UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Ciencias y Filosofía "Alberto Cazorla Talleri"

Papel del gen *myoD* en el desarrollo muscular del cuello de *Taenia solium* durante la metamorfosis de larva a adulto

Trabajo de Investigación para optar el Grado Académico de Bachiller en Ciencias con mención en Biología

Autora:

Valeria Alexandra Villar Dávila

Asesores:

Cristina Guerra Giraldez, PhD.

Juan Blume La Torre, MSc.

Laboratorio de Proliferación Celular y Regeneración

Lima – Perú

2021

Tabla de Contenidos

RESUMEN…….. 1

ABSTRACT……..... 2

ESTADO DEL ARTE……..... 3

1. Aspectos generales sobre *Taenia solium*……. 3

1.1. Ciclo de vida e importancia…… 3

1.2. Metamorfosis del estadio larval al adulto……... 4

1.2.1. Evaginación del escólex……... 4

1.2.2. Generación del estróbilo……... 5

1.3. Musculatura del gusano adulto……... 5

1.3.1. Sistemas musculares principales presentes en platelmintos parásitos……... 5

1.3.2. Organización de los componentes musculares en *T. solium*…….. 7

2. Miogénesis en vertebrados y los principales genes reguladores…….. 8

2.1. Miogénesis y su regulación molecular en vertebrados……... 8

2.2. Factores de transcripción miogénicos de tipo bHLH y el desarrollo del músculo esquelético……... 9

2.3. MyoD, una proteína de función conservada que es determinante en la miogénesis……..10

3. Miogénesis en platelmintos de vida libre……12

3.1. Desarrollo muscular descrito en planarias……. 12

3.2. Papel específico de MyoD en el desarrollo muscular de planarias……. 13

4. Miogénesis en un platelminto parásito modelo de laboratorio……..... 14

4.1. Desarrollo muscular en *Hymenolepis microstoma*……..... 14

4.2. Diferencias en la expresión de *MyoD* según el estadio y la región de *H. microstoma*……..……..... 15

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN……. 16

ESRATEGIA DE INVESTIGACIÓN……. 19

ANEXOS…… 21

REFERENCIAS…… 23

RESUMEN

Taenia solium es un cestodo endémico en el Perú que infecta a cerdos y humanos. Dos de sus estadios son: larva metacestode y gusano adulto. La larva se aloja en los tejidos blandos, formando un quiste que contiene al escólex y cuello invaginados del parásito. El gusano adulto se desarrolla en el intestino humano: a partir del cuello se forma un estróbilo de proglótides que producen huevecillos, convirtiéndose en el estadio diseminativo del parásito.

La metamorfosis del estadio larval al adulto implica cambios transcripcionales que originan modificaciones morfológicas, principalmente la evaginación del escólex y la generación del estróbilo. Ambos procesos son críticos en el desarrollo del parásito, pero los genes involucrados en estos eventos han sido poco explorados en *T. solium*.

Estudios en otros platelmintos han identificado elementos transcripcionales que regulan el crecimiento y la regeneración. Entre ellos se encuentra *myoD*, un factor de transcripción que induce y dirige la diferenciación de las células musculares. Como se conocen ortólogos en urocordados y equinodermos, *myoD* resulta ser un regulador universal de la miogénesis en animales bilaterales.

En planarias, *myoD* induce la formación de los músculos longitudinales, indispensables para iniciar la regeneración. En *Hymenolepis microstoma, myoD* presenta una mayor expresión en el cuello y escólex del estadio adulto. Esto sugiere que el gen cumple un papel en el desarrollo muscular de ambos platelmintos. Sin embargo, no se ha definido ni caracterizado la expresión de genes reguladores de miogénesis en *T. solium*, siendo este proceso esencial en el cuello para la extensión continua del estróbilo. Por ello, se propone

evaluar la expresión de *myoD* en larvas y parásitos evaginados in vitro y usar una técnica de silenciamiento para comprobar si este gen regula el desarrollo muscular del cuello y, por lo tanto, participa en la metamorfosis de larva a adulto de *T. solium*.

Palabras clave: *Taenia solium*, *myoD*, miogénesis, cuello

ABSTRACT

Taenia solium is an endemic cestode in Peru that infects pigs and humans. Two of its stages are: metacestode larva and adult worm. The larva lodges in soft tissues, forming a cyst that contains the invaginated scolex and neck of the parasite. The adult worm develops in the human intestine: a strobilus of proglottids that produce eggs is formed from the neck, becoming the disseminative stage of the parasite.

The metamorphosis from the larval to the adult stage implies transcriptional changes that originate morphological modifications, mainly the evagination of the scolex and the generation of the strobilus. Both processes are critical in the development of the parasite, but the genes involved in these events have been scarcely explored in *T. solium*.

Studies in other flatworms have identified transcriptional elements that regulate growth and regeneration. Among them is *myoD*, a transcription factor that induces and directs muscle cell differentiation. As orthologs are present in urochordates and echinoderms, *myoD* turns out to be a universal regulator of myogenesis in bilateral animals.

In planarians, *myoD* induces the formation of longitudinal muscles, essential to initiate regeneration. In *Hymenolepis microstoma*, *myoD* has a higher expression in the neck and scolex of the adult stage. This suggests that the gene plays a role in the muscle

development of both flatworms. However, the expression of myogenesis regulatory genes in *T. solium* has not been defined or characterized, despite the fact that myogenesis is an essential process in the neck for the continuous extension of the strobilus. Therefore, it is proposed to evaluate the expression of *myoD* in larvae and evaginated parasites in vitro and to use a silencing technique to confirm if this gene regulates the muscular development of the neck and, hence, participates in the metamorphosis from the larval to the adult stage of *T. solium*.

Key words: *Taenia solium*, *myoD*, myogenesis, neck

ESTADO DEL ARTE

1. Aspectos generales sobre *Taenia solium*

1.1. Ciclo de vida e importancia

Taenia solium es un cestodo parásito de importancia en salud pública que infecta a cerdos y humanos. La infección con esta tenia y la enfermedad resultante, neurocisticercosis (NCC), son comunes en varios países en desarrollo de Latinoamérica, Asia y África (1,2). Además de causar enfermedad, con un promedio de 9 AVADs (años laborales perdidos debido a enfermedad) por cada 1000 personas por año (3), este parásito genera pérdidas económicas para los ganaderos debido a la cisticercosis porcina (4). Esta condición vuelve al cerdo un animal riesgoso para la ingesta, por lo que su precio en el mercado se reduce hasta en un 30% según un estudio realizado en Camerún, África (3). En el Perú, un estudio en Andahuaylas estimó que los campesinos perdían entre un tercio y la mitad del precio del cerdo, o todo, si este era requisado (5). En cuanto a impacto económico por neurocisticercosis humana en nuestro país, se ha visto que el 54% de un salario mínimo anual es empleado para costear el tratamiento durante el primer año (6). El diagnóstico de la enfermedad (36%)

y la compra de medicamentos (27%) representan los mayores gastos asociados a atención médica (6).

