utilizaron listas de nombres de genes con patrones de expresión aumentados o disminuidos.

## **6.5 Ensayos de proliferación**

Para los ensayos de proliferación, las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/ml en 100  $\mu$ l. Después de 24 h de incubación en medio de proliferación, se indujo la diferenciación de las células como fue descrito anteriormente y se realizó la adición de PES de LM a diferentes concentraciones. La tasa de proliferación de las células se evaluó a los 4 días en medio de diferenciación monitoreando la conversión de MTT a formazán. Para ello se incubaron las células durante 3 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> con MTT (Cat. M5655, Sigma-Aldrich), después del tiempo de incubación se retiró todo el medio de los pozos y los cristales de formazán formados fueron disueltos con DMSO (100  $\mu$ l/pozo) incubando nuevamente por 30 min a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se midió la absorbancia de las muestras a 595 nm utilizando un lector de microplacas (Thermo Scientific Multiskan EX). Las células se sembraron utilizando únicamente los pozos internos para minimizar las variaciones debidas a la mayor evaporación de medio que sufren los pozos de la periferia. La absorbancia de las muestras sin tratamiento (Control) se tomó como el 100% de proliferación y la curva de proliferación se realizó graficando la absorbancia contra la concentración de PES utilizada para cada pozo.

## **6.6 Análisis de expresión por qRT-PCR**

La cuantificación de la expresión de diversos genes se realizó por qRT-PCR y la lista de genes evaluados y la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para realizar las amplificaciones se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para realizar las amplificaciones mediante qRT-PCR**

Gen	Oligonucleótidos 5´-3´	Tm (°C)	Tamaño amplicón (pb)	Fuente
<b><i>Csnk2a2</i></b>	F: GAGGCCCTAGATCTTCTTG R: CGCGTTAAGACGTTTTGATT	60	249	Koch <i>et al.</i> , 2013
<b><i>Barx2</i></b>	F: GAGTCAGAGACAGAACAGCCC R: GATACCAAGTCTTCACTTGCAGC	60	187	Este trabajo
<b><i>Mef2a</i></b>	F: GCCGGACAAACTCAGACATT R: TGGGATGGTAACTGGCATCT	60	172	Hildyard y Wells, 2014
<b><i>Myf5</i></b>	F: CCACCAACCCTAACCAGAGAC R: GCTGTTCTTTCGGGACCAGAC	60	209	Este trabajo
<b><i>MyoD</i></b>	F: CTACAGTGGCGACTCAGATG R: GTAGTAGGCGGTGTCTAG	60	118	Este trabajo
<b><i>MyoG</i></b>	F: CATCCAGTACATTGAGCGCCTA R: GAGCAAATGATCTCCTGGGTTG	60	190	Bai <i>et al.</i> , 2012
<b><i>Pax3</i></b>	F: CAGGTAATGGGACTTCTGACC R: GGGGACAATAGGGCTGAGAT	60	181	Wu <i>et al.</i> , 2008
<b><i>Pax7</i></b>	F: TATCGGAGGCAGCAAGCC R: CTTGATTCTGAGCACTCGGC	62	184	Este trabajo
<b><i>Timosina β4</i></b>	F: CCTCTGCCTTCAAAGAAACAAT R: AAGGGGCAGCACAGTCATTT	60	184	Este trabajo
<b><i>Trim32</i></b>	F: CTCAAGAAGATGGGGGCGAA R: CACGAAGCTATCAATGCCGC	60	183	Este trabajo
<b><i>α-Actina</i></b>	F: GTTGGATTCTGGGGACGGTG R: GATGTCGCGCACAATCTCAC	60	181	Este trabajo

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando SYBR-Green (One-Step qRT-PCR, Kapa Biosystems). El análisis de los datos se realizó utilizando StepOne Software versión 2.3. La expresión de los genes blanco se normalizó utilizando *Csnk2a2*

como gen de referencia. El cálculo de los niveles de expresión relativa se realizó utilizando el método del Ct comparativo mediante la fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak y Schmittgen 2001).

## **6.7 Inmunofluorescencia indirecta**

Para la inmunotinción, las células se sembraron en placas ópticas de 96 pozos (Nunc®) y se fijaron con formaldehído 3% en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se permeabilizaron con Tritón X100 0.2% en PBS por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó el bloqueo con BSA 3% en PBS a 37 °C durante 1 h, seguido de la tinción con Azul de Evans 0.02% durante 30 minutos. A continuación, se realizó la incubación con los siguientes anticuerpos a 4°C toda la noche: Anticuerpo monoclonal primario anti-cadena pesada de miosina de ratón diluido 1:50 (MYH1/2/3, sc-53092, Sta. Cruz) o bien Anticuerpo primario anti- $\alpha$ -Actina de ratón monoclonal diluido 1:50 ( $\alpha$ -Actin Sr-1, sc-58671, Santa Cruz) Después las células se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a FITC (Goat anti-mouse IgM-FITC, sc-2082, Santa Cruz) diluido 1:200 a 37 °C durante 2 h. Finalmente los núcleos se tiñeron con DAPI y las células se visualizaron por microscopía confocal (Zeiss®).

## **6.8 Fraccionamiento de G-Actina y F-Actina**

Para realizar el fraccionamiento de G-Actina y F-Actina, se utilizaron células de cultivos primarios tratados y no tratados con PES con 8 días en diferenciación, mantenidos en las condiciones descritas previamente en la Sección 6.1.2.

Se realizó la solubilización del pellet celular utilizando 60  $\mu$ l de buffer PBS 1x suplementado con 0.1% de Tritón X100, 1mM PMSF e inhibidores de proteasas Complete 1x (ROCHE). Las células se resuspendieron ligeramente por pipeteo y se mantuvieron 5 min en agitación suave por inversión a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión celular se centrifugó a 15000 g, a 4 °C durante 5 min.



Se separó el sobrenadante (que contiene a la G-Actina y demás proteínas solubles) y la pastilla celular (que contiene a la F-Actina y otros componentes de citoesqueleto) se resuspendió por pipeteo en 60 µl de buffer RIPA. Para evaluar el perfil de proteínas, mediante SDS-PAGE y Western Blot, se utilizaron volúmenes equivalentes de cada fracción.

## **6.9 Ensayos de Western Blot**

Se realizó la extracción de proteína total de cultivos primarios tratados y no tratados con PES utilizando buffer RIPA suplementado con 1mM PMSF y Complete 1x (ROCHE) a diferentes tiempos bajo condiciones de diferenciación. La concentración de las muestras se determinó mediante el método de Bradford (BioRad) y la integridad de las proteínas se verificó mediante SDS-PAGE 10%.

Para los ensayos de Western Blot se utilizaron 10 µg de cada muestra y las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (BioRad). Las membranas se bloquearon con Leche ProPure (Amresco) al 2% en Buffer TBS-T (Tween-20 0.1% en TBS) toda la noche a 4 °C. Posteriormente se incubaron con los siguientes anticuerpos diluidos en solución de bloqueo: anti-Pax7 (Santa Cruz, sc-25409, 1:1000), anti-Myf5 (Gene Tex, GTX63307, 1:1000), anti-Miogenina (Gene Tex, GTX63352, 1:1000 ), anti- GAPDH (Gene Tex, GTX100118, 1:5000 ), anti-MYH (Santa Cruz, sc-20641, 1:1000), anti-α-Actina (Gene Tex, GTX112860, 1:1000), toda la noche a 4 °C. Finalmente, las membranas se incubaron con Ac de cabra anti IgG de conejo HRP (Gene Tex, GTX85304, dilución 1:1000 - 1:2000), toda la noche a 4 °C. La reacción de peroxidasa se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando ECL western blotting detection reagents (GE Healthcare Buckinghamshire, UK).

## 6.10 Ensayos de Co-inmunoprecipitación

Se realizó la extracción de proteína total de cultivos primarios tratados y no tratados con PES a los 8 días bajo condiciones de diferenciación, utilizando buffer RIPA no desnaturizante (Tris-HCl 25 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1% NP40, 5% Glicerol) suplementado con 1mM PMSF y Complete 1x (ROCHE).

Se tomaron 100  $\mu$ l del lisado y se realizó un pre-aclarado de las proteínas adicionando 5  $\mu$ l de perlas de proteína A-sefarosa con 0.2  $\mu$ g de IgG de conejo (para las inmunoprecipitaciones con anti-Pax7), o 0.2  $\mu$ g de un anticuerpo IgG de cabra anti B7-1 (para las inmunoprecipitaciones con anti- $\beta$ -Catenina). Se incubó 20 min a 4 °C en rotación y posteriormente se centrifugó 30 s a 12000 g. Se recuperó el sobrenadante y se incubó durante toda la noche a 4 °C en rotación con el anticuerpo de interés (1  $\mu$ l de Anti-Pax7, Santa Cruz, sc-25409 con 5  $\mu$ l de perlas de proteína A-sefarosa o 5  $\mu$ l de anti-  $\beta$ -Catenina, Santa Cruz, sc-1496 AC). Posteriormente, la proteína se centrifugó a 12000 g durante 1 min, se descartó el sobrenadante y a la pastilla de perlas se le realizaron 3 lavados con 50  $\mu$ l de PBS 1x. Finalmente, las perlas se resuspendieron en 50  $\mu$ l de PBS 1x.

Para evaluar el perfil de proteínas, mediante SDS-PAGE y Western Blot, se utilizaron volúmenes equivalentes de cada inmunoprecipitación.

## 6.11 Análisis estadístico

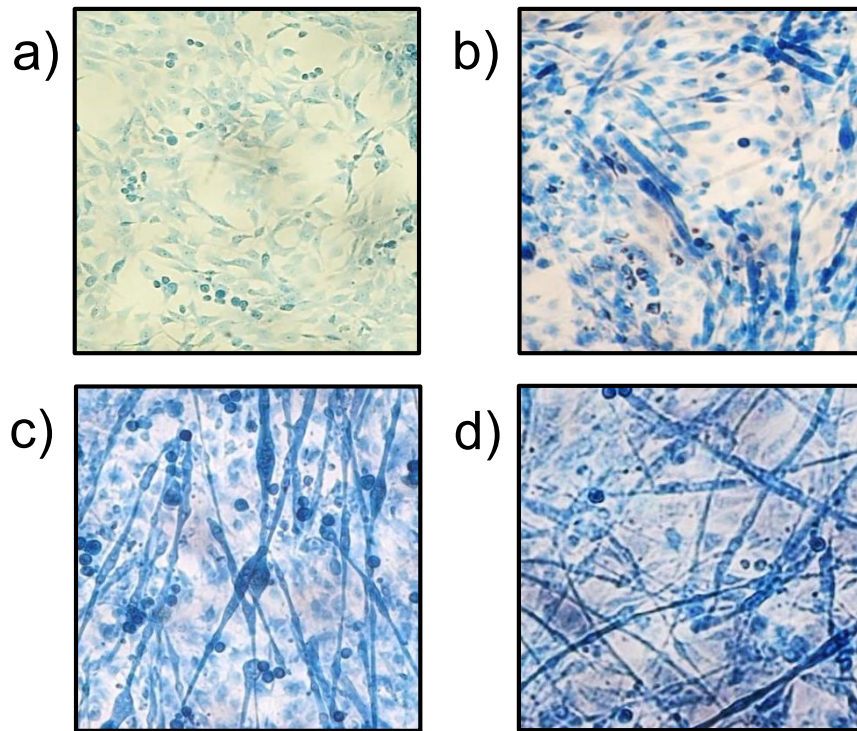
Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar para los ensayos de qRT-PCR y las densitometrías de western blot, y como la media  $\pm$  error estándar de la media para los ensayos de proliferación. La comparación de los datos se realizó utilizando la prueba *t*-Student al 95 y 99% de confianza, utilizando el Software GraphPad Prism 5 para Windows.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 Desarrollo del cultivo primario de miocitos**

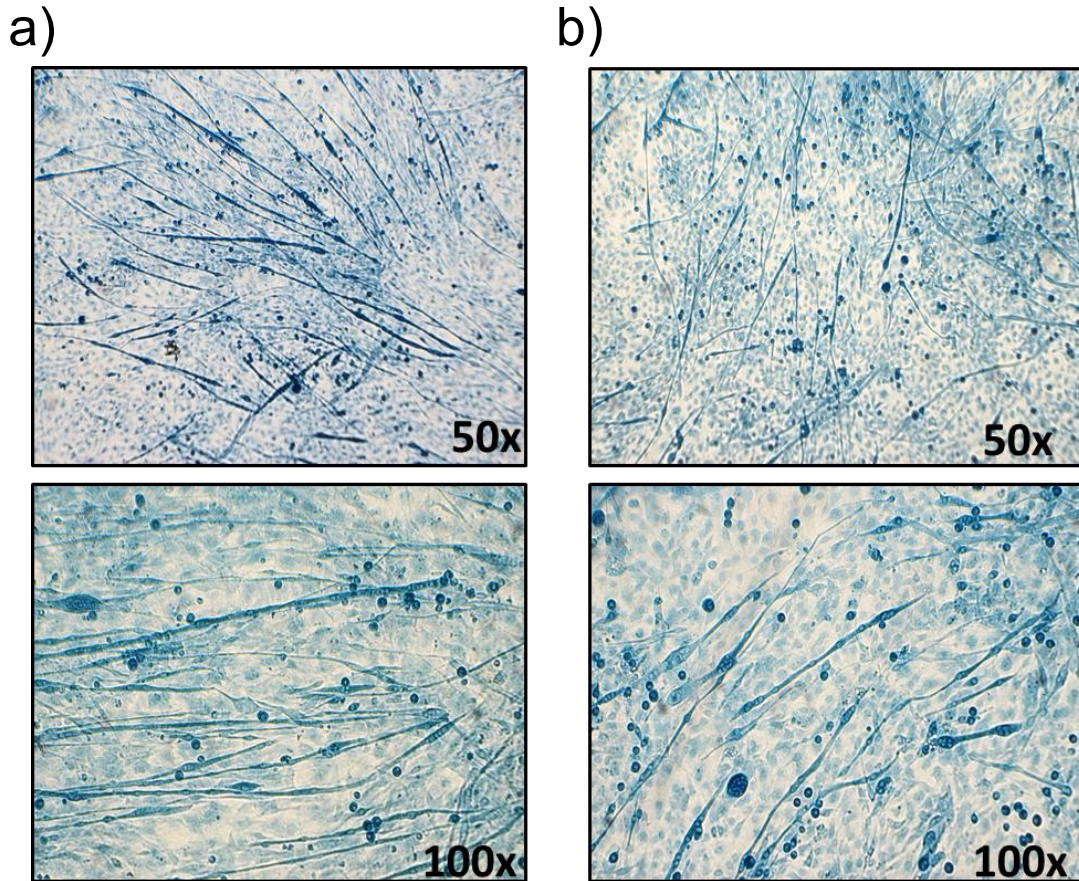
Las células musculares de ratones neonatos de 2-4 días de edad obtenidas como se describe en Materiales y Métodos se sembraron en placas de 6 pozos con una densidad de 52,083 células/cm<sup>2</sup> (500,000 células por pozo). Bajo estas condiciones los cultivos tuvieron un tiempo de vida de 9 días, el cual incluye un periodo de proliferación de 1 día y 8 días de diferenciación.

Transcurridas las primeras 24 h del cultivo en medio de proliferación se indujo la diferenciación de las células hacia miotubos. En los dos primeros días posteriores a la inducción, se observaron células pequeñas y redondeadas y a partir del tercer día éstas desarrollaron pequeñas prolongaciones, iniciándose la formación de miotubos pequeños alrededor del día 5. A partir del día 6 fue posible observar contracción espontánea de los miotubos en diferentes campos, mismos que se hicieron más largos conforme avanzó el tiempo del cultivo. En la etapa final del cultivo (día 9) se observó una confluencia del 80-90% y un desarrollo de miotubos de 80-90% (Figura 9).



**Figura 9. Morfología de las células del cultivo primario en diferentes etapas de diferenciación.** a) Día 3; b) Día 5; c) Día 7; d) Día 9 del cultivo. Células teñidas con azul de Evans. Fotografías de microscopía óptica, 100x.

Cuando se adicionaron 50  $\mu\text{g}$  de PES a los cultivos en los días 1 y 5 se observó una disminución de hasta el 50% en la formación de miotubos a los 9 días de cultivo (Figura 10). Haciendo uso de la tinción con azul de Evans se logró visualizar la cantidad de núcleos, dentro de los miotubos tanto en los cultivos control como en los tratados con PES. Así, en los cultivos controles se observaron miotubos largos con un máximo de 30-35 núcleos (Figura 10a) y en los cultivos tratados con PES entre 15-20 (Figura 10b). Esta disminución en el número de núcleos que conforman los miotubos también se reflejó en la longitud de los mismos, ya que los miotubos en los cultivos tratados con PES tuvieron una longitud menor que en los no tratados.



**Figura 10. Efecto del tratamiento con PES (50  $\mu$ g adicionados los días 1 y 5 de cultivo) en las células del cultivo primario de miocitos a los 8 días de diferenciación. a) Cultivos sin tratamiento; b) Cultivos tratados con PES. Fotografías de microscopía óptica, 100x.**

## **7.2 Análisis de los cambios en el transcriptoma inducidos por PES en el cultivo primario de miocitos**

### **7.2.1 Microarreglos de expresión**

Se han realizado diversos abordajes para tratar de entender los cambios que induce *Trichinella spiralis* en las células musculares infectadas, sin embargo, hasta el momento el análisis de las modificaciones genéticas inducidas por el parásito sólo se ha realizado mediante estudios *in vivo* (Wu *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008). Utilizar como modelo de estudio el cultivo primario de miocitos permitió evaluar los cambios

morfológicos a la par de las modificaciones en la expresión genética, para un mejor entendimiento de los cambios producidos por *T. spiralis*, además de sentar las bases para realizar posteriormente el análisis por separado de las proteínas contenidas en los productos de excreción-secreción de la LM (PES) de *T. spiralis* causantes de tales cambios. Considerando lo anterior, se realizó el análisis de las modificaciones genéticas inducidas en un cultivo primario de miocitos como consecuencia del tratamiento con PES y desarrollado como se describe en la sección 7.1.

Como estrategia para identificar los cambios en los procesos celulares provocados por los PES en las células musculares, se identificaron los mRNAs cuya abundancia resultó alterada a consecuencia del tratamiento con PES. Para esto se recurrió a microarreglos de expresión en los que se estimó la abundancia relativa de cada transcrito celular bajo tratamiento con PES con respecto a la abundancia de cada transcrito en condiciones sin tratamiento.

El microarreglo usado tenía impresas sondas específicas de 65 nt que corresponden a 22,000 genes de ratón (aproximadamente 70% del genoma), lo que permitió un monitoreo tanto de niveles de mRNAs como de ORFs no descritos o con función hipotética hasta el momento. Para ello, se extrajo RNA total de cultivos con 8 días de diferenciación con o sin tratamiento con PES. Después de obtener los cDNAs, se marcaron con los fluoróforos Cy3 o Cy5 y se ajustaron las concentraciones totales y se mezclaron en la misma proporción tanto los derivados de la muestra control como de la tratada con PES. Posteriormente, se realizó la hibridación en el microarreglo, de manera que cada población de cDNAs de un mismo gen tiende a ocupar en mayor o menor grado el spot correspondiente de acuerdo a su abundancia. El fundamento de este ensayo reside en la competencia que existe entre las dos poblaciones de cDNA (control vs tratada) para hibridar con cada spot correspondiente a un gen específico. Todos los spots fueron cuantificados en la longitud de onda (canal) correspondiente a cada fluoróforo y se registraron los valores finales (datos crudos). Se realizaron dos réplicas biológicas, cada una

constó de dos ensayos, invirtiendo el marcaje entre la muestra control y la tratada con PES (SWAP) para descartar los artefactos de marcaje.

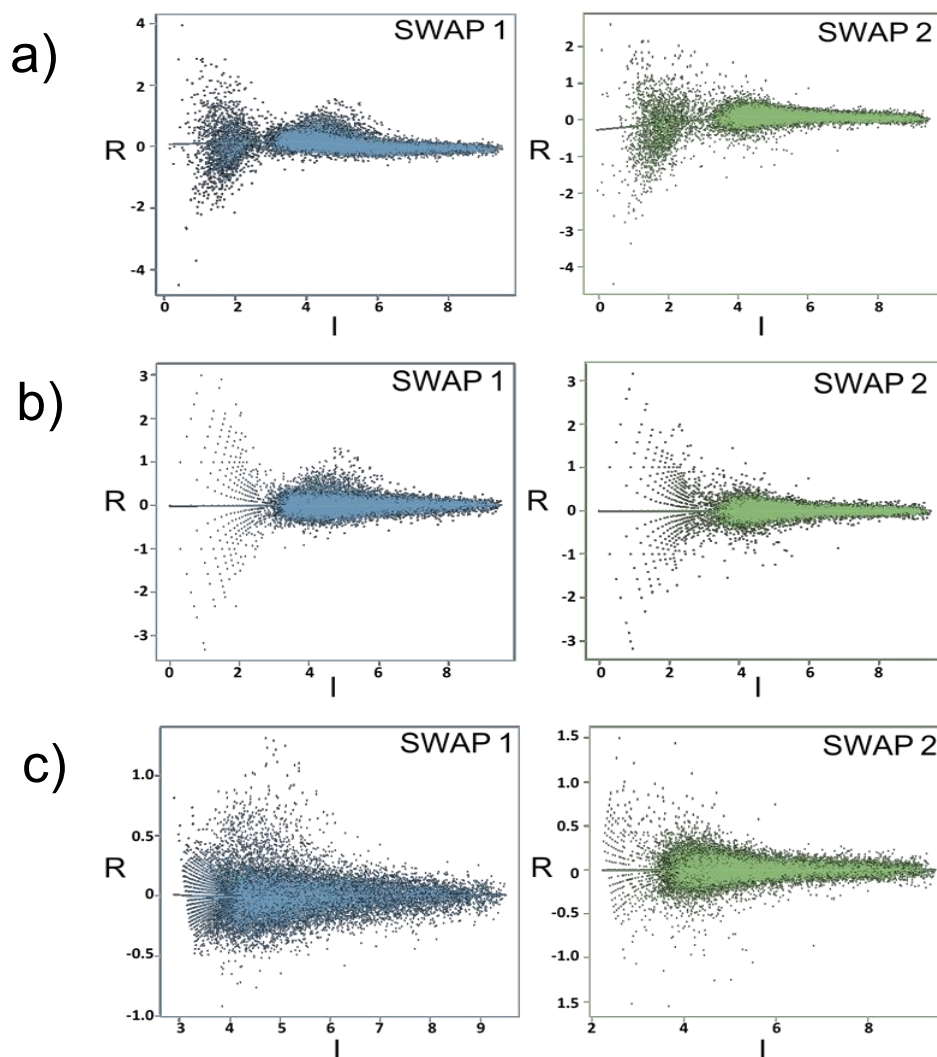
### **7.3 Análisis estadístico de los microarreglos de expresión**

Las diversas etapas en la metodología de microarreglos se someten a análisis estadísticos minuciosos, tanto por la complejidad del experimento como por la cantidad de variaciones que pueden afectar cada etapa de su desarrollo. El análisis elemental de estos datos está encaminado a determinar la confiabilidad de las observaciones, establecer criterios estadísticos para delimitar grupos por diferencia de abundancia, así como la eliminación de falsos positivos y de fondo, para poder extraer la mayor cantidad de información útil. Los datos pueden agruparse estadísticamente para encontrar conjuntos de transcritos que comparten un patrón similar de comportamiento, de acuerdo a sus niveles de abundancia (aumentado, disminuido o sin cambio).

#### **7.3.1 Procesamiento de los datos crudos**

La fase inicial del análisis se realizó con el programa GenArise (Gómez *et al.*, 2006). Al graficar la abundancia relativa ( $R$ , que corresponde al cociente de la señal de la muestra tratada sobre la señal de la muestra control) de cada transcrito contra la intensidad de sus señales ( $I$ ), se observó que los datos cubren un rango variable de intensidad, con cierta desviación en las zonas de baja intensidad (Figura 11a). Se depuró la señal neta de cada spot restándole el valor de fondo al valor de densidad de cada uno, ambos registrados durante la cuantificación del microarreglo. Posteriormente, se normalizaron los datos mediante el método LOCFIT (Figura 11b), que permite corregir la variación intrínseca de un canal de lectura respecto al fondo. Durante la cuantificación de los microarreglos se incluyó una normalización de las lecturas haciendo la consideración de que el fluoróforo Cy3 emite mayores niveles de intensidad a la misma concentración que Cy5. La normalización por LOCFIT se llevó a cabo en grupos de observaciones locales (ventanas) de los

valores de intensidad, de tal manera que la normalización no alteró las diferencias locales a lo largo del rango de intensidades del arreglo. Después de la normalización de los datos se calculó la media aritmética de las señales de cada spot y su réplica dentro del mismo arreglo (Figura 11c). La tabla de datos resultante se utilizó para los siguientes análisis.

