



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Genética y Biotecnología**

**Caracterización de microRNAs de *Echinococcus granulosus* en muestras de pacientes con diagnóstico de hidatidosis hepática con y sin tratamiento farmacológico y quirúrgico (Huancayo, 2022)**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista  
Biotecnóloga

**AUTOR**

Nicole Sonya MORANTE CALDERON

**ASESORES**

Mg. Alberto Ernesto LOPEZ SOTOMAYOR

Dra. María Lisseth EGUILUZ MOYA

Lima, Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Morante, N. (2024). *Caracterización de microRNAs de Echinococcus granulosus en muestras de pacientes con diagnóstico de hidatidosis hepática con y sin tratamiento farmacológico y quirúrgico (Huancayo, 2022)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---

## Metadatos complementarios

<b>Datos de autor</b>	
Nombres y apellidos	Nicole Sonya Morante Calderon
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	73689760
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0001-6661-4097">https://orcid.org/0000-0001-6661-4097</a>
<b>Datos de asesor</b>	
Nombres y apellidos	Alberto Ernesto Lopez Sotomayor
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10472260
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0001-6070-5836">https://orcid.org/0000-0001-6070-5836</a>
<b>Datos de coasesor</b>	
Nombres y apellidos	Maria Lisseth Eguiluz Moya
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	43173085
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0002-5370-6176">https://orcid.org/0000-0002-5370-6176</a>
<b>Datos del jurado</b>	
<b>Presidente del jurado</b>	
Nombres y apellidos	Olga Hilda Bracamonte Guevara
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06133853
<b>Miembro del jurado 1</b>	
Nombres y apellidos	Betty Elena Shiga Oshige

Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25739354
<b>Miembro del jurado 2</b>	
Nombres y apellidos	Claudia Fiorella Barletta Carrillo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40846770
<b>Datos de investigación</b>	
Línea de investigación	A.1.3.1. Salud Pública
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	Perú. Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT). Concurso de Proyectos de Investigación Básica. Convenio N° 063-2021-FONDECYT.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina Humana, Universidad Nacional del Centro del Perú País: Perú Departamento: Junín Provincia: Huancayo Distrito: El Tambo Calle: Mariscal Castilla N° 3909 Latitud: -11.8346396 Longitud: -75.3951575
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Febrero 2022 – Agosto 2023
URL de disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología Molecular <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03</a>



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
(Universidad del Perú, Decana de América)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGA  
GENETISTA BIOTECNÓLOGA**

**(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN PRESENCIAL DE TESIS)**

Siendo a las 8:47 horas del 21 de marzo del 2024, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** de **NICOLE SONYA MORANTE CALDERON**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20230098041, la titulando expuso su tesis: **CARACTERIZACIÓN DE MICRORNAs DE *Echinococcus granulosus* EN MUESTRAS DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE HIDATIDOSIS HEPÁTICA CON Y SIN TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO Y QUIRÚRGICO (HUANCAYO, 2022)**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 20... calificado: aprobado con máximos honores.....

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional Bióloga Genetista Biotecnóloga** de **NICOLE SONYA MORANTE CALDERON** y se eleva lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título conforme a ley.

Siendo las 10:04... horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 21 de marzo de 2024.

Mg. OLGA HILDA BRACAMONTE GUEVARA  
(PRESIDENTA)

Mg. ALBERTO ERNESTO LOPEZ SOTOMAYOR  
(ASESOR)

Mg. CLAUDIA FIORELLA BARLETTA CARRILLO  
(MIEMBRO)

Blga. BETTY ELENA SHIGA OSHIGE  
(MIEMBRO)



## **CERTIFICADO DE SIMILITUD**

Yo Alberto Ernesto López Sotomayor en mi condición de docente Operador del Programa Informático de Similitudes de la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas y Asesor de la tesis cuyo título es

“Caracterización de microRNAs de *Echinococcus granulosus* en muestras de pacientes con diagnóstico de hidatidosis hepática con y sin tratamiento farmacológico y quirúrgico (Huancayo, 2022)”, presentado por el egresado Nicole Sonya Morante Calderón para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo.

CERTIFICO: que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de **8%** de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional**.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.

Firma del profesor responsable (Turnitin)

Firma del Asesor (a):

DNI: 10472260

Nombres y apellidos: Alberto López Sotomayor



Firma del director (a) EPGyB:

DNI:

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, Ivonne y Marco,  
Por todo su amor incondicional,  
y a mi tía Evelia,  
por creer en mí.  
Los llevo siempre en el corazón.*



## AGRADECIMIENTOS

A mis padres Ivonne y Marco, quienes me brindaron su amor y apoyo incondicional desde siempre. Gracias por toda su dedicación, motivación y por ser mi gran soporte ¡Esta meta cumplida la comparto con ustedes!

A mi tía Evelia, quien me apoyó y apostó por mí al brindarme la educación que hoy poseo. Gracias por creer en mí y por ser el gran referente que marcó mi vida ¡Esto no lo hubiera logrado sin ti!

A mi abuelito Félix, mi primo Alonso, mi sobrino André y mi hermana Marieta, quienes compartieron conmigo grandes momentos de mi vida y fueron parte de mi crecimiento personal ¡Los quiero mucho y gracias por tanto!

A mi asesora María Eguiluz, quien me brindó la oportunidad de desarrollar esta tesis y participar en proyectos de investigación del laboratorio. Asimismo, por su guía durante todo este proceso y su gran apoyo en el ámbito académico y profesional ¡Muchas gracias!

A mi asesor Alberto López, por su compromiso y gran disposición para el desarrollo de esta tesis, y por haberme brindado su valioso tiempo, motivación y guía a lo largo de este proceso ¡Gracias por todo!

Al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional del Centro del Perú, por permitirme usar sus instalaciones para el desarrollo de esta tesis ¡Gracias!

A Mario, quien me brindó su gran apoyo en el desarrollo de la tesis. Gracias por tus enseñanzas, sugerencias y tu grata compañía durante este proceso ¡Te lo agradezco mucho!

A la Dra. Joshi, quien me brindó su guía en los proyectos de investigación del laboratorio y compartió conmigo bonitos momentos visitando la ciudad de Huancayo ¡Gracias!

Al Ing. Gilberto Torres del Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la Universidad Nacional del Centro del Perú, por su amabilidad y gran disposición al permitirme usar su equipo de espectrofotometría ¡Estoy muy agradecida!

A mis amistades de la Escuela de Genética y Biotecnología, quienes me acompañaron en la aventura de la carrera profesional y compartieron conmigo momentos muy bonitos y desafiantes, en especial, a Carolina, Nancy y Kevin ¡Se logró, chicos!

A Francesca y Jazmín de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, quienes siempre me brindaron su apoyo y buenos deseos en el proceso del desarrollo de la tesis ¡Gracias, chicas!

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), a través de su entidad ejecutora el Programa Nacional de Investigación Científica y Estudios Avanzados (PROCIENCIA), por financiar esta investigación según convenio N° 063-2021 ¡Gracias!

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por ser mi segundo hogar y por haber tenido un papel fundamental en mi formación académica ¡Gracias por tanto!

## RESUMEN

La hidatidosis hepática es una enfermedad zoonótica desatendida endémica del centro sur del Perú, causada por el parásito *Echinococcus granulosus*, caracterizada por generar quistes hidatídicos principalmente en el hígado que dañan la funcionalidad del órgano. Las técnicas de secuenciamiento de alto rendimiento han permitido descubrir nuevos ARN no codificantes como los microRNAs (miRNAs), que participan activamente en la regulación de la expresión génica. La caracterización de la expresión de los miRNAs de *E. granulosus* podría ser gran utilidad para mejorar el monitoreo del tratamiento y la comprensión de la biología de la enfermedad. Sin embargo, la expresión de los miRNAs del parásito en pacientes con hidatidosis hepática ha sido poco estudiada. Esta investigación caracterizó la expresión de miRNAs de *E. granulosus* por *stem-loop* RT-qPCR en pacientes antes y después de haber recibido tratamiento farmacológico o quirúrgico. En esta investigación, 1 rRNA y 12 miRNAs fueron identificados como los biomarcadores más adecuados para la detección de *E. granulosus* en líquido hidatídico de quiste hidatídico de nivel CE2. Los miRNAs egr-mir-1 y egr-mir-219 fueron identificados como los biomarcadores más adecuados para la detección de *E. granulosus* en plasma sanguíneo de pacientes con hidatidosis hepática. El tratamiento farmacológico de 400 mg de albendazol dos veces al día durante 1 mes no generó un cambio en la expresión de los miRNAs egr-mir-1 y egr-mir-219 en el plasma sanguíneo de los pacientes evaluados. Asimismo, la expresión de estos miRNAs no varió después de 24 horas de la cirugía de extracción de quiste hidatídico. Este estudio caracterizó por primera vez en el Perú la expresión de miRNAs de *E. granulosus* en pacientes con hidatidosis hepática antes y después de recibir tratamiento. Además, es la primera vez que se describen los patrones de expresión de miRNAs de *E. granulosus* en muestras de líquido hidatídico de pacientes con hidatidosis hepática.

**Palabras clave:** Hidatidosis hepática, *Echinococcus granulosus*, miRNAs, expresión génica, tratamiento, *stem-loop* RT-qPCR.

## ABSTRACT

Human Cystic Echinococcosis (HCE) in the liver is a neglected zoonotic disease endemic to south-central Peru, caused by the parasite *Echinococcus granulosus*, which is characterized by generating hydatid cysts mainly in the liver that damage the functionality of the organ. High-throughput sequencing techniques have allowed the discovery of new non-coding RNAs such as microRNAs (miRNAs), which actively participate in the regulation of gene expression. Characterizing the expression of *E. granulosus* miRNAs could be very useful to improve treatment monitoring and understanding of the biology of the disease. However, the expression of parasite miRNAs in patients with HCE has been little studied. This research characterized the expression of *E. granulosus* miRNAs by stem-loop RT-qPCR in patients before and after receiving pharmacological or surgical treatment. In this research thesis, 1 rRNA and 12 miRNAs were identified as the most suitable biomarkers for the detection of *E. granulosus* in hydatid fluid of hydatid cyst at CE2 level. The miRNAs egr-mir-1 and egr-mir-219 were identified as the most suitable biomarkers for the detection of *E. granulosus* in blood plasma of patients with HCE. The pharmacological treatment of 400 mg of albendazole twice a day for 1 month did not generate a change in the expression of miRNAs egr-mir-1 and egr-mir-219 in the blood plasma of the patients evaluated. Likewise, the expression of these miRNAs did not change after 24 hours after hydatid cyst extraction surgery. This study characterized for the first time in Peru the expression of *E. granulosus* miRNAs in patients with HCE before and after receiving treatment. Furthermore, it is the first time that the expression patterns of *E. granulosus* miRNAs have been described in hydatid fluid samples from patients with HCE.

**Keywords:** Human Cystic Echinococcosis, *Echinococcus granulosus*, miRNAs, gene expression, treatment, stem-loop RT-qPCR.

# ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Introducción.....	1
I.2. Planteamiento del problema.....	3
I.3. Objetivos.....	5
I.4. Importancia y alcance de la investigación.....	5
I.5. Limitaciones de la investigación.....	7
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	8
II.1. Marco Teórico .....	8
II.1.1. <i>Echinococcus granulosus</i> .....	8
II.1.1.1 Ciclo de vida .....	8
II.1.2. Hidatidosis hepática.....	9
II.1.2.1 Quiste hidatídico hepático.....	10
II.1.2.2 Etapa del quiste hidatídico.....	10
II.1.3. Diagnóstico de la hidatidosis hepática .....	11
II.1.3.1 Diagnóstico de hidatidosis hepática por métodos imagenológicos .....	11
II.1.3.2 Diagnóstico de hidatidosis hepática por métodos serológicos.....	11
II.1.4. Tratamientos para la hidatidosis hepática .....	12
II.1.4.1 Tratamiento farmacológico para la hidatidosis hepática.....	12
II.1.4.2 Tratamiento quirúrgico para la hidatidosis hepática.....	12
II.1.5. Limitaciones de los tratamientos para la hidatidosis hepática .....	13
II.1.6. Seguimiento del tratamiento para la hidatidosis hepática .....	13
II.1.6.1 Limitaciones del seguimiento por ecografía abdominal.....	14
II.1.6.2 Limitaciones del seguimiento por ELISA .....	14
II.1.7. microRNAs (miRNAs).....	14
II.1.7.1 Mecanismo de acción de los miRNAs en animales .....	15
II.1.7.2 Función reguladora de los miRNAs en animales .....	16
II.1.7.3 Base de datos de secuencias de miRNAs: miRBase .....	17
II.2. Antecedentes del estudio.....	17
II.2.1. miRNAs de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	17
II.2.2. miRNAs de <i>Echinococcus granulosus</i> en pacientes con hidatidosis hepática .....	17
II.2.3. miRNAs de <i>Echinococcus granulosus</i> en pacientes con hidatidosis hepática tratados .....	18
II.3. Bases teóricas.....	18

II.3.1. PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR en tiempo real).....	18
II.3.2. Retrotranscripción con PCR en tiempo real cuantitativa (RT-qPCR).....	19
II.3.3. Retrotranscripción tallo-bucle con PCR en tiempo real cuantitativa ( <i>Stem-loop</i> RT-qPCR).....	20
II.3.3.1 Retrotranscripción tallo-bucle.....	20
II.3.3.2 PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR en tiempo real).....	21
II.4. Definición de términos.....	22
III. HIPÓTESIS Y VARIABLES .....	27
III.1. Hipótesis .....	27
III.2. Variables.....	27
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
IV.1. Área de estudio.....	27
IV.2. Diseño de la investigación .....	29
IV.3. Población y muestra .....	29
IV.3.1. Muestras de líquido hidatídico .....	30
IV.3.2. Muestras de plasma sanguíneo.....	30
IV.4. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información .....	32
IV.4.1. Equipos .....	32
IV.4.2. Materiales.....	32
IV.4.3. Reactivos.....	33
IV.4.4. Metodología.....	34
IV.4.4.1 Detección de los rRNAs 5.8S y 12S de <i>Echinococcus granulosus</i> en muestras de líquido hidatídico mediante RT-qPCR .....	34
IV.4.4.1.1 Aislamiento de ARN a partir de líquido hidatídico de pacientes con hidatidosis hepática.....	34
IV.4.4.1.2 Cuantificación de ARN aislado a partir de líquido hidatídico.....	35
IV.4.4.1.3 Retrotranscripción con PCR en tiempo real cuantitativa ( <i>real time</i> RT-qPCR).....	35
IV.4.4.2 Detección de miRNAs de <i>Echinococcus granulosus</i> en muestras de líquido hidatídico .....	40
IV.4.4.2.1 miRNAs analizados .....	40
IV.4.4.2.2 Diseño de <i>primers</i> .....	41
IV.4.4.2.3 Retrotranscripción tallo-bucle con PCR en tiempo real cuantitativa ( <i>stem-loop</i> RT-qPCR).....	42
IV.4.4.3 Evaluación de miRNAs de <i>Echinococcus granulosus</i> en muestras de plasma sanguíneo de pacientes previo y posterior al tratamiento farmacológico y quirúrgico .....	46

IV.4.4.3.1 Aislamiento de ARN a partir de plasma sanguíneo de pacientes con hidatidosis hepática.....	46
IV.4.4.3.2 Cuantificación de ARN .....	47
IV.4.4.3.3 Retrotranscripción tallo-bucle con PCR en tiempo real cuantitativa ( <i>stem-loop</i> RT-qPCR).....	47
IV.4.4.3.4 Análisis estadístico.....	49
V. RESULTADOS .....	50
V.1. Detección de los rRNAs 5.8S y 12S de <i>Echinococcus granulosus</i> en muestras de líquido hidatídico mediante RT-qPCR .....	50
V.1.1. Aislamiento de ARN a partir de líquido hidatídico de pacientes con hidatidosis hepática .....	50
V.1.2. Retrotranscripción con PCR en tiempo real cuantitativa ( <i>real time</i> RT-qPCR) .....	50
V.2. Detección de miRNAs de <i>Echinococcus granulosus</i> en muestras de líquido hidatídico .....	52
V.2.1. Retrotranscripción tallo-bucle con PCR en tiempo real cuantitativa ( <i>stem-loop</i> RT-qPCR).....	53
V.3. Evaluación de miRNAs de <i>Echinococcus granulosus</i> en muestras de plasma de sanguíneo de pacientes previo y posterior al tratamiento farmacológico y quirúrgico .....	69
V.3.1. Aislamiento de ARN a partir de plasma sanguíneo de pacientes con hidatidosis hepática.....	69
V.3.2. Detección de miRNAs de <i>Echinococcus granulosus</i> en plasma sanguíneo de pacientes con hidatidosis hepática por <i>stem-loop</i> RT-qPCR.....	70
V.3.3. Expresión de los miRNAs <i>egr-mir-1</i> y <i>egr-mir-219</i> previo y posterior al tratamiento farmacológico y quirúrgico.....	73
VI. DISCUSIÓN.....	74
VII. CONCLUSIONES .....	79
VIII. RECOMENDACIONES.....	80
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	81
X. ANEXOS.....	88

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Echinococcus granulosus</i> (s.l.).....	9
Figura 2. Composición del quiste hidatídico hepático.....	10
Figura 3. Silenciamiento de la expresión génica postranscripcional de los miRNAs .....	16
Figura 4. Etapas de la metodología <i>stem-loop</i> RT-qPCR para la detección de miRNAs.....	22
Figura 5. Imagen satelital del área de estudio.....	28
Figura 6. Curvas de <i>Melting</i> para el marcador 5.8S ARNr de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	51
Figura 7. Curvas de <i>Melting</i> para el marcador 12S ARNr de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	52
Figura 8. Curvas de <i>Melting</i> para el miRNA egr-mir-9 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico. ....	53
Figura 9. Curvas de <i>Melting</i> para el miRNA egr-mir-4988 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico.....	54
Figura 10. Curvas de <i>Melting</i> para el miRNA egr-mir-133 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico.....	55
Figura 11. Curvas de <i>Melting</i> para el miRNA egr-mir-1992 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico.....	56
Figura 12. Curvas de <i>Melting</i> para el miRNA egr-mir-bantam de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico .....	57
Figura 13. Curvas de <i>Melting</i> para el miRNA egr-mir-219 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico .....	58
Figura 14. Curvas de <i>Melting</i> para el miRNA egr-mir-61 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico .....	59
Figura 15. Curvas de <i>Melting</i> para el miRNA egr-mir-10 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico .....	60
Figura 16. Curvas de <i>Melting</i> para el miRNA egr-let-7 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico .....	61
Figura 17. Curvas de <i>Melting</i> para el miRNA egr-mir-1 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico .....	62
Figura 18. Curvas de <i>Melting</i> para el miRNA egr-mir-71 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico .....	63
Figura 19. Curvas de <i>Melting</i> para el miRNA egr-mir-7 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico .....	64
Figura 20. Curvas de <i>Melting</i> para el miRNA egr-new-15 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico .....	65
Figura 21. Curvas de <i>Melting</i> para el miRNA egr-new-22 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico .....	66

<b>Figura 22. Curvas de <i>Melting</i> para el miRNA egr-new-17* de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico .....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 23. Curvas de <i>Melting</i> para el miRNA egr-new-74 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico .....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 24. Curvas de <i>Melting</i> para el miRNA egr-mir-1 de <i>Echinococcus granulosus</i> en plasma sanguíneo .....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 25. Curvas de <i>Melting</i> para el miRNA egr-mir-219 de <i>Echinococcus granulosus</i> en plasma sanguíneo.....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 26. Expresión de los miRNAs egr-mir-1 y egr-mir-219 en pacientes con hidatidosis hepática previo y posterior al tratamiento farmacológico y quirúrgico .....</b>	<b>73</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información clínica de los pacientes con hidatidosis hepática.....	30
Tabla 2. Información clínica de los pacientes con hidatidosis hepática que brindaron las muestras de plasma sanguíneo .....	31
Tabla 3. Primers utilizados para la detección de <i>Echinococcus granulosus</i> por RT-qPCR.....	35
Tabla 4. Mezcla de ARN y primer para la retrotranscripción del marcador ARNr 5.8S de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	36
Tabla 5. Mezcla maestra para la retrotranscripción del marcador ARNr 5.8S de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	36
Tabla 6. Mezcla de ARN y primer para la retrotranscripción del marcador ARNr 12S de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	37
Tabla 7. Mezcla maestra para la retrotranscripción del marcador ARNr 12S de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	37
Tabla 8. Ciclado térmico para la retrotranscripción de los ARNr 5.8S y 12S de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	38
Tabla 9. Componentes y volúmenes de la mezcla maestra de qPCR de los marcadores ARNr 5.8S y 12S de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	38
Tabla 10. Ciclado térmico para la PCR en tiempo real cuantitativa de los marcadores ARNr 5.8S y 12S de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	39
Tabla 11. miRNAs de <i>Echinococcus granulosus</i> analizados en esta investigación .	40
Tabla 12. Características de los <i>primers</i> de retrotranscripción y <i>primers forward</i> diseñados para la detección de los miRNAs egr-mir-1 y egr-mir-71. ....	41
Tabla 13. <i>Primers</i> utilizados para la detección de miRNAs de <i>E. granulosus</i> .....	42
Tabla 14. Mezcla de ARN y <i>primer</i> para la retrotranscripción de miRNAs de <i>Echinococcus granulosus</i> en muestras de líquido hidatídico .....	43
Tabla 15. Mezcla maestra para la retrotranscripción de miRNAs de <i>Echinococcus granulosus</i> . ....	44
Tabla 16. Ciclado térmico para la retrotranscripción de miRNAs de <i>Echinococcus granulosus</i> en muestras de líquido hidatídico. ....	44
Tabla 17. Componentes y volúmenes de la mezcla maestra de qPCR para detectar miRNAs de <i>Echinococcus granulosus</i> . ....	45
Tabla 18. Ciclado térmico para la detección de miRNAs de <i>Echinococcus granulosus</i> por qPCR. ....	45
Tabla 19. Mezcla de ARN y <i>primer</i> para la retrotranscripción de miRNAs de <i>Echinococcus granulosus</i> en muestras de plasma sanguíneo .....	48
Tabla 20. Características de las muestras de ARN aisladas a partir de muestras de líquido hidatídico .....	50
Tabla 21. Características de las curvas de amplificación para el marcador 5.8S ARNr de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	51

<b>Tabla 22. Características de las curvas de amplificación para el marcador 12S ARNr de <i>Echinococcus granulosus</i> .....</b>	<b>52</b>
<b>Tabla 23. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-9 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico.....</b>	<b>53</b>
<b>Tabla 24. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-4988 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico.....</b>	<b>54</b>
<b>Tabla 25. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-133 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico.....</b>	<b>55</b>
<b>Tabla 26. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-1992 de <i>Echinococcus granulosus</i> .....</b>	<b>56</b>
<b>Tabla 27. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-bantam de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico.....</b>	<b>57</b>
<b>Tabla 28. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-219 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico.....</b>	<b>58</b>
<b>Tabla 29. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-61 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico.....</b>	<b>59</b>
<b>Tabla 30. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-10 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico.....</b>	<b>60</b>
<b>Tabla 31. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-let-7 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico.....</b>	<b>61</b>
<b>Tabla 32. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-1 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico.....</b>	<b>62</b>
<b>Tabla 33. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-71 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico.....</b>	<b>63</b>
<b>Tabla 34. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-7 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico.....</b>	<b>64</b>
<b>Tabla 35. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-new-15 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico.....</b>	<b>65</b>
<b>Tabla 36. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-new-22 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico.....</b>	<b>66</b>
<b>Tabla 37. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-new-17* de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico.....</b>	<b>67</b>
<b>Tabla 38. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-new-74 de <i>Echinococcus granulosus</i> en líquido hidatídico.....</b>	<b>68</b>
<b>Tabla 39. Características de las muestras de ARN aisladas a partir de muestras de plasma sanguíneo .....</b>	<b>69</b>
<b>Tabla 40. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-1 de <i>Echinococcus granulosus</i> en plasma sanguíneo.....</b>	<b>71</b>
<b>Tabla 41. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-219 de <i>Echinococcus granulosus</i> en plasma sanguíneo.....</b>	<b>72</b>

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **I.1. Introducción**

La hidatidosis hepática es una enfermedad zoonótica causada por el parásito *Echinococcus granulosus*. Esta enfermedad genera el desarrollo de quistes hidatídicos principalmente en el hígado humano, repercutiendo en la funcionalidad del órgano (Eckert et al., 2001). A nivel mundial, esta enfermedad afecta principalmente a regiones que desarrollan la ganadería ovina y practican la convivencia con perros domésticos (Tercero & Olalla, 2008). La incidencia de la hidatidosis es de más de un millón de personas infectadas en el mundo, ocasionando más de 19 000 defunciones anuales. Por tal razón, esta enfermedad es considerada un grave problema de salud pública (World Health Organization, 2020). En el Perú, la hidatidosis hepática es una enfermedad endémica con alta incidencia en los andes centrales y sur del país. La incidencia de esta enfermedad fue de más de 5 000 casos en el año 2018, representando un incremento del 35% respecto al año anterior. En este contexto, Junín fue uno de los departamentos con la más alta prevalencia de la enfermedad (CDC Perú, 2021).

En el Perú, el tratamiento de la hidatidosis hepática se realiza a través de métodos farmacológicos (uso del albendazol) y quirúrgicos (extracción del o los quistes hidatídicos) (Montero & Breña, 2015; Stojković et al., 2018). Sin embargo, los tratamientos no tienen una completa efectividad para erradicar la enfermedad. Esto se ve reflejado en los casos de aparición de nuevos quistes (no necesariamente por reinfección) y casos de no respuesta al tratamiento, lo cual ocasiona largos periodos de recuperación, mayores gastos económicos y miles de defunciones anuales (Espinosa et al., 2014; Montalvo & Tiza, 2017; Montero & Breña, 2015; Pinto, 2004). Esta situación se ve agravada con las limitaciones de las técnicas de monitoreo del tratamiento, las cuales, en muchos casos, no reflejan la situación real de la evolución del paciente tratado (Frikha et al., 2018; Hosch et al., 2004; Vivanco et al., 2021). En este contexto, se torna importante evaluar nuevas herramientas que puedan servir para mejorar el monitoreo de la enfermedad.

Los análisis de secuenciación de alto rendimiento han permitido la identificación de microRNAs (miRNAs), los cuales son secuencias cortas de ARN no codificantes de hebra simple que regulan procesos moleculares y celulares complejos (Kabekkodu et al., 2018; Saliminejad et al., 2019; Y. Zhang et al., 2018). En los últimos

años, los métodos moleculares basados en el análisis de miRNAs han demostrado ser altamente sensibles y específicos en el monitoreo del tratamiento de enfermedades infecciosas y no infecciosas (Çakmak & Demir, 2020; Condrat et al., 2020; B. He et al., 2020; Loureiro et al., 2020). Por lo tanto, al representar agentes de cambio en la expresión génica de un patógeno, podrían funcionar como biomarcadores de monitoreo de enfermedades (Condrat et al., 2020).

Las investigaciones de miRNAs expresados por *E. granulosus* han permitido caracterizar su perfil de expresión en diferentes etapas del ciclo de vida del parásito (Cucher et al., 2011; Mortezaei et al., 2021). No obstante, la mayoría de estos trabajos se han centrado en analizar al parásito individualmente y no dentro de un hospedero humano. Las investigaciones que reportan miRNAs expresados por el parásito después del tratamiento farmacológico o quirúrgico son muy escasas y brindan información limitada (Alizadeh et al., 2020; Mortezaei et al., 2019; Xiao et al., 2022). En el Perú, no se han realizado estudios de miRNAs expresados por *E. granulosus* en pacientes con hidatidosis hepática que hayan recibido tratamiento. Por tanto, la expresión de estos miRNAs en pacientes peruanos con tratamiento para la hidatidosis continúa siendo desconocida.

El objetivo de esta investigación fue caracterizar miRNAs de *Echinococcus granulosus* en muestras de pacientes con diagnóstico de hidatidosis hepática previo y posterior al tratamiento farmacológico y quirúrgico (Huancayo, 2022), usando la técnica molecular *stem-loop* RT-qPCR y herramientas bioinformáticas. Para ello, se empleó un diseño cuantitativo cuasi experimental transversal descriptivo. Primero, se aisló ARN a partir de muestras de líquido hidatídico y plasma sanguíneo de pacientes con hidatidosis hepática antes y después de haber recibido tratamiento farmacológico o quirúrgico. Segundo, se identificaron miRNAs de *Echinococcus granulosus* diferencialmente expresados en las muestras de líquido hidatídico humano. Tercero, se evaluó la expresión de estos miRNAs en las muestras de plasma de pacientes con diagnóstico de hidatidosis hepática tratados farmacológica y quirúrgicamente. Los hallazgos de esta investigación proporcionarán información preliminar sobre la caracterización de la expresión de miRNAs de *Echinococcus granulosus* en pacientes tratados y no tratados en el Perú, lo cual contribuirá a mejorar la comprensión de la biología del parásito en la enfermedad y, en el futuro, a mejorar el monitoreo del tratamiento del paciente con hidatidosis hepática.