El ciclo de vida de *T.solium* es complejo, involucra al cerdo como hospedero intermediario y al humano como hospedero definitivo. Además, presenta tres estadíos: el huevo, que contiene al embrión u oncósfera, la larva metacestode (quiste o cisticerco) y el gusano adulto. En los tejidos del cerdo infectado está presente el estadio larval (cisticercosis porcina). Al ingerir la carne de cerdo infectada con cisticercos, el gusano adulto se desarrolla en el intestino humano (teniasis). Este gusano produce una gran cantidad de huevecillos altamente infecciosos que se liberan al ambiente mediante las heces, contaminando alimentos que se encuentran en condiciones insalubres. Por esta razón, el estadio adulto se considera el estadio diseminativo del parásito. Cuando una persona ingiere accidentalmente los huevecillos, estos eclosionan en el tracto digestivo y liberan las oncósferas, que se desarrollan como cisticercos y se alojan en tejidos blandos como el músculo esquelético y el cerebro (neurocisticercosis) (1,2,4).

1.2. Metamorfosis del estadio larval al adulto

1.2.1. Evaginación del escólex

El estadio larval o cisticerco consta de una vesícula membranosa, a manera de quiste, que contiene en su interior al escólex (pseudocabeza) y cuello invaginados del parásito (1,2). In vitro, se ha visto que el cisticerco viable se contrae y se relaja de forma lenta y continua. Esto se debe a una doble capa de fibras musculares localizadas justo debajo del tegumento (1). Cuando los cisticercos entran en contacto con enzimas digestivas y sales biliares, se induce la evaginación del escólex, proceso en el que este emerge del quiste. Al ser el escólex liberado en el

duodeno, se adhiere a la mucosa intestinal gracias a sus órganos de fijación: ganchos y ventosas (1,2,7,8).

In vitro, se conoce que la bilis induce la evaginación, aunque la evaginación espontánea también ocurre. Las sales biliares pueden actuar como agentes surfactantes que aumentan la permeabilidad de la membrana del quiste, lo cual permite el ingreso de enzimas digestivas que ayudan a disgregar la vesícula (9). El proceso, sin embargo, no sería solo mecánico, ya que el uso de hormonas como la progesterona y la gonadotropina coriónica humana (hCG) favorecen la evaginación (10,11). No obstante, los eventos de señalización y los mecanismos celulares y moleculares implicados se han explorado muy poco.

1.2.2. Generación del estróbilo

Después de la evaginación del escólex, el cuello va a emerger gradualmente y, a partir de las células proliferativas presentes en esta zona, se empezará a formar el estróbilo de proglótides. Estas proglótides son segmentos hermafroditas que conforman el cuerpo del gusano y se encuentran en distintos grados de madurez. La diferenciación continua de estas estructuras conlleva a la formación de las proglótides grávidas, más distales, capaces de producir cientos de huevecillos (1,2,7).

1.3. Musculatura del gusano adulto

1.3.1. Sistemas musculares principales presentes en platelmintos parásitos

Generalmente, el músculo de los platelmintos parásitos es de tipo liso, tiene miofibras delimitadas por un sarcolema y acopladas por uniones de tipo gap

(12,13). Los elementos contráctiles son protofibrillas delgadas y gruesas. La musculatura lisa de los cestodos corresponde a los músculos “lentos”, capaces de contraerse por un tiempo prolongado con bajos costos energéticos, contrarrestando así la peristalsis del hospedero (13).

Se pueden encontrar tres sistemas musculares bien diferenciados en la mayoría de platelmintos adultos. El primero es el músculo somático, encargado del movimiento locomotor y de darle forma al cuerpo. El segundo es el sistema muscular de los órganos de fijación, que pueden incluir fibras musculares estriadas y fibras de paramiosina. El tercer sistema muscular es el del tracto alimenticio, en el caso de tremátodos, y reproductivo, en cestodos (12,13).

El músculo somático forma una red de fibras que incluye varias agrupaciones musculares. La musculatura de la pared corporal está conformada por fibras circulares externas y longitudinales internas (12). Las fibras musculares diagonales pasan por debajo de las longitudinales en muchos monogeneos y tremátodos, pero están en menor cantidad o ausentes en diversos cestodos como *Moniezia expansa* e *Hymenolepis diminuta* (12,14). Los tres tipos de músculo somático se relacionan con los movimientos que la mayoría de platelmintos realiza regularmente: estiramientos (fibras circulares), encogimientos (fibras longitudinales) y flexiones (fibras diagonales) (12). Todas estas fibras musculares pueden unirse, mediante hemidesmosomas, a la lámina basal o al material fibroso intersticial. En cestodos, los músculos somáticos están mejor desarrollados en las capas más profundas del cuerpo, donde predominan las fibras longitudinales (12). Estas fibras están estratificadas en capas corticales externas y medulares internas.

Asimismo, están presentes las fibras transversales, pero rara vez las diagonales (12,14). La información sobre *T. solium* se limita a una descripción general sobre el entramado de miofilamentos en las proglótides (1). Lo que sí se ha identificado ha sido la presencia de isoformas de actina en el cisticerco, mientras que las isoformas de miosina tipo II se han descrito tanto en el estadio larval como en el adulto (15,16).

La musculatura de los órganos de adherencia, como las ventosas, posee una disposición compleja, pero se deriva principalmente de los músculos de la pared corporal. Las ventosas se abren por acción de los músculos meridionales y se cierran debido a la contracción de los músculos radiales y de las fibras dispuestas ecuatorialmente (12).

Los tractos alimenticio (esófago y ciego intestinal) y reproductivo (oviducto, conductos vitelinos, ootipo, útero) están provistos mayormente de fibras circulares, mientras que las fibras longitudinales y diagonales se encuentran en menor cantidad o incluso ausentes (12).

1.3.2. Organización de los componentes musculares en *T. solium*

El cuerpo de *T. solium* está compuesto de una serie de segmentos llamados proglótides, cubiertos por una superficie tegumentaria. La morfología muscular de este parásito no se ha descrito muy a fondo (1).

Una característica resaltante que sí se ha descrito en el tejido del estróbilo de *T. solium*, es el entramado de los miofilamentos. Este entramado ocurre debido a que

la fibras somáticas del músculo liso, organizadas en haces de miofilamentos longitudinales, se conectan a haces de miofilamentos perpendiculares u oblicuos (1) (**Figs. 1 & 2**). De esta forma, se genera una red bastante densa de miofibrillas en toda la capa externa del tejido del estróbilo (1).

A partir de lo que se ha reportado previamente en otros cestodos, en especial en *H. diminuta* (**Figs. 3 & 4**), se esperaría que en *T. solium* también estén presentes las fibras circulares externas y las longitudinales internas debajo del tegumento (7,12–14). En capas aún más profundas se esperaría encontrar más fibras longitudinales, pero también fibras transversales que marquen los límites entre proglótides (14).

2. Miogénesis en vertebrados y los principales genes reguladores

2.1. Miogénesis y su regulación molecular en vertebrados

La formación del tejido muscular o miogénesis ha sido principalmente estudiada en vertebrados, sobre todo en mamíferos (17,18). A partir de ello, se determinó que los reordenamientos celulares en la miogénesis son controlados mediante ciclos periódicos de expresión genética. Esto se conoce como expresión génica oscilante (17–19).