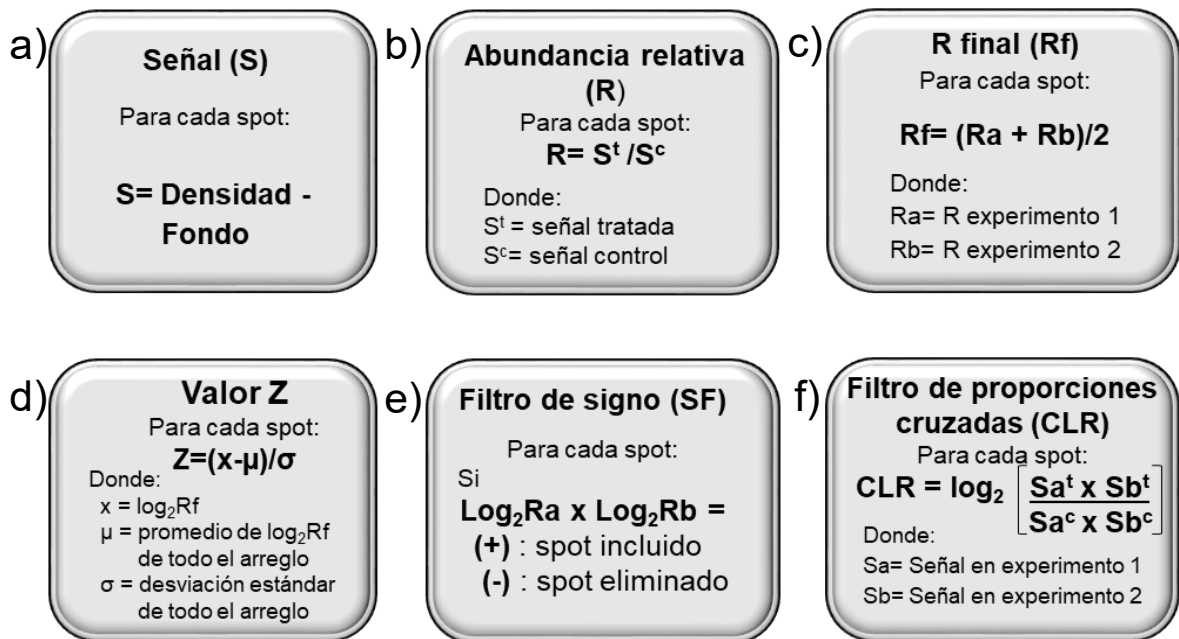


**Figura 11. Procesamiento estadístico de los datos crudos del microarreglo.** Gráficas de dispersión de cada transcrito de acuerdo a sus valores de abundancia relativa (R) y su intensidad (I). a) Datos crudos. b) Normalización de los datos mediante ventanas locales (LOCFIT). c) Promedio de los spots duplicados durante el arreglo. Se muestra el ajuste progresivo del conjunto de datos, correspondientes al análisis de cada uno de los SWAP.



### 7.3.2 Cálculo de la abundancia relativa de los transcritos

Como estrategia para obtener una referencia numérica de la abundancia de cada transcrito en las muestras tratadas con PES respecto a la muestra control, se calculó la tasa de abundancia relativa (R) para cada spot, la cual corresponde al cociente de la señal de la muestra tratada sobre la señal de la muestra control (Figura 12a,b). Para hacer la interpretación de R se asume que la señal de microarreglo refleja la abundancia de cada transcrito en la muestra, de forma que, si la población de cierto cDNA en la muestra tratada es mayor que en la muestra control, el cociente R (tratado/control) será mayor a 1. Por el contrario, si la abundancia en la muestra tratada es menor que en la muestra control el cociente será menor a 1 y si la abundancia es similar en ambas muestras, el valor de R será igual a 1. A cada uno de los casos anteriores se le adjudicó una cualidad que refleja su abundancia con respecto a la muestra control, catalogándolos como transcritos aumentados, disminuidos o sin cambio, respectivamente. En este trabajo se realizaron dos réplicas biológicas, por lo tanto, se tomó como referencia la abundancia relativa final (Rf), la cual abarca ambos ensayos (Figura 12c).



**Figura 12. Descripción de los cálculos usados en el análisis de microarreglos.**

Para un manejo más fácil de los datos se calculó el logaritmo en base dos de cada valor de R ( $\log_2 R$ ), obteniendo valores positivos para los transcritos aumentados (valores de R superiores a 1), valores negativos para los transcritos disminuidos (valores de R inferiores a 1) y valores cercanos a cero para los transcritos sin cambio (Tabla 2).

**Tabla 2. Interpretación de los parámetros de abundancia de los transcritos celulares.**

R	$\log_2 R$	Z	Cualidad de abundancia
<1	-	-	Disminuido
~ 1	~ 0	~ 0	Sin cambio
>1	+	+	Aumentado

Se muestran los tres rangos posibles de los valores de abundancia relativa (R) al igual que los signos correspondientes al expresar dichos valores como  $\log_2 R$  y valor Z. Adicionalmente, a cada rango se le asigna una cualidad de abundancia y un código de colores estándar que será aplicado en las gráficas siguientes.

### 7.3.3 Determinación de diferencias en la abundancia de los transcritos

Como criterio para establecer las líneas de corte para delimitar los grupos de transcritos cuya abundancia resultó alterada en la muestra tratada, se tomó de referencia su diferencia estadística respecto a los transcritos sin cambio. En el caso de los microarreglos de expresión, los valores de  $\log_2 R$  muestran una distribución normal, esto puede ser atribuido a que la mayoría de los transcritos no presentan diferencias de expresión entre la muestra tratada y la condición control o que simplemente no se están expresando al momento de realizar el muestreo.

Utilizando los valores de  $\log_2 R$  de todo el arreglo se puede calcular una media y su respectiva desviación estándar, posteriormente a partir de estos valores es posible calcular el valor de Z para cada transcrito. El valor de Z representa el número de desviaciones estándar que alejan a un dato de la media global, estableciendo el grado de diferencia de una muestra con respecto a la media general (Figura 12d). Con base en criterios estadísticos, se consideraron como aumentados todos aquellos transcritos cuyo valor de Z fue superior a 1 y disminuidos aquéllos con valor de Z inferior a -1. De igual manera, siguiendo estos parámetros es posible clasificar las alteraciones como sutiles ( $Z \geq 1 < 2$ ) o fuertes ( $Z \geq 2$ ).

#### **7.3.4 Análisis de las réplicas experimentales SWAP**

Como estrategia para detectar artefactos originados durante el marcaje del cDNA se realizó un SWAP, que consiste en realizar una repetición experimental del microarreglo invirtiendo el marcaje fluorescente entre la muestra control y la tratada. Para considerar una observación como reproducible es necesario que el transcrito mantenga su categoría de abundancia (aumentado, disminuido o sin cambio) en ambos experimentos, así como sus valores dentro de un rango estadísticamente confiable.

Dado que en el presente trabajo se realizaron dos réplicas biológicas, cada una con dos experimentos a manera de SWAP, para cada réplica se pudieron obtener dos valores de abundancia para cada transcrito, uno correspondiente al primer ensayo y otro a la repetición SWAP. Cada valor R fue calculado como el cociente de la señal de la muestra tratada sobre la señal del control, independientemente del marcaje utilizado (Figura 12b,c).

Los valores R de cada experimento permitieron evaluar la reproducibilidad de las observaciones, siguiéndose dos aproximaciones para realizar el filtrado de los datos no reproducibles entre réplicas biológicas: filtro de signo (SF) y proporciones cruzadas (Cross Log Ratios, CLR).

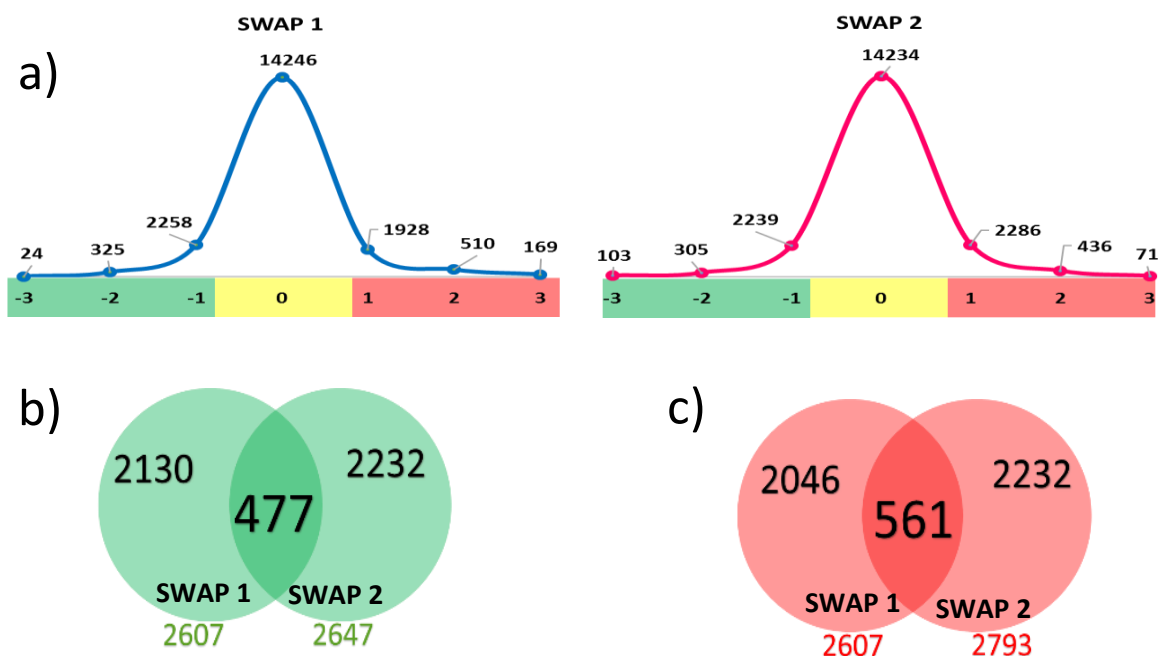
El filtro de signo consiste en calcular para cada transcrito el producto de sus dos valores  $\log_2 R$  (Figura 12e). Con base en este valor, se conservaron los casos donde el producto  $\log_2 R$  tuviera signo positivo (casos reproducibles), eliminándose aquellos con signo negativo, los cuales representan casos inconsistentes debido a que en el primer ensayo resultaron aumentados y en la segunda réplica biológica disminuidos, o viceversa.

Posteriormente se aplicó el filtro de proporciones cruzadas (CLR), el cual consiste en el  $\log_2$  de la proporción de los productos de la señal obtenida en condiciones de tratamiento contra la señal obtenida en condiciones sin tratamiento en ambos ensayos para cada spot (Figura 12f). Los spots que resultaron con signo negativo fueron eliminados pues se consideraron con resultados inconsistentes entre las réplicas.

Al realizar el filtrado estadístico de los datos, se encontraron datos correspondientes a las dos réplicas biológicas de 19107 transcritos, dentro de los cuales, de acuerdo al filtro de signo (SF) y el filtro de proporciones cruzados (CLR), se encontraron 10268 datos con valores reproducibles durante las dos réplicas biológicas. Al analizar los valores Z de estos transcritos se encontró que 49.51% (5084) de los genes mostraron diferencias en su expresión estadísticamente significativas, de los cuales 1038 fueron congruentes en ambas réplicas biológicas, mientras que 50.49% (5184) tenían valores Z cercanos a 0. Al realizar un escrutinio de los datos inicialmente descartados por el filtro de signo, se encontró que 5115 de los transcritos no exhibían una diferencia real en sus niveles de expresión entre la muestra control y la tratada, por lo que fueron reincorporados al análisis, haciendo un total de 15383 transcritos cuyos productos serían objeto de los análisis siguientes.

De acuerdo a lo esperado se observó una distribución normal de estos transcritos en ambos ensayos (Figura 13a). De los transcritos incluidos en ambos análisis 561

presentaron niveles de expresión mayores en la muestra tratada con respecto al control ( $Z \geq 1$ ), mientras que 477 presentaron niveles disminuidos ( $Z \leq -1$ ) (Figura 13b y c).



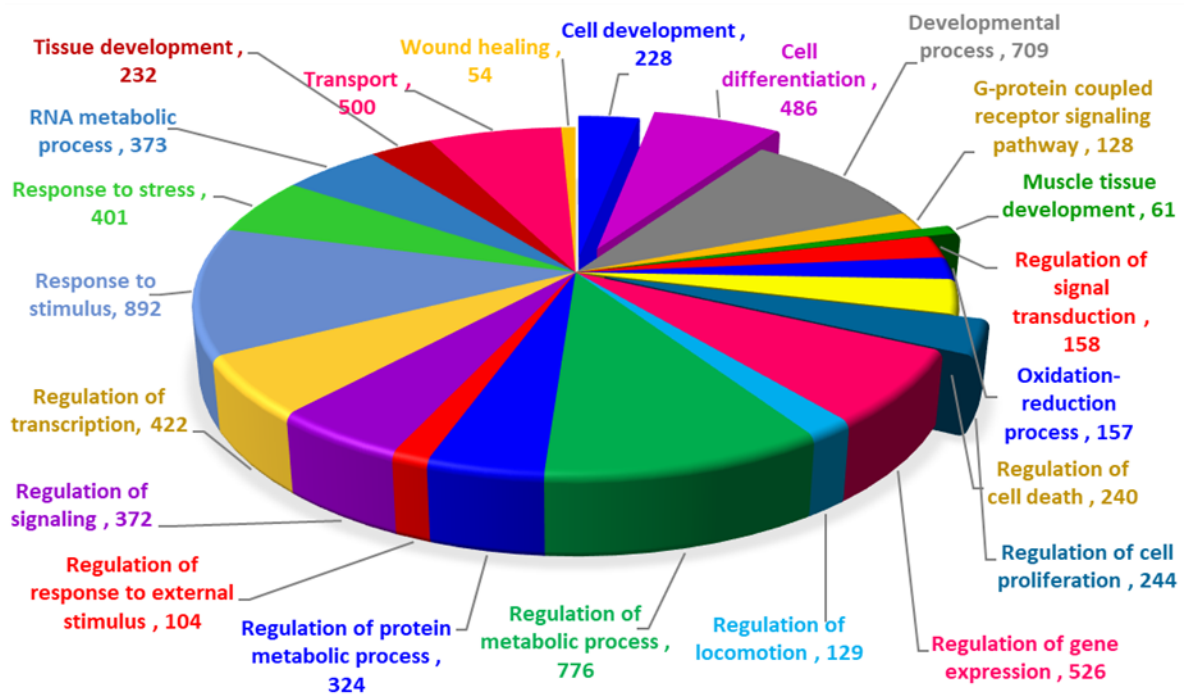
**Figura 13. Distribución normal de los datos del microarreglo e interpretación del valor Z.** a) Campana Gaussiana que muestra la distribución normal de los datos de ambos ensayos, el valor Z representa el número de desviaciones estándar con respecto a la media global. Número de transcritos con expresión disminuida (b) y aumentada (c) en cada uno de los ensayos.

### 7.3.5 Interpretación ontológica de los procesos alterados por el tratamiento con PES

Una vez que se identificaron los transcritos cuya abundancia resultó afectada por el tratamiento con PES de LM de *T. spiralis*, éstos fueron sometidos a un análisis ontológico, clasificándolos de acuerdo a la función descrita para cada uno y analizados en conjunto, para elucidar el significado biológico de lo observado en el microarreglo.

El Consorcio de Ontología Genética (Gene Ontology, GO) (The Gene Ontology Consortium, 2000) plantea una clasificación de los genes de acuerdo a tres distintos parámetros: Proceso Biológico, Función molecular y Componente Celular, a su vez, cada categoría cuenta con diversos subgrupos.

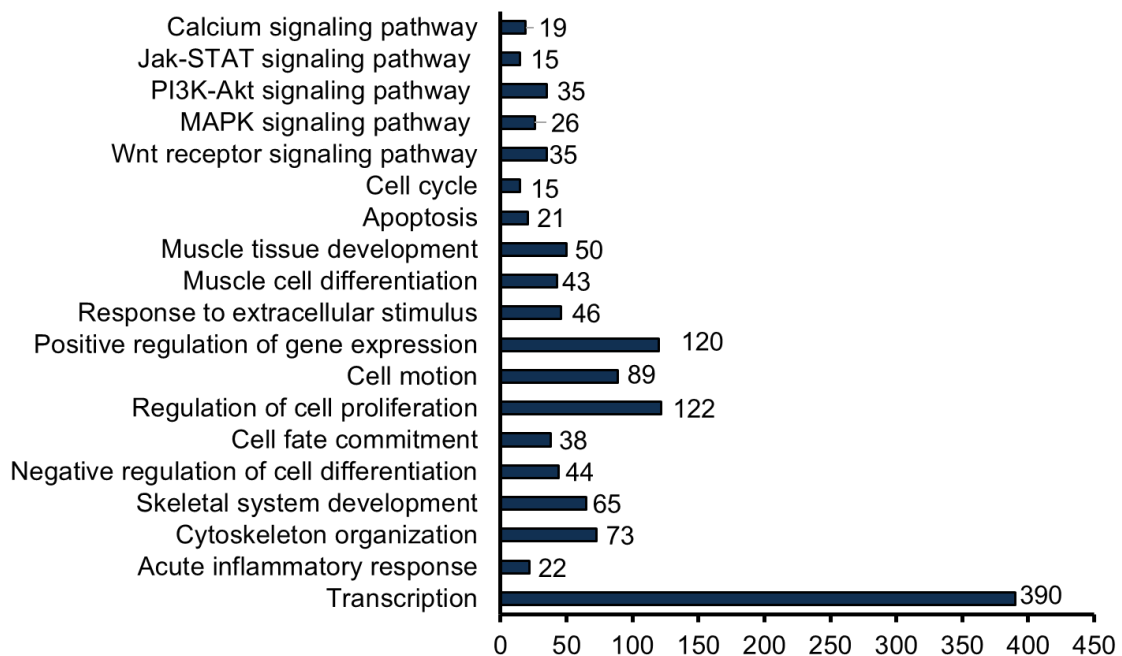
Al realizar la búsqueda de los términos ontológicos representados por los transcritos alterados, se encontró que dentro de los procesos biológicos con mayor representación se encontraban los de regulación de procesos metabólicos, procesos de desarrollo, regulación de expresión de genes y respuesta a estímulos (Figura 14).



**Figura 14. Categorías ontológicas representadas por transcritos con niveles de expresión alterados.** Se muestran algunos de los procesos biológicos en los que se agrupan los productos de los transcritos con expresión alterada ( $-1 \leq Z \leq 1$ ) por el tratamiento con PES. Los números indican la cantidad de transcritos involucrados en cada uno de los procesos.

De manera paralela, se realizó un análisis para identificar el papel de los transcritos alterados y evidenciar los procesos biológicos posiblemente alterados. Para ello se recurrió a bases de datos que permiten una búsqueda con mayor resolución, como por ejemplo la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Ogata *et al.*, 1999) y DAVID Bioinformatics Resources 6.8, que cuentan con un enfoque metabólico y estructural (Huang *et al.*, 2009a; Huang *et al.*, 2009b).

El análisis en estos servidores hizo evidente el papel que juegan los genes cuya expresión resultó alterada en vías tan diversas como la organización del citoesqueleto, proliferación, diferenciación de células musculares, ciclo celular, apoptosis, y de igual manera se encontró una gran cantidad de genes involucrados en las vías de señalización como Wnt, MAPK, Jak-STAT, PI3K-Akt (Figura 15) entre otras.



**Figura 15. Procesos biológicos y rutas metabólicas representadas por transcritos con niveles de expresión alterados.** Se presentan algunos de los procesos biológicos en los que participan los productos de los transcritos con expresión alterada ( $-1 \leq Z \leq 1$ ) por el tratamiento con PES. Se muestran 19 de 358 resultados. Los números indican la cantidad de transcritos involucrados en cada uno de los procesos.

## **7.4 Análisis del citoesqueleto de actina y de la cadena pesada de miosina (MHC) como marcador de diferenciación en células tratadas con PES**

Uno de los procesos biológicos con expresión alterada fue la organización del citoesqueleto. Para analizar este proceso se decidió evaluar la expresión de cadena pesada de miosina (MHC: *Miosin Heavy Chain*), una proteína que se ha utilizado como marcador de diferenciación en células musculares (Chargé y Rudnicki, 2004), así como la expresión de  $\alpha$ -Actina, la principal isoforma de Actina presente en células musculares (Perrin y Ervasti, 2010). La expresión de estas proteínas se evaluó por inmunofluorescencia indirecta y por Western blot.

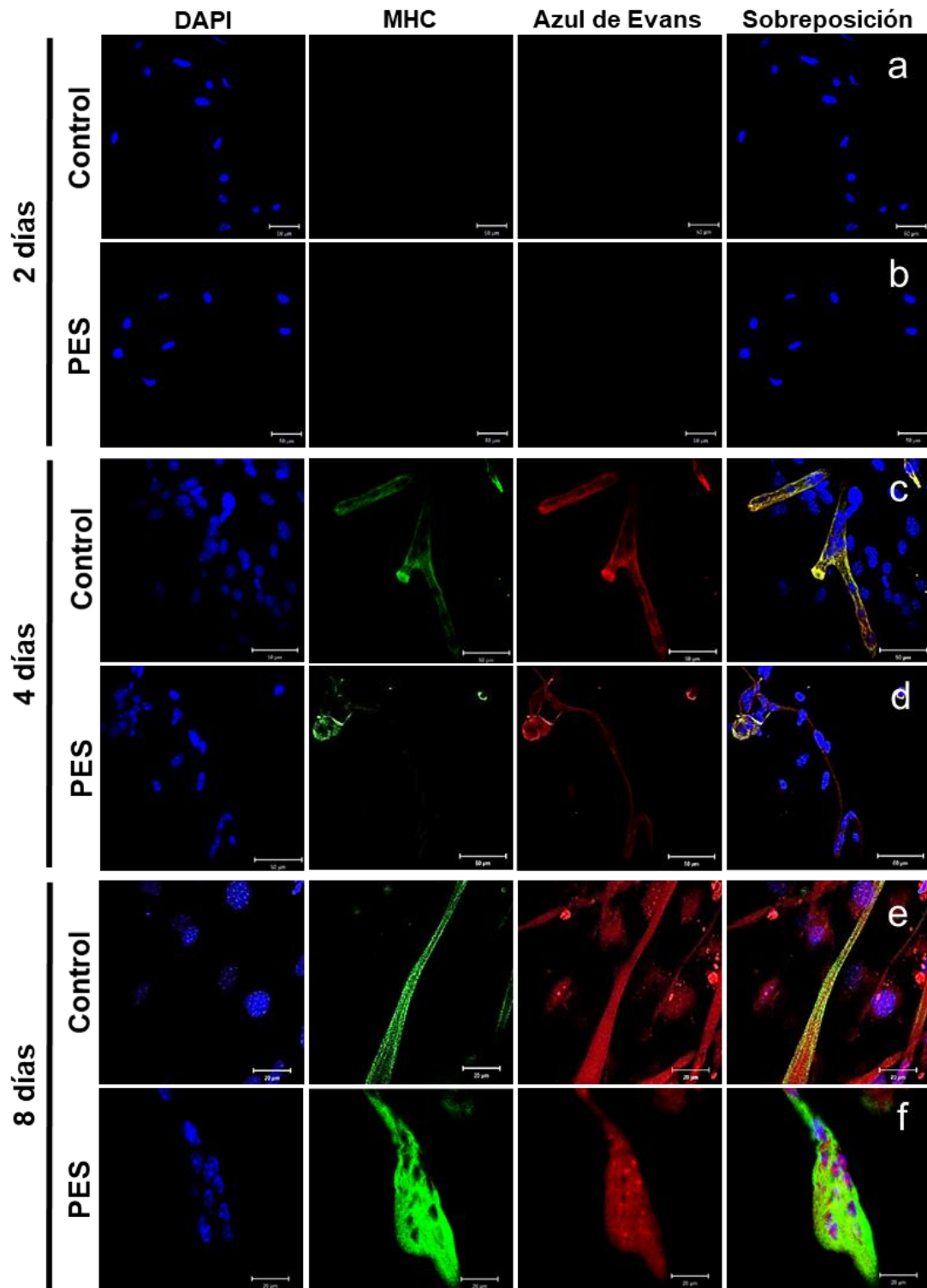
### **7.4.1 Expresión de MHC en cultivos primarios de miocitos tratados con PES**

En primer lugar, se realizó la detección de MHC en cultivos de 2, 4 y 8 días en condiciones de diferenciación (Figura 16).

La expresión de MHC no fue detectable a los 2 días en los cultivos con y sin tratamiento con PES (Figura 16a, b). Tratándose de una proteína sarcomérica, MHC pudo observarse en cultivos con 4 días en diferenciación, etapa en la cual se observaron miotubos cortos y de diámetro uniforme, con núcleos dispuestos a lo largo de toda la estructura en los cultivos sin tratamiento (Figura 16c), mientras que en los cultivos tratados con PES se observó una menor expresión de MHC, en miotubos de menor diámetro y con los núcleos acumulados en ciertas partes de las estructuras (Figura 16d). La expresión de MHC fue mayor en los cultivos con 8 días en diferenciación, en donde ya se encontraron miotubos de mayor longitud y la distribución de MHC correspondía a un patrón estriado en los cultivos controles (Figura 16e). Por el contrario, en los cultivos de 8 días tratados con PES la expresión de ésta proteína fue menor, MHC se observó dispersa y desarreglada dentro de los

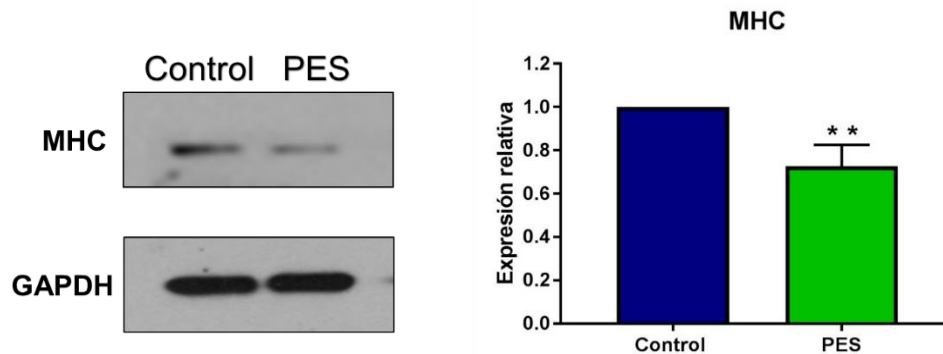


miotubos, los cuales fueron de menor longitud y con cúmulos de núcleos dando la impresión de formar “sacos” (Figura 16f).



**Figura 16.** Expresión de la cadena pesada de miosina (MHC) en cultivos primarios de miocitos con y sin tratamiento de PES de LM de *T. spiralis* a diferentes tiempos de diferenciación. (a-d) Barra de escala 50 µm. (e,f) Barra de escala 20 µm. Microscopía confocal.