## **I.2. Planteamiento del problema**

La hidatidosis es una enfermedad zoonótica desatendida causada por el parásito cestodo *Echinococcus granulosus*. En humanos, esta enfermedad puede generar el desarrollo de quistes hidatídicos en diferentes órganos, de los cuales el hígado representa aproximadamente el 75% de los casos (hidatidosis hepática), causando sintomatologías y complicaciones severas que repercuten críticamente en la salud del paciente (Eckert et al., 2001). Esta enfermedad afecta a la mayoría de los países del mundo, principalmente, a aquellos que desarrollan la ganadería ovina y practican la convivencia con perros domésticos (Tercero & Olalla, 2008). La incidencia de la hidatidosis es de más de un millón de personas infectadas en el mundo, ocasionando más de 19 000 defunciones anuales. Debido a su impacto perjudicial en la salud humana y en la industria ganadera, esta enfermedad es considerada un grave problema de salud pública (World Health Organization, 2020). En el Perú, la hidatidosis hepática ha sido considerada como una enfermedad endémica frecuentemente hallada en poblaciones localizadas en los andes centrales y sur del país (Junín, Ayacucho, Cuzco, Huancavelica, Puno y Pasco). La incidencia de esta enfermedad fue de más 5 000 casos en el año 2018, representando un incremento del 35% respecto al año anterior (CDC Perú, 2021). En este contexto, Junín fue uno de los departamentos con la más alta prevalencia de la enfermedad (CDC Perú, 2021).

En el Perú, el diagnóstico de la hidatidosis hepática se realiza mediante métodos serológicos e imagenológicos, mientras que su tratamiento, a través de métodos farmacológicos (uso del albendazol) y quirúrgicos (extracción del o los quistes hidatídicos) (Montero & Breña, 2015; Stojković et al., 2018). No obstante, estos tratamientos no tienen una completa efectividad para erradicar la enfermedad, pues se han reportado casos de recidivas (aparición de nuevos quistes) o no respuesta al tratamiento (quistes sin ningún cambio) (Espinosa et al., 2014; Pinto, 2004). En este contexto, el monitoreo de los pacientes tratados se torna crucial para su recuperación final. Si bien se recomienda la vigilancia ecográfica o serológica, no existe un protocolo estandarizado universal para el seguimiento de los pacientes tratados (Organización Panamericana de la Salud, 2017). Esta situación se ve agravada con las limitaciones de las técnicas de monitoreo en términos de sensibilidad, especificidad, aplicabilidad (obesidad) y recursos (Frikha et al., 2018; Hosch et al., 2004; Vivanco et al., 2021).

Por otra parte, existen métodos moleculares de alta sensibilidad y especificidad utilizados para el monitoreo del tratamiento de enfermedades infecciosas y no infecciosas. Entre los más recientes, se tiene al análisis de un tipo de ácido ribonucleico (ARN) expresado por el agente causal de la enfermedad, los microRNAs (miRNAs) (Çakmak & Demir, 2020; Condrat et al., 2020; B. He et al., 2020; Loureiro et al., 2020). Estos son secuencias de ARN no codificantes cortas de 20 a 24 nucleótidos de hebra simple que modulan procesos moleculares y celulares (Kabekkodu et al., 2018; Saliminejad et al., 2019; Y. Zhang et al., 2018). Los miRNAs ejercen su función regulando negativamente la expresión génica a nivel postranscripcional mediante la complementariedad en sus bases nucleotídicas con sus ARNm diana (Saliminejad et al., 2019).

Considerando que la expresión de los miRNAs del parásito en el torrente sanguíneo de los pacientes podría variar después del tratamiento con albendazol o después de la extracción del o los quistes, los reportes de la expresión de miRNAs de *E. granulosus* en pacientes con tratamiento son casi nulos. De hecho, las investigaciones que reportan miRNAs expresados por el parásito después del tratamiento farmacológico se basan en ensayos *in vitro*, mientras que las investigaciones después del tratamiento quirúrgico son muy escasas y brindan información muy limitada (Alizadeh et al., 2020; Mortezaei et al., 2019; Xiao et al., 2022). En el Perú, no se han realizado estudios sobre la expresión de *E. granulosus* en pacientes con hidatidosis hepática que hayan recibido tratamiento farmacológico o quirúrgico. Por tanto, la expresión de estos miRNAs en pacientes tratados peruanos continúa siendo desconocida.

Bajo este contexto, se ha identificado el problema de investigación: hay una falta de conocimiento en el Perú y el mundo sobre la expresión de miRNAs de *E. granulosus* en pacientes tratados. En ese sentido, esta tesis busca contribuir a cubrir ese vacío mediante la caracterización de miRNAs de *E. granulosus* en muestras de plasma sanguíneo de pacientes con hidatidosis hepática antes y después del tratamiento farmacológico y quirúrgico, lo cual contribuirá a mejorar la comprensión de la biología del parásito en la enfermedad y, en el futuro, a mejorar el monitoreo del tratamiento del paciente con hidatidosis hepática.

### **I.3. Objetivos**

#### **Objetivo general**

Caracterizar miRNAs de *Echinococcus granulosus* en muestras de pacientes con diagnóstico de hidatidosis hepática con y sin tratamiento farmacológico y quirúrgico.

#### **Objetivos específicos**

1. Detectar los rRNAs 5.8S y 12S de *Echinococcus granulosus* en muestras de líquido hidatídico de pacientes con hidatidosis hepática, mediante RT-qPCR.
2. Detectar miRNAs de *Echinococcus granulosus* en muestras de líquido hidatídico de pacientes con hidatidosis hepática, mediante *stem-loop* RT-qPCR.
3. Evaluar la expresión de miRNAs de *Echinococcus granulosus* en pacientes con hidatidosis hepática previo y posterior al tratamiento farmacológico y quirúrgico, mediante *stem-loop* RT-qPCR.

### **I.4. Importancia y alcance de la investigación**

En el Perú, la hidatidosis representa un problema de salud pública con alta prevalencia en las regiones del centro y sur del país como Junín (CDC Perú, 2021). Esta enfermedad tiene una considerable mortalidad, en gran parte, por complicaciones en la función hepática (Montúfar-Valer & Huapaya-Jurado, 2014). Los pacientes no tratados tienen un desenlace fatal, mientras que los tratados, generalmente, una disminución en su calidad de vida (Huamani, 2020). Actualmente, los tratamientos farmacológicos y quirúrgicos no tienen una efectividad total. Esto se ve reflejado en las recidivas (aparición de nuevos quistes) o la ausencia de respuesta al tratamiento (quistes sin ningún cambio), ocasionando largos periodos de recuperación y miles de defunciones anuales (Espinosa et al., 2014; Montero & Breña, 2015).

En Junín, la pérdida económica media debida al tratamiento de hidatidosis fue más de 390 000 dólares (Minsa y Essalud) en el año 2013, mientras que el costo por tratamiento privado fue más de 4 000 dólares por paciente (Montalvo & Tiza, 2017). En este contexto, el monitoreo del éxito del tratamiento se torna importante para erradicar la enfermedad y mermar dicha carga económica. Sin embargo, los métodos actuales de

monitoreo del tratamiento presentan limitaciones y, en muchos casos, no reflejan la situación real de la evolución del paciente tratado (Frikha et al., 2018; Hosch et al., 2004; Vivanco et al., 2021). Por lo tanto, se hace necesario evaluar nuevas herramientas que puedan servir para determinar la eficacia del tratamiento y mejorar el monitoreo de la enfermedad.

Una alternativa supone el análisis de los miRNAs, los cuales son secuencias de ARN no codificante cortas que modulan procesos moleculares y celulares complejos mediante la regulación génica postranscripcional. Recientemente, la importancia del estudio de los miRNAs radica en su rol como biomarcadores para el diagnóstico y monitoreo de enfermedades, así como en el tratamiento al representar potenciales blancos terapéuticos. De hecho, los métodos moleculares basados en el análisis de miRNAs han demostrado ser altamente sensibles y específicos en el monitoreo de enfermedades infecciosas y no infecciosas (Çakmak & Demir, 2020; Condrat et al., 2020; B. He et al., 2020; Loureiro et al., 2020).

Por otra parte, la Retrotranscripción tallo-bucle con PCR en tiempo real cuantitativa (*stem-loop* RT-qPCR) es una técnica que posee altos niveles de especificidad y sensibilidad para la cuantificación relativa de miRNAs en una muestra. De hecho, por su alto rendimiento, se ha convertido en la principal técnica molecular para la validación de miRNAs y otros pequeños biomarcadores (Chen et al., 2005; Kramer, 2011). Por ello, esta metodología se ha usado para la validación de miRNAs conservados y nuevos de *Echinococcus granulosus* en muestras no humanas, y ha permitido identificar miRNAs diferencialmente expresados en distintas etapas de vida del parásito (Bai et al., 2014). No obstante, la expresión de los miRNAs de *E. granulosus* en pacientes con hidatidosis hepática tratados no está completamente entendido en nuestro país y en el mundo.

En ese sentido, considerando la prevalencia de hidatidosis hepática en Junín, la carga económica de la enfermedad, las limitaciones de las actuales metodologías de monitoreo y la escasez de estudios sobre miRNAs en pacientes tratados peruanos, la caracterización de miRNAs de *E. granulosus* en pacientes de Huancayo (Junín) con hidatidosis hepática antes y después del tratamiento farmacológico o quirúrgico se torna importante, pues contribuirá a mejorar la comprensión de la biología del parásito en la enfermedad y en el tratamiento de pacientes con hidatidosis hepática. Asimismo, los hallazgos de esta tesis representarán la primera caracterización de miRNAs de este



parásito en pacientes tratados en el Perú, lo cual tendrá una gran relevancia como antecedente para futuras investigaciones en nuestro país.

### **I.5. Limitaciones de la investigación**

En esta investigación, no se pudo analizar un mayor número de muestras de líquido hidatídico o plasma sanguíneo de pacientes con hidatidosis hepática, dado que no se hallaron más pacientes que desearan incorporarse voluntariamente al estudio, y varios pacientes que aceptaron el estudio no continuaron su participación por motivos personales.

Se ha reportado previamente un amplio número de miRNAs conservados y nuevos de *E. granulosus* (Bai et al., 2014). Sin embargo, en la presente investigación, no se pudo evaluar la expresión de todos estos miRNAs en las muestras debido a la limitación de los recursos monetarios, teniendo en consideración el costo de los *kits* de retrotranscripción y de PCR en tiempo real cuantitativa, así como de la síntesis de *primers*.

En esta investigación, no se pudo evaluar la expresión de miRNAs en los pacientes en periodos más amplios después de su tratamiento farmacológico o quirúrgico, dado que los pacientes adscritos al estudio no se incorporaron al mismo tiempo y las muestras debían analizarse en simultáneo. Además, el proyecto de investigación que financió esta tesis se encontraba sujeto a tiempos previamente estipulados para cumplir con los objetivos acordados.

Aún con estas limitaciones, esta investigación logró obtener una caracterización preliminar de los miRNAs de *E. granulosus* en muestras de pacientes con hidatidosis hepática de Huancayo (Junín) tratados farmacológica y quirúrgicamente.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **II.1. Marco Teórico**

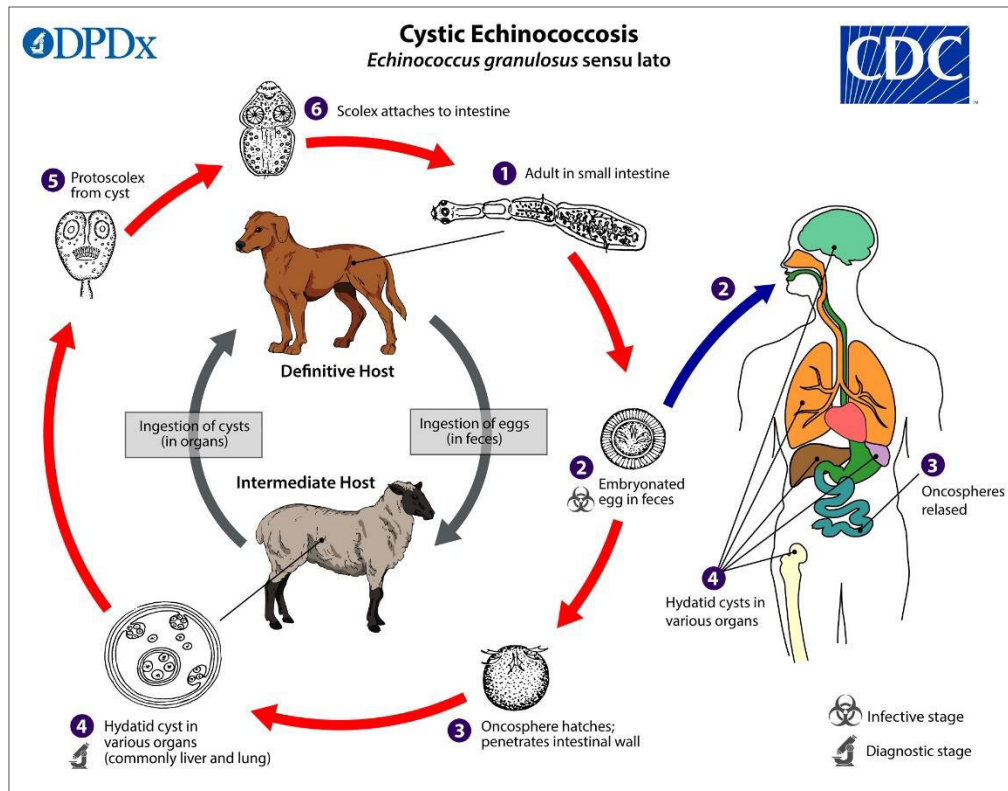
#### **II.1.1. *Echinococcus granulosus***

*Echinococcus granulosus* es un parásito cestodo pequeño (aproximadamente 4 milímetros) que se reproduce asexualmente por gemación. Esta especie pertenece a la familia *Taeniidae* y es considerada el agente causal de la hidatidosis hepática (Robertson, 2016). Estudios filogenéticos y moleculares han reportado que *E. granulosus* posee una alta diversidad genotípica, la cual se evidencia en los genomas mitocondriales y nucleares de sus 10 genotipos (G1-10) (Manterola & Otzen, 2016; Romig et al., 2015). Actualmente, existe un debate sobre la inclusión de éstos como especies dentro del género *Echinococcus*. Dado que las denominaciones pueden causar confusión, se designa *E. granulosus* sensu lato (s.l.) a las especies que causan hidatidosis o equinococosis quística (G4-10), y *E. granulosus* sensu stricto (s.s.) a las que no (G1-3) (Craig et al., 2015; Manterola et al., 2020; Manterola & Otzen, 2016).

##### **II.1.1.1 Ciclo de vida**

El ciclo de vida de *Echinococcus granulosus* (s.l.) consiste en una serie de estadios con marcada diferenciación morfológica, los cuales se desarrollan en hospederos animales. Generalmente, el hospedero definitivo e intermedio es el perro y la oveja, respectivamente (Casulli et al., 2019). Primero, *E. granulosus* en su forma adulta de larva se desarrolla en el intestino del hospedero definitivo y produce huevos infecciosos, los cuales son expulsados por las heces. Segundo, el hospedero intermedio ingiere los huevos, estos llegan a su intestino y liberan oncosferas, las cuales les permiten penetrar la pared intestinal y migrar hacia órganos internos como el hígado (más común) por la circulación. En caso de ser fértil, se convierte en metacestodo, también llamado “quiste hidatídico”, para luego generar la producción de protoscólices y la acumulación de líquido hidatídico en su interior. Tercero, el hospedero definitivo ingiere los órganos infectados (con quistes) del hospedero intermedio. Cuarto, los protoscólices ingeridos llegan hasta el intestino delgado del hospedero definitivo y se desarrollan hasta la forma adulta de larvas. Finalmente, el ciclo se repite cuando los huevos generados por la larva adulta son expulsados por las heces del hospedero definitivo e ingeridos por el hospedero intermedio (Figura 1). Los seres humanos son considerados hospederos accidentales

*dead-end* (callejón sin salida) y no forman parte del ciclo de vida del parásito. Esto se debe a que desarrollan la enfermedad por la ingesta accidental de huevos del parásito y no continúan el ciclo (Alvarez et al., 2018; CDC, 2019).



**Figura 1. Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus* (s.l.) (CDC, 2019).**

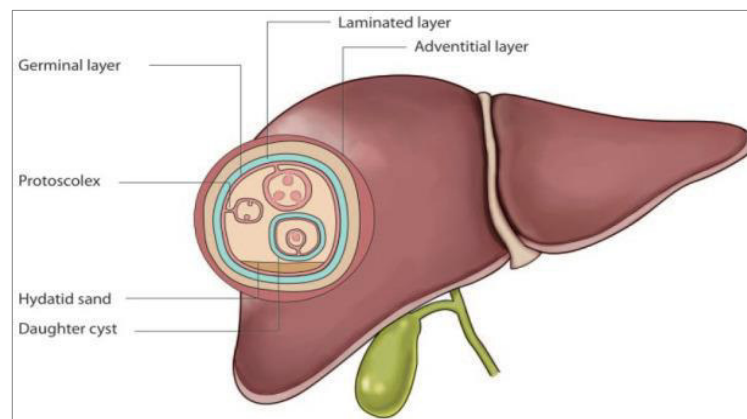
### II.1.2. Hidatidosis hepática

La hidatidosis hepática, o equinocosis quística, es una zoonosis causada por el parásito *Echinococcus granulosus* (s.l.) que se caracteriza por la formación de quistes hidatídicos en el hígado (Eckert et al., 2001). Los quistes se originan cuando el huevo de *E. granulosus* ingresa al hospedero y no es destruido por su sistema inmunitario (Tercero & Olalla, 2008). Después de la etapa inicial asintomática, los síntomas son variados e inespecíficos, siendo la sensibilidad y el dolor abdominal los más frecuentes (Tsaroucha et al., 2005). Uno de los episodios más graves es la ruptura del quiste. En este caso, el hospedero puede sufrir una reacción anafiláctica por el contacto con el líquido hidatídico, además de otras complicaciones como fistula biliar y diseminación de la infección hacia zonas extra hepáticas (Armiñanzas et al., 2015). En el Perú, ésta es una enfermedad endémica frecuentemente hallada en poblaciones localizadas en los andes centrales y sur del país. De hecho, su incidencia en el año 2018 fue de 5 197 casos (35% más respecto al

año anterior) y Junín fue uno de los departamentos con la más alta prevalencia de la enfermedad (CDC Perú, 2021).

### II.1.2.1 Quiste hidatídico hepático

Se produce como resultado de la infección por *E. granulosus* (s.l.), cuando el parásito llega hasta el hígado por medio del torrente sanguíneo (CDC, 2019). El quiste es una cavidad esférica integrada por capas y líquido hidatídico que crece lentamente y puede no generar ningún síntoma por muchos años. El quiste hidatídico tiene en su parte más externa una capa adventicia, la cual es producida por el hospedero. En la parte interna, está la capa laminar y la capa germinal. De la capa germinal, se forman muchos protoscolices, los cuales se reproducen por vía asexual y son infecciosos. También, se pueden formar vesículas con protoscolices en su interior que al final, junto con la capa laminar, dará lugar al quiste hija dentro del quiste hidatídico. El líquido hidatídico es el fluido que se encuentra dentro del quiste y contiene miles de protoscolices. La arenilla hidatídica hace referencia a la sedimentación de los protoscolices en el líquido hidatídico (Figura 2) (Govindasamy et al., 2023; Nabarro et al., 2015).



**Figura 2. Composición del quiste hidatídico hepático** (Govindasamy et al., 2023).

### II.1.2.2 Etapa del quiste hidatídico

La OMS ha brindado una clasificación estandarizada para la determinación de la etapa del quiste hidatídico (CE1, CE2, CE3a, CE3b, CE4 o CE5). Su determinación depende fundamentalmente de las características del quiste observadas a través de métodos imagenológicos. CE1 se caracteriza por quistes simples sin vesículas internas (etapa asintomática); CE2, por quistes multivesiculares (sintomática); CE3a, por quistes con membrana desunida (sintomática); CE3b, por quistes con quistes hijas separados por

una matriz (sintomática); CE4, por quistes heterogéneos caniculares (asintomática); y CE5, por quistes sólidos y calcificados (asintomática) (Stojkovic et al., 2012). Las etapas CE1 y CE2 se consideran como etapas activas; la etapa CE3, como etapa transitoria; y las etapas CE4 y CE5, como etapas inactivas (Almulhim & John, 2023).

### **II.1.3. Diagnóstico de la hidatidosis hepática**

El diagnóstico de hidatidosis hepática se lleva a cabo a través métodos imagenológicos y métodos serológicos, los cuales, generalmente, permiten la determinación del estadio de quiste y la detección de proteínas inmunitarias generadas contra el parásito, respectivamente (Eckert et al., 2001). En el Perú, el diagnóstico se realiza generalmente por imagenología, mientras que la serología es usada como método confirmatorio cuando los métodos imagenológicos son limitados o cuando no brindan información suficiente para determinar la presencia de la enfermedad (Montero & Breña, 2015; Tercero & Olalla, 2008).

#### **II.1.3.1 Diagnóstico de hidatidosis hepática por métodos imagenológicos**

Los métodos imagenológicos se basan en la detección por imágenes de las características quísticas en términos de tamaño, forma y número para la determinación de su estadio. Los métodos imagenológicos más usados son el ultrasonido (ecografía abdominal), la tomografía computarizada (TC), y la resonancia magnética (RM) (Eckert et al., 2001). En el Perú, la ecografía abdominal es el principal método diagnóstico para la hidatidosis hepática, debido a su eficiencia, sensibilidad, especificidad, menor costo y disponibilidad tecnológica, a diferencia de la TC y la RM (Liu et al., 2020; Montero & Breña, 2015).

#### **II.1.3.2 Diagnóstico de hidatidosis hepática por métodos serológicos**

Los métodos serológicos que dan lugar al inmunodiagnóstico se basan en la detección de la inmunoglobulina G humana específica contra antígenos de *E. granulosus*. Los métodos serológicos más usados son el ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas) y el Western-Blot, los cuales poseen altos niveles de sensibilidad y especificidad en determinados estadios del quiste. El resultado negativo de estas pruebas no descarta la enfermedad, pero son útiles frente a resultados imagenológicos sospechosos (Montero & Breña, 2015; Stojković et al., 2018).

#### **II.1.4. Tratamientos para la hidatidosis hepática**

Según el Grupo de Trabajo Informal de la OMS sobre Equinocosis (WHO-IWGE), los tratamientos para la hidatidosis hepática son cuatro: 1) Quirúrgico (cirugía), 2) Punción percutánea (PAIR: punción, aspiración, inyección, re-aspiración), 3) Farmacológico (drogas antiparasitarias), y 4) Observar y esperar. Para esta enfermedad, no existe un tratamiento mejor que otro, la elección del tratamiento dependerá de varios factores como el estadio y las características del quiste hidatídico (tamaño, localización y número), experiencia médica quirúrgica disponible, complicaciones del paciente, recursos, entre otros. En el Perú, el tratamiento quirúrgico y farmacológico son los más utilizados para tratar activamente la hidatidosis hepática (Brunetti et al., 2010; Montero & Breña, 2015).

##### **II.1.4.1 Tratamiento farmacológico para la hidatidosis hepática**

El tratamiento farmacológico consiste en el uso de drogas orales antiparasitarias como los benzimidazoles, siendo el más efectivo, el fármaco albendazol (ABZ), cuyo metabolito activo en el cuerpo humano es el albendazol sulfóxido. A nivel molecular, el fármaco inhibe la polimerización de la tubulina ocasionando afecciones en la membrana germinal de *E. granulosus*, lo cual conduce, generalmente, a la inhibición del quiste hidatídico (Lappin, 2012; Pinto, 2004). La dosis de ABZ por paciente es de 10 mg/kg/día en 2 dosis independientes, prescribiéndose usualmente 400 mg de ABZ dos veces al día a personas adultas de forma ininterrumpida durante semanas o hasta largos periodos, dependiendo de los síntomas y la evolución del paciente. El tratamiento farmacológico es recomendado para el estadio asintomático y los sintomáticos no complicados. En nuestro país, se emplea el tratamiento farmacológico en el caso de pacientes asintomáticos, o cuando los pacientes con quistes sintomáticos no pueden ser operados (Brunetti et al., 2010; Montero & Breña, 2015; Wen et al., 2019).

##### **II.1.4.2 Tratamiento quirúrgico para la hidatidosis hepática**

El tratamiento quirúrgico consiste en la extracción del o los quistes hidatídicos mediante cirugía hepática. Esta alternativa se realiza cuando las demás opciones de tratamiento son limitadas para inhibir quistes complejos, por ejemplo, quistes con alto riesgo de ruptura, quistes que chocan con el conducto biliar o que presionan otros órganos, y quistes numerosos o de gran tamaño (Brunetti et al., 2010). En el Perú, la cirugía

representa la primera opción de tratamiento para pacientes con quistes sintomáticos complicados. La cirugía puede ser radical (remoción total de la membrana del quiste) o conservadora (drenaje y remoción parcial de la membrana del quiste) dependiendo de la severidad de las características del quiste y el estado del paciente (Montero & Breña, 2015; Stojković et al., 2018).

### **II.1.5. Limitaciones de los tratamientos para la hidatidosis hepática**

En el caso del tratamiento farmacológico, su efectividad no es total, pues el éxito de esta terapia depende mucho de las características intrínsecas del paciente y del estadio del quiste. Se han reportado tres posibles respuestas al tratamiento con ABZ por parte de los pacientes. Las respuestas positivas, *Cura* (inhibición mínima del 50% de los quistes) y *Mejoría* (inhibición mínima del 25% de los quistes), son las más esperadas. No obstante, la respuesta negativa, *Sin cambios* (inhibición menor de 25% o nula de los quistes), también se suele presentar. De hecho, los pacientes con respuesta negativa que experimentan el fracaso farmacológico representarían el 20-30% (Pinto, 2004).

En el caso del tratamiento quirúrgico, la cirugía hepática involucra la extracción de los quistes hidatídicos. En los pacientes, la probabilidad de desparasitación solo es mayor mientras más radical sea la cirugía, procedimiento que no es tan practicado (Aydin et al., 2008; Montero & Breña, 2015). Además, la remoción quirúrgica radical o no radical tiene el riesgo de generar ruptura del quiste y filtraje de vesículas hijas o líquido hidatídico a zonas extra hepáticas, dando lugar a complicaciones e infecciones futuras (Eisman et al., 2017; Stojković et al., 2018). De hecho, en pacientes operados por hidatidosis hepática, se han reportado recidivas, las cuales consisten en la aparición de nuevos quistes después de un tiempo variable posterior al tratamiento quirúrgico (Brunetti et al., 2010; Espinosa et al., 2014).

### **II.1.6. Seguimiento del tratamiento para la hidatidosis hepática**

En el Perú, el seguimiento de la hidatidosis hepática se realiza frecuentemente a través de métodos imagenológicos basados en ultrasonido (ecografía abdominal) y, aunque en menor medida, a través de métodos serológicos basados en ELISA (Organización Panamericana de la Salud, 2017). No obstante, estas pruebas poseen limitaciones en términos de sensibilidad, especificidad, aplicabilidad, costo y recursos

(Frikha et al., 2018; Montero & Breña, 2015; Stojkovic et al., 2017; Stojković et al., 2018).

#### **II.1.6.1 Limitaciones del seguimiento por ecografía abdominal**

La capacidad de esta prueba para detectar la morfología del quiste y la afección del órgano no es total. Al comparar los hallazgos visualizados por cirugía con los obtenidos por ecografía abdominal, existen características clínicas que no puede detectar (periquistes y fístula biliar), y características que sí detecta (número y localización de quistes), pero en menor medida a comparación con la TC (Frikha et al., 2018). En términos de aplicabilidad, la ecografía abdominal no puede ser ejecutada en pacientes con obesidad o meteorismo debido a la obtención de resultados indeterminados o erróneos (Hosch et al., 2004) Asimismo, esta técnica requiere recursos tecnológicos moderados que, si bien no son tan costosos, su continuo empleo en el monitoreo de la enfermedad genera una carga financiera (Montalvo & Tiza, 2017).

#### **II.1.6.2 Limitaciones del seguimiento por ELISA**

La capacidad de esta prueba para detectar la enfermedad depende del estadio del quiste. En los quistes de estadios iniciales, los antígenos del parásito situados dentro de las cavidades quísticas no tienen contacto con células inmunitarias, por lo que la seropositividad en esta etapa solo ocurre cuando hay ruptura del quiste. De manera similar, en los quistes de estadios finales, hay consolidación acompañada de calcificación, dando lugar al mismo resultado (Siles-Lucas et al., 2017; Stojković et al., 2018). Por otra parte, se ha reportado que la seropositividad disminuye significativamente en pacientes diagnosticados con hidatidosis hepática que fueron previamente tratados quirúrgicamente, demostrándose la limitación de esta prueba para detectar recidivas (Stojkovic et al., 2017).

#### **II.1.7. microRNAs (miRNAs)**

Los miRNAs son la clase de ARN no codificante corto más abundante presente en animales, plantas, algas unicelulares y virus (P. Zhang et al., 2019). En su forma madura, son secuencias cortas no codificantes de 20 a 24 nucleótidos de hebra simple que modulan procesos moleculares y celulares complejos (Y. Zhang et al., 2018). Los miRNAs poseen una complementariedad parcial o múltiple a un determinado ARN

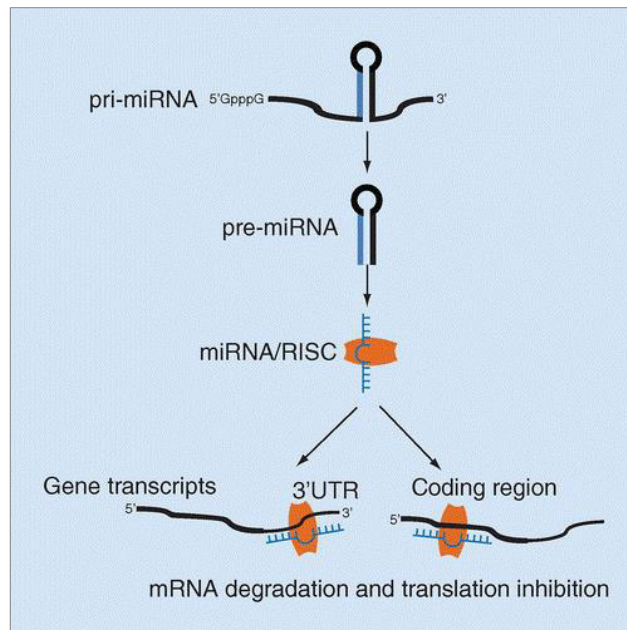


mensajero (ARNm), generalmente en su región 3' no traducida (3' UTR). Por tanto, la hibridación de un miRNA con un ARNm diana evita el proceso de traducción del mismo y la formación de la proteína correspondiente (Ying et al., 2018).

