



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

LA ESPECIFICACIÓN DEL POLO  
ANTERIOR Y POSTERIOR DEL  
METACÉSTODE (CISTICERCO) DE *Taenia  
solium*, MEDIADA POR LA VÍA DE  
DESARROLLO WNT, COMO PASO  
CRUCIAL PARA SU DESARROLLO

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

JOSE DEL CARMEN MARAVI JAIME

LIMA – PERÚ

2025



**ASESOR**

DR. CRISTINA GUERRA GIRALDEZ

**CO ASESOR**

MG. RENZO MARCELO GUTIERREZ LOLI

**JURADO DE TESIS**

DRA. ROSA PATRICIA HERRERA VELIT  
PRESIDENTE

DRA. DIONICIA BAZILIZA GAMBOA VILELA  
VOCAL

MG. CARLA MARIA GALLO LOPEZ ALIAGA  
SECRETARIO (A)

## **DEDICATORIA**

A quienes en algún momento impulsaron la locomotora en mi cabeza, encarrilando mis ideas. A quienes caminaron y caminan conmigo, y con quienes he decidido caminar lado a lado, a quienes conocen mis momentos, los que seguramente el tiempo llegará a borrar. A mis contados amigos, David Castañeda, Renzo Gutierrez, Valeria Villar, Camila Bravo, Macarena Hidalgo, Diana Cubas y Jhon Zumaeta, por ser faros en los larguísimos días de poca luz. A mi familia, por su fe silenciosa en mi, que de alguna forma me sostuvo. A Yulissa Vásquez, por imponer el orden, por su cariño y su amistad. Y muy especialmente a quienes me dieron en la ciencia una forma de mirar el mundo con asombro, de dudar con respeto y de buscar con esperanza, a la Dra. Cristina Guerra, Dr. Jorge Arévalo, Dr. Daniel Guerra y Dr. Daniel Clark.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, mi abuelo Aparicio Maravi, mi padre Rodrigo Maravi, mi madre Zonia Jaime, mi tía Rosario Maravi, mi hermano Rodrigo y mis hermanas Felisa, Benigna y Zonia. Por cultivar las fuertes raíces que me sostienen hoy en día, por su amor incondicional, su paciencia y su fe en mi.

A mis amigos, por su complicidad y su alegría. A mis maestros y mentores, por su buen ejemplo. A mi universidad, por ser estos 15 años mi casa académica, al laboratorio 218, el espacio donde mi curiosidad encontró propósito, donde la disciplina se hizo vocación, y donde comprendí que la ciencia florece cuando se cultiva con compromiso y humanidad.

A todos los lectores de esta tesis.

El conocimiento no termina en estas páginas; apenas comienza el viaje.

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

CONCYTEC - Programa Nacional de Investigación Científica y Estudios  
Avanzados (Prociencia).

CONTRATO No PE501079376-2022-PROCIENCIA  
al proyecto “Identificación transcriptómica de determinantes celulares  
en la transición *in vitro* de larva metacéstode (cisticerco)  
a gusano adulto en *Taenia solium*”;  
convocatoria del Esquema Financiero E041-2022-01,  
“PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN BÁSICA”

**Beca Cobián 2023 para estudios de posgrado**

Facultad de Ciencias e Ingeniería



### DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	MARAVI JAIME JOSE DEL CARMEN

(Agregar filas adicionales si hay más autores)

Pertencientes al programa de la **MAESTRÍA EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**, autores del trabajo titulado: **LA ESPECIFICACIÓN DEL POLO ANTERIOR Y POSTERIOR DEL METACÉSTODE (CISTICERCO) DE *Taenia solium*, MEDIADA POR LA VÍA DE DESARROLLO WNT, COMO PASO CRUCIAL PARA SU DESARROLLO**, el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el grado de **MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR** bajo la modalidad de **TESIS**.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	GUERRA GIRALDEZ CRISTINA	FACI	MAESTRÍA
2.	GUTIERREZ LOLI RENZO MARCELO	FACI	MAESTRÍA

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **11%**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **2823511026**; fecha de entrega: **21-11-2025**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: **Lima, 21 de noviembre de 2025**

Asesora

Cristina Guerra Giraldez

N° DNI: 08274402

ORCID: 0000-0002-9287-9838

Co-asesor

Renzo Marcelo Gutiérrez Loli

N° DNI: 71950802

ORCID: 0000-0001-6466-5288

## ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ESTADO DEL ARTE	2
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	15
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	16
IV.	RESULTADOS	26
V.	DISCUSIONES	49
VI.	LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES	62
VII.	CONCLUSIONES	63
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
IX.	ANEXOS	

## RESUMEN

La evaginación del escólex del metacéstodo de *Taenia solium* permite su fijación en el intestino humano y su desarrollo hacia la forma adulta. Se utilizó qPCR y el análisis de datos transcriptómicos para estudiar la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina en la especificación de los polos anterior y posterior del cisticerco durante este proceso. Para ello, se indujo con ácido taurocólico la evaginación del escólex. Esto permitió definir las fases pre-evaginación (PRE) y evaginación (EV) como momentos morfológica y molecularmente diferenciables.

Los genes *wnt1*, *wnt11a*, *sfrp*, *groucho*, *tcf* y *gsk3* se sobreexpresan en la fase EV, y hacia estadios más avanzados, lo que sugiere una activación regulada de la vía Wnt. Este patrón es consistente con lo observado en otros céstodos como *Hymenolepis microstoma*, *Hymenolepis diminuta* y *Echinococcus multilocularis*, donde estos genes participan en la especificación del eje anteroposterior, el mantenimiento de la proliferación celular y la transición hacia la formación del estróbilo. La expresión de *h2b* indicó mayor actividad proliferativa antes de la evaginación del escólex, y la expresión constante del gen *argonaute* sugiere el mantenimiento activo de células germinales durante el desarrollo del cisticerco, similar a lo reportado en *Echinococcus multilocularis*.

El inhibidor de Wnts IWP-3 no produjo efectos morfológicos notorios. Sin embargo, en EV se evidenció una disminución significativa en la expresión de *wnt1*, *axin* y *argonaute* con la concentración más alta de IWP-3.

Finalmente, se evidenció que el transporte de los cisticercos desde la extracción del músculo del cerdo (RE) hasta el laboratorio (RL) afecta la expresión génica,

probablemente como respuesta al cambio de ambiente y preparación para la evaginación del escólex. Este trabajo consolida herramientas experimentales y moleculares para estudiar el desarrollo temprano de *T. solium*, y plantea nuevas estrategias para explorar su regulación genética y posibles blancos terapéuticos.

**Palabras clave:** *Taenia solium*, *Evaginación del escólex*, *Vía canónica de Wnt*, *Especificación anteroposterior*, *Células germinales*.

## ABSTRACT

The evagination of the scolex from the metacestode of *Taenia solium* allows its attachment to the human intestine and development toward the adult form. The Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway was studied during the specification of the anterior and posterior poles of the cysticercus, using qPCR and transcriptomic data analysis. To achieve this, scolex evagination was induced with taurocholic acid, enabling us to define the pre-evagination (PRE) and evagination (EV) phases as morphologically and molecularly distinct moments.

The genes *wnt1*, *wnt11a*, *sfrp*, *groucho*, *tcf*, and *gsk3* are overexpressed in the EV phase and in later stages, suggesting a regulated activation of the Wnt pathway. This pattern is consistent with what has been observed in other cestodes, such as *Hymenolepis microstoma*, *Hymenolepis diminuta*, and *Echinococcus multilocularis*, where these genes participate in the specification of the anteroposterior axis, maintenance of cell proliferation, and transition toward strobilar formation. Expression of *h2b* indicates greater proliferative activity before evagination. The constant expression of *argonaute* suggests the active maintenance of germ cells during cysticercus development, similar to reports in *Echinococcus multilocularis*.

The Wnt inhibitor IWP-3 did not produce noticeable morphological effects, possibly due to limitations in permeabilization or concentration. However, in the EV phases, a significant decrease was observed in the expression of *wnt1*, *axin*, and *argonaute* at the highest concentration of IWP-3.

Finally, it was demonstrated that the transportation time to the laboratory after extraction from pig muscle affects gene expression, likely as a response to environmental changes and preparation for evagination. This work consolidates experimental and molecular tools for studying the early development of *T. solium* and proposes new strategies to explore its genetic regulation and possible therapeutic targets.

**Keywords:** *Taenia solium*, *Scolex evagination*, *Canonical Wnt pathway*, *Anteroposterior specification*, *Germinal cells*.

## I. INTRODUCCIÓN:

El ciclo de vida de *Taenia solium*, causante de la teniasis y la cisticercosis, implica la metamorfosis del estadio larval (metacéstode o cisticerco) hasta el adulto intestinal que desarrolla cientos de proglótides sucesivas (estróbilo) donde se producen cientos de miles de huevecillos infecciosos. Las proglótides son segmentos hermafroditas, las más distales al escólex son proglótides grávidas, las más maduras (De Coster et al., 2018; White et al., 2018; García et al., 2020). Esta transición requiere una reorganización morfofuncional, que tiene como primer desafío la evaginación del escólex. Para ello, es necesaria la correcta especificación de los ejes corporales, en particular el eje anteroposterior, como se ha identificado en modelos de céstodos como *Hymenolepis microstoma* y *H. diminuta* (Koziol et al., 2014; Koziol et al., 2016; Jarero et al., 2024; Nanista et al., 2025).

En modelos de desarrollo ampliamente estudiados, como vertebrados, cnidarios, y platelmintos de vida libre, se ha demostrado que la vía de señalización Wnt es un regulador clave en la especificación de la polaridad corporal, la regionalización de tejidos y la regeneración (Holstein, 2008; Petersen et al., 2009; Hikaza et al., 2013). En platelmintos como *Schmidtea mediterranea*, *Hymenolepis microstoma*, *Hymenolepis diminuta*, la activación diferencial de componentes de la vía canónica de Wnt es esencial para definir la identidad posterior, mientras que su represión es clave para establecer estructuras anteriores y posteriores (Gurley et al., 2008; Umesono et al., 2013; Jarero et al., 2024; Nanista et al., 2025). Sin embargo, a pesar de la relevancia biomédica de *T. solium*, los mecanismos moleculares que

determinan la polaridad corporal del parásito durante su desarrollo siguen siendo escasamente comprendidos y constituyen un vacío en el conocimiento de su biología.

Elucidar si esta vía está funcionalmente conservada y cómo participa en la organización del eje anteroposterior del metacéstode de *Taenia solium* representa un avance conceptual en la biología evolutiva del desarrollo de parásitos, y una oportunidad para identificar posibles blancos moleculares que regulan la transición al estadio adulto, con implicancias en el control de su desarrollo y transmisión (Olson, 2008; Koziol et al., 2016). Este estudio busca investigar la especificación del polo anterior y posterior del cisticerco de *T. solium* en la evaginación del escólex, abordando la expresión de genes asociados a la vía canónica de Wnt.

## **II. ESTADO DEL ARTE:**

### **A. Aspectos generales e importancia en salud pública**

*Taenia solium* es un platelminto parásito obligatorio causante de la teniasis y cisticercosis, enfermedades tropicales desatendidas (NTDs). El ser humano puede consumir carne de cerdo infectado mal cocida con uno o más cisticercos (larvas metacéstodes, o *Cysticercus cellulosae*). En estas vesículas blanquecinas llenas de fluido se encuentra el escólex invaginado, con sus ventosas y rostelo (corona de ganchos), seguido del cuello del parásito. Al llegar al duodeno, el escólex emerge de su vesícula en un proceso de evaginación, que es estimulado por las sales biliares y enzimas estomacales del hospedero. Generalmente, solo uno de los metacéstodes con escólex evaginado se mantiene adherido al epitelio del duodeno y se convierte, eventualmente, en parásito adulto (Smyth et al., 1989; Pawlowski, 2002).

El parásito adulto consta de un estróbilo (parte del cuerpo del parásito que inicia al final del cuello hasta el extremo posterior y está conformado por proglótides) en constante renovación, por un proceso denominado estrobilación, que contempla la formación y maduración de proglótides. Las proglótides albergan los órganos reproductivos de este parásito hermafrodita, que sirven para producir sus huevecillos que son diseminados en las heces del hospedero definitivo. El ser humano o los cerdos, al ingerir alimentos contaminados con los huevecillos, serán hospederos intermediarios (Pawlowski, 2002; García et al., 2020).

### **B. Desarrollo: activación y crecimiento del cisticerco**

Los huevecillos migran por el torrente sanguíneo a diferentes órganos y músculos, donde atraviesan una metamorfosis a larva metacéstode (cisticerco), produciendo la cisticercosis. Cuando el cisticerco se desarrolla en el sistema nervioso central se denomina neurocisticercosis (Hossain et al., 2023). La neurocisticercosis es responsable de casi el 30% de casos de epilepsia adquirida en países endémicos, donde, además, es frecuente encontrar condiciones sanitarias inadecuadas (OMS, 2022).

Dentro del huevecillo de *T. solium* se encuentra el estadio larval conocido como oncósfera. Una vez que el huevecillo es ingerido, madura y eclosiona, liberando la oncósfera. En los tejidos a los que migra (frecuentemente músculos y sistema nervioso) se desarrollará la post-oncósfera, que ya presenta las ventosas y el rostelo, aunque invaginados y no evertidos. La larva metacéstode se formará a partir de la post-oncosfera manteniendo el escólex invaginado. El rostelo y ventosas del escólex invaginado se van reposicionando hasta su evaginación, externalizando así

el escólex evertido, cuello y región estrobilar (Slais, 1970; Pawlowski, 2002; Chile et al., 2016).

La evaginación sería dirigida por la proliferación constante de la región posterior del cisticerco. Esta región es bastante específica, y empieza en la base del escólex, como se ha observado en los modelos de estudio de desarrollo de céstodos *Echinococcus multilocularis* e *Hymenolepis microstoma* (Koziol et al., 2016; Rozario et al., 2019). El cuello es esta región ubicada inmediatamente debajo de las ventosas y rostelo del cisticerco, que va desarrollándose, elongándose, creciendo, según transcurre el desarrollo del metacéstode evaginado hacia el estadio adulto. Debajo del cuello, se forma la región de estrobilación, donde se desarrollarán las proglótides (Slais, 1970; Pawlowski, 2002).

El metacéstode de *T. solium* es comparable con el cisticercoide de *Hymenolepis microstoma* y la hidátide de *Echinococcus multilocularis*. En estos modelos de estudio de los céstodos, el desarrollo desde las larvas metacéstode (cisticercoide e hidátide, respectivamente) hasta sus estadios adultos presentan similitudes con el desarrollo del cisticerco de *T. solium* (Koziol et al., 2016; Rozario et al., 2019). Sin embargo, para comprender el desarrollo de *T. solium*, la información extrapolada de estos modelos podría ser limitada por las características propias de *T. solium*, como la longitud que puede alcanzar el estadio adulto (3-4 metros en promedio), comparado con los 2-7 milímetros de longitud del estadio adulto de *Echinococcus*, o los aproximadamente 60 cm de *Hymenolepis*, además de las diferencias con sus hospederos. La larva metacéstode de *T. solium* tiene un desarrollo característico, un

escólex evaginado notablemente más grande, con una región posterior que continúa creciendo extensamente (CDC, 2019; CDC, 2024).

### **C. Células germinativas, marcadores moleculares**

En el proceso de maduración de los protoescólices invaginados de *Echinococcus multilocularis*, y la progresión del desarrollo del metacéstode de *Hymenolepis microstoma* (Olson et al, 2018), se ha identificado la región del cuello de los gusanos adultos como una región generativa, en la que se describe la expresión localizada de varios factores de transcripción asociados con la proliferación, especificación y diferenciación celular desde las primeras etapas de desarrollo (Koziol et al., 2014, Olson et al., 2018, Montagne et al, 2023). Hay poblaciones de células madre, conocidas como células germinativas, que son similares a los neoblastos de las planarias y otros platelmintos, restringidas a esta región (Koziol, et al., 2016).

Para identificar el comportamiento de estas células germinativas en el desarrollo posterior del cisticerco de *Taenia solium* durante la evaginación, se ha identificado como marcadores los genes *nanos* y *argonaute*. Estos son marcadores moleculares de la línea germinal en muchos modelos, que también se expresan en células madre multipotentes de varios linajes metazoos como planarias, *Hymenolepis* y *Echinococcus* (Tsai et al., 2013; Jarero, 2018; Koziol et al., 2014).

Las células germinativas deben proliferar y diferenciarse durante el proceso de desarrollo de *T. solium*. La replicación de ADN mediante la mitosis es indispensable para la proliferación celular. Para identificar la actividad replicativa en platelmintos parásitos y de vida libre, se utilizan marcadores celulares

conservados como el componente 2 del complejo de mantenimiento de minicromosomas (*mcm2*) e histona H2B (*h2b*) (Rozario et al., 2019). Dado que, en células en proliferación, la transcripción de genes de histonas como H2B aumenta, sobre todo en la fase S, la expresión de *h2b* se utiliza para extrapolar la actividad proliferativa durante la evaginación del escolex.

#### **D. Vías de señalización en el desarrollo**

El desarrollo de los organismos multicelulares está regulado para que las células proliferen, migren, se diferencien y formen tejidos en el lugar y momento correspondientes. Las vías celulares Hedgehog (Hh), Notch, y Wnt son las principales vías de señalización que conducen el desarrollo de un organismo desde un cigoto unicelular hasta un organismo multicelular regulando los procesos de proliferación, diferenciación y migración celular (Kumar et al., 2021). Estas vías de señalización abarcan nichos de células madre en las etapas embrionarias de desarrollo, que participan también en los procesos de maduración.

En platelmintos, estas son vías celulares conservadas, implicadas en múltiples procesos, como la definición de los ejes de desarrollo anterior y posterior (anteroposterización (AP)) (Almuedo et al., 2012; Tsai et al., 2013; Jarero, 2018). En céstodos, el crecimiento continuo del extremo posterior en el adulto durante la estrobilación requiere de una definición precisa del eje anteroposterior y una posible actividad sostenida de células germinativas, procesos en los que la vía Wnt podría desempeñar un papel clave (Nanista et al., 2025).

La señalización Wnt se divide en tres principales vías: la vía canónica (Wnt/ $\beta$ -catenina), la vía de polaridad celular planar (Wnt/PCP), y la vía de dependiente de

calcio (Wnt/Ca<sup>2+</sup>), divididas así según si favorecen o no la activación de la  $\beta$ -catenina. La vía canónica está principalmente involucrada en la regulación del desarrollo embrionario, la proliferación celular y la diferenciación, siendo crucial para la formación de órganos y tejidos. Esta vía implica la estabilización y acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma, que luego se transloca al núcleo para activar la transcripción de genes específicos. La vía PCP está asociada con la orientación celular, y afecta procesos como la migración celular, la organización del citoesqueleto, la elongación de tejidos durante el desarrollo y la formación de estructuras multicelulares ordenadas. La vía de calcio involucra la liberación de calcio intracelular, modula la activación de proteínas dependientes de calcio, como la calmodulina y la proteína quinasa C, y participa en la regulación de la contracción muscular y la secreción de neurotransmisores y hormonas. (Petersen et al., 2009, Routledge et al., 2019, Mehta et al., 2021, Qin et al., 2024).

La vía canónica Wnt dependiente de  $\beta$ -catenina tiene un papel conservado en la especificación de los ejes anterior-posterior (AP) en diversos vertebrados e invertebrados como los platelmintos e hidras, en los que la señalización Wnt posterior y la inhibición Wnt anterior son principios unificadores de su desarrollo (Petersen et al., 2009). En los platelmintos *Echinococcus*, *Hymenolepis* y planarias, por ejemplo, algunos de los genes que codifican proteínas de esta vía, llamados genes de control posicional, se expresan en el polo posterior (*wnt1*, *wnt11b*, *fzb*) o anterior (*sfrp*, *sfl*) (Nanista et al., 2025; Jarero et al., 2024; Koziol et al., 2016; Almuedo et al., 2012).

## E. Mecanismos de las vías de señalización Wnt

En ausencia del ligando (Wnt), el receptor de Wnt (Frizzled/Fz) y el correceptor LRP5/6 permanecen en un estado inactivo en la membrana plasmática. En el citoplasma, los componentes del complejo de destrucción (GSK-3 $\beta$ , APC, CK-1, Axin) se unen y fosforilan a  $\beta$ -catenina, lo que conlleva a su ubiquitinación y degradación proteasomal. En el núcleo, el represor transcripcional Groucho (Gro) se une al cofactor TCF y mantiene inactivada la expresión de genes mediada por TCF/Wnt. La unión de Wnt al receptor Fz recluta al co-receptor LRP5/6, esto conduce a la inactivación, mediada por Disheveled (Dsh), del complejo de destrucción y la acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma.  $\beta$ -catenina se importa al núcleo, donde reemplaza a Gro y forma un complejo activador transcripcional que permite la expresión de genes mediada por TCF/Wnt (Routledge et al., 2019; Mehta et al., 2021).

La señalización de Wnt está modulada por varios inhibidores y activadores conservados. Entre los principales inhibidores de Wnt se incluye a las familias Dkk, SFRP, y WIF. Dkk1 y Dkk2 inhiben específicamente la cascada de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina uniéndose con alta afinidad a la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP) 5/6. Los SFRP representan la familia más grande de inhibidores de Wnt secretados, presentan el mismo dominio de unión que Frizzled (Fz). Los SFRP, WIF-1 y Cerberus secuestran a Wnt, inhibiendo así la señalización Wnt, tanto canónica como no canónica. Los sFRP también pueden inhibir la señalización Wnt canónica y no canónica uniéndose directamente a Fz (Cruciat, et al., 2013). Ver Anexo 1 para mayor detalle de la vía canónica de Wnt.

La proteína carboxilesterasa Notum también es un regulador negativo de la señalización Wnt, que actúa eliminando un grupo palmitoleato de Wnt esencial para la activación de esta vía mediante el reconocimiento con su receptor Fz (Bayle et al., 2021).

En la vía Wnt/PCP, Wnt se une al receptor Fz y conduce al reclutamiento de Dishevelled (Dsh), a partir de allí, este complejo, junto con otros correceptores como el receptor tipo tirosina quinasa (Ror) y la tirosina-proteína quinasa (Ryk) activan quinasas efectoras como RhoA/ROCK, que conducen a la polimerización de la actina. Las proteínas Wnt también pueden inducir la activación de la vía de la quinasa N-terminal (JNK) c-Jun a través de los complejos de proteínas Fz-Dsh-Ror/Ryk y Vangl-Ror/Ryk (Mehta et al., 2021; Qin et al., 2024).

En presencia del ligando Wnt, el correceptor LRP5/6 forma un complejo con Frizzled unido a Wnt. Esto conduce a la activación de Disheveled (Dvl) mediante fosforilación secuencial, poliubiquitinación y polimerización, lo que desplaza GSK-3 $\beta$  de APC/Axin. La  $\beta$ -catenina estabilizada se transloca al núcleo a través de Rac1 y otros factores, donde se une a los factores de transcripción LEF/TCF, desplazando a los correceptores y reclutando coactivadores adicionales para los genes blanco de Wnt.

En la vía Wnt/Ca<sup>2+</sup> el receptor Fz recluta los correceptores Ror/Ryk tras la unión de ligandos Wnt que activan las proteínas Dsh y G( $\alpha$ , $\beta$ ) en la membrana formando un grupo activo. Esto da como resultado la activación de la fosfolipasa-C (PLC), que conduce a la liberación de iones de calcio intracelulares del retículo endoplasmático (RE). Frente a la disminución de los niveles de calcio en el RE y el aumento de este

en el citoplasma, se activan diferentes vías mediadas por efectores posteriores como calcineurina (Cn), proteína quinasa II dependiente de calmodulina (CAMK II) y proteína quinasa C (PKC) (Routledge et al., 2019; Mehta et al., 2021; Qin et al., 2024).

#### **F. Vía Wnt/ $\beta$ -catenina en platelmintos modelos**

La tesis doctoral de Francesca Jarero para University College London (2018) y la publicación de Jarero et al., 2024, establecen en el modelo de laboratorio de *Hymenolepis microstoma* los elementos de la vía canónica de Wnt expresados en el polo anterior (región orientada hacia el rostelo y las ventosas) y posterior (región del cuello, región estrobilar) del cisticercoide. Tinciones basadas en la detección de ácidos nucleicos mediante la hibridación *in situ* de montaje completo (WMISH, de sus siglas en inglés) mostraron claramente la expresión de genes de proteínas antagonistas de la vía Wnt, como el gen *sfrp* y su parólogo *sfl*, en el polo anterior del cisticercoide, y de genes marcadores de posterización (*wnt1*, *wnt11A* y el gen del receptor Frizzled 4/B (*fz4/B*)) en el polo posterior (Jarero, 2018; Jarero et al., 2024).

De forma similar, Koziol y colaboradores identificaron que los patrones de expresión de los genes de los mismos elementos de la vía canónica de Wnt implicados en la definición del polo de desarrollo anterior y el polo de desarrollo posterior de *Hymenolepis microstoma* se repetían en el desarrollo de la hidátide de *Echinococcus multilocularis* (Anexo 2) (Koziol et al., 2016). Igualmente, en planarias, *wnt1*, *wnt11* y *fz4/B* se expresan en el polo posterior, los *sfrp* en la región

anterior, y la expresión de  $\beta$ -catenina es ubicua en todo el cuerpo de la planaria (Anexo 3) (Almuedo et al., 2012).

En la planaria *Schmidtea mediterranea* con la cola amputada, el *knock down* con ARN de interferencia de *smed-wnt-1* o *wnt11-2* provoca la regeneración de dos cabezas, una reemplazando a la cola. La señalización de Hh en planarias desencadena la especificación posterior al activar la transcripción de *wnt-1* en células diferenciadas en el extremo posterior, luego la señal de especificación posterior se transmite aún más mediante la inducción de *wnt11-2* en células madre a través de la señalización Wnt canónica dependiente de  $\beta$ -catenina (Adell et al., 2009; Yazawa et al., 2009).

En *Hymenolepis microstoma*, el uso de IWP-3 (Inhibitor of Wnt Production-3), que inhibe la palmitoilación de Wnt mediada por la aciltransferasa Porcupine, necesaria para exportar Wnt fuera de la célula para su reconocimiento por Fz, provocó el desarrollo defectuoso de los cisticercoides de *H. microstoma*; las larvas mostraron una anteriorización, con expresión de *sfrp* en ambos polos, anterior y posterior (Chen et al., 2009; Jarero, 2018).

### **G. Aspectos conservados de la vía Wnt en *Taenia solium***

Los genomas de referencia de los céstodos *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus granulosus*, *Taenia solium*, e *Hymenolepis microstoma* han permitido identificar genes ortólogos de los componentes de la vía Wnt canónica en el genoma de *T. solium*, comprobando que esta vía se encuentra bien conservada (Tsai et al., 2013). Un estudio en el que se revisó la evolución de la vía Wnt en platelmintos mostró que han perdido varios *wnt*, conservando solo *wnt1*, *wnt2*,

*wnt4*, *wnt5* y *wnt 11* (Holstein, 2012). Estos *wnt* coinciden con los reportados en la lista de genes ortólogos de Tsai y colaboradores. Los antagonistas de la vía de señalización de Wnt identificados incluyen un gen ortólogo de *sfrp* y su parólogo *sfl*, y un gen ortólogo de *wif*, ambos identificados en *T. solium* (Tsai et al., 2013). Los receptores de Wnt identificados fueron de la familia de Fz: A, 4/B (Jarero, 2018), C, D y E (Tsai et al., 2013). El gen de *porcupine* no ha sido anotado en el genoma de *Taenia solium*, pero sí en otros céstodos como *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus granulosus*, e *Hymenolepis diminuta* (Tsai et al., 2013). También se ha identificado un homólogo de *porcupine* en *S. mediterranea* (Cleland et al., 2025). En general, en platelmintos está poco caracterizada a nivel génico y de proteína. Porcupine está empezando a estudiarse más, recientemente, en enfermedades asociadas con la desregulación de la vía de señalización de Wnt, especialmente en formas de cánceres (Raeisi et al., 2022; Shi et al., 2025). Los ortólogos de los elementos de las vías no canónicas de Wnt, Wnt/Planar Cell Polarity (PCP) y Wnt/Ca<sup>2+</sup>, están conservados en *T. solium*, y han sido reportados por Tsai y colaboradores (Tsai et al., 2013). Estas vías son independientes de  $\beta$ -catenina, pero tienen elementos en común con la vía canónica de Wnt. Por otro lado, los ligandos Wnt más importantes de la vía canónica pueden no ser los principales en las vías no canónicas; por ejemplo, Wnt5 es el ligando más relevante en la vía no canónica (Qin et al., 2024).