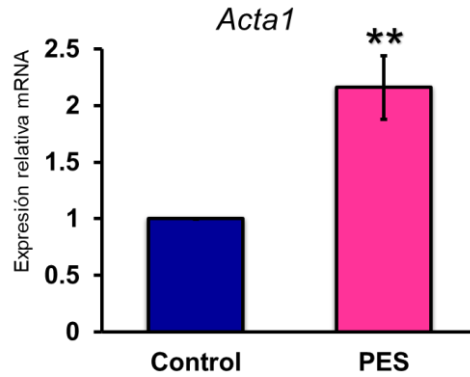
Adicionalmente a la detección de MHC mediante inmunofluorescencia indirecta, se evaluó su expresión por western blot, en cultivos con 8 días en condiciones de diferenciación, con lo cual se confirmó que el tratamiento con PES disminuyó la expresión de ésta proteína en aproximadamente 30% (Figura 17).



**Figura 17. La expresión de MHC disminuye en cultivos primarios de miocitos tratados con PES de LM de *T. spiralis*.** Se evaluaron los niveles de expresión de MHC y GAPDH mediante Western blot a partir de cultivos primarios con 8 días en diferenciación con y sin tratamiento con PES. En el panel derecho se muestra el análisis densitométrico de los resultados obtenidos. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. \*\*  $p < 0.01$ .

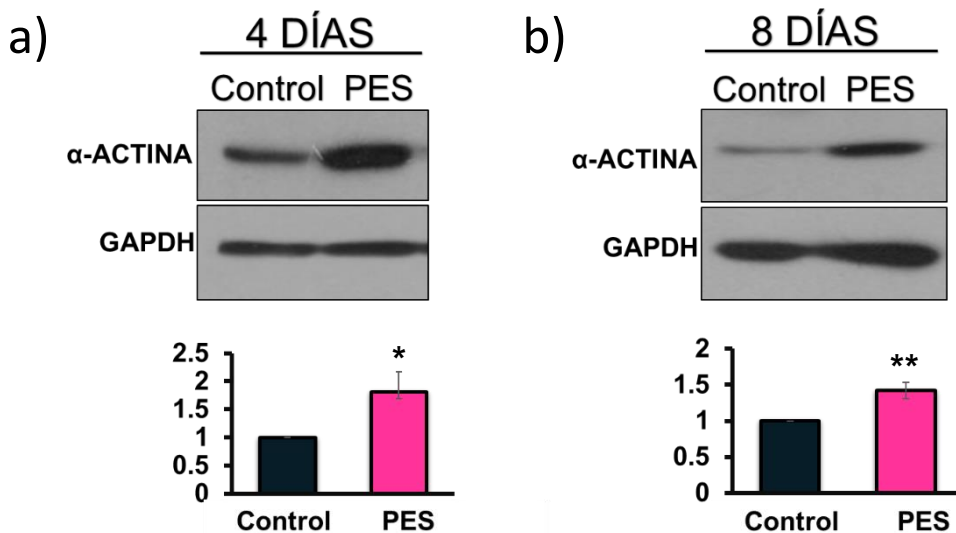
#### 7.4.2 Expresión de $\alpha$ -Actina en cultivos primarios de miocitos tratados con PES

Además de Miosina, otro de los componentes principales de citoesqueleto de células musculares es  $\alpha$ -Actina. El análisis de este gen por qRT-PCR reveló que su expresión se duplicó en los cultivos tratados con PES a los 8 días en diferenciación (Figura 18).



**Figura 18. Cuantificación de la expresión relativa de  $\alpha$ -Actina.** Expresión relativa de  $\alpha$ -Actina mediante qRT-PCR en cultivos tratados con PES a los 8 días en condiciones de diferenciación. La cuantificación se realizó por el método de  $\Delta\Delta Ct$ , normalizando la expresión del gen con *Csnk2a2*. Imagen representativa de 3 experimentos independientes. \*\* $p < 0.01$  con respecto al control.

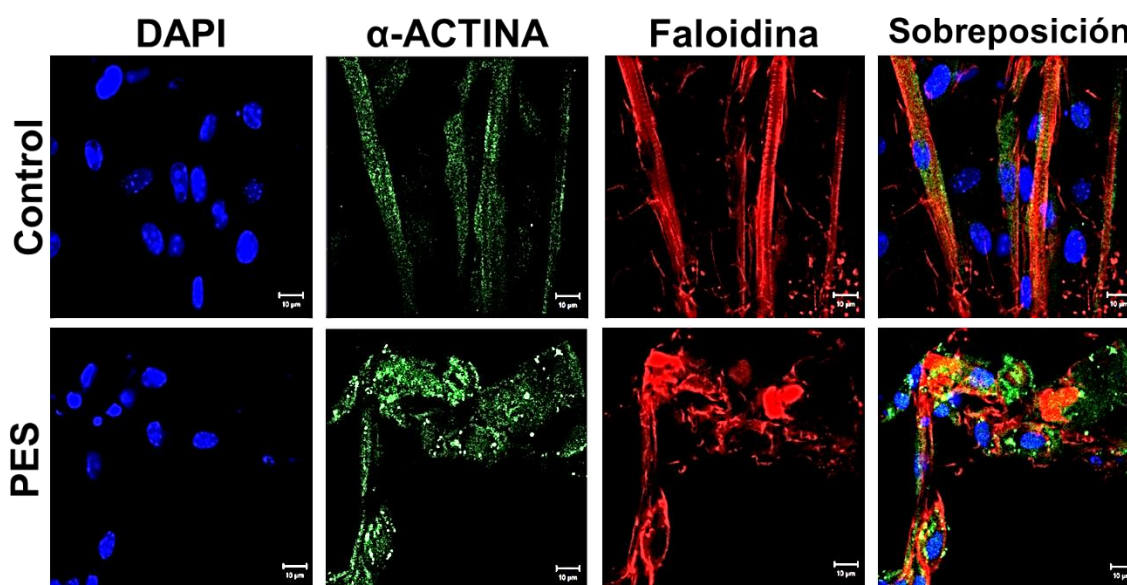
El incremento en la expresión de  $\alpha$ -Actina se corroboró posteriormente mediante Western blot. Al realizar la detección de  $\alpha$ -ACTINA se encontró que el tratamiento con PES provocó un incremento del 80% en su expresión en cultivos con 4 días en diferenciación (Figura 19a) y del 50% en cultivos de 8 días (Figura 19b).



**Figura 19. La expresión de  $\alpha$ -ACTINA aumenta en cultivos primarios de miocitos tratados con PES de LM de *T. spiralis*.** Se evaluaron los niveles de expresión de  $\alpha$ -ACTINA y GAPDH mediante Western blot a partir de cultivos primarios con 4 (a) y 8 (b) días en diferenciación con y sin tratamiento con PES. En el panel inferior se muestra el análisis densitométrico de los resultados obtenidos. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ .

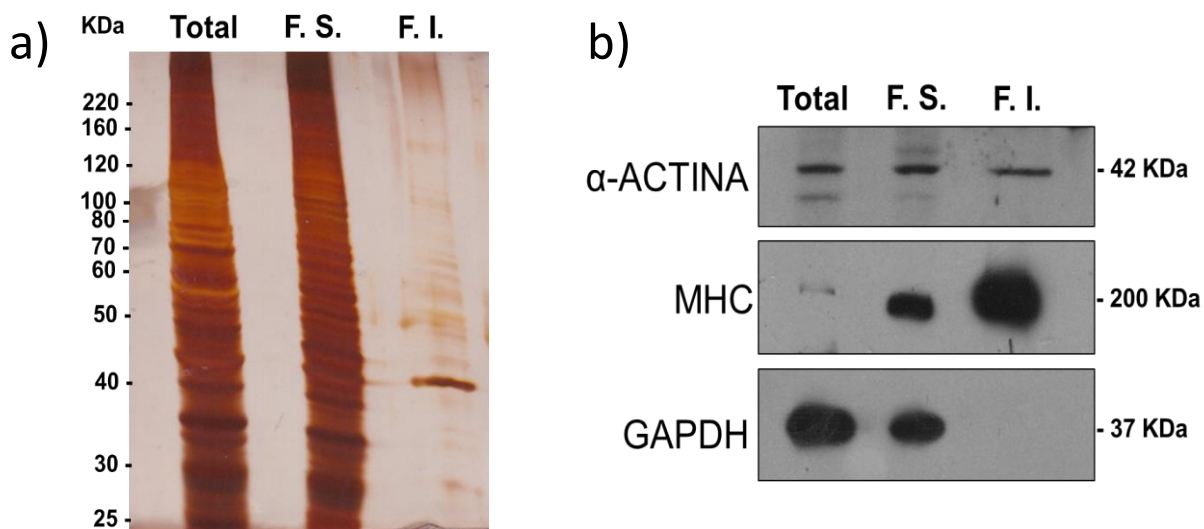
El incremento en la expresión de  $\alpha$ -ACTINA contrastó con la disminución de MHC inducida por los PES de LM de *T. spiralis* considerando que ambas proteínas son componentes de citoesqueleto. Una posible explicación para las diferencias de expresión era que  $\alpha$ -ACTINA se encontrara en su forma monomérica (G-Actina) y no formando parte de citoesqueleto como F-Actina.

Para evaluar si el tratamiento con PES de LM de *T. spiralis* inducían un incremento de  $\alpha$ -ACTINA en su forma monomérica se realizó la detección de esta proteína mediante inmunofluorescencia indirecta en cultivos con 8 días de diferenciación. Se realizó un doble marcaje, utilizando un anticuerpo específico para detectar  $\alpha$ -ACTINA total, y faloidina para marcar únicamente a la  $\alpha$ -ACTINA en su forma filamentosa (F-Actina), adicionalmente los núcleos fueron marcados con DAPI. Al realizar la sobreposición de los tres marcajes se observó que, en los cultivos tratados con PES, además de las alteraciones morfológicas previamente descritas y una mayor señal de  $\alpha$ -ACTINA total, existieron cúmulos de señal correspondiente a  $\alpha$ -ACTINA que no co-localizó con F-Actina, indicando que ese exceso de proteína podría encontrarse en forma de G-Actina (Figura 20).



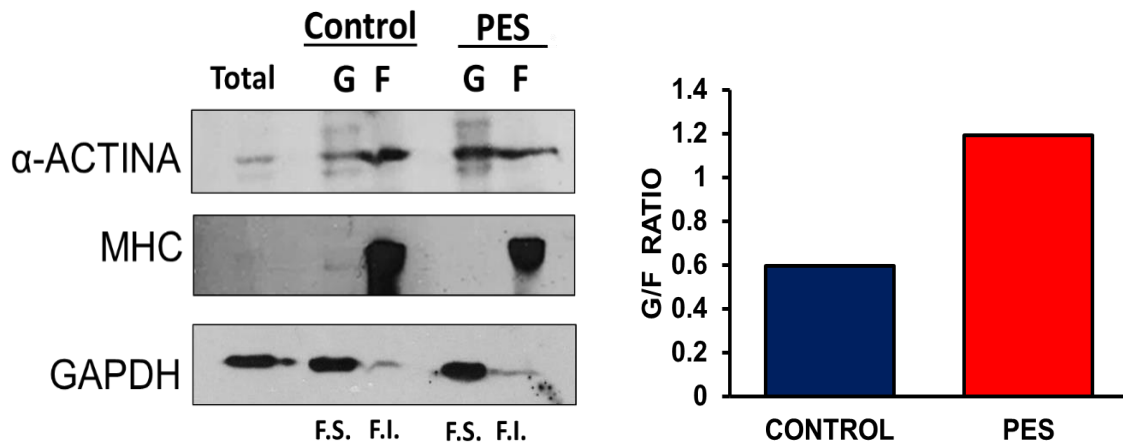
**Figura 20. Distribución de  $\alpha$ -ACTINA en cultivos primarios de miocitos con y sin tratamiento de PES de LM de *T. spiralis*.** Expresión de  $\alpha$ -ACTINA en cultivos primarios con 8 días de diferenciación, la expresión de  $\alpha$ -ACTINA total se muestra en verde y F-ACTINA se muestra marcada en rojo. Barra de escala 10  $\mu$ m. Microscopía confocal.

Para comprobar si el tratamiento con PES provocaba una acumulación de  $\alpha$ -ACTINA en su forma monomérica, se realizó un fraccionamiento que permitiera separar G-ACTINA y F-ACTINA. El fraccionamiento se realizó por medio de una solubilización celular con 0.1% Tritón X100 en PBS 1x, el cual permitió recuperar en la fracción soluble  $\alpha$ -ACTINA monomérica (G-ACTINA) y en la fracción insoluble  $\alpha$ -ACTINA filamentosa (F-ACTINA) junto con otros componentes de citoesqueleto. En primer lugar, se realizó el fraccionamiento utilizando cultivos primarios con 8 días de diferenciación sin tratamiento con PES y el perfil de proteínas obtenido fue evaluado mediante SDS-PAGE y tinción con plata (Figura 21a). Para verificar el correcto fraccionamiento se realizó la detección de  $\alpha$ -ACTINA mediante western blot, incluyendo como controles de enriquecimiento MHC para la fracción insoluble y GAPDH para la fracción soluble (Figura 21b).



**Figura 21. Fraccionamiento de G-ACTINA y F-ACTINA en cultivos primarios de miocitos.** Las proteínas de cultivos con 8 días de diferenciación obtenidas a partir de la solubilización con 0.1% Tritón X100 en PBS1x se fraccionaron para obtener G-ACTINA soluble y F-ACTINA insoluble. a) Perfil de proteínas teñido con plata. Total: Extracto total de proteínas, F.S.: Fracción soluble y F.I.: Fracción insoluble. b) Se evaluó la expresión de  $\alpha$ -ACTINA mediante Western blot en las fracciones obtenidas. La detección de MHC y GAPDH se incluyó como control de enriquecimiento para cada fracción.

Posteriormente, se realizó el fraccionamiento simultaneo de proteínas de cultivos con 8 días de diferenciación con y sin tratamiento con PES, y se realizó la detección de  $\alpha$ -ACTINA, MHC y GAPDH. De esta manera se pudo comprobar que los PES inducen una acumulación de G-ACTINA ya que la proporción G-ACTINA/F-ACTINA se duplicó en los cultivos tratados con PES (Figura 22).

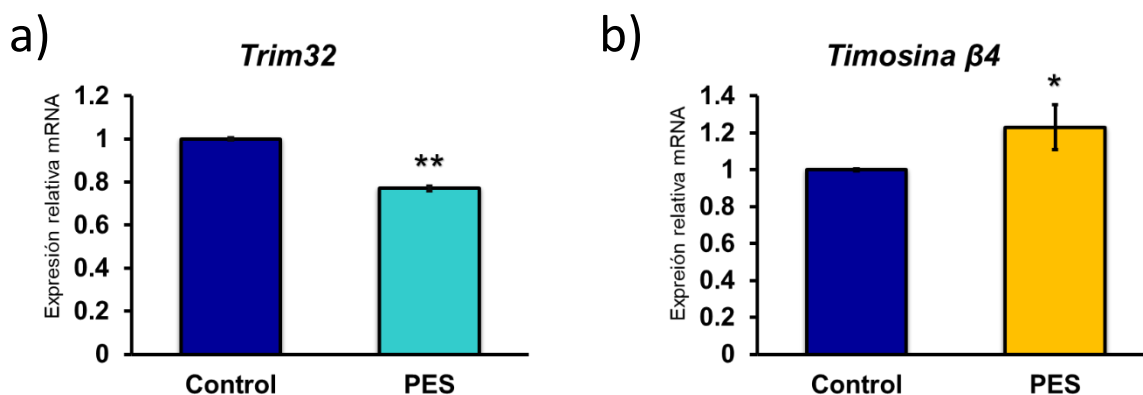


**Figura 22. Fraccionamiento de G-ACTINA y F-ACTINA en cultivos primarios de miocitos con y sin tratamiento con PES.** Las proteínas de cultivos con 8 días de diferenciación obtenidas a partir de la solubilización con 0.1% Tritón X100 en PBS1x se fraccionaron para obtener G-ACTINA soluble y F-ACTINA insoluble. Se evaluó la expresión de  $\alpha$ -ACTINA mediante Western blot en las fracciones obtenidas. La detección de MHC y GAPDH se incluyó como control de enriquecimiento para cada fracción. Total: Extracto total de proteínas, G: G-Actina, F: F-Actina, F.S.: Fracción soluble y F.I.: Fracción insoluble. En el panel derecho se muestra el análisis densitométrico de la proporción de G/F-Actina en ambas condiciones.

Para encontrar una posible explicación al aumento observado en la proporción de  $\alpha$ -ACTINA se analizó la expresión de *Trim32* y *Timosina  $\beta$ 4* mediante qRT-PCR en cultivos primarios con 8 días en diferenciación, tomando en consideración que sus niveles de expresión en los microarreglos se observaron alterados.

*Trim32*, una E3 ubiquitín ligasa, participa en la degradación de ACTINA (Lazzari and Meroni, 2016), mientras que Timosina  $\beta$ 4 estabiliza ACTINA en su forma monomérica (G-ACTINA) (Sanders *et al.*, 1992).

La expresión de *Trim32*, se encontró disminuida en los cultivos tratados con PES, lo cual podría explicar al menos en parte, el incremento de  $\alpha$ -ACTINA observado por western blot (Figura 23a) debido a la participación de este factor. La expresión de *Timosina  $\beta$ 4* se incrementó en los cultivos tratados con PES (Figura 23b), hallazgo que concuerda con la mayor proporción de G-ACTINA en cultivos con tratamiento con PES.



**Figura 23. Cuantificación de la expresión relativa de *Trim32* y *Timosina  $\beta$ 4*.** Expresión relativa de *Trim32* (a) y *Timosina  $\beta$ 4* (b) mediante qRT-PCR en cultivos tratados con PES a los 8 días en condiciones de diferenciación. La cuantificación se realizó por el método de  $\Delta\Delta$ Ct, normalizando la expresión del gen con *Csnk2a2*. Imagen representativa de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  con respecto al control.

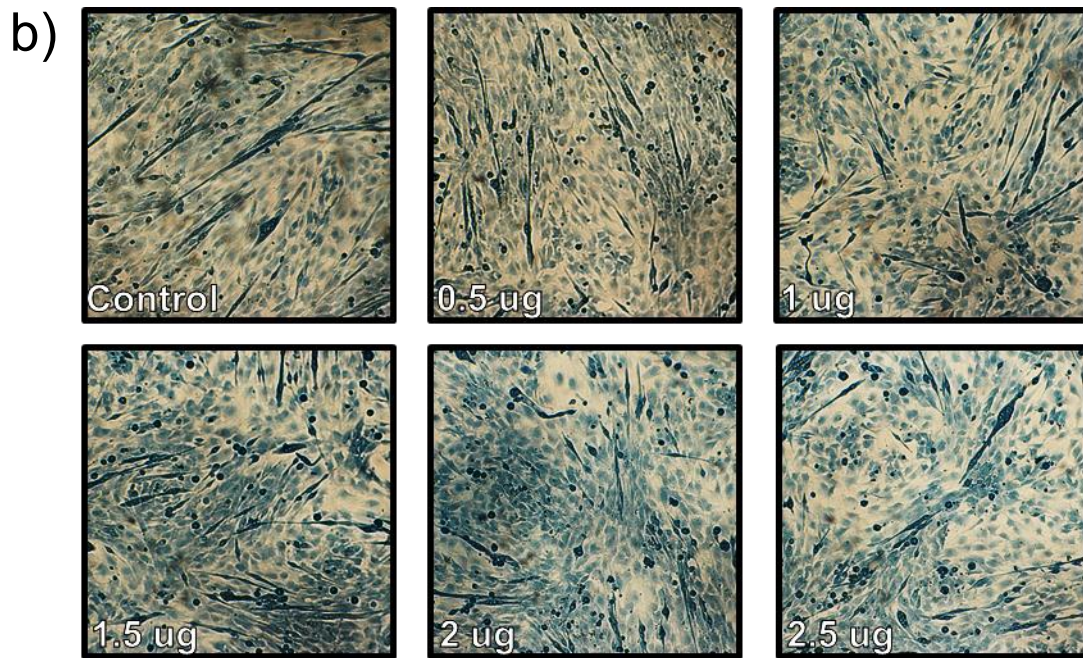
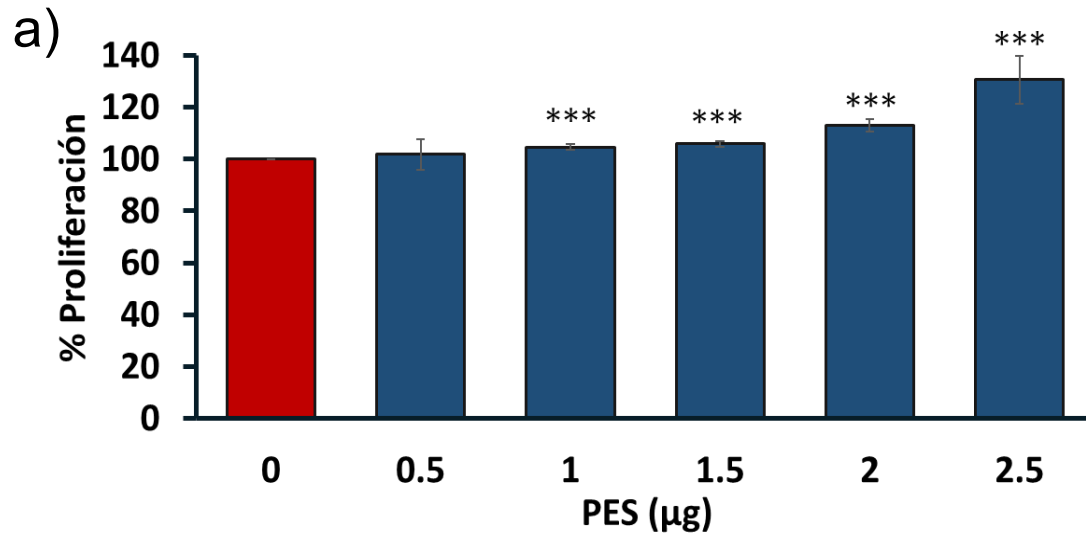
## 7.5 Proliferación celular en cultivos primarios de miocitos tratados con PES

Una posible explicación a la menor diferenciación observada en los cultivos primarios de miocitos era que el tratamiento con PES favoreciera la proliferación. Dado que estos procesos biológicos son mutuamente excluyentes y cada uno de ellos está regulado por la actividad de diferentes factores de regulación miogénica (Olson, 1992), fue necesario determinar si los PES favorecen la proliferación celular y que factores de regulación podrían estar implicados.

Para comprobar si los PES de LM de *T. spiralis* tenían un impacto en la proliferación de cultivos primarios de mioblastos, tal y como se ha observado en estudios previos utilizando la línea celular C2C12 (Bai *et al.*, 2012) se realizaron ensayos de proliferación celular con MTT.

Estos ensayos se realizaron en cultivos de 4 días de diferenciación, ya que este tiempo corresponde a la etapa del cultivo que permite observar el inicio en la formación de miotubos en condiciones normales, y una menor diferenciación en los cultivos tratados con PES. En los ensayos de MTT la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, de esta manera, se observó que el tratamiento con concentraciones crecientes de PES incrementó la proliferación de las células musculares de forma dosis dependiente, provocando un incremento de hasta el 30% con la dosis máxima de PES utilizados (Figura 24a), lo cual correlacionó con los cambios morfológicos observados en los cultivos primarios bajo los diferentes tratamientos (Figura 24b).



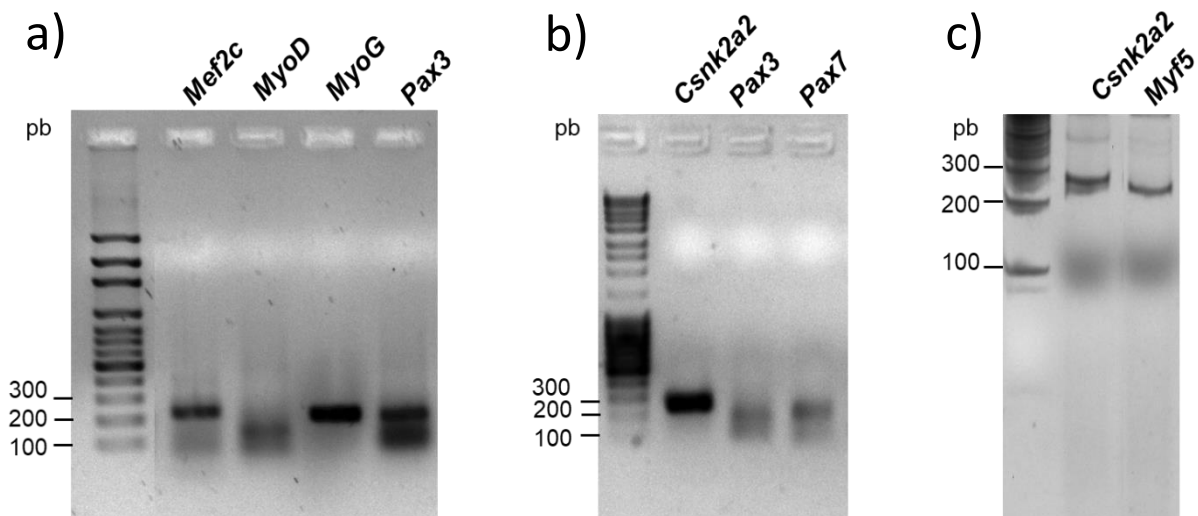


**Figura 24. El tratamiento con PES incrementa la proliferación celular.** a) Ensayo de proliferación celular con MTT en cultivos primarios con 4 días en medio de diferenciación tratados con diferentes dosis de PES. Se muestra el valor de la media  $\pm$  error estándar. b) Morfología de los cultivos primarios tratados con diferentes concentraciones de PES. Tinción de Evans. Fotografías de microscopía óptica, 100x. Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  vs el pozo control.