Debido a que son componentes principales de la regulación génica postranscripcional, los miRNAs han sido considerados blancos de investigación en las últimas décadas al representar biomarcadores importantes para el diagnóstico y monitoreo de enfermedades, así como por su potencial terapéutico (Backes et al., 2016; B. He et al., 2020; Swarbrick et al., 2019). Además, el descubrimiento de nuevos miRNAs ha mejorado el conocimiento actual sobre los mecanismos de regulación génica en la era postgenómica (Ying et al., 2018).

#### **II.1.7.1 Mecanismo de acción de los miRNAs en animales**

El mecanismo de acción de los miRNAs consiste en un conjunto de interacciones moleculares entre nucleótidos y proteínas conexas que estabilizan el proceso de forma coordinada. Inicialmente, el miRNA maduro en conjunto con el Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RISC) interactúa, generalmente, con la 3' UTR del ARNm objetivo formando un complejo de ARN de doble cadena y proteínas. Producto de esta complementariedad parcial, la unión del miRNA conlleva a la degradación del transcripto de ARNm a través del clivaje de la cadena. Por otra parte, también se ha reportado que el complejo miRNA-RISC-ARNm puede bloquear a la maquinaria de traducción sin causar la degradación del ARNm, pero evitando que este pueda traducirse en una proteína (Figura 3) (Koturbash et al., 2015; Matsuyama & Suzuki, 2019; Tafrihi & Hasheminasab, 2018; Ying et al., 2018).



**Figura 3. Silenciamiento de la expresión génica postranscripcional de los miRNAs** (Koturbash et al., 2015).

### II.1.7.2 Función reguladora de los miRNAs en animales

El silenciamiento génico postranscripcional mediado por los miRNAs puede regular potencialmente diversos aspectos de los procesos biológicos y funciones celulares (Tafrihi & Hasheminasab, 2018). Entre los procesos más importantes, se encuentran los siguientes: el crecimiento celular, la proliferación celular, el desarrollo celular, el metabolismo celular, los procesos infecciosos, la inmunidad, la muerte celular (apoptosis y necrosis), la biogénesis de organelas, la señalización de mensajeros, los mecanismos de reparación del ADN y el proceso de renovación celular (Kabekkodu et al., 2018; Saliminejad et al., 2019).

Dado que los miRNAs regulan la expresión génica por su complementariedad parcial al sitio 3'-UTR de ARNm, un solo miRNA puede hibridarse a más de un ARNm, y, de igual manera, varios miRNAs pueden hibridarse a un solo ARNm, modulando de forma organizada la expresión génica en células, tejidos y órganos (Ying et al., 2018).

### **II.1.7.3 Base de datos de secuencias de miRNAs: miRBase**

miRBase es la base de datos digital más extensa de miRNAs (<https://www.mirbase.org/>). Esta base de datos constituye un portal de almacenamiento online de secuencias de miRNAs precursoras (pre-miRNAs) y secuencias de miRNAs maduras (miRNAs). Estas secuencias fueron identificadas a partir del análisis de datos de secuenciamiento a gran escala para posteriormente ser publicadas y anotadas (Kozomara & Griffiths-Jones, 2014). Las secuencias reportadas en esta base de datos se utilizan como referencias para la identificación de miRNAs conservados y nuevos expresados en diversos organismos (Griffiths-Jones et al., 2008).

## **II.2. Antecedentes del estudio**

### **II.2.1. miRNAs de *Echinococcus granulosus***

En diversos países del mundo, se han realizado estudios transcriptómicos de *E. granulosus* (Z. He et al., 2020). Estos estudios han permitido identificar los miRNAs expresados por el parásito de acuerdo con sus estadios morfológicos. No obstante, la mayoría de estas investigaciones se han centrado en analizar el perfil de miRNAs a partir de cultivos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* del parásito, y son muy pocas las investigaciones desarrolladas a partir de hospederos infectados (Bai et al., 2014; Cucher et al., 2011; Faridi et al., 2021; Mortezaei et al., 2021). Los estudios en animales se han realizado a partir de infecciones experimentales y/o se han enfocado en analizar el transcriptoma intestinal del hospedero (Faridi et al., 2020; Li et al., 2021; Xiao et al., 2022). En el Perú, hasta la fecha no se han reportado estudios de caracterización de miRNAs de *E. granulosus* a partir de cualquier tipo de cultivo celular ni de hospederos animales.

### **II.2.2. miRNAs de *Echinococcus granulosus* en pacientes con hidatidosis hepática**

Las investigaciones en personas infectadas son muy escasas y, generalmente, buscan analizar los miRNAs expresados por el hospedero humano (Mahami-Oskouei et al., 2021; Orsten et al., 2021). En nuestro país, hasta la fecha, no se han reportado estudios de caracterización de miRNAs de *E. granulosus* a partir de muestras de pacientes diagnosticados con hidatidosis hepática.

### **II.2.3. miRNAs de *Echinococcus granulosus* en pacientes con hidatidosis hepática tratados**

Los estudios de miRNAs de *E. granulosus* en pacientes con hidatidosis hepática diferencialmente expresados antes y después del tratamiento farmacológico o quirúrgico son muy escasos y limitados. Entre los más relacionados, se reportan dos estudios recientes realizados en Irán. El primero analizó miRNAs del parásito antes y después de la inoculación de albendazol, y se reveló el efecto inhibitor del fármaco. Sin embargo, este estudio solo analizó la expresión de dos miRNAs en un ensayo *in vitro* y no dentro de un hospedero infectado (Mortezaei et al., 2019). El segundo analizó el perfil de miRNAs del parásito antes y después del procedimiento quirúrgico en pacientes con la enfermedad, y reveló la presencia de miRNAs subregulados del parásito después de la cirugía. Este estudio demostró el papel de los miRNAs de *E. granulosus* como biomarcadores efectivos para el seguimiento de los pacientes tratados quirúrgicamente. No obstante, solo analizó la expresión diferencial de dos miRNAs y no caracterizó el perfil de expresión de más miRNAs conservados y nuevos del parásito en los pacientes infectados (Alizadeh et al., 2020). En Latinoamérica y en el Perú, hasta la fecha no se han reportado estudios de caracterización de miRNAs de *E. granulosus* en pacientes con hidatidosis hepática antes y después del tratamiento farmacológico o quirúrgico.

## **II.3. Bases teóricas**

### **II.3.1. PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR en tiempo real)**

Es una técnica molecular basada en la tecnología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual permite la amplificación exponencial de secuencias de ADN objetivo en una determinada muestra generando una gran cantidad de productos de amplificación que facilitarán su detección. En la PCR en tiempo real cuantitativa, estos productos pueden ser cuantificados en el momento de la reacción, debido a la presencia de moléculas fluorescentes afines al ADN, permitiendo su detección en un determinado ciclo de amplificación. Esto lo convierte en un método cuantitativo que va a permitir la amplificación, detección y cuantificación del ADN en una muestra (Life Technologies Corporation, 2012; Nolan et al., 2013). Asimismo, es importante considerar los lineamientos necesarios para la realización óptima de experimentos de qPCR (Bustin et al., 2009).

La reacción de qPCR en tiempo real inicia con la mezcla de los componentes o reactivos, luego, el ciclado térmico va a permitir denaturar las hebras de ADN, hibridar los *primers forward* y *reverse* y extender hasta obtener miles de copias de ADN. Debido a la presencia de fluoróforos en el buffer de reacción, el ADN amplificado puede detectarse en tiempo real. El fluoróforo más usado por su costo-beneficio es el *SYBR Green*, esta es una molécula fluorescente con alta afinidad por el ADN de doble hebra, que se intercala entre sus hebras y emite fluorescencia cuando se encuentra unido al mismo. A medida que incrementa la concentración de ADN, la cantidad de moléculas fluorescentes unidas al ADN aumentan, dando lugar a una emisión de fluorescencia cada vez mayor. Así, el ADN amplificado es capaz de detectarse cuando la fluorescencia del complejo ADN-*SYBR Green* pasa el umbral de detección en un determinado ciclo de amplificación, el cual se denomina *C<sub>q</sub>* (ciclo de cuantificación). Los resultados del experimento de qPCR en tiempo real se expresan en términos de *C<sub>q</sub>* para cada muestra analizada. Finalmente, el número de moléculas de ADN en la muestra puede conocerse comparando los resultados de *C<sub>q</sub>* con los de la curva estándar, la cual es elaborada con concentraciones de ADN previamente conocidas (Life Technologies Corporation, 2012; Nolan et al., 2013).

### **II.3.2. Retrotranscripción con PCR en tiempo real cuantitativa (RT-qPCR)**

La técnica RT-qPCR en tiempo real consiste en una primera etapa de retrotranscripción de ARN y una segunda etapa de PCR en tiempo real cuantitativa. Esta configuración permite primero la conversión de ARN a ADN complementario (ADNc) y después la amplificación, detección y cuantificación en tiempo real del ADNc en una determinada muestra. Esta técnica posee altos niveles de especificidad y sensibilidad, por lo que se ha convertido en la principal técnica molecular empleada para el análisis de expresión génica y la detección de marcadores de ARN, entre ellos el ARN ribosomal (ARNr) (Life Technologies Corporation, 2012; Nolan et al., 2013). De hecho, esta metodología se ha usado para la detección de los ARNr 5.8S y 12S de *E. granulosus* en muestras no humanas, y ha permitido detectar la presencia del parásito y también actuar como control interno en estudios previos (Bai et al., 2014; Štefanić et al., 2004).

El proceso de retrotranscripción inicia con la mezcla de los componentes o reactivos, entre ellos, los *primers*, el tampón de reacción, la enzima retrotranscriptasa, los *dNTPs*, etc. Generalmente, existen tres tipos de *primers* empleados en este proceso: los

oligonucleótidos de timina (oligo T), los hexámeros aleatorios y los *primers* específicos. Los primeros suelen usarse cuando se desea retrotranscribir ARN que contenga una cadena poliadenilada (polyA) como los ARN mensajeros; los hexámeros aleatorios, cuando se desea retrotranscribir el ARN en general presente en la muestra; y los *primers* específicos, cuando se desea retrotranscribir una secuencia de ARN en particular, por lo que la secuencia del *primer* debe ser afín a la del ARN objetivo. Posterior a la mezcla de los componentes, el ciclado térmico va a permitir la hibridación del *primer* y luego, la extensión, dando lugar a la conversión de ARN a ADNc. Cuando el proceso finaliza, generalmente, se realiza una incubación final para inactivar a la enzima de retrotranscripción y continuar con el proceso de qPCR, considerando los lineamientos necesarios para la realización óptima de esta técnica (Bustin et al., 2009; Life Technologies Corporation, 2012; Nolan et al., 2013).

Los resultados del experimento de qPCR en tiempo real se expresan en términos de *Cq* para cada muestra analizada. Finalmente, estos valores permiten hacer análisis de expresión relativa y determinar una posible expresión diferencial entre condiciones evaluadas (Life Technologies Corporation, 2012; Nolan et al., 2013).

### **II.3.3. Retrotranscripción tallo-bucle con PCR en tiempo real cuantitativa (*Stem-loop* RT-qPCR)**

La técnica *stem-loop* RT-qPCR está basada en la tecnología de la retrotranscripción seguida de una PCR en tiempo real cuantitativa (RT-qPCR), con una variante en la retrotranscripción que permite formar una estructura tallo-bucle (*stem-loop*) con el miRNA objetivo. Esta técnica posee altos niveles de especificidad y sensibilidad para la cuantificación relativa de miRNAs en una muestra. De hecho, por su alto rendimiento, se ha convertido en la principal técnica molecular para la validación de miRNAs y otros pequeños biomarcadores (Chen et al., 2005; Kramer, 2011). Por ello, esta metodología se ha usado para la validación de miRNAs conservados y nuevos de *E. granulosus* en muestras no humanas, y ha permitido identificar miRNAs diferencialmente expresados en distintas etapas de vida del parásito (Bai et al., 2014).

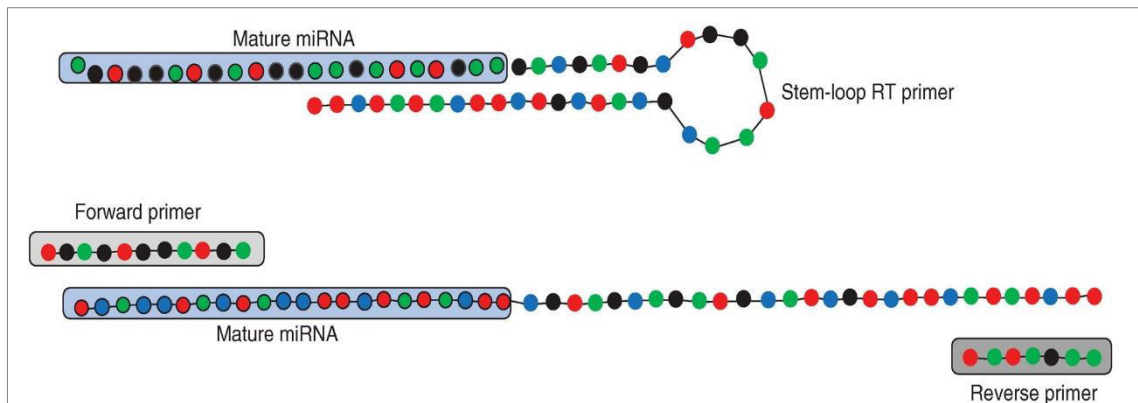
#### **II.3.3.1 Retrotranscripción tallo-bucle**

La primera etapa de esta metodología es la retrotranscripción tallo-bucle que permite la obtención ADNc. En esta etapa, el *primer* de retrotranscripción es el resultado

de la unión de una secuencia universal (al inicio) y la secuencia reversa complementaria de los últimos 6-8 nucleótidos del miRNA objetivo (al final). La secuencia universal contiene en sus extremos dos regiones espaciadas que son complementarias entre sí. Esta estructura favorable permite que al entrar en contacto con el miRNA objetivo, el complejo *primer*-miRNA adopte una estructura en forma de tallo-bucle muy estable (paso de hibridación). Posteriormente, la retrotranscripción se llevará a cabo con los demás componentes necesarios para la síntesis de ADNc (paso de extensión). Finalmente, se puede realizar una incubación final para inactivar a la enzima de retrotranscripción y continuar con la segunda etapa de qPCR en tiempo real (Figura 4) (Bai et al., 2014; Benes & Castoldi, 2010; Chen et al., 2005; Forero et al., 2019).

### **II.3.3.2 PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR en tiempo real)**

La segunda etapa de esta metodología es la PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR), la cual va a permitir la amplificación, detección y cuantificación del cDNA obtenido a partir de la retrotranscripción tallo-bucle del miRNA objetivo. En esta etapa, es importante considerar los lineamientos para la realización óptima de experimentos de qPCR (Bustin et al., 2009). El *primer forward* es diseñado según la secuencia del miRNA, y su longitud va a depender de la afinidad de sus características con las del *primer reverse*, el cual es una secuencia universal con características previamente conocidas (Bai et al., 2014; Chen et al., 2005; Forero et al., 2019). La reacción inicia con la mezcla de los componentes para la amplificación, luego, el ciclado térmico va a permitir denaturar las hebras de ADNc, hibridar los *primers forward* y *reverse* y extender hasta obtener miles de copias de ADNc. Debido a la presencia de un fluoróforo en el buffer de reacción, el ADN amplificado puede detectarse en tiempo real (Figura 4) (Benes & Castoldi, 2010). Los resultados del experimento de *stem-loop* RT-qPCR se expresan en términos de *Cq* para cada muestra analizada. Posteriormente, estos valores permiten hacer análisis de expresión relativa de miRNAs y determinar una posible expresión diferencial entre condiciones evaluadas (Benes & Castoldi, 2010; Chen et al., 2005; Forero et al., 2019).



**Figura 4. Etapas de la metodología *stem-loop* RT-qPCR para la detección de miRNAs.** Primero, se muestra la estructura tallo-bucle formada por el complejo *primer-miRNA*. Después, se muestra la amplificación del ADNc con los *primers forward* y *reverse* (Forero et al., 2019).

#### II.4. Definición de términos

**Activación de la polimerasa:** En el contexto de la PCR, consiste en la elevación de la temperatura a un nivel generalmente alto (90-95°C) para que la enzima polimerasa pueda liberarse de su modificador (en caso lo posea) y ejercer activamente su función de polimerización (Thermo Fisher Scientific, 2023d).

**ADN:** El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una macromolécula de estructura de doble hélice compuesta por nucleótidos que almacena información genética de las entidades biológicas (National Institutes of Health, 2023d).

**ADNc:** El ADN complementario (ADNc) Es una macromolécula de ADN sintetizada a partir de una molécula de ARN y, generalmente, se obtiene en los procesos de retrotranscripción, donde una enzima es capaz de rescribir la secuencia del ARN en una secuencia de ADN complementaria (National Institutes of Health, 2023c).

**ARN:** El ácido ribonucleico (ARN) es una macromolécula de hebra simple que cumple funciones relacionadas a la síntesis de proteínas y a la regulación génica en la célula, por lo que es útil en las investigaciones de expresión génica (National Institutes of Health, 2023a).

**ARNm:** El ARN mensajero (ARNm) es una molécula de ARN que se obtiene de la transcripción del ADN y contiene información genética codificante que, posteriormente,



dará lugar a la síntesis de proteínas mediante del proceso de traducción (National Institutes of Health, 2023b).

**ARNnp:** Los ARN pequeños nucleares (ARNnp) son un tipo de ARN pequeño no codificante que desempeña un papel esencial en la maquinaria de procesamiento del ARN y en la regulación de la expresión génica (Koffler-Brill et al., 2023).

**ARNr:** El ARN ribosomal (ARNr), un tipo de ARN, es un componente estructural de los ribosomas y facilita la síntesis de proteínas al guiar la traducción de ARNm a proteínas (Guigó, 2013).

**Biomarcador:** Es un indicador biológico que se puede medir y evaluar en un contexto biológico normal, patológico o en respuesta a un tratamiento (Strimbu & Tavel, 2010).

**Caracterización:** Se refiere al proceso de describir y analizar las características o propiedades de un objeto de estudio particular en un contexto determinado (EduRev, 2023).

**Curva de *Melting*:** Es un proceso generalmente incluido en la PCR en tiempo real, que a través de una gradiente de temperatura proporciona información sobre la composición y la pureza del producto amplificado (Life Technologies Corporation, 2012).

**Denaturación:** Es un proceso biológico o químico en el cual las dos cadenas de la doble hélice de ADN se separan, desenrollándose y rompiendo las uniones de hidrógeno que mantienen sus cadenas unidas (Caetano-Anollés, 2013).

**ELISA:** El Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) es una técnica inmunológica utilizada en investigación y diagnóstico para detectar y cuantificar la presencia de antígenos o anticuerpos en muestras biológicas (British Society for Immunology, 2023).

**Espectrofotometría:** Es una técnica utilizada para analizar la absorbancia de la luz a diferentes longitudes de onda en una solución, lo cual permite medir la concentración de moléculas y la pureza de una muestra, como el ARN (Thermo Fisher Scientific, 2023e)

**Expresión génica:** Se refiere al proceso por el cual la información contenida en un gen se utiliza para sintetizar una proteína funcional o una molécula de ARN funcional, por lo que es fundamental en la transmisión de la información genética y la regulación de la función de las células y los organismos (National Institutes of Health, 2023e).

**Extensión:** Es una etapa del ciclo de amplificación de la PCR que implica la síntesis de nuevas cadenas de ADN complementarias utilizando las hebras simples de ADN o ARN molde como plantilla (Nolan et al., 2013).

**Fístula biliar:** Es una conexión anormal entre las vías biliares y el tracto gastrointestinal, cuyos síntomas incluyen dolor abdominal, fiebre e ictericia, y se da como resultado de cirugías biliares, enfermedades del hígado o inflamación intestinal (Crespi et al., 2016).

**Fluoróforo:** Es una molécula que es capaz de absorber la luz en una longitud de onda específica y reemitirla a una longitud de onda diferente. Por ello, son ampliamente utilizados en técnicas de biología molecular como la PCR para marcar y detectar moléculas biológicas como el ADN (Nolan et al., 2013).

**GC %:** Es una medida que indica el porcentaje de bases nitrogenadas de guanina (G) y citosina (C) en una molécula de ADN o ARN en relación con el total de bases nitrogenadas presentes (Mooers & Holmes, 2000).

**Gemación:** Es un proceso de reproducción asexual realizado por ciertos seres vivos y consiste en la formación de un nuevo ser biológico a partir de una pequeña protuberancia o brote del cuerpo de un ser parental hasta convertirse en un organismo independiente idéntico al progenitor (Khan Academy, 2023).

**Hibridación:** Es la complementariedad específica de pequeñas secuencias o *primers* con secuencias objetivo de ADN o ARN presentes en una muestra, por lo que es un paso importante en los procesos de retrotranscripción o amplificación por PCR (Nolan et al., 2013).

**Líquido hidatídico:** Es el fluido que se encuentra dentro del quiste hidatídico y contiene en su mayoría miles de parásitos de *E. granulosus* en forma de protozoos en solución acuosa junto con proteínas y otros elementos celulares (Govindasamy et al., 2023).

**Mezcla de dNTP:** Los desoxinucleósido trifosfatos (*dNTP*) se componen de una base nitrogenada (adenina, citosina, guanina o timina) unida a un azúcar (desoxirribosa) y tres grupos fosfato. Estos se incorporan a la cadena en crecimiento y sirven como componentes básicos para la síntesis de nuevas cadenas de ADN (Thermo Fisher Scientific, 2023a).

**Pb:** En el contexto de la biología molecular, un par de bases (1 pb) hace referencia a dos nucleótidos que están unidos por complementariedad de bases en una molécula de ADN

y se utiliza para expresar la longitud de secuencias de ADN o el tamaño del producto de amplificación en ensayos de PCR (Thermo Fisher Scientific, 2023c).

**Plasma sanguíneo:** Es la parte líquida de la sangre y constituye aproximadamente el 55% del volumen total. Está compuesto por agua (principalmente), proteínas, electrolitos, nutrientes, productos de desecho, hormonas, etc, así como por biomarcadores y sustancias indicativas de la salud (Stanford Medicine Children's Health, 2023).

**Protoscólice:** Es el estadio larval de *E. granulosus* que se origina de la capa germinal del metacéstodo. Los protoscólices se encuentran en el interior de quistes hidatídicos y poseen ganchos y ventosas que facilitan su adherencia (Galindo et al., 2002).

**Regulación postranscripcional:** Se refiere al conjunto de procesos y mecanismos que ocurren después de que una molécula de ARN mensajero (ARNm) ha sido transcrita a partir de un gen, con el fin de regular la expresión génica y la función de las proteínas en las células (Corbett, 2018).

**RevertAid M-MuLV RT:** Es un tipo específico de enzima retrotranscriptasa o transcriptasa inversa generalmente comercializada en *kits* de biología molecular. Esta enzima se utiliza para realizar la síntesis de ADNc a partir de ARN en una determinada muestra (Thermo Fisher Scientific, 2013).

**RPM:** Las Revoluciones Por Minuto (RPM) representan la velocidad de rotación de un objeto en mecánica e indican cuántas veces un objeto gira completamente en un minuto. Esto es importante para controlar la velocidad de equipos en el procesamiento de muestras biológicas (Hareendran, 2017).

**Secuenciamiento de alto rendimiento:** Es una tecnología utiliza enfoques paralelos y automatizados que permiten la secuenciación rápida y masiva de millones de fragmentos de ADN o ARN. Por ello, ha tenido gran relevancia en investigación y la salud (Churko et al., 2013)

**Tampón de reacción:** Es una solución utilizada en técnicas de laboratorio como la PCR, para mantener un pH constante y proporcionar reactivos necesarios para la síntesis de ADN, como sales de magnesio, sales de potasio, etc (Thermo Fisher Scientific, 2023a).

**Temperatura de *Melting*:** La temperatura de fusión es la temperatura en la que el 50% de las secuencias analizadas se encuentran en configuración doble cadena y el otro 50% se encuentra en hebra simple. Esta es una característica particular de cada secuencia y

puede variar según la longitud y la composición de bases de una secuencia (Merck KGaA, 2023).

**TRizol:** Es un reactivo utilizado en biología molecular y biotecnología para extraer ácido nucleico (ADN y ARN) de muestras biológicas, y funciona mediante la denaturación de las proteínas y la disociación de los ácidos nucleicos de proteínas y otros componentes celulares (Thermo Fisher Scientific, 2023b).

### III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

#### III.1. Hipótesis

Existe expresión diferencial de miRNAs de *Echinococcus granulosus* previo y posterior al tratamiento farmacológico o quirúrgico en pacientes con diagnóstico de hidatidosis hepática (Huancayo, 2022).

#### III.2. Variables

La clasificación de las variables se basó en reportes previos de estadística aplicada (Cauas, 2015; Gamboa, 2014).

**Variable independiente:** Condición del paciente con hidatidosis hepática.

Características de la variable:

- Escala nominal
- Variable cualitativa nominal
- Posibles valores: Paciente no tratado, paciente tratado farmacológicamente y paciente tratado quirúrgicamente.

**Variable dependiente:** Expresión relativa de miRNAs de *Echinococcus granulosus*.

Características de la variable:

- Escala numérica
- Variable cuantitativa continua
- Posibles valores: 0.1, 0.2, 0.3...n

### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

#### IV.1. Área de estudio

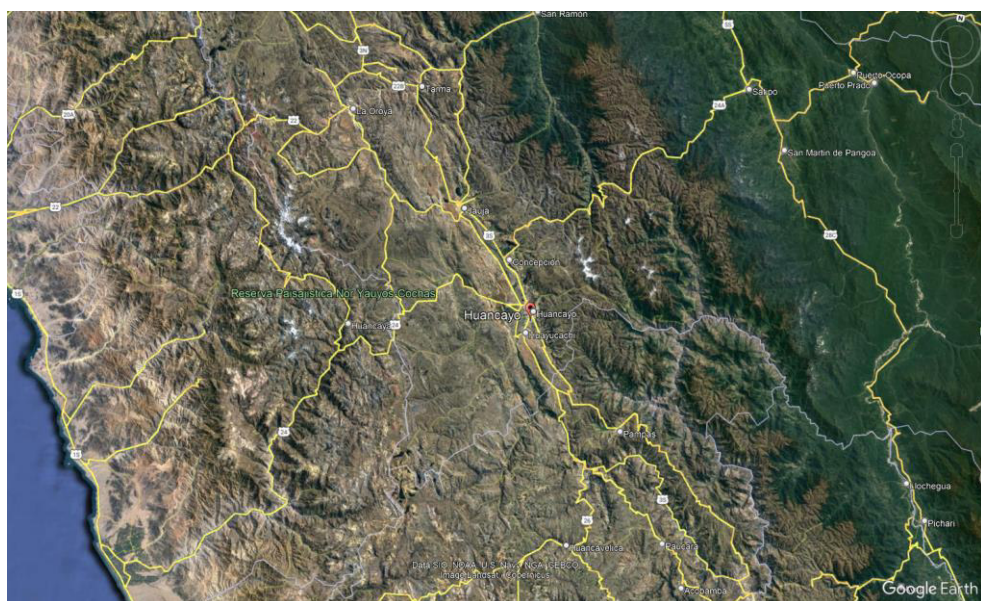
Las muestras biológicas se recolectaron en el año 2022 en la ciudad de Huancayo, cuyas coordenadas son 12°3'54''S, 75°12'17'' O (Figura 6).

Huancayo es una ciudad de la sierra central peruana ubicada en la provincia de Huancayo, en el departamento de Junín, a 3 249 metros sobre el nivel del mar. Fue fundada en el año 1571, durante la época colonial española. Por lo que, la ciudad tiene una rica historia que abarca desde la resistencia indígena descendiente de los “Huancas” hasta su papel como centro comercial y cultural en la región andina. Huancayo se encuentra a orillas del río Mantaro, río más largo del Perú, el cual ha sido fundamental

para el crecimiento de la ciudad por proporcionar agua y recursos para la agricultura. Además, su población está en constante crecimiento y es diversa, lo cual se refleja en las diferentes actividades económicas como la agricultura, la ganadería, la acuicultura, la minería, el comercio, el transporte, las comunicaciones, el turismo y los servicios (Guabloche & Saldarriaga, 2013; Huancayo Perú, 2023; Loayza-Acosta et al., 2019).

En cuanto a sus características geográficas, Huancayo tiene una topografía montañosa y cuenta con valles, mesetas y paisajes naturales. La Carretera Central es una de las principales vías de acceso, ya que conecta la costa peruana con la sierra central y atraviesa la ciudad de Huancayo en su camino hacia otras ciudades de la región de Junín (Municipalidad Provincial de Huancayo, 2003).

Huancayo tiene un clima templado seco de montaña con estaciones marcadas. Los inviernos son fríos y secos, con temperaturas que pueden descender por debajo de cero grados Celsius, mientras que los veranos son cálidos y lluviosos. La flora y fauna característica de la ciudad es el eucalipto, cactus, junco, ichu, romero, perdiz, ganso andino, zorro colorado, alpaca, llama, vicuña, trucha, entre otras. Según la clasificación de Antonio Brack Egg, Huancayo se encuentra en la ecorregión Quechua. Esta ecorregión se caracteriza por su clima frío y seco, así como por una flora y fauna adaptada a las condiciones de gran altitud en los Andes (Brack, 1986; Municipalidad Provincial de Huancayo, 2003).