El músculo esquelético en los embriones de los vertebrados se origina a partir de somitas, segmentos derivados del mesodermo. Para que se dé la determinación miogénica de las somitas, se requiere de morfógenos secretados de tejidos adyacentes. Todos ellos dan inicio y restringen la miogénesis a la región de formación muscular del dermomiotoma (17,18).

Los estudios realizados en mamíferos, también revelaron por primera vez al gen *myoD*, un factor capaz de determinar el destino de un linaje celular y convertir células indiferenciadas en células musculares. Desde ese momento, se puso en evidencia su función como un factor regulador miogénico (MRF) durante el desarrollo (17,18).

2.2. Factores de transcripción miogénicos de tipo bHLH y el desarrollo del músculo esquelético

A lo largo de la última década, se ha descrito en mamíferos una red que controla la formación del músculo esquelético, la cual depende del ingreso de las células a un programa miogénico. La determinación y diferenciación de los mioblastos somáticos dependen principalmente de la expresión de los MRF de tipo bHLH (dominio *basic helix-loop-helix*), un grupo de cuatro proteínas específicas del músculo que incluyen a MyoD, Myf5, miogenina y al Factor Regulador Miogénico 4 (MRF4) (18). En esta red también participan otros factores de transcripción que dirigen a las células hacia la miogénesis, actuando cooperativamente con los MRF (18). Todos ellos actúan en múltiples puntos del linaje muscular para establecer en conjunto el fenotipo del músculo esquelético (18,20). La red de factores responsable de la miogénesis se viene identificando en todos los animales bilaterales, incluyendo protostomados y deuterostomados. Entre los protostomados, por ejemplo, se han identificado ortólogos de *myoD* en nemátodos (*hlh-1* en *Caenorhabditis elegans*) y artrópodos (*nautilus* en *Drosophila*) (18,21). Respecto a los deuterostomados, se han reportado ortólogos en equinodermos (*Sp-MyoD2 en Strongylocentrotus purpuratus*) y urocordados (*Ci-MRF*) (18,21). Estos filos son señalados en el árbol filogenético de los bilateria (22), en la **Figura 5**. La identificación de estos genes revela un alto grado

de conservación de *myoD*, permitiendo realizar estudios comparativos en los bilateria a fin de comprobar la participación de este factor en la miogénesis (18,21). Incluso se ha establecido la filogenia de *AmphiMyoD*, un ortólogo en *Amphioxus*, señalando el vínculo entre la miógenesis de invertebrados y vertebrados (23).

2.3. MyoD, una proteína de función conservada que es determinante en la miogénesis

MyoD fue el primer factor de transcripción de la familia MRF en ser identificado. El dominio bHLH, al igual que en los demás MRFs, le confiere la capacidad de reconocer la secuencia E-box en las regiones reguladoras de genes que se expresan en el músculo esquelético, activando así la transcripción de los mismos (17,20). Además de lo observado en mamíferos, la presencia de ortólogos de MyoD en el árbol filogenético indica que este factor de transcripción es un regulador universal de la miogénesis y un "interruptor maestro" capaz de inducir y dirigir la diferenciación de células musculares en los bilateria.

Es llamado "interruptor maestro", porque se demostró que puede convertir otros tipos de células (fibroblastos, células nerviosas, adipocitos y hepatocitos) en músculo esquelético (17). Estos resultados brindaron la primera evidencia directa de que un solo gen puede iniciar un proceso complejo de diferenciación. El hecho de ser un "factor pionero" (capaz de acceder a genes en una cromatina abierta como cerrada), también facilita la inducción de células de distinto linaje en células musculares, puesto que MyoD recluta a las histonas acetiltransferasas (HATs) y al complejo Swi/Snf para remodelar y abrir una cromatina cerrada (17).

No solo MyoD es una proteína de función conservada, sino que todo el grupo MRF cumple con el principio de estabilidad evolutiva de las "secuencias más importantes" (18). Esto se debe a que es una familia de factores de transcripción que actúan durante el desarrollo y que se han mantenido a lo largo de la evolución, mostrando una conservación excepcional en su dominio de unión al DNA (bHLH) (18). Estas familias que tienen secuencias extremadamente conservadas comparten un origen y una función en común (18).

La función miogénica de MyoD ha sido ampliamente descrita, sobre todo, en mamíferos, pero tiene una función conservada en invertebrados. El gen presenta secuencias ortólogas en especies como: *Drosophila*, *C. elegans,* tunicados y el erizo de mar morado (18,21). Además, existen ortólogos en platelmintos de vida libre y platelmintos parásitos: *myoD* en *Schmidtea mediterranea* (68%ID), *HmN_000553800* en *Hymenolepis microstoma y TsM_000079400* en *T. solium* (89%ID) (24–26). El grado de identidad de los ortólogos de *S. mediterranea* y *T. solium* se basa en una comparación de estas secuencias, disponibles en la base de datos de WormBaseParasite (26), con el ortólogo publicado de *H. microstoma* (25). Asimismo, al alinear secuencias de los ortólogos de *myoD* en *S. mediterranea*, *H. microstoma* y *T. solium*, se observó una región altamente conservada que corresponde al dominio bHLH (**Fig.6**).

3. Miogénesis en platelmintos de vida libre

3.1. Desarrollo muscular descrito en planarias

Las planarias son bastante conocidas por su habilidad de regenerarse y renovar cualquier tipo de tejido a través de la diferenciación de neoblastos, células madre

adultas pluripotentes (24). Tras una amputación, los neoblastos que rodean la herida proliferan y dan lugar al blastema regenerativo, células no diferenciadas que darán lugar a los tipos celulares necesarios para restablecer las estructuras faltantes (24). Nuevas células musculares en planarias surgen a partir de neoblastos pluripotentes (24).

Las células musculares, específicamente los miocitos, son funcionalmente importantes durante la regeneración en planarias. Al presentarse una lesión, los miocitos más cercanos actúan rápidamente y cierran la herida por contracción de la pared corporal en el área donde se formará el blastema (27). Las células musculares también brindan información posicional que guía la renovación del tejido y la regeneración (28). Esto se logra mediante los genes de control de posición (PCGs) que se expresan en la mayoría de estas células; el músculo tiene una doble función: contracción y control de patrones (28). La expresión de PCGs en células musculares puede darse incluso en ausencia de neoblastos, por lo que el músculo es el encargado de proporcionar las instrucciones posicionales para regenerar cualquier región del cuerpo (28).

La pared corporal de las planarias está rodeada por una red densa y compacta de fibras musculares subepidérmicas en diferentes orientaciones (24). La estructura muscular de la pared corporal depende del tamaño de la planaria; en términos generales, consiste en una capa externa de fibras circulares, una capa intermedia de fibras diagonales y una capa interna de fibras longitudinales (27). Adicionalmente, fibras musculares dorsoventrales conectan las superficies dorsal y ventral del cuerpo (27). Toda esta musculatura de la pared les sirve, sobre todo, para mantener la forma

e integridad del cuerpo (27). Asimismo, poseen fibras musculares alrededor del sistema digestivo, los órganos reproductivos, la abertura de la boca y en la faringe (24,27). En esta última estructura, se planteó que los neoblastos en la base de la faringe ingresan a ella y empiezan la diferenciación a miocitos (24,27). Luego, pasan a la musculatura subepitelial y se intercalan entre las viejas células musculares (24,27).