## 7.6 Expresión de factores de regulación miogénica en cultivos primarios de miocitos

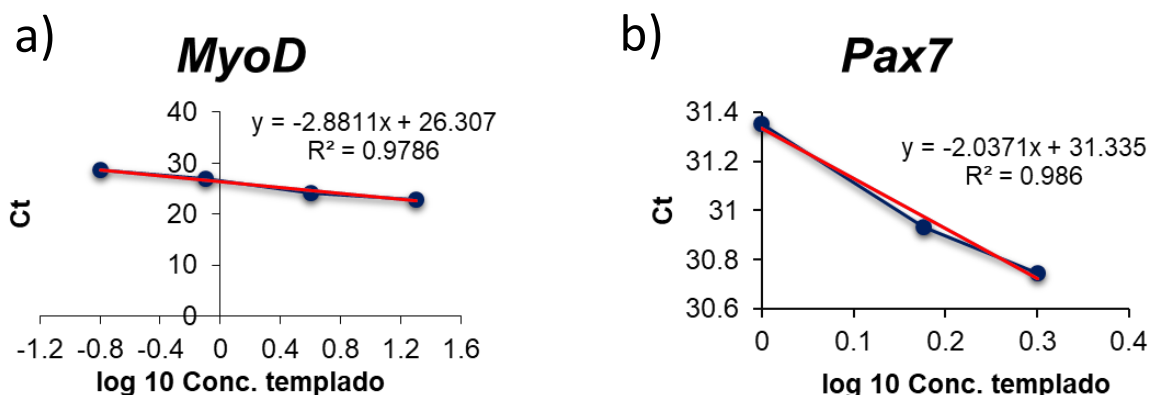
Debido a los cambios que se encontraron en miocitos tratados con PES y a las alteraciones en los niveles de expresión de genes relacionados con el desarrollo de células musculares, como parte del proceso de validación de los resultados del microarreglo, se procedió a comprobar mediante qRT-PCR la expresión de algunos de los genes que controlan diversos aspectos de la miogénesis post-natal, tales como *Pax3*, *Pax7*, *Myf5*, *MyoD*, *Myogenina* y *Mef2c*, utilizando como gen de referencia *Csnk2a2*.

Como primer paso, se determinaron las condiciones de amplificación por PCR de cada uno de los genes a evaluar. En la Figura 25 se observan los amplicones de cada uno de los genes y sus  $T_m$  experimentales se muestran en la Tabla 1.



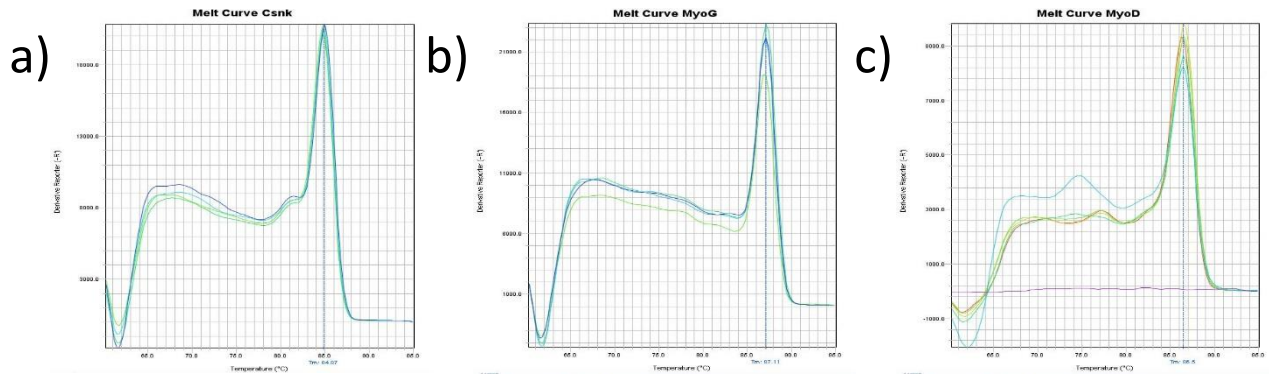
**Figura 25. Amplificación por PCR de genes de regulación miogénica.** a) Amplificación de *Mef2c*, *MyoD*, *MyoG* y *Pax3* a 60 °C, empleando 2  $\mu$ l de cDNA. b) Amplificación de *Csnk2a2* y *Pax3* a 60 °C y *Pax7a* 62 °C, empleando 1.5  $\mu$ l de cDNA. c) Amplificación de *Csnk2a2* y *Myf5* a 60 °C empleando 1  $\mu$ l de cDNA. Los productos de amplificación se corrieron en geles de agarosa al 2% (a,b) o en geles de acrilamida/bisacrilamida 19:1 al 10% (c) para permitir su correcta visualización.

Una vez determinadas las condiciones de amplificación de cada uno de los genes a evaluar se realizaron curvas estándar de amplificación o rango dinámico, con el objetivo de establecer el rango de concentraciones de RNA con las cuales se podía trabajar en las qRT-PCR, ya que las reacciones de amplificación deben ser lineales, para ello se utilizaron como templados diferentes cantidades de RNA (para genes abundantes) o cDNA (en el caso de los genes menos abundantes). En la Figura 26 se muestra un ejemplo de curvas estándar para ambos casos.



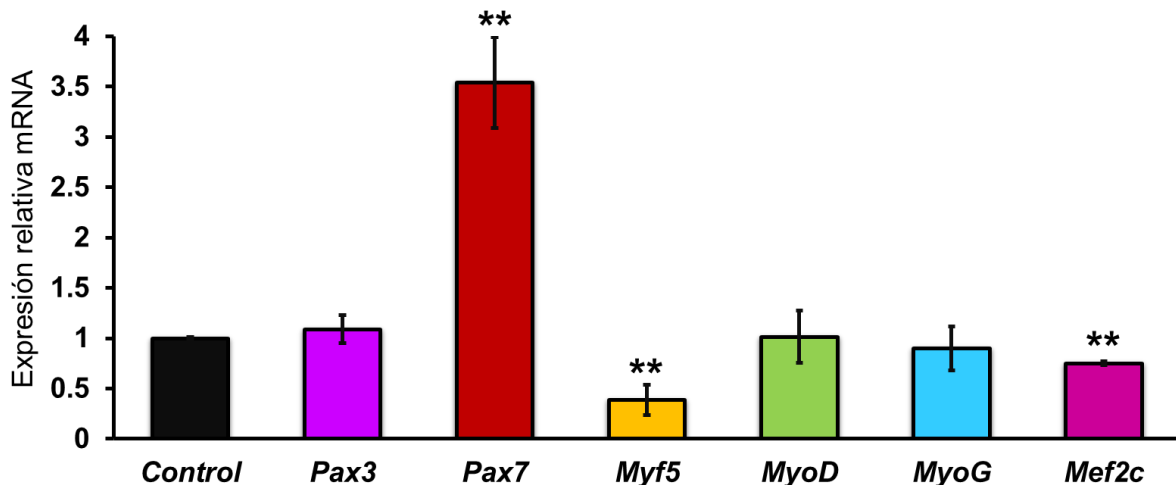
**Figura 26. Ejemplo de las curvas de rango dinámico para qRT-PCR.** a) Curva estándar de *MyoD*, concentraciones de RNA utilizadas: 100 ng, 20 ng, 4 ng, 0.8 ng y 0.16 ng. b) Curva estándar de *Pax7*, empleando 1, 1.5 y 2  $\mu$ l de cDNA como templado.

Asimismo, en cada una de las amplificaciones por qRT-PCR se verificó que se detectara un solo producto, por ello en cada reacción se incluyó una curva de disociación. En la figura 27 se muestran algunos ejemplos de las curvas de disociación obtenidas.



**Figura 27. Ejemplo de las curvas de disociación obtenidas para cada uno de los genes a validar por qRT-PCR.** a) *Csnk2a2*, utilizado como gen de referencia. b) *MyoG* y c) *MyoD*, dos de los genes blanco.

Una vez establecidas las condiciones de amplificación adecuadas para cada gen de interés, se realizó la cuantificación de expresión de diversos genes involucrados en la regulación de la miogénesis post-natal, los cuales representaban cada categoría de expresión previamente mencionada en el análisis de microarreglos (aumentada, disminuida o sin cambio). En la Figura 28 se pueden observar los resultados de la cuantificación de *Pax3*, *Pax7*, *MyoD*, *Myf5*, *MyoG* y *Mef2c* en cultivos con 8 días en diferenciación con y sin tratamiento con PES.



**Figura 28. Cuantificación de la expresión relativa de genes reguladores de miogénesis.** Expresión relativa de *Pax3*, *Pax7*, *MyoD*, *Myf5*, *MyoG* y *Mef2c* mediante qRT-PCR en cultivos tratados con PES a los 8 días en condiciones de diferenciación. Las cuantificaciones se realizaron por el método de  $\Delta\Delta Ct$ , normalizando la expresión de cada gen con *Csnk2a2*. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  con respecto al control.

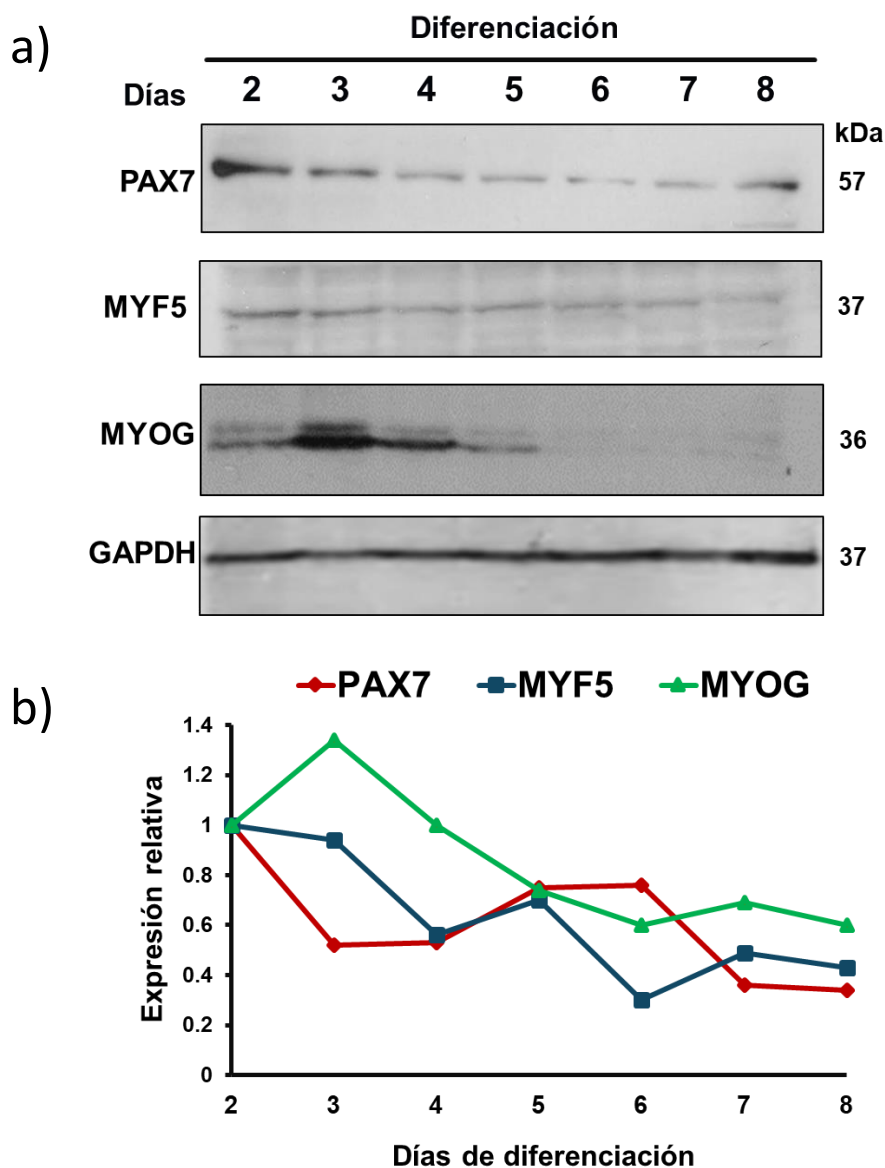
Se encontró un incremento en la expresión de *Pax7*, factor de regulación transcripcional indispensable para la renovación y proliferación de las células satélite y que participa en etapas muy tempranas de la miogénesis post-natal (Oustanina *et al.*, 2004; Von Maltzahn *et al.*, 2013). La sobreexpresión de este factor y su efecto inhibitorio de la diferenciación, así como la disminución de *Mef2c*, factor que fomenta la transcripción de genes que inducen la diferenciación de células musculares como *Miogenina* y *MRF4*, concuerdan con los cambios morfológicos observados en los cultivos primarios de miocitos tratados con PES de *T. spiralis*, en los cuales se observó una mayor proliferación y un desarrollo menor de miotubos.

De igual manera, se encontró una disminución en la expresión de *Myf5*, factor de regulación miogénica asociado a etapas tempranas de la miogénesis y para el cual se ha reportado su importancia para la regeneración adecuada del tejido muscular (Gayraud *et al.*, 2007).

Si bien no se encontraron alteraciones en los niveles de expresión de *Pax3* y *MyoG*, las actividades de ambos suelen estar en función de otras proteínas con actividades similares, en el caso de *Pax3*, sus funciones llegan a ser suplidas por *Pax7* y su expresión se limita a células satélite pluripotenciales (Relaix *et al.*, 2005), mientras que la función de *MyoG* es también suplida en parte por *MRF4* (Berkes *et al.*, 2005). En el caso de *MyoD*, la ausencia de alteraciones en su expresión, al menos a nivel de mRNA, puede atribuirse a su participación a lo largo de casi todo el proceso de la miogénesis post-natal, desde mioblastos hasta miotubos (Olguín *et al.*, 2012).

Posteriormente, se procedió a evaluar los niveles de expresión proteica de algunos de estos factores. Se analizó la expresión de PAX7, MYF5 y MYOG debido a su importancia durante la miogénesis post-natal. El patrón de expresión normal de estos factores en nuestro modelo de estudio se realizó mediante western blot en cultivos primarios sin tratamiento desde el día 2 hasta el día 8 en condiciones de diferenciación (Figura 29).

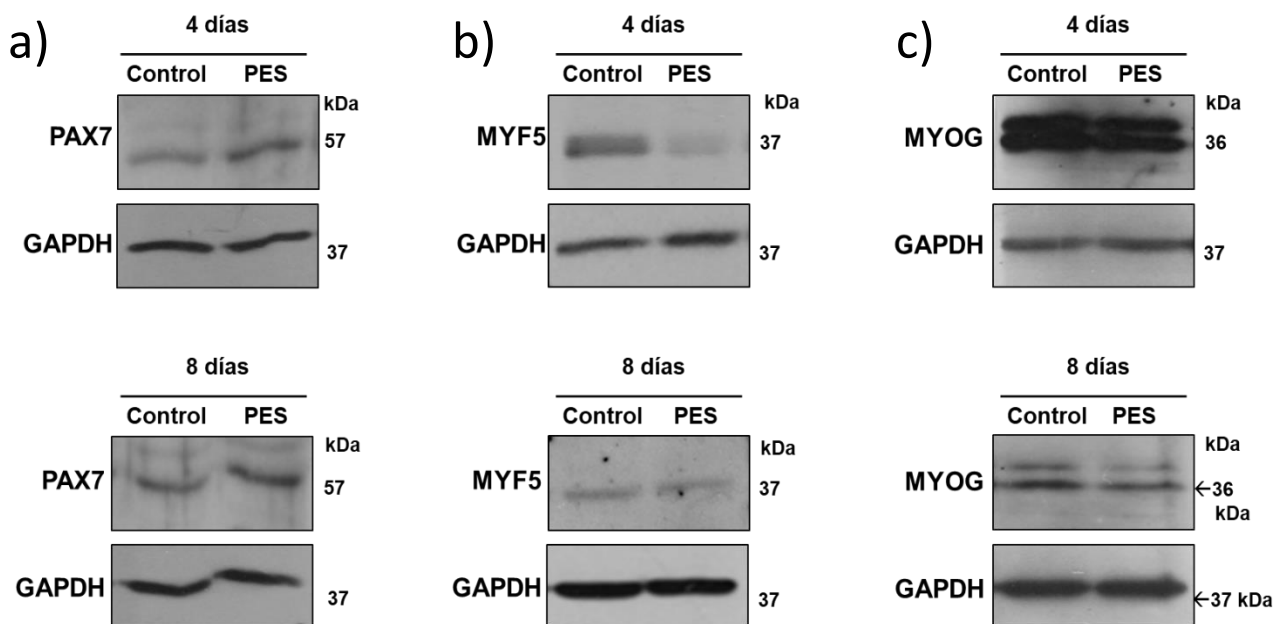
La cinética de expresión indicó que PAX7 y MYF5 van decayendo conforme avanza la diferenciación de las células musculares, lo cual correlaciona con los patrones de expresión previamente reportados (Olguin *et al*, 2012). En el caso de Miogenina, su expresión fue mayor en cultivos con 3 días en diferenciación, lo cual corresponde a la etapa de los cultivos en donde se empieza a generar la fusión de miocitos para dar lugar a la formación de miotubos.



**Figura 29. Cinética de expresión de PAX7, MYF5 y MIOGENINA en cultivos primarios de miocitos.** a) Se realizó la detección de PAX7, MYF5 y MYOG en cultivos primarios de miocitos de 2 a 8 días de diferenciación mediante Western blot como se describe en Materiales y Métodos. b) Análisis densitométrico. La detección de GAPDH se incluyó para normalizar la expresión de cada factor durante la cinética.

Con base en los resultados de las cinéticas de expresión y tomando en cuenta la morfología de los cultivos primarios, se decidió evaluar la expresión de PAX7, MYF5 y MYOG, en cultivos con y sin tratamiento con PES a los 4 y 8 días de diferenciación. El día 4 en diferenciación corresponde al inicio de la formación de miotubos y es el primer día donde se puede apreciar un efecto a nivel morfológico de los cambios inducidos por los PES. En el caso del día 8, corresponde al día final de los cultivos, en los cuales se observa la mayor diferencia morfológica entre los cultivos con y sin tratamiento con PES, además de que en este día se realizaron los análisis de expresión mediante microarreglos y qRT-PCR.

Se encontró un incremento en la expresión de PAX7 en los cultivos tratados con PES, tanto al día 4 como al día 8 de diferenciación, confirmando los resultados encontrados previamente por qRT-PCR (Figura 30a). En el caso de MYF5, no se encontraron alteraciones en su expresión en cultivos de 8 días de diferenciación, pero si a los 4 días (Figura 30b), lo cual corresponde a la etapa de los cultivos donde la expresión de MYF5 tendría mayor relevancia debido a su participación en la reparación de células musculares (Gayraud *et al.*, 2007). De manera similar a los resultados de qRT-PCR, no se encontraron cambios en la expresión de Miogenina en ninguno de los tiempos evaluados (Figura 30c), si bien fue evidente la menor fusión de miocitos en los cultivos tratados con PES, estas alteraciones podrían estar reguladas mediante otros mecanismos.



**Figura 30. Expresión de PAX7, MYF5 y MIOGENINA en cultivos primarios de miocitos con y sin tratamiento con PES.** Se realizó la detección de PAX7(a), MYF5 (b) y MYOG (c) en cultivos primarios de miocitos con 4 y 8 días en diferenciación mediante Western blot como se describe en Materiales y Métodos. La detección de GAPDH se incluyó para normalizar la expresión de cada factor en ambas condiciones. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes.

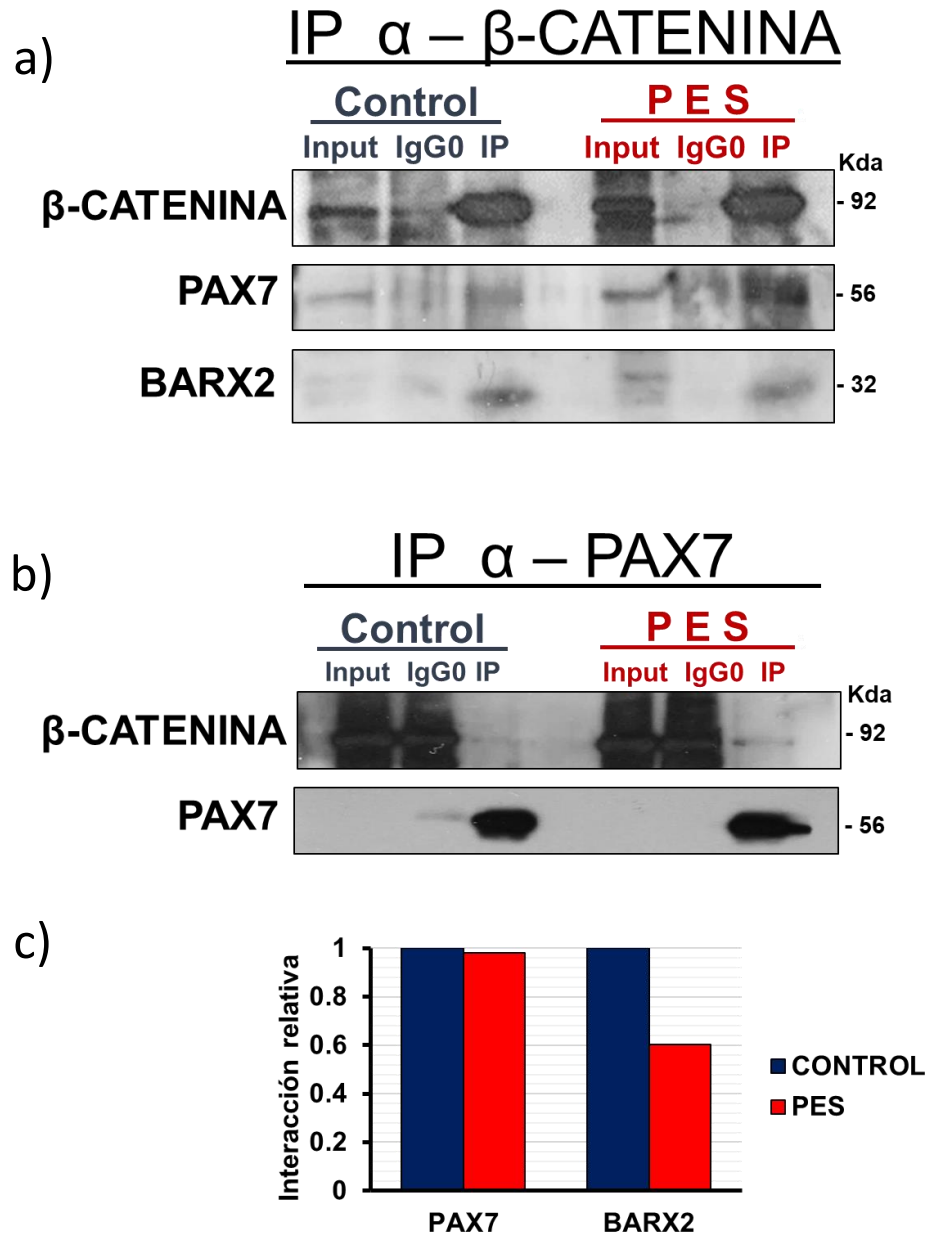
## 7.7 Papel de la vía Wnt en los cambios inducidos en las células musculares tratadas con PES de *T. spiralis*

Los resultados de los microarreglos mostraron una importante alteración en la expresión de genes de la vía Wnt a consecuencia del tratamiento con PES. La vía Wnt es muy importante para la regulación de procesos de proliferación y diferenciación en múltiples tipos celulares (Suzuki *et al.*, 2015). Es por ello que se decidió evaluar si las alteraciones en esta vía podían explicar, al menos parcialmente, algunos de los cambios observados en los cultivos primarios tratados con PES de *T. spiralis*.



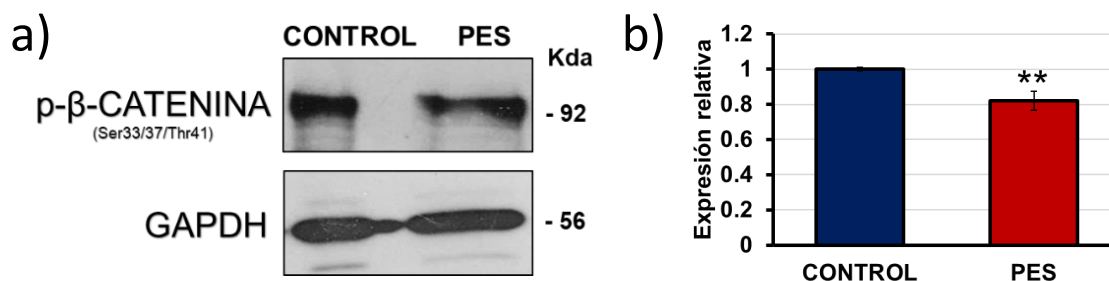
Particularmente nos enfocamos en la regulación de la miogénesis a través de la vía canónica de Wnt, ya que en los cultivos tratados con PES se encontró un incremento en la expresión de Pax7, reportado recientemente como un regulador negativo de la diferenciación de células musculares a través de su interacción con  $\beta$ -Catenina (Zhuang *et al.*, 2014), componente clave de la vía canónica Wnt.

Se decidió evaluar si el incremento en los niveles de PAX7 podría estar relacionado con su papel antagónico con BARX2 en su interacción con  $\beta$ -Catenina (Zhuang *et al.*, 2014). Para evaluar los niveles de interacción de PAX7 y BARX2 con  $\beta$ -Catenina se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación de éstas proteínas a partir de extractos totales de cultivos con 8 días de diferenciación con y sin tratamiento con PES usando anticuerpos específicos anti $\beta$ -CATENINA o anti PAX7. En la figura 31 se muestran los resultados de estos ensayos, con los cuales se demostró que efectivamente existe una mayor interacción de  $\beta$ -CATENINA con PAX7 en los cultivos tratados con PES.