**Figura 5. Imagen satelital del área de estudio.** La ciudad de Huancayo se observa en el marcador rojo ubicado la zona central (Google Earth, 2022).

## **IV.2. Diseño de la investigación**

Esta investigación tiene un diseño cuantitativo cuasi experimental, ya que se buscó caracterizar la expresión de miRNAs en pacientes con hidatidosis hepática, cuya asignación de tratamiento farmacológico o quirúrgico no fue aleatoria, sino que fue recomendada por médicos especialistas en base a las características clínicas de cada paciente (González & Covinos, 2021).

Además, este estudio fue transversal, ya que las muestras de pacientes se tomaron en dos momentos específicos (antes y después del tratamiento) durante el año 2022 y todas las muestras se analizaron al mismo tiempo. Por tanto, la recopilación de datos se dio en dos periodos específicos y no en un seguimiento continuo a lo largo del tiempo (González & Covinos, 2021).

Finalmente, este estudio tuvo un enfoque descriptivo, pues buscó describir las características de la expresión de miRNAs en pacientes con hidatidosis hepática antes y después del tratamiento para proporcionar una visión preliminar sobre la expresión de estos en respuesta al tratamiento farmacológico o quirúrgico (González & Covinos, 2021).

## **IV.3. Población y muestra**

Esta investigación realizó un muestreo por juicio no aleatorio, ya que se tomaron muestras de pacientes con hidatidosis hepática que fueron seleccionados por cumplir con ciertas características predefinidas, como los criterios de inclusión y exclusión, por lo que no implicó una selección aleatoria. Este tipo de muestreo es utilizado comúnmente en investigaciones clínicas y epidemiológicas para garantizar que la muestra sea representativa de la población de interés, y que los participantes cumplan con ciertas características o condiciones específicas relevantes para el estudio (Navarrete, 2000).

Para ello, esta investigación se presentó al Comité de Ética en Investigación del Hospital Regional Docente Clínico Quirúrgico Daniel Alcides Carrión de Huancayo, Junín, y fue aceptada con constancia brindada el 4 de febrero de 2022 (Anexo 01). Además, los pacientes dieron su consentimiento informado para participar en la investigación de manera voluntaria (Anexo 02).

### IV.3.1. Muestras de líquido hidatídico

En total, se analizaron 4 muestras de líquido hidatídico de 4 pacientes con hidatidosis hepática que fueron diagnosticados por ecografía abdominal y/o tomografía computarizada (Tabla 1).

**Tabla 1. Información clínica de los pacientes con hidatidosis hepática.** F: Femenino, M: Masculino, EA: Ecografía abdominal, TC: tomografía computarizada de abdomen, NR: No reportado.

N° de Paciente	Edad	Sexo	Método diagnóstico	Número de quistes	Tamaño del quiste (mm)	Volumen del quiste (cm <sup>3</sup> )	Etapa del quiste (OMS)
Paciente 1	45	F	EA y TC	1	160x170x220	3000	CE3
Paciente 2	77	M	EA y TC	2	53x76	NR	CE3
					100x95	NR	CE3
Paciente 3	46	F	TC	1	112x137	850	CE3
Paciente 4	24	F	EA y TC	2	200x150x140	2184	CE2
					100x65x77	210	CE2

Estas muestras fueron obtenidas por especialistas del Hospital Regional Docente Clínico Quirúrgico Daniel Alcides Carrión de Huancayo, Junín, después de la cirugía de extracción de quiste hidatídico de pacientes con hidatidosis hepática y consistió en la aspiración de líquido hidatídico del quiste con una jeringa estéril. Estas muestras se almacenaron en tubos de microcentrífuga y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

### IV.3.2. Muestras de plasma sanguíneo

En total, se procesaron 25 muestras de plasma sanguíneo de 13 pacientes residentes en Huancayo (Junín) que fueron diagnosticados como positivos para hidatidosis hepática por ecografía abdominal y/o tomografía computarizada. Asimismo, se recolectó la información clínica de cada paciente incluido en el estudio (Tabla 2).



**Tabla 2. Información clínica de los pacientes con hidatidosis hepática que brindaron las muestras de plasma sanguíneo.** F: Femenino, M: Masculino, EA: Ecografía abdominal, TC: tomografía computarizada, Fa: tratamiento farmacológico, Q: tratamiento quirúrgico, NR: No reportado.

N° de Paciente	Edad	Sexo	Método diagnóstico	Número de quistes	Tamaño del quiste (mm)	Etapas del quiste (OMS)	Tratamiento
Paciente 1	42	M	EA y TC	1	64x67	CE4	Fa
Paciente 2	85	F	EA	1	49.3x48x50.8	CE2	Fa
Paciente 3	66	M	EA	3	63x47, 36x28, 23x15	CE1	Fa
Paciente 4	72	F	EA	1	33.6x35.8x29.7	CE4	Fa
Paciente 5	67	M	EA y TC	1	46x35.1x39.6	CE4	Fa
Paciente 6	61	F	EA	1	37.96x25.58x32.39	CE1	Fa
Paciente 7	32	F	EA	1	37.1x27.9	CE1	Fa
Paciente 8	35	F	EA	1	50	CE1	Fa
Paciente 9	66	M	EA	1	22x34.82x21.04	CE2	-
Paciente 10	29	F	EA	1	50x52	CE2	Q
Paciente 11	33	M	EA	1	29x30	CE4	Q
Paciente 12	27	F	EA y TC	1	NR	CE1	Q
Paciente 13	24	M	EA	2	85.9x67.2x70.1 72.7x73.8x81.1	CE1	Q

Para la obtención de cada muestra, primero se colectó 3 mL de sangre venosa en un tubo con anticoagulante heparina. Después, las muestras se colocaron en neveras portátiles con paquetes de hielo para su traslado al laboratorio. Este procedimiento se realizó dos veces por paciente. En el caso de los pacientes con tratamiento farmacológico, la primera toma de muestra se realizó en un día antes del inicio del tratamiento y la segunda, 30 días después de iniciado el tratamiento con albendazol (400 mg dos veces al día). En el caso de los pacientes con tratamiento quirúrgico, la primera toma de muestra se realizó antes de la cirugía, y la segunda, 24 horas después de la cirugía de extracción de quiste hidatídico. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3200 rpm durante 20

minutos a 4°C. Posteriormente, se retiró la fase acuosa correspondiente a plasma sanguíneo y se colocó en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL para su almacenamiento a -70°C hasta su análisis.

#### **IV.4. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información**

##### **IV.4.1. Equipos**

- Cabina de bioseguridad nivel 2
- Centrífuga refrigerada
- Destilador de agua
- Espectrofotómetro (Nanodrop One®)
- Esterilizador autoclave
- Microcentrífuga refrigerada
- Micropipetas de 0.5-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL y 100-1000 µL
- Refrigeradoras con temperatura mínima de 4°C, -20°C y -70°C
- Termociclador en tiempo real (CFX96 Real Time System, Bio-Rad®)
- Vórtex

##### **IV.4.2. Materiales**

- Agujas 21G, algodón hidrófilo y esparadrapo
- Bolsas de bioseguridad
- Cajas de criopreservación para tubos de 2 mL
- Casco para sistema Vacutainer®, ligadura tubular y tubos de recolección de sangre con anticoagulante heparina
- Frascos con tapa rosca de 250 mL y 1000 mL
- Guantes de nitrilo
- Guardapolvos y mascarillas descartables
- Neveras portátiles
- Pabilo y cinta indicadora de esterilización
- Papel kraft y papel filtro
- Paquetes de hielo
- Probetas graduadas de 100 mL y 500 mL
- Puntas de micropipeta con filtro de 0.5-10, 2-20, 20-200 y 100-1000 µL

- Soporte para tubos de microcentrífuga y centrífuga
- *Strips* de tubos de PCR de 200  $\mu$ L
- Tachos para material biocontaminado
- Tubos de centrífuga estériles autoclavables de 15 mL y 45 mL
- Tubos de microcentrífuga autoclavables de 1.5 mL y 2 mL
- Vasos precipitados autoclavables de 250 mL y 1000 mL

#### IV.4.3. Reactivos

- Agua destilada
- Agua ultrapura grado biología molecular
- Alcohol medicinal de 70° y 90°
- Cloroformo grado biología molecular
- Etanol absoluto grado biología molecular
- Isopropanol grado biología molecular
- *Kit* para PCR en tiempo real cuantitativa (SsoAdvanced universal SYBR® Green Supermix, Bio-Rad): incluye agua libre de nucleasas y tampón de reacción *SsoAdvanced SYBR Mix*.
- *Kit* para sintetizar cDNA a partir de RNA (RevertAid First Strand cDNA Synthesis, ThermoScientific): incluye agua libre de nucleasas, tampón de reacción, mezcla de *dNTP*, enzima retrotranscriptasa *RevertAid M-MuLV RT*, *primer* hexámeros aleatorios.
- Reactivo para descontaminación de RNAsas
- Solución de *primers* de retrotranscripción, *forward* y *reverse*.
- TRIzol grado biología molecular

#### **IV.4.4. Metodología**

##### **IV.4.4.1 Detección de los rRNAs 5.8S y 12S de *Echinococcus granulosus* en muestras de líquido hidatídico mediante RT-qPCR**

###### **IV.4.4.1.1 Aislamiento de ARN a partir de líquido hidatídico de pacientes con hidatidosis hepática**

Se utilizó el reactivo TRIzol para aislar el ARN total de las muestras de líquido hidatídico. Para ello, se siguieron las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones. Este se realizó en baño de hielo manteniendo la temperatura de 4°C en cada paso.

1. Se homogenizó la muestra de líquido hidatídico.
2. Se transfirió 1 mL de líquido hidatídico.
3. Se centrifugó a 16 000 g por 10 minutos a 4°C.
4. Se retiró 600 µL del sobrenadante.
5. Se agregó 1 mL de TRIzol Reagent (Invitrogen).
6. Se mezcló con la micropipeta y por vórtex durante 10 segundos.
7. Se incubó a 4°C por 5 minutos.
8. Se agregó 300 µL de cloroformo grado biología molecular.
9. Se incubó por 3 minutos a 4°C.
10. Se centrifugó por 15 minutos a 12 000 g a 4°C.
11. Se retiró la fase acuosa (ARN) y se colocó en un nuevo tubo. No se tomó ni se perturbó la interfase (ADN).
12. Se añadió 500 µL de isopropanol grado biología molecular.
13. Se añadió 1 µL de glucógeno (20 mg/mL).
14. Se incubó por 10 minutos a 4°C.
15. Se centrifugó por 10 minutos a 12 000 g a 4°C.
16. Se descartó el sobrenadante sin tocar el pellet.
17. Se lavó el pellet en 1 mL de etanol al 75%.
18. Se mezcló por vórtex.
19. Se centrifugó por 5 minutos a 7500 g a 4°C.
20. Descartar el sobrenadante sin tocar el pellet.
21. Secar al aire por 10 min.

22. Se resuspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas.

23. Las muestras de ARN se almacenaron a -70°C hasta su uso.

#### IV.4.4.1.2 Cuantificación de ARN aislado a partir de líquido hidatídico

La cuantificación del ARN se realizó con mediante el espectrofotómetro Nanodrop One siguiendo la guía del fabricante. La concentración de ARN se expresó en nanogramos por microlitro (ng/µL) y los parámetros de pureza en A260/A280 y A260/A230.

#### IV.4.4.1.3 Retrotranscripción con PCR en tiempo real cuantitativa (*real time RT-qPCR*)

Para confirmar que el ARN aislado a partir de líquido hidatídico contenía ARN de *Echinococcus granulosus*, se realizó una retrotranscripción con PCR en tiempo real cuantitativa (RT-qPCR) de los marcadores mitocondriales de ARNr 5.8S y 12S del parásito. En esta etapa, se tuvo en consideración los lineamientos para la realización óptima de experimentos de qPCR (Bustin et al., 2009). Además, se validaron *primers* específicos previamente reportados (Tabla 3).

**Tabla 3. Primers utilizados para la detección de *Echinococcus granulosus* por RT-qPCR.** RT primer: Primer de retrotranscripción.

Marcador	Primers	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto (pb)	Referencia
ARNr 5.8S	RT primer	GGACAGACGTGACCACAGGC	114	(Bai et al., 2014)
	Forward	GTCGATGAAGAGTGCAGCCAAC		
	Reverse	GGACAGACGTGACCACAGGC		
ARNr 12S	RT primer	Hexámeros aleatorios	255	(Štefanić et al., 2004)
	Forward	CATTAATGTATTTTGTAAGTTG		
	Reverse	CACATCATC TTACAATAACACC		

Este paso consistió en obtener ADNc a partir de los ARNr 5.8S y 12S de la muestra de ARN aislada a partir de líquido hidatídico. Para ello, se utilizó el kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones se mantuvieron a 4°C y consideró un control negativo en la reacción con agua libre de nucleasas en lugar de ARN.

### Retrotranscripción del ARNr 5.8S

Primero, se mezclaron los componentes indicados en la Tabla 4, y se incubaron a 65°C por 5 minutos para que las secuencias de *primers* y ARN se abran y/o separen. Inmediatamente después, la mezcla se incubó en baño de hielo por 6 minutos para generar un *shock* térmico y que las secuencias permanezcan en dicho estado. Posteriormente, se preparó la mezcla maestra indicada en la Tabla 5 que contenía los demás reactivos necesarios para la retrotranscripción, y se agregó a la mezcla inicial (Tabla 4).

**Tabla 4. Mezcla de ARN y primer para la retrotranscripción del marcador ARNr 5.8S de *Echinococcus granulosus*. RT primer: Primer de retrotranscripción.**

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para 1 reacción (µL)
Agua libre de nucleasas	-	-	3
RT primer	5 µM	1 µM	1.5
ARN	0.2 – 0.4 µg/µL	0.08 – 0.16 µg/µL	3
Volumen final			7.5

**Tabla 5. Mezcla maestra para la retrotranscripción del marcador ARNr 5.8S de *Echinococcus granulosus*.**

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para 1 reacción (µL)
Agua libre de nucleasas	-	-	5.5
Tampón de reacción	5X	1X	4
Mezcla de dNTP	10 mM	1 mM	2
RevertAid M-MuLV RT	200 U/µL	10 U/µL	1
Mezcla de ARN y primer (Tabla 4)			7.5
Volumen final			20

### Retrotranscripción del ARNr 12S

Primero, se mezclaron los componentes indicados en la Tabla 6, y se incubaron a 65°C por 5 minutos para que las secuencias de *primers* y ARN se abran y/o separen. Inmediatamente después, la mezcla se incubó en baño de hielo por 6 minutos para generar un *shock* térmico y que las secuencias permanezcan en dicho estado. Posteriormente, se preparó la mezcla maestra indicada en la Tabla 7 que contenía los demás reactivos necesarios para la retrotranscripción, y se agregó a la mezcla inicial (Tabla 6).

**Tabla 6. Mezcla de ARN y primer para la retrotranscripción del marcador ARNr 12S de *Echinococcus granulosus*.**

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para 1 reacción (µL)
Agua libre de nucleasas	-	-	3.5
<i>Primer hexámeros aleatorios</i>	100 µM	13,3 µM	1
ARN	0.2 – 0.4 µg/µL	0.08 – 0.16 µg/µL	3
<b>Volumen final</b>			7.5

**Tabla 7. Mezcla maestra para la retrotranscripción del marcador ARNr 12S de *Echinococcus granulosus*.**

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para 1 reacción (µL)
Agua libre de nucleasas	-	-	5,5
Tampón de reacción	5X	1X	4
Mezcla de <i>dNTP</i>	10 mM	1 mM	2
<i>RevertAid M-MuLV RT</i>	200 U/µL	10 U/µL	1
<b>Mezcla de ARN y primer (Tabla 6)</b>			7,5
<b>Volumen final</b>			20

El ciclado térmico utilizado para la retrotranscripción de ambas mezclas maestras se detalla en la Tabla 8.

**Tabla 8. Ciclado térmico para la retrotranscripción de los ARNr 5.8S y 12S de *Echinococcus granulosus*.**

Paso	Temperatura	Tiempo
Hibridación	16°C	30 min
Extensión	42° C	60 min
Inactivación de la retrotranscriptasa	70°C	5 min
Final	4°C	Infinito

Cada muestra de ADNc obtenida se diluyó con agua libre de nucleasas en proporción 1:100. Posterior a ello, se continuó con la PCR en tiempo real cuantitativa.

PCR en tiempo real cuantitativa (real time qPCR)

Este paso se realizó para amplificar, detectar y cuantificar el ADNc obtenido del ARNr 5.8S y 12S de las muestras de ARN aisladas a partir de líquido hidatídico. Para ello, se utilizó el kit *SsoAdvanced universal SYBR® Green Supermix* de Bio-Rad, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones se mantuvieron a 4°C, se hicieron por cuadruplicado, se consideró el control negativo de la amplificación con agua libre de nucleasas en lugar de ADNc.

La mezcla maestra utilizada para la qPCR se detalla en la Tabla 9. En este paso, se usó el *primer forward* y *reverse* específico de cada marcador (Tabla 3).

**Tabla 9. Componentes y volúmenes de la mezcla maestra de qPCR de los marcadores ARNr 5.8S y 12S de *Echinococcus granulosus*.**

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para 1 reacción (µL)
Agua libre de nucleasas	-	-	1,3
<i>SsoAdvanced SYBR Mix</i>	2X	1X	7,5
<i>Primer Forward</i>	10 µM	0,4 µM	0,6
<i>Primer Reverse</i>	10 µM	0,4 µM	0,6
ADNc			5
Volumen final			15



El ciclado térmico utilizado para la qPCR se detalla en la Tabla 10.

**Tabla 10. Ciclado térmico para la PCR en tiempo real cuantitativa de los marcadores ARNr 5.8S y 12S de *Echinococcus granulosus*.**

<b>Paso</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Activación de la polimerasa</b>	1	95°C	1 min
<b>Denaturación</b>	45	95°C	15 s
<b>Hibridación y Extensión</b>		60 °C	1 min
<b>Curva de <i>Melting</i></b>	1	65°C -95°C (0.5°C/ 2 segundos)	-
<b>Final</b>	1	15°C	Infinito

Finalmente, se analizaron las curvas de amplificación y las curvas de *Melting* de cada muestra para validar la expresión de los marcadores ARNr 5.8S y 12S de *Echinococcus granulosus* en las muestras de ARN aisladas a partir de líquido hidatídico.

#### IV.4.4.2 Detección de miRNAs de *Echinococcus granulosus* en muestras de líquido hidatídico

Se utilizaron las muestras de ARN aisladas previamente (ver sección IV.4.4.1.1).

##### IV.4.4.2.1 miRNAs analizados

Se analizaron 12 miRNAs conservados y 5 miRNAs nuevos de *E. granulosus* identificados por un estudio previo (Tabla 11) (Bai et al., 2014).

**Tabla 11. miRNAs de *Echinococcus granulosus* analizados en esta investigación.**

Tipo	N°	miRNA	Secuencia	Longitud (nt)	Acceso (miRBase)
miRNAs conservados	1	egr-mir-9	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUGUG	22	MIMAT0020235
	2	egr-mir-4988	ACCUAUCACACUUCAGUCC	19	-
	3	egr-mir-133	UUGGUCCCCAUUAACCAGCCGC	22	MIMAT0041196
	4	egr-mir-1992	UCAGCAGUUGUACCAUUGAAAUG	23	MIMAT0041198
	5	egr-mir-bantam	UGAGAUCGCGAUUACAGCUGAU	22	MIMAT0041174
	6	egr-mir-219	UGAUUGUCCAUCGCAUUUCUUG	23	MIMAT0020246
	7	egr-mir-61	UGACUAGAAAGAGCACUCACAUCC	24	MIMAT0041176
	8	egr-mir-10	CACCCUGUAGACCCGAGUUUGA	22	MIMAT0020236
	9	egr-let-7	UGAGGUAGUGUUUCGAAUGUCU	22	MIMAT0020227
	10	egr-mir-1	UGGAAUGUUGUGAAGUAUGU	20	MI0017775
	11	egr-mir-71	UGAAAGACGAUGGUAGUGAGA	21	MIMAT0020237
	12	egr-mir-7	UGGAAGACUGGUGAUUGUUGU	22	MIMAT0020233
miRNAs nuevos	13	egr-new-15	UGGAGCUUGGUGACAAGACUGAC	23	-
	14	egr-new-22	AGUGUUGAUGUCAGGUUGCUUCU	23	-
	15	egr-new-87*	CUAAACCAAGAGACAAAUUGA	21	-
	16	egr-new-17*	UAAUUCGAGUCAACAGGGUCGUU	23	-
	17	egr-new-74	GGUGCCAUUAGUGUGAUAGG	20	-

#### IV.4.4.2.2 Diseño de *primers*

De los 17 miRNAs mencionados en la Tabla 11, el estudio de Bai y colaboradores en 2014 validó a todos por *stem-loop* RT-qPCR, excepto a los miRNAs *egr-mir-1* y *egr-mir-71*. Por tal razón, se procedió a diseñar originalmente los *primers* de retrotranscripción y *forward* para ambos miRNAs, siguiendo la metodología reportada previamente (Bai et al., 2014; Chen et al., 2005). Las estructuras tallo-bucle se analizaron en UNAFold (<http://www.unafold.org/>) (Zuker, 2003) y el porcentaje de GC, estructuras secundarias y temperatura de *Melting* se evaluó en el *software OligoAnalyzer* (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) (Owczarzy et al., 2008).

Se consideraron los siguientes parámetros en el caso de los *primers* de retrotranscripción:

- Delta de Gibbs ( $\Delta G$ ) de la estructura tallo-bucle: menor a -15 kcal/mol.
- Porcentaje de GC óptimo: 45-55%.
- Delta de Gibbs ( $\Delta G$ ) de estructuras secundarias: mayores a -9 kcal/mol.
- Temperatura de *Melting*:  $67^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Se consideraron los siguientes parámetros en el caso de los *primers forward*:

- Porcentaje de GC óptimo:  $55 \pm 5 \%$ .
- Delta de Gibbs ( $\Delta G$ ) de estructuras secundarias: mayores a -9 kcal/mol.
- Temperatura de *Melting* (afín a la del primer *reverse*):  $63.6 \pm 1^{\circ}\text{C}$

En la Tabla 12, se presentan las características de los *primers* diseñados.

**Tabla 12. Características de los *primers* de retrotranscripción y *primers forward* diseñados para la detección de los miRNAs *egr-mir-1* y *egr-mir-71*. RT: *Primer* de retrotranscripción, TM: Temperatura de *Melting*. ES: Estructura secundaria.**

<i>Primer</i>	miRNA	Secuencia (5'-3')	GC (%)	TM (°C)	ES (kcal/mol)
RT	<i>egr-mir-1</i>	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGG CAATTCAGTTGAGACATACTT	47.7	67.1	-17.30
	<i>egr-mir-71</i>	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGG CAATTCAGTTGAGTCTCACTA	50.0	67.7	-16.80
<i>Forward</i>	<i>egr-mir-1</i>	ACACTCCAGCTGGGTGAAAGAC GATGG	55.6	63.9	Mayor a -2
	<i>egr-mir-71</i>	ACACTCCAGCTGGGTGGAATGTT GTG	53.8	62.9	Mayor a -2

#### IV.4.4.2.3 Retrotranscripción tallo-bucle con PCR en tiempo real cuantitativa (*stem-loop* RT-qPCR)

Para detectar miRNAs de *E. granulosus* en las muestras de ARN aisladas a partir de líquido hidatídico, se realizó la metodología *stem-loop* RT-qPCR específica para cada secuencia, con algunas modificaciones (Bai et al., 2014; Chen et al., 2005; Forero et al., 2019). Para ello, se tuvo en consideración los lineamientos para la realización óptima de experimentos de qPCR (Bustin et al., 2009). La lista total de los *primers* utilizados se detalla en la Tabla 13. De esta lista, solo los *primers* de los miRNAs egr-mir-1 y egr-mir-71 fueron diseñados en este estudio, mientras que los demás fueron diseñados y validados por el estudio de Bai y colaboradores en 2014.

**Tabla 13. *Primers* utilizados para la detección de miRNAs de *E. granulosus*.**

Nº	miRNA	<i>Primer</i> de retrotranscripción (5'-3')	<i>Primer forward</i> (5'-3')	<i>Primer reverse</i> (5'-3')
1	egr-mir-9	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGC AATTCAGTTGAGCACACAGC	ACACTCCAGCTGGGTCTTTGG TTATCTA	CTCAACT GGTGTCG TGGAGT
2	egr-mir-4988	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGC AATTCAGTTGAGGGACTGAA	ACACTCCAGCTGGGACCTATC ACAC	
3	egr-mir-133	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGC AATTCAGTTGAGGCGGCTGG	ACACTCCAGCTGGGTGGTCC CCATTAA	
4	egr-mir-1992	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGC AATTCAGTTGAGCATTTCOA	ACACTCCAGCTGGGTCAGCAG TTGTACCA	
5	egr-mir-bantam	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGC AATTCAGTTGAGATCAGCTG	ACACTCCAGCTGGGTGAGATC GCGATTA	
6	egr-mir-219	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGC AATTCAGTTGAGCAAGAAAT	ACACTCCAGCTGGGTGATTGT CCATTCGC	
7	egr-mir-61	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGC AATTCAGTTGAGGGATGTGA	ACACTCCAGCTGGGTGACTAG AAAGAGCAC	
8	egr-mir-10	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGC AATTCAGTTGAGTCAAATC	ACACTCCAGCTGGGCACCCTG TAGACCC	
9	egr-let-7	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGC AATTCAGTTGAGAGACATTC	ACACTCCAGCTGGGTGAGGTA GTGTTTC	
10	egr-mir-1	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGC AATTCAGTTGAGACATACTT	ACACTCCAGCTGGGTGAAAGA CGATGG	
11	egr-mir-71	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGC AATTCAGTTGAGTCTCACTA	ACACTCCAGCTGGGTGGAATG TTGTG	
12	egr-mir-7	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGC AATTCAGTTGAGACAACATA	ACACTCCAGCTGGGTGGAAGA CTGGTGA	
13	egr-new-15	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGC AATTCAGTTGAGGTCAGTCT	ACACTCCAGCTGGGTGGAGCT TGGTGACA	
14	egr-new-22	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGC AATTCAGTTGAGAGAAGCAA	ACACTCCAGCTGGGAGTGTTG ATGTCAGG	
15	egr-new-87*	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGC AATTCAGTTGAGTCAATTTG	ACACTCCAGCTGGGCTAAACC AAGAGA	

16	egr-new-17*	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGC AATTCAGTTGAGAACGACCC	ACACTCCAGCTGGGTAATTCG AGTCAACA
17	egr-new-74	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGC AATTCAGTTGAGCCTATCAC	ACACTCCAGCTGGGGGTGCCA TTAGT

### Retrotranscripción tallo-bucle (stem-loop RT)

Este paso se realizó para obtener ADNc a partir de la estructura miRNA/*primer* de retrotranscripción. Para ello, se utilizó el kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se consideró como control positivo una muestra ARN aislada a partir de líquido hidatídico confirmada por los marcadores 5.8S y 12S ARNr de *Echinococcus granulosus*. El control negativo de la reacción se preparó con agua libre de nucleasas en lugar de ARN. Este protocolo se realizó para cada miRNA con su *primer* de retrotranscripción específico.

Primero, se mezclaron los componentes indicados en la Tabla 14, y se incubaron a 65°C por 5 minutos para que las secuencias de *primers* y ARN se abran. Inmediatamente después, la mezcla se incubó en baño de hielo por 6 minutos para generar un *shock* térmico y que las secuencias permanezcan en dicho estado. Posteriormente, se preparó la mezcla maestra indicada en la Tabla 15 que contenía los demás reactivos necesarios para la retrotranscripción, y se agregó a la mezcla inicial (Tabla 14).

**Tabla 14. Mezcla de ARN y *primer* para la retrotranscripción de miRNAs de *Echinococcus granulosus* en muestras de líquido hidatídico.**

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para 1 reacción (µL)
Agua libre de nucleasas	-	-	3
<i>Primer</i> de retrotranscripción	2.5 µM	0.5 µM	1.5
ARN	0.2 – 0.4 µg/µL	0.08 – 0.16 µg/µL	3
<b>Volumen final</b>			<b>7.5</b>

**Tabla 15. Mezcla maestra para la retrotranscripción de miRNAs de *Echinococcus granulosus*.**

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para 1 reacción (μL)
Agua libre de nucleasas	-	-	5.5
Tampón de reacción	5X	1X	4
Mezcla de dNTP	10 mM	1 mM	2
<i>RevertAid M-MuLV RT</i>	200 U/μL	10 U/μL	1
Mezcla de ARN y primer (Tabla 14)			7.5
Volumen final			20

El ciclado térmico utilizado para la retrotranscripción de los miRNAs se detalla en la Tabla 16. Cada muestra de ADNc obtenida se diluyó con agua libre de nucleasas en proporción 1:100. Posterior a ello, se continuó con la PCR en tiempo real cuantitativa.

**Tabla 16. Ciclado térmico para la retrotranscripción de miRNAs de *Echinococcus granulosus* en muestras de líquido hidatídico.**

Paso	Temperatura	Tiempo
Hibridación	16°C	30 min
Extensión	42° C	60 min
Inactivación de la retrotranscriptasa	70°C	5 min
Final	4°C	Infinito

PCR en tiempo real cuantitativa (real time qPCR)

Este paso se realizó con el fin de amplificar, detectar y cuantificar el ADNc obtenido de cada miRNA de las muestras de ARN aisladas a partir de líquido hidatídico. Para ello, se utilizó el kit *SsoAdvanced universal SYBR® Green Supermix*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones se mantuvieron a 4°C, se hicieron por cuadruplicado y se consideró el control negativo de la retrotranscripción y de la amplificación con agua libre de nucleasas en lugar de ADNc.