3.2. Papel específico de MyoD en el desarrollo muscular de planarias

El músculo de la pared corporal de las planarias muestra algunas características similares a las células del músculo esquelético y a las del músculo liso. Sin embargo, su naturaleza es esquelética debido a que expresa genes de miosina esquelética de cadena pesada y el factor de transcripción miogénico MyoD (24).

Un homólogo del gen *myoD* fue identificado en la planaria *Schmidtea mediterranea* (24) y se ha comprobado su expresión en neoblastos, lo que sugiere, a su vez, que se expresa en progenitores miogénicos (24). *myoD* también se expresa en fibras subepidérmicas a lo largo de todo el animal, especialmente en la superficie ventral (24). Como estas células corresponden a la musculatura de la pared corporal, se deduce que el músculo de las planarias es principalmente esquelético (24).

MyoD es necesario para formar las fibras musculares longitudinales, ubicadas a lo largo del eje anteroposterior (AP) (29). Al silenciar el gen *myoD* en *Schmidtea*, se perdieron estas fibras y ocurrió una falla total en la regeneración: estas planarias, después de ser amputadas, no pudieron regenerar los polos anterior y posterior, esenciales para formar patrones en el blastema (inicio de la regeneración) (29).

Además, los animales presentaron un fenotipo diferente, pues se volvieron más largos y delgados, presumiblemente por la falta de musculatura (29), efecto comparable a la atrofia muscular en casos de caquexia por inhibición o degradación de MyoD (30).

4. Miogénesis en un platelminto parásito modelo de laboratorio

4.1. Desarrollo muscular en *Hymenolepis microstoma*

Al igual que en los demás cestodos, *H. microstoma* tiene una musculatura compuesta de fibras longitudinales, transversales y circulares (14,31). Igualmente, se ha identificado un anillo subepidérmico de miocitos no contráctiles (31).

La musculatura del estróbilo se puede dividir en dos láminas corticales: músculo superficial y músculo medular. El músculo superficial está compuesto de fibras delgadas, tanto longitudinales como circulares, mientras que el músculo medular se compone de los mismos tipos de fibras pero más gruesas. Por otra parte, las fibras musculares transversales marcan los límites entre proglótides (14).

Dentro de la corteza del gusano adulto de *H. microstoma,* al igual que en todas las tenias, existe una región en particular donde el tejido nervioso, las células germinativas y los músculos longitudinales están estrechamente unidos. Esta región es descrita como un "cilindro de señalización del desarrollo" (DSC) (31). Se ha demostrado que varios factores de la vía Wnt, Notch y Hedgehog (Hh) se expresan dentro del DSC (31). Los factores de las vías Hh y Notch están asociados al sistema nervioso, mientras que se asume que los factores Wnt se expresan en las células musculares (31).

4.2. Diferencias en la expresión de *myoD* según el estadio y la región de *H. microstoma*

La secuenciación del transcriptoma (mRNA-seq) de *H. microstoma* mostró la expresión diferencial de varios genes involucrados en distintos procesos de desarrollo. Entre estos genes estaba *myoD*, cuya expresión fue diferente según el estadio y la región corporal del gusano (25).

A partir de los resultados de mRNA-seq, se determinó que hubo una alta expresión del gen en el estadio larval y en el gusano adulto; sin embargo, la mayor expresión de *myoD* se dio en las zonas del escólex y el cuello del estadio adulto. A diferencia de las muestras larvales, no se realizó *Whole-mount in situ hybridization* (WMISH) con las muestras del escólex-cuello del gusano adulto, por lo que no se pudo observar la expresión espacial del gen (25).

Por otro lado, el WMISH de las larvas permitió observar la expresión genética espacial y temporal de *myoD* durante la metamorfosis larval. Las tres regiones de la larva cisticercoide presentaron diferencias en la expresión del gen. En la zona anterior, la expresión de *myoD* es difusa, pero se distingue una mayor expresión en la región de las ventosas y el rostelo. En la zona posterior, se muestra una expresión bastante marcada en los tejidos del quiste, alrededor de la cavidad larval, área en la que se desarrollan láminas musculares delgadas. En cambio, las células encargadas de formar la "cola" del cisticercoide no expresan el gen durante las primeras etapas de la metamorfosis (S1). El gen *myoD* continúa expresándose fuertemente en la parte

anterior del estadio cisticercoide juvenil post-enquistamiento (S4), pero su expresión empieza a restringirse al área de la "cola" en el cisticercoide maduro (S5) (25).

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Las infecciones causadas por *T. solium*, tanto teniasis como neurocisticercosis, prevalecen en países subdesarrollados de Latinoamérica, África y Asia (1,2). La metamorfosis del estadio larval al gusano adulto implica modificaciones morfológicas como la evaginación del escólex y la generación del estróbilo (1,2,4,7). Ambos procesos, críticos para el desarrollo del parásito, han sido descritos morfológicamente (1,8), mas no a nivel genético. No obstante, se han estudiado vías de señalización involucradas en el desarrollo larval y estrobilar de otros cestodos, como *H. microstoma* (31). Queda por responder cuáles son los genes que regulan el desarrollo de *T. solium*.

MyoD es un factor de transcripción que induce y dirige la diferenciación de las células musculares a partir de diversos tipos de células (17,18). El gen *myoD,* descrito esencialmente en mamíferos, tiene ortólogos en varios invertebrados (18,21). Los ortólogos descritos en platelmintos como *S. mediterranea*, *H. microstoma* y *T. solium* (24–26) muestran un alto grado de conservación, indicando que la regulación del desarrollo muscular en platelmintos tendría semejanzas con la descrita en vertebrados (29).

La miogénesis es esencial en la fisiología de *T. solium*, ya que la contracción muscular permite que la tenia se movilice en el intestino y se mantenga adherida al epitelio intestinal (13,14). Particularmente, la miogénesis en el cuello es fundamental en la metamorfosis hacia gusano adulto, pues la extensión continua del estróbilo se basa en la

formación de nuevas células musculares conforme se diferencian las proglótides (25). Por esta razón, el cuello no solamente le brinda soporte al escólex, sino que se trata de una zona de crecimiento que da paso al desarrollo del estadio diseminativo del parásito (1,14).