## **H. Cultivo y biología molecular de cisticercos en el laboratorio**

En el laboratorio de Proliferación Celular y Regeneración de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, se está concluyendo el proyecto de investigación básica

“Identificación transcriptómica de determinantes celulares en la transición *in vitro* de larva metacéstode (cisticerco) a gusano adulto en *Taenia solium*” (PE501079376-2022, SIDISI 209290). Mediante este proyecto se ha realizado la transcriptómica de cisticercos enteros de *Taenia solium* antes de la evaginación del escólex, cisticercos con escólex recién evaginado, y cisticercos tras hasta 120 h en cultivo. Los cisticercos fueron recolectados de tejido muscular porcino naturalmente infectado, transportados desde Tumbes por vía aérea y por sistema de encomienda hasta el laboratorio en Lima (~16 h de transporte), y posteriormente cultivados *in vitro* en medio RPMI a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>, en presencia o ausencia de ácido taurocólico, para inducir la evaginación del escólex (Castaneda-Carpio et al., 2025).

Este diseño experimental es similar al que se utilizó en esta tesis para evaluar la expresión de los elementos de la vía canónica de Wnt en la evaginación del cisticerco; el análisis del transcriptoma permitió identificar expresión diferencial de elementos de la vía canónica de Wnt entre condiciones, revelando cambios específicos asociados a la activación larval y los primeros pasos de la estrobilación. Los ensayos de qPCR de esta tesis complementan y validan estos resultados, y viceversa. La señalización de Wnt, como ya se ha mencionado, está involucrada en la especificación del eje antero-posterior en las planarias durante su regeneración (Lin et al., 2014; Almuedo et al., 2012). Además, en *E. multilocularis*, está relacionada con la generación del protoescólex y la especificación del eje antero-posterior (Koziol et al., 2016; Montagne et al., 2019); en *E. multilocularis*, *E. granulosus*, *H. microstoma*, *H. diminuta*, *Meoscestoides corti*, y *T. solium* (Rozario

et al., 2019; Paludo et al., 2020; Jarero et al., 2024; Nanista et al., 2025) esta vía también es requerida para la estrobilación.

La presente tesis enfatiza el estudio de la expresión de los elementos de la vía canónica de Wnt en el proceso de evaginación del escólex de cisticercos de *Taenia solium* durante su desarrollo *in vitro*, siendo la expresión de estos elementos clave en la definición de los ejes de desarrollo anterior y posterior. A nivel molecular, se desconoce el comportamiento de los elementos de esta vía de señalización que gatillan el desarrollo de *T. solium* en el transcurso de la evaginación del escólex, evento que es crucial para la progresión de su desarrollo hacia el estadio adulto.

### **III. HIPÓTESIS:**

La expresión de algunos elementos de la vía canónica de Wnt (*wnt1*, *wnt11*, *fzb*, *sfrp*, *sfl*) está relacionada con la delimitación de los polos anterior y posterior de desarrollo. Frente a ello, la expresión de, por lo menos, estos genes de la vía canónica de Wnt, es regulada durante el proceso de evaginación *in vitro* del escólex de *Taenia solium*.

#### **A. Objetivos:**

Objetivo principal: Determinar los elementos de la vía Wnt cuya expresión es regulada durante la evaginación del escólex del cisticerco de *Taenia solium*.

#### **B. Objetivos específicos:**

1. Validar las condiciones experimentales de colecta, traslado y cultivo para inducir la evaginación *in vitro* del escólex de cisticercos de *T. solium*, para garantizar un diseño experimental adecuado para estudiar eventos tempranos del desarrollo del cisticerco no evaginado a adulto.
2. Establecer una relación funcional entre la actividad de la vía Wnt y la definición axial del parásito, comparando mediante PCR de transcripción reversa en tiempo real (RT-qPCR) la expresión relativa de los elementos de la vía canónica de Wnt entre cisticercos de *T. solium* antes y después de evaginar el escólex.
3. Evaluar si la vía canónica de Wnt participa activamente en la regulación transcripcional durante la evaginación mediante el análisis morfológico y

de expresión de transcritos en cisticercos expuestos a la inhibición de la secreción de Wnts con el inhibidor de Porcupine IWP-3.

#### **IV. MATERIALES Y MÉTODOS:**

##### **A. Diseño general**

El material de partida fueron cisticercos con escólex no evaginado, con aproximadamente 19 horas de haber sido extraídos del músculo de dos cerdos infectados naturalmente con cisticercosis. Los cisticercos recolectados fueron cultivados *in vitro* individualmente. El cultivo se realizó con 0.1% de ácido taurocólico (AT), en presencia y ausencia del inhibidor de la secreción de Wnts, IWP-3 (*Inhibitor of Wnt Production-3*). El ácido taurocólico actúa como inductor de la evaginación del escólex (Smyth et al., 1989), que además sincroniza este evento, permitiendo un mejor seguimiento del desarrollo del cisticerco entre antes y después de evaginar el escólex. El cultivo con ácido taurocólico simula el escenario natural de desarrollo del cisticerco en el intestino delgado humano.

Esta investigación no busca responder los mecanismos involucrados en el estímulo del ácido taurocólico en la evaginación del escólex, sino identificar los genes de la vía canónica de Wnt cuya expresión estaría vinculada a la progresión del desarrollo de cisticerco a través de la especificación del eje antero-posterior. Con el proyecto “Identificación transcriptómica de determinantes celulares en la transición *in vitro* de larva metacéstode (cisticerco) a gusano adulto en *Taenia solium*” (SIDISI 209290) se obtuvo el transcriptoma de diferentes momentos del desarrollo del cisticerco *in vitro*. El análisis de expresión diferencial, a partir de este

transcriptoma, de los genes asociados a la vía canónica de Wnt, se incluye como parte de los resultados obtenidos.

### **B. Cultivo de cisticercos para evaluar la expresión relativa de genes asociados a la vía canónica de Wnt mediante qPCR.**

Se utilizaron cisticercos frescos extraídos asépticamente de los tejidos de dos cerdos con cisticercosis adquirida de forma natural, procedentes del Centro de Salud Global de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) en Tumbes, Perú. Al momento de la colecta, un grupo de cisticercos recién extraídos del músculo de cerdo (cisticercos recién extraídos no evaginados (RE)), se colocaron en 1 mL de la solución preservante RNAlater (R-0901, Sigma Aldrich) en tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL para preservar el ARN de las muestras. El resto de los cisticercos, todos sin evaginar el escólex, se colocaron en tubos Falcon con un medio de transporte (solución salina tamponada con fosfato (PBS; 0.1 M, pH 7.4) suplementado con dilución 1X de antibiótico-antimicótico Gibco™ (100X), a una concentración final equivalente a 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0.25 µg/ml de anfotericina B..

Antes de colocar a los parásitos en RNAlater o medio de transporte para su envío aéreo a la sede central de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en Lima, Perú, con bisturíes estériles se aseguró la eliminación completa del tejido porcino circundante. Además, los quistes se lavaron tres veces en tubos Falcon estériles de 50 mL utilizando medio de transporte como solución de lavado. Cada lavado se hizo invirtiendo suavemente el tubo varias veces durante 3 minutos, reemplazando la solución entre lavados. Los quistes fueron transferidos a tubos Falcon estériles

de 50 mL (hasta 100 quistes por tubo), con al menos el doble de su volumen de medio de transporte fresco, y empacados en un recipiente aislante que se mantuvo por debajo de 12-15 grados centígrados hasta su llegada al laboratorio de proliferación celular y regeneración, en los laboratorios de la UPCH. Los cisticercos de la condición RE se almacenaron y mantuvieron a -20°C directamente, en cuanto llegaron al laboratorio y hasta su uso.

Un total de 156 cisticercos se colocaron de manera individual en 156 pocillos de placas de cultivo Costar® de 24 pocillos claros de fondo plano (Corning®, Corning, NY, USA), cada uno con 1.5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 filtrado y esterilizado (pH 7.2 – 7.4), suplementado con 2 g/mL de NaHCO<sub>3</sub> (Merck®, Burlington, MA), 1.6 μM de β-mercaptoetanol y el Antibiótico-Antimicótico Gibco™ en las concentraciones descritas anteriormente, con 0.1% de ácido taurocólico (AT) (Sigma, St. Louis, MO, USA), a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en una incubadora estéril (VWR Symphony Incubator) durante un máximo de cinco días. El medio de cultivo se reemplazó cada 24 horas. 24 de estos cisticercos cultivados con 0.1% AT se mantuvieron por 120 horas en cultivo al mismo tiempo que 24 quistes adicionales solo con el medio de cultivo, sin AT, para elaborar una curva de evaginación que evidencie la actividad del ácido taurocólico. Se registró el número de horas transcurridas en cultivo hasta que los cisticercos evaginaron el escólex. Los cisticercos de la curva de evaginación se fijaron en 4% FND y se almacenaron a -20°C en 1.5 mL de etanol absoluto.

Además de 0.1% de AT, 33 quistes se incubaron con 1% DMSO (ATD), 33 se incubaron con 10 μM IWP-3 (AT10), y otros 33 se incubaron con 40 μM IWP-3

(AT40). IWP-3 se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar una solución stock de 10 mM, la cual posteriormente se diluyó para obtener concentraciones de trabajo de 10  $\mu$ M y 40  $\mu$ M. Cada uno de los 4 grupos de 33 quistes se subdividió de la siguiente manera, dependiendo del momento en el que se colectaron las muestras: 11 cisticercos sin evaginación del escólex que se mantuvieron 6 horas en cultivo (definidos como las condiciones 6AT, 6ATD, 6AT10, 6AT40, respectivamente), 11 cisticercos sin evaginación del escólex que se mantuvieron 24 horas en cultivo (cisticercos con evaginación del escólex inminente, definidos como las condiciones 24AT, 24ATD, 24AT10, 24AT40, respectivamente), 11 cisticercos con el escólex recién evaginado (cisticercos que evaginaron el escólex entre las 25h y las 120h de cultivo, definidos como las condiciones EVAT, EVATD, EVAT10, EVAT40, respectivamente) (Figura 1. Diseño experimental).

Cinco de los 11 cisticercos de cada subgrupo se fijaron en 4% FND y se almacenaron a -20°C en 1.5 mL de etanol absoluto; a dos de estos se les cultivó con 50  $\mu$ M de 5-Ethinil-2'-deoxiuridina (EdU) además de su respectiva condición. Los quistes fijados se reservaron para hibridaciones *in situ* de montaje completo (*Whole Mount In Situ Hybridization*, WMISH) que no forman parte de la presente tesis. Los 6 cisticercos restantes de cada condición se colocaron en tubos Eppendorf con 1 mL de RNAlater (R-0901, Sigma Aldrich) para extraer su ARN. Después del cultivo, todos los parásitos fueron lavados con 1X PBS para eliminar el medio residual y preservados a -20°C.

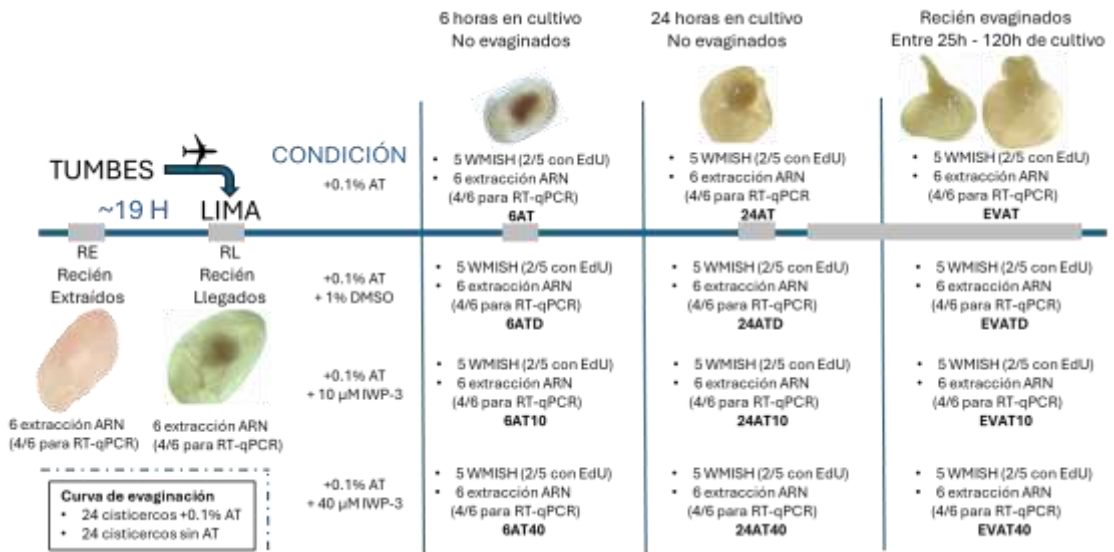


Figura 1. Distribución de las muestras del diseño experimental.

### C. Extracción de ARN y generación de ADNc.

Se extrajo el ARN de 84 (cisticercos), es decir, de 6 cisticercos de cada una de las 14 condiciones (RE, RL, 6HAT, 6HATD, 6HAT10, 6HAT40, 24HAT, 24HATD, 24HAT10, 24HAT40, EVAT, EVATD, EVAT10, EVAT40), incluyendo RE (almacenados en RNAlater (R-0901, Sigma Aldrich)) y RL (llegados al laboratorio en PBS pero no cultivados). Se utilizó el kit Quick-RNA Miniprep Plus (Zymo Research, R1058). Cada cisticercos preservado se colocó en una placa de Petri estéril y su vesícula fue cuidadosamente retirada con un bisturí estéril, dejando únicamente la porción parenquimatosa (escólex, cuello y eventuales proglótides). Las muestras se lavaron de forma independiente tres veces con agua de grado molecular (Fisher Scientific).

El ARN se aisló siguiendo las instrucciones del fabricante, con ligeras modificaciones, como se describe a continuación: las muestras se sumergieron en 600 µL de DNA/RNA Shield (Zymo Research, R1058) y se homogenizaron con

una punta de homogeneizador de tejido estéril (Omni International, Kennesaw, GA) sobre hielo. Posteriormente, se aplicó un tratamiento con 60 mg de Proteínasa K (Zymo Research, D3001-2-60) durante 30 minutos, al que se adicionó un paso de lavado con 400  $\mu$ L de RNA Wash Buffer (Zymo Research, R1058) antes de la extracción final del ARN. Se realizó un tratamiento con DNasa I (Zymo Research, E1009-A (250 U)), para ello se añadió una mezcla de 5  $\mu$ L de DNasa I (1 U/ $\mu$ L) y 75  $\mu$ L de DNA Digestion Buffer (Zymo Research, R1058) directamente a la matriz de la columna de sílica (Zymo-Spin™ IIICG Columns) que contenía las muestras procesadas, y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente (20-30°C).

La concentración de ARN se midió mediante espectrofotometría con un NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), y aproximadamente 300 ng de ARN fueron cargados en un gel de agarosa al 1.5%, lejía Clorox® al 1%, para verificar su integridad mediante electroforesis (35 minutos a 100 V) en el equipo de electroforesis OmniPAC Midi CS-300V (Clever Scientific) (Anexo 4, bandas 28S y 18S) (Aranda et al., 2012). Se seleccionaron 4 muestras de cada condición en base a la concentración de ARN obtenida y a la relación de absorbancia 260/280, como medida de la pureza de muestras de ácidos nucleicos, considerando los valores más cercanos a 2.0 (Anexo 5).

Se generó ADNc a partir de 400 ng de ARN de cada muestra seleccionada, mediante transcripción inversa utilizando el kit High-Capacity Reverse Transcription Kit (Thermofisher Scientific, Waltham, MA) en un volumen final de 20  $\mu$ L. El protocolo térmico para la reacción fue el siguiente: 15 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C y finalmente 5 minutos a 85°C. El producto se diluyó en alícuotas de 20  $\mu$ L

considerando una cantidad total de ADNc, aproximada, de 100 ng por alícuota. Se almacenaron las muestras de ADNc a -20°C hasta su uso.

#### **D. Diseño de primers y eficiencia de amplificación de genes de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, *notum*, *argonaute-2* y *h2b***

Se identificaron y verificaron las secuencias de ADNc de los genes de *Taenia solium* de interés homólogas con los céstodos *Hymenolepis microstoma* y *Echinococcus spp.* Los componentes de la vía de señalización Wnt (*wnt1*, *wnt11a*, *wnt11b*, *fz4/B*, *sfrp*, *axin-2*, *groucho*, *tcf/lef-1*, *gsk-3*,  $\beta$ -catenina A,  $\beta$ -catenina B) fueron identificados mediante BLAST y análisis de sus dominios proteicos en el estudio comparativo realizado por Tsai et al., en 2013. Las secuencias de *notum*, *argonaute-2*, *h2b*, se obtuvieron a partir de otros trabajos de investigación (Orrego et al., 2024; Rozario et al., 2019, Villar, 2024). Las secuencias de todos genes de interés fueron analizadas nuevamente mediante BLAST e INTERPRO. Las secuencias de los genes están disponibles en la base de datos de WormBase ParaSite (<https://parasite.wormbase.org/>).

Los primers fueron diseñados utilizando Primer3 y BLAST. Para ello, se escogieron las secuencias que cumplieron con los criterios termodinámicos y de tamaño de producto deseado (100-250 pares de bases para qPCR). Los parámetros termodinámicos se evaluaron utilizando la herramienta Oligo Analyzer (OligoAnalyzer™ Tool, <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Para determinar la eficiencia de amplificación de los primers se utilizó la pendiente de una regresión lineal basada en una serie de diluciones del ADNc. Las diluciones se realizaron en un rango de  $10^0$  a  $10^{-3}$ . La eficiencia (E) se determinó utilizando la

ecuación  $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$  (Pfaffl, 2001). Las reacciones de qPCR se realizaron usando el SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Biorad). Para cada reacción de 15  $\mu\text{L}$ , se añadieron primers a una concentración final de 300 nM (forward y reverse), y se utilizaron diluciones de ADNc a partir de 1  $\mu\text{L}$  de ADNc (5 ng).

Las condiciones de ciclado se configuraron en el sistema térmico SLAN-96P Real-Time PCR System (Sansure Biotech) con su propio sistema de PCR en tiempo real. El protocolo de amplificación incluyó: 30 segundos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C. Cada muestra se corrió por triplicado y, al final de cada experimento, se realizó un paso de curva de fusión que abarcó de 60°C a 95°C con incrementos de 0.25°C por segundo. Además, el tamaño y la especificidad de los productos amplificados se confirmaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% de las muestras no diluidas.

Para determinar la expresión relativa de estos genes se utilizó el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001), utilizando la media geométrica de la expresión de los dos genes de referencia más estables. La selección de los genes de referencia se detalla en la siguiente sección.

### **E. Selección de genes de referencia**

La determinación de los genes de referencia idóneos para comparar la expresión relativa de genes entre las condiciones propuestas es parte de un trabajo en conjunto del laboratorio donde se desarrolló esta tesis, hecho con cisticercos provenientes de otro cerdo naturalmente infectado cultivados en condiciones similares a las descritas más arriba. Los grupos de muestras utilizadas para los propósitos de esta

tesis fueron: 8 parásitos no evaginados cultivados durante 6 horas con 0.1% AT (PRE AT), 10 parásitos con evaginación temprana, entre las 24 y 48 horas, cultivados con 0.1% AT (EV AT); y 10 parásitos completamente evaginados cultivados con 0.1% AT durante 120 horas (POST AT).

Brevemente, se evaluó por RT y qPCR la estabilidad de la expresión de 12 genes candidatos a genes de referencia (proteína de unión a la caja TATA (*tbp*), proteína ribosomal L13 (*rpl13*), factor de elongación 1 alfa (*ef1a*), quinasa activada por mitógenos 3 (*mapk3*), beta actina 1 (*βact1*), beta actina 2 (*βact2*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh1*), (*gapdh2*), fosfoglicerato quinasa 1 (*pgk1*), malato deshidrogenasa (*mdh*), subunidad I de la citocromo c oxidasa (*cox1*). comparando los grupos mediante NormFinder, Bestkeeper y deltadelta, con Reffinder y Pfaff; se usó la media geométrica. Las secuencias de estos genes en *Taenia solium* están disponibles en WormBase ParaSite (<https://parasite.wormbase.org/>). Los primers fueron diseñados siguiendo los mismos criterios mencionados en la sección anterior. El tamaño y la especificidad de los productos amplificados se confirmaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5%.

La eficiencia de amplificación de los primers de cada gen de referencia candidato (RG) se determinó mediante el método de diluciones de ADNc, utilizando diluciones seriadas en un rango de  $10^0$  a  $10^{-5}$ . La eficiencia de amplificación se determinó en función de la pendiente utilizando la fórmula ya descrita  $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$  (Pfaffl, 2001). La estabilidad de expresión génica de los genes candidatos se evaluó utilizando los algoritmos de normalización disponibles (geNorm (Vandesompele et al., 2002), Normfinder (Andersen et al., 2004), BestKeeper (Pfaffl et al., 2004) y el método comparativo DeltaCT (Silver et al., 2006)) en el

programa RStudio (R version 4.5.0), con los valores de cq de cada gen (Ver Anexo 6 para código en R, Anexo 7 para datos de promedio de Cqs de las muestras utilizadas). La selección del RG más estable se basó en el cálculo de la media geométrica de la estabilidad de cada gen por cada método.

### F. Método de Pfaffl: expresión relativa de los genes de interés por qPCR.

La expresión relativa de los genes de interés se determinó mediante el método de Pfaffl, utilizando la media geométrica de la expresión de los dos genes de referencia más estables. Este método tiene en cuenta las diferentes eficiencias de amplificación de los genes evaluados y de referencia, permitiendo un análisis más preciso dado que las eficiencias de amplificación de los genes de referencia y los genes evaluados no son iguales. Cada muestra se evaluó por triplicado, para los análisis de expresión se utilizó el promedio de Cq de cada muestra.

Se utilizó la siguiente fórmula para calcular la expresión relativa de cada gen evaluado Pfaffl, 2001; Livak et al., 2010):

$$\frac{E_{gen}^{\Delta Cq_{gen}}}{\left( (E_{ref1}^{\Delta Cq_{ref1}}) * (E_{ref2}^{\Delta Cq_{ref2}}) \right)^{0.5}}$$

Donde:

$E_{gen}^{\Delta Cq_{gen}}$  es la eficiencia de amplificación del gen a evaluar elevado a la diferencia del promedio de Cq del grupo control con el Cq de la muestra.

$E_{ref1}^{\Delta Cq_{ref1}}$  es la eficiencia de amplificación del gen de referencia 1 elevado a la diferencia del promedio de Cq del grupo control con el Cq de la muestra.

$E_{ref2}^{\Delta Cq_{ref2}}$  es la eficiencia de amplificación del gen de referencia 2 elevado a la diferencia del promedio de Cq del grupo control con el Cq de la muestra.

$\left( (E_{ref1}^{\Delta Cq_{ref1}}) * (E_{ref2}^{\Delta Cq_{ref2}}) \right)^{0.5}$  corresponde al cálculo de la media geométrica de los genes de referencia.

## **G. Análisis estadístico**

El análisis de las diferencias en la expresión relativa entre las condiciones de cada gen se evaluó utilizando las pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis y U de Mann-Whitney. El test de Fisher se utilizó para evaluar el efecto del ácido taurocólico sobre la evaginación. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró como estadísticamente significativo en todas las pruebas.

## **V. RESULTADOS**

### **A. Validación de secuencias obtenidas de WormBase ParaSite**

La información en la Tabla 1 es una adaptación del trabajo colaborativo con otros miembros del laboratorio para determinar los genes de referencia en el estudio de la expresión relativa de los genes de *Taenia solium* durante su desarrollo (Maravi et. al; manuscrito en preparación). En las Tablas 1 y 2, se muestran, respectivamente, los números de acceso de las secuencias de ADNc, de los genes de referencia candidatos y los genes de la vía canónica de Wnt (y otros genes de interés), de *T. solium*. En la Tabla 2 se provee los números de acceso identificados por Tsai et al., 2013.

Los dominios identificados en las secuencias de aminoácidos de cada una de las proteínas codificadas por los genes considerados (genes de referencia candidatos y genes de la vía canónica de Wnt, y otros) muestra que los genes han sido identificados (Anexo 8). Además, en la Figura 2 se observa que los primers diseñados amplifican específicamente. En el Anexo 9 se reportan las secuencias de los primers y el tamaño del producto de amplificación esperado para cada gen.

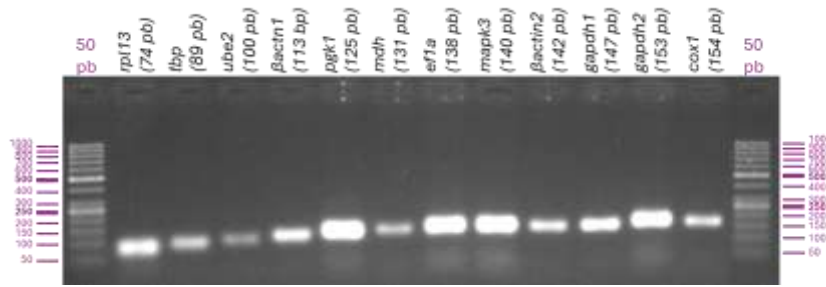
#### **Tabla 1: Secuencias de genes de referencia candidatos**

<b>Gen</b>	<b>Número de acceso</b>	<b>Tamaño secuencia de aminoácidos</b>	<b>UniProtKB <i>T. solium</i></b>	<b>Ortólogos Wormbase Parasite <i>Platelmintos</i></b>
<i>rpl13</i>	TsM_000621100	204	NA	<i>Hymenolepis diminuta</i> TrEMBL A0A0R3SRV7
<i>tbp</i>	TsM_000071900	238	TrEMBL A0A0N7FYW4	<i>Echinococcus multilocularis</i> TrEMBL A0A068YBX9
<i>ube2</i>	TsM_001232600	109	NA	NA
<i>βactin1</i>	TsM_001199400	376	Swiss-Prot P68555	<i>Schistosoma mansoni</i> Swiss-Prot P53471
<i>pgk1</i>	TsM_000796500	399	NA	<i>Schistosoma mansoni</i> Swiss-Prot P41759
<i>mdh</i>	TsM_000048200	332	Swiss-Prot F1C7I4	<i>Hymenolepis diminuta</i> TrEMBL A0A564YSF0
<i>ef1α</i>	TsM_000233800	448	TrEMBL E4WL05	<i>Hymenolepis diminuta</i> TrEMBL A0A0R3SCG6
<i>mapk3</i>	TsM_000447200	361	NA	<i>Taenia asiatica</i> TrEMBL A0A158R8B1
<i>βactin2</i>	TsM_001001400	277	NA	<i>Echinococcus multilocularis</i> TrEMBL A0A068XWU3
<i>gapdh1</i>	TsM_000056400	336	TrEMBL A8R8Q4	<i>Hydatigera taeniaeformis</i> TrEMBL A0A0R3X5Z3
<i>gapdh2</i>	TsM_001083000	338	NA	<i>Schistosoma mansoni</i> Swiss-Prot P20287
<i>cox1</i>	TsM_000401000	279	NA	<i>Hymenolepis nana</i> TrEMBL A0A0R3TB37

**Tabla 2: Secuencias de genes de la vía canónica de Wnt y genes de interés**

<b>Gen</b>	<b>Número de acceso</b>	<b>Tamaño secuencia de aminoácidos</b>	<b>UniProtKB <i>T. solium</i></b>	<b>Ortólogos Wormbase Parasite <i>Platelmintos</i></b>
<i>h2b</i>	TsM_000989300	122	NA	<i>Hymenolepis diminuta</i> TrEMBL A0A0R3SFS0
<i>argonaute-1</i> ( <i>argo</i> )	TsM_000674100	918	NA	<i>Echinococcus multilocularis</i> TrEMBL A0A068XVL9
<i>wnt1</i>	TsM_000159300	507	NA	<i>Schmidtea mediterranea</i> TrEMBL B0LMF6
<i>wnt11a</i>	TsM_000806100	524	NA	<i>Schmidtea mediterranea</i> TrEMBL B0LMF9
<i>wnt11b</i>	TsM_000542700	420	NA	<i>Echinococcus multilocularis</i> TrEMBL A0A087VYR5
<i>fbz</i>	TsM_000459600	765	NA	<i>Echinococcus multilocularis</i> TrEMBL A0A068Y2G6
<i>sfrp</i>	TsM_000954300	440	NA	<i>Echinococcus multilocularis</i> TrEMBL A0A068Y8C1
<i>sfl</i>	TsM_000313100	580	NA	<i>Echinococcus granulosus</i> TrEMBL A0A068WG98
<i>axin-1</i>	TsM_001153100	393	NA	<i>Echinococcus granulosus</i> TrEMBL A0A068WLS3
<i>gsk3</i>	TsM_000963800	512	NA	<i>Echinococcus granulosus</i> TrEMBL A0A068WWV9
<i>tcf/lef-1</i>	TsM_001099200	927	NA	<i>Echinococcus multilocularis</i> TrEMBL A0A087W055
<i>groucho</i>	TsM_000098100	1009	NA	<i>Echinococcus multilocularis</i> TrEMBL A0A068YGI9
<i>βcateninaA</i> ( <i>βcatA</i> )	TsM_000048900	886	NA	<i>Echinococcus granulosus</i> TrEMBL U6J250
<i>βcateninaB</i> ( <i>βcatB</i> )	TsM_000971100	546	NA	<i>Echinococcus granulosus</i> TrEMBL A0A068WYM1
<i>notum</i>	TsM_000930800	272	NA	<i>Schmidtea mediterranea</i> Swiss-Prot F8U830 <i>Echinococcus multilocularis</i> TrEMBL A0A068Y747
<i>porcupine</i>	TsM_000587900	450	NA	<i>Echinococcus multilocularis</i> TrEMBL A0A087VYC0 <i>Hymenolepis diminuta</i> TrEMBL A0A564YTP8

a Genes de referencia candidatos



b Genes de la vía canónica de Wnt y otros genes de interés

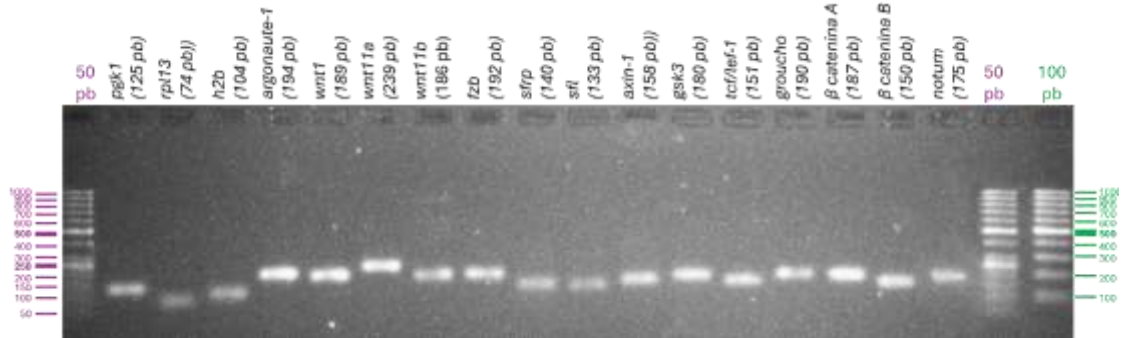


Figura 2: Productos de amplificación.