La mezcla maestra utilizada para la qPCR se detalla en la Tabla 17. En este paso, se usó el *primer forward* y *reverse* específico para cada miRNA (Tabla 13). El ciclado térmico utilizado para la qPCR se detalla en la Tabla 18.

**Tabla 17. Componentes y volúmenes de la mezcla maestra de qPCR para detectar miRNAs de *Echinococcus granulosus*.**

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para 1 reacción (µL)
Agua libre de nucleasas	-	-	1.3
<i>SsoAdvanced SYBR Mix</i>	2X	1X	7.5
<i>Primer Forward</i>	10 µM	0.4 µM	0.6
<i>Primer Reverse</i>	10 µM	0.4 µM	0.6
ADNc			5
Volumen final			15

**Tabla 18. Ciclado térmico para la detección de miRNAs de *Echinococcus granulosus* por qPCR.**

Paso	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Activación de la polimerasa	1	95°C	1 min
Denaturación	45	95°C	15 s
Hibridación y Extensión		60 °C	1 min
Curva de <i>Melting</i>	1	65°C -95°C (0.5°C/ 2 segundos)	-

Finalmente, se analizaron las curvas de amplificación y las curvas de *Melting* de cada muestra para validar la expresión de los miRNAs de *Echinococcus granulosus* en las muestras de ARN aisladas a partir de líquido hidatídico.

#### **IV.4.4.3 Evaluación de miRNAs de *Echinococcus granulosus* en muestras de plasma sanguíneo de pacientes previo y posterior al tratamiento farmacológico y quirúrgico**

##### **IV.4.4.3.1 Aislamiento de ARN a partir de plasma sanguíneo de pacientes con hidatidosis hepática**

Se utilizó el reactivo TRIzol para aislar el ARN total de las muestras de plasma sanguíneo. Para ello, se siguieron las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones. Este protocolo se realizó en baño de hielo manteniendo la temperatura de 4°C en cada paso.

1. Se agregó 1.5 mL de TRIzol.
2. Se transfirió 500 µL de plasma al mismo tubo.
3. Se mezcló con la micropipeta y por vórtex durante 10 segundos.
4. Se incubó a 4°C por 5 minutos.
5. Se centrifugó a 12 000 g por 5 minutos a 4°C.
6. Se retiró el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo de microcentrífuga.
7. Se agregó 300 µL de cloroformo grado biología molecular.
8. Se incubó por 3 minutos a 4°C.
9. Se centrifugó por 15 minutos a 12 000 g a 4°C.
10. Se retiró la fase acuosa (ARN) y se colocó en un nuevo tubo. No se tomó ni se perturbó la interfase (ADN).
11. Se añadió 750 µL de isopropanol grado biología molecular a la fase acuosa.
12. Se añadió 1 µL de glucógeno 20 mg/mL.
13. Se incubó por 10 minutos a 4°C.
14. Se centrifugó por 10 minutos a 12 000 g a 4°C.
15. Se descartó el sobrenadante sin tocar el pellet.
16. Se lavó el pellet en 1.5 mL de etanol al 75%.
17. Se mezcló por vórtex.
18. Se centrifugó por 5 minutos a 7500 g a 4°C.
19. Descartar el sobrenadante sin tocar el pellet (blanco).
20. Secar al aire por 10 min.
21. Se resuspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas.
22. Las muestras de ARN se almacenaron a -70°C hasta su uso.



#### **IV.4.4.3.2 Cuantificación de ARN**

La cuantificación del ARN se realizó con mediante el espectrofotómetro Nanodrop One siguiendo la guía del fabricante. La concentración de ARN se expresó en nanogramos por microlitro (ng/ $\mu$ L) y los parámetros de pureza en A260/A280 y A260/A230.

#### **IV.4.4.3.3 Retrotranscripción tallo-bucle con PCR en tiempo real cuantitativa (*stem-loop* RT-qPCR)**

Se realizó la técnica de retrotranscripción tallo-bucle y PCR en tiempo real cuantitativa (*stem-loop* RT-qPCR) específica para cada secuencia, con algunas modificaciones (Bai et al., 2014; Chen et al., 2005; Forero et al., 2019). Los *primers* para la detección de cada miRNA se detallan en la Tabla 13. Además, se tuvo en consideración los lineamientos para la realización óptima de experimentos de qPCR (Bustin et al., 2009).

##### Retrotranscripción tallo-bucle (*stem-loop* RT)

Este paso se realizó para obtener ADNc a partir de la estructura miRNA/*primer* de retrotranscripción. Para ello, se utilizó el kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se consideró como control positivo una muestra ARN aislada a partir de líquido hidatídico confirmada por los marcadores 5.8S y 12S ARNr de *Echinococcus granulosus*. El control negativo de la reacción se preparó con agua libre de nucleasas en lugar de ARN. Este protocolo se realizó para cada miRNA con su *primer* de retrotranscripción específico.

Primero, se mezclaron los componentes indicados en la Tabla 19, y se incubaron a 65°C por 5 minutos para que las secuencias de *primers* y ARN se abran. Inmediatamente después, la mezcla se incubó en baño de hielo por 6 minutos para generar un *shock* térmico y que las secuencias permanezcan en dicho estado. Posteriormente, se preparó la mezcla maestra indicada en la Tabla 15 que contenía los demás reactivos necesarios para la retrotranscripción, y se agregó a la mezcla inicial (Tabla 19).

**Tabla 19. Mezcla de ARN y *primer* para la retrotranscripción de miRNAs de *Echinococcus granulosus* en muestras de plasma sanguíneo.**

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para 1 reacción (μL)
Agua libre de nucleasas	-	-	- Muestra: 0 - Control positivo: 3
<i>Primer</i> de retrotranscripción	2.5 μM	0.5 μM	1.5
ARN	0.2 – 0.9 μg/μL	- Muestra: 0.16 – 0.72 μg/μL - Control positivo: 0.08 – 0.36 μg/μL	- Muestra: 6 - Control positivo: 3
<b>Volumen final</b>			7.5

El ciclado térmico utilizado para la retrotranscripción de los miRNAs se detalla en la Tabla 16. Las muestras ADNc obtenidas a partir de ARN aislado de plasma sanguíneo se diluyeron con agua libre de nucleasas en proporción 1:10, mientras que el ADNc obtenido del ARN aislado de líquido hidatídico, en proporción 1:100. Posterior a ello, se continuó con la PCR en tiempo real cuantitativa.

*PCR en tiempo real cuantitativa (real time qPCR)*

Este paso se realizó con el fin de amplificar, detectar y cuantificar el ADNc obtenido de cada miRNA de las muestras de ARN aisladas a partir de plasma sanguíneo. Para ello, se utilizó el kit *SsoAdvanced universal SYBR® Green Supermix*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones se mantuvieron a 4°C, se hicieron por triplicado y se consideró un control negativo de la amplificación con agua libre de nucleasas en lugar de ADNc.

La mezcla maestra utilizada para la qPCR se detalla en la Tabla 17. En este paso, se usó el *primer forward* y *reverse* específico para cada miRNA (Tabla 13). El ciclado térmico utilizado para la qPCR se detalla en la Tabla 18.

Finalmente, se analizaron las curvas de amplificación y las curvas de *Melting* de cada muestra para validar la expresión de los miRNAs de *Echinococcus granulosus* en las muestras de ARN aisladas a partir de plasma sanguíneo de pacientes con hidatidosis hepática.

#### **IV.4.4.3.4 Análisis estadístico**

Los datos de cuantificación de la expresión de los miRNAs se presentaron en términos de Cq. Los gráficos y análisis estadísticos se realizaron en el software GraphPad Prism 8 y se consideró un nivel de confianza del 95% (GraphPad, 2024).

## V. RESULTADOS

### V.1. Detección de los rRNAs 5.8S y 12S de *Echinococcus granulosus* en muestras de líquido hidatídico mediante RT-qPCR

#### V.1.1. Aislamiento de ARN a partir de líquido hidatídico de pacientes con hidatidosis hepática

Se aislaron 4 muestras de ARN a partir de líquido hidatídico de pacientes con hidatidosis hepática. Las medidas obtenidas de la cuantificación de ARN por espectrofotometría se detallan en la Tabla 20.

**Tabla 20. Características de las muestras de ARN aisladas a partir de muestras de líquido hidatídico.**

Nº de Paciente	Concentración (ng/ $\mu$ L)	A260/A280	A260/A230
<b>Paciente 1</b>	492.8	1.73	1.35
<b>Paciente 2</b>	342.3	1.75	0.35
<b>Paciente 3</b>	397.15	1.44	0.28
<b>Paciente 4</b>	214.4	1.48	0.27

#### V.1.2. Retrotranscripción con PCR en tiempo real cuantitativa (*real time* RT-qPCR)

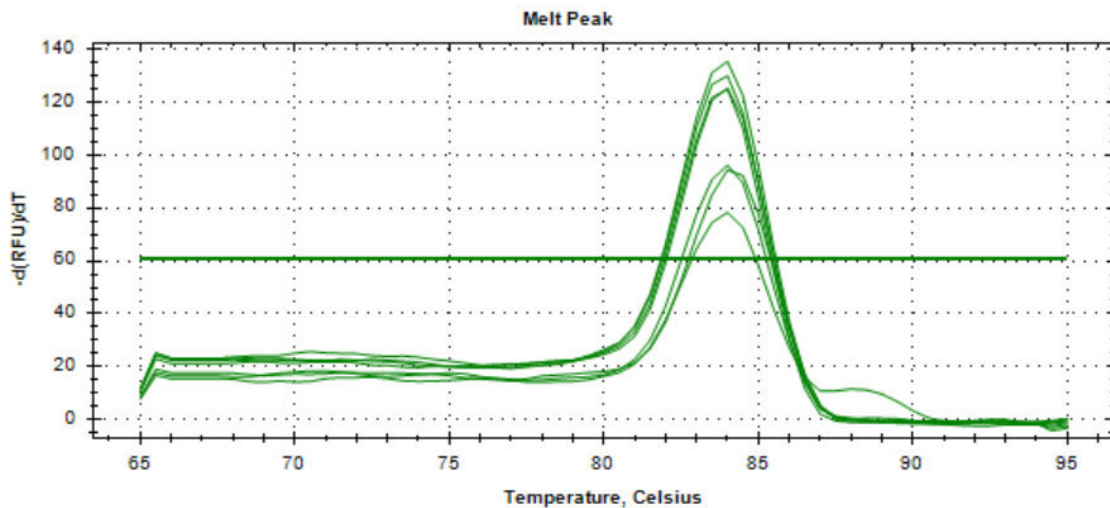
Esta investigación propuso el punto de corte  $C_q = 35$ . Las muestras cuyas curvas de amplificación obtuvieron valores de  $C_q$  mayores al punto de corte ( $>35$ ) se consideraron como “No Detección” (ND).

Marcador molecular 5.8S ARNr de *Echinococcus granulosus*

En la Tabla 21, se muestran las características de las curvas de amplificación. En la Figura 6, se observan los picos de *Melting* del producto obtenido para este marcador.

**Tabla 21. Características de las curvas de amplificación para el marcador 5.8S ARNr de *Echinococcus granulosus*.**

N° de Paciente	Cq Promedio	Desviación Estándar
Paciente 1	ND	-
Paciente 2	32.71	0.306
Paciente 3	ND	-
Paciente 4	19.24	0.440
Control negativo	ND	-



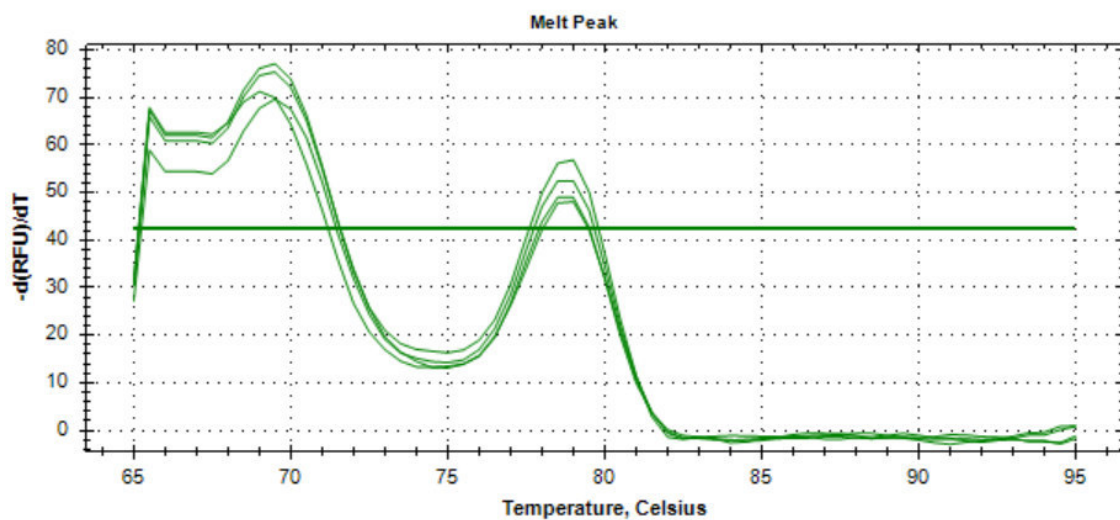
**Figura 6. Curvas de *Melting* para el marcador 5.8S ARNr de *Echinococcus granulosus*. La temperatura del pico de *Melting* obtenida para este marcador fue de 84°C.**

Marcador molecular 12S ARNr de *Echinococcus granulosus*

En la Tabla 22, se muestran las características de las curvas de amplificación. En la Figura 7, se observan los picos de *Melting* del producto obtenido para este marcador.

**Tabla 22. Características de las curvas de amplificación para el marcador 12S ARNr de *Echinococcus granulosus*.**

N° de Paciente	Cq Promedio	Desviación Estándar
Paciente 1	ND	-
Paciente 2	ND	-
Paciente 3	ND	-
Paciente 4	29.16	0.087
Control negativo	ND	-



**Figura 7. Curvas de *Melting* para el marcador 12S ARNr de *Echinococcus granulosus*.** La temperatura del pico de *Melting* obtenida para este marcador fue de 79°C. Los picos observados en el rango de 65°C a 70°C corresponden a inespecificidades.

**V.2. Detección de miRNAs de *Echinococcus granulosus* en muestras de líquido hidatídico**

Se analizaron las muestras de ARN obtenidas previamente (ver sección V.1.1).

### V.2.1. Retrotranscripción tallo-bucle con PCR en tiempo real cuantitativa (*stem-loop* RT-qPCR)

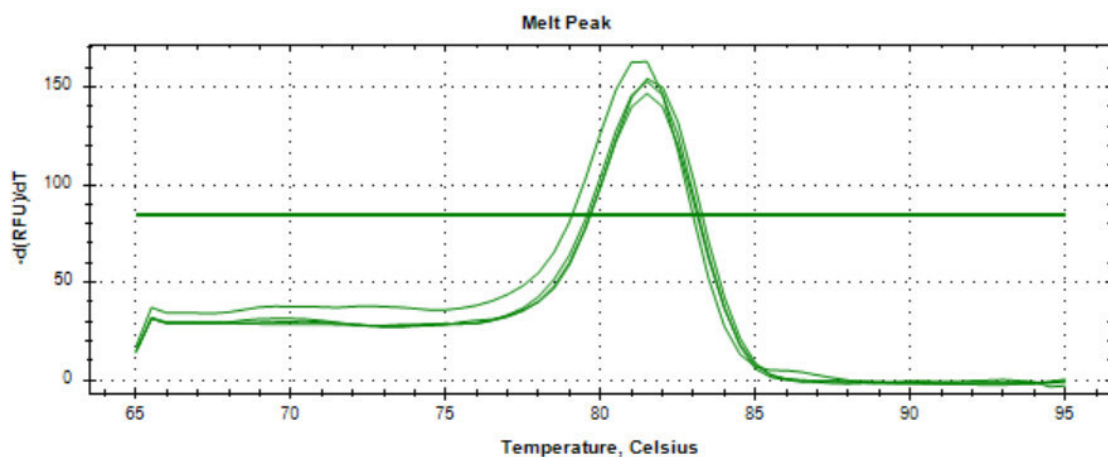
Esta investigación propuso el punto de corte  $Cq = 35$ . Las muestras cuyas curvas de amplificación obtuvieron valores de  $Cq$  mayores al punto de corte ( $>35$ ) se consideraron como “No Detección” (ND).

#### miRNA egr-mir-9 de *Echinococcus granulosus*

En la Tabla 23, se muestran las características de las curvas de amplificación. En la Figura 8, se observan los picos de *Melting* del producto obtenido para este miRNA.

**Tabla 23. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-9 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico.**

N° de Paciente	Cq Promedio	Cq Desviación Estándar
Paciente 1	ND	-
Paciente 2	ND	-
Paciente 3	ND	-
Paciente 4	29.81	0.291
Control negativo	ND	-



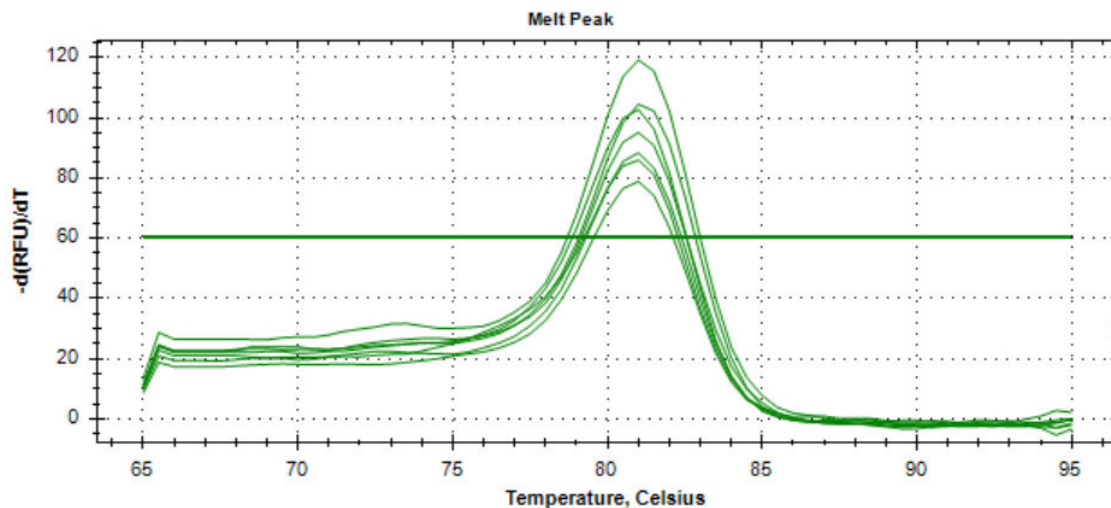
**Figura 8. Curvas de *Melting* para el miRNA egr-mir-9 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico. La temperatura del pico de *Melting* obtenida para este miRNA fue de 81.5°C.**

miRNA egr-mir-4988 de *Echinococcus granulosus*

En la Tabla 24, se muestran las características de las curvas de amplificación. En la Figura 9, se observan los picos de *Melting* del producto obtenido para este miRNA.

**Tabla 24. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-4988 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico.**

N° de Paciente	Cq Promedio	Desviación Estándar
Paciente 1	ND	-
Paciente 2	31.40	0.102
Paciente 3	ND	-
Paciente 4	31.72	0.483
Control negativo	ND	-



**Figura 9. Curvas de *Melting* para el miRNA egr-mir-4988 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico. La temperatura del pico de *Melting* obtenida para este miRNA fue de 81°C.**

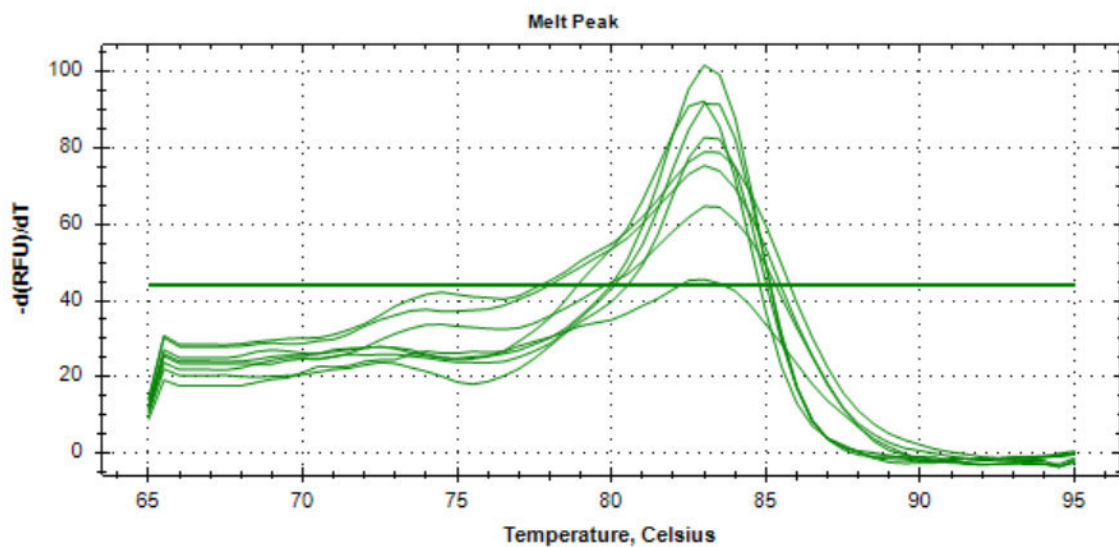


miRNA egr-mir-133 de *Echinococcus granulosus*

En la Tabla 25, se muestran las características de las curvas de amplificación. En la Figura 10, se observan los picos de *Melting* del producto obtenido para este miRNA.

**Tabla 25. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-133 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico.**

N° de Paciente	Cq Promedio	Desviación Estándar
Paciente 1	29.16	0.257
Paciente 2	ND	-
Paciente 3	ND	-
Paciente 4	34.83	0.134
Control negativo	ND	-



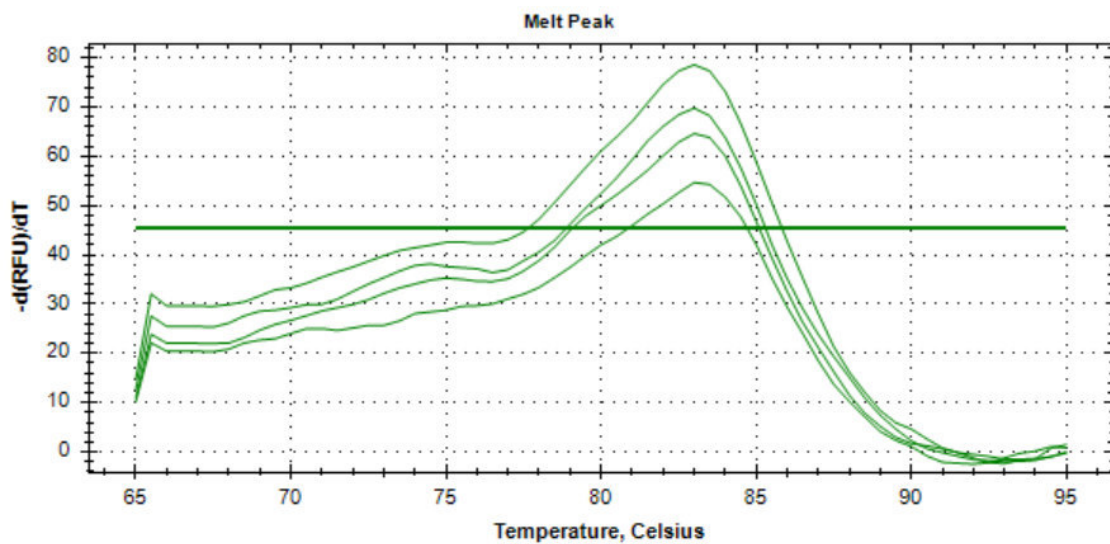
**Figura 10. Curvas de *Melting* para el miRNA egr-mir-133 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico. La temperatura del pico de *Melting* obtenida para este miRNA fue de 83°C.**

miRNA egr-mir-1992 de *Echinococcus granulosus*

En la Tabla 26, se muestran las características de las curvas de amplificación. En la Figura 11, se observan los picos de *Melting* del producto obtenido para este miRNA.

**Tabla 26. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-1992 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico.**

N° de Paciente	Cq Promedio	Desviación Estándar
Paciente 1	ND	-
Paciente 2	ND	-
Paciente 3	ND	-
Paciente 4	26.58	0.391
Control negativo	ND	-



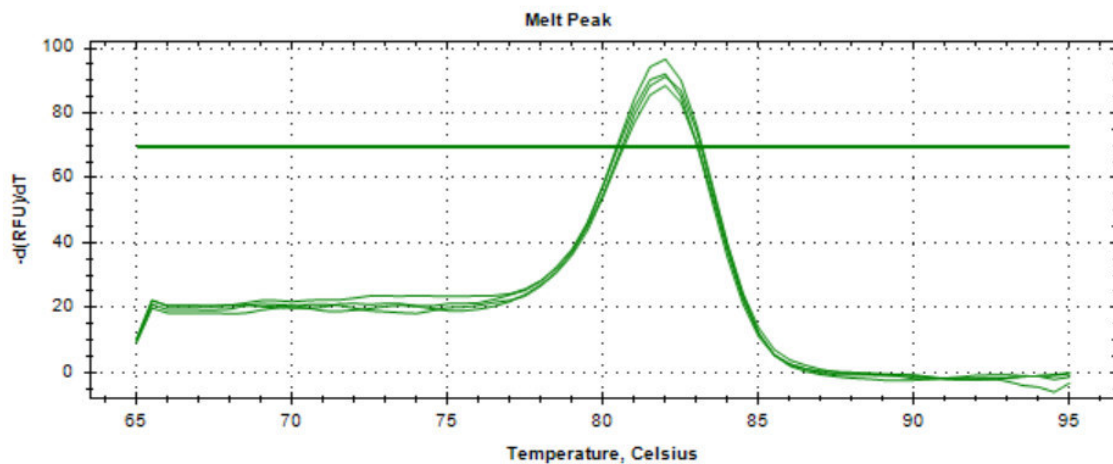
**Figura 11. Curvas de *Melting* para el miRNA egr-mir-1992 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico. La temperatura del pico de *Melting* obtenida para este miRNA fue de 83°C.**

miRNA egr-mir-bantam de *Echinococcus granulosus*

En la Tabla 27, se muestran las características de las curvas de amplificación. En la Figura 12, se observan los picos de *Melting* del producto obtenido para este miRNA.

**Tabla 27. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-bantam de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico.**

N° de Paciente	Cq Promedio	Desviación Estándar
Paciente 1	ND	-
Paciente 2	ND	-
Paciente 3	ND	-
Paciente 4	31.96	0.285
Control negativo	ND	-



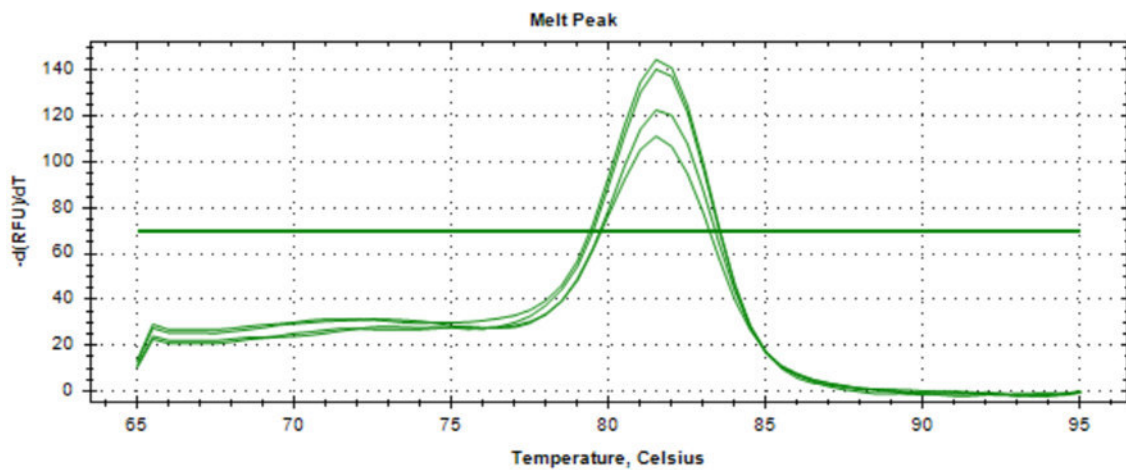
**Figura 12. Curvas de *Melting* para el miRNA egr-mir-bantam de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico. La temperatura del pico de *Melting* obtenida para este miRNA fue de 82°C.**

miRNA egr-mir-219 de *Echinococcus granulosus*

En la Tabla 28, se muestran las características de las curvas de amplificación. En la Figura 13, se observan los picos de *Melting* del producto obtenido para este miRNA.