También se ha visto que las células musculares, en platelmintos, expresan genes de control posicional (PCGs), por lo que el músculo no solamente realiza contracciones, sino que también controla los patrones de desarrollo (28,31). En el cestodo *Echinococcus multilocularis,* se ha demostrado que las células musculares expresan factores Wnt (*em-wnt1* y *em-wnt11a*), también denominados PCGs (31,32). En *H. microstoma*, una tesis presentada el 2018 en University College London, Reino Unido, comprobó la expresión de varios factores Wnt, los cuales regulan la orientación anteroposterior en animales, en la región denominada "cilindro de señalización del desarrollo"(DSC) (31). En esta región se encuentran músculos longitudinales, por lo que el estudio plantea que es probable que los factores Wnt se expresen en ellos (31). Igualmente, se observó la expresión del factor *Hmic-Wnt11a* en una región denominada la "zona de transición", que empieza en la parte final del cuello y se extiende hasta el comienzo del estróbilo (31). Debido a la expresión espacialmente restringida de este gen, los autores asumen que se trata de un factor que da inicio a la estrobilación, ya que estaría brindando información posicional sobre la parte anterior y posterior de los segmentos del parásito (31). Adicionalmente, se ha visto la sobreexpresión de genes de la vía Wnt (Wnt1, Wnt4, Wnt5, Fz4, y LRP5/6) en el estadio adulto de *Taenia pisiformis*. Esto implica que la ruta permanece activa durante el desarrollo de este estadio y que probablemente está asociada con la formación del eje anteroposterior en el gusano adulto (33). La capacidad de Wnt de activar MyoD, observada en cultivos de somites mamíferos, establece un vínculo en las rutas de señalización (34).

Los estudios acerca de la biología de platelmintos parásitos, como *T. solium,* son escasos, debido a que es complicado tener acceso a organismos vivos de todos los estadios que resulten útiles para la experimentación (1). Por esta razón, se ha estudiado la función y expresión del gen *myoD* en platelmintos que se pueden mantener en el laboratorio, como planarias (de vida libre) y cestodos del género *Hymenolepis.* En planarias, *myoD* se expresa en progenitores miogénicos y en las fibras musculares diferenciadas de la pared corporal (24). Adicionalmente, el gen cumple un papel específico en la miogénesis, pues es necesario para formar las fibras longitudinales, esenciales para iniciar la regeneración (29). La regulación diferencial de *myoD* en *H. microstoma*, donde el escólex y el cuello del estadio adulto presentan la mayor expresión del gen (25), es otra evidencia de que *myoD* cumple un papel en el desarrollo muscular de los platelmintos. A partir de estas evidencias, es razonable postular que este gen regula el desarrollo muscular del cuello de *T.solium*, induciendo la formación de las fibras musculares longitudinales en esta zona, todo esto durante la metamorfosis de larva a adulto.

Establecer el papel de *myoD* en la miogénesis del cuello de *T.solium* permitiría determinar la función del tejido muscular en el desarrollo del parásito, específicamente en la metamorfosis de larva cisticerco a gusano adulto. Además, el estudio estaría contribuyendo a confirmar el papel determinante de este factor de transcripción "pionero" en el desarrollo muscular, a lo largo de la escala evolutiva.

ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Como parte de este trabajo, para evaluar el papel que cumple *myoD* en el desarrollo muscular del cuello de *T. solium*, se ha realizado un análisis de similitud de secuencias con el genoma del parásito (35). A partir de ello, se halló un ortólogo de *myoD*, *TsM_000079400* (26).

Posteriormente, se debe confirmar la expresión del gen en larvas y parásitos evaginados *in vitro*. Para ello, los quistes de *T. solium* serán cultivados en medio RPMI suplementado y se inducirá la evaginación usando ácido taurocólico al 0.3%. Este es un ácido biliar, por lo que su acción surfactante sigue siendo la misma *in vitro* y en el intestino humano, al momento de inducir la evaginación. Luego, se utilizará WMISH para observar los patrones espaciales y temporales de la expresión del gen en los quistes evaginados, específicamente en las zonas del escólex-cuello, la parte media del estróbilo y el quiste propiamente dicho.

Una vez comprobada la expresión de *myoD,* se silenciará el gen mediante interferencia de ARN (RNAi), utilizando el método de microinyección de ARN de doble cadena a *T. solium*. Los grupos experimentales con los cuales se trabajará serían los siguientes: un grupo de gusanos evaginados en medio RPMI con ácido taurocólico sin microinyección, y otros dos grupos de organismos en el mismo medio, pero un grupo sería tratado con el ARN de doble cadena de un gen no relacionado y el otro grupo recibiría la microinyección del ARN de doble cadena del gen *myoD*. De esta forma, al observar los efectos de la ausencia de *myoD*, se podrá constatar si regula el desarrollo muscular del cuello del parásito.

Si bien se ha realizado RNAi de *myoD* solamente en planarias (29), existen antecedentes de que la técnica funciona satisfactoriamente en organismos emparentados con *T. solium*. En cestodos, se han silenciado genes esenciales para la división celular (*zmym3* y *pogzl*) en *Hymenolepis diminuta*, genes hox (*Post-2*) en *H. microstoma* y recientemente se ha usado RNAi para silenciar el gen *tetraspanina-1* en *Echinococcus granulosus* (36–38). De igual manera, esta técnica se ha empleado en tremátodos para silenciar los genes de las catepsinas B y L en *Fasciola hepatica* y genes de acuaporinas como *SmAQP* en *Schistosoma mansoni* (39,40).

ANEXOS

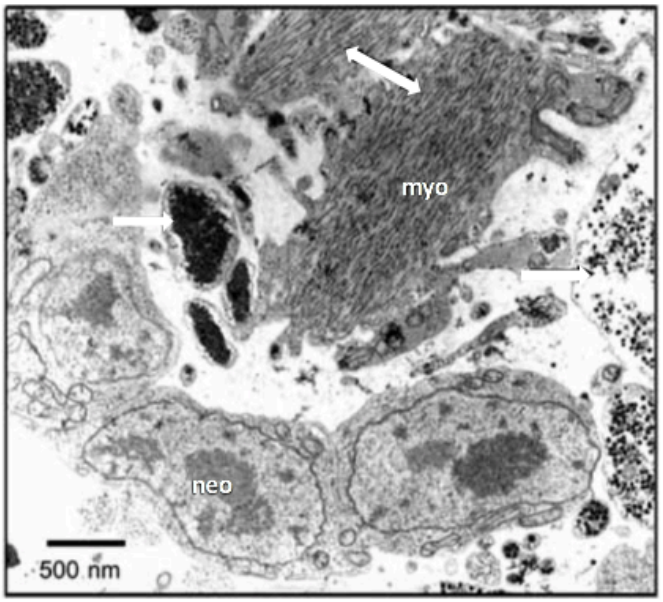

Fig.1 Microfotografía electrónica de una proglótide inmadura de *T.solium* que muestra haces de miofibrillas (**myo**) conectados entre sí (flecha con doble cabeza). Neo=neoblastos, Flechas con 1 cabeza apuntan al glucógeno citoplasmático.
Referencia: *Willms, 2008, Current Topics in Medicinal Chemistry*