## B. Genes de referencia

Los genes *pgk1* y *rpl13* fueron seleccionados como los genes de referencia para el cálculo de expresión relativa en cada una de las condiciones experimentales, al ser los más estables de acuerdo con el ranking global obtenido (Tabla 3, Figura 3). La Tabla 3 resume los resultados de cada uno de los métodos empleados, así como la media geométrica (MG) del resultado de estos. Además, la Figura 2 (a, b, c, d y e) muestra los resultados obtenidos mediante GeNorm, Normfinder, Delta Ct, BestKeeper y el ranking global, respectivamente.

Tabla 3: Ranking de genes de referencia considerando los 4 métodos de análisis:

Gen	GeNorm	Normfinder	Delta Ct	BestKeeper	MG
<i>rpl13</i>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1.86120972</b>
<i>pgk1</i>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>2</b>
<i>eflα</i>	3	3	3	2	2.71080601
<i>mdh</i>	2	4	4	6	3.72241944
<i>gapdh2</i>	9	8	8	1	4.89897949
<i>mapk3</i>	5	5	5	8	5.62341325
<i>gapdh1</i>	7	6	6	7	6.4807407
<i>tbp</i>	6	7	7	10	7.36354309
<i>cox1</i>	8	9	9	5	7.54460058
<i>ube2</i>	10	10	10	9	9.74003746
<i>bactin2</i>	11	11	11	11	11

<i>bactin1</i>	12	12	12	12	12
----------------	----	----	----	----	----

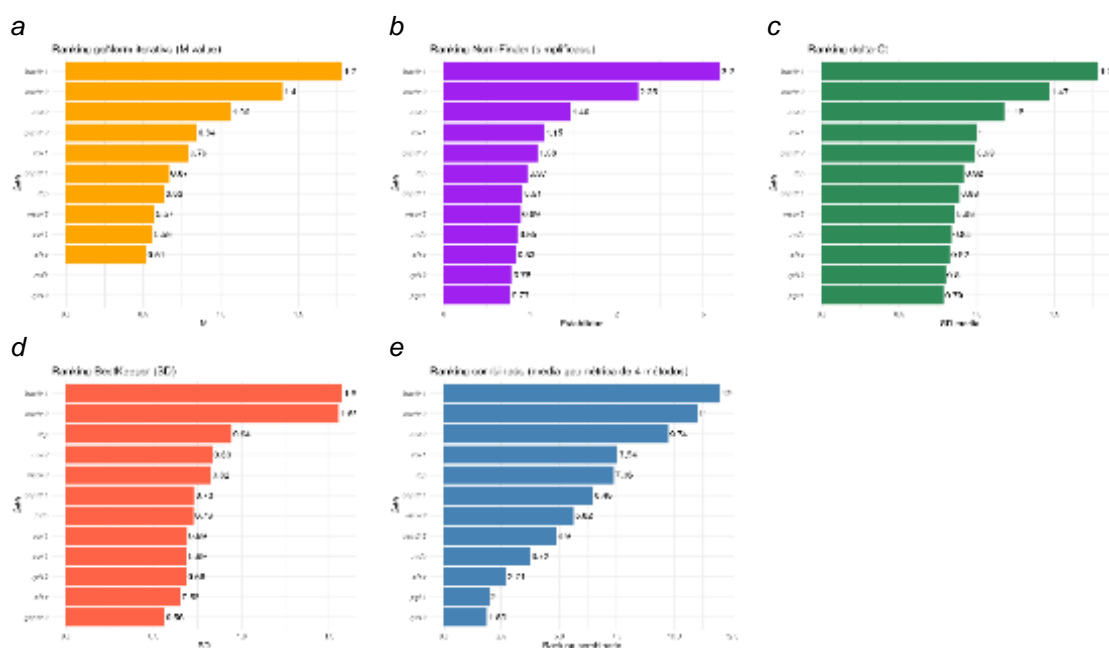


Figura 3: Rankings de estabilidad de genes de referencia obtenidos con cuatro métodos. El ranking combinado resume los resultados mediante la media geométrica de las posiciones obtenidas en los otros métodos.

### C. Eficiencia de amplificación de los genes.

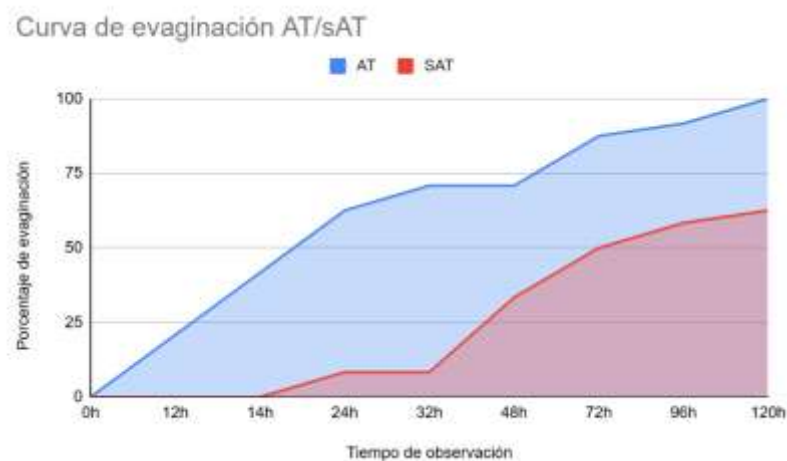
La eficiencia (E) de amplificación de todos los genes se encuentra en el rango de 1.92 a 2.1. Todos superaron el valor de mínimo de 1.9 (Tabla 4). Asimismo, se presenta el ajuste lineal ( $R^2$ ) de los Cq de cada punto de dilución realizado para cada gen, con el logaritmo de la dilución correspondiente, y la pendiente (m) de la recta obtenida para el cálculo de la eficiencia (E). En el Anexo 10 se muestran los gráficos de tendencia lineal de cada uno de los genes.

Tabla 4. Eficiencia de amplificación para cada gen.

Gen	$R^2$	m	E	Gen	$R^2$	m	E	Gen	$R^2$	m	E
<i>pgk1</i>	0.9986	-3.39	1.97	<i>sfrp</i>	0.9986	-3.42	1.96	<i>tcf</i>	0.9617	-3.50	1.93
<i>rpl13</i>	0.9992	-3.34	1.99	<i>sfl</i>	1	-3.37	1.98	<i>groucho</i>	0.999	-3.47	1.94
<i>wnt1</i>	0.9997	-3.47	1.94	<i>notum</i>	0.814	-3.48	1.94	<i>beta1A</i>	0.9985	-3.41	1.96
<i>wnt11a</i>	0.9997	-3.36	1.99	<i>axin</i>	0.9988	-3.40	1.97	<i>beta1B</i>	0.9998	-3.07	2.10
<i>wnt11b</i>	0.9997	-3.29	2.01	<i>gsk3</i>	0.9924	-3.41	1.96	<i>h2b</i>	0.995	-3.54	1.92
<i>fzb</i>	0.9926	-3.40	1.97	<i>argo</i>	0.9898	-3.31	2.00				

#### D. Evaginación comparativa entre cisticercos cultivados con y sin AT.

La evaginación del escólex de los cisticercos de *Taenia solium* fue más rápida en la condición con AT comparada con la condición sin AT (Figura 4). A las 24 h, el 62.5% (15 de 24) de los cisticercos con AT ya había evaginado el escólex, mientras que en ausencia de AT se observó que solo el 8.3% (2 de 24) de los cisticercos había evaginado el escólex. Esta diferencia se acentuó con el tiempo, alcanzando el 100% de evaginación a las 120 h con AT, frente al 62.5% en la condición sin AT (Tabla 5). En todos los puntos temporales analizados con la prueba de Fisher (Tabla 5), se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la condición con AT y sin AT con respecto a la evaginación del escólex de los cisticercos ( $p < 0.05$ ,  $FDR < 0.05$ ). Estos resultados reflejan que el ácido taurocólico (AT) mejora significativamente la velocidad y proporción de evaginación del escólex *in vitro* en comparación con la condición sin AT.



**Figura 4. Curva de evaginación del escólex de cisticercos cultivados con y sin AT.**

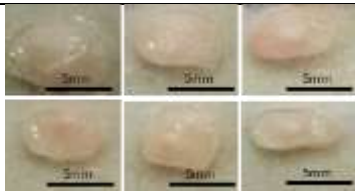
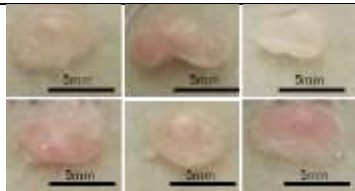

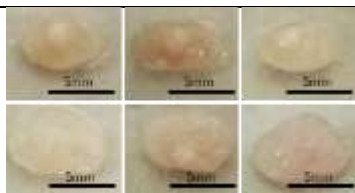
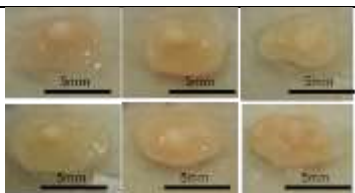
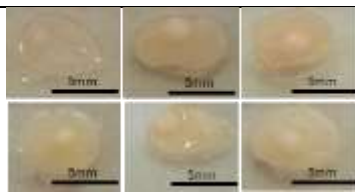


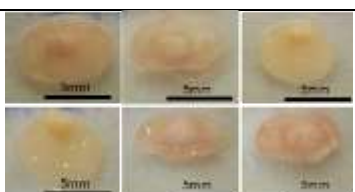



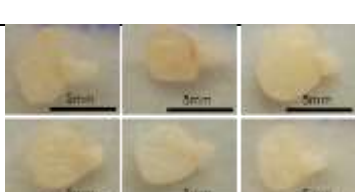

**Tabla 5. Tiempo de evaginación del escólex en cultivo con y sin AT.**

<b>Condición</b>	<b>0h</b>	<b>12h</b>	<b>14h</b>	<b>24h</b>	<b>32h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>	<b>96h</b>	<b>120h</b>
AT	0	5 (20.8%)	10 (41.7%)	15 (62.5%)	17 (70.8%)	17 (70.8%)	21 (87.5%)	22 (91.7%)	24 (100%)
Sin AT	0	0	0	2 (8.3%)	2 (8.3%)	8 (33.3%)	12 (50%)	14 (58.3%)	15 (62.5%)
Prueba de Fisher (p)	-	0.049645	0.0006	0.000179	1.71E-05	0.019855	0.011361	0.017337	0.001559
FDR_BH	-	0.0496	0.0016	0.0007	0.0001	0.0227	0.0182	0.0227	0.0031

### **E. Fenotipo de los cisticercos en diferentes condiciones experimentales**

Los cisticercos sin escólex evaginado: recién extraídos (RE) del músculo de cerdo, los recién llegados al laboratorio (RL), aquellos con 6 horas en el medio de cultivo (6AT, 6ATD, 6AT10, 6AT40), aquellos en inminente evaginación tras 24 horas de cultivo (24AT, 24ATD, 24AT10, 24AT40); y los cisticercos con escólex recién evaginado (EVAT, EVATD, EVAT10, EVAT40), no evidencian diferencias morfológicas identificables por inspección visual simple (Tabla 6). En aquellos cisticercos con el escólex evaginado, se midió la longitud del escólex, encontrándose que esta longitud no es significativamente diferente entre condiciones (Tabla 7).

**Tabla 6. Fenotipo de los cisticercos que componen cada condición experimental.**

Condición	Muestras	Condición	Muestras
RE Recién extraído		RL Recién llegado al laboratorio	
6AT 6 horas en cultivo		6ATD 6 horas en cultivo + 1% DMSO	
6AT10 6 horas en cultivo + 10 µM IWP-3		6AT40 6 horas en cultivo + 40 µM IWP-3	
24AT 24 horas de cultivo		24ATD 24 horas en cultivo + 1% DMSO	
24AT10 24 horas en cultivo + 10 µM IWP-3		24AT40 24 horas en cultivo + 40 µM IWP-3	
EVAT Evaginación en cultivo		EVATD Evaginación en cultivo + 1% DMSO	
EVAT10 Evaginación en cultivo + 10 µM IWP-3		EVAT40 Evaginación en cultivo + 40 µM IWP-3	

En aquellos cisticercos con el escólex evaginado (condiciones EVAT, EVATD, EVAT10 y EVAT40), se midió la longitud del escólex, encontrándose que esta longitud no es significativamente diferente entre condiciones (Tabla 7). Fenotípicamente, el inhibidor de Porcupine (encargado de la palmitoilación de las proteínas Wnt) IWP-3, no tiene un efecto observable en la evaginación del escólex en ninguna de las concentraciones utilizadas (Tabla 6, Tabla 7).

Tabla 7. Longitud del escólex de los cisticercos evaginados en milímetros.

Condición	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Promedio	Desviación estándar
EVAT	1.7	3.2	2.3	1.8	1.7	2.0	2.11666667	0.57763887
EVATD	3.4	2.2	2.1	1.9	2.4	1.6	2.26666667	0.61860057
EVAT10	2.7	2.6	2.0	1.5	1.6	1.8	2.03333333	0.50859283
EVAT40	2.8	2.6	2.5	3.4	1.6	2.1	2.5	0.61318839
Kruskal-Wallis, valor de p								0.4914

#### F. Expresión relativa de los genes asociados a la vía canónica de Wnt y genes *h2b*, *argonaute-1*, *notum* mediante qPCR.

Los gráficos siguientes muestran la comparación entre las diferentes condiciones experimentales (RE, RL, 6AT, 24AT, EVAT, 6ATD, 24ATD, EVATD, 6AT10, 24AT10, EVAT10, 6AT40, 24AT40, EVAT40) para cada gen utilizando el método de Pfaffl y la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, y la prueba U de Mann-Whitney. Cada gráfico mostrará la presencia de uno o más asteriscos entre dos condiciones siempre que existan diferencias estadísticamente significativas en la expresión relativa entre estas. Un asterisco (\*) corresponde a un valor de  $p < 0.05$ , dos asteriscos (\*\*) corresponden a un valor de  $p < 0.01$ .

### 1. Condiciones RE, RL, 6AT, 24AT, EVAT:

La Figura 5 presenta la expresión relativa de genes clave de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, incluyendo a *notum*, y de los marcadores celulares (*h2b*, *argonaute*) en distintas condiciones de desarrollo del cisticerco de *Taenia solium*, organizadas cronológicamente desde la extracción del cisticerco del músculo de cerdo (RE) hasta la evaginación del escólex del cisticerco *in vitro*, en presencia de AT (EVAT). Los paneles (*aa* hasta *oc*) se agrupan siguiendo el eje de activación de la vía Wnt canónica dependiente de  $\beta$ -catenina, desde los ligandos (*wnt1*, *wnt11a*, *wnt11b*) hasta los elementos en el núcleo celular (*groucho*, *tcf/lef*,  *$\beta$ catA*,  *$\beta$ catB*), terminando el gen asociado a proliferación celular (*h2b*) y el marcador de células germinativas o pluripotentes (*argonaute*), identificados en céstodos.

Se evidencia que *wnt1* (Figura 5aa-ac) y *wnt11a* (Figura 5ba-bc) incrementan su expresión progresivamente, con máxima expresión en EVAT, lo que sugiere una activación de la señalización Wnt durante la maduración o transición hacia el estado evaginado. En *wnt11b* (Figura 5ca-cc) no se presentan diferencias significativas entre condiciones. El gen del receptor de Wnt, *fzb* (Figura 5da-dc), mantiene su expresión entre las condiciones, y los moduladores de Wnt, *sfrp* (Figura 5ea-ec) y *sfl* (Figura 5fa-fc) muestran un aumento de expresión de RE hacia RL. Para ambos genes la expresión decae de RL hacia 6AT. En *sfl* se mantienen niveles de expresión similares a RE desde 6AT hasta la evaginación del escólex, donde la expresión de *sfl* es incluso menor (Figura 5fc). Para *sfrp*, la tendencia es a un aumento progresivo de su expresión, desde 6AT aumenta su expresión hacia 24AT y continúa aumentando hasta la condición con el escólex evaginado (EV) (Figura 5ec).

El gen *axin*, no muestra diferencias significativas o una tendencia a aumentar o disminuir su expresión entre condiciones (Figura 5ga-gc). Este gen es un blanco de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina; su expresión es inducida por la activación de la vía Wnt, y su producto participa en la retroalimentación negativa de la vía para controlar la activación excesiva. La expresión constante de este gen a lo largo de las condiciones experimentales sugiere que la activación de la expresión de los genes como *wnt11a* no está necesariamente asociada a una activación de la vía Wnt canónica en las condiciones experimentales presentadas, *wnt11a* podría activarse por vías alternativas (como la vía planar de polaridad celular o Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ ). Otra posibilidad es que la activación de la vía canónica esté siendo modulada de forma post transcripcional, sin generar cambios detectables en el ARN mensajero de *axin*.

La expresión del gen *gsk3* (Figura 5ha-hc) aumenta progresivamente desde las condiciones no cultivadas (RE, RL) hasta las condiciones en cultivo (6AT, 24AT, EVAT), con diferencias significativas. Este patrón no es coherente con la inhibición de la proteína GSK3 típica de la activación de la vía Wnt canónica, en la que GSK3 suele ser suprimida para permitir la acumulación de  $\beta$ -catenina. Este resultado sugiere un papel alternativo de GSK3 en *Taenia solium*, como en procesos de remodelación celular, proliferación o diferenciación durante la evaginación.

La expresión de  $\beta$ -catenina A (Figura 5ia-4ic) y  $\beta$ -catenina B (Figura 5ha-hc) tienen tendencias similares, con un aumento en su expresión, estadísticamente no significativo, de RE a RL, una disminución de RL a 6AT, estadísticamente significativa en  $\beta$ -catenina A, y un aumento progresivo de 6AT hasta EV. El aumento progresivo de la expresión de  $\beta$ -cateninas es coherente con el avance en el desarrollo del cisticerco. El gen *groucho* (Figura 5ka-kc) muestra un patrón de

expresión similar al de las  $\beta$ -cateninas entre condiciones: aumenta de RE a RL, disminuye de RL a 6AT y aumenta de 6AT a 24AT y sigue aumentando de 24AT a EVAT. Esto refleja posiblemente un papel regulador ajustado al estado transicional de los tejidos.

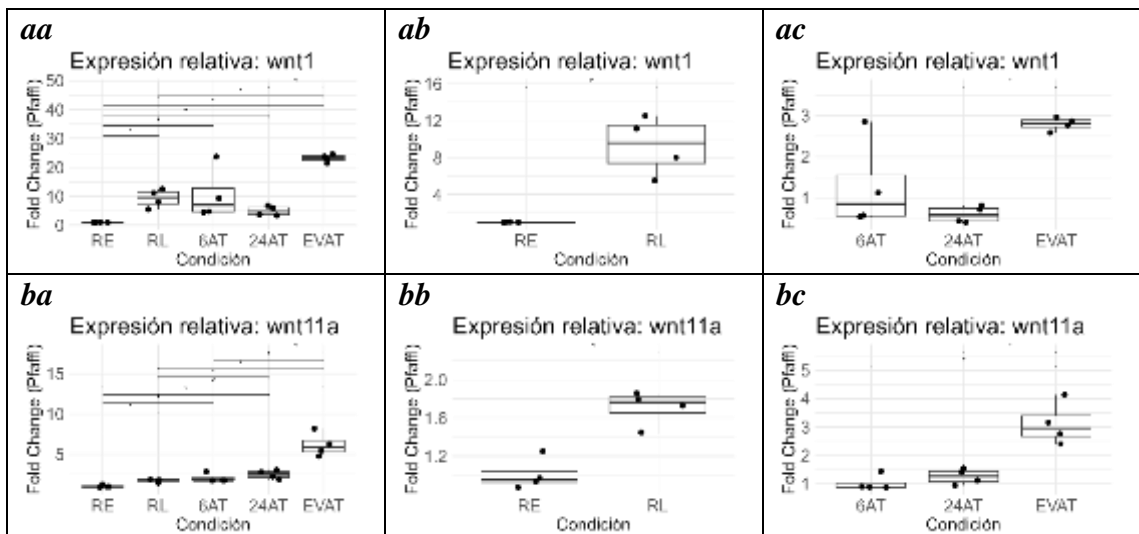
El gen *tcf* tiene como producto a Tcf, que actúa junto con  $\beta$ -catenina en la vía Wnt canónica para activar la transcripción de genes diana implicados en proliferación, diferenciación y autorrenovación celular, y actúa junto a Groucho para reprimir esta vía. EVAT muestra una expresión significativamente más alta de *tcf* en comparación con las demás condiciones. En conjunto con la expresión de *groucho*, esto sugiere una activación regulada de la vía Wnt canónica en esta condición (Figura 5la-lc).

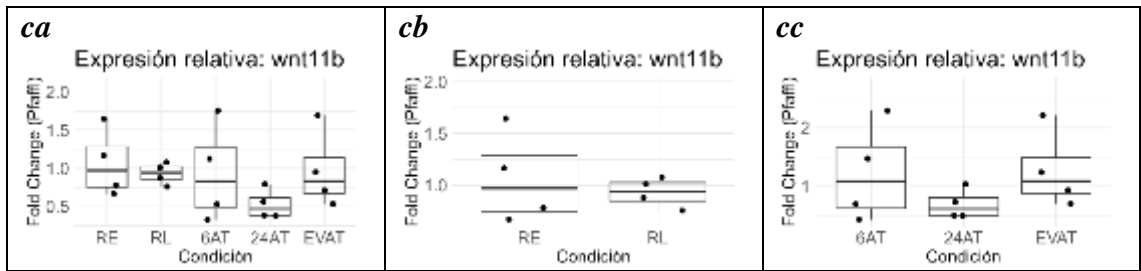
Notum es un inhibidor extracelular de la vía Wnt canónica, que actúa despalmitoilando las proteínas Wnt, impidiéndoles activar sus receptores. Su expresión (Figura 5ma-mc) no varía significativamente entre las diferentes condiciones (RE, RL, 6AT, 24AT, EVAT), excepto entre 6AT y 24 AT. La expresión de *notum* debe asumirse cuidadosamente, dado que la abundancia de transcritos de *notum* fue la más baja entre todos los genes, tanto que fue necesario utilizar el triple de input de ADNc (15ng en lugar de 5 ng) para obtener lecturas de cq consistentes (Cq <35).

El gen *h2b* muestra una expresión diferencial significativa, con mayor expresión de 6AT a 24AT y 6AT a EVAT (y de RE a RL, aunque no es estadísticamente significativa), y menor de RL a 6AT (Figura 5na-nc). Esto sugiere diferencias en la actividad proliferativa global entre las condiciones evaluadas. Para el gen

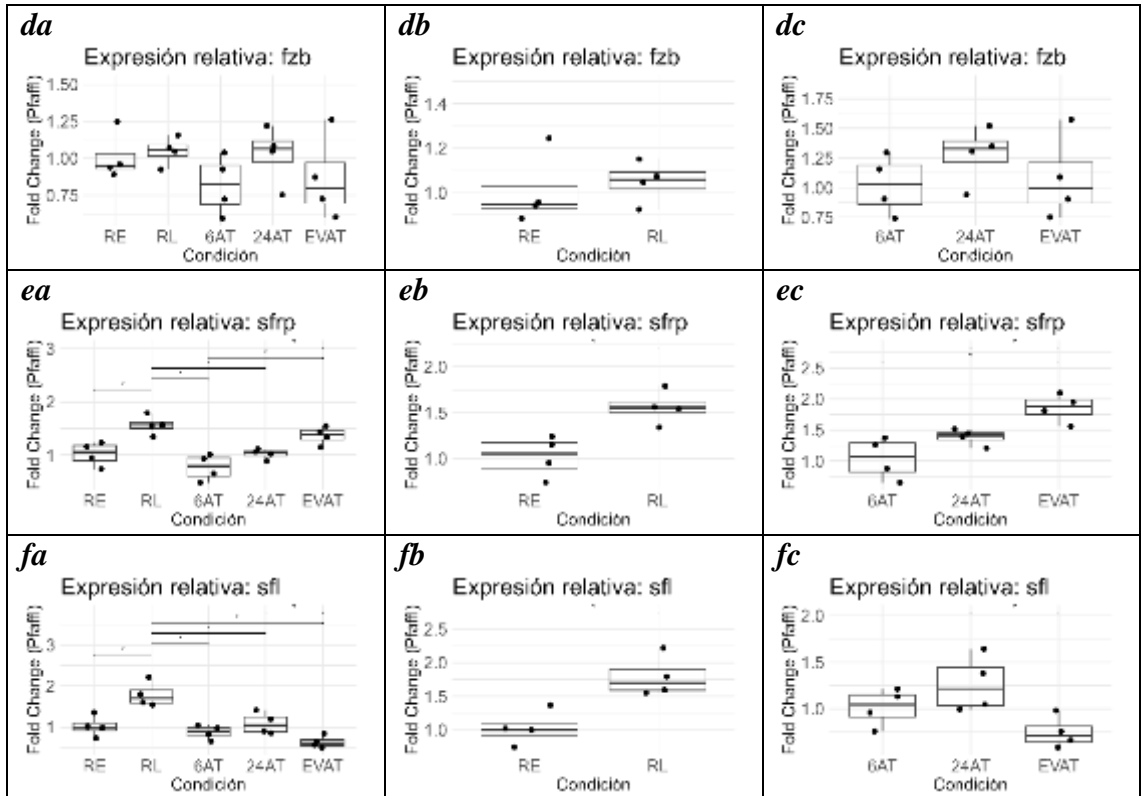
*argonaute* (Figura 5oa-oc), no se muestran diferencias estadísticamente significativas en su expresión entre las condiciones, sin embargo, es más elevada en la condición EVAT. Este aumento de su expresión hacia la condición más tardía puede relacionarse a una activación de pluripotencia celular en los cisticercos evaginados, que podría estar relacionada con procesos de diferenciación, que se iniciarían en etapas avanzadas de la evaginación para la formación de proglótidés.

Para todos los genes se ha incluido el análisis solo de RE y RL, y de las condiciones 6AT, 24AT y EVAT. Esto permitió identificar que entre los estados basales RE y RL, que son fisiológicamente relevantes debido al cambio del entorno del quiste, hay un cambio estadísticamente significativo en la expresión de los genes *wnt1*, *wnt11a*, *sfrp*, *sfl*, y *tcf* (Figura 5). La expresión de estos aumenta y luego retorna a un nivel de expresión similar a RE al someterse al cultivo *in vitro*. Se observó una tendencia similar, pero estadísticamente no significativa, para los genes *fzb*, *axin*, *gsk3*, *bcathA*, *bcathB*, y *groucho* (Figura 5). Los genes *wnt11b* y *argonaute* no varían en su expresión con este cambio de entorno del cisticerco.