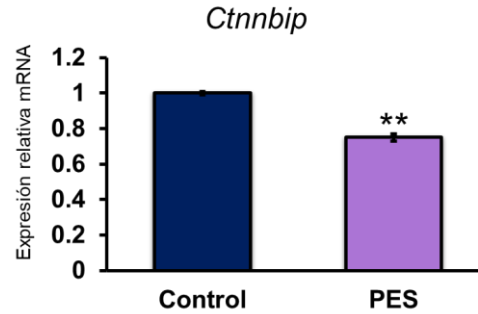
**Figura 31. Niveles de interacción de PAX7 y BARX2 con  $\beta$ -CATENINA en cultivos tratados con PES.** a) Se realizó la inmunoprecipitación (IP) de proteínas con un anticuerpo anti- $\beta$ -CATENINA, posteriormente se detectó la presencia de  $\beta$ -CATENINA, PAX7 y BARX2 mediante western blot en cultivos primarios de miocitos con 8 días de diferenciación. b) Inmunoprecipitación de proteínas con un anticuerpo anti-PAX7, posteriormente se detectó la presencia de  $\beta$ -CATENINA y PAX7 en cultivos primarios de miocitos con 8 días en diferenciación. c) Análisis densitométrico de los resultados mostrados.

Una vez que se observó una mayor interacción de  $\beta$ -CATENINA y PAX7 en los cultivos tratados con PES, se decidió evaluar que tan activa se encontraba la vía canónica de Wnt en estas condiciones. Una manera de evaluar esto es mediante el nivel de fosforilación de  $\beta$ -CATENINA, ya que ésta es la señal para su degradación en citoplasma. Se realizó la detección de  $\beta$ -CATENINA fosforilada en Ser33/37/Thr41 (p- $\beta$ -CATENINA) en cultivos tratados con PES a los 8 días de diferenciación (Figura 32) y se encontró que los niveles de p- $\beta$ -CATENINA disminuyeron en los cultivos tratados en aproximadamente 20%.



**Figura 32. Detección de  $\beta$ -CATENINA fosforilada en cultivos primarios tratados con PES.** a) Se realizó la detección de p- $\beta$ -CATENINA en cultivos primarios de miocitos con 8 días en diferenciación con y sin tratamiento con PES. La detección de GAPDH se incluyó para normalizar la expresión de cada factor en ambas condiciones. b) Análisis densitométrico de 3 experimentos independientes. \*\*  $p < 0.01$  con respecto al control.

Adicionalmente, se realizó la cuantificación de expresión de *Ctnnbip* mediante qRT-PCR. Este gen codifica para una proteína de unión a  $\beta$ -Catenina, cuya función es unirse a  $\beta$ -Catenina en citoplasma e impedir su entrada a núcleo. La expresión de *Ctnnbip* se encontró disminuida en cultivos de 8 días de diferenciación tratados con PES (Figura 33).



**Figura 33. Expresión relativa de *Ctnnbip* en cultivos primarios tratados con PES.** Expresión relativa de *Ctnnbip* mediante qRT-PCR en cultivos tratados con PES a los 8 días en condiciones de diferenciación. La cuantificación se realizó por el método de  $\Delta\Delta Ct$ , normalizando la expresión con *Csnk2a2*. \*\* $p < 0.01$  con respecto al control.

Tanto la disminución en los niveles de fosforilación de  $\beta$ -catenina como en la expresión de *Ctnnbip*, los cuales actúan como reguladores negativos de la vía canónica de Wnt, indican que la actividad de esta vía se encuentra favorecida en los cultivos que fueron tratados con PES.

## 8. DISCUSIÓN

La invasión de *Trichinella spiralis* produce numerosos cambios en músculo esquelético, los cuales conducen a una remodelación estructural causada por una reprogramación genética de las células satélite activadas a causa del daño. Para evaluar la naturaleza de estos cambios, se han utilizado diferentes abordajes. Entre ellos se encuentran la evaluación de las alteraciones morfológicas y la inhibición en la formación de miotubos inducida por el tratamiento con PES de LM (Leung y Ko, 1997), alteraciones genéticas en músculo infectado (Wu *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008) y la inhibición de la diferenciación utilizando como modelo la línea celular C2C12 (Bai *et al.*, 2012).

El análisis mediante microarreglos ha sido utilizado como un acercamiento inicial para revelar los cambios producidos por *T. spiralis* en músculo infectado. Sin embargo, existe una heterogeneidad transcripcional inherente al estudio del músculo infectado completo. Para superar esto, en el presente trabajo se realizó el análisis de microarreglos utilizando como modelo de estudio cultivos primarios de mioblastos, con el objetivo de analizar las alteraciones que se desencadenan en las células satélite que se activan y proliferan una vez que los miocitos han sido infectados, con la idea de extrapolar los resultados obtenidos a lo que ocurre una vez que el músculo ha sido infectado.

Este análisis reveló alteraciones en diferentes vías tales como apoptosis, ciclo celular y organización de citoesqueleto, además de procesos biológicos como desarrollo de células musculares, proliferación y diferenciación. Previamente se reportaron resultados similares en los análisis de microarreglos realizados en músculo infectado por *T. spiralis* (Wu *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008), en los cuales también resultó evidente el impacto que tiene esta infección en vías de señalización como MAPK, Wnt y JAK-STAT, las cuales son cruciales para la diferenciación de células musculares.

En comparación con los cambios producidos por *T. spiralis* en músculo infectado, en el cual las células satélite se activan y proliferan rápidamente, las células en el cultivo primario de mioblastos también tuvieron una proliferación incrementada a consecuencia del tratamiento con PES, algo similar a lo que ocurre en las etapas tempranas de la formación de la célula nodriza. Este aumento en la proliferación es un paso clave, dado que el citoplasma de la célula nodriza está compuesto de las células satélite que fueron activadas y que proliferaron (Wranicz *et al.*, 1998). El incremento en la proliferación de células precursoras miogénicas tratadas con PES también se ha observado en células C2C12 (Bai *et al.*, 2012).

La formación de nódulos y la presencia de estructuras granulares observadas en el cultivo primario de miocitos tratados con PES de LM (Leung y Ko, 1997) puede relacionarse con desarreglos en la organización del citoesqueleto. De manera similar, en este trabajo se observaron múltiples cambios en la organización del citoesqueleto en los cultivos tratados con PES (Figura 16). Estos cambios se asociaron con una disminución en la expresión de MHC (cadena pesada de miosina) y son congruentes con reportes previos en células C2C12 (Bai *et al.*, 2012) y la pérdida de proteínas contráctiles que ocurre durante la fase temprana de invasión de la LRN al músculo (Despommier *et al.*, 1975). De igual manera, los niveles de MHC disminuyeron al inducir la expresión de Tsp43 en células C2C12, la cual es una proteína localizada en los esticocitos de *T. spiralis* con probable actividad de unión a DNA (Jasmer y Kwak, 2006).  $\alpha$ -Actina es otra proteína de citoesqueleto que se sobre-expresa por el tratamiento con PES de LM y esta es la primera vez que se hace esta observación en un cultivo de células musculares. La expresión de  $\alpha$ -Actina se duplicó en los cultivos primarios a los 4 días de tratamiento con PES, etapa en la cual inicia la formación de miotubos. Adicionalmente, se comprobó que la acumulación de esta proteína ocurre en su forma monomérica, como G-actina. Este fenómeno podría causar disrupciones en el citoesqueleto de actina, afectando la migración de mioblastos y reduciendo la fusión tal y como se observó en los cultivos primarios de mioblastos tratados con PES. *In vivo*, las alteraciones en la fusión de mioblastos interfieren con el proceso de reparación (Rochlin *et al.*, 2010),

durante el cual la migración celular es un paso muy importante. De manera interesante, la sobreexpresión de *Timosina  $\beta$ 4*, la cual funciona como secuestrador de G-actina en diversos tipos celulares (Husson *et al.*, 2010), sugiere su participación como inhibidor de la polimerización de Actina, lo cual a su vez podría ser un efecto colateral de su papel durante la formación de la célula nodriza, donde se ha reportado que estimula la formación de vasos sanguíneos (Sanders *et al.*, 1992; Ock *et al.*, 2013).

La inhibición en la formación de miotubos en los cultivos tratados con PES puede ser parcialmente causada por la regulación de la expresión de los MRF's. Esto debido a que la diferenciación de los mioblastos depende de la expresión orquestada de los MRF's durante las diferentes etapas de la diferenciación, activando la expresión de genes específicos de músculos mediante su unión a diferentes promotores (Londhe and Davie, 2011). Al evaluar la expresión de algunos reguladores miogénicos, resultó relevante el incremento en la expresión de *Pax7*, un factor transcripcional involucrado en el mantenimiento de las células satélite (Tremblay and Gruss, 1994; Relaix *et al.*, 2006). La sobreexpresión de PAX7 también inhibe la expresión de MHC (McKinnell *et al.*, 2008) y la diferenciación de células musculares mediante la represión de otros MRF's (Soleimani *et al.*, 2012). De forma contrastante, se encontró una disminución de la expresión de *Myf5* a nivel de mRNA a los 8 días de tratamiento con PES. Aunque esta reducción no correlacionó con los niveles protéicos de MYF5, del cual si se observó disminuido a los 4 días de tratamiento. En esta etapa es cuando los miocitos se fusionan y MYF5 podría estar desempeñando un rol en este proceso y también como factor regenerativo durante la miogénesis (Dedieu *et al.*, 2002; Gayraud *et al.*, 2007; Londhe and Davie, 2011).

A diferencia de *Myf5*, no se detectaron cambios en la expresión de *Miogenina*, a nivel de mRNA ni de proteína. Si bien *Miogenina* juega un papel importante promoviendo la fusión de miocitos (Dedieu *et al.*, 2002; Rochlin *et al.*, 2010), la ausencia de cambios en este factor puede indicar que las alteraciones en el proceso

de fusión pueden estar siendo mediadas por otros factores, tales como *β1-integrina* (Schwander *et al.*, 2003), la cual presenta niveles de expresión disminuidos en el microarreglo. De hecho, cada miembro de la familia de MRF's controla un conjunto distinto de genes específicos de músculo durante la fusión celular, y previamente se reportó que la función de MYF5 y Miogenina durante la formación de miotubos no puede ser compensada totalmente por los demás MRF's (Dedieu *et al.*, 2002). De igual manera, no se encontraron cambios en la expresión de *MyoD* a nivel de mRNA, en contraste con estudios previos en células C2C12 en los cuales se encontraron niveles disminuidos de MyoG y MyoD tanto a nivel de mRNA como de proteína a consecuencia del tratamiento con PES (Bai *et al.*, 2012). Por otro lado, estudios en músculo infectado a diferentes tiempos después de la invasión de *T. spiralis*, mostraron un incremento inicial de MyoD y MyoG, seguido por una disminución hasta niveles normales a los 23 días después de la infección (Wu *et al.*, 2001). Las discrepancias entre los reportes previos y los resultados encontrados en este estudio pueden ser atribuidos a los diferentes modelos de estudio utilizados en cada caso, así como el tiempo en que fueron evaluados cada uno de los factores.

La disminución de *Mef2c*, al igual que la de *Myf5*, pueden indicar alteraciones en el proceso de reparación durante la miogénesis post-natal como consecuencia del tratamiento con PES, dado que se ha reportado que ambos factores participan durante la regeneración de miotubos (Gayraud *et al.*, 2007; Londhe and Davie, 2011; Liu *et al.*, 2014).

La proliferación de las células satélite es una respuesta que ocurre como consecuencia del daño en músculo esquelético. De igual manera, cuando ocurre la invasión de la LRN se induce la activación y proliferación de las células satélite, sin embargo, estas células no se convertirán en miotubos si no que contribuirán a la formación de la célula nodriza (Despomier 1998; Wu *et al.*, 2001). En el análisis de microarreglos, se encontraron alteraciones de expresión en 122 genes relacionados con la regulación de la proliferación celular. Entre los cambios encontrados están la expresión disminuida de *Scrib* y *Mfn2*, cuya deficiencia promueve la proliferación de



células satélite (Ono *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2014). Además, resaltan el incremento de *PCNA* y *Wnt1*, los cuales inducen proliferación de células satélite para ayudar a la reparación de fibras musculares (Otto *et al.*, 2008), junto con el aumento en la expresión de *Pax7*, marcador canónico involucrado en la renovación y proliferación de células satélite (Halevy *et al.*, 2004; Oustanina *et al.*, 2004).

De igual manera, el incremento en la expresión de PAX7 inducido por los PES, se relacionó con su papel antagónico a BARX2 en su interacción con  $\beta$ -Catenina. Ya que la mayor interacción de  $\beta$ -Catenina con PAX7 induce proliferación en células musculares (Zhuang *et al.*, 2014) este mecanismo de regulación puede explicar algunos de los cambios observados en los cultivos primarios tratados con PES de LM de *T. spiralis*, tomando en cuenta que la participación de la vía canónica de WNT parece estar favorecida en estos cultivos, tal y como lo sugiere la disminución de dos factores que actúan como reguladores negativos de esta vía: la fosforilación de  $\beta$ -Catenina y la expresión de *Ctnnbip*.

Las alteraciones encontradas en el presente trabajo sugieren que el tratamiento con PES inhibe la diferenciación de mioblastos, induciendo proliferación, así como alterando la organización del citoesqueleto, provocando cambios similares a los inducidos en la fibra muscular por la invasión de la LRN.

Recientemente se reportó que *T. spiralis* puede modular el sistema del proteosoma de su hospedero, inhibiendo la degradación proteosomal, ya que *T. spiralis* cuenta con su propia E2 ligasa (TsUBE2L3), la cual puede reemplazar a la proteína equivalente en su hospedero (White *et al.*, 2016). Esto podría relacionarse con la expresión disminuida de Trim32 encontrada en los cultivos tratados con PES, además de que Actina es uno de los blancos de TRIM32 (Kudryashova *et al.*, 2005).

Alteraciones en el citoesqueleto de Actina así como en *Trim32*, componente del sistema de ubiquitinación, podrían estar asociados con los cambios encontrados en factores de regulación de la miogénesis. Estos hallazgos contribuyen a entender los

múltiples procesos desarrollados por *T. spiralis* durante la formación de la célula nodriza. Sin embargo, se requieren análisis posteriores para determinar la distribución de  $\alpha$ -Actina y su función en las células tratadas con PES, así como la implicación de los PES en la reducción de Mef2c.

## 9. CONCLUSIONES

- ⊗ Los PES de LM de *Trichinella spiralis* inducen alteraciones en genes involucrados en la proliferación y diferenciación de células musculares, así como en múltiples vías de señalización tales como Wnt, MAPK, Jak-STAT y PI3K-Akt.
  
- ⊗ Los PES de LM de *T. spiralis* disminuyen la diferenciación de células musculares, en un modelo de cultivo primario de miocitos.
  
- ⊗ El tratamiento con PES de LM de *T. spiralis* favorece la proliferación de células musculares, probablemente regulada por una mayor interacción de PAX7 con  $\beta$ -Catenina.
  
- ⊗ La actividad de la vía canónica Wnt se encuentra favorecida en los cultivos primarios tratados con PES de LM de *T. spiralis*.
  
- ⊗ Los PES de LM de *T. spiralis* inducen un incremento en la expresión de  $\alpha$ -ACTINA, así como la acumulación de ésta proteína en su forma monomérica.

## 10. PERSPECTIVAS

- ⊗ Analizar qué funciones desempeña el exceso de G-Actina en las células musculares tratadas con PES.
- ⊗ Evaluar qué componentes de los PES actúan como efectores de la vía Wnt.
- ⊗ Estudiar las alteraciones de otras vías como MAPK y Jak-STAT inducidas por los PES de LM de *T. spiralis*.

# 11. ANEXO



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal for Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijpara](http://www.elsevier.com/locate/ijpara)

## *Trichinella spiralis* muscle larvae excretory–secretory products induce changes in cytoskeletal and myogenic transcription factors in primary myoblast cultures

Lizbeth Hernández-Ancheyta<sup>a</sup>, María del Rosario Salinas-Tobón<sup>b</sup>, Juan Carlos Cifuentes-Goches<sup>a</sup>, Javier Hernández-Sánchez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional, No. 2508, San Pedro Zacatenco, 07360 Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Immunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala S/N. Santo Tomás, 11340 Mexico City, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 August 2017

Received in revised form 11 October 2017

Accepted 13 October 2017

Available online xxxxx

#### Keywords:

*Trichinella spiralis*

Cytoskeleton

Primary myoblasts cultures

Transcription

### ABSTRACT

*Trichinella spiralis* infection in skeletal muscle culminates with nurse cell formation. The participation of excretory–secretory products of the muscle larvae has been implicated in this process through different studies performed in infected muscle and the muscle cell line C2C12. In this work, we developed primary myoblast cultures to analyse the changes induced by excretory–secretory products of the muscle larvae in muscle cells. Microarray analyses revealed expression changes in muscle cell differentiation, proliferation, cytoskeleton organisation, cell motion, transcription, cell cycle, apoptosis and signalling pathways such as MAPK, Jak-STAT, Wnt and PI3K-Akt. Some of these changes were further evaluated by other methodologies such as quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and western blot, confirming that excretory–secretory products of the muscle larvae treated primary mouse myoblasts undergo increased proliferation, decreased expression of MHC and up-regulation of  $\alpha$ -actin. In addition, changes in relevant muscle transcription factors (*Pax7*, *Myf5* and *Mef2c*) were observed. Taken together, these results provide new information about how *T. spiralis* could alter the normal process of skeletal muscle repair after ML invasion to accomplish nurse cell formation.

© 2017 Australian Society for Parasitology. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Trichinella spiralis* is an intracellular parasite of mammalian species. After a short intestinal phase, the newborn larvae (NBL) invade the skeletal muscle where they mature into muscle larvae (ML). During this process, *T. spiralis* triggers a series of changes in the infected muscle, which eventually lead to the transformation of the infected cell into the nurse cell phenotype (Teppema et al., 1973; Despommier, 1993). The nurse cell is a structure surrounded by a highly vascularized collagen capsule, which allows parasite survival for long periods of time until the parasite infects a new host (Baruch and Despommier, 1991; Wranicz et al., 1996; Despommier, 1998).

The multiple changes that ML infection elicits in skeletal muscle include the loss of contractile structures, nuclei hypertrophy, mitochondrial damage, basophilic transformation, apoptosis modulation and cell cycle re-entry followed by the arrest in G2/M phase (Despommier, 1975; Jasmer, 1993; Wranicz et al., 1996, 1998; Matsuo et al., 2000; Boonmars et al., 2004; Babal et al., 2011). These changes have been catalogued as a de-differentiation process followed by re-differentiation into an entirely different phenotype (Ko et al., 1994; Wu et al., 2008b). The nature of these events raises questions, and their solutions would provide new insights into new therapeutic approaches against this parasite.

Different approaches have been used to study the muscle alterations induced by *T. spiralis* infection, including microarray analysis of infected muscle (Wu et al., 2005, 2008a) and gene expression changes in C2C12 cells (Bai et al., 2012). Differential gene expression is observed in muscle transcription factors (*MyoD*, *MRF4*, *MyoG*, *MEF2c*) and genes related to satellite cell activation (*Pax3*, *Pax7* and *Desmin*), proliferation (*Pcna*, *Srib*), cell cycle (*p21*, *Rb1*) and apoptosis (*p53*, *MDM2*) (Wu et al., 2001, 2005, 2008a). In vitro,

\* Corresponding author at: Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional, No. 2508, San Pedro Zacatenco, 07360 Mexico City, Mexico. Fax: +55 50 61 33 92.

E-mail address: [javierh@investav.mx](mailto:javierh@investav.mx) (J. Hernández-Sánchez).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.10.002>

0020-7519/© 2017 Australian Society for Parasitology. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

C2C12 cell treatment with excretory–secretory products (ESP) of the ML (ML-ESP) reduces muscle differentiation, induces proliferation and reduces the levels of *MyoD*, *Myogenin* and *p21* in vitro (Bai et al., 2012), which suggest that ML-ESP play a fundamental role in nurse cell formation.

ML-ESP are composed of a complex array of proteins, some of them tyvelosed (Wisnewski et al., 1993) and not fully characterised. MS analysis revealed multiple serin-proteases and a deoxyribonuclease II (Robinson and Connolly, 2005; Wang et al., 2013), while activity of serine/threonine protein kinase, metallo-protease, endonuclease, nucleoside diphosphate kinase and serine protease (Arden et al., 1997; Mak and Ko, 1999; Gounaris et al., 2001; Lun et al., 2003; Park et al., 2016) have also been reported.

Different studies have also detected some of these proteins in nuclei and cytoplasm of infected muscle (Despommier et al., 1990; Lee et al., 1991; Vassilatis et al., 1992; Boonmars et al., 2005; Guiliano et al., 2009). Muscle modifications induced by injection of ML-ESP are similar to those produced during ML development, which suggests that *T. spiralis* uses ESP to induce the necessary changes in muscle to allow nurse cell development (Ko et al., 1994).

The process of nurse cell formation shares some similarities to muscle repair (Matsuo et al., 2000; Wu et al., 2001, 2008b), since *T. spiralis* infection also causes the activation and proliferation of satellite cells but inhibits differentiation, altering the normal muscle repairing course to accomplish cystogenesis (Wu et al., 2008b). Therefore, it would be relevant to further study the changes occurring during this process. Until now, expression analysis has been performed in infected muscle (Wu et al., 2005, 2008a), and these tissues carry a variety of contaminating infiltrated cell types. In addition, studies in the C2C12 cell line may contain some genetic inaccuracies due to genetic and phenotypic differences from the original tissue (Bai et al., 2012).

Although the analysis of primary muscle cell cultures treated with ML-ESP was previously reported (Leung et al., 1997), only a morphological description was performed. Also, microarray analyses from *T. spiralis*-infected tissue late in the infection have already been reported (Wu et al., 2005, 2008a). Therefore, in this work, we developed a microarray expression analysis in primary myoblast cultures, in an attempt to elucidate the early changes induced in ML-ESP treated muscle cells that could lead to nurse cell formation. We found alterations in cytoskeleton organisation associated with changes in Myosin Heavy Chain (MHC) and  $\alpha$ -actin protein and gene expression, presumably related to the morphological and some structural alterations in ML-ESP treated myoblasts. Furthermore, ML-ESP treatment produced changes in muscle transcription factors such as *Pax7*, *Myf5* and *Mef2c* which may give new insights into the mechanisms used by *T. spiralis* to accomplish cystogenesis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animal source

Mice were obtained from the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the Center for Research and Advanced Studies (IACUC–CINVESTAV), Mexico. Animal handling and all experimental protocols were fully accredited and performed in accordance with the Ethical Guidelines and Procedures from the IACUC–CINVESTAV, protocol number 0084-14, which fulfills the Mexican Official Norm (NOM-062ZOO-1999) “Technical specifications for the Care and Use of Laboratory Animals” and the National Institutes of Health, USA, guide for the care and use of laboratory animals.

### 2.2. ML-ESP preparation

ML-ESP were collected from *T. spiralis* muscle larvae (MSU/MEX/91/CM-91) from experimentally infected CD-1 mice at least 30 days p.i. as previously described (Gamble et al., 1988; Appleton and Usack, 1993). Briefly, ML recovered from infected muscle were subjected to an acid-pepsin digestion, and then incubated in serum-free RPMI 1640 medium containing 100 U/ml of penicillin and 100  $\mu$ g/ml of streptomycin, at 37 °C under 5% atmospheric CO<sub>2</sub>. After 72 h, the supernatant was collected, filtered through a 0.2  $\mu$ m pore-size membrane, precipitated with ammonium sulphate and dialyzed against PBS (1 $\times$ ). Protein concentration was determined by Bradford assay and integrity was evaluated by SDS–PAGE. ML-ESP was fractionated and kept at –70 °C.

### 2.3. Primary myoblast culture

Skeletal muscle was obtained from hind limbs of 2–4 days post-natal BALB/c mice. Digestion was performed at 32 °C as previously reported (Das et al., 2007; Sander et al., 2013). Cells were cultured at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> under proliferation conditions (Minimum Essential Medium Eagle, 10% FBS, 100 U/ml of penicillin, 100  $\mu$ g/ml of streptomycin, MEM amino acids solution (Sigma (USA), M5550)) for 24 h and then induced to differentiate by cultivating in differentiation medium (DM) (DMEM supplemented with 3% FBS, 7% Adult Bovine Serum, 100 U/ml of penicillin, 100  $\mu$ g/ml of streptomycin, MEM amino acids solution (Sigma, M5550) and GlutaMAX (Gibco, (USA) Cat. 35050061). Depending on the assay, cells were grown for various periods of time in the presence of different ML-ESP concentrations. All experiments were performed from newly isolated cells with no more than 9 days under culture, without passages.

### 2.4. RNA isolation

Primary myoblasts ( $5 \times 10^5$  cells) were seeded onto 6 well plates. After a 24 h proliferation period, cells were induced to differentiate, and 50  $\mu$ g of ML-ESP were added to the cultures at days 0 and 4 under differentiation conditions. After 8 days of ML-ESP treatment, total RNA was extracted from cells with Trizol (Invitrogen, USA), according to the manufacturer's instructions and digested with DNase I (New England Biolabs, USA). Concentration and purity of RNA were analysed by NanoDrop ND-2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) and used both in microarray analysis and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) assays.

### 2.5. Microarray analysis

Total RNA extracted from cells was used for cDNA synthesis, sample labelling and hybridisation by the DNA Microarray Unit of the Institute of Cellular Physiology of National Autonomous University of Mexico (UNAM, Mexico). Microarray data analysis was performed using genArise software, developed by the Computing Unit of the Institute of Cellular Physiology of UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>). GenArise implements background correction, lowers normalisation, and intensity filter. It also replicates analysis and selects differentially expressed genes. This software identifies differentially expressed genes by calculating an intensity-dependent z-score with a sliding window algorithm, which calculates the mean and S.D. within a window surrounding each data point, and defines a z-score where z measures the number of S.Ds. that separates a data point from the mean.

$$z_i = [R_i - \text{mean}(R)] / \text{sd}(R)$$

where  $z_i$  is the z-score for each element,  $R_i$  is the log-ratio for each element, and  $sd(R)$  is the S.D. of the log-ratio. With this criterion, the elements with a z-score with two S.D. above or below media correspond to the significantly and differentially expressed genes. Metabolic pathways with altered gene expression were evaluated with the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Ogata et al., 1999) and DAVID 2.0 Functional Annotation Tool (Huang et al., 2009), and gene ontology (GO) analysis was performed with AmiGO (Ashburner et al., 2000).