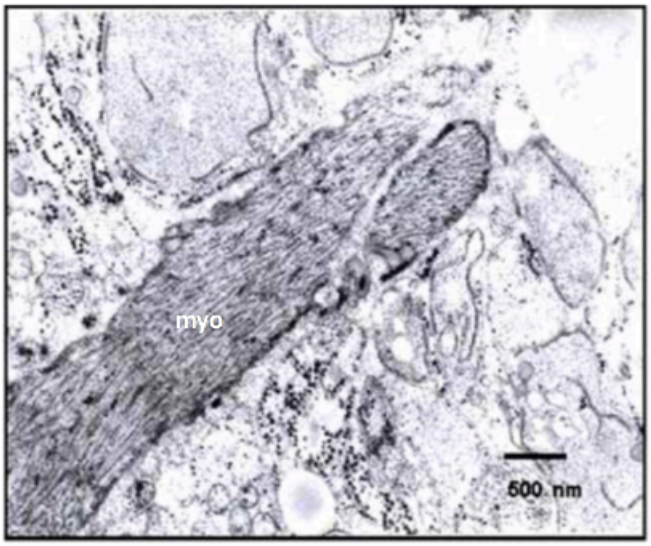

Fig.2 Microfotografía electrónica de una proglótide inmadura de *T.solium* que muestra un haz de miofibrillas (myo).
Referencia: *Willms, 2008, Current Topics in Medicinal Chemistry*

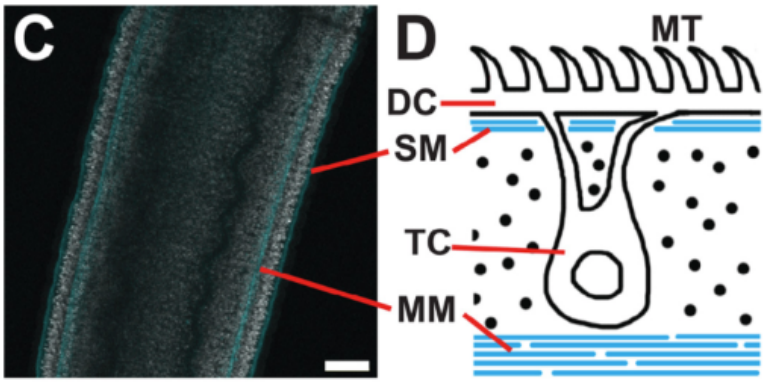

Fig.3 Musculatura del estróbilo de *H.diminuta*.**(C)**Las tinciones con faloidina (celeste) y DAPI (gris) muestran los músculos de la superficie (fibras más apicales) del estróbilo y los músculos medulares o más internos.**(D)**Representación de la estructura muscular y del tegumento. **MT**=Microtriches o microvellosidades especializadas, **DC**=Citoplasma distal, **SM**=Músculo superficial, **TC**=Cyton tegumentario, **MM**=Músculo medular
Referencia: *Rozario & Newmark, 2015, Experimental Parasitology*

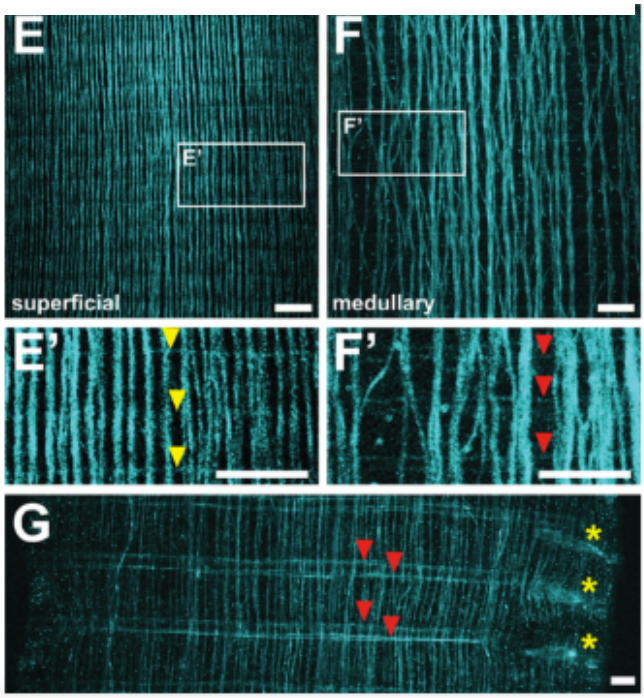

Fig.4 Musculatura del estróbilo de *H.diminuta*. Las fibras longitudinales medulares (internas) son los músculos más visibles teñidos con faloidina(celeste) a lo largo del cestodo. **(E)**Vista frontal del músculo superficial, incluyendo fibras longitudinales, de una región inmadura del estróbilo.**(E')**Vista ampliada de fibras musculares circulares en la capa superficial (flechas amarillas).**(F)**Vista frontal del músculo medular, incluyendo fibras longitudinales, del estróbilo. **(F')** Vista ampliada de las fibras musculares circulares en la capa medular (flechas rojas).**(G)**Las fibras musculares transversales en el estróbilo marcan los límites de las proglótides (flechas rojas). También se observa que los genitales terminales presentan considerable tejido muscular (asteriscos).
Referencia: *Rozario & Newmark, 2015, Experimental Parasitology*

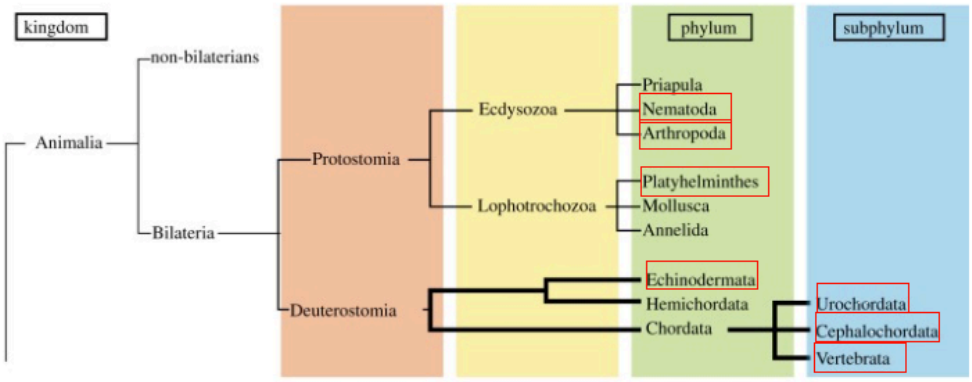

Fig.5 Árbol filogenético de los bilateria donde se señalan los filos mencionados en el texto, los cuales presentan ortólogos del gen *myoD*.