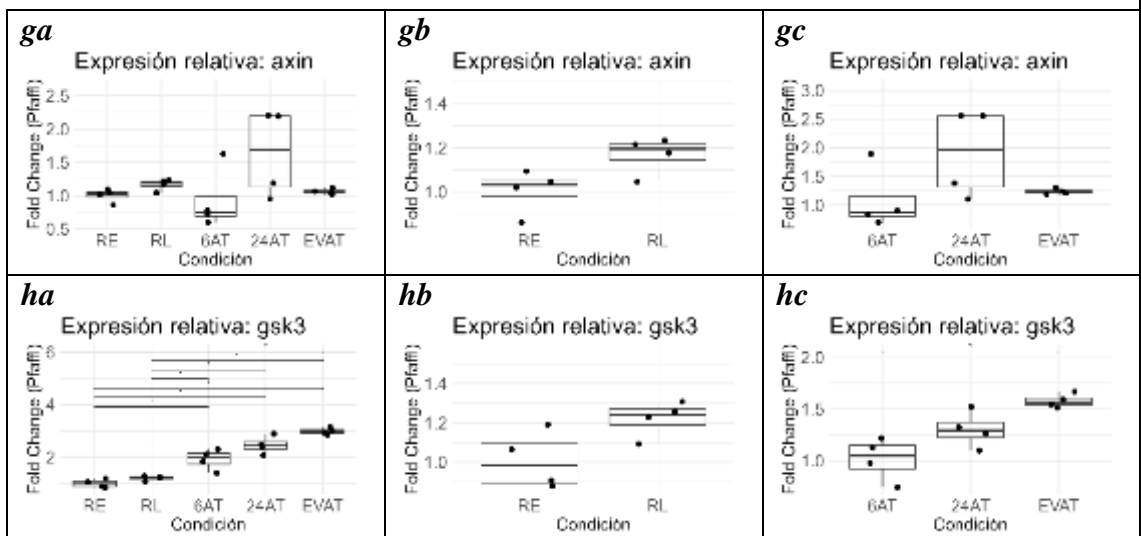


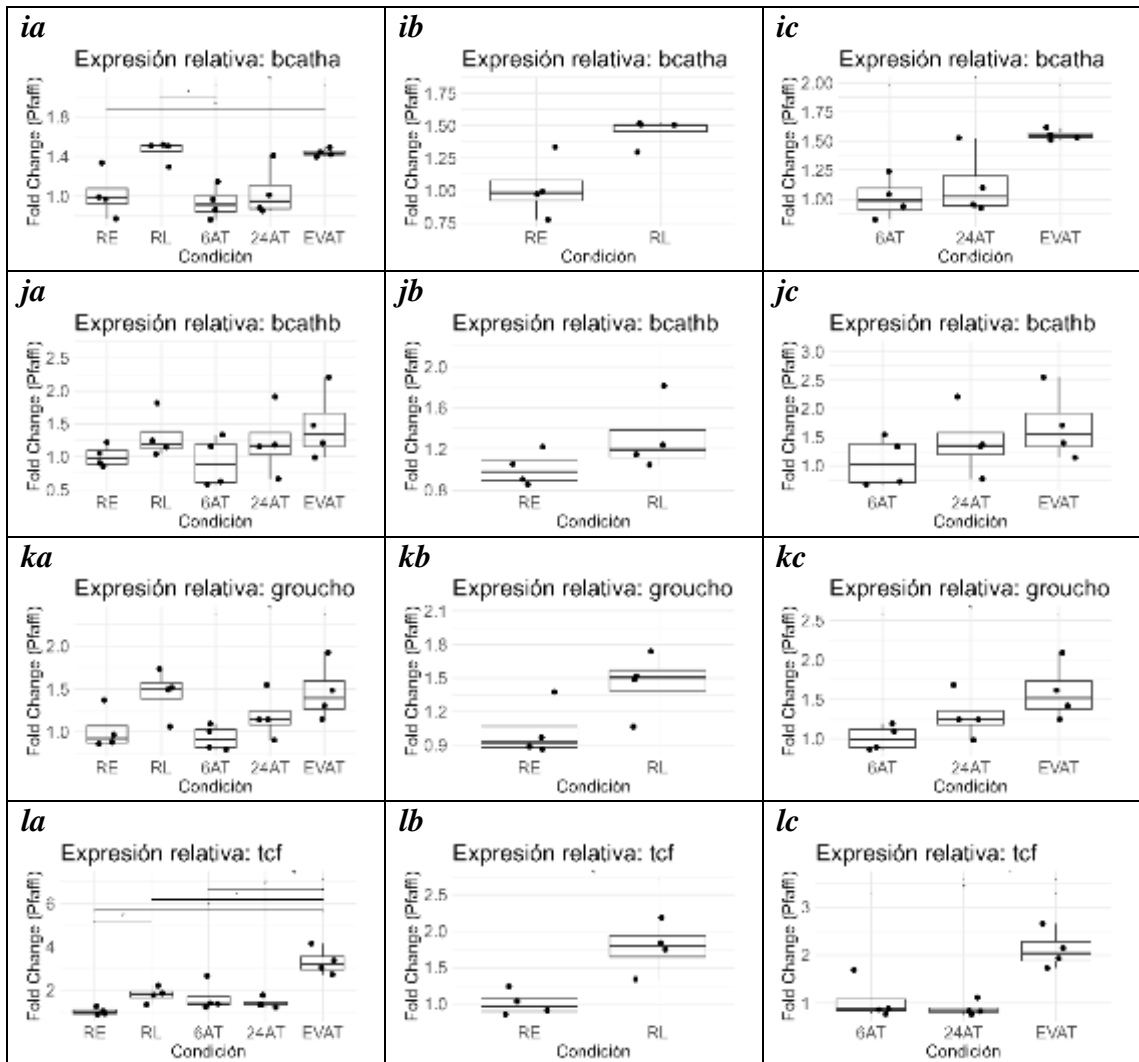


**Figura 5aa-cc. Ligandos de la vía canónica Wnt**

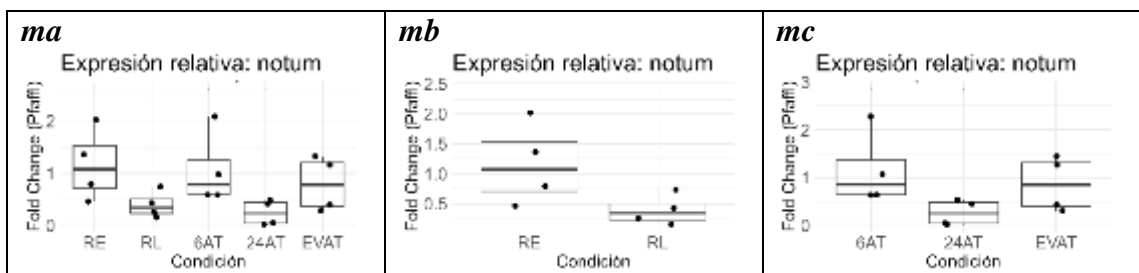


**5da-fc. Receptores y modulares de Wnt**

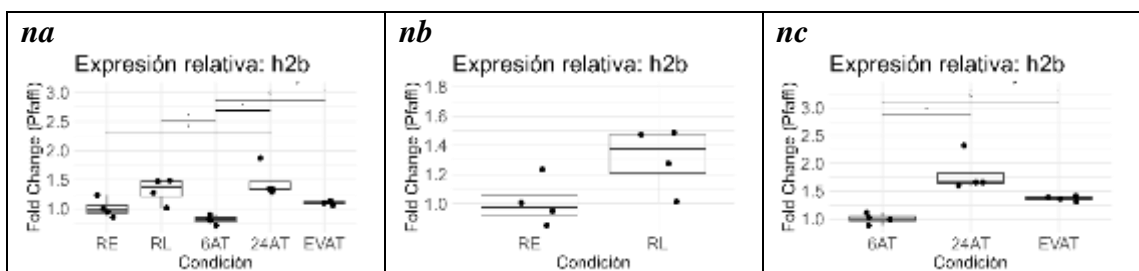


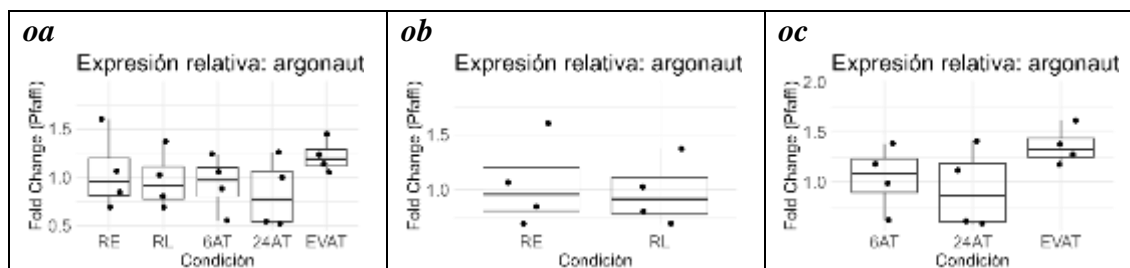


**5ga-lc. Componentes intracelulares de la vía canónica de Wnt**



**5ma-mc. Inhibidor de la vía de señalización Wnt**





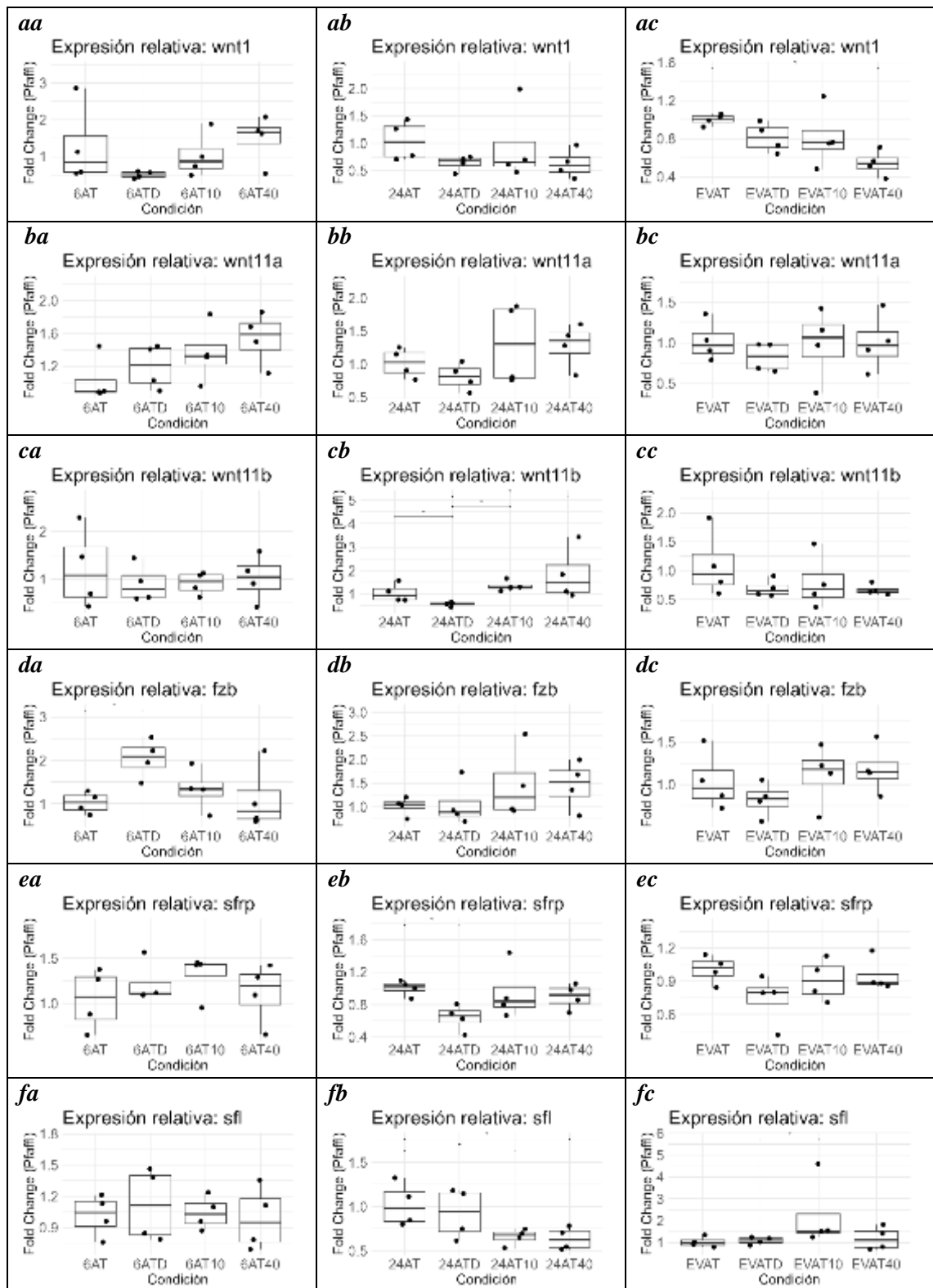
*5na-oc. Marcadores celulares.*

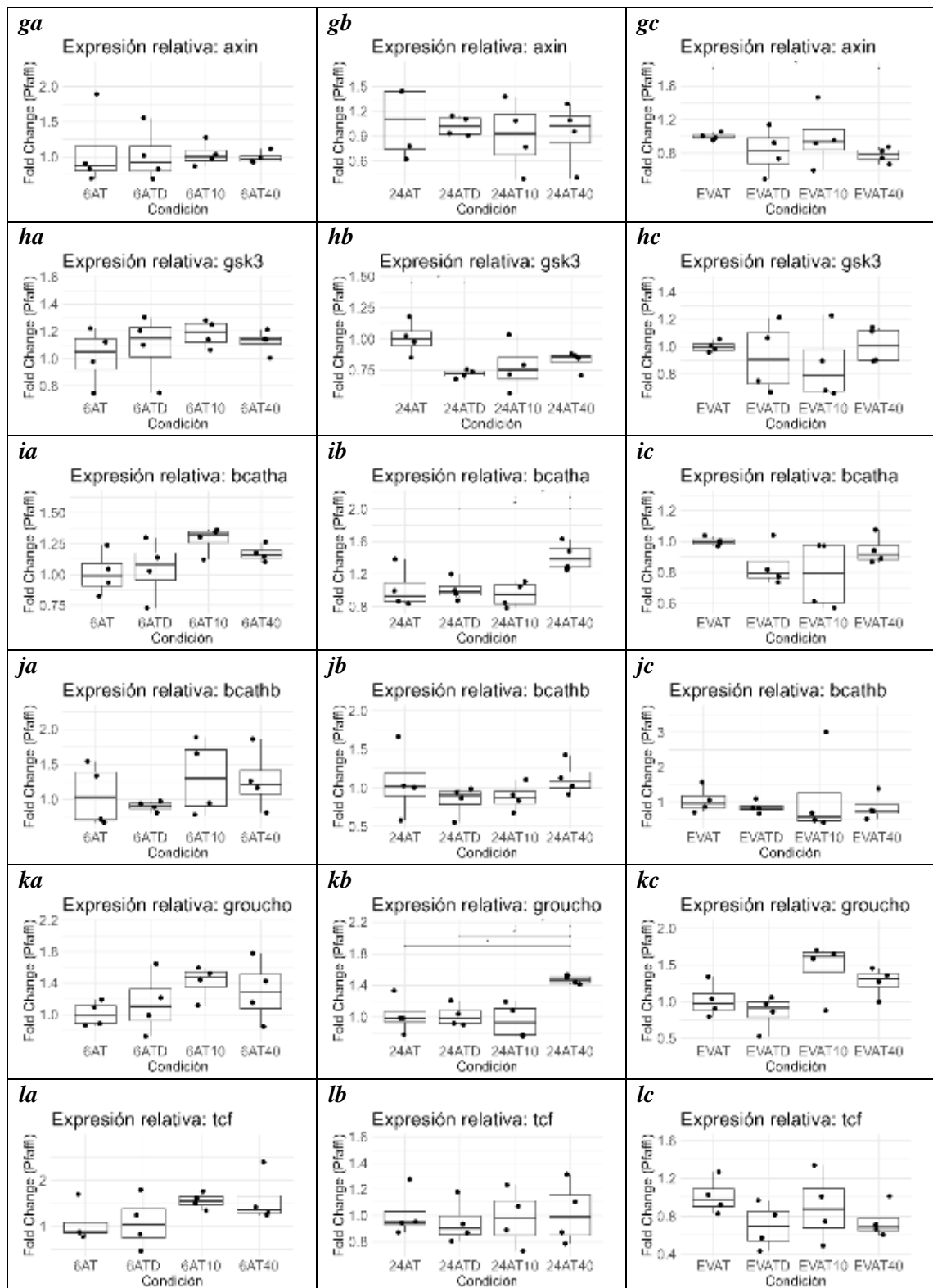
**Figura 5: Expresión relativa de genes relacionados con la vía Wnt en condiciones RE, RL, 6AT, 24AT, EVAT.**

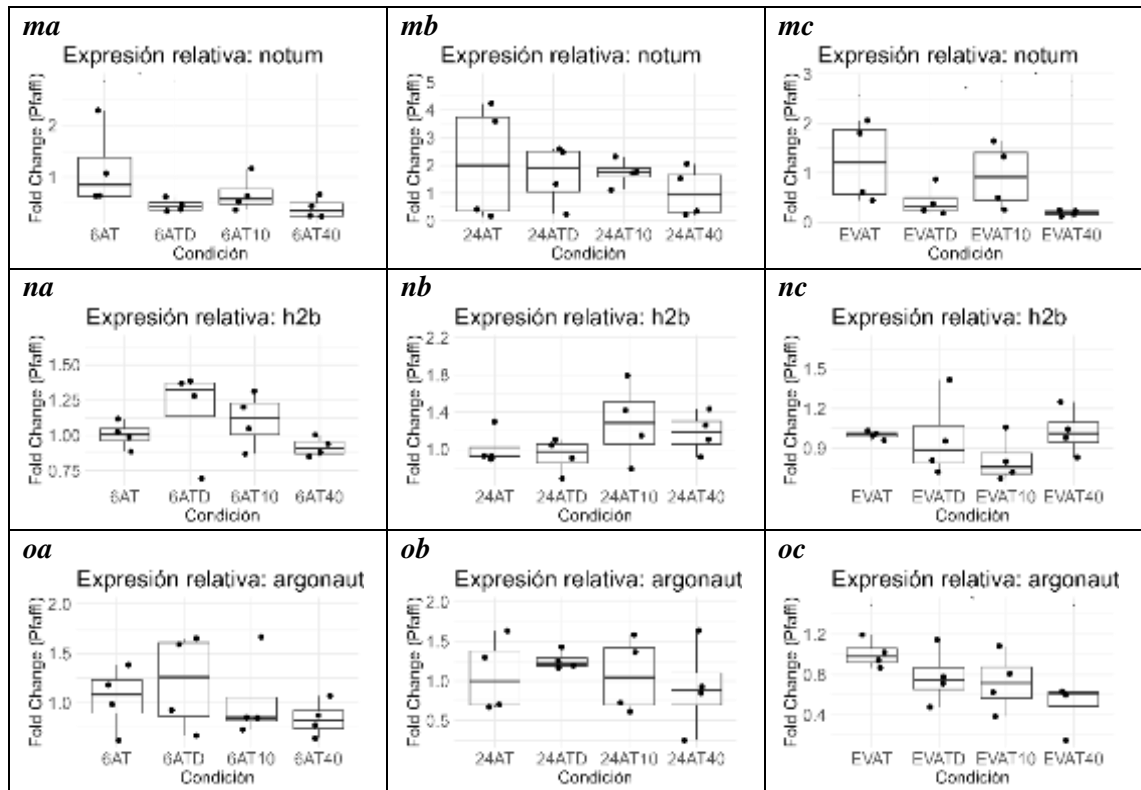
La columna de la izquierda compara la expresión de los genes en cada grupo experimental respecto al grupo RE. En la columna del centro se muestra la expresión de los genes en las condiciones no cultivadas *in vitro*, respecto a RE. En la columna de la derecha se muestran las condiciones cultivadas *in vitro*, comparando la expresión de los genes respecto a 6AT.

**2. Condiciones 6AT, 6ATD, 24AT, 24ATD, EVAT, EVATD, EVAT10 y EVAT40: influencia del inhibidor IWP-3 en la expresión relativa de los genes evaluados.**

La mayoría de los genes no mostraron una diferencia significativa al comparar la expresión relativa de la condición ATD (0.1% AT + 1% DMSO) respecto a AT (Figura 6). Algunas excepciones pueden identificarse, *wnt11b* en 24AT vs 24ATD (Figura 6cb), *fzb* en 6AT vs 6ATD (Figura 6da), *sfrp* en 24AT vs 24ATD, *gsk3* en 24AT vs 24ATD (Figura 6hb) y *notum* en 6AT vs 6ATD (Figura 6ma). Este aparente efecto en la expresión de estos genes en las condiciones con DMSO es pequeño, la mayor diferencia de Fold Change (FC) es menor a 0.6, observada en *notum* (Figura 6 ma). Esta diferencia es probablemente debida al número muestral (n=4 por condición) pequeño, no reflejando un efecto biológico real.







**Figura 6: Expresión relativa de los cisticercos: influencia del DMSO e IWP-3.**

La columna de la izquierda compara la expresión de los genes entre los grupos experimentales que estuvieron 6 horas en cultivo *in vitro*. En la columna del centro se muestra la expresión de genes en los grupos cultivados 24 horas *in vitro*. En la columna de la derecha se compara la expresión de los grupos experimentales con excólex recién evaginado en cultivo *in vitro*.

Fenotípicamente se observó que no hay diferencias entre las condiciones con el inhibidor IWP-3 y aquellas sin el inhibidor (Tabla 6, Tabla 7). En la expresión de los genes *wnt1* (EVAT) (Figura 6ac), *axin* (EVAT) (Figura 6gc), *argonaute* (EVAT) (Figura 60c) y *sfl* (24AT) (Figura 6fb), la concentración más alta del inhibidor (40  $\mu$ M) de forma estadísticamente significativa disminuye la expresión de estos genes, y aumenta la expresión la expresión de *groucho* (24AT). Los resultados más interesantes son los de *argonaute*, *wnt1* y *groucho*. Considerando la función de las proteínas que traducen estos genes, es esperable que hacia los momentos de desarrollo más avanzados el efecto del inhibidor pueda hacerse

notorio, dado que Wnt promueve la diferenciación de células madre hacia el extremo posterior en la estrobilación.

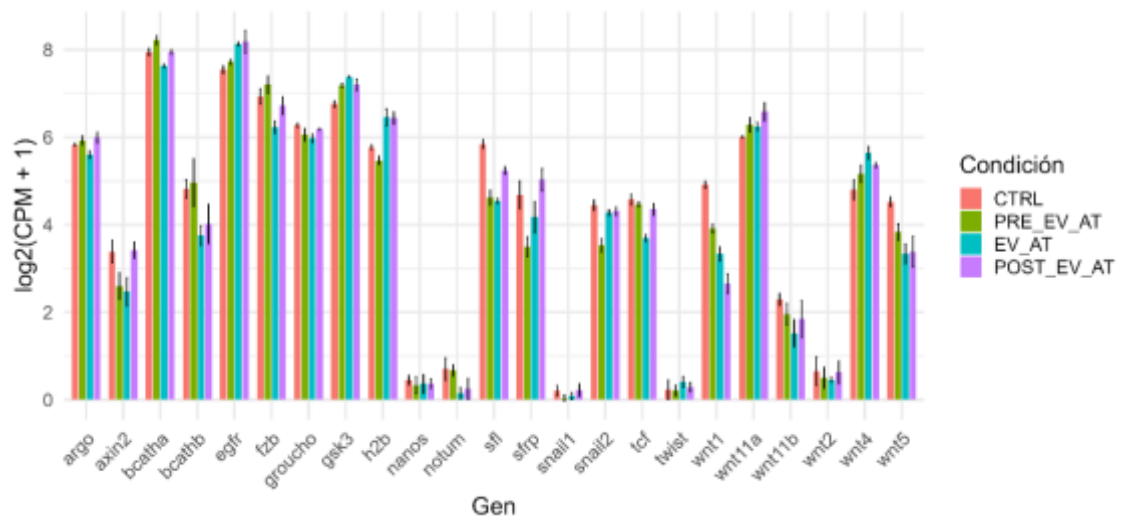
El cisticerco, luego de evaginar el escólex ha de emprender un nuevo camino, la elongación y estrobilación, que inevitablemente involucra la diferenciación celular (donde Argonaute, como regulador post-transcripcional de la expresión de genes relacionados con la pluripotencia y la diferenciación celular, debe tener implicancia), la activación de la vía canónica de Wnt (donde Wnt1 es de los primeros mensajeros en activar la vía y Groucho, un correpresor transcripcional clave, inhibidor de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, al nivel de la transcripción nuclear). Por lo tanto, el efecto inhibitorio de IWP-3, será más evidente donde estos procesos se estén preparando, en la elongación y estrobilación del cisticerco que ha evaginado el escólex. El efecto del inhibidor se refleja entonces en inhibir la expresión de *wnt1* y *argonaute*, y expresándose más el represor *groucho*.

#### **G. Expresión diferencial de genes asociados a la vía canónica de wnt en el transcriptoma de *Taenia solium*.**

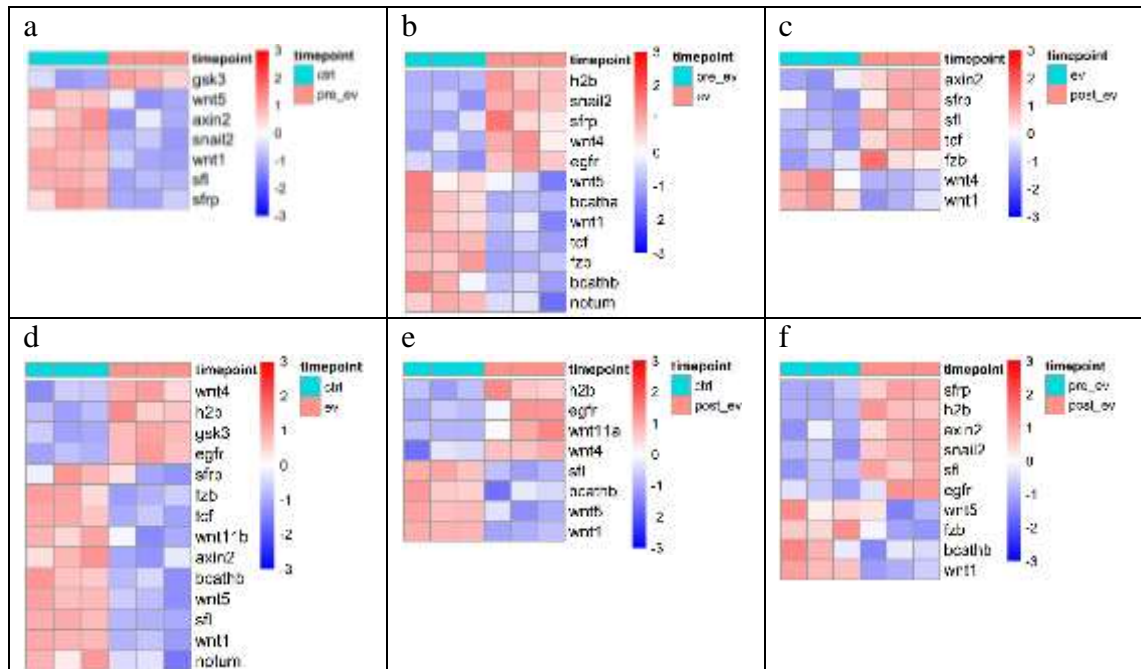
La figura 7 muestra que, en efecto, el evidenciado bajo nivel de transcritos de *notum* es consistente. Asimismo, lo es para los genes *twist*, *snail1* y *nanos*. Varias interpretaciones acompañan a estos resultados. Es probable que *notum* no se exprese porque ya no es necesario inhibir Wnt a través de este, dado que ya se ha activado la formación de estructuras posteriores en las etapas embrionarias. Para *twist* y *snail1*, vinculados a la transición epitelial-mesenquimal en animales bilaterales, pueden estar subutilizados en céstodos, o expresarse solo en momentos específicos. El gen *nanos*, se asocia con líneas germinales o células madre, en

céstodos podría estar restringido a nichos celulares muy limitados o en baja abundancia.

Los heatmaps (mapas de calor) de la Figura 8 representan la expresión diferencial de genes relacionados con la vía Wnt en diferentes condiciones (CTRL o cisticercos no cultivados, PRE\_EV\_AT o cisticercos mantenidos en cultivo por 12 horas, EV\_AT o cisticercos de evaginación del escólex reciente, POST\_EV\_AT o cisticercos con el escólex evaginado mantenidos en cultivo hasta 120 horas). La condición CTRL es comparable a RL, EV\_AT a 6AT y 24AT, y EV\_AT es comparable a EVAT. POST\_AT\_EV es un escenario que refleja los límites del modelo *in vitro*, como puede observarse en el Anexo 11, donde las réplicas biológicas de los cisticercos con 120 horas en cultivo no se agrupan adecuadamente en el Análisis de Componentes Principales.