## 2.6. qRT-PCR

qRT-PCR was performed in triplicate with a SYBR-Green fluorescent dye kit (One-Step qRT-PCR, Kapa Biosystems, USA) and a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Data were analysed using Applied Biosystems sequence detection software, and target gene expression was normalised to that of the housekeeping gene *Csnk2a2*. The primer sequences used in this study are listed in Supplementary Table S1. Relative mRNA expression levels were calculated using the comparative Ct method with the formula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak and Schmittgen, 2001).

## 2.7. IFAT

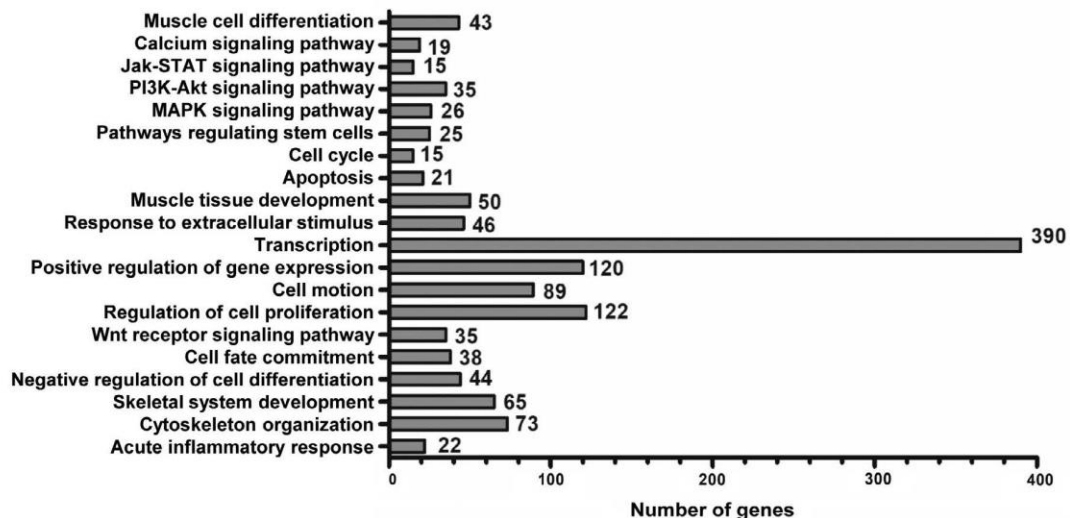
For immunostaining, primary myoblast cultures were grown on 96 well optical plates (Corning, USA). After a 24 h proliferation period, 2.5  $\mu$ g of ML-ESP were added to the cultures at days 0 and 4 under differentiation conditions. After 2, 4 or 8 days, cells were fixed with 3% (v/v) formaldehyde for 10 min at room temperature followed by permeabilisation with 0.2% Triton-100 diluted in PBS 1 $\times$  for 10 min at room temperature and blocked with 3% (w/v) BSA for 1 h at 37 °C. Then, cells were incubated with monoclonal mouse anti-myosin heavy chain (MYH1/2/3, Santa Cruz Biotechnology (USA) Cat# sc-53092, 1:50) overnight at 4 °C. Cells were then incubated with a secondary antibody (goat anti-mouse IgM-FITC, 1:200) (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-2082) for 2 h at 37 °C. For nuclei staining, cells were incubated with DAPI for 5 min at room temperature. Finally, the cells were visualised with laser scanning confocal microscopy (Carl Zeiss).

## 2.8. Proliferation assays

Cell proliferation was assessed by monitoring the conversion of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) substrate to formazan. Primary myoblasts (100  $\mu$ l;  $1 \times 10^5$  cells/ml) were seeded into 96 well plates. After a 24 h proliferation period, cells were induced to differentiate, and ML-ESP were added at different concentrations (a single addition in a 0–2.5  $\mu$ g range with 0.5  $\mu$ g increments). After 4 days, the culture medium was discarded, and cells were washed twice with PBS. Then, 110  $\mu$ l of DMEM supplemented with MTT (5 mg/mL) were added to the wells and incubated for 3 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, media were removed and the blue formazan crystals trapped in cells were dissolved in sterile DMSO (100  $\mu$ l) by incubating at 37 °C for 30 min. The absorbance at 595 nm was measured with a plate reader (Thermo Scientific Multiskan EX). The absorbance of untreated cells (control) was taken as 100% cell proliferation. The growth curve was constructed by plotting absorbance (blanked with DMSO) against ML-ESP concentration.

## 2.9. Western blot

Cells were cultured as described for RNA isolation. Total protein was extracted from primary cells with RIPA buffer containing 1 mM PMSF and Complete 1 $\times$  (Roche, Switzerland) at different times under differentiation conditions (2–8 days), and protein concentration was determined by Bradford method (BioRad, USA). Protein samples were separated by 10% SDS-PAGE and subsequently transferred to a Polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) (BioRad). Membranes were blocked with 2% ProPure milk (Amresco, USA) in TBS-T buffer (Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20) overnight and then incubated overnight with antibody diluted in blocking buffer including anti-PAX7 (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-25409, 1:1000) anti-MYF5 (GeneTex, USA), Cat# GTX63307, 1:1000), anti-Myogenin (GeneTex Cat# GTX63352, 1:1000), anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, GeneTex Cat# GTX100118, 1:5000), anti-MYH (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-20641, 1:1000), anti- $\alpha$ -actin (GeneTex Cat# GTX112860, 1:1000). Finally, membranes were incubated with a goat Anti-Rabbit IgG Polyclonal Antibody, Horseradish Peroxidase (HRP) conjugated (GeneTex Cat# GTX85304, 1:1000–



**Fig. 1.** Gene expression is altered in primary mouse myoblasts treated with *Trichinella spiralis* excretory–secretory products of the muscle larvae. Twenty out of 358 categories are shown. Numbers of genes with altered expression are indicated in each category.  $P < 0.05$ .



1:2000 dilution) in blocking buffer overnight. The peroxidase was developed using Enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting detection reagents (GE Healthcare Buckinghamshire, UK). The autoradiographies were analysed by ImageJ software to quantify the expression levels as electronic density (pixels) and plot as relative expression.

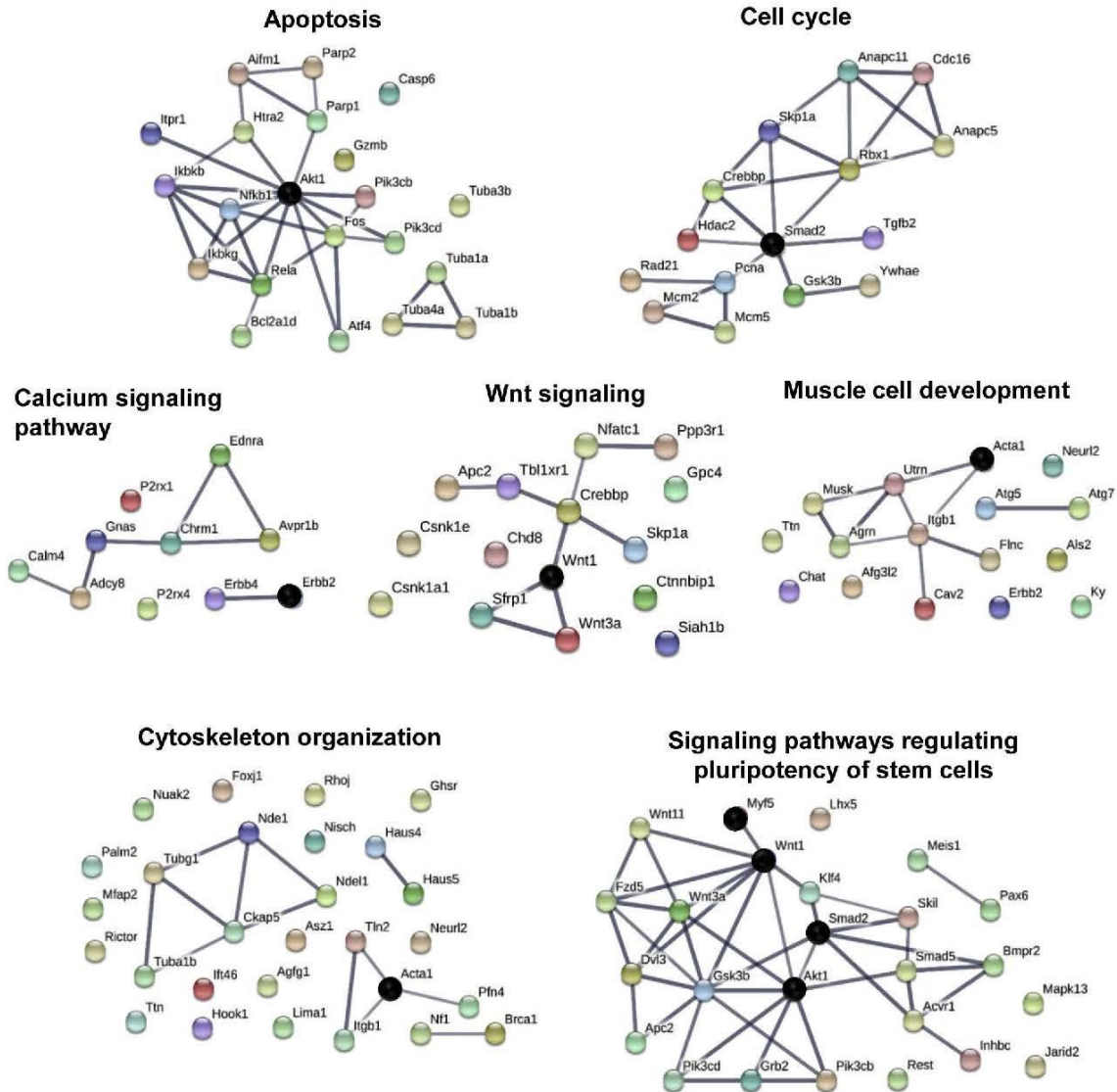
### 2.10. Statistical analysis

The results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. for proliferation assays or as the mean  $\pm$  S.D. for qRT-PCR and western blot assays. The statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 software for Windows. Differences between the mean values of normally distributed data were assessed using the Student's *t*-test. *P* values were expressed as \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 and \*\*\**P* < 0.0001 for comparison with the control group.

## 3. Results

### 3.1. Gene expression changes induced in ML-ESP treated primary myocytes

In an attempt to understand the mechanisms by which *T. spiralis* alters adult myogenesis in infected skeletal muscle, microarray analysis from ML-ESP treated primary myoblast cultures was performed after 8 days under differentiation conditions. Microarray experiments were performed for two different biological samples, each one with a swap replicate. Out of the 22,000 genes analysed, the expression of 661 genes was up-regulated (*z*-score > 2 S.D.), and 425 genes were down-regulated by ML-ESP treatment (*z*-score < -2 S.D.). Classification of genes with altered expression based on GO terms revealed a total of 358 biological processes and signalling pathways affected (Fig. 1). Within these results, different processes linked to muscle cell differentiation



**Fig. 2.** Interactions among genes with altered expression within different biological processes in primary mouse myoblasts treated with *Trichinella spiralis* excretory-secretory products of the muscle larvae. Physical and/or functional interactions with high confidence interaction scores (>0.7) are shown within each group. Line thickness indicates the strength of data support. Black dots point to genes of interest such as the Wnt pathway and Myogenesis. The protein association network was generated in STRING 10.0.

and development were found in addition to pathways controlling proliferation, cell cycle, apoptosis, stem cells pluripotency and cytoskeleton organisation (Fig. 1).

Interactions among genes belonging to the different biological process were analysed to visualise possible targets of the ML-ESP and candidates responsible for alterations observed at the morphological and genetic levels in primary myoblast cultures. The Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) algorithm (Jensen et al., 2009) was used to build interaction networks of the differentially expressed genes (Fig. 2). Among these, the reduced expression of *Akt1* and *Myf5* stands out, in addition to the increased expression of *Nfkb1*, *Smad2*, *Wnt1* and *ErbB2*. These alterations may cause a delay in muscle differentiation and atrophy by promoting proliferation and myoblast survival (Gayraud-Morel et al., 2007; Li et al., 2008; Otto et al., 2008; Gardner et al., 2012; Tando et al., 2016).

### 3.2. ML-ESP promotes proliferation in vitro and provokes cytoskeleton disarrangement

To assess whether proliferation is affected in ML-ESP treated primary myoblast cultures, an MTT assay was performed on 4 day cultures treated with different concentrations of ML-ESP. As expected, ML-ESP treatment increased proliferation in a dose-dependent manner (from 0 to 2.5 µg), as shown in Fig. 3. Proliferation was enhanced with 2.5 µg of ML-ESP, so IFATs were performed using this condition.

To evaluate whether ML-ESP treatment alters myoblast differentiation in vitro, MHC, a myogenic differentiation marker, was evaluated by immunofluorescence during differentiation of cultures treated with ML-ESP. Myotubes were not detected after 2 days of differentiation (Fig. 4A, B) but short myotubes developed after 3 days, which became more elongated with further culturing (Fig. 4C, E). Myotubes formed by control cells were numerous, long and often branched, and showed many nuclei distributed along their extension (Fig. 4C, E). On the contrary, myotube formation in ML-ESP treated myoblasts decreased approximately 50%, and short myotubes appeared at day 4, but they had reduced and clumped nuclei (Fig. 4D, F). In addition, myotubes were shorter and thinner than those of untreated cultures. Immunofluorescence analysis revealed that the distribution of MHC in treated cultures was more concentrated in the nuclear periphery in contrast to thin filaments characteristic of differentiated muscle cells (Fig. 4E, F). A reduced expression of MHC after ML-ESP treatment was further confirmed by western blot analysis (Fig. 5).

α-actin, the principal actin isoform in muscle cells, was also analysed. qRT-PCR and western blot analyses showed increased protein levels starting at day 4 under differentiation conditions in treated cultures (Fig. 6).

### 3.3. ML-ESP treatment alters the expression of factors required for muscle specification and regeneration

Microarray data showed altered expression of some Myogenic Regulatory Factors (MRFs) and transcription factors involved in myogenic commitment and maintenance (Fig. 1). Therefore, expression of some of these genes was analysed by RT-PCR and western blot assays. Paired box gene 7 (PAX7) is a satellite marker highly expressed in early stages of postnatal myogenesis when satellite cells are activated and proliferate. Accordingly, *Pax7* had an up-regulated expression by microarray analysis (Fig. 1). This was further confirmed by qRT-PCR (Fig. 7A). Under normal conditions, PAX7 expression decreased as differentiation proceeded, as shown in Supplementary Fig. S1. However, in cultures treated with ML-ESP, PAX7 levels remained up-regulated from early differentiation stages (Fig. 7B) until the end of the culture (Fig. 7C). This is

in agreement with the fact that PAX7 inhibits differentiation by repressing MRFs (Olguín and Pisconti, 2012).

The basic helix–loop–helix transcription factor MYF5, whose expression is limited to satellite cells and myoblasts, but its role at later stages remains unclear, has been typically related to regulation of the early stages of myogenesis (Tajbakhsh et al., 1997; Olguín and Pisconti, 2012;). Similar to PAX7, MYF5 expression is reduced in normally differentiated cultures (Supplementary Fig. S1). However, decreased mRNA expression was found both by microarray analysis and qRT-PCR in treated cultures (Fig. 7D). Protein level down-regulation was evident at day 4 under differentiation conditions (Fig. 7E) without changes in the final stages of differentiation (Fig. 7F). This expression profile agrees with the recently reported role of MYF5 in muscle degeneration and regeneration (Gayraud-Morel et al., 2007).

Cell fusion is a major step for cell differentiation, and most of these events occur between days 3–4 in our primary cultures (Fig. 4C). Coincidentally, it is at these days when Myogenin showed the higher levels of expression (Supplementary Fig. S1). Unlike *Pax7* and *Myf5*, ML-ESP treatment did not affect Myogenin expression, which was corroborated by qRT-PCR (Fig. 7G) and western blot (Fig. 7H, I).

Although Myogenin, as well as *MyoD*, can induce myogenesis in various cell lines, no changes in the expression of *MyoD* were found by microarray analysis and confirmed by qRT-PCR (Fig. 8A), suggesting that myogenesis regulation may be modulated by other factors.

In fact, a decreased expression of *Mef2c* (myocyte enhancer factor 2c), usually expressed late in the differentiation programme, was found in ML-ESP treated cultures after 8 days under differentiation conditions (Fig. 8B). This reduction is in agreement with the role of MEF2 family proteins together with MRFs to coordinate the activities of co-activators and co-repressors to control gene expression during myogenesis (Berkes and Tapscott, 2005). Some studies suggest that *Mef2* genes interact with Myogenin bHLH domains to activate downstream muscle-specific genes and it has recently been proved that MEF2A, C and D are essential for a proper skeletal muscle regeneration (Molkentin et al., 1995; Liu et al., 2014).

ML-ESP treatment decreased mRNA expression of *Trim32* (Fig. 8C), an E3 ubiquitin ligase associated with myofibrils which ubiquitinates actin and plays a crucial role in muscle homeostasis (Kudryashova et al., 2005; Lazzari and Meroni, 2016). A recent

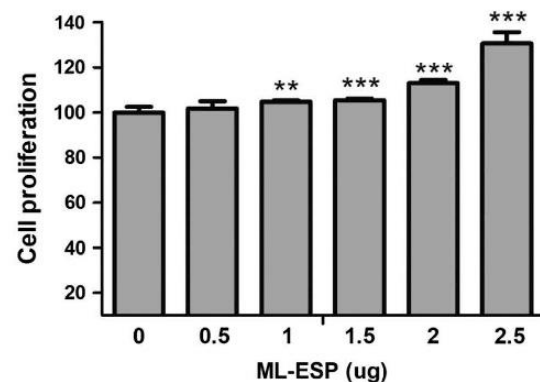
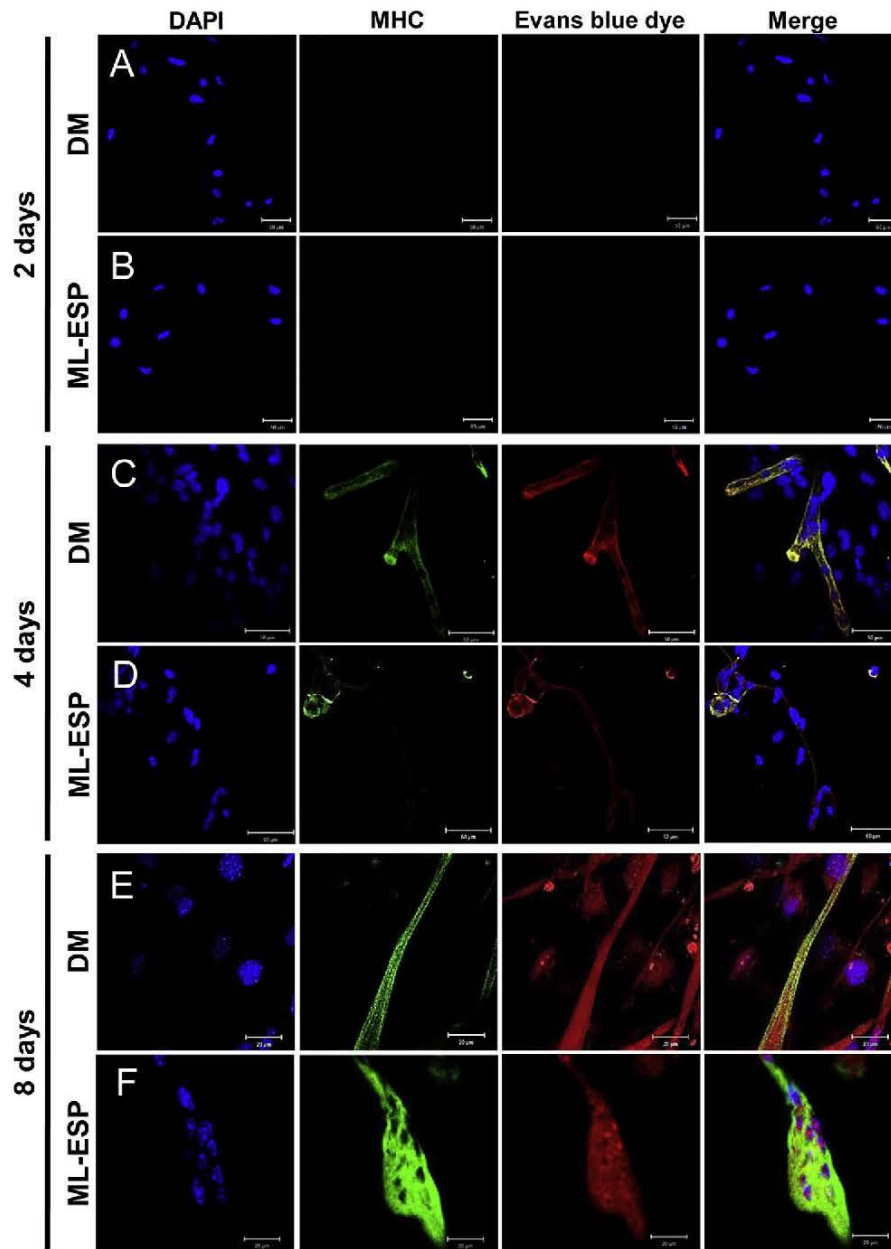


Fig. 3. *Trichinella spiralis* excretory–secretory products of muscle larvae promote proliferation of primary mouse myoblasts. Myoblasts were plated in differentiation medium with or without excretory–secretory products of the muscle larvae and proliferation rates were assessed after 4 days under differentiation conditions. The proliferation of cells without treatment was taken as 100%. Values are expressed as the mean ± S.E.M. of three independent experiments. \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.0001$  compared with the control culture.



**Fig. 4.** *Trichinella spiralis* excretory–secretory products of muscle larvae treatment inhibits differentiation of primary mouse myoblasts. Myoblasts were plated in differentiation medium (DM) with or without excretory–secretory products of the muscle larvae (ML-ESP). Cells were fixed after 2 (A, B), 4 (C, D) or 8 days (E, F), stained with anti-Myosin Heavy Chain (MHC) antibody and counterstained with DAPI and Evans blue dye. These images are representative of three independent experiments.

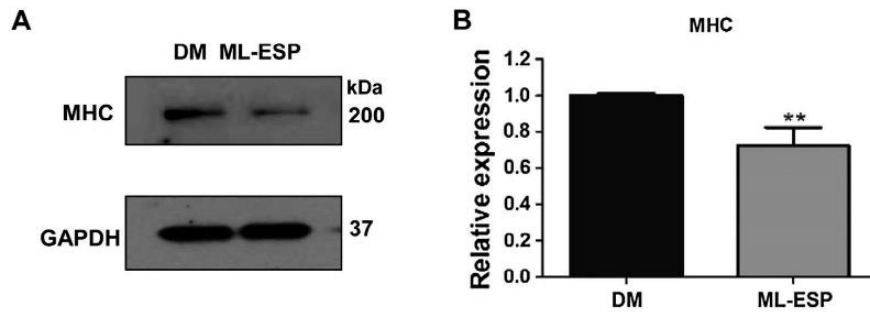
report about the presence of *TsUBE2L3*, a *T. spiralis* E2 enzyme able to bind human E3 Ub ligases and alter the host Ub pathway (White et al., 2016) has been published, broadening the possibilities for host–parasite interactions.

As a possible cause for the  $\alpha$ -actin increased expression, presumably as G-actin, we decided to evaluate *Thymosin  $\beta$ 4* expression, a G-actin sequestering factor (Sanders et al., 1992) that facilitates skeletal muscle regeneration (Hara, 2011). Interestingly, increased *Thymosin  $\beta$ 4* mRNA expression was found in 8 day cultures treated with ML-ESP (Fig. 8D), suggesting that *Thymosin  $\beta$ 4* could be participating in inhibiting the polymerisation of actin filaments by stabilising  $\alpha$ -actin in its monomeric form in these cultures.

#### 4. Discussion

*Trichinella spiralis* invasion triggers several changes in infected muscle that can be explained as a structural remodelling caused by a genetic reprogramming of activated satellite cells. The nature of these changes has been assessed using different approaches. These include inhibition of myotube formation and morphological alterations induced by *T. spiralis* ML-ESP using primary myoblast cultures (Leung et al., 1997), gene alterations in infected tissue (Wu et al., 2008a, 2005) and inhibition of differentiation employing the C2C12 cell line as a model, among others (Bai et al., 2012).