Árbol filogenético obtenido de: *Satoh, 2014, Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*

```
SMEST034317001  ------------------------------------------------------------MI   2
HmN_000553800   MLGGSNSDYSSSEVAPN-----ATAKLHDSESSNSASRSEVVYPYPEYANLMGYETAGVN   55
TsM_000079400   ML-ESSGDYTSEVVTTATPSVPQPSKLQDAD-SNGSGGRENIYPYPEYPNLMGYDNSA-S   57

SMEST034317001  HSGSFPGSTCPI-------------------NYD---YSGPYSAG-LEAAPFLVNQTCP   38
HmN_000553800   QNRPFPTDSHPGPLQTLVSQLVAKSELTSNEGNYDHLLYSATTSAAAPGYPPFYGNQPA-   114
TsM_000079400   HGRPFLNDTHPGPLQTLVSQLVAKSELGSNEANYDHLLYSASSTAAVAAYSPFYGNQS--   115
                :.  *  .: *                    ***   **.  :*.     **  **

SMEST034317001  YNTGTNTMPPSLSLVDNMMMNNSMHLYDRLNTHHSASYPP------------------QI   80
HmN_000553800   ----AGVMPPSPEGFYPQSY--TAYMSDHLNSSTDLNGPAYSGGYPTNRGYETSDYAGT-   167
TsM_000079400   -----GGMSTSPENFYPHSY--TAYMSDHLNNSTDLNGPFYSSTYASNRVYETSEYGSAT   168
                     . *  *:. .       : :: *:**.  . . *

SMEST034317001  LNKIEQKLPTTSSKTTPSTLVSTSSNSISNSEPNSSRSSSQFPTYDLISSLNNSNYDMYD   140
HmN_000553800   --EYPSQHPATSSANKPAAAT--------ANALDSSSTSSVNS-----------------   200
TsM_000079400   SNTYQNQHPSTTNANKSA-PT--------SSAIDSSSTSSVTS-----------------   202
                     .: *:*:. .. :  .          . ::** :**

SMEST034317001  SPYAAYLAAGYYQSPGFALKQYDAAGTSQPSNTDLYHS--------SLAASSGLNLNYSQ   192
HmN_000553800   --TCSAMEPGFSNNPGFYLKPEEGGKL--PGFFSAPNSGVQSAPNTAGTTPTTCNLNSSI   256
TsM_000079400   --TCSAMDSTFS-STGFYIKPEEGGKV--GGFFANPNNATA-----AVTTTTTCNTNSSI   252
                   .: :   :  . ** :*  :..     .:    :.        : :: :  * * *

SMEST034317001  --HKSRHLSEDAGSCQDPQSQNITSNNH-HNNSYSPTTADFGSPKALSSSSQSINDGRQP   249
HmN_000553800   DKNQGKRMVDTRRNSGDMR-KKVRSLQQTPKKA--DSVTEK----T-AKSSLGMSEDRSP   308
TsM_000079400   DKEQRKRIVEPRKNGADMR-KKIRTHQQAKKAESSPCITDK----D-VKTSLAVREDESP   306
                  .: ::: :   .  * : ::: : ::  :       ::        .:* .: :.:.*

SMEST034317001  TSSNS--SPQKLSLAIEQHLCPNKEEHVLVPGSHGQCLLWACKACKKKTVHVDRRKAATM   307
HmN_000553800   ISMGDS-GDD-TCSSDDEHGPGNKEEHVLAPGSHGQCLLWACKACKKKTMQVDRRKAATM   366
TsM_000079400   LSLGGDSGDDSTSSDDDGHGSGNKEEHIIAPGSHGQCLLWACKACKKKTMQVDRRKAATM   366
                 * ..  . :  .   : *   *****::.**********************::*********

SMEST034317001  RERRRLRKVNEAFETLKRRTSGNPNQRMPKVEILKNAIDYIESLEELLNSVGKLPATVGE   367
HmN_000553800   RERRRLRKVNEAFETLKRRTCSNPNQRMPKVEILRTAIDYIENLEEMLHRNGVLLGTSPT   426
TsM_000079400   RERRRLRKVNEAFETLKRRTCSNPNQRMPKVEILRTAIDYIENLEEMLHRNGVLLGPSAS   426
                **********************.,************;.******.***;*:  * * .

SMEST034317001  LKERRKNNPEN-----SRTAIAGKQKPPNKINDKQK----------------------A   399
HmN_000553800   GTSPSAGNLLRSAGRYPSTN---PSTPSNKINSVDGARIQRVVSGTRGRKAGGISKGDKA   483
TsM_000079400   SSSAAAGTLLRSSSRYSTGAGANNAAVNSKITSVESGRIQRTGNGNRGRKAAALTKGDKV   486
                 ..   ..  .                .**.. :                        .

SMEST034317001  ENK-YPETICKLP------TTRKSYVASDLDQQ-------IYQSNM--LKSSTLDQLSSI   443
HmN_000553800   GDQTRPEYSNIVPTSGTPNGTQASFMKMETAQAPMQTEEQSYRGYASILANNGWPPSIQV   543
TsM_000079400   GNN-RADYTGIAATSA-ANTGQASFMKMETSQAMPTEDESSYRGYTTSLANNGWPASIPV   544
                 ::   :              : *::  :  *         *:.    * ..       :

SMEST034317001  VDKISTTNTTI-------------------ADHSMDAKPENS--       466
HmN_000553800   HDPNSVSGVTV----SPPPWRHMAPPLNSNTSEKSATAVPEKALC      584
TsM_000079400   HDPNSVGGASVPAVSPPPPWRHVTPSLSGA--ETPTSAVPEKALC      587
                 *  *. ..::                    :    * **::
```

Fig.6 Comparación de secuencias de aminoácidos de MyoD en *H.microstoma* con las de *S.mediterranea* y *T.solium*. Los dominios bHLH altamente conservados están señalados con un recuadro rojo. El asterisco representa un aminoácido idéntico entre las secuencias. Se pueden acceder a estas secuencias en WormBaseParasite con los siguientes nombres:
-HmN_000553800 (*Hymenolepis microstoma*)
-SMEST034317001 (*Schmidtea mediterranea*)
-TsM_000079400 (*Taenia solium*)

REFERENCIAS

1. Willms K. Morphology and biochemistry of the pork tapeworm, Taenia solium. Curr Top Med Chem. 2008;8(5):375–82.
2. García HH, Gonzalez AE, Evans CAW, Gilman RH, Cysticercosis Working Group in Peru CWG in. Taenia solium cysticercosis. Lancet (London, England). 2003 Aug 16;362(9383):547–56.
3. Praet N, Speybroeck N, Manzanedo R, Berkvens D, Nforninwe DN, Zoli A, et al. The disease burden of Taenia solium cysticercosis in Cameroon. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3(3).
4. García HH, Rodríguez S, Friedland J, The Cysticercosis Working Group in Peru. Inmunology of Taenia solium taeniasis and human cysticercosis. Parasite Immunol. 2014;36(8):388–96.
5. Ayvar Polo V. Seroprevalencia de la Cisticercosis porcina en las Villas de Nueva Esperanza, Matapuquio y Turpo en la provincia de Andahuaylas - Departamento de Apurímac. [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2002. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/963/Ayvar_pv.pdf?sequence=1&isAllowed=y
6. Rajkotia Y, Lescano AG, Gilman RH, Cornejo C, Garcia HH. Economic burden of neurocysticercosis: results from Peru. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2007 Aug;101(8):840–6.
7. Koziol U. Evolutionary developmental biology (evo-devo) of cestodes. Exp Parasitol. 2017 Sep 1;180:84–100.
8. Rabiela MT, Hornelas Y, Garcia-Allan C, Rodriguez-del-Rosal E, Flisser A.

Evagination of Taenia solium cysticerci: A histologic and electron microscopy study. Arch Med Res. 2000 Dec;31(6):605–7.