**Figura 7. Log<sub>2</sub>(CPM+1) de los genes asociados a la vía canónica de Wnt y otros genes de interés.**



**Figura 8. Mapas de calor de la expresión diferencial entre condiciones de genes asociados a la vía Wnt y otros genes de interés.**

En *a* se observa la expresión diferencial de genes asociados a la vía canónica de Wnt y otros genes de interés entre un grupo de cisticercos no cultivados o condición basal (ctrl) y cisticercos no con escólex no evaginado con 6 horas en cultivo in vitro con 0.1% AT (PRE\_EV). En *b* entre PRE\_EV y cisticercos con escólex recién evaginado (EV\_AT). En *c* entre EV\_AT y cisticercos con el escólex evaginado mantenidos en cultivo hasta 120 horas (POST\_EV\_AT). En *d* entre ctrl y EV\_AT. En *e* entre ctrl y POST\_EV. Finalmente, en *f* entre PRE\_EV y POST\_EV. Los mapas de calor muestran la expresión diferencial de los genes, normalizada como valores z-score en un rango de expresión que va desde -3 (azul, baja expresión del gen) hasta +3 (rojo, alta expresión del gen). El color blanco indica una expresión media o sin cambio (alrededor de 0). Se consideraron como límite mínimo de las diferencias en el Fold Change (FC) de los genes de 1.3 veces.

En el panel *a* (Figura 8a) se observan los cambios transcripcionales tempranos (ctrl vs pre\_ev). Comparado con la condición basal (CTRL), se observa una represión

inicial de varios genes efectores de la vía Wnt, incluyendo *wnt5*, *axin2*, y *snail2* en *pre\_ev* y la activación de genes represores como *gsk3*. Este patrón sugiere un estado de preparación celular antes de la evaginación del escólex, posiblemente orientado a limitar la activación basal de Wnt en anticipación a un estímulo externo, el cambio de entorno.

El panel b (*PRE\_EV* vs *EV*, Figura 8b), muestra que, hacia la evaginación del escólex, hay un aumento en la expresión de genes asociados con proliferación temprana y transición epitelio-mesenquimal (EMT), como *snail2* y *h2b*. Estos cambios sugieren que, a pesar de la represión general de la vía Wnt por *notum* en *PRE\_EV* y por *sfrp* en *EV*, hay una activación de los mecanismos de proliferación. El panel c, *EV\_AT* vs *POST\_EV\_AT*, muestra una recuperación de la expresión de genes blanco de la vía Wnt, como *axin2*. Genes como *sfl*, *sfrp*, y *fzb* también muestran un incremento en su expresión. El gen *egfr* es otro blanco de la vía canónica de Wnt, y se observa que su expresión aumenta con el desarrollo del cisticerco (Figura 8b, d, e, f).

El gen *wnt11a* muestra expresión diferencial entre *CTRL* y *POST\_EV\_AT* (Figura 8e), lo que es consistente con los resultados de qPCR descritos anteriormente (Figura 5ba-bc). La activación de *sfrp*, *gsk3*, *tcf*, *h2b* hacia las condiciones más tardías también se ve representada (Figura 8, Figura 5e,h,l,n). Respecto a *argonaute*, este mantiene su nivel de expresión hacia *POST\_EV\_AT*, no se descarta que en momentos de desarrollo más avanzados a esta condición su expresión aumente, dado que tiene una expresión y número de transcritos consistentes (Figura 5oa-oc, Figura 7).

## VI. DISCUSIONES

La evaginación del escólex del metacéstodo de *Taenia solium* es crucial para el anclaje en el intestino humano, donde el parásito se desarrolla hacia el estadio adulto, con la consiguiente maduración sexual y generación de huevecillos que se liberan al ambiente. El modelo generado de evaginación inducida *in vitro* es útil para estudiar este paso, siendo, además, el efecto del ácido taurocólico perceptible en la inducción de la evaginación del escólex (Figura 4, Tabla 5, Anexo 11).

La estandarización de cultivos, el tratamiento farmacológico, la recolección de estadios definidos, la determinación de los genes de referencia idóneos para los ensayos de expresión relativa, la búsqueda de secuencias homólogas en *Taenia solium* y el diseño de primers para qPCR desarrollados en el presente trabajo contribuye a reducir la variabilidad biológica y mejorar la precisión de los análisis transcriptómicos y funcionales en el estudio del desarrollo de *Taenia solium*. Este trabajo muestra que las fases PRE y EV, momentos antes y después de la evaginación del escólex constituyen dos morfologías con identidad clara y características valiosas para estudios de desarrollo.

Los resultados obtenidos en esta tesis aportan los primeros registros en la expresión de los elementos de la vía de señalización Wnt canónica en *Taenia solium*, antes y después de la evaginación del escólex. Esta información es de importancia para entender el desarrollo de este parásito. El objetivo principal de esta tesis fue investigar el posible rol de la vía de señalización Wnt en la evaginación del escólex del cisticerco, enfatizando en los elementos asociados con la especificación del eje anteroposterior (AP).

### **A. Los genes que definen el eje anteroposterior muestran expresión diferencial relativa**

Los patrones de expresión de los elementos asociados al polo anterior (*sfrp*, *sfl*) o al polo posterior (*wnt1*, *wnt11a*, *fzb*), asociación que se ha extrapolado de otros céstodos, sugieren que están implicados en la progresión del desarrollo del cisticerco. Los genes *wnt1*, *wnt11a* y *sfrp* muestran una mayor expresión relativa en cisticercos con escólex recién evaginado (EV), en comparación con aquellos cuyo escólex aún no ha evaginado (6AT, 24AT) (Figura 5ac, 5bc, 5ec). Los genes *fzb* y *sfl* aumentan su expresión hacia estadios más tardíos, como puede evidenciarse en los mapas de calor del análisis del transcriptoma de *Taenia solium* (Figura 8C, EV\_AT vs POST\_AT).

La expresión de *wnt11a* define uno de los principales hallazgos en *Hymenolepis microstoma*, donde está delimitada al polo posterior de desarrollo del cisticercoide y delimita una región altamente proliferativa en el cuello del cisticercoide exquisitado antes de que se formen los segmentos del estróbilo (Jarero, 2018; Jarero *et al.*, 2024). Wnt11a es el efector más probable de la estrobilación, sobreexpresado en la zona transitoria a la formación de proglótides. Es altamente probable que en *Taenia solium* el aumento progresivo de la expresión de *wnt11a* hacia los estadios más tardíos (Figura 5bc, Figura 8e), refleje este mismo comportamiento, marcando la zona posterior de cisticerco en la que se iniciará la producción de las proglótides.

La expresión de *wnt1* aumenta en los cisticercos evaginados al evaluarlos mediante qPCR. Sin embargo, el análisis en el transcriptoma de *Taenia solium* muestra un resultado contrario, una menor expresión de este gen según se avanza en el

desarrollo del cisticerco. La expresión de *wnt1* en *Hymenolepis microstoma* colocaliza con la expresión del inhibidor *sfl* en la zona transitoria, expresándose *wnt1* hacia el lado posterior, restringido a las proglótides tempranas, y *sfl* hacia el lado anterior. En la transición de estadio larval a adulto, *wnt1* se expresa en momentos tempranos, disminuye su expresión con la maduración de la larva, y reaparece en la formación de los estróbilos (Jarero 2018; Jarero et al., 2024).

Relacionando la expresión de *wnt1*, *wnt11a*, *wnt11b* con los hallazgos en planarias, se ha observado que *wnt1* se expresa en una hilera de células discretas ubicadas exclusivamente en la línea media dorsal posterior, mientras que *wnt11a* y *wnt11b* presentan una expresión más amplia en la región de la cola (Petersen et al, 2008; Adell et al., 2009; Gurley et al., 2010; Almuedo et al., 2012). Tras una amputación, la activación diferencial de la señal Wnt/ $\beta$ -catenina determina la identidad anterior y posterior. Inicialmente, tanto *wnt1* como *notum* (inhibidor de Wnt) se expresan en todas las lesiones, pero después se restringen hacia la parte posterior o anterior, respectivamente (Almuedo et al., 2012; Pascual-Carreras et al., 2023).

En *Hymenolepis* la expresión de *wnt11b* está más asociada al eje posterior de los segmentos del adulto (Jarero et al., 2024). En modelos de desarrollo de céstodos, como *Hymenolepis diminuta* e *Hymenolepis microstoma*, las señales de especificación del eje anteroposterior diferencialmente regulan la regeneración y maduración de estos organismos. Por ejemplo,  $\beta$ -catenina A es necesaria para el mantenimiento de las células germinativas, proliferación y formación de proglótides, *sfrp* es necesario para el mantenimiento de la región germinativa del cuello, *wnt11a* en el mantenimiento de la zona de transición (Jarero et al., 2024; Nanista et al., 2025). En *Echinococcus multilocularis*, el desarrollo de células

primarias parece estar sesgado hacia destinos celulares posteriorizados bajo la influencia de células que expresan *wnt1* y *wnt11b* (Herz et al., 2024)

Los transcritos de *wnt1* en *Taenia solium* van disminuyendo según progresa el desarrollo del cisticerco, y los transcritos de *wnt11b* son menos en comparación con *wnt11a* (Figura 7). Estas diferencias en las poblaciones de transcritos tienen sentido en vista de que *wnt11b* estaría más involucrado en la maduración de los estróbilos que en la evaginación del escólex, manteniéndose su expresión constante antes y después del evento de evaginación (Figura 5ca-cc). En el caso de *wnt1*, la tendencia a disminuir la población de transcritos sugiere que su rol principal está en la maduración de la larva (Figura 5aa-ac) y más adelante en la formación de zona de transición para la formación de las proglótides. Estos patrones de expresión observados en *Hymenolepis*, *Echinococcus multilocularis* y planarias, probablemente sean reproducibles en *Taenia solium* (Jarero et al., 2024; Herz et al., 2024; Nanista et al., 2025).

### **B. Los ensayos de inhibición no resultaron concluyentes**

Los experimentos utilizando el inhibidor de Wnts (IWP-3) no evidenciaron cambios morfológicos (Tabla 6, Tabla 7). En cambio, en larvas de *Hymenolepis microstoma* (Jarero, 2018), la disrupción de la señalización Wnt produjo leves alteraciones morfológicas evidenciables y un retraso en el proceso de desarrollo. Sin embargo, Jarero enfatiza que es necesario confirmar estos hallazgos mediante, por ejemplo, qPCR de genes blanco de Wnt, como *axin*. Sin el inhibidor, la expresión de *axin* es constante antes y después de la evaginación (Figura 6 ga-gc). El análisis del transcriptoma de *Taenia solium* muestra que su expresión aumenta en estadios más avanzados (Figura 7C, EV\_AT vs POST\_AT). Con 40  $\mu$ M de IWP-3 (Figura 6 gc),

la concentración más alta, la expresión de *axin* es significativamente menor que sin el inhibidor, aunque solo en los cisticercos con escólex evaginado. En general, el efecto de IWP-3 es discernible solo en los siguientes casos: a las 24 horas, en cisticercos con escólex no evaginado, en la disminución de la expresión de *sfl* (Figura 6 fb) y el incremento de la expresión de *groucho* (Figura 6 kb); en cisticercos con el escólex recién evaginado, en la disminución de *wnt1* (Figura 6 ac), *axin* (Figura 6 gc), y *argonaute* (Figura 6 oc).

Considerando que IWP-3 actúa impidiendo la secreción de proteínas Wnt, se esperaba un efecto negativo en el establecimiento del polo posterior en los cisticercos de *Taenia solium*, y que esto se evidenciara en una inhibición de la evaginación del escólex, por ejemplo. Sin embargo, es en individuos con escólex ya evaginado donde recién se evidencia, a nivel de la expresión de *axin*, un efecto atribuible a IWP-3. Esto sugiere la posibilidad de que la concentración de IWP-3 fuera insuficiente para tener efecto antes de la evaginación, o que el método de sumergir a los cisticercos completos (con vesícula) en el medio con el inhibidor no fuera suficiente para alcanzar las células más internas, alcanzándolas solo al evaginar el escólex, enmascarando el efecto. Estrategias como microinyección directa al tejido más interno del cisticerco podrían mostrar mejores resultados.

Se identificó un gen homólogo de *porcupine* en *Taenia solium* (Anexo 8, *porcupine*), TsM\_000587900. En *S. mediterranea* la inhibición de *porcupine* mediante RNAi, tuvo efectos similares al *knock down* con RNAi de *smad-wnt-1* o *wnt11-2* con la cola amputada: en los tres casos se formó una nueva cabeza, enreemplazando de la cola amputada (Adell et al., 2009; Cleland et al, 2025). Una comprobación del efecto de la inhibición de IWP-3, además de la verificación por

qPCR de la expresión de *axin* (Jarero, 2018) realizada, sería evaluar la expresión de *porcupine*, idóneamente su actividad acetil transferasa como proteína. Evidenciar la interferencia en la formación del complejo de destrucción a partir del marcaje *in situ* de  $\beta$ -cateninas también serviría para corroborar el efecto del inhibidor (Stamos *et al.*, 2013; Montagne *et al.*, 2019).

Con estas consideraciones, puede establecerse que, a partir de la evaginación del escólex, pueden evidenciarse diferencias moleculares debido al tratamiento con IWP-3 en condiciones más avanzadas de desarrollo, y posiblemente en estadios como POST\_EV\_AT, se evidenciarían diferencias fenotípicas además de alteraciones moleculares. Es evidente la necesidad de desarrollar herramientas como el ARN de interferencia (RNAi) adecuadas a *Taenia solium*. Los inhibidores químicos como IWP-3 y DAPT tienen un efecto más general, mientras que RNAi actúa de manera específica sobre genes concretos. En *Hymenolepis diminuta* e *Hymenolepis microstoma* se ha desarrollado el método de RNAi (Pouchkina-Stantcheva *et al.*, 2013; Nanista *et al.*, 2025), pero la morfología de *T. solium* es diferente y este desarrollo requerirá abundancia de material para ensayo y error.

### **C. El *crosstalk* entre vías de señalización regula la vía Wnt.**

Es importante recordar que Wnt no es la única vía de señalización que podría intervenir en la evaginación del escólex; la especificación de los polos anterior y posterior de desarrollo para lograr la evaginación puede regularse por el *crosstalk* con otras vías, como Notch, y Hedgehog. El *crosstalk* entre Wnt y Notch es importante para la diferenciación de células; Notch puede, por ejemplo, limitar la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina (Acar *et al.*, 2021). En planarias, la vía

Hedgehog puede modular la especificación posterior regulando la expresión de *wnt1*, en una cascada de activación de  $\beta$ -catenina B y *Wnt11b* iniciada por *wnt1* (Yazawa *et al.*, 2009).

No solo Wnt interviene en evaginación del escólex; Wnt, Notch, Hh, TGF $\beta$  son conocidos por definir polaridad para proliferación en el desarrollo animal, y tienen *crosstalk* (Baloghova *et al.*, 2019; Chatterjee *et al.*, 2019). En céstodos hay poca información de este *crosstalk*, en *Echinococcus multilocularis* se han identificado elementos principales de la vía Notch expresados exclusivamente en células postmitóticas (Speicher *et al.*, 2024). En la tesis doctoral de F. Jarero, la mayoría de los componentes de señalización Notch se expresan en el estadio adulto, asociado con la neurogénesis, pero no fue posible determinar si participa en el establecimiento de la polaridad.

En la tesis de maestría de J. Blume, *notch1* y *hes2* se expresan más después de la evaginación del escólex, en estadios más tardíos. La aplicación de un inhibidor de Notch, DAPT, restringió la evaginación del escólex de un grupo de cisticercos de *Taenia solium*, y aumentó la expresión de los genes de la vía Notch, *delta1* y *hes2*, un resultado opuesto a lo esperado, sugiriendo la acción compensatoria de otras vías como Wnt y TGF $\beta$ . Por otro lado, un tratamiento con DAPT, impidió la segmentación del anélido *Helobdella robusta* (Rivera *et al.*, 2009). En Hydra, DAPT impide la regeneración de la cabeza, a través de la incapacidad de Wnt de especificar el polo anterior (Mander *et al.*, 2013), reforzando la idea de la regulación cruzada de Wnt por la vía Notch.

**D. La proliferación celular y el mantenimiento de las células germinativas deben estar activas para el desarrollo del cisticerco.**

La caracterización de neoblastos en los platelmintos de vida libre, especialmente en las planarias, es motivo de múltiples estudios. Se ha demostrado que los neoblastos de las planarias son pluripotentes y resultan esenciales para la regeneración de estos organismos. En céstodos, existen poblaciones de células madre indiferenciadas similares a neoblastos que se denominan células germinativas. Es en la región del cuello de los céstodos segmentados donde se localizan las células germinativas proliferativas, cerca de la capa muscular interna, y se ha demostrado que son el único tipo celular que se divide activamente (Newmark *et al.*, 2000; Koziol *et al.*, 2010; Wagner *et al.*, 2011; Koziol *et al.*, 2016; Rozario *et al.*, 2019).

Respecto a la expresión de *argonaute*. Este gen pertenece a una subfamilia de la familia de genes homólogos a *piwi*, que se ha observado en los neoblastos tanto de *Dugesia japonica* como de *Schmidtea mediterranea* (Shibata *et al.*, 2016). Aunque los céstodos han perdido los genes *piwi*, el genoma de *E. multilocularis* sí codifica otras proteínas Argonauta. Entre estas proteínas, la expresión del ortólogo *em-ago2* colocaliza fuertemente con los patrones de incorporación de EdU en las células germinativas de la lámina germinal; el gen se mantiene expresado en la progresión hacia la maduración del protoescólex (Koziol *et al.*, 2014; Herz *et al.*, 2024). Esta copia de *argonaute* parece haber surgido después de la divergencia entre *Hymenolepis* y el clado que agrupa a *Echinococcus* y *Taenia* (Tsai *et al.*, 2013). La identidad de *em-ago2* en *Taenia solium* se ha confirmado (Anexo 8, Argonaute) con una homología de 95% entre la secuencia identificada en *Taenia solium* y *Echinococcus multilocularis*.

La expresión del gen *argonaute* en *Taenia solium* se mantiene constante antes y después de la evaginación del escólex (Figura 5 oa-oc), incluso después de la evaginación (no se muestra en los mapas de calor de genes diferencialmente expresados, Figura 8). La cantidad de transcritos identificados en el transcriptoma de *T. solium* en las diferentes condiciones (CTRL, PRE\_EV\_AT, EV\_AT, POST\_EV\_AT) se muestran en niveles similares a *wnt11a* (Figura 7). Esto sugiere una expresión que se mantiene a lo largo del desarrollo del cisticerco, y, por lo tanto, el mantenimiento de una población de células germinativas durante el desarrollo (Costábile et al., 2024; Rios-Valencia et al., 2024; Herz et al., 2024). Se sugiere detectar transcritos de *argonaute*, mediante Hibridación *in situ* de montaje completo (WMISH, por sus siglas en inglés), colocalizados con las células germinativas marcadas con BrdU o EdU en el cuello del cisticerco de *T. solium*.

En parásitos con el escólex evaginado, se observa una disminución significativa de la expresión de *argonaute* en la condición con la mayor concentración, 40  $\mu$ M, del inhibidor IWP-3, con respecto a la condición sin el inhibidor (Figura 6 oc). De manera similar a lo interpretado con *axin*, esto sugiere que la concentración de IWP-3 fue insuficiente para tener efecto antes de la evaginación del escólex, o que el método de sumersión de los cisticercos en el medio con el inhibidor no es suficientemente adecuado. Sin embargo, considerando el rol de las vías de señalización Wnt en el control de la especificación de linajes embrionarios y la regulación de la pluripotencia en células madre (Sokol, 2011; Zhang et al., 2014; Koziol et al., 2016; Herz et al., 2024) es coherente que una evidencia del efecto de la inhibición de la vía canónica de Wnt pueda ser la disminución de la expresión de *argonaute*.

### **E. Represores de la vía canónica de Wnt Groucho, Tcf y GSK3 tienen una expresión activa en el desarrollo del cisticerco**

Groucho y Tcf tienen un rol regulador de la vía Wnt canónica; en ausencia de  $\beta$ -catenina nuclear, Tcf actúa como represor de la transcripción al unirse a la proteína Groucho. Cuando la  $\beta$ -catenina no está asociada a cadherinas, forma un complejo con Axin, en ese estado, es fosforilada de manera constante por la quinasa GSK3 para ser degradada mediante ubiquitinación. Cuando la vía Wnt está activa por la unión de un ligando Wnt, la acción de GSK-3 se inhibe, la  $\beta$ -catenina se desfosforila y se estabiliza, permitiendo que se acumule en el citoplasma y se transloque al núcleo, donde desplaza a Groucho, se une a Tcf, y estimula la expresión de genes blanco de la vía (Zhang *et al.*, 2014). GSK-3 actúa como un nodo, integrando señales de múltiples vías, incluidas PI3K/Akt, Wnt, Notch y Hedgehog. Aunque no regula directamente la expresión de los elementos de la vía Wnt, su actividad puede ser modulada por estas vías, lo cual afecta indirectamente la activación o represión de Wnt canónica (Kaidanovich-Beilin *et al.*, 2011; Montagne *et al.*, 2019).

La expresión de *tcf* y *groucho* aumenta con la evaginación (Figura 5 kc, 5 lc), así como los niveles de  *$\beta$ -catenina A* y  *$\beta$ -catenina B* (no estadísticamente significativo en  *$\beta$ -catenina B*). *Gsk3* aumenta su expresión según el progreso del desarrollo del cisticerco, y *wnt11a* también aumenta progresivamente su expresión. El patrón de expresión de *tcf*, *groucho*, *wnt11a*, *gsk3* y *axin* sugieren que la vía Wnt canónica es activada de forma regulada. El aumento de la expresión de *axin* hacia POST\_AT\_EV (Figura 8 c,f), que es un gen blanco de la vía Wnt y regulador negativo de la vía Wnt, sugiere esta activación regulada, así como el aumento

progresivo de *gsk3* para controlar la acumulación excesiva de  $\beta$ -cateninas (Qian *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014).

#### **F. La expresión de *h2b* es mayor antes de la evaginación del escólex del cisticerco.**

El gen *h2b* es un marcador de proliferación de células conservado en ciclo celular, incluyendo a platelmintos de vida libre y parásitos (Collins *et al.*, 2013; Solana *et al.*, 2012). En el desarrollo del cisticerco, *h2b* se expresa más antes de la evaginación (Figura 5nc), disminuyendo en el cisticerco recién evaginado a niveles similares a la condición 6AT. En la tesis de licenciatura de Valeria Villar también se observó mayor expresión de *h2b*, y por tanto mayor actividad proliferativa, en cisticercos que aún no habían evagando el escólex (Villar, 2024). En la forma adulta de *Hymenolepis diminuta*, se identificó mediante WMISH la mayor expresión de *h2b* desde el extremo del cuello cercano a la base del escólex, hacia la región más posterior. Si comparamos esta expresión con la de un cisticerco evaginado mantenido en cultivo por 120 horas (POST\_AT\_EV), sin estrobilación, el patrón de expresión es similar, con una mayor acumulación de transcritos en la base del escólex (Anexo 12, resultados preliminares no publicados).

#### **G. Efecto del transporte en la expresión de los genes**

En esta tesis se ha incluido una condición no considerada en otros estudios que utilizaron este modelo, como el del transcriptoma; la condición del cisticerco recién extraído del músculo (RE). Se observa que en esta condición la expresión de muchos genes es significativamente inferior que en cisticercos que recién llegan al laboratorio (RL), es decir, que la expresión de ciertos genes aumenta en el

transcurso del transporte al laboratorio (Figura 5. RE vs RL). Luego, esta expresión disminuye (6AT) retornando a niveles similares a los iniciales (RE). Los cisticercos viajan en un medio carente de nutrientes (solución salina tamponada con fosfato (PBS; 0.1 M, pH 7.4) suplementada con dilución 1X de antibiótico-antimicótico Gibco™ (100X)), por 16-20 horas.

Es poco probable que la respuesta observada en este cambio de ambiente (de músculo a PBS) sea una respuesta a la falta de nutrientes; más bien, parece una reacción preparatoria para la evaginación del escólex. Los céstodos obtienen la mayor parte de su energía a partir del catabolismo de la glucosa y, además, almacenan grandes cantidades de este azúcar en forma de glucógeno. Céstodos como *Otobothrium insigne* o *Hymenolepis diminuta* tienen una gran reserva de carbohidratos en su vesícula y tegumento, donde incluso se hipotetiza que, además de servir como reservorio de glucosa y glucógeno, la vesícula facilitaría la difusión de glucosa hacia el escólex invaginado, al crear un fuerte gradiente de difusión con el fluido que rodea al escólex (Hildreth et al., 1988; Smyth et al., 1989). Al favorecer la absorción eficiente de glucosa por parte del escólex invaginado, se favorecerían múltiples procesos metabólicos y celulares, como la producción de ATP y proliferación celular (Slais, 1966; Hildreth et al., 1988). Al momento de transferir al cisticerco a un medio rico en glucosa, el gradiente se disiparía, así como la expresión de los genes inicialmente incrementada. Evidentemente, es necesario probar esto de forma experimental.

## **H. Se consolidan protocolos para estudiar el desarrollo de *T. solium* desde la activación *in vitro*.**

La principal limitación para el estudio molecular de *Taenia solium* es su ciclo de vida complejo y el hecho de que la activación del cisticerco y su desarrollo hacia organismo adulto ocurran en el hospedero humano. Además, obtener los cisticercos para cultivo requiere de una logística que incluye ubicar cerdos infectados, extraer cisticercos en condiciones axénicas y trasladarlos oportunamente y en condiciones que afecten al mínimo su viabilidad y desarrollo. Protocolos estandarizados para el mantenimiento en cultivo, conservación posterior, extracción de material nucleico, fijación del parásito para técnicas como WMISH, y técnicas moleculares, como qPCR en este caso, permiten que los resultados de expresión sean confiables y superen la variabilidad entre cisticercos individuales. Esta variabilidad se ha compensado en las fases que llamamos PRE (RE, RL, 6AT, 24AT) y EV, que corresponden a cisticercos antes y después de la evaginación. Sin embargo, aún es necesario encontrar una forma más efectiva y eficiente para lograr describir el desarrollo en fases previas y posteriores.

## VII. LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES PARA TRABAJO FUTURO

De acuerdo con lo evidenciado en los modelos de planarias, y céstodos como *Hymenolepis* y *Echinococcus*, los genes de la vía canónica de Wnt de nuestro mayor interés (*wnt1*, *wnt11*, *fzb*, *sfrp*, *sfl*) se expresan espacialmente en el polo anterior o polo posterior del cisticerco. Además de los datos de qPCR se requiere observar el lugar anatómico de expresión de los transcritos de en las distintas fases de desarrollo de *Taenia solium*. La aplicación de técnicas como WMISH para observar esta expresión en el cisticerco entero está aún en desarrollo, observando los primeros resultados en el Anexo 12 con la expresión de *h2b*.

Una subsiguiente limitación es el establecimiento del sistema para la producción de las sondas para inmunohistoquímica fluorescente (ISH); el diseño de primers para lograrlo requiere agregar las secuencias de promotores específicos (por ejemplo, T7 y SP6) a los primers para producir las sondas complementarias y anticomplementarias (*sense* y *antisense*) de los transcritos de interés. Esto afecta a la especificidad de los primers, por lo que es necesario tener varios diseños alternativos. Para teñir los cisticercos, se requiere permeabilizar el tegumento del parásito. Esto se ha logrado en los cisticercos con escólex evaginado (Anexo 12), pero aún es un desafío en los cisticercos con escólex invaginado, ya que las estructuras dentro de la vesícula deben ser reconocibles, en orientación y morfología.

Estudiar la inhibición de alguna de las vías de señalización, o incluso uno de los elementos de estas vías, requiere de inhibidores específicos, lo cual es factible mediante ARN de interferencia, como se ha logrado en planarias, *Hymenolepis*,

*Schistosoma*, etc. En *Taenia solium* el desarrollo de esta técnica no se encuentra aún ni en proceso de estandarización. Las técnicas de WMISH y ARN de interferencia son los próximos objetivos metodológicos en el estudio molecular de *Taenia solium* en nuestro grupo de investigación.

## VIII. CONCLUSIONES

El modelo *in vitro* de evaginación del escólex de *Taenia solium* es funcional y reproducible, y permite estudiar procesos moleculares implicados en esta etapa clave del desarrollo del parásito. La sensibilidad del cisticerco al ácido taurocólico confirma su utilidad como herramienta experimental para analizar vías de señalización en distintos momentos del desarrollo, emulando las características del entorno intestinal.

Los genes *wnt1*, *wnt11a* y *sfrp* muestran un patrón de expresión diferencial, con mayor expresión en cisticercos recientemente evaginados. La expresión diferencial de *wnt11a* y *sfrp* antes de la evaginación y después de la evaginación del escólex es una primera evidencia de que un eje anteroposterior definido en el cisticerco es un requisito para evaginar el escólex.

El marcador de proliferación *h2b* muestra una expresión aumentada después de la evaginación y hacia estadios más tardíos. Esta observación es coherente con patrones conservados en otros platelmintos.

La inhibición de la vía Wnt mediante IWP-3 no provocó cambios fenotípicos evidentes antes de la evaginación, pero sí redujo significativamente la expresión de genes como *axin* y *argonaute* tras la evaginación, lo que sugiere que el efecto del

inhibidor es progresivo. Esto podría deberse a una limitación en la concentración o al método de administración del inhibidor.