Despite the technical limitations and the need for further validation of data, microarray analysis is an informative tool that



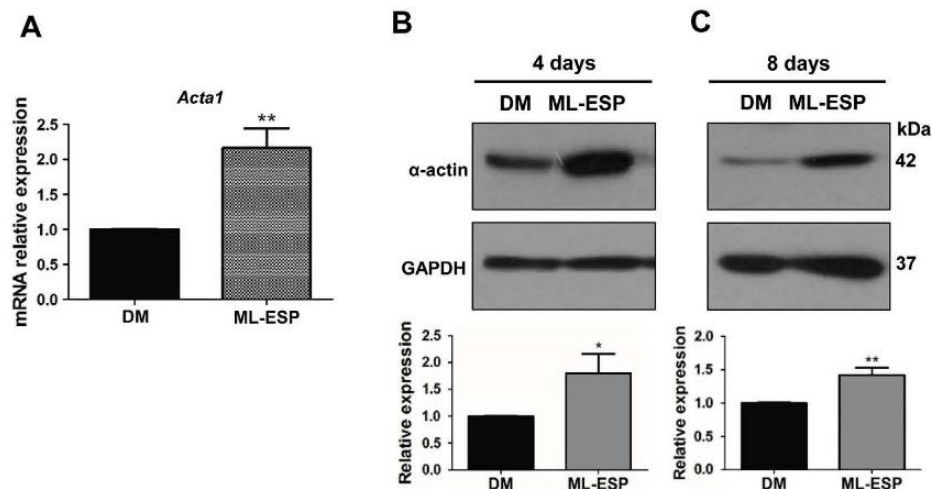
**Fig. 5.** Myosin decreases in primary mouse myoblasts treated with *Trichinella spiralis* excretory–secretory products of the muscle larvae. (A) Myoblasts were cultured for 8 days in differentiation medium with or without excretory–secretory products of the muscle larvae (ML-ESP) and the protein expression levels of Myosin Heavy Chain (MHC) were assessed by western blot. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase was included as a loading control. (B) Densitometric analysis from three independent experiments.  $^{**}P < 0.01$  compared with the control cultures (differentiation medium only).

allows determination of metabolic pathways and biological process alterations (Bumgarner, 2013). Thus, microarray analysis has been used as an initial approach to unravel the changes produced in *T. spiralis*-infected muscle. However, there is an inherent transcriptional heterogeneity attributable to different infiltrated cell types associated with infected tissue studies (Matsuo et al., 2000). To overcome this issue, in this work, a microarray analysis was performed in primary cultures enriched for myogenic cells to analyse gene expression alterations induced in myoblasts by *T. spiralis* ML-ESP in an attempt to understand the changes that proliferating satellite cells undergo once muscle cells are infected.

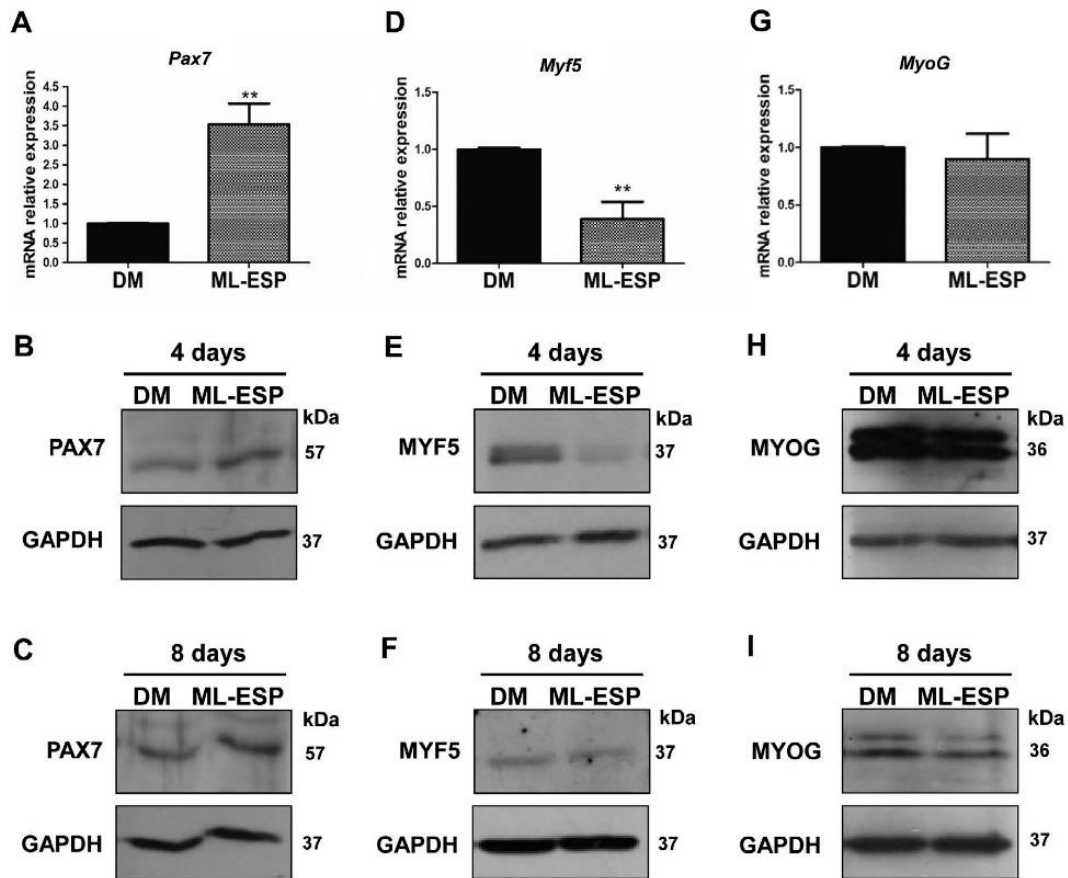
This analysis revealed alterations in different pathways such as apoptosis, cell cycle, and cytoskeleton organisation including those related to muscle cell development, proliferation and differentiation. A similar profile was previously observed in *T. spiralis*-infected muscle analysed by microarrays (Wu et al., 2005, 2008a), where the roles of critical signalling pathways essential for muscle differentiation such as MAPK, Wnt and JAK-STAT were clear. Primary myoblast culture cells such proliferating satellite cells are activated and grow rapidly, paralleling the changes produced in *T. spiralis*-infected muscle. This phenomenon was also observed in our cultures, resembling the events occurring in the

early stages of nurse cell formation. Proliferation is an essential step given that a nurse cell is formed out of the cytoplasm derived from activated and proliferating satellite cells (Wrancicz et al., 1998). This increase in proliferation was previously observed in C2C12 treated with ML-ESP (Bai et al., 2012).

The nodular and more granular structures observed in myoblasts treated with ML-ESP should be associated with structural changes in the cytoskeleton organisation. Thus, in this work, several cytoskeletal changes were observed in primary myoblasts treated with ML-ESP, including decreased MHC expression. These changes are in agreement with previous reports in C2C12 cells (Bai et al., 2012) and the loss of contractile proteins as reported during the early phase of muscle invasion by NBL (Despommier, 1975). Decreased levels of MHC were also previously observed in C2C12 cells with transfection of Tsp43, a *T. spiralis* protein with probable DNA binding activity (Jasmer and Kwak, 2006). In addition, this is to our knowledge the first report of an ML-ESP-mediated up-regulation of  $\alpha$ -actin.  $\alpha$ -Actin increased twice in 4 day ML-ESP treated cultures, when myotube formation started, so there is a strong probability that accumulation of this protein is occurring as free globular G-actin. This may produce disruptions of actin cytoskeleton, affecting myoblast migration, and reducing



**Fig. 6.**  $\alpha$ -actin is up-regulated in *Trichinella spiralis* excretory–secretory products of muscle larvae treated primary mouse myoblasts. (A) The mRNA relative expression was determined by real-time PCR in 8 day myoblasts cultured in differentiation medium (DM) with or without excretory–secretory products of the muscle larvae (ML-ESP). Protein expression levels of  $\alpha$ -actin were assessed by western blot from myoblasts cultured for 4 (B) or 8 days (C) in differentiation medium with or without excretory–secretory products of the muscle larvae. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was included as a loading control. The corresponding densitometric analysis is shown for B and C.  $^{*}P < 0.05$  and  $^{**}P < 0.01$  compared with the control cultures (DM only). These Figs. are representative of three independent experiments.



**Fig. 7.** Altered expression of *Pax7* and myogenic regulatory factors in primary myoblast cultures treated with *Trichinella spiralis* excretory–secretory products of the muscle larvae. *Pax7*, *Myf5* and *MyoD* mRNA relative expression in 8 day myoblast cultures treated with excretory–secretory products of the muscle larvae (ML-ESP) (A, D, G). Myoblasts were treated as described in Section 2.9 and the protein expression levels of PAX7 (B, C), MYF5 (E, F) and MYOG (H, I) were assessed by western blot at the indicated times; glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was included as loading control. \* $P < 0.01$  compared with the control cultures (DM, differentiation medium only). These images are representative of three independent experiments.

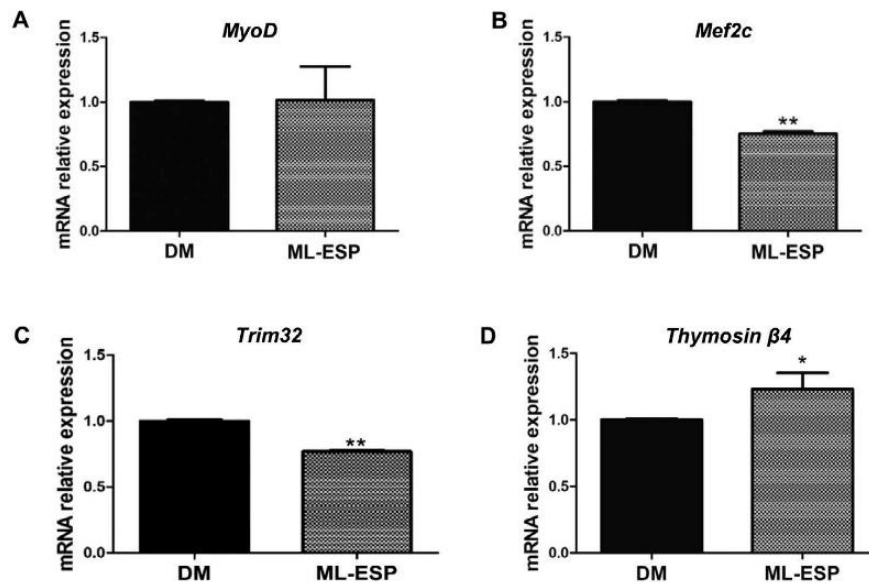
cell fusion in ML-ESP treated cultures. The morphology and cytoskeleton organisation of the treated cells suggest that actin and myosin filaments have lost their arrangement. Indeed, cytoskeletal rearrangements are crucial for proper cellular migration and fusion to accomplish the differentiation process (Nowak et al., 2009). In vivo, alterations in myoblast fusion interfere with the repair process (Rochlin et al., 2010), where cell migration is a significant step. Increased expression of *Thymosin  $\beta$ 4* mRNA, the major sequestering protein of G-actin in many cell types (Husson et al., 2010), suggests its participation as an actin polymerising inhibitor. This role could be a collateral effect of its main function during nurse cell formation, where it has been shown to stimulate blood vessel formation (Sanders et al., 1992; Ock et al., 2013).

An orchestrated expression of MRFs is a key factor to regulate postnatal myogenesis, and disruptions in this process can lead to alterations in final muscle morphology (Dedieu et al., 2002; Gayraud-Morel et al., 2007). Myotube inhibition may be partially caused by regulation of the expression of MRFs by ML-ESP. In addition, myoblast differentiation depends on the control of MRFs expressed at different stages of differentiation which activate muscle genes by binding to specific promoter sequences (Londhe and Davie, 2011). Assessment of the expression of some myogenic regulators showed increased levels of PAX7, a transcription factor involved in maintenance and renewal of satellite cells (Tremblay and Gruss, 1994; Relaix et al., 2006). Over-expression of this factor

both inhibits MHC expression (Mckinnell et al., 2008) and myoblast differentiation by repressing the function of other MRFs. Although it has been reported that *Myf5* levels depend on *Pax7* expression (Soleimani et al., 2012), down-regulation in *Myf5* mRNA levels was detected 8 days after treatment. However, this reduction only correlated with MYF5 reduction at 4 but not 8 days after treatment. At this time primary fusion of myocytes occurs and MYF5 may be playing a role in the fusion of mononuclear cells into multinucleated myotubes as well as being a regenerative myogenesis factor (Dedieu et al., 2002; Gayraud-Morel et al., 2007; Londhe and Davie, 2011).

Unlike MYF5, no changes were detected in Myogenin, both at the mRNA and protein levels, even though it has a significant role in promoting primary myocyte fusion (Dedieu et al., 2002; Rochlin et al., 2010), suggesting that alterations in the fusion process may be mediated by other factors such as  $\beta$ 1-integrin (Schwander et al., 2003) which appeared down-regulated in the microarray assay. Myogenin also triggers the expression of myotube-specific genes and is required for skeletal muscle development and survival at the embryonic stage, but it is dispensable for postnatal life even though it plays a role in body homeostasis (Meadows et al., 2008).

*MyoD* did not show alterations at the mRNA level, in contrast to previous studies with C2C12 cells where the expression of *MyoG* and *MyoD* mRNAs and protein levels were reduced by ML-ESP (Bai et al., 2012). Studies in infected muscle at different times after



**Fig. 8.** *Mef2c* and *Trim32* mRNAs are reduced in primary mouse myoblasts treated with *Trichinella spiralis* excretory–secretory products of the muscle larvae. mRNA relative expression from myoblasts treated with excretory–secretory products of the muscle larvae (ML-ESP) was determined by real-time PCR after 8 days. Expression of *MyoD* (A), *Mef2c* (B), *Trim32* (C) and *Thymosin  $\beta$ 4* (D). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  compared with the control cultures (DM, differentiation medium only). These images are representative of three independent experiments.

*T. spiralis* invasion showed an initial increase in *MyoD* and *MyoG* mRNA between 8 and 18 days p.i., followed by a reduction to normal levels up to 23 days p.i. (Wu et al., 2001). The discrepancy between those data and ours may be attributable to differences in the models used, and the time at which the protein level was evaluated.

Down-regulation of *Mef2c* and *Myf5* could indicate alterations in the repair process during adult myogenesis as a consequence of ML-ESP treatment since both factors have been reported to play a role during regeneration of myotube formation (Gayraud-Morel et al., 2007; Londhe and Davie, 2011; Liu et al., 2014).

Proliferation is a response to injury in adult skeletal muscle, and when *T. spiralis* NBL penetrates into the skeletal muscle it causes the activation and proliferation of satellite cells. However, these cells do not differentiate to myotubes but contribute to nurse cell formation (Despommier, 1998; Wu et al., 2001). In our microarray analysis, 122 genes related to regulation of cell proliferation were altered, among which there was decreased expression of *Scrib* and *Mfn2*, whose deficiency has been reported to promote satellite cell proliferation (Chen et al., 2014; Ono et al., 2015) in addition to the up-regulation of *Pcna* and *Wnt1*. These factors induce satellite cell proliferation which helps in the repair process of muscle fibres (Otto et al., 2008) together with *Pax7*, a canonical marker involved in satellite cell renewal and proliferation (Halevy et al., 2004; Oustanina et al., 2004).

The modifications described in this work may suggest that ML-ESP treatment can inhibit myoblast differentiation by not only promoting proliferation but also altering cytoskeleton function, and inducing changes in muscle cells similar to those caused by NBL invasion in the muscle fibre.

It was recently reported that *T. spiralis* could modulate the host proteasome system by inhibiting proteasomal degradation, since *T. spiralis* has an E2 ligase (TsUBE2L3) that can replace the equivalent host protein (White et al., 2016). This could be related to down-regulated expression of *Trim32* found in treated cultures, since one of the targets of TRIM32 is actin (Kudryashova et al., 2005).

Alterations in the actin cytoskeleton and *Trim32* Ub pathway component may be associated with the changes observed in myo-

genic regulatory factors. This may shed light on the multiple processes elicited by *T. spiralis* during nurse cell formation. However, further analysis is necessary to determine actin distribution and function in cells treated with ML-ESP.

In this work, we developed primary myoblast cell cultures to evaluate gene expression changes induced by *T. spiralis* ML-ESP in muscle cells. We found increased proliferation and cytoskeleton alterations in addition to changes in transcription factors involved in myogenesis.

#### Acknowledgements

The authors thank Lorena Chávez González, Simón Guzmán León, and José Luis Santillán Torres and Jorge Ramírez, for technical assistance in the microarray analyses, Gerardo Coello, Gustavo Corral and Ana Patricia Gómez for assistance with genArise software, and María de Jesus Perea Flores and Alberto Peña Barrientos for their technical assistance with Confocal microscopy at the Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías (CNMN) of Instituto Politécnico Nacional (IPN), Mexico. LHA was granted a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexico. This work was supported by Grants of SIP 20161165 and 20170647 to M.R.S.T. and CONACYT (Grant 27975 to J.H.S).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.10.002>.

#### References

- J.A. Appleton L. Usack Identification of potential antigenic targets for rapid expulsion of *Trichinella spiralis* Mol. Biochem. Parasitol. 58 1993 53 62 10.1016/0166-6851(93)90090-K
- S.R. Arden A.M. Smith M.J. Booth S. Tweedie K. Gounaris M.E. Selkirk Identification of serine/threonine protein kinases secreted by *Trichinella spiralis* infective larvae Mol. Biochem. Parasitol. 90 1997 111 119 10.1016/S0166-6851(97)00145-X
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L.,

- Kasarskis, Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G., 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* 25, 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>.
- Babal, P., Milcheva, R., Petkova, S., Janega, P., Humrikova, Z., 2011. Apoptosis as the adaptation mechanism in survival of *Trichinella spiralis* in the host. *Parasitol. Res.* 109, 997–1002. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2343-2>.
- Bai, X., Wu, X., Wang, X.X., Liu, X., Song, Y., Gao, F., Miao, Y., Yu, L., Tang, B., Wang, X., X., Radu, B., Vallee, I., Boireau, P., Wang, F., Zhao, Y., Liu, M., 2012. Inhibition of mammalian muscle differentiation by excretory secretory products of muscle larvae of *Trichinella spiralis* in vitro. *Parasitol. Res.* 110, 2481–2490. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2789-2>.
- Baruch, A.M., Despommier, D.D., 1991. Blood vessels in *Trichinella spiralis* infections: a study using vascular casts. *J. Parasitol.* 77, 99–103.
- Berkes, C.A., Tapscott, S.J., 2005. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 585–595. <https://doi.org/10.1016/j.semdcb.2005.07.006>.
- Boonmars, T., Wu, Z., Nagano, I., Nakada, T., Takahashi, Y., 2004. Differences and similarities of nurse cells in cysts of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis*. *J. Helminthol.* 78, 7–16. <https://doi.org/10.1079/JOH2003203>.
- Boonmars, T., Wu, Z., Nagano, I., Takahashi, Y., 2005. What is the role of p53 during the cyst formation of *Trichinella spiralis*? A comparable study between knockout mice and wild type mice. *Parasitology* 131, 705–712. <https://doi.org/10.1017/S0031182005008036>.
- Bumgarner, R., 2013. DNA microarrays: Types, Applications and their future. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 6137, 1–17. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2201s101.DNA>.
- Chen, K.H., Dasgupta, A., Ding, J., Indig, F.E., Ghosh, P., Longo, L.D., 2014. Role of mitofusin 2 (Mfn2) in controlling cellular proliferation. *FASEB J.* 28, 382–394. <https://doi.org/10.1096/fj.13-230037>.
- Das, M., Wilson, K., Molnar, P., Hickman, J.J., 2007. Differentiation of skeletal muscle and integration of myotubes with silicon microstructures using serum-free medium and a synthetic silane substrate. *Nat. Protoc.* 2, 1795–1801. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.229>.
- Dedieu, S., Mazères, G., Cottin, P., Brustis, J.J., 2002. Involvement of myogenic regulator factors during fusion in the cell line C2C12. *Int. J. Dev. Biol.* 46, 235–241.
- Despommier, D., 1975. Adaptive changes in muscle fibers infected with *Trichinella spiralis*. *Am. J. Pathol.* 78, 477–496.
- Despommier, D.D., 1998. How does *Trichinella spiralis* make itself at home? *Parasitol. Today*. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(98\)01287-3](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(98)01287-3).
- Despommier, D.D., 1993. *Trichinella spiralis* and the concept of niche. *J. Parasitol.* 79, 472–482.
- Despommier, D.D., Gold, I.A.M., Buck, S.W., Capo, V., Silberstein, D., Gold, A.M., Buck, S.W., Capo, V., Silberstein, D., 1990. *Trichinella spiralis*: secreted antigen of the infective L1 larva localizes to the cytoplasm and nucleoplasm of infected host cells. *Exp. Parasitol.* 71, 27–38.
- Gamble, H.R., Rapić, D., Marinculić, A., Murrell, K.D., 1988. Evaluation of excretory-secretory antigens for the serodiagnosis of swine trichinellosis. *Vet. Parasitol.* 30, 131–137. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(88\)90160-4](https://doi.org/10.1016/0304-4017(88)90160-4).
- Gardner, S., Anguiano, M., Rotwein, P., 2012. Defining Akt actions in muscle differentiation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 303, C1292–C1300. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00259.2012>.
- Gayraud-Morel, B., Chrétien, F., Flamant, P., Gomès, D., Zammit, P.S., Tajbakhsh, S., 2007. A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis. *Dev. Biol.* 312, 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.08.059>.
- Gounaris, K., Thomas, S., Najarro, P., Selkirk, M.E., 2001. Secreted variant of nucleoside diphosphate kinase from the intracellular parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Infect. Immun.* 69, 3658–3662. <https://doi.org/10.1128/IAI69.6.3658-3662.2001>.
- Guiliano, D.B., Oksov, Y., Lustigman, S., Gounaris, K., Selkirk, M.E., 2009. Characterisation of novel protein families secreted by muscle stage larvae of *Trichinella spiralis*. *Int. J. Parasitol.* 39, 515–524. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.09.012>.
- Halevy, O., Piestun, Y., Allouh, M.Z., Rosser, B.W.C., Rinkevich, Y., Reshef, R., Rozenboim, I., Wleklinski-Lee, M., Yablonska-Reuveni, Z., 2004. Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. *Dev. Dyn.* 231, 489–502. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20151>.
- Hara, T., 2011. Thymosins and muscle regeneration. *Vitam. Horm.* 87, 277–290. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386015-6.00032-9>.
- Huang, D.W., Lempicki, R.A., Sherman, B.T., 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4, 44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>.
- Husson, C., Cantrelle, F.-X., Roblin, P., Didry, D., Le, K.H.D., Perez, J., Guittet, E., Van Heijenoort, C., Renault, L., Carlier, M.-F., 2010. Multifunctionality of the beta-thymosin/WH2 module: G-actin sequestration, actin filament growth, nucleation, and severing. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1194, 44–52. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05473.x>.
- Jasmer, D.E., 1993. *Trichinella spiralis* infected skeletal muscle cells arrest in G2/M and cease muscle gene expression. *J. Cell Biol.* 121, 785–793.
- Jasmer, D.P., Kwak, D., 2006. Fusion and differentiation of murine C2C12 skeletal muscle cells that express *Trichinella spiralis* p43 protein. *Exp. Parasitol.* 112, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.09.013>.
- Jensen, L.J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., Doerks, T., Julien, P., Roth, A., Simonovic, M., Bork, P., von Mering, C., 2009. STRING 8 – A global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res.* 37, 412–416. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn760>.
- Ko, R.C., Fan, L., Lee, D.L., Compton, H., 1994. Changes in host muscles induced by excretory/secretory products of larval *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis*. *Parasitology* 108 (Pt 2), 195–205. <https://doi.org/10.1017/S0031182000068293>.
- Kudryashova, E., Kudryashov, D., Kramerova, I., Spencer, M.J., 2005. Trim32 is a ubiquitin ligase mutated in limb girdle muscular dystrophy type 2H that binds to skeletal muscle myosin and ubiquitinates actin. *J. Mol. Biol.* 354, 413–424. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.09.068>.
- Lazzari, E., Meroni, G., 2016. TRIM32 ubiquitin E3 ligase, one enzyme for several pathologies: from muscular dystrophy to tumours. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 79, 469–477. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.07.023>.
- Lee, D.L., Ko, R.C., Yi, X.Y., Yeung, M.H., 1991. *Trichinella spiralis*: antigenic epitopes from the stichocytes detected in the hypertrophic nuclei and cytoplasm of the parasitized muscle fibre (nurse cell) of the host. *Parasitology* 102 (Pt 1), 117–123. <https://doi.org/10.1017/S003118200006042X>.
- Leung, R.K.M., Ko, E., Leung, R.K., Ko, R.C., 1997. In vitro effects of *Trichinella spiralis* on muscle cells. *J. Helminthol.* 71, 113–118.
- Li, H., Malhotra, S., Kumar, A., 2008. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. *J. Mol. Med.* 86, 1113–1126. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0373-8>.
- Liu, N., Nelson, B.R., Bezprozvannaya, S., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., 2014. Requirement of MEF2A, C, and D for skeletal muscle regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 4109–4114. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401732111>.
- K.J. Livak T.D. Schmittgen Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $[\Delta\Delta Ct]$  method *Methods* 25 2001 402 408 10.1006
- Londhe, P., Davie, J.K., 2011. Sequential association of myogenic regulatory factors and E proteins at muscle-specific genes. *Skelet. Muscle* 1, 14. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-14>.
- Lun, H.M., Mak, C.H., Ko, R.C., 2003. Characterization and cloning of metalloproteinase in the excretory/secretory products of the infective-stage larva of *Trichinella spiralis*. *Parasitol. Res.* 90, 27–37. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0815-0>.
- Mak, C., Ko, R.C., 1999. Characterization of endonuclease activity from excretory/secretory products of a parasitic nematode, *Trichinella spiralis*. *Eur. J. Biochem.* 260, 477–481. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00174.x>.
- Matsuo, A., Wu, Z., Nagano, I., Takahashi, Y., 2000. Five types of nuclei present in the capsule of *Trichinella spiralis*. *Parasitology* 121 (Pt 2), 203–210. <https://doi.org/10.1017/S0031182099006198>.
- Mckinnell, I.W., Ishibashi, J., Grand, F. Le, Punch, V.J.G., Gregory, C., Greenblatt, J.F., Dilworth, F.J., Rudnicki, M.A., 2008. Pax7 activates myogenic genes by recruitment of a histone methyltransferase complex. *Nat. Cell Biol.* 10, 77–84. <https://doi.org/10.1038/ncb1671.Pax7>.
- Meadows, E., Cho, J.H., Flynn, J.M., Klein, W.H., 2008. Myogenin regulates a distinct genetic program in adult muscle stem cells. *Dev. Biol.* 322, 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.07.024>.
- Molkenstin, J.D., Black, B.L., Martin, J.F., Olson, E.N., 1995. Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* 83, 1125–1136. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90139-6).
- Nowak, S., Nahirney, P.C., Hadjantonakis, A.-K., Bayliss, M.K., 2009. Nap1-mediated actin remodeling is essential for mammalian myoblast fusion. *J. Cell Sci.* 122, 3282–3293. <https://doi.org/10.1242/jcs.047597>.
- Ock, M.S., Cha, H.J., Choi, Y.H., 2013. Verifiable hypotheses for thymosin  $\beta$ 4-dependent and -independent angiogenic induction of *Trichinella spiralis*-triggered nurse cell formation. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 23492–23498. <https://doi.org/10.3390/ijms141223492>.
- OGATA, H., GOTO, S., SATO, K., FUJIBUCHI, W., BONO, H., KANEHISA, M., 1999. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/27.1.29>.
- Olguin, H.C., Pisconti, A., 2012. Marking the tempo for myogenesis: Pax7 and the regulation of muscle stem cell fate decisions. *J. Cell. Mol. Med.* 16, 1013–1025. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01348.x>.
- Ono, Y., Urata, Y., Goto, S., Nakagawa, S., Humbert, P.O., Li, T.S., Zammit, P.S., 2015. Muscle stem cell fate is controlled by the cell-polarity protein Scrib. *Cell Rep.* 10, 1135–1148. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.045>.
- Otto, A., Schmidt, C., Luke, G., Allen, S., Valasek, P., Muntioni, F., Lawrence-Watt, D., Patel, K., 2008. Canonical Wnt signalling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneration. *J. Cell Sci.* 121, 2939–2950. <https://doi.org/10.1242/jcs.026534>.
- Oustanina, S., Hause, G., Braun, T., 2004. Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *EMBO J.* 23, 3430–3439. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600346>.
- Park, M.K., Cho, M.K., Kang, S.A., Kim, B.Y., Yu, H.S., 2016. The induction of the collagen capsule synthesis by *Trichinella spiralis* is closely related to protease-activated receptor 2. *Vet. Parasitol.* 230, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.11.001>.
- Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., Mansouri, A., Cumano, A., Buckingham, M., 2006. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J. Cell Biol.* 172, 91–102. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508044>.
- Robinson, M.W., Connolly, B., 2005. Proteomic analysis of the excretory-secretory proteins of the *Trichinella spiralis* L1 larva, a nematode parasite of skeletal muscle. *Proteomics* 5, 4525–4532. <https://doi.org/10.1002/pmic.200402057>.