**Tabla 28. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-219 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico.**

N° de Paciente	Cq Promedio	Desviación Estándar
Paciente 1	ND	-
Paciente 2	ND	-
Paciente 3	ND	-
Paciente 4	27.15	0.311
Control negativo	ND	-



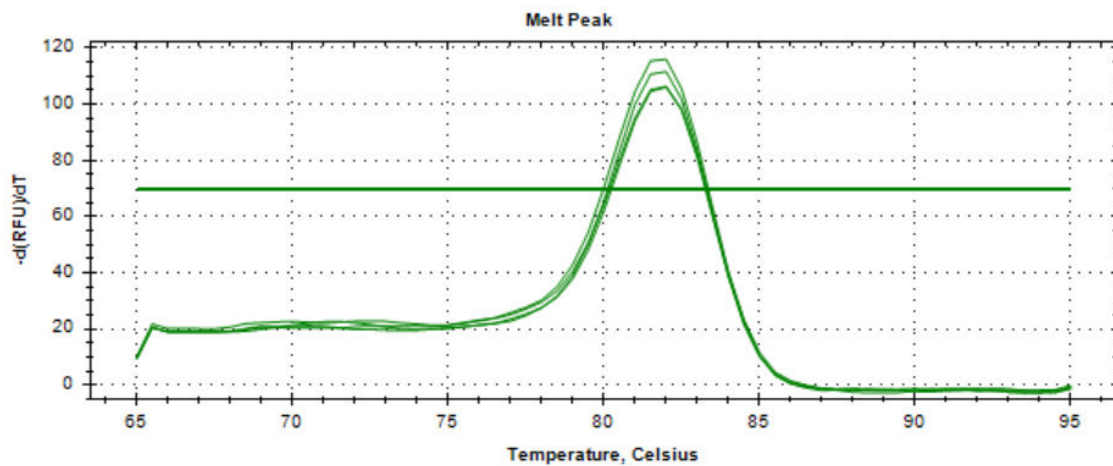
**Figura 13. Curvas de *Melting* para el miRNA egr-mir-219 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico. La temperatura del pico de *Melting* obtenida para este miRNA fue de 81.5°C.**

miRNA egr-mir-61 de *Echinococcus granulosus*

En la Tabla 29, se muestran las características de las curvas de amplificación. En la Figura 14, se observan los picos de *Melting* del producto obtenido para este miRNA.

**Tabla 29. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-61 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico.**

N° de Paciente	Cq Promedio	Desviación Estándar
Paciente 1	ND	-
Paciente 2	ND	-
Paciente 3	ND	-
Paciente 4	28.32	0.150
Control negativo	ND	-



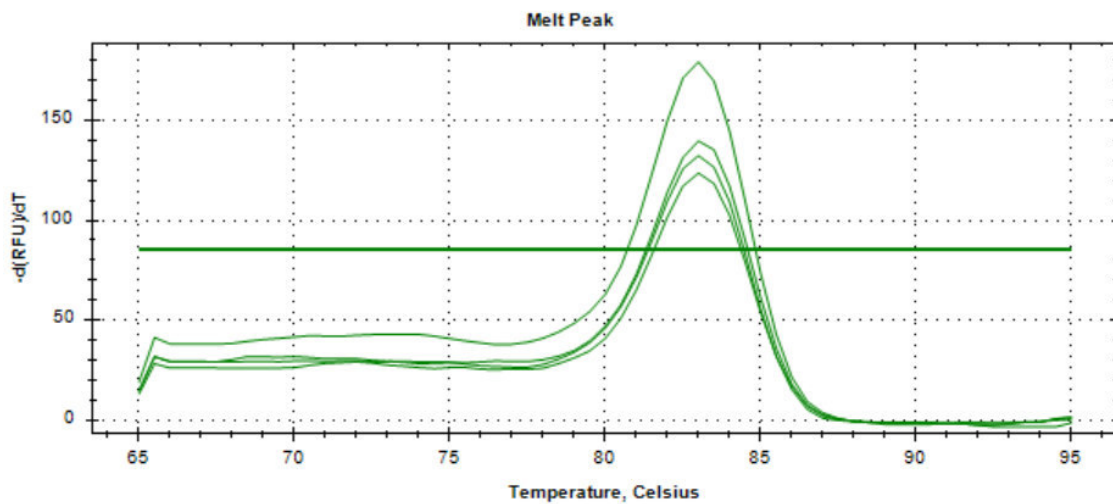
**Figura 14. Curvas de *Melting* para el miRNA egr-mir-61 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico. La temperatura del pico de *Melting* obtenida para este miRNA fue de 82°C.**

miRNA egr-mir-10 de *Echinococcus granulosus*

En la Tabla 30, se muestran las características de las curvas de amplificación. En la Figura 15, se observan los picos de *Melting* del producto obtenido para este miRNA.

**Tabla 30. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-10 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico.**

N° de Paciente	Cq Promedio	Desviación Estándar
Paciente 1	ND	-
Paciente 2	ND	-
Paciente 3	ND	-
Paciente 4	26.27	0.128
Control negativo	ND	-



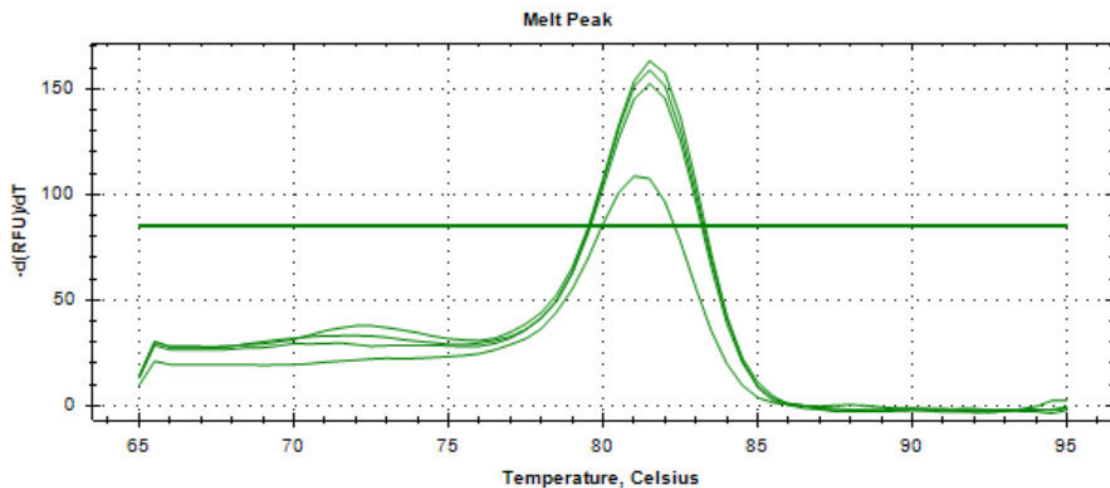
**Figura 15. Curvas de *Melting* para el miRNA egr-mir-10 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico. La temperatura del pico de *Melting* obtenida para este miRNA fue de 83°C.**

miRNA egr-let-7 de *Echinococcus granulosus*

En la Tabla 31, se muestran las características de las curvas de amplificación. En la Figura 16, se observan los picos de *Melting* del producto obtenido para este miRNA.

**Tabla 31. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-let-7 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico.**

N° de Paciente	Cq Promedio	Desviación Estándar
Paciente 1	ND	-
Paciente 2	ND	-
Paciente 3	ND	-
Paciente 4	27.29	0.314
Control negativo	ND	-



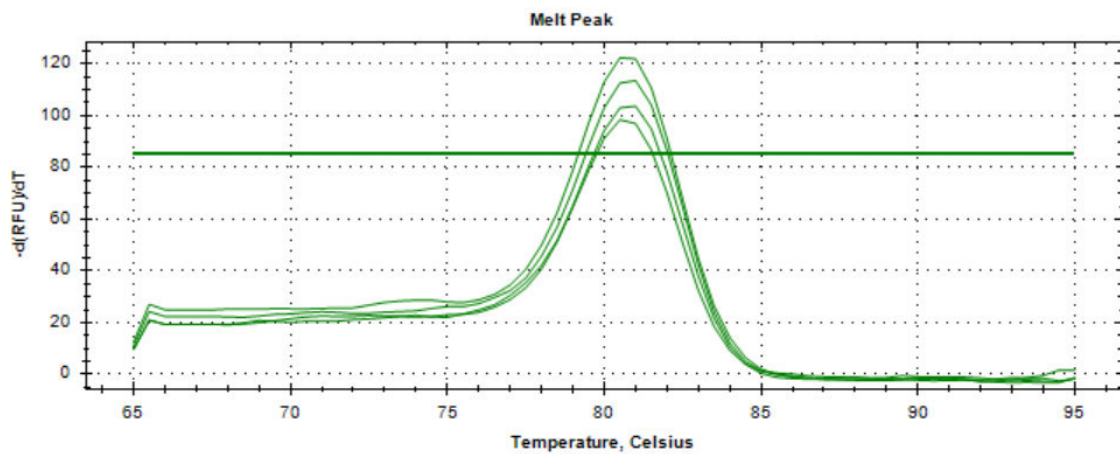
**Figura 16. Curvas de *Melting* para el miRNA egr-let-7 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico. La temperatura del pico de *Melting* obtenida para este miRNA fue de 81.5°C.**

miRNA egr-mir-1 de *Echinococcus granulosus*

En la Tabla 32, se muestran las características de las curvas de amplificación. En la Figura 17, se observan los picos de *Melting* del producto obtenido para este miRNA.

**Tabla 32. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-1 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico.**

N° de Paciente	Cq Promedio	Desviación Estándar
Paciente 1	ND	-
Paciente 2	ND	-
Paciente 3	ND	-
Paciente 4	28.86	0.366
Control negativo	ND	-



**Figura 17. Curvas de *Melting* para el miRNA egr-mir-1 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico. La temperatura del pico de *Melting* obtenida para este miRNA fue de 80.5°C.**

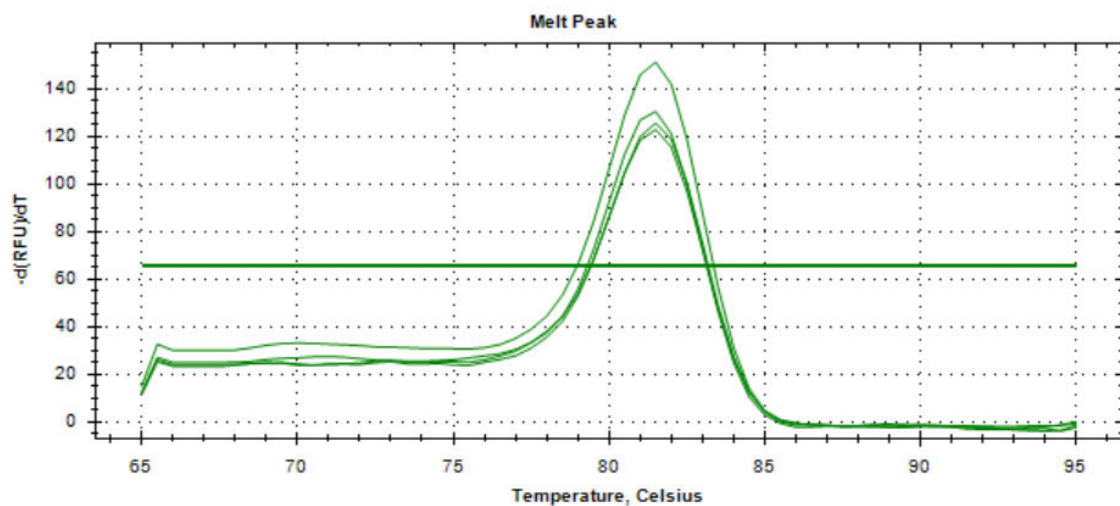


miRNA egr-mir-71 de *Echinococcus granulosus*

En la Tabla 33, se muestran las características de las curvas de amplificación. En la Figura 18, se observan los picos de *Melting* del producto obtenido para este miRNA.

**Tabla 33. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-71 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico.**

N° de Paciente	Cq Promedio	Desviación Estándar
Paciente 1	ND	-
Paciente 2	ND	-
Paciente 3	ND	-
Paciente 4	26.30	0.037
Control negativo	ND	-



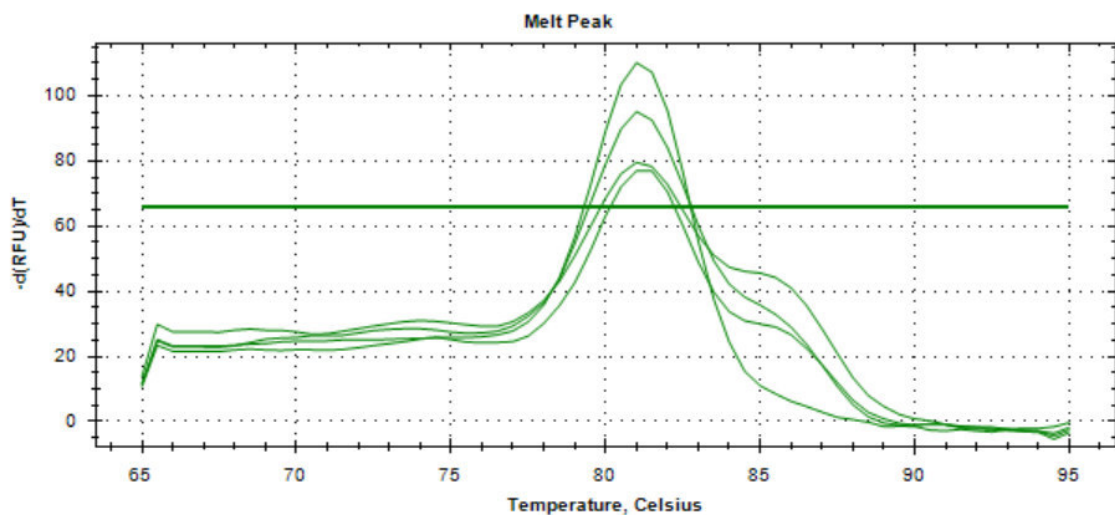
**Figura 18. Curvas de *Melting* para el miRNA egr-mir-71 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico. La temperatura del pico de *Melting* obtenida para este miRNA fue de 81.5°C.**

miRNA egr-mir-7 de *Echinococcus granulosus*

En la Tabla 34, se muestran las características de las curvas de amplificación. En la Figura 19, se observan los picos de *Melting* del producto obtenido para este miRNA.

**Tabla 34. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-7 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico.**

N° de Paciente	Cq Promedio	Desviación Estándar
Paciente 1	ND	-
Paciente 2	ND	-
Paciente 3	ND	-
Paciente 4	34.51	0.292
Control negativo	ND	-



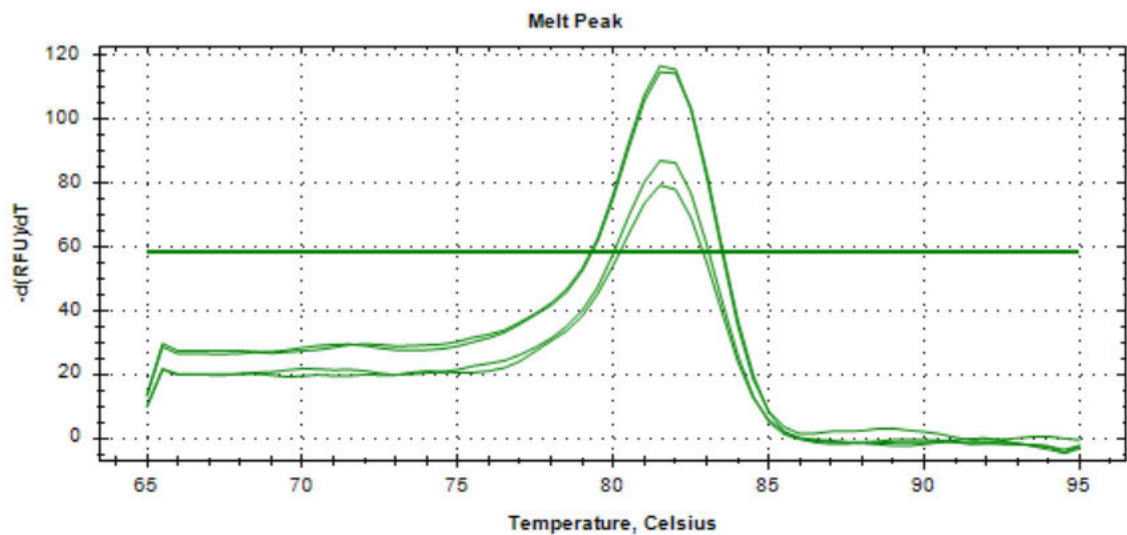
**Figura 19. Curvas de *Melting* para el miRNA egr-mir-7 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico. La temperatura del pico de *Melting* obtenida para este miRNA fue de 81°C.**

miRNA egr-new-15 de *Echinococcus granulosus*

En la Tabla 35, se muestran las características de las curvas de amplificación. En la Figura 20, se observan los picos de *Melting* del producto obtenido para este miRNA.

**Tabla 35. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-new-15 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico.**

N° de Paciente	Cq Promedio	Desviación Estándar
Paciente 1	ND	-
Paciente 2	ND	-
Paciente 3	ND	-
Paciente 4	30.74	0.359
Control negativo	ND	-



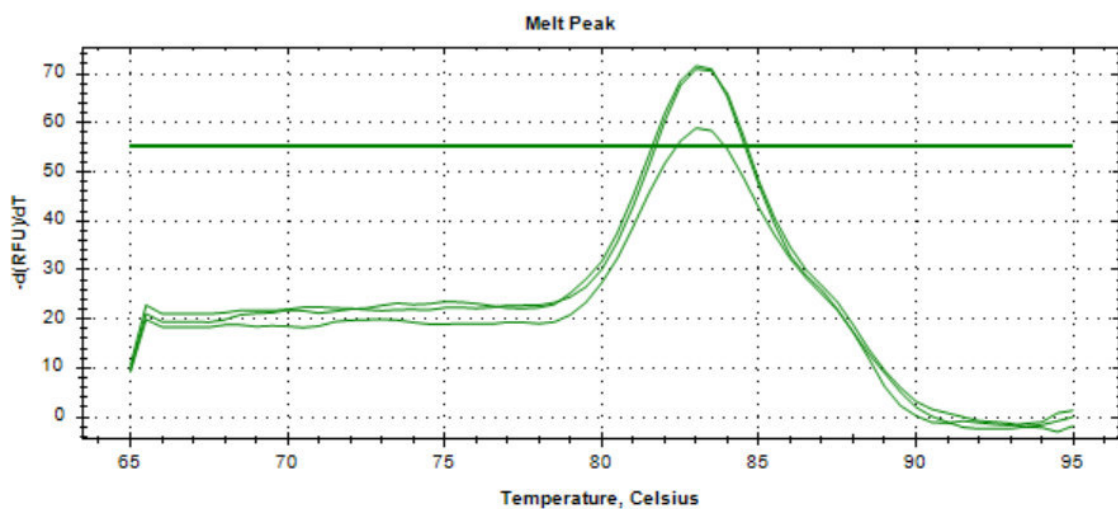
**Figura 20. Curvas de *Melting* para el miRNA egr-new-15 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico. La temperatura del pico de *Melting* obtenida para este miRNA fue de 81.5°C.**

miRNA egr-new-22 de *Echinococcus granulosus*

En la Tabla 36, se muestran las características de las curvas de amplificación. En la Figura 21, se observan los picos de *Melting* del producto obtenido para este miRNA.

**Tabla 36. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-new-22 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico.**

N° de Paciente	Cq Promedio	Desviación Estándar
Paciente 1	ND	-
Paciente 2	ND	-
Paciente 3	ND	-
Paciente 4	34.79	0.087
Control negativo	ND	-



**Figura 21. Curvas de *Melting* para el miRNA egr-new-22 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico. La temperatura del pico de *Melting* obtenida para este miRNA fue de 83°C.**

miRNA egr-new-87\* de *Echinococcus granulosus*

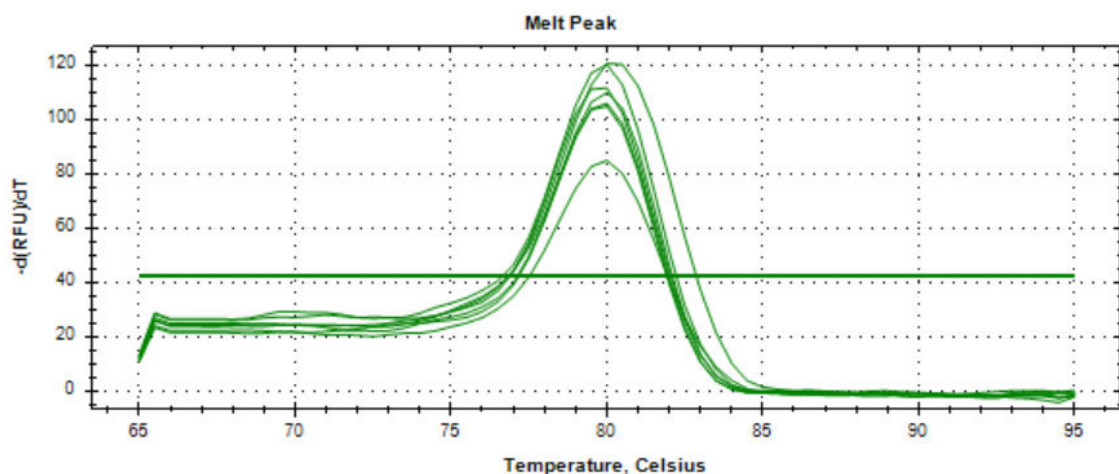
No se reportaron curvas de amplificación ni curvas de *Melting* correspondientes al producto obtenido de la amplificación de este miRNA.

miRNA egr-new-17\* de *Echinococcus granulosus*

En la Tabla 37, se muestran las características de las curvas de amplificación. En la Figura 22, se observan los picos de *Melting* del producto obtenido para este miRNA.

**Tabla 37. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-new-17\* de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico.**

N° de Paciente	Cq Promedio	Desviación Estándar
Paciente 1	ND	-
Paciente 2	33.77	0.348
Paciente 3	ND	-
Paciente 4	33.14	0.251
Control negativo	ND	-



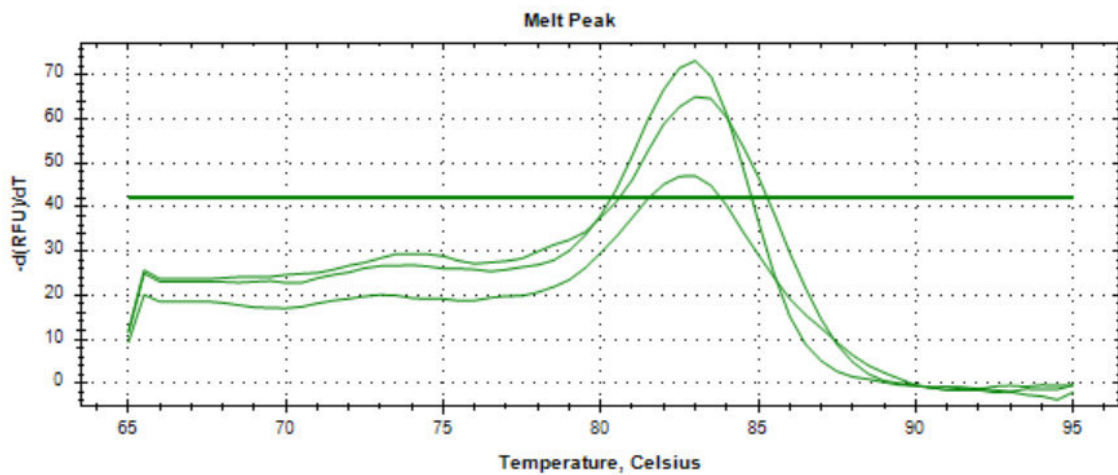
**Figura 22. Curvas de *Melting* para el miRNA egr-new-17\* de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico. La temperatura del pico de *Melting* obtenida para este miRNA fue de 80°C.**

miRNA egr-new-74 de *Echinococcus granulosus*

En la Tabla 38, se muestran las características de las curvas de amplificación. En la Figura 23, se observan los picos de *Melting* del producto obtenido para este miRNA.

**Tabla 38. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-new-74 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico.**

N° de Paciente	Cq Promedio	Desviación Estándar
Paciente 1	30.47	0.245
Paciente 2	ND	-
Paciente 3	ND	-
Paciente 4	ND	-
Control negativo	ND	-



**Figura 23. Curvas de *Melting* para el miRNA egr-new-74 de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico. La temperatura del pico de *Melting* obtenida para este miRNA fue de 83°C.**

### V.3. Evaluación de miRNAs de *Echinococcus granulosus* en muestras de plasma de sanguíneo de pacientes previo y posterior al tratamiento farmacológico y quirúrgico

#### V.3.1. Aislamiento de ARN a partir de plasma sanguíneo de pacientes con hidatidosis hepática

Se aislaron 25 muestras de ARN a partir de plasma sanguíneo de pacientes con hidatidosis hepática. Las medidas obtenidas de la cuantificación de ARN por espectrofotometría se detallan en la Tabla 39.

**Tabla 39. Características de las muestras de ARN aisladas a partir de muestras de plasma sanguíneo.**

Tipo de tratamiento	N° de Paciente	Antes del tratamiento			Después del tratamiento		
		Concentración (ng/μL)	A260/A280	A260/A230	Concentración (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
Tratamiento farmacológico	Paciente 1	424.9	1.51	0.41	431.1	1.29	0.43
	Paciente 2	602.1	1.11	0.31	587.2	1.01	0.32
	Paciente 3	553.5	1.05	0.41	641.2	1.04	0.44
	Paciente 4	254.1	1.55	0.27	206.5	1.50	0.25
	Paciente 5	753.6	1.13	0.49	912.6	1.20	0.33
	Paciente 6	665.7	1.10	0.44	664.5	1.15	0.28
	Paciente 7	327.7	1.60	0.33	204.9	1.46	0.27
	Paciente 8	504.2	1.42	0.49	280.6	1.24	0.33
Tratamiento quirúrgico	Paciente 9	572.9	1.25	0.30	-	-	-
	Paciente 10	752.6	1.19	0.32	593.0	1.07	0.43
	Paciente 11	550.0	1.06	0.44	572.3	1.05	0.32
	Paciente 12	728.6	1.22	0.30	642.8	1.20	0.29
	Paciente 13	536.0	1.28	0.27	469.6	1.58	0.46

### **V.3.2. Detección de miRNAs de *Echinococcus granulosus* en plasma sanguíneo de pacientes con hidatidosis hepática por stem-loop RT-qPCR**

Esta investigación propuso el punto de corte Cq = 35. Las muestras cuyas curvas de amplificación obtuvieron valores de Cq mayores al punto de corte (>35) se consideraron como “No Detección” (ND). Se usó la muestra del “Paciente 4” de líquido hidatídico como control positivo de reacción, ya que, en dicha muestra, se detectaron los marcadores mitocondriales de ARNr 5.8S y 12S de *E. granulosus*.

#### miRNA egr-let-7 de *Echinococcus granulosus*

No se reportaron curvas de amplificación ni curvas de *Melting* correspondientes al producto obtenido de la amplificación de este miRNA.

#### miRNA egr-mir-9 de *Echinococcus granulosus*

No se reportaron curvas de amplificación ni curvas de *Melting* correspondientes al producto obtenido de la amplificación de este miRNA.

#### miRNA egr-mir-71 de *Echinococcus granulosus*

No se reportaron curvas de amplificación ni curvas de *Melting* correspondientes al producto obtenido de la amplificación de este miRNA.

#### miRNA egr-new-87\* de *Echinococcus granulosus*

No se reportaron curvas de amplificación ni curvas de *Melting* correspondientes al producto obtenido de la amplificación de este miRNA.

#### miRNA egr-new-17\* de *Echinococcus granulosus*

No se reportaron curvas de amplificación ni curvas de *Melting* correspondientes al producto obtenido de la amplificación de este miRNA.

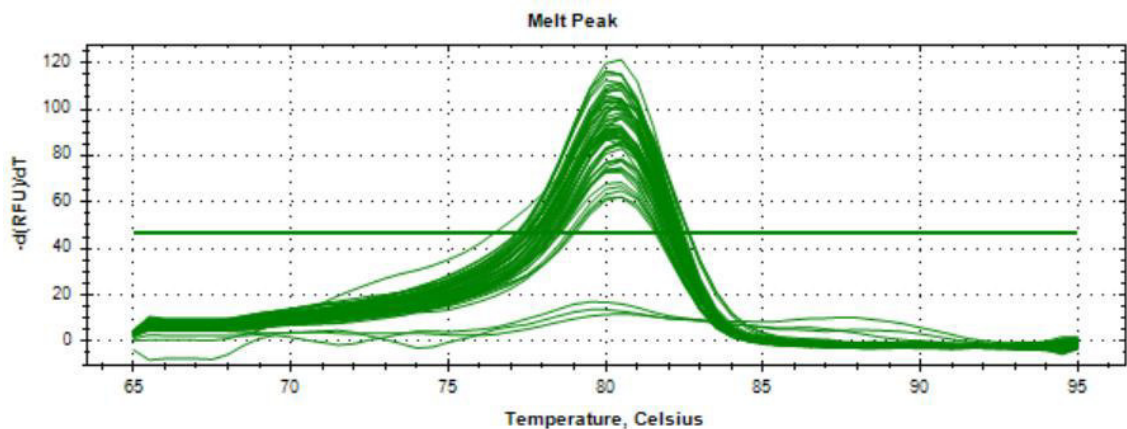


miRNA egr-mir-1 de *Echinococcus granulosus*

En la Tabla 40, se muestran las características de las curvas de amplificación. En la Figura 24, se observan los picos de *Melting* del producto obtenido para este miRNA.