Los genes reguladores de la vía canónica, como *pcf*, *groucho*, *axin* y *gsk3*, aumentan progresivamente su expresión conforme avanza el desarrollo, respaldando un modelo de activación regulada de la vía Wnt, necesaria para controlar los niveles de  $\beta$ -catenina y la progresión morfogénica del parásito.

La expresión estable del gen *argonaute* durante el desarrollo, incluso tras la evaginación, sugiere su rol en el mantenimiento de la población de células germinativas. La disminución de su expresión con el inhibidor IWP-3 refuerza la conexión entre la vía Wnt y el control de pluripotencia o proliferación en células madre parasitarias.

Se identificó una condición experimental crítica no reportada en estudios previos: el efecto del transporte del cisticerco desde su extracción del músculo de cerdo al cultivo. La transcripción de varios genes aumenta durante este proceso, lo que podría reflejar una respuesta anticipatoria a la evaginación más que una simple respuesta al estrés por nutrientes.

Limitaciones metodológicas como la imposibilidad de validar espacialmente la expresión génica por qPCR, la baja eficiencia de penetración de inhibidores, y la ausencia de herramientas como RNAi o WMISH plenamente estandarizadas en *Taenia solium*, impiden interpretaciones más concluyentes sobre la función de genes específicos. El desarrollo de técnicas como RNA de interferencia (RNAi) e hibridación in situ de montaje completo (WMISH) permitirá avanzar en la

validación espacial y funcional de los genes implicados en el desarrollo y diferenciación del parásito.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acar, A., Hidalgo-Sastre, A., Leverentz, M. K., Mills, C. G., Woodcock, S., Baron, M., & Brennan, K. (2021). Inhibition of Wnt signalling by Notch via two distinct mechanisms. *Scientific reports*, 11(1), 9096.

Adell, T., Salò, E., Boutros, M., & Bartscherer, K. (2009). Smed-Evi/Wntless is required for  $\beta$  catenin-dependent and-independent processes during planarian regeneration. *Development (Cambridge, England)*, 136(6), 905–910.

Almuedo-Castillo, M., Sureda-Gómez, M., & Adell, T. (2012). Wnt signaling in planarians: new answers to old questions. *The International journal of developmental biology*, 56(1-2-3), 53-65.

Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research*, 64(15), 5245-5250.

Aranda, P. S., LaJoie, D. M., & Jorcyk, C. L. (2012). Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*, 33(2), 366-369.

Baloghova, N., Lidak, T., & Cermak, L. (2019). Ubiquitin ligases involved in the regulation of Wnt, TGF- $\beta$ , and notch signaling pathways and their roles in mouse development and homeostasis. *Genes*, 10(10), 815.

Bayle, E. D., Svensson, F., Atkinson, B. N., Steadman, D., Willis, N. J., Woodward, H. L., & Fish, P. V. (2021). Carboxylesterase notum is a druggable target to modulate Wnt signaling. *Journal of medicinal chemistry*, 64(8), 4289-4311.

Blume J. (2020). La inhibición de la gamma secretasa altera la expresión de genes de la vía de señalización Notch en el cisticerco de *Taenia solium* y reprime la evaginación del escólex. Tesis de Maestría en Bioquímica y Biología Molecular, UPCH.

Castaneda-Carpio, D., Gutierrez-Loli, R., Maravi-Jaime, J., Del Aguila, S. W., Villar-Davila, V., Moyano, L. M., & Guerra-Giraldez, C. (2025). Transcriptome of *Taenia solium* during in vitro cyst activation and initial growth into the tapeworm stage. *Scientific data*, 12(1), 808.

Cayman chemicals. (Sin fecha). IWP-3 (CAS 687561-60-0). Disponible en: <https://www.caymanchem.com/product/13953/iwp-3> (Accessed: 26 June 2024).

CDC - dpdx - echinococcosis (2019) Centers for Disease Control and Prevention. Available at: <https://www.cdc.gov/dpdx/echinococcosis/index.html> (Accessed: 26 June 2024).

CDC - dpdx - hymenolepiasis (2024) Centers for Disease Control and Prevention. Available at: <https://www.cdc.gov/dpdx/hymenolepiasis/index.html> (Accessed: 26 June 2024).

Chatterjee, S. J., Halaoui, R., Deagle, R. C., Rejon, C., & McCaffrey, L. (2019). Numb regulates cell tension required for mammary duct elongation. *Biology open*, 8(5), bio042341.

Chen, B., Dodge, E., Tang, W., Lu, J., Ma, Z., Fan, C. W. & Lum, L. (2009). Small molecule– mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nature chemical biology*, 5(2), 100-107.

Chile, N., Clark, T., Arana, Y., Ortega, Y. R., Palma, S., Mejia & Cysticercosis Working Group in Peru. (2016). In vitro study of *Taenia solium* postoncospherical form. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(2), e0004396.

Cleland James P, Vu Hanh T.-K, Dickmann Johanna EM, Rozanski Andrei, Werner Steffen, Schuhmann Andrea, Shevchenko Anna, Rink Jochen C (2025) A comparative analysis of planarian regeneration specificity reveals tissue polarity contributions of the axial cWnt signalling gradient. *eLife* 14:RP105707

Collins III, J. J., Wang, B., Lambrus, B. G., Tharp, M. E., Iyer, H., & Newmark, P. A. (2013). Adult somatic stem cells in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nature*, 494(7438), 476-479.

Costábile, A., Domínguez, M. F., Guarnaschelli, I., Preza, M., Koziol, U., Castillo, E., & Tort, J. F. (2024). Purification and transcriptomic characterization of proliferative cells of *Mesocestoides corti* selectively affected by irradiation. *Frontiers in parasitology*, 3, 1362199.

Cruciat, C. M., & Niehrs, C. (2013). Secreted and wnt transmembrane inhibitors and activators. *Cold spring harbor perspectives in biology*, 5(3), a015081.

De Coster, T., Van Damme, I., Baauw, J., & Gabriël, S. (2018). Recent advancements in the control of *Taenia solium*: a systematic review. *Food and waterborne parasitology*, 13, e00030.

Garcia, H. H., Gonzalez, A. E., & Gilman, R. H. (2020). *Taenia solium* cysticercosis and its impact in neurological disease. *Clinical microbiology reviews*, 33(3), 10-1128.

Gurley, K. A., Elliott, S. A., Simakov, O., Schmidt, H. A., Holstein, T. W., & Alvarado, A. S. (2010). Expression of secreted Wnt pathway components reveals unexpected complexity of the planarian amputation response. *Developmental biology*, 347(1), 24-39.

- Gurley, K. A., Rink, J. C., & Alvarado, A. S. (2008).  $\beta$ -catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis. *Science*, 319(5861), 323-327.
- Herz, M., Zarowiecki, M., Wessels, L., Pätzel, K., Herrmann, R., Braun, C., & Brehm, K. (2024). Genome-wide transcriptome analysis of *Echinococcus multilocularis* larvae and germinative cell cultures reveals genes involved in parasite stem cell function. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 14, 1335946.
- Hikasa, H., & Sokol, S. Y. (2013). Wnt signaling in vertebrate axis specification. *Cold spring harbor perspectives in biology*, 5(1), a007955.
- Hildreth, M. B. (1983). Structure of a tapeworm blastocyst and its function in the carbohydrate metabolism of the inlying juvenile scolex (*Otobothrium insigne*). *Tulane University ProQuest Dissertations & Theses*, 8322094.
- Holstein, T. W. (2008). Wnt signaling in cnidarians. *Wnt signaling*, 47-54.
- Holstein, T. W. (2012). The evolution of the Wnt pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in biology*, 4(7), a007922.
- Hossain, M.S., Shabir, S., Toye, P. et al. Insights into the diagnosis, vaccines, and control of *Taenia solium*, a zoonotic, neglected parasite. *Parasites vectors*, 16, 380 (2023).
- Jarero, F. (2018). Wnt, Hedgehog and Notch signalling in relation to tapeworm anteroposterior polarity and segmentation (Doctoral dissertation, UCL (University College London)).
- Jarero, F., Baillie, A., Riddiford, N., Montagne, J., Koziol, U., & Olson, P. D. (2024). Muscular remodeling and anteroposterior patterning during tapeworm segmentation. *Developmental dynamics*, 253(11), 998-1023.
- Kaidanovich-Beilin, O., & Woodgett, J. R. (2011). GSK-3: functional insights from cell biology and animal models. *Frontiers in molecular neuroscience*, 4, 40.
- Koziol, U., Domínguez, M. F., Marín, M., Kun, A., & Castillo, E. (2010). Stem cell proliferation during in vitro development of the model cestode *Mesocestoides corti* from larva to adult worm. *Frontiers in zoology*, 7(1), 22.
- Koziol, U., Jarero, F., Olson, P. D., & Brehm, K. (2016). Comparative analysis of Wnt expression identifies a highly conserved developmental transition in flatworms. *BMC biology*, 14(1), 1-16.
- Koziol, U., Rauschendorfer, T., Zanon Rodríguez, L., Krohne, G., & Brehm, K. (2014). The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*. *Evodevo*, 5(1), 1-23.

- Kumar, V., Vashishta, M., Kong, L., Wu, X., Lu, J. J., Guha, C., & Dwarakanath, B. S. (2021). The role of Notch, Hedgehog, and Wnt signaling pathways in the resistance of tumors to anticancer therapies. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 650772.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Maravi, Castaneda-Carpio, D., J., Gutierrez-Loli, R., Villar, V., Blume La Torre, J., Del Aguila, S. W., & Guerra-Giraldez, C. (2022). Validation of Reference Genes for RT-qPCR Relative Expression Analysis in Pre-Adult Stages of *Taenia solium*. Manuscrito en preparación.
- Mehta, S., Hingole, S., & Chaudhary, V. (2021). The emerging mechanisms of Wnt secretion and signaling in development. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 714746.
- Montagne, J., Preza, M., & Koziol, U. (2023). Stem cell proliferation and differentiation during larval metamorphosis of the model tapeworm *Hymenolepis microstoma*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1286190.
- Montagne, J., Preza, M., Castillo, E., Brehm, K., & Koziol, U. (2019). Divergent Axin and GSK-3 paralogs in the beta-catenin destruction complexes of tapeworms. *Development genes and evolution*, 229(4), 89-102.
- Münder, S., Tischer, S., Grundhuber, M., Büchels, N., Bruckmeier, N., Eckert, S., ... & Böttger, A. (2013). Notch-signalling is required for head regeneration and tentacle patterning in Hydra. *Developmental biology*, 383(1), 146-157.
- Muyal, Jai & Muyal, Vandana & Kaistha, Brajesh & Seifart, Carola & Fehrenbach, Heinz. (2009). Systematic comparison of RNA extraction techniques from frozen and fresh lung tissues: Checkpoint towards gene expression studies. *Diagnostic pathology*. 4. 9.
- Nanista, E. M., Poythress, L. E., Skipper, I. R., Haskins, T., Cora, M. F., & Rozario, T. (2025). Anterior-posterior polarity signals differentially regulate regeneration-competence of the tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *bioRxiv*.
- Newmark, P. A., & Alvarado, A. S. (2000). Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Developmental biology*, 220(2), 142-153.
- Olson, P. D. (2008). Hox genes and the parasitic flatworms: new opportunities, challenges and lessons from the free-living. *Parasitology international*, 57(1), 8-17.
- Olson, P. D., Zarowiecki, M., James, K., Baillie, A., Bartl, G., Burchell, P., ... & Berriman, M. (2018). Genome-wide transcriptome profiling and spatial expression analyses identify signals and switches of development in tapeworms. *EvoDevo*, 9(1), 21.

Organización Mundial de la Salud. (2022). *Taenia solium* Taeniasis/cysticercosis. Disponible en: <https://www.paho.org/en/topics/taenia-solium-taeniasiscysticercosis>

Orrego, M. A., Szczesniak, M. W., Vasquez, C. M., Verastegui, M. R., Bustos, J. A., Garcia, H. H., & Nash, T. E. (2024). Transcriptomic analysis of subarachnoid cysts of *Taenia solium* reveals mechanisms for uncontrolled proliferation and adaptations to the microenvironment. *Scientific reports*, 14(1), 11833.

Paludo, G. P., Thompson, C. E., Miyamoto, K. N., Guedes, R. L. M., Zaha, A., de Vasconcelos, A. T. R., ... & Ferreira, H. B. (2020). Cestode strobilation: prediction of developmental genes and pathways. *BMC genomics*, 21(1), 487.

Pascual-Carreras, E., Marín-Barba, M., Castillo-Lara, S., Coronel-Córdoba, P., Magri, M. S., Wheeler, G. N., ... & Adell, T. (2023). Wnt/ $\beta$ -catenin signalling is required for pole-specific chromatin remodeling during planarian regeneration. *Nature communications*, 14(1), 298.

Pawlowski, Z. (2002). *Taenia solium*: Basic biology and transmission. *G Singh, ed.*

Petersen, C. P., & Reddien, P. W. (2009). Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell*, 139(6), 1056-1068.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.

Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*, 26(6), 509-515.

Pouchkina-Stantcheva, N. N., Cunningham, L. J., Hrkova, G., & Olson, P. D. (2013). RNA-mediated gene suppression and in vitro culture in *Hymenolepis microstoma*. *International journal for parasitology*, 43(8), 641-646.

Qian, L., Mahaffey, J. P., Alcorn, H. L., & Anderson, K. V. (2011). Tissue-specific roles of Axin2 in the inhibition and activation of Wnt signaling in the mouse embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(21), 8692-8697.

Qin, K., Yu, M., Fan, J., Wang, H., Zhao, P., Zhao, G., & Shi, L. L. (2024). Canonical and noncanonical Wnt signaling: multilayered mediators, signaling mechanisms and major signaling crosstalk. *Genes & Diseases*, 11(1), 103-134.

Raeisi, M., Saberivand, M., Velaei, K., Aghaei, N., Rahimi-Farsi, N., Kharrati-Shishavan, H., Hassanzadeh, D., & Mehdizadeh, A. (2022). Porcn as a novel therapeutic target in cancer therapy: A review. *Cell biology international*, 46(12), 1979-1991. Rios-Valencia, D. G., Estrada, K., Calderón-Gallegos, A., Tirado-Mendoza, R., Bobes, R. J., Laclette, J. P., & Cabrera-Bravo, M. (2024). Effect of Hydroxyurea on Morphology, Proliferation, and Protein Expression on *Taenia crassiceps* WFU Strain. *International journal of molecular sciences*, 25(11), 6061.

- Rivera, A. S., & Weisblat, D. A. (2009). And Lophotrochozoa makes three: Notch/Hes signaling in annelid segmentation. *Development genes and evolution*, 219(1), 37-43.
- Routledge, D., & Scholpp, S. (2019). Mechanisms of intercellular Wnt transport. *Development*, 146(10), dev176073.
- Rozario, T., Quinn, E. B., Wang, J., Davis, R. E., & Newmark, P. A. (2019). Region-specific regulation of stem cell-driven regeneration in tapeworms. *eLife*, 8, e48958.
- Shi, J. J., Liu, Y. J., Yu, J., Wang, R., Chen, R. Y., Yang, G. J., & Chen, J. (2025). Porcupine (PORCN): structural insights, functional mechanisms, and therapeutic potential in Wnt-driven diseases. *Bioorganic chemistry*, 165, 108955.
- Shibata, N., Kashima, M., Ishiko, T., Nishimura, O., Rouhana, L., Misaki, K., ... & Agata, K. (2016). Inheritance of a nuclear PIWI from pluripotent stem cells by somatic descendants ensures differentiation by silencing transposons in planarian. *Developmental cell*, 37(3), 226-237.
- Silver, N., Best, S., Jiang, J., & Thein, S. L. (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC molecular biology*, 7(1), 33.
- Slais, J. (1970). The morphology and pathogenicity of the bladder worms: *Cysticercus cellulosae* and *Cysticercus bovis*. *Springer science & business media*.
- Smyth, J., & McManus, D. (1989). The physiology and biochemistry of cestodes. pp.233. *Cambridge university press*.
- Sokol, S. Y. (2011). Maintaining embryonic stem cell pluripotency with Wnt signaling. *Development*, 138(20), 4341-4350.
- Solana, J., Kao, D., Mihaylova, Y., Jaber-Hijazi, F., Malla, S., Wilson, R., & Aboobaker, A. (2012). Defining the molecular profile of planarian pluripotent stem cells using a combinatorial RNA-seq, RNA interference and irradiation approach. *Genome biology*, 13(3), R19.
- Speicher, C., Bergmann, M., & Brehm, K. (2024). Echinococcus multilocularis delta/notch signalling components are expressed in post-mitotic cells. *Parasitology research*, 123(12), 418.
- Tsai, J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garcarrubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K. L., & Berriman, M. (2013). The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*, 496(7443), 57-63.
- Umesono, Y., Tasaki, J., Nishimura, Y., Hroudá, M., Kawaguchi, E., Yazawa, S., & Agata, K. (2013). The molecular logic for planarian regeneration along the anterior–posterior axis. *Nature*, 500(7460), 73-76.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), research0034-1.

Villar, V. (2024). Expresión diferencial de los genes reguladores myoD y snail-1 y la participación de la proliferación celular durante la evaginación del escólex de *Taenia solium*. Tesis de licenciatura en Biología, UPCH.

Wagner, D. E., Wang, I. E., & Reddien, P. W. (2011). Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science*, 332(6031), 811-816.

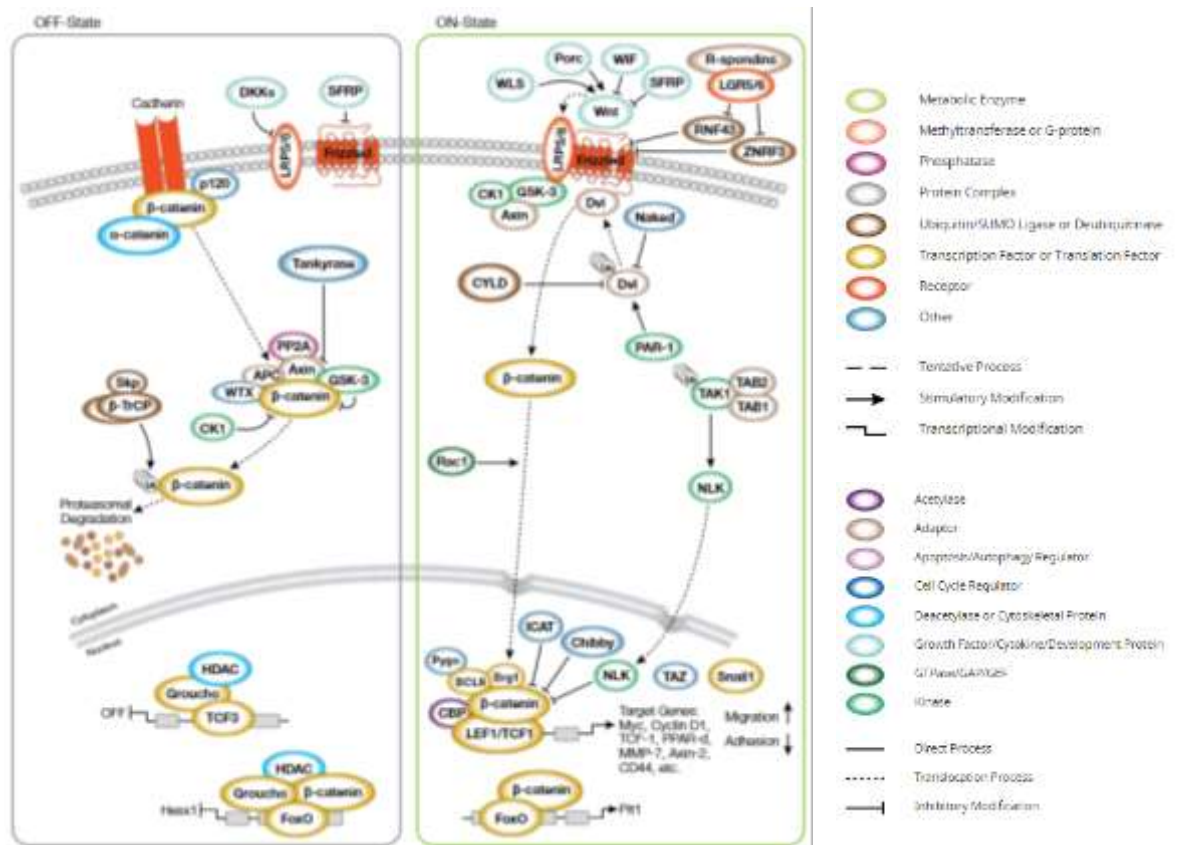
White Jr, A. C., Coyle, C. M., Rajshekhar, V., Singh, G., Hauser, W. A., Mohanty, A., & Nash, T. E. (2018). Diagnosis and treatment of neurocysticercosis: 2017 clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clinical infectious diseases*, 66(8), e49-e75.

Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. Cell Signaling Technology. Disponible en: <https://www.cellsignal.com/pathways/wnt-beta-catenin-signaling-pathway>

Stamos, J. L., & Weis, W. I. (2013). The  $\beta$ -catenin destruction complex. *Cold spring harbor perspectives in biology*, 5(1), a007898.

Zhang, Y., Pizzute, T., & Pei, M. (2014). A review of crosstalk between MAPK and Wnt signals and its impact on cartilage regeneration. *Cell and tissue research*, 358(3), 633-649

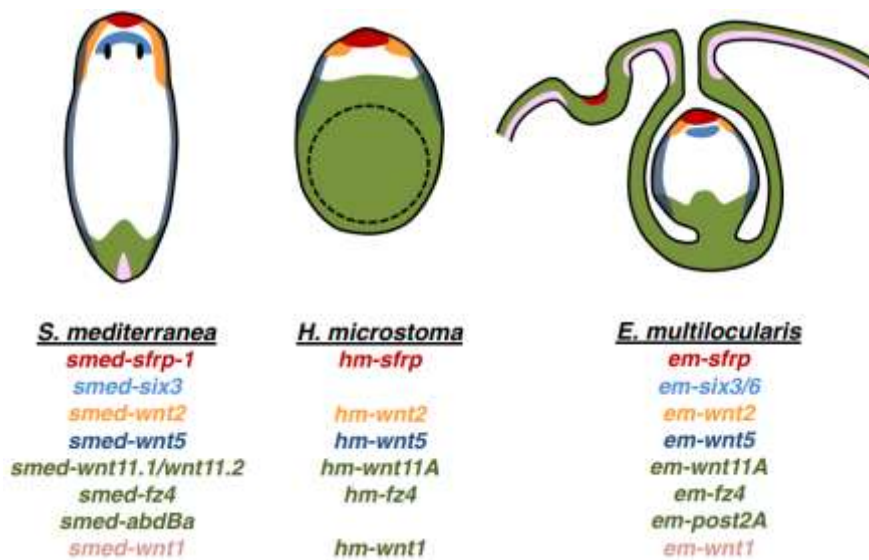
**Anexo 1:** Vía canónica de Wnt dependiente de  $\beta$ -catenina. Imagen adaptada de *Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. Cell Signaling Technology*. Disponible en: <https://www.cellsignal.com/pathways/wnt-beta-catenin-signaling-pathway>.



La vía canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina regula la pluripotencia de las células madre y la diferenciación celular durante el desarrollo. El ligando Wnt es una glicoproteína secretada que se une a los receptores Frizzled, lo que lleva a la formación de un complejo de superficie celular más grande con LRP5/6. Los Frizzleds están ubiquitinados por ZNRF3 y RNF43, cuya actividad es inhibida por la unión de R-espondina a LGR5/6. De esta manera, las R-espondinas aumentan la sensibilidad de las células al ligando Wnt. La activación del complejo del receptor Wnt desencadena el desplazamiento de la quinasa multifuncional GSK-3 $\beta$  de un complejo regulador APC/Axin/GSK-3 $\beta$ . En ausencia de señal Wnt, la  $\beta$ -catenina, una proteína adaptadora integral de adhesión celular de E-cadherina y co-regulador transcripcional, es sustrato de la fosforilación coordinada por CK1 y el complejo

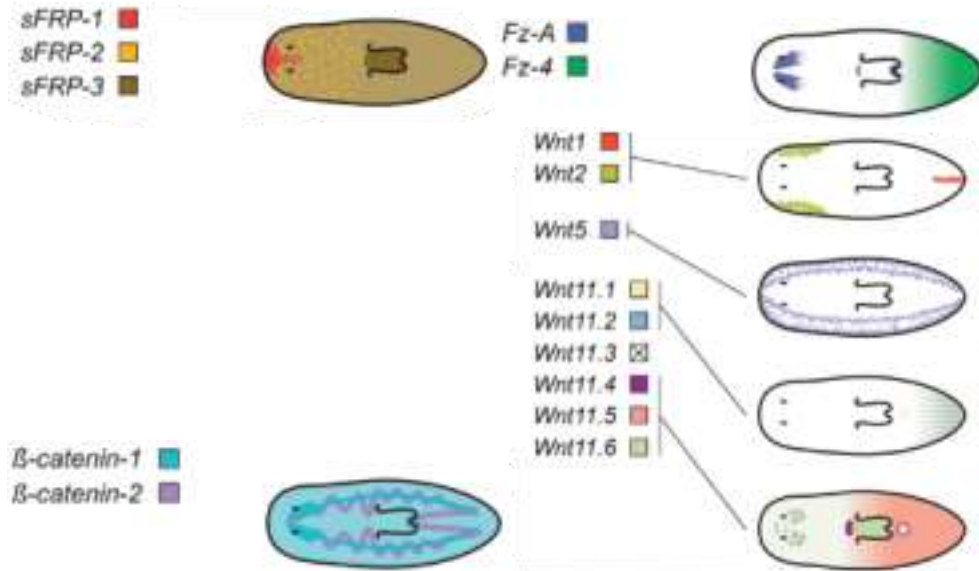
APC/Axin/GSK-3 $\beta$  que conduce a su ubiquitinación y degradación proteasomal a través de la vía  $\beta$ -TrCP/Skp.

**Anexo 2:** Patrones de expresión génica en platelmintos: adultos de la planaria *Schmidtea mediterranea*, cisticercoide de *H. microstoma* y protoescólex de *E. multilocularis*. Las regiones de expresión se muestran con diferentes colores y, en algunos casos, se agruparon varios genes con dominios de expresión ligeramente diferentes. Figura tomada de Koziol et al., 2016.

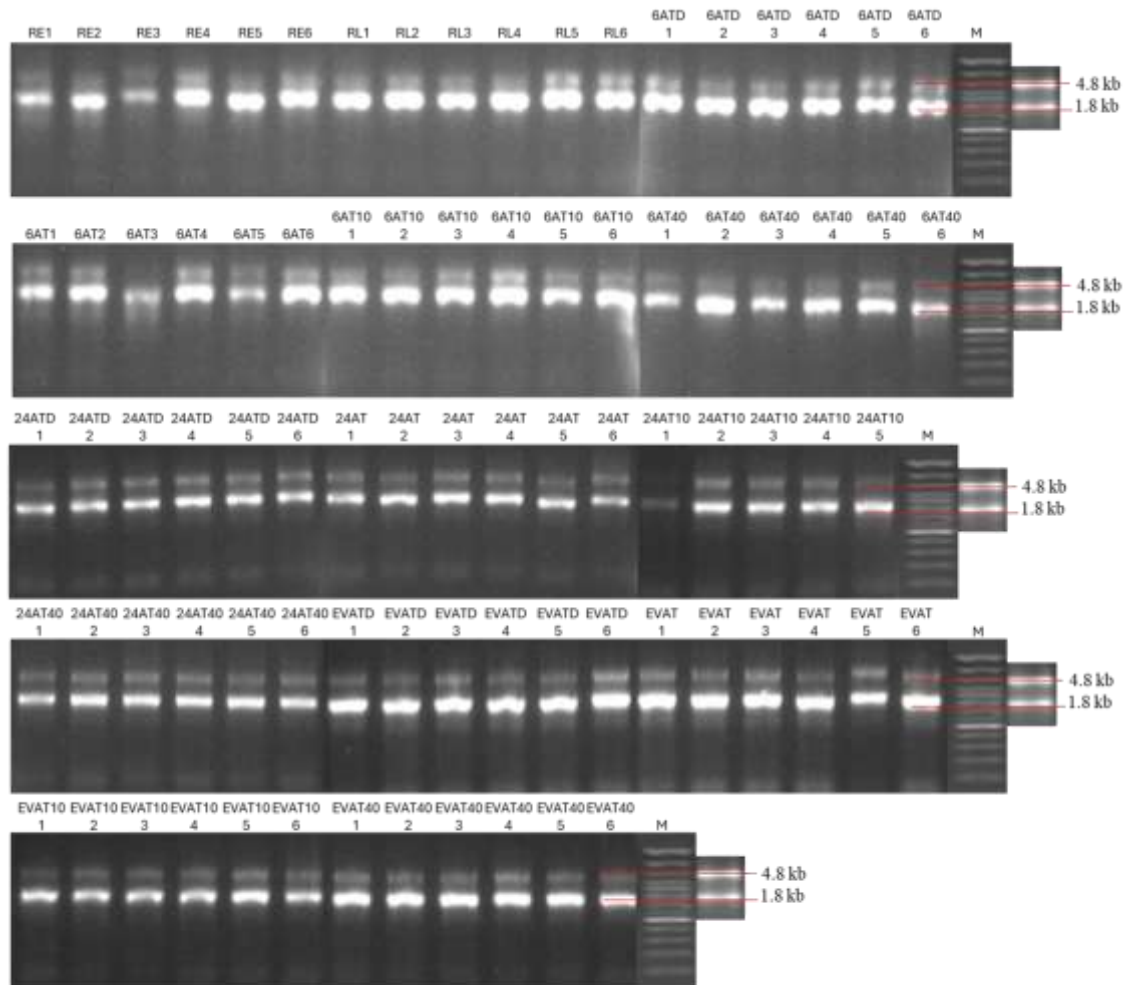


**Anexo 3:** Patrones de expresión de los elementos de la vía Wnt en planaria.

Figura tomada y adaptada de Almuedo *et al.*, 2012.