- Rochlin, K., Yu, S., Roy, S., Baylies, M.K., 2010. Myoblast fusion: When it takes more to make one. *Biol. Dev.* <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.024>.
- Sander, V., Sufie, G., Jopling, C., Morera, C., Izpisua Belmonte, J.C., 2013. Isolation and in vitro culture of primary cardiomyocytes from adult zebrafish hearts. *Nat. Protoc.* 8, 800–809. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.041>.
- Sanders, M.C., Goldstein, A.L., Wang, Y.L., 1992. Thymosin  $\beta$ 4 (Fx peptide) is a potent regulator of actin polymerization in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 4678–4682. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4678>.
- Schwander, M., Leu, M., Stumm, M., Dorchies, O.M., Ruegg, U.T., Schittny, J., Müller, U., 2003. Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev. Cell* 4, 673–685. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00118-7](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00118-7).
- Soleimani, V.D., Punch, V.G., Kawabe, Y., Jones, A.E., Palidwor, G.A., Porter, C.J., Cross, J.W., Carvajal, J.J., Kockok, C.E.M., van Ijcken, W.F.J., Perkins, T.J., Rigby, P.W.J., Grosveld, F., Rudnicki, M.A., 2012. Transcriptional dominance of Pax7 in adult myogenesis is due to high-affinity recognition of homeodomain motifs. *Dev. Cell* 22, 1208–1220. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.03.014>.
- Tajbakhsh, S., Rocancourt, D., Cossu, G., Buckingham, M., 1997. Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell* 89, 127–138. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80189-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80189-0).
- Tando, T., Hirayama, A., Furukawa, M., Sato, Y., Kobayashi, T., Funayama, A., Kanaji, A., Hao, W., Watanabe, R., Morita, M., Oike, T., Miyamoto, K., Soga, T., Nomura, M., Yoshimura, A., Tomita, M., Matsumoto, M., Nakamura, M., Toyama, Y., Miyamoto, T., 2016. Smad2/3 proteins are required for immobilization-induced skeletal muscle atrophy. *J. Biol. Chem.* 291, 12184–12194. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.680579>.
- Teppema, J.S., Robinson, J.E., Ruitenberg, E.J., 1973. Ultrastructural aspects of capsule formation in *Trichinella spiralis* infection in the rat. *Parasitology* 66, 291–296.
- P. Tremblay P. Gruss Pax: Genes for mice and men *Pharmacol. Ther.* 61 1994 205 226 10.1016/0163-7258(94)90063-9
- Vassilatis, D.K., Despommier, D., Misk, D.E., Polvere, R.I., Gold, A.M., Van der Ploeg, L.H.T., 1992. Analysis of a 43-kDa glycoprotein from the intracellular parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *J. Biol. Chem.* 267, 18459–18465.
- Wang, L., Wang, Z.Q., Hu, D.D., Cui, J., 2013. Proteomic analysis of *Trichinella spiralis* muscle larval excretory–secretory proteins recognized by early infection sera. *Biomed Res. Int.* 2013, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/139745>.
- White, R.R., Ponsford, A.H., Weekes, M.P., Rodrigues, R.B., Ascher, D.B., Mol, M., Selkirk, M.E., Gygi, S.P., Sanderson, C.M., Artavanis-Tsakonas, K., 2016. Ubiquitin-dependent modification of skeletal muscle by the parasitic nematode, *Trichinella spiralis*. *PLoS Pathog.* 12, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005977>.
- Wisniewski, N., McNeil, M., Grieve, R.B., Wassom, D.L., 1993. Characterization of novel fucosyl- and tyvelosyl-containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61, 25–35. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90155-Q](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90155-Q).
- Wranicz, M.J., Gustowska, L., Gabryel, P., Kucharska, E., Cabaj, W., 1998. *Trichinella spiralis*: induction of the basophilic transformation of muscle cells by synchronous newborn larvae. *Parasitol. Res.* 84, 403–407. <https://doi.org/10.1007/s004360050418>.
- Wranicz, M.J., Koyro, H.W., Stelzer, R., Stoye, M., 1996. *Trichinella spiralis*: X-ray analysis of the nurse cell–muscle larva complex after exponential growth of the larva. *Parasitol. Res.* 82, 731–736. <https://doi.org/10.1007/s004360050193>.
- Wu, Z., Matsuo, A., Nakada, T., Nagano, I., Takahashi, Y., 2001. Different response of satellite cells in the kinetics of myogenic regulatory factors and ultrastructural pathology after *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infection. *Parasitology* 123, 85–94. <https://doi.org/10.1017/S0031182001007958>.
- Wu, Z., Nagano, I., Boonmars, T., Takahashi, Y., 2005. A spectrum of functional genes mobilized after *Trichinella spiralis* infection in skeletal muscle. *Parasitology* 130, 561–573. <https://doi.org/10.1017/S0031182004006912>.
- Wu, Z., Nagano, I., Takahashi, Y., 2008a. Candidate genes responsible for common and different pathology of infected muscle tissues between *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infection. *Parasitol. Int.* 57, 368–378. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.03.005>.
- Wu, Z., Sofronic-Milosavljevic, L., Nagano, I., Takahashi, Y., 2008b. *Trichinella spiralis*: nurse cell formation with emphasis on analogy to muscle cell repair. *Parasit. Vectors* 1, 27. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-27>.



## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Andrechek, E. R., Hardy, W. R., Girgis-Gabardo, A. A., Perry, R. L. S., Butler, R., Graham, F. L., Khan R.C., Rudnicki M.A., Muller, W. J. (2002). ErbB2 Is Required for Muscle Spindle and Myoblast Cell Survival. *Mol Cell Biol.* 22(13):4714-22.
2. Appleton, J. A., & Usack, L. (1993). Identification of potential antigenic targets for rapid expulsion of *Trichinella spiralis*. *Mol Biochem Parasitol.*, 58(1), 53–62.
3. Arden, S. R., Smith, A. M., Booth, M. J., Tweedie, S., Gounaris, K., & Selkirk, M. E. (1997). Identification of serine/threonine protein kinases secreted by *Trichinella spiralis* infective larvae. *Mol Biochem Parasitol*, 90(1) 111–119.
4. Babal, P., Milcheva, R., & Petkova, S. (2011). Apoptosis as the adaptation mechanism in survival of *Trichinella spiralis* in the host. *Parasitol Res.*, 997–1002.
5. Bai, X., Wu X, Wang X, Liu X, Song Y, Gao F, Miao Y, Yu L, Tang B, Wang X, Radu B, Vallee I, Boireau P, Wang F, Zhao Y, Liu M. (2012). Inhibition of mammalian muscle differentiation by excretory secretory products of muscle larvae of *Trichinella spiralis* in vitro. *Parasitol Res.* 110(6):2481-90
6. Bandman E. (1992) Contractile protein isoforms in muscle development. *Dev Biol.* 54(2):273-83.
7. Baruch, A. M., & Despommier, D. D. (1991). Blood vessels in *Trichinella spiralis* infections: a study using vascular casts. *J Parasitol.*, 77(1), 99–103.
8. Berkes CA, Tapscott SJ. (2005) MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 16(4-5):585-95.
9. Boonmars, T., Wu, Z., Nagano, I., Takahashi, Y. (2005). What is the role of p53 during the cyst formation of *Trichinella spiralis*? A comparable study between knockout mice and wild type mice. *Parasitology*, 131(Pt 5), 705–712.
10. Boonmars, T., Wu, Z., Nagano, I., Nakada, T., Takahashi, Y. (2004). Differences and similarities of nurse cells in cysts of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis*. *J Helminthol.* 78(1), 7–16.
11. Chargé SB, Rudnicki MA. (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 84(1):209-38.
12. Chen, K., Dasgupta, A., Ding, J., Indig, F. E., Ghosh, P., Longo, D. L. (2017). Role of mitofusin 2 (Mfn2) in controlling cellular proliferation. *FASEB J*, 28(1), 382–394.

13. Das, M., Wilson, K., Molnar, P., Hickman, J. J. (2007). Differentiation of skeletal muscle and integration of myotubes with silicon microstructures using serum-free medium and a synthetic silane substrate. *Nat Protoc.* 2(7), 1795–1801.
14. Dedieu, S., Mazères, G., Cottin, P., Brustis, J. (2002). Involvement of myogenic regulator factors during fusion in cell line C2C12. *Int J Dev Biol.* 46(2):235-41.
15. Despommier, D. (1975). Adaptive Changes in Muscle Fibers Infected with *Trichinella spiralis*. *Am J Pathol.* 78(3), 477–496.
16. Despommier, D. D. (1993). *Trichinella spiralis* and the concept of niche. *J Parasitol.* 79(4), 472–482.
17. Despommier, D. D. (1998). How Does *Trichinella spiralis* Make Itself at Home? *Parasitol Today.* 4(8):318-23.
18. Despommier, D. D., Gold, I. A. M., Buck, S. W., Capo, V., Silberstein, D. (1990). *Trichinella spiralis*: Secreted Antigen of the Infective L1, Larva Localizes to the Cytoplasm and Nucleoplasm of Infected Host Cells. *Exp Parasitol.* 71(1):27-38.
19. Despommier, D., Aron, L., Turgeon, L. (1975). *Trichinella spiralis*: growth of the intracellular (muscle) larva. *Exp Parasitol.* 37(1), 108–116.
20. Gamble, H. R., Rapic, D., Marinculic, A., Murrell, K. D. (1988). Evaluation of excretory-secretory antigens for the serodiagnosis of swine trichinellosis. *Vet Parasitol.* 30(2), 131–137.
21. Gardner, S., Anguiano, M., Rotwein, P. (2012). Defining Akt actions in muscle differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 15;303(12):C1292-300
22. Gayraud-Morel, B., Chrétien, F., Flamant, P., Gomès, D. (2007). A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis. *Dev Biol.* 312(1):13-28.
23. Gómez, et al. (2006) The genArise package (API) Versión 1.7.3 Microarray analysis tool. <http://www.ifc.unam.mx/genarise/>
24. Gounaris, K., Thomas, S., Najarro, P., Selkirk, M. E. (2001). Secreted variant of nucleoside diphosphate kinase from the intracellular parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Infect Immun.* 69(6), 3658–3662.
25. Grant DS, Rose W, Yaen C, Goldstein A, Martinez J, Kleinman H. (1999) Thymosin beta4 enhances endothelial cell differentiation and angiogenesis. *Angiogenesis.* 3(2):125-35.

26. Guiliano, D. B., Oksov, Y., Lustigman, S., Gounaris, K., Selkirk, M. E. (2009). Characterisation of novel protein families secreted by muscle stage larvae of *Trichinella spiralis*. *Int J Parasitol*- 39(5), 515–524.
27. Halevy, O., Piestun, Y., Allouh, M. Z., Rosser, B. W. C., Rinkevich, Y., Reshef, R. Yablonka-Reuveni, Z. (2004). Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. *Dev Dyn*. 231(3), 489–502.
28. Hildyard JC, Wells DJ. (2014). Identification and validation of quantitative PCR reference genes suitable for normalizing expression in normal and dystrophic cell culture models of myogenesis. *PLoS Curr*. 6;6.
29. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009a) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc*.4(1):44-57.
30. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009b). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*. 37(1):1-13.
31. Hulin JA, Nguyen TD, Cui S, Marri S, Yu RT, Downes M, Evans RM, Makarenkova H, Meech R. (2016). Barx2 and Pax7 Regulate Axin2 Expression in Myoblasts by Interaction with  $\beta$ -Catenin and Chromatin Remodelling. *Stem Cells*. 4(8):2169-82.
32. Jasmer, D. E. (1993). *Trichinella spiralis* infected skeletal muscle cells arrest in G2/M and cease muscle gene expression. *J Cell Biol*. 121(4), 785–793.
33. Jasmer, D. P., & Kwak, D. (2006). Fusion and differentiation of murine C2C12 skeletal muscle cells that express *Trichinella spiralis* p43 protein. *Exp Parasitol*. 112, 67–75.
34. Kang YJ, Jo JO, Cho MK, Yu HS, Ock MS, Cha HJ. (2012). *Trichinella spiralis* infection induces angiogenic factor thymosin  $\beta$ 4 expression. *Vet Parasitol*. 7;181(2-4):222-8
35. Khurana A, Dey CS. (2003) p38 MAPK interacts with actin and modulates filament assembly during skeletal muscle differentiation. *Differentiation*. 1(1):42-50.
36. Ko, R. C., Fan, L., Lee, D. L., Compton, H. (1994). Changes in host muscles induced by excretory/secretory products of larval *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis*. *Parasitology*, 108 (Pt 2), 195–205.

37. Koch S, Capaldo CT, Hilgarth RS, Fournier B, Parkos CA, Nusrat A. (2013) Protein kinase CK2 is a critical regulator of epithelial homeostasis in chronic intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* (1):136-45.
38. Kudryashova, E., Kudryashov, D., Kramerova, I., Spencer, M. J. (2005). Trim32 is a ubiquitin ligase mutated in limb girdle muscular dystrophy type 2H that binds to skeletal muscle myosin and ubiquitinates actin. *J Mol Biol.* 354(2), 413–424.
39. Lazzari, E., & Meroni, G. (2016). TRIM32 ubiquitin E3 ligase, one enzyme for several pathologies: From muscular dystrophy to tumours. *Int J Biochem Cell Biol.* 79, 469–477.
40. Lee, D. L., Ko, R. C., Yi, X. Y., Yeung, M. H. (1991). *Trichinella spiralis*: antigenic epitopes from the stichocytes detected in the hypertrophic nuclei and cytoplasm of the parasitized muscle fibre (nurse cell) of the host. *Parasitology*, 102 Pt 1, 117–123.
41. Leung, R. K., Ko, R. C. (1997). In vitro effects of *Trichinella spiralis* on muscle cells. *J Helminthol.* 71(2), 113–118.
42. Li, H., Malhotra, S., & Kumar, A. (2008). Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. *J Mol Med.* 86(10), 1113–1126.
43. Liu, N., Nelson, B. R., Bezprozvannaya, S., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., Olson, E. N. (2014). Requirement of MEF2A, C, and D for skeletal muscle regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(11), 4109–4114.
44. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408
45. Londhe, P., & Davie, J. K. (2011). Sequential association of myogenic regulatory factors and E proteins at muscle-specific genes. *Skelet Muscle*, 1(1), 14.
46. Lun, H. M., Mak, C. H., & Ko, R. C. (2003). Characterization and cloning of metallo-proteinase in the excretory/secretory products of the infective-stage larva of *Trichinella spiralis*. *Parasitol Res.* 90(1), 27–37.
47. Lv S, Cheng G, Zhou Y, Xu G. (2013) Thymosin beta4 induces angiogenesis through Notch signaling in endothelial cells. *Mol Cell Biochem.* 81(1-2):283-90.
48. Mak, C., & Ko, R. C. (1999). Characterization of endonuclease activity from excretory / secretory products of a parasitic nematode, *Trichinella spiralis*. *Eur J Biochem.* 481, 477–481

49. Matsuo, A, Wu, Z., Nagano, I., Takahashi, Y. (2000). Five types of nuclei present in the capsule of *Trichinella spiralis*. *Parasitology*, 121 (Pt 2), 203–210.
50. Mckinnell, I. W., Ishibashi J, Le Grand F, Punch VG, Addicks GC, Greenblatt JF, Dilworth FJ, Rudnicki, M. A. (2008). Pax7 activates myogenic genes by recruitment of a histone methyltransferase complex. *Nat Cell Biol*, 10(1), 77–84.
51. Meadows, E., Cho, J. H., Flynn, J. M., Klein, W. H. (2008). Myogenin regulates a distinct genetic program in adult muscle stem cells. *Dev Biol*. 322(2), 406–414.
52. Molkenkin, J. D., Black, B. L., Martin, J. F., Olson, E. N. (1995). Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell*, 83(7), 1125–1136.
53. Ock, M. S., Cha, H., Choi, Y. H. (2013). Verifiable hypotheses for Thymosin  $\beta$  4 dependent and independent angiogenic induction of *Trichinella spiralis* triggered nurse cell formation. *Int J Mol Sci*. 23492–23498.
54. Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H and Kanehisa M (1999) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res*. 27(1): 29-34
55. Olguín, H. C., Pisconti, A. (2012). Marking the tempo for myogenesis: Pax7 and the regulation of muscle stem cell fate decisions. *J Cell Mol Med*. 16(5), 1013–1025.
56. Olson EN. (1992) Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage. *Dev Biol*. 54(2):261-72.
57. Ono, Y., Urata, Y., Goto, S., Nakagawa, S., Humbert, P. O., Li, T. S., Zammit, P. S. (2015). Muscle Stem Cell Fate Is Controlled by the Cell-Polarity Protein Scrib. *Cell Reports*. 10(7), 1135–1148.
58. Otto, A., Schmidt, C., Luke, G., Allen, S., Valasek, P., Muntoni, F., Lawrence-Watt D., Patel, K. (2008). Canonical Wnt signalling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneration. *J Cell Sci*. 121(17), 2939–2950.
59. Oustanina, S., Hause, G., Braun, T. (2004). Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *EMBO J*. 23(16), 3430–3439.
60. Perrin BJ, Ervasti JM. (2010) The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 67(10):630-4.

61. Posern, G., Sotiropoulos, A., Treisman, R. (2002). Mutant actins demonstrate a role for unpolymerized actin in control of transcription by serum response factor. *Mol Biol Cell*. 13(12), 4167–4178.
62. Rao J. (2002) Targeting actin remodeling profiles for the detection and management of urothelial cancers-a perspective for bladder cancer research. *Front Biosci*.1;7:e1-8.
63. Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., Mansouri A., Cumano A., Buckingham, M. (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol*. 172(1), 91–102.
64. Robinson, M. W., Connolly, B. (2005). Proteomic analysis of the excretory-secretory proteins of the *Trichinella spiralis* L1 larva, a nematode parasite of skeletal muscle. *Proteomics*, 4525–4532.
65. Rochlin, K., Yu, S., Roy, S., Baylies, M. K. (2010). Myoblast fusion: When it takes more to make one. *Dev Biol*. 1;341(1):66-83.
66. Sanders, M. C., Goldstein, A. L., Wang, Y. L. (1992). Thymosin beta 4 (Fx peptide) is a potent regulator of actin polymerization in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(10), 4678–4682.
67. Schwander, M., Leu, M., Stumm, M., Dorchies, O. M., Ruegg, U. T., Schittny, J., Müller, U. (2003). Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev Cell*. 4, 673–685.
68. Soleimani, V. D., Punch, V. G., Kawabe, Y. ichi, Jones, A. E., Palidwor, G. A., Porter, C. J., Cross J.W., Carvajal J.J., Kockx C.E., van IJcken W.F., Perkins T.J., Rigby P.W., Grosveld F., Rudnicki, M. A. (2012). Transcriptional dominance of Pax7 in adult myogenesis is due to high-affinity recognition of homeodomain motifs. *Dev Cell*. 22(6), 1208–1220.
69. Suzuki A, Pelikan RC, Iwata J. (2015) WNT/ $\beta$ -Catenin Signaling Regulates Multiple Steps of Myogenesis by Regulating Step-Specific Targets. *Mol Cell Biol*. 35(10):1763-76.
70. Tando, T., Hirayama, A., Furukawa, M., Sato, Y., Kobayashi, T., Funayama, A., Kanaji A., Hao W., Watanabe R., Morita M., Oike T., Miyamoto K., Soga T., Nomura M., Yoshimura A., Tomita M., Matsumoto M., Nakamura M., Toyama Y., Miyamoto, T. (2016). Smad2/3 proteins are required for immobilization-induced skeletal muscle atrophy. *J Biol Chem*, 291(23), 12184–12194.

71. Teppema, J. S., Robinson, J. E., Ruitenber, E. J. (1973). Ultrastructural aspects of capsule formation in *Trichinella spiralis* infection in the rat. *Parasitology*. 291–296.
72. The Gene Ontology Consortium (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* 25(1):25-9
73. Tremblay, P., Gruss, P. (1994). Pax: genes for mice and men. *Pharmacol Ther.* 61(1–2), 205–226.
74. Vassilatis, D. K., Despommier, D., Misek, D. E., Polvere, R. I., Gold, A. M., Van der Ploeg, L. H. T. (1992). Analysis of a 43-kDa glycoprotein from the intracellular parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *J Biol Chem.* 267(26), 18459–18465.
75. von Maltzahn J, Jones AE, Parks RJ, Rudnicki MA. (2013) Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 8;110(41):16474-9.
76. Wang, L., Wang, Z. Q., Hu, D. D., Cui, J. (2013). Proteomic analysis of *Trichinella spiralis* muscle larval excretory-secretory proteins recognized by early infection sera. *BioMed Res Int.* 2013:139745.
77. White, R. R., Ponsford, A. H., Weekes, M. P., Rodrigues, R. B., Ascher, D. B., Mol, M. Artavanis-tsakonas, K. (2016). Ubiquitin-dependent modification of skeletal muscle by the parasitic nematode, *Trichinella spiralis*. *PLoS Pathog.* 12(11):e1005977.
78. Wisnewski, N., McNeil, M., Grieve, R. B., Wassom, D. L. (1993). Characterization of novel fucosyl- and tyvelosyl-containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. *Mol Biochem Parasitol.* 61(1), 25–35
79. Wranicz, M. J., Gustowska, L., Gabryel, P., Kucharska, E., Cabaj, W. (1998). *Trichinella spiralis*: Induction of the basophilic transformation of muscle cells by synchronous newborn larvae. *Parasitol Res.* 84(5), 403–407.
80. Wranicz, M. J., Koyro, H. W., Stelzer, R., Stoye, M. (1996). *Trichinella spiralis*: X-ray analysis of the nurse cell-muscle larva complex after exponential growth of the larva. *Parasitol Res.* 82(8), 731–736.
81. Wu, Z., Matsuo, A, Nakada, T., Nagano, I., Takahashi, Y. (2001). Different response of satellite cells in the kinetics of myogenic regulatory factors and ultrastructural pathology after *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infection. *Parasitology.* 123(Pt 1), 85–94.

82. Wu, Z., Nagano, I., Boonmars, T., Takahashi, Y. (2005). A spectrum of functional genes mobilized after *Trichinella spiralis* infection in skeletal muscle. *Parasitology*. 130:561–73.
83. Wu, Z., Sofronic-Milosavljevic, L., Nagano, I., Takahashi, Y. (2008). *Trichinella spiralis*: nurse cell formation with emphasis on analogy to muscle cell repair. *Parasit Vectors*. 1(1), 27.





CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Enero 9, 2018.

Arq. Hugo Flores Félix  
Subdirector de Posgrado  
Presente.

Por medio del presente nos permitimos hacer de su conocimiento que la tesis de doctorado de la **M. en C. Lizbeth Hernández Ancheyta** intitulada: "**Alteraciones en la expresión génica relacionadas con miogénesis inducidas *in vitro* por productos de excreción-secreción de *Trichinella spiralis***", ha sido aprobada por su Comité Tutorial por lo que corresponde a la versión final de la misma.

Sin otro particular de momento.

Atentamente,

Dr. Javier Hernández Sánchez  
Director de Tesis

Dra. Rosa María Bermúdez Cruz  
Asesor de Tesis

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe  
Asesor de Tesis

Dra. Patricia Talamás Rohana  
Asesor de Tesis

Dra. María del Rosario Salinas Tobón  
Asesor de Tesis

Dr. Everardo Curiel Quezada  
Asesor de Tesis

Vo. Bo.

Dr. Javier Hernández Sánchez  
Coordinador Académico  
Depto. de Genética y Biología Molecular