9. Khanna D, Yadav P. Biology Of Helminthes. 1st ed. Vol. 1. Nueva Delhi: Discovery Publishing House; 2004. 168–173 p.

10. Escobedo G, Camacho I, Hernández O, Ostoa P, García M, Morales J. Progesterone Induces Scolex Evagination of the Human Parasite Taenia solium: Evolutionary Implications to the Host-Parasite Relationship. J Biomed Biotechnol. 2010 Dec 13;2010(591079):1–10.

11. Díaz-Orea MA, de Aluja AS, de L'Erosa M, Gomez-Conde E, Castellanos Sánchez VO, Willms K, et al. Different Effects of Chorionic Gonadotropin on Taenia crassiceps and Taenia solium Cysticerci Cultured In Vitro. J Parasitol. 2007 Dec;93(6):1518–20.

12. Halton DW, Maule AG. Flatworm nerve-muscle: Structural and functional analysis. Can J Zool. 2004 Feb;82(2):316–33.

13. Korneva Z V. Characterization of Cestoda tissue organization. Biol Bull. 2013 Apr;40(2):146–57.

14. Rozario T, Newmark PA. A confocal microscopy-based atlas of tissue architecture in the tapeworm Hymenolepis diminuta. Exp Parasitol. 2015 Nov;158:31–41.

15. Ambrosio JR, Reynoso-Ducoing O, Hernández-Sanchez H, Correa-Piña D, González-Malerva L, Cruz-Rivera M, et al. Actin expression in Taenia solium cysticerci (cestoda): Tisular distribution and detection of isoforms. Cell Biol Int. 2003 Sep 1;27(9):727–33.

16. Gonzalez-Malerva L, Cruz-Rivera M, Reynoso-Ducoing O, Retamal C, Flisser A, Ambrosio JR. Muscular myosin isoforms of Taenia solium (Cestoda). Cell

Biol Int. 2004 Dec;28(12):885–94.

17. Tapscott S. The circuitry of a master switch: Myod and the regulation of skeletal muscle gene transcription. Development. 2005;132(1):2685–95.

18. Andrikou C, Arnone MI. Too many ways to make a muscle: Evolution of GRNs governing myogenesis. Zool Anzeiger - A J Comp Zool. 2015 May 1;256:2–13.

19. Moreno-Risueno MA, Benfey PN. Time-based patterning in development: The role of oscillating gene expression. Transcription. 2011;2(3):124–9.

20. Hernández-Hernández JM, García-González EG, Brun CE, Rudnicki MA. The Myogenic Regulatory Factors, Determinants of Muscle Development, Cell Identity and Regeneration. Semin Cell Dev Biol. 2017 Dec;72:10–8.

21. Aase-Remedios M, Coll-Lladó C, Ferrier D. More Than One-To-Four via 2R: Evidence of an Independent Amphioxus Expansion and Two-Gene Ancestral Vertebrate State for MyoD-related Muscle Regulatory Factors (MRFs). Mol Biol Evol. 2020 Jun 10;1–49.

22. Satoh N, Rokhsar D, Nishikawa T. Chordate evolution and the three-phylum system. Proc R Soc B Biol Sci. 2014 Sep 17; 281(1794).

23. Tan X, Zhang PJ, Du SJ. Evolutionary aspects of a new MyoD gene in amphioxus (Branchiostoma belcheri) and its promoter specificity in skeletal and cardiac muscles. Biol. 2014 Aug 1;69(9):1210–21.

24. Cebrià F. Planarian Body-Wall Muscle: Regeneration and Function beyond a Simple Skeletal Support. Front Cell Dev Biol. 2016;4:8.

25. Olson PD, Zarowiecki M, James K, Baillie A, Bartl G, Burchell P, et al. Genome-wide transcriptome profiling and spatial expression analyses identify signals and switches of development in tapeworms. Evodevo. 2018 Dec 9;9(1):21.

26. Howe KL, Bolt BJ, Shafie M, Kersey P, Berriman M. WormBase ParaSite − a comprehensive resource for helminth genomics. Mol Biochem Parasitol. 2017 Jul 1;215:2–10.

27. Cebrià F, Vispo M, Newmark P, Bueno D, Romero R. Myocyte differentiation and body wall muscle regeneration in the planarian Girardia tigrina. Dev Genes Evol. 1997 Nov;207(5):306–16.

28. Witchley JN, Mayer M, Wagner DE, Owen JH, Reddien PW. Muscle cells provide instructions for planarian regeneration. Cell Rep. 2013 Aug 29;4(4):633–41.

29. Scimone ML, Cote LE, Reddien PW. Orthogonal muscle fibres have different instructive roles in planarian regeneration. Nature. 2017;551(7682):623–8.

30. Hall DT, Ma JF, Marco S Di, Gallouzi IE. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in muscle wasting syndrome, sarcopenia, and cachexia. Aging (Albany NY). 2011;3(8):702–15.

31. Jarero F. Wnt, Hedgehog and Notch signalling in relation to tapeworm anteroposterior polarity and segmentation. University College London; 2018. Disponible en: https://discovery.ucl.ac.uk/id/eprint/10044881/7/Jarero_10044881_thesis_redacted.pdf

32. Koziol U, Jarero F, Olson PD, Brehm K. Comparative analysis of Wnt expression identifies a highly conserved developmental transition in flatworms. BMC Biol. 2016 Mar 4;14(10):10.

33. Zhang S. Comparative Transcriptomic Analysis of the Larval and Adult Stages of Taenia pisiformis. Genes (Basel). 2019 Jul 1;10(7).

34. Pan YC, Wang XW, Teng HF, Wu YJ, Chang HC, Chen SL. Wnt3a signal

pathways activate MyoD expression by targeting cis-elements inside and outside its distal enhancer. Biosci Rep. 2015 Feb 5;35(2).

35. Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garciarrubio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. Nature. 2013 Apr 4;496(7443):57–63.

36. Mousavi SM, Afgar A, Mohammadi MA, Mortezaei S, Faridi A, Sadeghi B, et al. Biological and morphological consequences of dsRNA-induced suppression of tetraspanin mRNA in developmental stages of Echinococcus granulosus. Parasites and Vectors. 2020 Apr 10;13(1):1–10.

37. Pouchkina-Stantcheva NN, Cunningham LJ, Hrčkova G, Olson PD. RNA-mediated gene suppression and in vitro culture in Hymenolepis microstoma. Int J Parasitol. 2013 Jul 1;43(8):641–6.

38. Rozario T, Quinn EB, Wang J, Davis RE, Newmark PA. Region-specific regulation of stem cell-driven regeneration in tapeworms. Elife. 2019 Sep 1;8.

39. McGonigle L, Mousley A, Marks NJ, Brennan GP, Dalton JP, Spithill TW, et al. The silencing of cysteine proteases in Fasciola hepatica newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration. Int J Parasitol. 2008 Feb;38(2):149–55.

40. Krautz-Peterson G, Bhardwaj R, Faghiri Z, Tararam CA, Skelly PJ. RNA interference in schistosomes: Machinery and methodology. Parasitology. 2010 Mar;137(3):485–95.