**Anexo 4:** Gel de agarosa al 1.5%, lejía Clorox® al 1%. Integridad de ARN de las muestras.



RE: Recién extraídos; RL: Recién Llegados; 6ATD: 6 horas + 0.1%AT + 1% DMSO; 6AT: 6 horas + 0.1%AT; 6AT10: 6 horas + 0.1%AT + 10  $\mu$ M IWP-3; 6 horas + 0.1%AT + 40  $\mu$ M IWP-3; 24ATD: 24 horas + 0.1%AT + 1% DMSO; 24AT: 24 horas + 0.1%AT; 24AT10: 24 horas + 0.1%AT + 10  $\mu$ M IWP-3; 24AT40: 24 horas + 0.1%AT + 40  $\mu$ M IWP-3; EVATD: EV + 0.1%AT + 1% DMSO; EVAT: EV + 0.1%AT; EVAT10: EV + 0.1%AT + 10  $\mu$ M IWP-3; EVAT40: EV + 0.1%AT + 40  $\mu$ M IWP-3; M: Marcador (Muyal *et al.*, 2009)

**Anexo 5:** Cuantificación de ARN total de las muestras.

Condición	Código	[ARN] ng/μl	260/ 280	260/ 230	Condición	Código	[ARN] ng/μl	260/ 280	260/ 230
Recién extraídas del cerdo	RE1	27.6	2.04	1.23	24 horas de cultivo, AT 0.1%	24AT1	46.7	2.09	2.03
	RE2	48.4	2.06	1.38		24AT2	61.1	2.11	2.28
	RE3	20.5	1.85	1.01		24AT3	46.5	2.12	2.31
	RE4	43.1	2.04	1.50		24AT4	53	2.05	1.80
	RE5	47.8	2.07	1.56		24AT5	55.7	2.08	2.14
	RE6	31.2	2.00	1.44		24AT6	41.9	2.01	1.69
Recién llegadas al laboratorio	RL1	51.2	2.04	1.45	24 horas de cultivo, AT 0.1%, 10 μM IWP-3	24AT10-1	11.1	2.25	26.9 6
	RL2	55.1	2.12	2.10		24AT10-2	27.9	2.12	4.96
	RL3	55.2	2.02	1.45		24AT10-3	43.9	2.09	2.31
	RL4	55.5	2.02	1.59		24AT10-4	41	2.10	2.61
	RL5	52.6	2.07	1.72		24AT10-5	42.5	2.13	2.73
	RL6	46.3	1.98	1.38		24AT10-6	-	-	-
6 horas de cultivo, AT 0.1%, 1% DMSO	6ATD1	50.5	2.06	1.76	24 horas de cultivo, AT 0.1%, 40 μM IWP-3	24AT40-1	25.2	1.94	0.45
	6ATD2	44.5	1.96	1.37		24AT40-2	30.2	2.14	0.89
	6ATD3	55.6	2.06	1.77		24AT40-3	18.9	2.27	0.22
	6ATD4	55.7	2.02	1.71		24AT40-4	30.9	2.13	1.91
	6ATD5	38.1	2.01	1.52		24AT40-5	35.7	2.18	2.59
	6ATD6	45.7	2.03	1.70		24AT40-6	21.7	2.14	0.55
6 horas de cultivo, AT 0.1%	6AT1	43.8	1.95	1.39	EV horas de cultivo, AT 0.1%, 1% DMSO	EVATD1	42.2	1.99	1.82
	6AT2	63.5	2.00	1.54		EVATD2	50.1	2.07	1.81
	6AT3	30.4	1.91	1.32		EVATD3	59.4	2.14	1.98
	6AT4	45.6	1.98	1.45		EVATD4	44.8	2.10	2.12
	6AT5	20.5	1.80	1.14		EVATD5	40.7	2.10	1.95
	6AT6	55.5	2.04	1.54		EVATD6	27	2.11	2.21
6 horas de cultivo, AT 0.1%, 10 μM IWP-3	6AT10-1	53.9	2.04	1.67	EV horas de cultivo, AT 0.1%	EVAT1	56.3	2.12	0.89
	6AT10-2	39.7	2.03	1.58		EVAT2	41.7	2.07	1.76
	6AT10-3	34.2	1.96	1.53		EVAT3	32.7	2.02	2.22
	6AT10-4	42.1	2.06	1.84		EVAT4	39.2	2.17	2.23
	6AT10-5	36.2	2.05	1.79		EVAT5	19.6	2.02	1.97
	6AT10-6	48.2	2.01	1.59		EVAT6	44.1	2.08	0.94
6 horas de cultivo, AT 0.1%, 40 μM IWP-3	6AT40-1	21.6	2.02	1.51	EV horas de cultivo, AT 0.1%, 10 μM IWP-3	EVAT10-1	45.8	2.06	1.25
	6AT40-2	45	2.08	1.82		EVAT10-2	44.6	2.02	1.78
	6AT40-3	56.6	2.08	2.00		EVAT10-3	39.1	2.01	2.07
	6AT40-4	57.1	2.06	1.86		EVAT10-4	44.4	2.04	1.95
	6AT40-5	48.5	2.10	1.94		EVAT10-5	51.3	2.08	1.97
	6AT40-6	55.3	2.03	1.72		EVAT10-6	41.4	2.11	2.72
24 horas de cultivo, AT 0.1%, 1% DMSO	24ATD1	35.3	2.06	1.13	EV horas de cultivo, AT 0.1%, 40 μM IWP-3	EVAT40-1	58.5	2.09	1.94
	24ATD2	45.8	2.15	2.60		EVAT40-2	45.6	2.06	1.86
	24ATD3	36.8	2.11	2.52		EVAT40-3	54	2.11	2.24
	24ATD4	42.9	2.17	2.59		EVAT40-4	47.6	2.08	1.95
	24ATD5	39	2.16	2.42		EVAT40-5	43.5	2.08	1.86
	24ATD6	42.2	2.08	1.82		EVAT40-6	66.4	2.12	2.23

## Anexo 6: Código en R para análisis de mejor gen de referencia.

```
# Instalar si es necesario:
# install.packages(c("readxl", "dplyr", "tidyr", "ggplot2", "openxlsx"))
library(readxl)
library(dplyr)
library(tidyr)
library(ggplot2)
library(openxlsx)

# ==== 0. Leer archivo ====
archivo <- "Data AT cq_s genes de referencia.xlsx"
cq_data <- read_excel(archivo)
genes <- colnames(cq_data)
# Crear carpeta para guardar gráficos
dir.create("graficos_rankings", showWarnings = FALSE)

# ==== 1. BestKeeper con correlaciones ====
pearson_mat <- cor(cq_data, use = "pairwise.complete.obs", method = "pearson")
pearson_df <- as.data.frame(as.table(pearson_mat)) %>%
  filter(Var1 != Var2) %>%
  group_by(Var1) %>%
  summarise(Mean_Pearson = mean(Freq, na.rm = TRUE)) %>%
  rename(Gene = Var1)
bestkeeper_res <- cq_data %>%
  summarise(across(everything(),
    list(SD = ~sd(.x, na.rm = TRUE),
         Mean = ~mean(.x, na.rm = TRUE)))) %>%
  pivot_longer(cols = everything(),
    names_to = c("Gene", "Metric"),
    names_sep = "_") %>%
  pivot_wider(names_from = Metric, values_from = value) %>%
  mutate(CV = SD / Mean * 100) %>%
  left_join(pearson_df, by = "Gene") %>%
  mutate(Rank_BK = rank(SD))

# Guardar gráfico BestKeeper
bestkeeper_res <- bestkeeper_res %>%
  mutate(Gene_lower = tolower(Gene))
ggplot(bestkeeper_res, aes(x = reorder(Gene_lower, Rank_BK), y = SD)) +
  geom_col(fill = "tomato") +
  geom_text(aes(label = round(SD, 2)), hjust = -0.1) +
  labs(title = "Ranking BestKeeper (SD)", x = "Gen", y = "SD") +
  theme_minimal() +
  coord_flip() +
  theme(axis.text.y = element_text(face = "italic"))
ggsave("graficos_rankings/ranking_bestkeeper.png", width = 6, height = 5)
```

```

# === 2. Delta-Ct comparativo ===
delta_ct_list <- list()
for (i in 1:(length(genes)-1)) {
  for (j in (i+1):length(genes)) {
    delta <- cq_data[[genes[i]]] - cq_data[[genes[j]]]
    delta_ct_list[[paste(genes[i], genes[j], sep = "_vs_")]] <- sd(delta, na.rm =
TRUE)
  }
}
delta_ct_df <- as.data.frame(delta_ct_list) %>%
  pivot_longer(cols = everything(), names_to = "Comparacion", values_to = "SD")
%>%
  separate(Comparacion, into = c("Gen1", "Gen2"), sep = "_vs_")
delta_ct_ranking <- bind_rows(
  delta_ct_df %>% select(Gene = Gen1, SD),
  delta_ct_df %>% select(Gene = Gen2, SD)
) %>%
  group_by(Gene) %>%
  summarise(Mean_SD = mean(SD, na.rm = TRUE)) %>%
  mutate(Rank_dCt = rank(Mean_SD))

# Guardar gráfico delta-Ct
delta_ct_ranking <- delta_ct_ranking %>%
  mutate(Gene_lower = tolower(Gene))
ggplot(delta_ct_ranking, aes(x = reorder(Gene_lower, Rank_dCt), y = Mean_SD))
+
  geom_col(fill = "seagreen") +
  geom_text(aes(label = round(Mean_SD, 2)), hjust = -0.1) +
  labs(title = "Ranking delta-Ct", x = "Gen", y = "SD media") +
  theme_minimal() +
  coord_flip() +
  theme(axis.text.y = element_text(face = "italic"))
ggsave("graficos_rankings/ranking_deltact.png", width = 6, height = 5)

# === 3. NormFinder simple ===
normfinder_simple <- function(cq_data) {
  n_genes <- ncol(cq_data)
  stab_values <- rep(NA, n_genes)
  names(stab_values) <- colnames(cq_data)
  for (i in 1:n_genes) {
    var_sum <- 0
    for (j in 1:n_genes) {
      if (i != j) {
        diff_ij <- cq_data[[i]] - cq_data[[j]]
        var_sum <- var_sum + var(diff_ij, na.rm = TRUE)
      }
    }
  }
}

```

```

    stab_values[i] <- var_sum / (n_genes - 1)
  }
  data.frame(Gene = names(stab_values),
            Stability = stab_values,
            Rank_NF = rank(stab_values))
}
ranking_normFinder <- normfinder_simple(cq_data)

# Gráfico NormFinder
ranking_normFinder <- ranking_normFinder %>%
  mutate(Gene_lower = tolower(Gene))
ggplot(ranking_normFinder, aes(x = reorder(Gene_lower, Rank_NF), y =
Stability)) +
  geom_col(fill = "purple") +
  geom_text(aes(label = round(Stability, 2)), hjust = -0.1) +
  labs(title = "Ranking NormFinder (simplificado)", x = "Gen", y = "Estabilidad")
+
  theme_minimal() +
  coord_flip() +
  theme(axis.text.y = element_text(face = "italic"))
ggsave("graficos_rankings/ranking_normfinder.png", width = 6, height = 5)

# === 4. geNorm iterativo según Vandesompele et al. (2002) ===
geNorm_iterativo <- function(cq_data) {
  expr_rel <- 2^(-as.matrix(cq_data))
  genes_restantes <- colnames(expr_rel)
  ranking <- data.frame()
  while (length(genes_restantes) > 2) {
    M_values <- sapply(genes_restantes, function(gene_i) {
      otros_genes <- setdiff(genes_restantes, gene_i)
      sds <- sapply(otros_genes, function(gene_j) {
        log_ratios <- log2(expr_rel[, gene_i] / expr_rel[, gene_j])
        sd(log_ratios, na.rm = TRUE)
      })
      mean(sds)
    })
    peor_gen <- names(which.max(M_values))
    ranking <- rbind(ranking, data.frame(Gene = peor_gen, M_value =
M_values[peor_gen]))
    genes_restantes <- setdiff(genes_restantes, peor_gen)
  }

  # Añadir los dos genes más estables (sin nuevo cálculo M)
  ranking <- rbind(ranking,
                  data.frame(Gene = genes_restantes[1], M_value = NA),
                  data.frame(Gene = genes_restantes[2], M_value = NA))

  ranking$Rank_gN <- nrow(ranking):1

```

```

    return(ranking)
  }
ranking_geNorm <- geNorm_iterativo(cq_data)

# Gráfico geNorm actualizado
ranking_geNorm <- ranking_geNorm %>%
  mutate(Gene_lower = tolower(Gene))
ggplot(ranking_geNorm, aes(x = reorder(Gene_lower, Rank_gN), y = M_value)) +
  geom_col(fill = "orange") +
  geom_text(aes(label = ifelse(is.na(M_value), "", round(M_value, 2))), hjust = -
0.1) +
  labs(title = "Ranking geNorm iterativo (M value)", x = "Gen", y = "M") +
  theme_minimal() +
  coord_flip() +
  theme(axis.text.y = element_text(face = "italic"))
ggsave("graficos_rankings/ranking_genorm.png", width = 6, height = 5)

# === 5. Ranking combinado ===
ranking_total <- ranking_geNorm %>%
  left_join(ranking_normFinder %>% select(Gene, Rank_NF), by = "Gene") %>%
  left_join(delta_ct_ranking %>% select(Gene, Rank_dCt), by = "Gene") %>%
  left_join(bestkeeper_res %>% select(Gene, Rank_BK), by = "Gene") %>%
  mutate(Geomean_Rank = exp(rowMeans(log(across(starts_with("Rank_"))),
na.rm = TRUE))) %>%
  arrange(Geomean_Rank)

# Gráfico combinado
ranking_total <- ranking_total %>%
  mutate(Gene_lower = tolower(Gene))
ggplot(ranking_total, aes(x = reorder(Gene_lower, Geomean_Rank), y =
Geomean_Rank)) +
  geom_col(fill = "steelblue") +
  geom_text(aes(label = round(Geomean_Rank, 2)), hjust = -0.1) +
  labs(title = "Ranking combinado (media geométrica de 4 métodos)",
x = "Gen", y = "Ranking combinado") +
  theme_minimal() +
  coord_flip() +
  theme(axis.text.y = element_text(face = "italic"))
ggsave("graficos_rankings/ranking_combinado.png", width = 6, height = 5)

# === 6. Exportar resultados a Excel ===
write.xlsx(list(
  "Ranking_Completo" = ranking_total,
  "BestKeeper" = bestkeeper_res,
  "Correlaciones_BK" = pearson_df,
  "Delta_Ct" = delta_ct_ranking,
  "geNorm" = ranking_geNorm,
  "NormFinder_simple" = ranking_normFinder

```

), file = "Ranking\_genes\_referencia\_COMPLETO.xlsx")

**Anexo 7:** Cqs de muestras utilizadas para selección de genes de referencia.

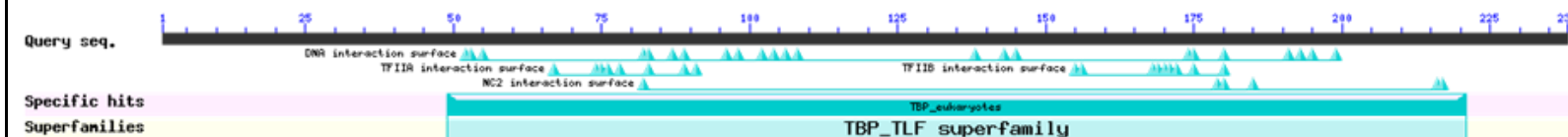
Muestra	MDH	RPL13	COX1	MAPK3	PGK1	EF1 $\alpha$	GAPDH2	GAPDH1	BACTIN1	BACTIN2	TBP	UBE2
PreAT1	23.05	25.89	24.07	27.87	25.61	21.56	31.49	21.93	21.33	25.03	29.28	31.73
PreAT2	22.49	25.20	22.52	25.08	23.07	19.75	30.37	19.21	20.94	23.08	27.06	30.76
PreAT3	21.91	24.82	22.79	26.25	23.41	20.08	31.83	20.34	22.39	25.43	27.14	31.35
PreAT4	20.72	23.64	23.62	26.68	24.30	19.25	29.51	20.28	21.98	23.68	27.52	31.25
PreAT5	21.40	24.56	22.92	27.02	24.27	19.81	30.43	20.75	23.54	23.99	27.82	30.93
PreAT6	21.65	24.75	22.14	25.52	23.30	19.27	30.78	20.68	21.14	23.87	27.83	30.40
PreAT7	21.47	24.09	23.04	27.23	24.56	19.42	30.41	20.10	21.60	24.18	26.89	30.92
PreAT8	21.40	24.13	21.62	24.83	22.88	19.04	30.53	19.30	21.72	24.18	25.58	31.69
EVAT1	21.81	24.89	22.67	26.37	23.85	20.49	30.11	20.88	22.15	23.53	27.81	30.98
EVAT2	20.45	23.36	22.05	25.43	23.31	18.81	29.94	20.34	22.13	23.01	26.99	29.89
EVAT3	20.90	23.78	22.83	26.04	23.37	19.10	31.25	20.24	21.66	20.20	26.34	30.70
EVAT4	20.46	23.61	23.22	25.64	23.32	19.98	31.01	20.61	21.09	20.65	26.30	30.18
EVAT5	20.95	23.74	23.71	25.73	23.16	20.09	30.67	19.27	20.83	20.39	25.76	30.59
EVAT6	21.69	24.47	24.38	26.22	23.51	19.44	30.59	20.34	21.13	22.04	26.13	30.80
EVAT7	20.96	23.56	23.47	25.48	23.00	19.73	30.29	19.96	20.98	21.19	25.98	30.58
EVAT8	21.61	24.35	23.69	25.98	23.12	19.35	30.68	20.50	21.01	22.58	26.20	30.21
EVAT9	21.08	23.89	23.73	25.80	23.36	19.55	30.00	20.13	21.28	23.78	26.02	29.85
EVAT10	20.61	23.58	23.57	25.47	23.28	19.72	30.01	19.71	21.14	20.39	25.57	29.26
POSTEVAT1	22.68	24.69	24.04	26.60	24.49	20.53	30.72	22.37	20.93	23.05	27.48	30.58
POSTEVAT2	21.04	23.88	23.17	25.83	23.59	19.97	31.31	20.81	23.32	23.72	26.36	27.96
POSTEVAT3	21.35	23.87	23.42	25.45	23.57	19.96	31.13	20.66	22.00	21.97	26.09	31.79
POSTEVAT4	20.21	23.36	22.40	25.00	22.60	18.66	30.89	19.43	21.56	20.88	25.45	31.67
POSTEVAT5	21.30	23.75	23.46	25.18	23.54	19.15	31.10	21.22	21.18	22.40	26.60	30.98
POSTEVAT6	20.62	23.67	22.74	25.12	23.00	19.13	30.83	20.22	28.98	21.01	26.07	31.66
POSTEVAT7	20.73	23.61	23.14	25.53	23.24	19.56	31.29	20.12	20.91	21.31	25.91	31.42
POSTEVAT8	20.68	23.68	23.42	25.43	22.95	19.54	31.51	20.10	21.59	21.14	25.89	31.44
POSTEVAT9	20.43	22.66	21.97	23.89	22.27	18.32	29.91	19.49	21.27	20.27	24.93	30.59
POSTEVAT10	20.24	23.22	22.40	24.86	22.63	18.86	30.71	20.03	20.56	21.48	26.00	30.84

**Anexo 8:** Dominios de las secuencias de aminoácidos de cada uno de los genes de interés.

***rpl13* Dominio: Ribosomal protein L13**



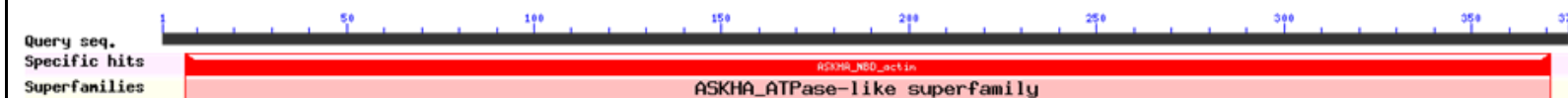
***tbp* Dominio: TATA box binding protein**



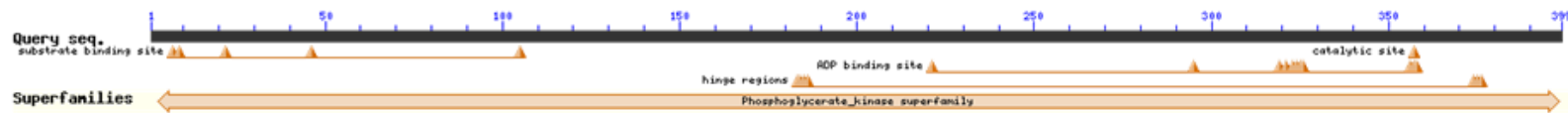
***ube2* Dominio: Ubiquitin-conjugating enzyme**



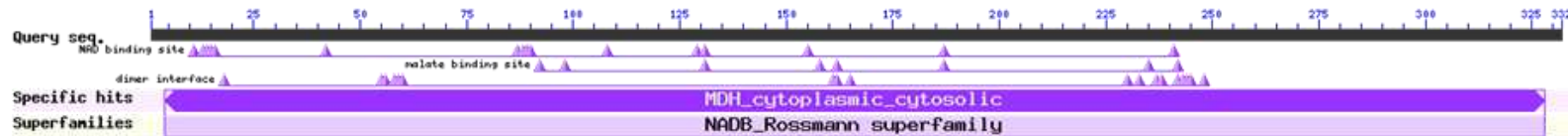
***βactin1* Superfamilia SSF53067 Actin-like ATPase domain**



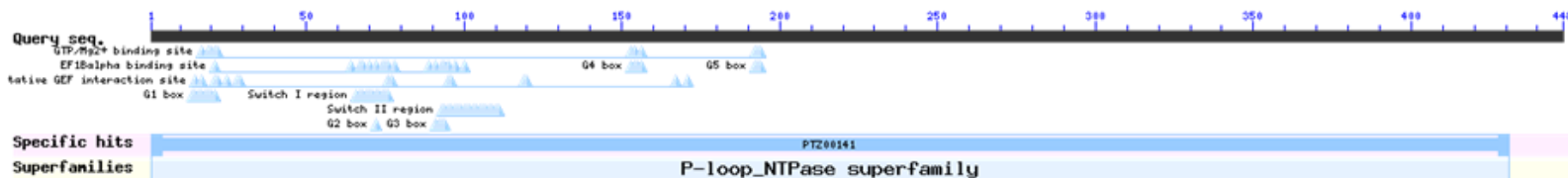
***pgk1* Dominio: Phosphoglycerate kinase**



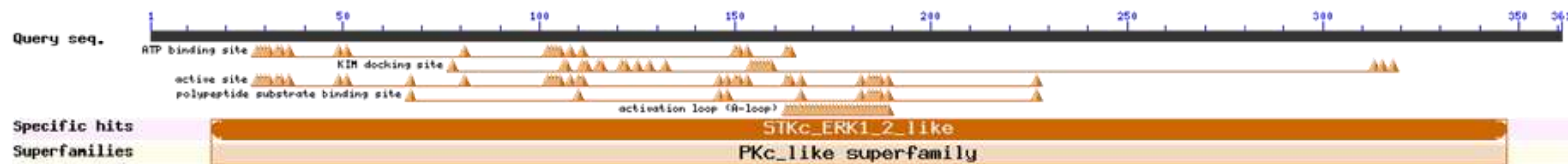
***mdh* Dominio: Lactate/malate dehydrogenase, N-terminal; Lactate/malate dehydrogenase, C-terminal**



***ef1a* Dominio: Elongation factor Tu (EF-Tu), GTP-binding domain; Translation elongation factor EFTu-like, domain 2; GTP-eEF1A, C-terminal domain**



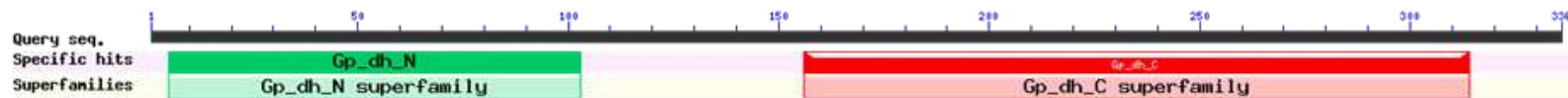
***mapk3* Dominio: Protein kinase domain**



***βactin2* Superfamilia SSF53067 Actin-like ATPase domain**



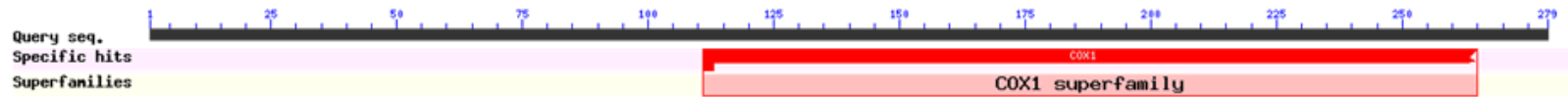
***gapdh1* Dominio: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, NAD(P) binding domain; Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, catalytic domain**



***gapdh2* Dominio: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, NAD(P) binding domain; Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, catalytic domain**



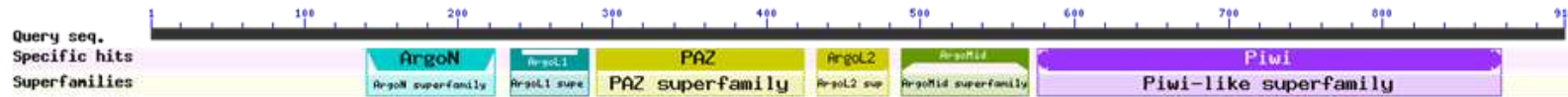
***cox1* Dominio: Cytochrome c oxidase-like, subunit I domain**



***h2b* Familia Histone H2B; dominio: Histone H2A/H2B/H3**

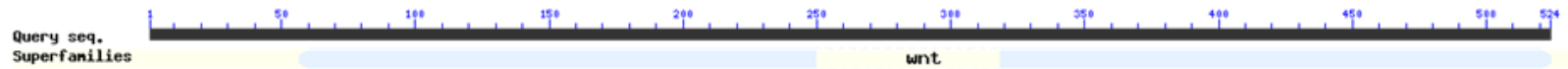


**argonaute-1 (argo) Dominio: Protein argonaute, N-terminal; Argonaute, linker 1 domain; PAZ domain; Protein argonaute, Mid domain**



Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
1702 bits(4409)	0.0	Compositional matrix adjust.	809/850(95%)	832/850(97%)	2/850(0%)
<i>E. multilocularis</i>	140	TPPT--QHSFIFEPARNSHGTEGRAIALRANHFEITVPHGFLHHYDVAISPEKPRRVNREIIEITMNSMHYQNYFYNQKPVFDGRRNMYTRDPLPIGNETVELEVTLPGEGRDRVFKV	257		
<i>Taenia solium</i>	69	+PPT H FIFEPARNSHGTEGRAI L+ANHFEIT+ L HYDVAISPEKPRRVNREIIEITMNS+HY NYF NQKPVFDGRRNMYTR PLPIGN+T+ELEVTLPGEGRDRVFKV	188		
<i>E. multilocularis</i>	258	AIRHVSEVSLFSLDALDGRSKRIPADAVISLQVIMRHLPSMSYTPVGRSFFQTPERGYDNPLGGGREVWFGHQSVRPSQWMMNLIDVSATAFYKSQSVIDFMCEVLDLTDKNDQRRP	377		
<i>Taenia solium</i>	189	AIRH+S+VS SL+DAL G+SKRIPADA+ISLQVIMRHLPSMSYTPVGRSFFQTPERGYDNPLGGGREVWFGHQSVRPSQWMMNLIDVSATAFYKSQSVIDFMCEVLDLTDKNDQRRP	308		
<i>E. multilocularis</i>	378	LDSQRVKFTKEIKGLKVEITHCGSMRRKYRVCNVTRRSAQSQSFFLQLDLSGATVES TVAKYFQDRYNIVLNYPNL PCLQVQEQKHHTYLPLEVCNPNAGQRCIKKL TDMQTS THIKATA	497		
<i>Taenia solium</i>	309	LDSQRVKFTKEIKGLKVEITHCGMRRKYRVCNVTRRSAQSQSFFLQLDLSGATVES TVAKYFQDRYNIVLNYPNL PCLQVQEQKHHTYLPLEVCNPNAGQRCIKKL TDMQTS THIKATA	428		
<i>E. multilocularis</i>	498	RSAPDREKEIINLVRRANFNADPHLQMFGITVPRMVDIQGRVIPAPKIQYGGRTKAQASRSAPDREKEIINLVRRANFNADPHLQMFGITVPRMVDIQGRVIPAPKIQYGGRTKAQAS	557		
<i>Taenia solium</i>	429	RSAPDREKEIINLVRRANF+ DPHL+HFGI+V+PRMVDIQGRVIPAPKIQYGGRTKAQASRSAPDREKEIINLVRRANF+ DPHL+HFGI+V+PRMVDIQGRVIPAPKIQYGGRTKAQAS	488		
<i>E. multilocularis</i>	558	PQLGVDMRGKQFFSGIEIKTWAIAACFAPKRIVREDSLQQFVIQLQKISNDAGMPIQSPPSFCKYATGQQQVEPMFRFLKNQHVGLQLIVVWLPKTPVYAEVKRVGDIHFGLATQCVQS	677		
<i>Taenia solium</i>	489	PQLGVDMRGKQFFSGIEIKTWAIAACFAPKRIVRE++LQQF+IQLQKISNDAGMPIQSPPSFCKYATGQQQVEPMFRFLKNQHVGLQLIVVWLPKTPVYAEVKRVGDIHFGLATQCVQS	608		
<i>E. multilocularis</i>	678	KNVNKTSPQTL SNLCLKINVKLGGINSILVPAVRPTVFRPVIFFGADVTHPPAGDKTKPSIAA+WASHDAHPSRYSATVVRVQSHRQEI IQDL YPMVRSLLLQFYQSTRFKPARI IYYRD	797		
<i>Taenia solium</i>	609	KNVNKTSPQTL SNLCLKINVKLGGINSILVPAVRPTVFRPVIFFGADVTHPPAGDKTKPSIAA+WASHDAHPSRYSATVVRVQSHRQEI IQDL YPMVRSLLLQFYQSTRFKPARI IYYRD	728		
<i>E. multilocularis</i>	798	GVSEGGFSMVLNHELRAIREAC LKLEIEYQGITFVWVQKRHHTRLFCADKKDQMGRSNGIPAGTTVDHVITHTPTEFDFYLC SHAGIQGTSRPSHYHVLWDDNNFSADDLQNL TYQLCHT	917		
<i>Taenia solium</i>	729	GVSEGGFSMVLNHELRAIREACVRL ELEYQGITFVWVQKRHHTRLFCADKKDQMGRSNGIPAGTTVDHVITHTPTEFDFYLC SHAGIQGTSRPSHYHVLWDDNNFSADDLQNL TYQLCHT	848		
<i>E. multilocularis</i>	918	YVRCRSVSI PAPA YAHLVAFRARYHLVEKEIDSGEGSQSGNSDERTPTAMHRAVTVHPETLRVMYFA	987		
<i>Taenia solium</i>	849	YVRCRSVSI PAPA YAHLVAFRARYHLVEKEIDSGEGSQSGNSDERTPTAMHRAVTVHPETLRVMYFA	918		

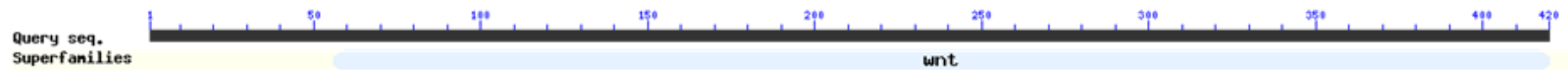
**wnt1** Dominio: Wnt domain



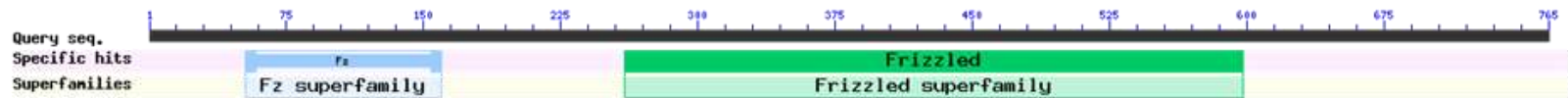
**wnt11a** Dominio: Wnt domain



**wnt11b** Dominio: Wnt domain



**fzb** Dominio: Frizzled domain; Frizzled/Smoothened, 7TM; GPCR, family 2-like, 7TM



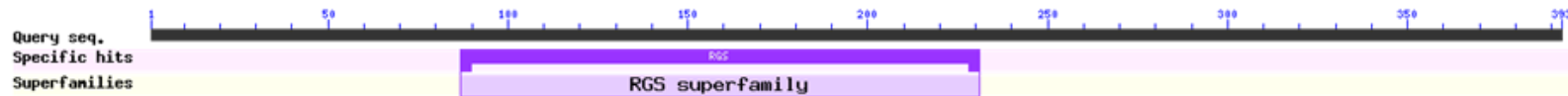
***sfrp* Dominio: Frizzled domain**



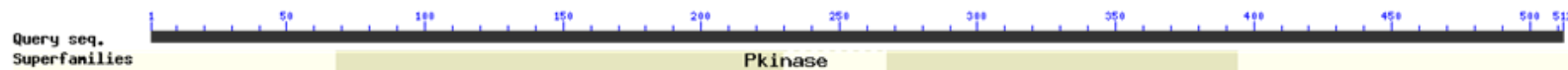
***sfl* Dominio: Frizzled domain**



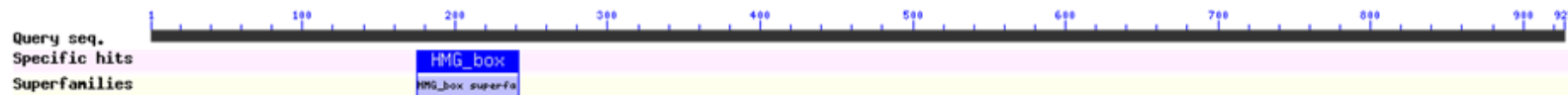
***axin-1* Dominio: RGS-Domain**



***gsk3* Dominio: Glycogen synthase kinase 3, catalytic domain; Protein kinase domain**



***tcf/lef-1* Dominio: High mobility group box domain**



Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
131 bits(329)	2e-37	Compositional matrix adjust.	58/77(75%)	67/77(87%)	0/77(0%)

<i>H. sapiens</i>	265	KKPTIKKPLNAFMLYMKEMRAKVIAECTLKESAAINQILGRRWHALSREEQAKYYELARK ERQLHMQLYPGWSARDN	341
		KK IKKPLNAFML+MKEMR +V ECTLKESAAINQILG++WH LSR EQ KYE+AR+ ++LH +LYPGWSARDN	
<i>T. solium</i>	171	KKAHIKKPLNAFMLFMKEMRPRVQEECTLKESAAINQILGKKWHEL SRAEQTKYYEMARQAKELHQRLYPGWSARDN	247

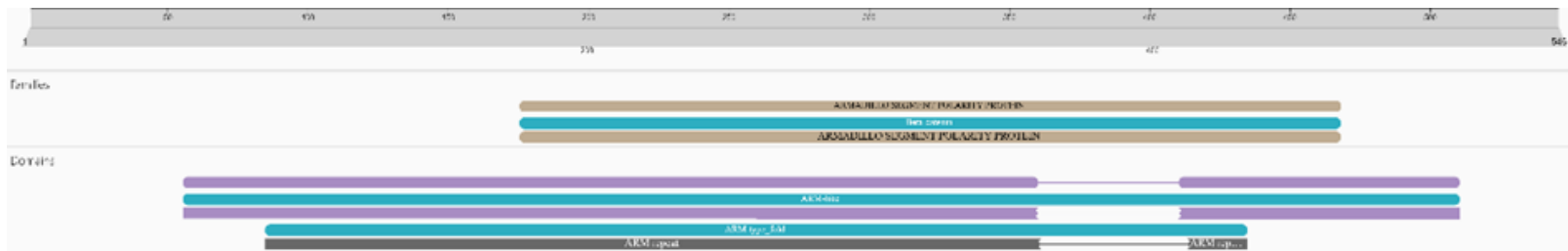
*groucho* Dominio: Groucho/TLE, N-terminal Q-rich domain; WD40 repeats like



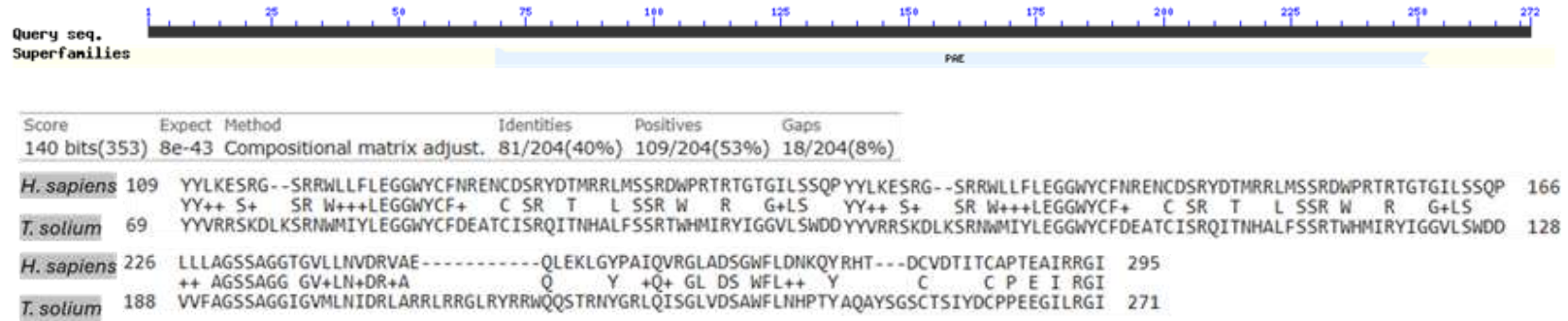
*βcateninaA* Superfamily SSF48371 armadillo repeats



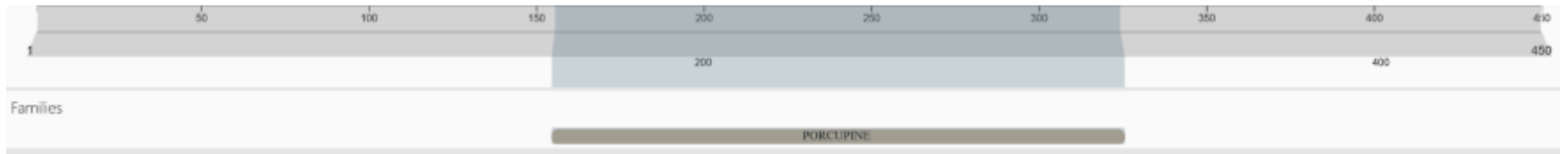
***βcateninaB* Superfamily SSF48371 armadillo repeats**



**notum** Dominio: Notum related, PAE



**porcupine** TsM\_000587900

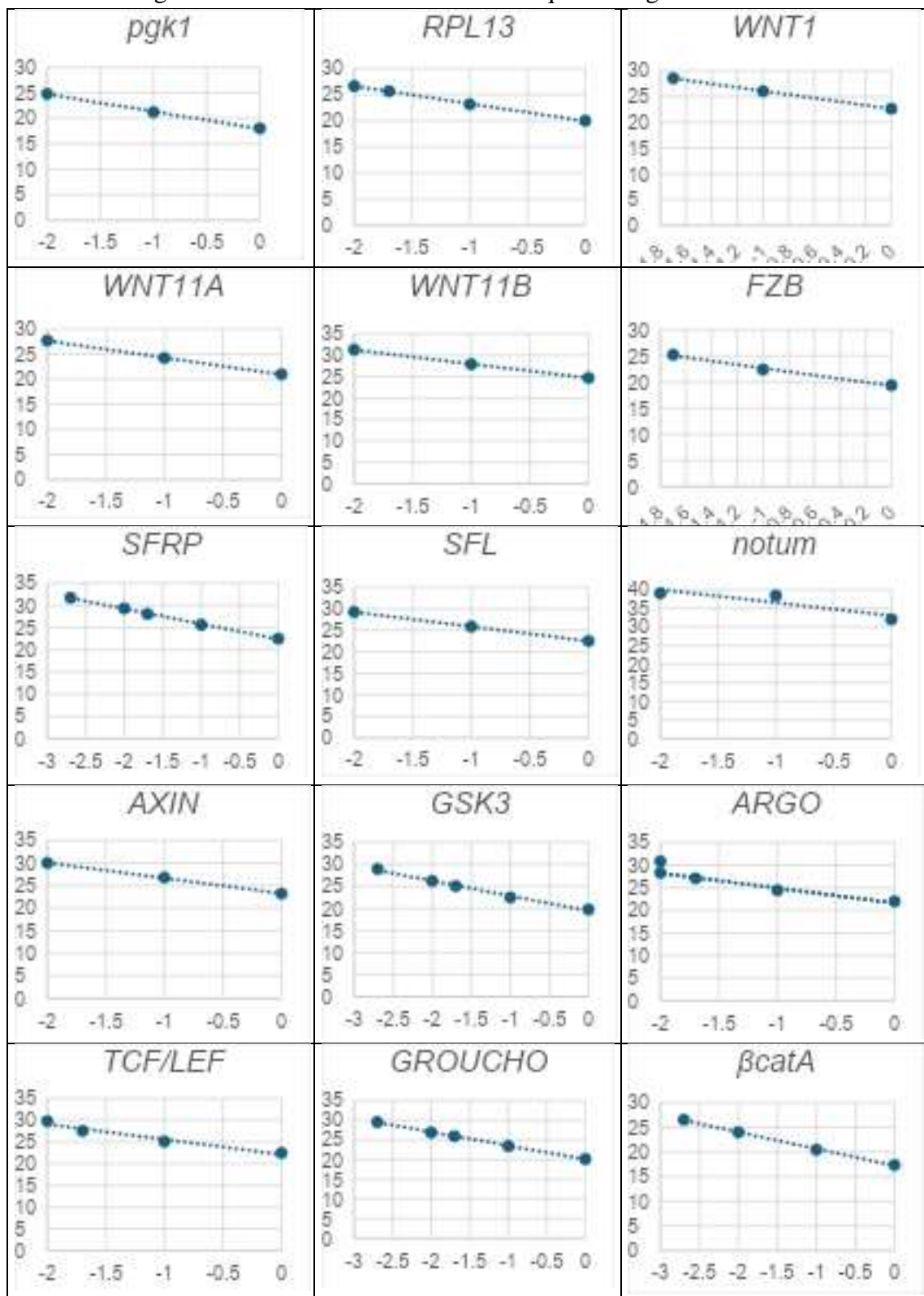


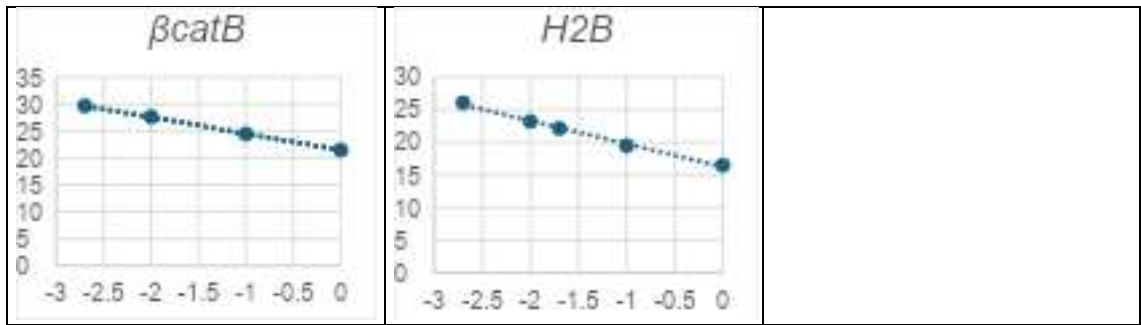
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
422 bits(1085)	9e-149	Compositional matrix adjust.	209/279(75%)	229/279(82%)	7/279(2%)
EmuJ_000111210	MDFGETDL TGYGGVFEDESDIYLNRY	--HYDDEMYEGGFDDYEMQDVKGFAAF	CGSI VRQVWPNIWISLVACLVWRGCQGLFRLLSSTTTPNYLPQIFETLLNAISILLGIILLRH		117
_PORCN	MDFG TDLTGYGG FDED	+N+RY H D MYE F YYE+QDVD+GFAAF	CGSI VRQVWPNIWISLVACLVWRGC+GLFRLLSSTTTPNYLPQIFE LLNAIS+LLGI+LLRH		
TsM_000587900	MDFGATDL TGYGGAFDEDD	--INSRYHHHSGDGMIEDDFGYEVDVDEGFAAF	CGSI VRQVWPNIWISLVACLVWRGCRGLFRLLSSTTTPNYLPQIFEALLNAISMLLGIVLLRH		190
EmuJ_000111210	FFGDLYVRPCAFVFTVGFVSSNFILRDTTVRLGKSQTPVGWTSQMVLVTVYCLLLQLYCEFFMNPREWHMIRGTTMLLMKAISVAASRGPDQQTLEMGFLRHYLAWCGYAFSPGSVIF				237
_PORCN	FFGDLYVRPCAFVFTVG F++ N + R +T	+ + P GWTSQMV VTV CLLLQLYCEFFMNPREWHMIRGT M+L MKAISVAA R P QQ+L+ GFL+HYLAWCGYAFSPGSVIF			
TsM_000587900	FFGDLYVRPCAFVFTVGAFLAFNTMTRGSTACGDEPRKPTGWTSQMVVTVCCLLQLYCEFFMNPREWHMIRGTAMVLAMKAISVAAPRSPHQQSLQTGFLQHYLAWCGYAFSPGSVIF				310
EmuJ_000111210	GPWFGFDSYLHAIRLIGPSSGNPFKDLLRTAVSFAIAI		276		
_PORCN	GPWFGF+SYLH +LI SS NP	L AV F+I I			
TsM_000587900	GPWFGFESYLHGTQLIDSSVNPGLNFQL-AAVLF SIGI		348		
EmuJ_000111210	SSLLHGLNFQLAAVLF SIGIYAYIDF IFRERLSTKVSACIGARACP TCNHRNRNRWVVRGVNLLFSCLAIFHLAYLAVMFDTSEQQKGYNMFHVLDKWSNLNFLSHIIASLTYLCCFFI				518
_PORCN	SS+ GLNFQLAAVLF SIGIYAYIDF R RLS K SACIGARACP TCNHRNR NRWVVRGVN+LFS LAIFHLAYLAVMFDTSE+QKGYNM HVL+KWS+LNFLSHI+A LTY LCF I				
TsM_000587900	SSVNPGLNFQLAAVLF SIGIYAYIDFRLRRLS AKWSACIGARACP TCNHRNRANRWRWVVRGVNVLFSGLAIFHLAYLAVMFDTSEEQKGYNMLHVLKWSNLNFLSHIVAGLTYALCFLI				450

**Anexo 9: Primers seleccionados y tamaño de productos.**

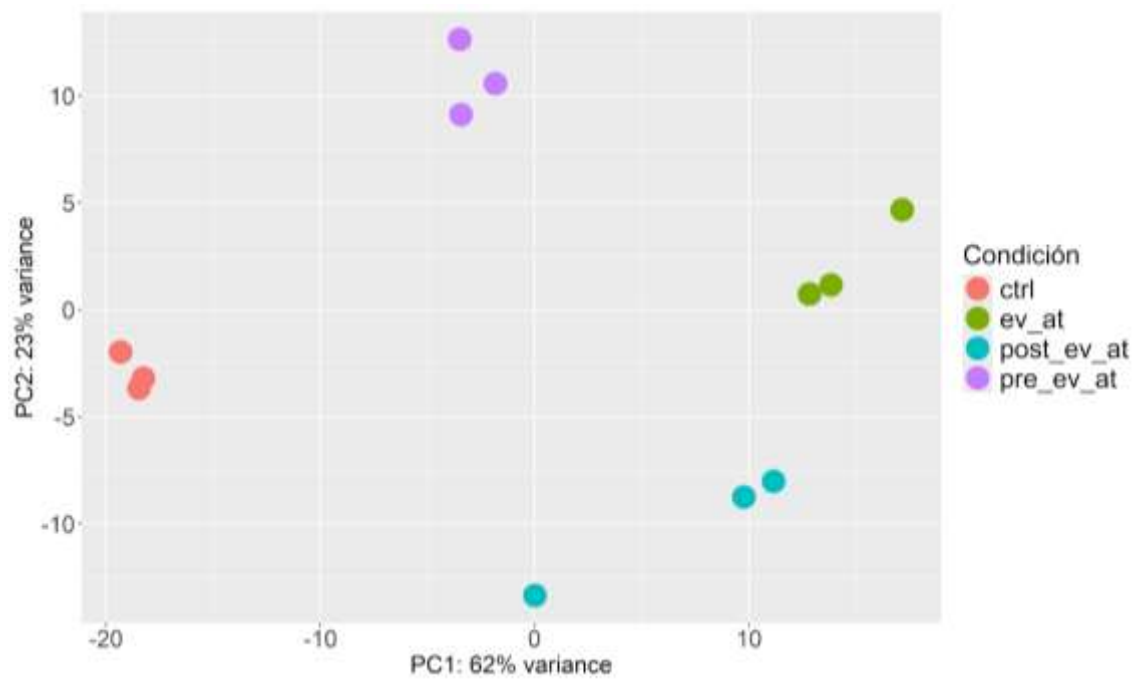
Gen	Primers (Forward/Reverse)	Product o (pb)	Gen	Primers (Forward/Reverse)	Product o (pb)
<i>rpl13</i>	TCCAATGCTATCGGGTGAAT CGCCTCGTGGATCGTATATT	74	<i>wnt1</i>	AGCAGTTCCTCCACAAGACG TGCCGAAGAGAGCATTCTCTG	189
<i>tbp</i>	GCCAAAAGTGCAGATGAGAT CCCGATTGTCTGAATCCAA	89	<i>wnt11a</i>	GGCAGGCGAGGTTCTGTAAT GGCACAGTAGCGACCGATTT	239
<i>ube2</i>	TTGTCCCACCTTATCCCAAGG ACGGCCTAAGCACACTGAAC	100	<i>wnt11b</i>	CGAGTGCCCGACAGACGAT CAGCAGTTGACGGAAGCAGA	186
<i><math>\beta</math>actin1</i>	ATCGTAGCACCACCAGAACG CCCGATTTCGTCTACTCCTG	113	<i>fzb</i>	ACCCGCAACTACAAGACCTG CGCCGCAATAGGTAAAGCAG	192
<i>pgk1</i>	GACACCGCTACTTGTGTGTC TCCGAAAAGAGCTGATACGCC	125	<i>sfrp</i>	TCAGCATTTCGCAACAGCAAC AGTGGGTTTGTGGCAGGTAG	140
<i>mdh</i>	TAAGGTGCTGGTTGTGGCA CGACCTGATAGATGGCACGG	131	<i>sfl</i>	ATACGGAAGGGGTTCGCAAAG ATCGCAGGTGGAAACGGAAT	133
<i>ef1a</i>	TTGCTGCTGGTACTGGTGAG CGCTATAATCAACCGCATCC	138	<i>axin-1</i>	ACATTACAGCAGGGTGGTCTG ATGGTAAGTGGCAGGTGTGG	158
<i>mapk3</i>	TCAAGCCGGACTACTTACCG CACGGTTGCTGTACATCTCG	140	<i>gsk3</i>	CTGGTGACAAGTCTCCACC TCGATGAATCAGTCCCAGCG	180
<i><math>\beta</math>actin2</i>	GTGCGAGACATCAAGGAGAAG GGAAGCGTTCATTGCCAACT	142	<i>tcf/lef-1</i>	AAGCACAGCATCACCCCTAC CCGAAAGGAGATACCGAGGC	151
<i>gapdh1</i>	TCCAAGAGATGAATGCCAATGC CAGAAGGAGCCGAGATGATGA	147	<i>groucho</i>	GTAGCCGCAGGTATGGAGTC TGAACAGGTTAGCACCCAC	190
<i>gapdh2</i>	CAAACCTGCCAAACCTGCCA GCGTCGAAAAGTGGATGATGC	153	<i><math>\beta</math>catA</i>	CCTGGAGCCTAGTATGTGCG AGTGAGAGGATTGTGTGGCG	187
<i>cox1</i>	CCGTTAGGAGGTGGTGTATCC ACCCATAAAAGCCAAAAGCA	154	<i><math>\beta</math>catB</i>	TTCCGTCTCACTGTCTGATGC TCACCAGCCAGGAAACAGTC	150
<i>h2b</i>	GCTCCTAAAAGTAGTGTGAGGCA ATGGCGTAGCTCTCCTTCCT	104	<i>notum</i>	CTGACAGGTCTCCACGCTTC ACCGAATCATGTGCCAGGTG	175
<i>argo</i>	ATTAGACAGTGGTGGCAGCG AGGTCTGCATGTCAGTGAGC	194			

Anexo 10: Logaritmo de la dilución de ADNc vs Cq de cada gen.



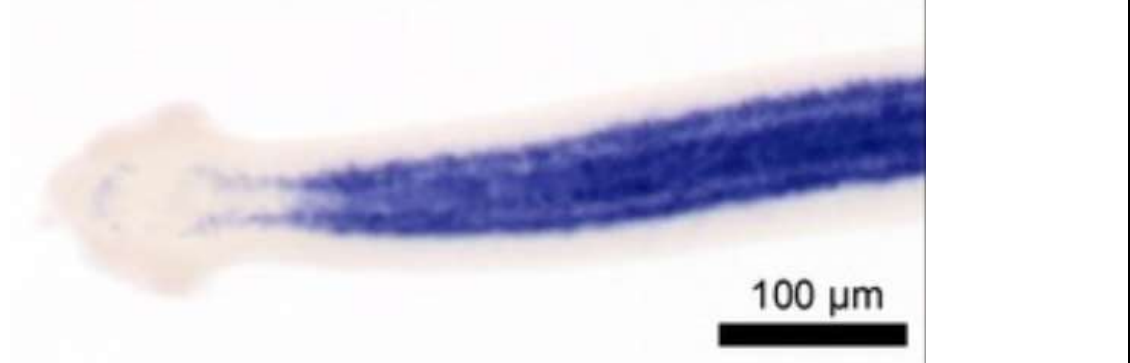


**Anexo 11:** Análisis de componentes principales de réplicas biológicas de CTRL, PRE\_EV\_AT, EV\_AT y POST\_EV\_AT.



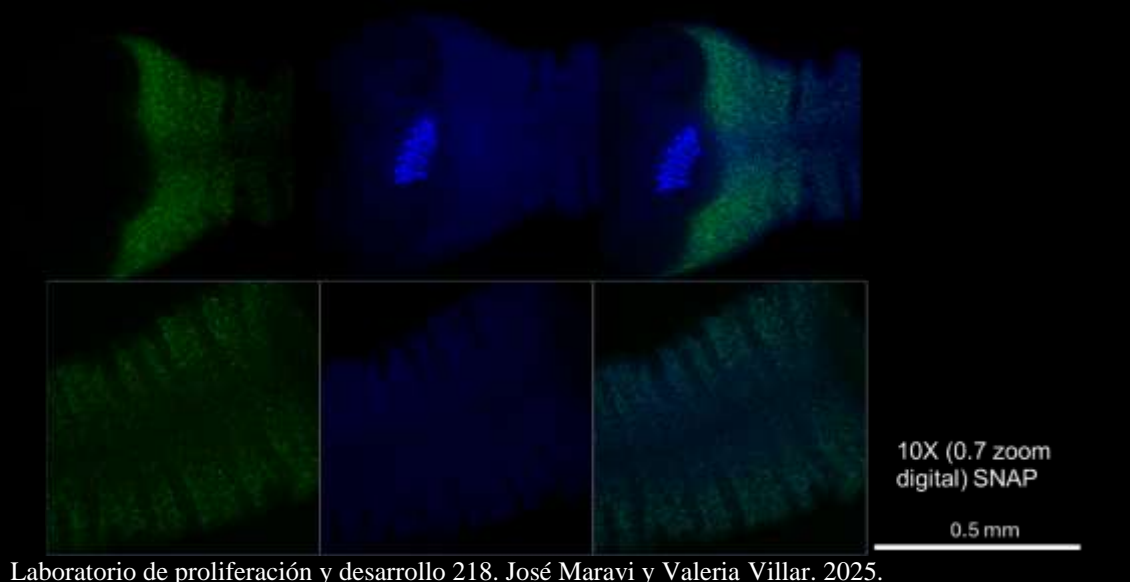
**Anexo 12:** WMISH de *h2b*.

a Adulto de *Hymenolepis microstoma*. En azul, *h2b*.



Rozario *et al.*, 2019

b Post evaginado de cisticerco de *Taenia solium*. En azul núcleos celulares marcados con DAPI. En verde *h2b*.



Laboratorio de proliferación y desarrollo 218. José Maravi y Valeria Villar. 2025.