**Tabla 40. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-1 de *Echinococcus granulosus* en plasma sanguíneo. NE: No Evaluado.**

Tipo de tratamiento	Nº de Paciente	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
		Cq promedio	Desviación estándar	Cq Promedio	Desviación estándar
Tratamiento farmacológico	Paciente 1	26.93	0.177	26.48	0.255
	Paciente 2	26.57	0.135	26.88	0.199
	Paciente 3	26.89	0.077	26.51	0.059
	Paciente 4	26.61	0.230	26.70	0.110
	Paciente 5	26.46	0.223	26.85	0.112
	Paciente 6	27.02	0.317	26.99	0.106
	Paciente 7	26.35	0.249	26.28	0.264
	Paciente 8	27.00	0.139	26.71	0.481
Tratamiento quirúrgico	Paciente 9	26.96	0.402	NE	-
	Paciente 10	26.55	0.052	27.05	0.125
	Paciente 11	27.07	0.471	26.89	0.287
	Paciente 12	27.43	0.277	28.05	0.249
	Paciente 13	26.84	0.100	27.25	0.183
<b>Controles de la PCR</b>					
<b>Control</b>		<b>Cq promedio</b>		<b>Desviación estándar</b>	
<b>Control positivo</b>		26.34		0.185	
<b>Control negativo</b>		ND		-	



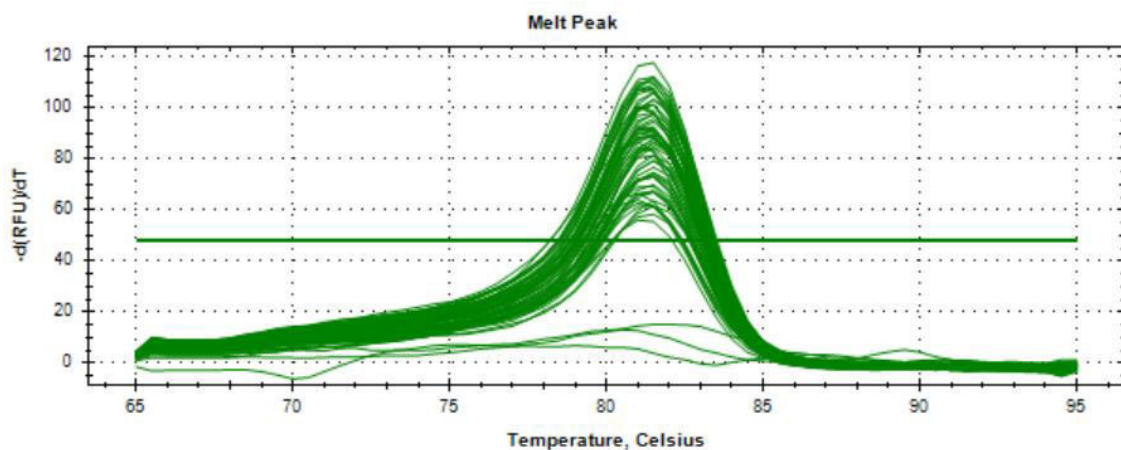
**Figura 24. Curvas de *Melting* para el miRNA egr-mir-1 de *Echinococcus granulosus* en plasma sanguíneo. La temperatura del pico de *Melting* obtenida para este marcador fue de  $80.5^{\circ}\text{C}$ .**

miRNA egr-mir-219 de *Echinococcus granulosus*

En la Tabla 41, se muestran las características de las curvas de amplificación. En la Figura 25, se observan los picos de *Melting* del producto obtenido para este miRNA.

**Tabla 41. Características de las curvas de amplificación para el miRNA egr-mir-219 de *Echinococcus granulosus* en plasma sanguíneo. NE: No Evaluado.**

Tipo de tratamiento	N° de Paciente	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
		Cq promedio	Desviación estándar	Cq Promedio	Desviación estándar
Tratamiento farmacológico	Paciente 1	26.03	0.005	26.26	0.327
	Paciente 2	26.52	0.053	26.69	0.355
	Paciente 3	26.94	0.186	28.13	1.918
	Paciente 4	26.44	0.154	27.23	0.207
	Paciente 5	26.20	0.117	26.91	0.063
	Paciente 6	27.24	0.009	27.54	0.230
	Paciente 7	26.59	0.272	27.40	0.159
	Paciente 8	26.90	0.336	27.52	0.262
Tratamiento quirúrgico	Paciente 9	26.91	0.144	NE	-
	Paciente 10	27.22	0.090	27.59	0.370
	Paciente 11	27.07	0.401	27.50	0.103
	Paciente 12	27.41	0.378	27.52	0.388
	Paciente 13	27.70	0.180	28.05	0.088
<b>Controles de la PCR</b>					
<b>Control</b>		<b>Cq promedio</b>		<b>Desviación estándar</b>	
<b>Control positivo</b>		27.18		0.053	
<b>Control negativo</b>		ND		-	



**Figura 25. Curvas de *Melting* para el miRNA egr-mir-219 de *Echinococcus granulosus* en plasma sanguíneo. La temperatura del pico de *Melting* obtenida para este marcador fue de 81.5°C.**

### V.3.3. Expresión de los miRNAs egr-mir-1 y egr-mir-219 previo y posterior al tratamiento farmacológico y quirúrgico

En la Figura 26, se muestran los gráficos de la expresión de los miRNAs en los pacientes con hidatidosis hepática. No se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre la expresión de los miRNAs previo y posterior al tratamiento farmacológico (azul) y quirúrgico (naranja) ( $p > 0.05$ ).

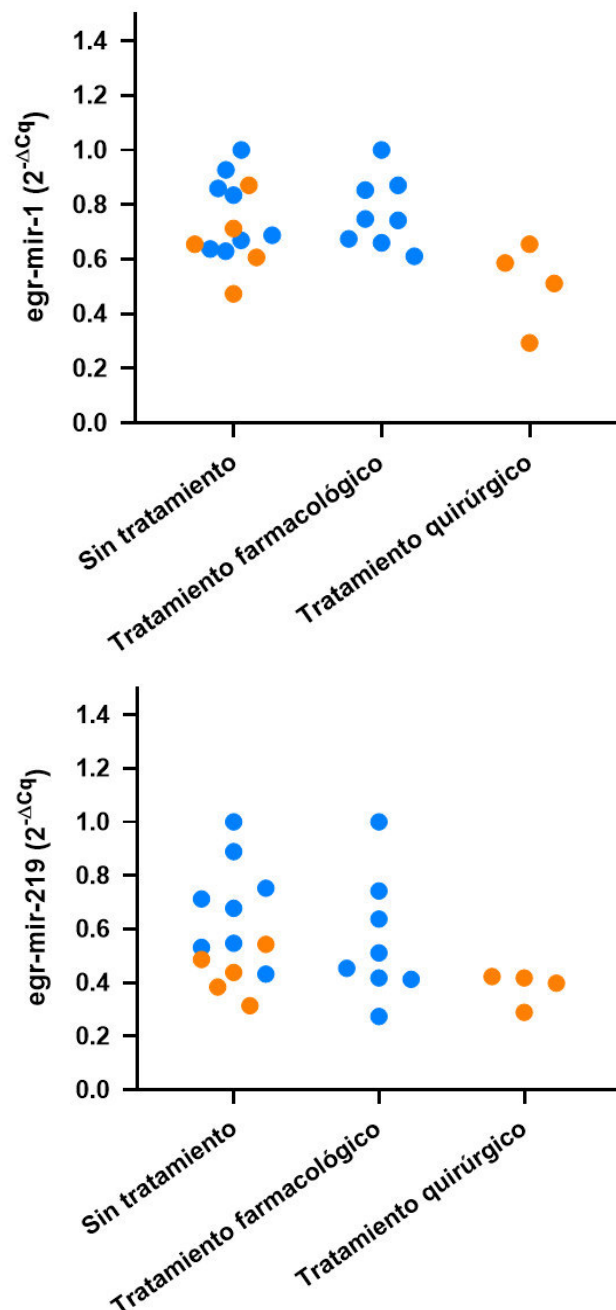


Figura 26. Expresión de los miRNAs egr-mir-1 y egr-mir-219 en pacientes con hidatidosis hepática previo y posterior al tratamiento farmacológico y quirúrgico.

## VI. DISCUSIÓN

El aislamiento de ARN a partir de líquidos biológicos ha representado un desafío para la investigación de miRNAs en enfermedades infecciosas, en gran parte, por su sensibilidad a la degradación. En este estudio, se logró aislar ARN a partir de plasma sanguíneo y líquido hidatídico mediante el reactivo TRIzol, el cual ha sido usado eficazmente como punto de partida para el análisis de miRNAs (Gautam et al., 2016; Heidary & Pahlevan Kakhki, 2014; Trakunram et al., 2019).

En la presente investigación, se detectó el marcador mitocondrial ARNr 5.8S de *E. granulosus* en dos muestras de líquido hidatídico de pacientes con hidatidosis hepática, mientras que el marcador mitocondrial ARNr 12S solo se detectó en una muestra. Esto sugeriría que el ARNr 5.8S es un mejor marcador para la identificación de *E. granulosus* en las muestras de líquido hidatídico evaluadas. De hecho, este marcador fue utilizado con éxito en un estudio previo como control interno para la evaluación de miRNAs de *E. granulosus* en el parásito en su estadio de la larva adulta (Bai et al., 2014).

Además, se detectaron en total 16 miRNAs (egr-mir-9, egr-mir-4988, egr-mir-133, egr-mir-1992, egr-mir-bantam, egr-mir-219, egr-mir-61, egr-mir-10, egr-let-7, egr-mir-1, egr-mir-71, egr-mir-7, egr-new15, egr-new-22, egr-new-17\* y egr-new-74) de *E. granulosus* que se estarían expresando en muestras de líquido hidatídico de quistes de pacientes con hidatidosis hepática. Este hallazgo ha sido congruente con el estudio de Zhang et al. (2020), en el cual, se identificó, por secuenciación de alto rendimiento, miRNAs del parásito en líquido hidatídico de quistes de ovejas con hidatidosis hepática, entre ellos, egr-mir-bantam, egr-let-7, egr-mir-10, egr-mir-61, egr-mir-7, egr-mir-71, egr-mir-9, egr-mir-133 y egr-mir-1. Además, Zhang et al. (2020) detectó mediante métodos moleculares a los miRNAs egr-mir-bantam, egr-let-7, egr-mir-10, egr-mir-61 y egr-mir-71 en el líquido hidatídico de ovejas. En esta tesis, estos miRNAs fueron detectados también en humanos, destacando este hallazgo en diferentes especies de hospederos. Por otra parte, el estudio de Bai et al. (2014) identificó por técnicas de secuenciación a los 17 miRNAs analizados en esta tesis, y validó por *stem-loop* RT-qPCR a 15 de ellos, en muestras de larva de *E. granulosus* extraída de caninos infectados, en membranas de quiste hidatídico de ovejas infectadas y en protoscolex recuperados por aspiración quística. No obstante, los miRNAs egr-mir-71 y egr-mir-1, que fueron los más abundantes en términos de lecturas de secuenciación, no fueron validados (Bai et al., 2014), por lo

que, los resultados de esta tesis de investigación resultan complementarios. Esta es la primera investigación que diseña originalmente y valida *primers* para la detección de los miRNAs egr-mir-71 y egr-mir-1 por la metodología *stem-loop* RT-qPCR. De hecho, los resultados indicaron que estos *primers* son adecuados para futuros ensayos de *stem-loop* RT-qPCR. Asimismo, esta es la primera investigación que caracteriza miRNAs conservados y nuevos de *E. granulosus* en muestras de líquido hidatídico humano.

En esta investigación, se detectaron 12 miRNAs (egr-mir-9, egr-mir-1992, egr-mir-bantam, egr-mir-219, egr-mir-61, egr-mir-10, egr-let-7, egr-mir-1, egr-mir-71, egr-mir-7, egr-new15 y egr-new-22) de *E. granulosus* que se estarían expresando exclusivamente en el líquido hidatídico de un quiste de estadio CE2, mientras que 1 miRNA (egr-new-74) se estaría expresando exclusivamente en el líquido hidatídico de un quiste de estadio CE3. Es importante destacar que los estadios de los quistes hidatídicos (CE1, CE2, CE3, CE4 y CE5) se caracterizan por una morfología específica con fases de actividad. El estadio CE2 se considera como fase activa, mientras que el estadio CE3 se considera una fase transitoria en el ciclo del parásito, ubicado entre la fase activa y la fase inactiva (Almulhim & John, 2023). Investigaciones previas han reportado perfiles de expresión de miRNAs de *E. granulosus* en diferentes etapas de su ciclo de vida, incluyendo quistes hidatídicos y protoscólices, sugiriendo que los miRNAs diferencialmente expresados en determinadas etapas cumplirían funciones importantes en el desarrollo del parásito (Bai et al., 2014; Cucher et al., 2011; Faridi et al., 2021). La función reguladora de los miRNAs de *E. granulosus* ha sido propuesta por estudios basados en ontología génica. Se ha reportado más de 800 dianas que estarían involucradas en procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares del parásito (Faridi et al., 2021). Los principales procesos biológicos reportados son la transcripción de ARNm, el transporte de proteínas, la diferenciación celular, la determinación de vida adulta y la respuesta a nutrientes de *E. granulosus*. Esto sería determinante para el desarrollo del parásito y la adaptación al ambiente del huésped (Bai et al., 2014). Por lo tanto, los miRNAs detectados en la fase activa y la fase transitoria podrían ser fundamentales para comprender mejor la biología del parásito y la transición entre estadios. En el futuro, podrían utilizarse para mejorar el monitoreo de pacientes con hidatidosis hepática y, potencialmente, podrían considerarse como blancos terapéuticos para inducir la inactividad del parásito, tal como se planteado en otras enfermedades

infecciosas y no infecciosas (Condrat et al., 2020; Drury et al., 2017; Loureiro et al., 2020; Ochiya & Takahashi, 2018).

Los estudios de miRNAs de *E. granulosus* en el torrente sanguíneo de pacientes infectados son muy limitados. En la presente investigación, se detectaron 2 miRNAs de *E. granulosus* (egr-mir-1 y egr-mir-219) que se estarían expresando en el plasma sanguíneo de pacientes con hidatidosis hepática. Además, se encontró que estos dos miRNAs no se encuentran diferencialmente expresados en pacientes con hidatidosis hepática antes y después del tratamiento farmacológico y quirúrgico. Esto sugeriría que, después de 1 mes de tratamiento con el fármaco albendazol (400 mg dos veces al día) y después de 24 horas posteriores a la cirugía de extracción de quiste hidatídico, la expresión de estos miRNAs se mantendría sin cambios significativos en los pacientes evaluados.

Solo un estudio ha reportado la expresión de miRNAs (egr-let-7 y egr-mir-61) de *E. granulosus* después de la exposición al fármaco albendazol, en dicho análisis, se reportó que los miRNAs se subexpresan ( $p < 0.05$ ) o sobreexpresan ( $p < 0.05$ ) en las paredes del quiste y en los protoscolex cuando estos son sometidos a determinadas concentraciones de albendazol sulfóxido. Sin embargo, bajo otras concentraciones (mayores o menores) del fármaco y en otros periodos no se evidenció una expresión diferencial en ninguno de los dos miRNAs, además, el estudio se desarrolló *in vitro*, no analizó otros miRNAs y no fue evaluado en hospederos infectados (Mortezaei et al., 2019). Si bien el tratamiento farmacológico con albendazol en pacientes con hidatidosis hepática busca reducir el tamaño de los quistes hidatídicos en el hígado y eliminar la infección, no existe un tiempo específico universal para dicho tratamiento. De hecho, el tiempo puede variar según la gravedad de la infección, la respuesta del paciente, la ubicación y el tamaño de los quistes y la adherencia al tratamiento. Por tal razón, el tratamiento puede ser eficaz en varias semanas o extenderse hasta varios años en casos muy graves o resistentes al tratamiento (Brunetti et al., 2010; Montero & Breña, 2015; Wen et al., 2019). Esto sugeriría que el tratamiento con albendazol (400 mg dos veces al día) durante 1 mes en pacientes infectados no necesariamente podría hacer un cambio significativo en la biología del parásito, por lo que es fundamental la evaluación en periodos más prolongados.

Así mismo, también hay un solo estudio que ha reportado la expresión de miRNAs de *E. granulosus* (egr-let-7 y egr-mir-71) por RT-qPCR en pacientes con hidatidosis hepática tratados quirúrgicamente. Los resultados de dicho estudio indicaron que estos miRNAs se subexpresaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en plasma sanguíneo 3 y 6 meses después de la cirugía de extracción de quiste hidatídico. Aunque la expresión de ambos miRNAs fue disminuyendo con el tiempo, sus resultados sugerirían la posibilidad de detectar miRNAs de *E. granulosus* en plasma sanguíneo incluso hasta 6 meses después de la cirugía (Alizadeh et al., 2020). Dicho resultado es congruente con lo obtenido en esta investigación, pues aquí también se detectó la expresión de miRNAs del parásito después de la cirugía. Esto podría deberse a que los miRNAs podrían permanecer en el torrente sanguíneo por varios meses, como se ha visto en enfermedades infecciosas y crónicas (Filipów & Łaczmański, 2019; Harms et al., 2020). Por otra parte, podría estar relacionado con los riesgos del tratamiento, como la ruptura del quiste y el filtraje de líquido hidatídico altamente infeccioso que pueden provocar la permanencia del parásito y la reaparición de nuevos quistes en el futuro (Brunetti et al., 2010; Eisman et al., 2017; Espinosa et al., 2014; Stojković et al., 2018). Además, cuando se trata de eliminar la infección parasitaria mediante cirugía, la probabilidad de que el tratamiento sea exitoso es mayor cuando la cirugía es más extensa o radical; sin embargo, este tipo de procedimiento no es tan practicado (Aydin et al., 2008; Montero & Breña, 2015). Esto sugeriría que el análisis de miRNAs de *E. granulosus* después del tratamiento quirúrgico podrían ser, potencialmente, una herramienta clave para el monitoreo del tratamiento en amplios periodos.

Según un reporte de análisis funcional de predicción de dianas, el miRNA egr-mir-1 estaría involucrado en la regulación postranscripcional de genes relacionados con la ubiquitinación, la biosíntesis de oligosacáridos y la excreción de toxinas y múltiples fármacos en *E. granulosus*; mientras que el miRNA egr-mir-219, con la ribosilación de proteínas, la ubiquitinación y el transporte de sodio y potasio (Bai et al., 2014). Además, un análisis de enriquecimiento funcional ha reportado que los miRNAs de *E. granulosus* podrían participar en vías relacionadas con inflamación e infecciones parasitarias. Dado que los miRNAs pueden transferirse desde el parásito hacia células del huésped, es importante destacar el papel que podrían tener en la regulación de procesos inflamatorios e infecciosos (Zhang et al., 2020), por lo que, es fundamental continuar con su investigación.

Esta tesis proporcionó información preliminar sobre la caracterización de miRNAs de *Echinococcus granulosus* en pacientes con y sin tratamiento en el Perú, lo cual contribuirá a mejorar la comprensión de la biología del parásito durante el desarrollo de la enfermedad y en el tratamiento de pacientes con hidatidosis hepática. Futuras investigaciones son necesarias para ampliar los alcances de esta investigación y contribuir a mejorar el monitoreo de esta enfermedad infecciosa.



## VII. CONCLUSIONES

1. En esta investigación, el rRNA 5.8S fue identificado como el marcador mitocondrial más adecuado para la detección de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico de quiste de estadio CE2.
2. En esta investigación, 12 miRNAs (egr-mir-9, egr-mir-1992, egr-mir-bantam, egr-mir-219, egr-mir-61, egr-mir-10, egr-let-7, egr-mir-1, egr-mir-71, egr-mir-7, egr-new15 y egr-new-22) fueron identificados como los biomarcadores más adecuados para la detección de *Echinococcus granulosus* en líquido hidatídico de quiste de estadio CE2.
3. En esta investigación, los miRNAs egr-mir-1 y egr-mir-219 fueron identificados como los biomarcadores más adecuados para la detección de *Echinococcus granulosus* en muestras de plasma sanguíneo de pacientes con hidatidosis hepática.
4. El tratamiento farmacológico de 400 mg de albendazol dos veces al día durante 1 mes no generó un cambio en la expresión de los miRNAs egr-mir-1 y egr-mir-219 de *Echinococcus granulosus* en el plasma sanguíneo de los pacientes evaluados.
5. La expresión de los miRNAs egr-mir-1 y egr-mir-219 de *Echinococcus granulosus* en el plasma sanguíneo de pacientes con hidatidosis hepática no varió después de 24 horas de la cirugía de extracción de quiste hidatídico.

## VIII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda ampliar los alcances de esta investigación al evaluar un mayor número de muestras de pacientes con hidatidosis hepática.
2. Se sugieren más estudios que permitan validar el punto de corte ( $Cq=35$ ) propuesto en esta investigación.
3. Se sugieren más estudios que permitan analizar la expresión de los miRNAs de *E. granulosus* en pacientes con hidatidosis hepática después de periodos más prolongados de tratamiento farmacológico (6 meses).
4. Se sugieren más estudios que permitan analizar la expresión de los miRNAs de *E. granulosus* en pacientes con hidatidosis hepática después de periodos más prolongados posteriores a la cirugía de extracción de quiste hidatídico (6 meses).

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alizadeh, Z., Mahami-Oskouei, M., Spotin, A., Kazemi, T., Ahmadpour, E., Cai, P., Shanehbandi, D., & Shekari, N. (2020). Parasite-derived microRNAs in plasma as novel promising biomarkers for the early detection of hydatid cyst infection and post-surgery follow-up. *Acta Tropica*, 202. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2019.105255>
- Almulhim, A. M., & John, S. (2023). Echinococcus Granulosus. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539751/>
- Alvarez, C. A., Mathis, A., & Deplazes, P. (2018). Assessing the Contamination of Food and the Environment With Taenia and Echinococcus Eggs and Their Zoonotic Transmission. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5(2), 154–163. <https://doi.org/10.1007/S40588-018-0091-0/TABLES/2>
- Armiñanzas, C., Gutiérrez, M., María, C., & Fariñas, C. (2015). Hydatidosis: epidemiological, clinical, diagnostic and therapeutic aspects Revisión. *Rev Esp Quimioter*, 28(3), 116–124. [www.cdc.org](http://www.cdc.org)
- Aydin, U., Yazici, P., Onen, Z., Ozsoy, M., Zeytinlu, M., Kilic, M., & Coker, A. (2008). The optimal treatment of hydatid cyst of the liver: radical surgery with a significant reduced risk of recurrence - PubMed. *Turkish Journal of Gastroenterology*, 19, 33–39. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18386238/>
- Backes, C., Meese, E., & Keller, A. (2016). Specific miRNA Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects. *Molecular Diagnosis & Therapy* 2016 20:6, 20(6), 509–518. <https://doi.org/10.1007/S40291-016-0221-4>
- Bai, Y., Zhang, Z., Jin, L., Kang, H., Zhu, Y., Zhang, L., Li, X., Ma, F., Zhao, L., Shi, B., Li, J., McManus, D. P., Zhang, W., & Wang, S. (2014). Genome-wide sequencing of small RNAs reveals a tissue-specific loss of conserved microRNA families in Echinococcus granulosus. *BMC Genomics*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-736/FIGURES/5>
- Benes, V., & Castoldi, M. (2010). Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods (San Diego, Calif.)*, 50(4), 244–249. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2010.01.026>
- Brack, A. (1986). *Las Ecorregiones del Perú*. 44, 57–70. [https://scholar.google.com/scholar?hl=es&as\\_sdt=0%2C5&q=las+ecorregiones+del+peru+antonio+brack+egg+pdf&btnG=](https://scholar.google.com/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=las+ecorregiones+del+peru+antonio+brack+egg+pdf&btnG=)
- British Society for Immunology. (2023). *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/experimental-techniques/enzyme-linked-immunosorbent-assay>
- Brunetti, E., Kern, P., & Vuitton, D. A. (2010). Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Tropica*, 114(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2009.11.001>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2008.112797>
- Caetano-Anollés, D. (2013). Polymerase Chain Reaction. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01186-4>
- Çakmak, H. A., & Demir, M. (2020). MicroRNA and Cardiovascular Diseases. *Balkan Medical Journal*, 37(2), 60–71. <https://doi.org/10.4274/BALKANMEDJ.GALENOS.2020.2020.1.94>
- Casulli, A., Siles-Lucas, M., & Tamarozzi, F. (2019). Echinococcus granulosus sensu lato. *Trends in Parasitology*, 35(8), 663–664. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2019.05.006>
- Cauas, D. (2015). Definición de las variables, enfoque y tipo de investigación. In *Bogotá: biblioteca electrónica de la universidad Nacional de Colombia*. [https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:pwR-5cplLTEJ:scholar.google.com/+tipos+de+variables+de+investigación&hl=es&as\\_sdt=0,5](https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:pwR-5cplLTEJ:scholar.google.com/+tipos+de+variables+de+investigación&hl=es&as_sdt=0,5)

- CDC. (2019). *Echinococcosis*. <https://www.cdc.gov/dpdx/echinococcosis/index.html>
- CDC Perú. (2021). *Boletín Epidemiológico del Perú*. [https://www.dge.gob.pe/epublic/uploads/boletin/boletin\\_202136\\_25\\_150233.pdf](https://www.dge.gob.pe/epublic/uploads/boletin/boletin_202136_25_150233.pdf)
- Chen, Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., Lao, K. Q., Livak, K. J., & Guegler, K. J. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 33(20), e179. <https://doi.org/10.1093/NAR/GNI178>
- Churko, J. M., Mantalas, G. L., Snyder, M. P., & Wu, J. C. (2013). Overview of High Throughput Sequencing Technologies to Elucidate Molecular Pathways in Cardiovascular Diseases. *Circulation Research*, 112(12), 1613–1623. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300939>
- Condrat, C. E., Thompson, D. C., Barbu, M. G., Bugnar, O. L., Boboc, A., Cretoiu, D., Suci, N., Cretoiu, S. M., & Voinea, S. C. (2020). miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/CELLS9020276>
- Corbett, A. H. (2018). Post-transcriptional Regulation of Gene Expression and Human Disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 52, 96. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2018.02.011>
- Craig, P., Mastin, A., van Kesteren, F., & Boufana, B. (2015). Echinococcus granulosus: Epidemiology and state-of-the-art of diagnostics in animals. *Veterinary Parasitology*, 213(3–4), 132–148. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2015.07.028>
- Crespi, M., Montecamozzo, G., & Foschi, D. (2016). Diagnosis and Treatment of Biliary Fistulas in the Laparoscopic Era. *Gastroenterology Research and Practice*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6293538>
- Cucher, M., Prada, L., Mourglia-Ettlin, G., Dematteis, S., Camicia, F., Asurmendi, S., & Rosenzvit, M. (2011). Identification of Echinococcus granulosus microRNAs and their expression in different life cycle stages and parasite genotypes. *International Journal for Parasitology*, 41(3–4), 439–448. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2010.11.010>
- Drury, R. E., O'Connor, D., & Pollard, A. J. (2017). The clinical application of MicroRNAs in infectious disease. *Frontiers in Immunology*, 8(SEP), 295828. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01182/BIBTEX>
- Eckert, J., Gemmell, M. A., Meslin, F.-X., & Pawłowski, Z. S. (2001). *World Health Organization World Organisation for Animal Health WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern Edited by*. <http://www.oie.int>
- EduRev. (2023). *What is characterization in biology?* <https://edurev.in/question/3668023/What-is-characterization-in-biology->
- Eisman, M., Núñez, Y., & García, P. (2017). Obstrucción de la vía biliar secundaria a ruptura y fistulización de un quiste hidatídico hepático - Dialnet. *Revista Andaluza de Patología Digestiva*, 40(3), 161–162. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6288094>
- Espinosa, G., López, P., & Ruso, L. (2014). Recidiva quiste hidatídico hepático complicado con fistulización biliar. *Revista Chilena de Cirugía*, 66(4), 311–312. <https://doi.org/10.4067/S0718-40262014000400003>
- Faridi, A., Afgar, A., Mousavi, S. M., Nasibi, S., Mohammadi, M. A., Farajli Abbasi, M., & Fasihi Harandi, M. (2020). Intestinal Expression of miR-130b, miR-410b, and miR-98a in Experimental Canine Echinococcosis by Stem-Loop RT-qPCR. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2020.00507>
- Faridi, A., Mansouri, M., Macchiaroli, N., Afgar, A., Mousavi, S. M., Rosenzvit, M. C., & Harandi, M. F. (2021). MicroRNA profile of the strobilated worms of Echinococcus granulosus derived from in vivo and in vitro systems by using high-throughput approach. *Parasitology Research*, 120(9), 3203–3214. <https://doi.org/10.1007/S00436-021-07251-3>
- Filipów, S., & Łaczmański, Ł. (2019). Blood circulating miRNAs as cancer biomarkers for diagnosis and surgical treatment response. *Frontiers in Neuroscience*, 13(FEB), 410241. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2019.00169/BIBTEX>

- Forero, D. A., González-Giraldo, Y., Castro-Vega, L. J., & Barreto, G. E. (2019). qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs. *BioTechniques*, 67(4), 192–199. <https://doi.org/10.2144/BTN-2019-0065/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE4.JPEG>
- Frikha, F., Trigui, A., Haitham, R., Toumi, N., Fendri, S., Jemal, A., Ben Amar, M., & Mzali, R. (2018). Correlation of radiological findings with surgical findings in hepatic hydatid disease. A prospective study of 79 cases - PubMed. *Annali Italiani Di Chirurgia*, 89, 309–314. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30337501/>
- Galindo, M., Gonzalez, M. J., & Galanti, N. (2002). Echinococcus granulosus protoscolex formation in natural infections. *Biological Research*, 35(3–4), 365–371. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602002000300011>
- Gamboa, M. (2014). *Estadística aplicada a la investigación científica* (pp. 59–75). [https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:bLaXfo6NecJ:scholar.google.com/+escala+de+variables+y+tipo+de+investigacion%3F&hl=es&as\\_sdt=0,5](https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:bLaXfo6NecJ:scholar.google.com/+escala+de+variables+y+tipo+de+investigacion%3F&hl=es&as_sdt=0,5)
- Gautam, A., Kumar, R., Dimitrov, G., Hoke, A., Hammamieh, R., & Jett, M. (2016). Identification of extracellular miRNA in archived serum samples by next-generation sequencing from RNA extracted using multiple methods. *Molecular Biology Reports*, 43(10), 1165–1178. <https://doi.org/10.1007/S11033-016-4043-6/FIGURES/8>
- González, A., & Covinos, M. (2021). *Diseño y metodología de la investigación*. [https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:yEC2LIGrp8J:scholar.google.com/+tipo+diseño+y+enfoque+de+investigación+libro&hl=es&as\\_sdt=0,5](https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:yEC2LIGrp8J:scholar.google.com/+tipo+diseño+y+enfoque+de+investigación+libro&hl=es&as_sdt=0,5)
- Govindasamy, A., Bhattarai, P. R., & John, J. (2023). Liver cystic echinococcosis: a parasitic review. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 10. <https://doi.org/10.1177/20499361231171478>
- GraphPad. (2024). *GraphPad Software*. <https://www.graphpad.com/>
- Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., Van Dongen, S., & Enright, A. J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 36(Database issue). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKM952>
- Guabloche, J., & Saldarriaga, M. (2013). Aspectos económicos y sociales de la región Junín. *Revista Moneda*, 155, 12–17. <https://www.bcrp.gob.pe/docs/Publicaciones/Revista-Moneda/moneda-155/moneda-155-02.pdf>
- Guigó, R. (2013). The Coding and the Non-coding Transcriptome. *Handbook of Systems Biology: Concepts and Insights*, 27–41. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385944-0.00002-2>
- Hareendran, T. (2017). *RPM Measurement*. <https://www.electronicsforu.com/tech-zone/test-measurement-electronics/rpm-measurement-sensors-techniques>
- Harms, D., Choi, M., Allers, K., Wang, B., Pietsch, H., Papp, C. P., Hanisch, L., Kurreck, J., Hofmann, J., & Bock, C. T. (2020). Specific circulating microRNAs during hepatitis E infection can serve as indicator for chronic hepatitis E. *Scientific Reports 2020 10:1*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62159-9>
- He, B., Zhao, Z., Cai, Q., Zhang, Y., Zhang, P., Shi, S., Xie, H., Peng, X., Yin, W., Tao, Y., & Wang, X. (2020). miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 16(14), 2628–2647. <https://doi.org/10.7150/IJBS.47203>
- He, Z., Yan, T., Yuan, Y., Yang, D., & Yang, G. (2020). miRNAs and lncRNAs in Echinococcus and Echinococcosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/IJMS21030730>
- Heidary, M., & Pahlevan Kakhki, M. (2014). TRIzol-based RNA Extraction: A Reliable Method for Gene Expression Studies. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 25(1), 13–17. [https://jscienc.es.ut.ac.ir/article\\_50483.html](https://jscienc.es.ut.ac.ir/article_50483.html)
- Hosch, W., Junghanss, T., Werner, J., & Dux, M. (2004). Imaging methods in the diagnosis and therapy of cystic echinococcosis. *RoFo: Fortschritte Auf Dem Gebiete Der Rontgenstrahlen Und Der Nuklearmedizin*, 176(5), 679–687. <https://doi.org/10.1055/S-2004-812743>
- Huamani, O. (2020). *Epidemiología de hidatidosis en el Perú 2013 - 2017* [Universidad Nacional Federico Villarreal]. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/4358>

- Huancayo Perú. (2023). *Huancayo Perú - Ciudad y provincia de Junín*. <https://www.dehuancayo.com/>
- Kabekkodu, S. P., Shukla, V., Varghese, V. K., D'Souza, J., Chakrabarty, S., & Satyamoorthy, K. (2018). Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 93(4), 1955–1986. <https://doi.org/10.1111/BRV.12428>
- Khan Academy. (2023). *Types of reproduction review*. <https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-reproduction-and-cell-division/hs-types-of-reproduction/a/hs-types-of-reproduction-review>
- Koffler-Brill, T., Noy, Y., & Avraham, K. B. (2023). The long and short: Non-coding RNAs in the mammalian inner ear. *Hearing Research*, 428, 108666. <https://doi.org/10.1016/J.HEARES.2022.108666>
- Koturbash, I., Tolleson, W. H., Guo, L., Yu, D., Chen, S., Hong, H., Mattes, W., & Ning, B. (2015). MicroRNAs as pharmacogenomic biomarkers for drug efficacy and drug safety assessment. *Biomarkers in Medicine*, 9(11), 1153–1176. <https://doi.org/10.2217/BMM.15.89/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE3.JPEG>
- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT1181>
- Kramer, M. F. (2011). STEM-LOOP RT-qPCR for miRNAs. *Current Protocols in Molecular Biology / Edited by Frederick M. Ausubel ... [et Al.]*, CHAPTER(SUPPL. 95), Unit15.10. <https://doi.org/10.1002/0471142727.MB1510S95>
- Lappin, M. R. (2012). Anthelmintic Agents. In *Canine and Feline Gastroenterology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3661-6.00037-7>
- Li, X., Jiang, S., Wang, X., & Jia, B. (2021). Intestinal transcriptomes in Kazakh sheep with different haplotypes after experimental *Echinococcus granulosus* infection. *Parasite (Paris, France)*, 28, 14. <https://doi.org/10.1051/PARASITE/2021011>
- Life Technologies Corporation. (2012). *Real-time PCR handbook*. <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
- Liu, J., Li, Z. Y., Liu, L., Shi, X. J., Xiang, W. G., Liu, Q., & Zhao, L. (2020). Application of ultrasound in the diagnosis and preoperative evaluation of cystic hepatic echinococcosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 100(43), 3453–3456. <https://doi.org/10.3760/CMA.J.CN112137-20200428-01351>
- Loayza-Acosta, G., Calle-Arancibia, M., Campos-Arias, M., & Bernardo-Reyes, N. (2019). Indicador Trimestral de Actividad Económica para Ciudades Intermedias Latinoamericanas. Caso: Huancayo (Perú). *Revista Espacios*, 40(22), 1–17.
- Loureiro, D., Tout, I., Narguet, S., Benazzouz, S. M., Mansouri, A., & Asselah, T. (2020). miRNAs as Potential Biomarkers for Viral Hepatitis B and C. *Viruses*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/V12121440>
- Mahami-Oskouei, M., Norouzi, B., Ahmadvpour, E., Kazemi, T., Spotin, A., Alizadeh, Z., Ghorbani Sani, R., & Asadi, M. (2021). Expression analysis of circulating miR-146a and miR-155 as novel biomarkers related to effective immune responses in human cystic echinococcosis. *Microbial Pathogenesis*, 157. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2021.104962>
- Manterola, C., & Otzen, T. (2016). Molecular Epidemiology of Cystic Echinococcosis: Genotypic Characterization in Humans and Different Livestock. *International Journal of Morphology*, 34(4), 1472–1481. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022016000400048>
- Manterola, C., Rojas, C., Totomoch-Serra, A., García-Méndez, N., Riffo-Campos, Á. L., Manterola, C., Rojas, C., Totomoch-Serra, A., García-Méndez, N., & Riffo-Campos, Á. L. (2020). *Echinococcus granulosus* genotypes verified in human hydatid disease around the world. Systematic review. *Revista Chilena de Infectología*, 37(5), 541–549. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182020000500541>
- Matsuyama, H., & Suzuki, H. I. (2019). Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences 2020*, Vol. 21, Page 132, 21(1), 132. <https://doi.org/10.3390/IJMS21010132>

- Merck KGaA. (2023). *Oligonucleotide Melting Temperature*. <https://www.sigmaaldrich.com/PE/es/technical-documents/protocol/genomics/pcr/oligos-melting-temp>
- Montalvo, R., & Tiza, V. (2017). Evaluación del gasto económico en la atención de hidatidosis humana en Junín, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 34(3), 445–450. <https://doi.org/10.17843/RPMESP.2017.343.2521>
- Montero, L. G., & Breña, M. R. (2015). Hidatidosis humana en el Perú. *Apuntes de Ciencia & Sociedad*, 5(1). <https://doi.org/10.18259/ACS.2015015>
- Montúfar-Valer, A., & Huapaya-Jurado, F. (2014). Características clínicas, radiológicas y laboratoriales de pacientes con hidatidosis hepática en un hospital de referencia nacional, Lima 1997-2010. *Revista de Gastroenterología Del Perú*, 34, 203–209. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1022-51292014000300004](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292014000300004)
- Mooers, A., & Holmes, E. C. (2000). The evolution of base composition and phylogenetic inference. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(9), 365–369. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01934-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01934-0)
- Mortezaei, S., Afgar, A., Mohammadi, M. A., Mousavi, S. M., Sadeghi, B., & Harandi, M. F. (2019). The effect of albendazole sulfoxide on the expression of miR-61 and let-7 in different in vitro developmental stages of *Echinococcus granulosus*. *Acta Tropica*, 195, 97–102. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2019.04.031>
- Mortezaei, S., Afgar, A., Sadeghi, B., Mohammadi, M. A., Mousavi, S. M., & Harandi, M. F. (2021). Comparative Analysis of miRNA Expressions in Different Developmental Stages of *Echinococcus granulosus* in Mono-Phasic and Di-Phasic Culture Systems. *Infectious Disorders Drug Targets*, 21(5). <https://doi.org/10.2174/1871526520999201103192518>
- Municipalidad Provincial de Huancayo. (2003). *Plan Vial de la Ciudad de Huancayo*.
- Nabarro, L. E., Amin, Z., & Chiodini, P. L. (2015). Current management of cystic echinococcosis: A survey of specialist practice. *Clinical Infectious Diseases*, 60(5), 721–728. <https://doi.org/10.1093/CID/CIU931>
- National Institutes of Health. (2023a). *Ácido ribonucleico (ARN)*. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/ARN>
- National Institutes of Health. (2023b). *ARN mensajero (ARNm)*. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/ARN-mensajero>
- National Institutes of Health. (2023c). *cDNA (copy DNA)*. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Copy-DNA>
- National Institutes of Health. (2023d). *Deoxyribonucleic Acid (DNA)*. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Deoxyribonucleic-Acid>
- National Institutes of Health. (2023e). *Gene Expression*. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Gene-Expression>
- Navarrete, J. (2000). El muestreo en la investigación cualitativa. *Investigaciones Sociales*, 4(5), 165–180.
- Nolan, T., Huggett, J., & Sanchez, E. (2013). *Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR)*. LGC. <https://www.gene-quantification.de/national-measurement-system-qpcr-guide.pdf>
- Ochiya, T., & Takahashi, R.-U. (2018). MicroRNAs: Novel Biomarkers and Therapeutic Targets for Human Cancers. *Journal of Clinical Medicine*, 272. <https://doi.org/10.3390/BOOKS978-3-03897-253-2>
- Organización Panamericana de la Salud. (2017). *Prevención y Control de la Hidatidosis en el Nivel Local: iniciativa sudamericana para el control y vigilancia de la equinococosis quística / hidatidosis*. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/34173>
- Orsten, S., Baysal, Yabanoglu-Ciftci, S., Ciftci, T., Azizova, A., Akinci, D., Akyon, Y., & Akhan, O. (2021). MicroRNA expression profile in patients with cystic echinococcosis and identification of possible cellular pathways. *Journal of Helminthology*, 95. <https://doi.org/10.1017/S0022149X2000098X>

- Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., Pedersen, K. F., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N. O., Sailor, C. A., Dawson, R. B., & Peek, A. S. (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKN198>
- Pinto, P. P. (2004). Tratamiento médico de la enfermedad hidatídica. *Cuadernos de Cirugía*, 18, 57–61. <http://revistas.uach.cl/pdf/cuadcir/v18n1/art10.pdf>
- Robertson, L. J. (2016). Parasites in Food: Occurrence and Detection. In *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00518-3>
- Romig, T., Ebi, D., & Wassermann, M. (2015). Taxonomy and molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus sensu lato*. *Veterinary Parasitology*, 213(3–4), 76–84. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2015.07.035>
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 5451–5465. <https://doi.org/10.1002/JCP.27486>
- Siles-Lucas, M., Casulli, A., Conraths, F. J., & Müller, N. (2017). Laboratory Diagnosis of *Echinococcus* spp. in Human Patients and Infected Animals. *Advances in Parasitology*, 96, 159–257. <https://doi.org/10.1016/BS.APAR.2016.09.003>
- Stanford Medicine Children’s Health. (2023). *What Is Plasma?* <https://www.stanfordchildrens.org/en/topic/default?id=what-is-plasma-160-37>
- Štefanić, S., Shaikenov, B. S., Deplazes, P., Dinkel, A., Torgerson, P. R., & Mathis, A. (2004). Polymerase chain reaction for detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* (“sheep strain”) in naturally infected dogs. *Parasitology Research*, 92(4), 347–351. <https://doi.org/10.1007/S00436-003-1043-Y>
- Stojkovic, M., Adt, H. M., Rosenberger, K., Boubaker, G., Hernandez-Gonzalez, A., Junghans, T., Zwahlen, M., & Siles-Lucas, M. (2017). Follow-up of surgically treated patients with cystic echinococcosis: can novel recombinant antigens compete with imaging? Analysis of a patient cohort. *Tropical Medicine & International Health: TM & IH*, 22(5), 614–621. <https://doi.org/10.1111/TMI.12859>
- Stojkovic, M., Rosenberger, K., Kauczor, H. U., Junghans, T., & Hosch, W. (2012). Diagnosing and Staging of Cystic Echinococcosis: How Do CT and MRI Perform in Comparison to Ultrasound? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0001880>
- Stojković, M., Weber, T. F., & Junghans, T. (2018). Clinical management of cystic echinococcosis: state of the art and perspectives. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 31(5), 383–392. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000485>
- Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are Biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463. <https://doi.org/10.1097/COH.0B013E32833ED177>
- Swarbrick, S., Wragg, N., Ghosh, S., & Stolzing, A. (2019). Systematic Review of miRNA as Biomarkers in Alzheimer’s Disease. *Molecular Neurobiology* 2019 56:9, 56(9), 6156–6167. <https://doi.org/10.1007/S12035-019-1500-Y>
- Tafrihi, M., & Hasheminasab, E. (2018). MiRNAs: Biology, Biogenesis, their Web-based Tools, and Databases. *MicroRNA*, 8(1), 4–27. <https://doi.org/10.2174/2211536607666180827111633>
- Tercero, M., & Olalla, R. (2008). Hidatidosis. Una zoonosis de distribución mundial. *Offarm*, 27(9), 88–94. <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-hidatidosis-una-zoonosis-distribucion-mundial-13127387>
- Thermo Fisher Scientific. (2013). *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*. [www.thermoscientific.com/onebio](http://www.thermoscientific.com/onebio)
- Thermo Fisher Scientific. (2023a). *PCR Reagents and Enzymes*. <https://www.thermofisher.com/ht/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes.html>
- Thermo Fisher Scientific. (2023b). *TRIzol Reagent User Guide*. <https://www.thermofisher.com/trizolfaqs>



- Thermo Fisher Scientific. (2023c). *Base Pair*. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Base-Pair>
- Thermo Fisher Scientific. (2023d). *DNA Polymerase—Four Key Characteristics for PCR - PE*. <https://www.thermofisher.com/ht/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/dna-polymerase-characteristics.html>
- Thermo Fisher Scientific. (2023e). *Quantitating RNA*. <https://www.thermofisher.com/ht/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/quantitating-rna.html>
- Trakunram, K., Champoochana, N., Chaniad, P., Thongsuksai, P., & Raungrut, P. (2019). MicroRNA Isolation by Trizol-Based Method and Its Stability in Stored Serum and cDNA Derivatives. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 20(6), 1641. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.6.1641>
- Tsaroucha, A. K., Polychronidis, A. C., Lyrantzopoulos, N., Pitiakoudis, M. S., Karayiannakis, A. J., Manolas, K. J., & Simopoulos, C. E. (2005). Hydatid Disease of the Abdomen and Other Locations. *World Journal of Surgery* 29:9, 29(9), 1161–1165. <https://doi.org/10.1007/S00268-005-7775-3>
- Vivanco, F., Wang, Y., Sanhueza, C., Zagmutt, T., & Vrsalovic, J. (2021). Niveles de prevención de hidatidosis hepática a nivel internacional en comparación a Chile: Una revisión bibliográfica. *Revista Confluencia*. *Revista Confluencia*, 4, 1–5. <https://revistas.udd.cl/index.php/confluencia/article/view/572>
- Wen, H., Vuitton, L., Tuxun, T., Li, J., Vuitton, D. A., Zhang, W., & McManus, D. P. (2019). Echinococcosis: Advances in the 21st Century. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-18>
- World Health Organization. (2020). *Equinococosis*. Press Center. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/echinococcosis>
- Xiao, J., Zhu, Y., Wu, J., Bai, M., Xin, Y., Wang, Q., & Zhao, J. (2022). Expression profiling of exosomal miRNAs derived from different stages of infection in mice infected with *Echinococcus granulosus* protoscoleces using high-throughput sequencing. *Parasitology Research*, 121(7), 1993–2008. <https://doi.org/10.1007/S00436-022-07536-1>
- Ying, S. Y., Chang, D. C., & Lin, S. L. (2018). The MicroRNA. *Methods in Molecular Biology*, 1733, 1–25. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7601-0\\_1/COVER](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7601-0_1/COVER)
- Zhang, Gong, W., Cao, S., Yin, J., Zhang, J., Cao, J., & Shen, Y. (2020). Comprehensive Analysis of Non-coding RNA Profiles of Exosome-Like Vesicles From the Protoscoleces and Hydatid Cyst Fluid of *Echinococcus granulosus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00316>
- Zhang, P., Wu, W., Chen, Q., & Chen, M. (2019). Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. *Journal of Integrative Bioinformatics*, 16(3). <https://doi.org/10.1515/JIB-2019-0027>
- Zhang, Y., Yun, Z., Gong, L., Qu, H., Duan, X., Jiang, Y., & Zhu, H. (2018). Comparison of miRNA Evolution and Function in Plants and Animals. *MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates)*, 7(1), 4–10. <https://doi.org/10.2174/2211536607666180126163031>
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3406–3415. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKG595>

## X. ANEXOS

	<b>HOSPITAL REGIONAL DOCENTE CLÍNICO QUIRÚRGICO DANIEL ALCIDES CARRIÓN</b>
<b>“Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional”</b>	
<b><u>CONSTANCIA</u></b>	
<p>El que suscribe, presidente del Comité de ética en investigación (CEI) del Hospital Regional Docente Clínico Quirúrgico Daniel Alcides Carrión, certifica que habiéndose aprobado el proyecto <b>“DESARROLLO DE PRUEBAS DIAGNOSTICAS Y DE SEGUIMIENTO DE HIDATIDOSIS”</b>, el cual fue aprobado mediante constancia N°029-2021-CEI, con fecha 19 de noviembre de 2021 por el comité de ética de nuestra Institución, se <b>APRUEBA LA ENMIENDA AL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN</b> versión 2-2021 con fecha 04 de febrero de 2022. En el cual incluirán a los pacientes hospitalizados con diagnostico de hidatidosis, modificando de esta manera los criterios de selección, descripción de procedimientos, aspectos éticos y anexo 2 de consentimiento informado.</p>	
<p>Huancayo, 04 de febrero de 2022</p>	
	
Dr Ciro Rodriguez Aliaga Presidente del comité de ética	
<p>Cc archivo</p>	

**Anexo 01.** Constancia de aprobación de la investigación emitida por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Regional Docente Clínico Quirúrgico Daniel Alcides Carrión de Huancayo, Junín.

## **ANEXO 2: CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PARTICIPACIÓN EN LA INVESTIGACIÓN DESARROLLO DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS Y DE SEGUIMIENTO DE HIDATIDOSIS**

Esta investigación es conducida por investigadores de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Centro del Perú y del Hospital Daniel Alcides Carrión. El objetivo del estudio es el Desarrollo de pruebas diagnósticas de Hidatidosis mediante técnicas moleculares. La Hidatidosis es una enfermedad transmitida por perros, y puede afectar su hígado y otros órganos como el pulmón y cerebro, pero puede ser tratada con diferentes opciones de acuerdo al grado de avance. Para un mejor tratamiento se requiere un diagnóstico rápido, que evite el avance de la enfermedad. Actualmente el diagnóstico se realiza por ecografía del abdomen, pero en muchas ocasiones es difícil que se le realice esta ecografía, por lo cual se necesitan nuevas pruebas que permitan un diagnóstico temprano.

Este estudio busca desarrollar tres nuevas pruebas para el diagnóstico de Hidatidosis y para seguimiento de enfermedad, que en caso sean validadas en futuros estudios, permitirá acceder a un diagnóstico temprano y eficaz, en especial en lugares donde es difícil movilizarse con otros equipos como ecografía. Para esto se requieren muestras de pacientes con Hidatidosis, por lo cual se le está invitando a participar en el estudio.

El estudio consiste en:

### VISITA INICIAL:

1. Recolectar información suya en una ficha de recolección de información: datos generales sobre usted y su enfermedad.
2. Se repetirá una ecografía abdominal en un Centro de Diagnóstico por imágenes. Este examen es gratuito y se entregará su resultado como máximo a los 4 días útiles de realizado.
3. Se realizará una radiografía de tórax para descartar Hidatidosis en el pulmón. Este examen es gratuito y se entregará sus resultados como máximo a los 4 días útiles de realizados.
4. Se le tomará además tres muestras de sangre y una muestra de orina. Con una de las muestras de sangre se le realizará un perfil hepático que permitirá evaluar cómo está funcionando su hígado, y el resultado se le entregará como máximo 4 días después de la toma de muestra. La segunda muestra será enviada a un laboratorio privado para detectar si presenta anticuerpos contra Hidatidosis, este resultado demorará aproximadamente 3 meses. En caso se requiera el resultado para confirmar el diagnóstico de Hidatidosis, se entregará el resultado en un periodo máximo de 10 días.

La tercera muestra de sangre y la orina nos ayudarán a desarrollar las pruebas para diagnóstico de Hidatidosis.

En caso se encuentre hospitalizado, y en espera de la cirugía para Hidatidosis hepática, no realizará ecografía abdominal. La radiografía de tórax, el estudio de perfil hepático y detección de IgG para *E. granulosus*, se solicitará solo en caso usted no cuente con estos exámenes al momento de ingresar al estudio.

### VISITAS DE SEGUIMIENTO

5. Se le realizará controles en los que se le tomará dos muestras de sangre, para evaluar su hígado y para desarrollar las pruebas para diagnóstico de Hidatidosis, y se le realizará una ecografía abdominal para evaluar su respuesta al tratamiento. Estos controles se realizarán en los siguientes momentos:
  - Visita 01 a los 28-31 días de iniciado el tratamiento (en un mes)
  - Visita 02: a los 88-92 días de iniciado el 1° ciclo de tratamiento (en tres meses)
  - Visita 03: a los 88-92 días de iniciado el 2° ciclo de tratamiento (el 2° ciclo se inicia luego de finalizado los 3 meses del 1° ciclo de tratamiento). (en seis meses)

A los cuatro días de cada visita, se le entregará los resultados de la evaluación del hígado (perfil hepático) y de la ecografía abdominal.

En caso usted requiera cirugía para el tratamiento de abdomen para el tratamiento de la Hidatidosis, se le tomará una muestra adicional de sangre luego de la cirugía (uno o dos días después), previa coordinación con usted.

### PROCEDIMIENTOS A REALIZAR

6. El procedimiento en cada visita consta de lo siguiente:

**Anexo 02.** Consentimiento informado brindado, leído y aprobado por cada paciente incluido en la presente investigación.

- a. Se le va a tomar dos muestras de sangre en el brazo, aproximadamente 3-5 ml. Con una muestra de sangre se evaluará su hígado, y se entregará los resultados como máximo 4 días útiles después de tomada la muestra. La segunda muestra de sangre será utilizada en el laboratorio de investigación de la Universidad Nacional del Centro del Perú para el desarrollo de las pruebas para diagnóstico y seguimiento de Hidatidosis. Solo en la primera visita, se evaluará la presencia de anticuerpos contra hidatidosis.
- b. Se le pedirá que recolecte una muestra de orina en un envase estéril sólo en la primera visita.
- c. Se le va a realizar una ecografía abdominal, procedimiento que consiste observar los órganos internos que se encuentran en el abdomen a través de un aparato que se coloca en la piel. Este examen sirve para ver si usted tiene algún quiste (bolsa de agua) ya sea en el hígado o en algún otro órgano dentro de su abdomen.
- d. Se le realizará Radiografía de Tórax solo en la primera visita: Este procedimiento permitirá evaluar si la Hidatidosis ha comprometido sus pulmones. Los riesgos de la radiografía son mínimos, al exponerlo a una dosis de radiación mínima, similar a la que puede estar expuesta de forma natural en un periodo de 10 días. El beneficio de este procedimiento, al descartar que la Hidatidosis haya llegado a su pulmón, es mayor que el riesgo.
- e. En caso de que la radiografía de tórax muestre alguna imagen que sugiera hidatidosis en el pulmón, y en caso su médico lo requiera, se le realizará una Tomografía pulmonar (financiada por el proyecto).

El estudio incluye el pago de todo el transporte necesario para que se realice las pruebas indicadas.

Se le brindará un diagnóstico completo de Hidatidosis con la ecografía abdominal y radiografía de tórax, que permitirá además descartar otras enfermedades. Además, se realizará en cada visita una prueba que permite ver cómo está funcionando su hígado, y con la primera muestra de sangre además se evaluará la presencia de anticuerpos contra Hidatidosis.

Un médico infectólogo parte del equipo de investigación, o de su centro de salud, le brindará el tratamiento completo con Albendazol, el tratamiento con pastillas de elección, por el periodo que lo requiera. Además, en caso se requiera otro tratamiento, como cirugía, se le apoyará en las coordinaciones con su centro de salud correspondiente.

En caso se atienda en el Hospital Ramiro Prialé Prialé o Daniel Alcides Carrión, se les brindará el tratamiento solo si no está disponible en el hospital o si requiriese un pago adicional.

**Este estudio no interferirá con el tratamiento que le indique su médico tratante.**

Dentro de los riesgos de este estudio se encuentra el mínimo dolor que le causará la toma de la de sangre del brazo, pero solo será un momento y se contará con todas las medidas de seguridad e higiene, eso no le hará daño; no se sentirá débil, ni se pondrá mal. Los posibles efectos adversos poco frecuentes son la aparición de un hematoma, y con muy poca frecuencia: desmayo, inflamación de zona donde se colocó la aguja, náuseas, o afección por pinchazo en el nervio.

La ecografía abdominal no le causara ninguna molestia, no existen efectos dañinos reportados en humanos por la realización de este procedimiento; sin embargo, este examen podría ocasionar alguna molestia física relacionada con el uso del gel o la presión que se realizara.

La radiografía de tórax, lo expone a una cantidad mínima de radiación, y aunque la radiación puede ser perjudicial, solo lo es en grandes cantidades. Una prueba de radiografía tiene mínimo riesgo.

La participación en este estudio es estrictamente voluntaria. La información preservará confidencialidad de su identidad y se usará los datos con fines profesionales, codificando la información y manteniéndola en archivos seguros. Solo los investigadores del trabajo tendrán acceso a esta información y cualquier reporte que se genere presentará los datos de manera agregada. En ningún caso se identificarán personas individuales.

Su participación o su negación de participación en el estudio no influirá en la atención que recibirá del médico tratante. El análisis de la información recolectada se realizará de manera agregada con toda la información recolectada de todos los participantes del estudio, de tal forma que no se podrán asociar sus resultados con su

**(Continuación del Anexo 02)**

nombre. Si tiene alguna duda sobre este estudio, puede hacer preguntas en cualquier momento durante su participación en él. Igualmente, puede retirarse del proyecto en cualquier momento sin que eso lo perjudique en ninguna forma. Este estudio no producirá ningún riesgo significativo a su persona.

Además, una parte de la muestra de sangre y orina será guardada en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Centro, para futuros estudios relacionados a Hidatidosis o enfermedades parasitarias. Estos futuros estudios no influyen en su tratamiento, y serán siempre aprobados por un comité de ética en investigación, por lo cual no serán informados a usted.

**CONSENTIMIENTO:**

Reconozco que la información que yo provea en el curso de esta investigación es estrictamente confidencial y no será usada para ningún otro propósito fuera de los de este estudio sin mi consentimiento.

Puede preguntar en cualquier momento, ahora o después, sobre cualquier detalle relacionado a las pruebas que se le va tomar.

Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de ética de la Universidad Nacional del Centro del Perú

Nombre de investigador principal del estudio: María Eguiluz

Correo de contacto: investigacion.fm.uncp@gmail.com

Yo, \_\_\_\_\_ con DNI N° \_\_\_\_\_ declaro que he sido informado detalladamente sobre el objetivo y en que consiste la investigación "DESARROLLO DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS Y DE SEGUIMIENTO DE HIDATIDOSIS", he podido realizar preguntas y han sido respondidas satisfactoriamente, por lo cual, declaro voluntariamente mi aceptación para participar en este estudio y realizarme las pruebas que me han indicado.

He entendido también los riesgos y beneficios de estas pruebas, y entiendo que sus resultados no modifican el manejo clínico de los posibles síntomas que pueda desarrollar. Por lo anterior, apruebo con mi firma y/o huella digital esta declaración.

Firma del participante o representante legal.

.....  
Firma del participante

Huella

Nombre (en letra de imprenta) .....

Fecha: ..... DNI: .....

Teléfono de contacto: .....

Si está de acuerdo con que guardemos una parte de su muestra de sangre en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Centro, para futuros estudios de investigación, por favor marque la siguiente casilla

.....  
Firma del Investigador que realiza la inclusión del paciente

Nombre (en letra de imprenta) .....

Fecha: .....

**(Continuación del Anexo 02)**