



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**“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 para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor:

Valeria Alexandra Villar Davila

Asesor:

Dra. Cristina Guerra Giraldez

Co-asesor:

Mg. Juan Blume La Torre

Lima, Perú

2024

Jurado calificador

Presidente: Dra. Rosa Patricia Herrera Velit

Vocal: Dr. Holger Maita Malpartida

Secretario: Dra. Rocio de Maria Inga Peña

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Esta tesis se desarrolló como parte del proyecto “Identificación transcriptómica de determinantes celulares en la transición *in vitro* de larva metacestode (cisticerco) a gusano adulto en *Taenia solium*”, el cual recibió financiamiento del CONCYTEC, a través del Programa Nacional de Investigación Científica y Estudios Avanzados (Prociencia), Esquema Financiero E041-2022-01 “PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN BÁSICA”.
CONTRATO No PE501079376-2022-PROCIENCIA

El trabajo del Anexo 5 se realizó en el marco de una pasantía (2/05 - 16/06/2023) en el Laboratorio de Biología Celular y Desarrollo de Platelminos Parásitos. Facultad de Ciencias, sección Biología Celular de la Universidad de la República (Montevideo, Uruguay), lograda gracias al Esquema Financiero E074-2022-01 “TESIS Y PASANTÍAS EN CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN” del mismo Programa Nacional.
CONTRATO No PE501081913-2022-PROCIENCIA

DEDICATORIA

A toda mi familia, por su apoyo y cariño incondicional.

*Y, especialmente, a mi yo de hace años,
que alguna vez dudó si la ciencia era su camino.*

Esta tesis demuestra que sí lo es.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios, fuente de mi fortaleza y sabiduría, por iluminar mi camino y darme la oportunidad de llegar hasta aquí.

Agradezco profundamente a mi familia por su apoyo incondicional durante toda mi formación profesional. En especial, a mis padres, Delia y Milton, y a mi hermana, Anghelina, por confiar en mí y por enseñarme a perseverar, incluso en los momentos más difíciles.

A la Dra. Cristina Guerra, por permitirme formar parte de su equipo, por su incansable dedicación y por orientarme con entusiasmo a lo largo de este proceso. Su crítica constructiva y apoyo han sido fundamentales para la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Juan, Renzo, David, José, Segundo y Macarena, por crear, no solo un espacio de aprendizaje continuo, sino también una red de apoyo y compañerismo que hizo este camino mucho más enriquecedor.

A mis amigos del colegio y la universidad, quienes siempre me alentaron cuando más lo necesitaba.

Y, en especial, a mí misma. Gracias por superar cada reto, a pesar de la incertidumbre. Solo tú sabes lo que ha costado llegar hasta aquí. Este logro es el reflejo de tu esfuerzo y dedicación.



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

"Expresión diferencial de los genes reguladores *myoD* y *snai-1*
y la participación de la proliferación celular
durante la evaginación del escólex de *Taenia solium*"

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor:

Valeria Alexandra Villar Davila

Asesor:

Dra. Cristina Guerra Giraldez

Co-asesor:

Mg. Juan Blume La Torre

Lima, Perú

2024

Informe estándar
Informe en inglés no disponible Más información

13% Similitud estándar

35 Exclusiones →

Fuentes
Mostrar las fuentes solapadas

1	Internet	repositorio.upch.edu.pe	7%
		102 bloques de texto	1348 palabra que coinciden
2	Internet	hdl.handle.net	<1%
		24 bloques de texto	191 palabra que coinciden
3	Internet	es.biomedicalhouse.com	<1%
		3 bloques de texto	81 palabra que coinciden
4	Internet	www.colibri.udelar.edu.uy	<1%
		8 bloques de texto	70 palabra que coinciden
5	Internet	repositorioubi.sisbi.uba.ar	<1%
		5 bloques de texto	44 palabra que coinciden

jueves, 5 de diciembre de 2024

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
1. Generalidades sobre <i>Taenia solium</i>	4
1.1 Ciclo de vida e impacto en la salud pública.....	4
1.2 Metamorfosis del estadio larval al adulto	5
1.2.1 Evaginación del escólex.....	5
1.2.2 Generación del estróbilo por acción de células proliferativas	6
2. Mecanismos moleculares claves en el desarrollo	8
2.1 Miogénesis y los principales genes reguladores	8
2.1.1 Miogénesis y su regulación génica en vertebrados.....	8
2.1.2 Factores de transcripción miogénicos de tipo bHLH y su identificación en los bilateria	8
2.1.3 MyoD, una proteína de función conservada y determinante en la miogénesis	9
2.2 Transición epitelio-mesénquima (TEM) y los principales genes reguladores	11
2.2.1 La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso complejo en vertebrados	11
2.2.2 Factores de transcripción involucrados en la TEM de vertebrados	12
2.2.3 Snail-1 es un factor de transcripción inductor de la TEM en vertebrados	12
3. Miogénesis y su regulación molecular en platelmintos	14
3.1 Miogénesis en platelmintos de vida libre	14
3.1.1 Desarrollo muscular en planarias.....	14
3.1.2 Papel específico de <i>myoD</i> en el desarrollo muscular de planarias.....	15
3.2 Miogénesis en platelmintos parásitos	16
3.2.1 Musculatura del gusano adulto	16
3.2.2 Desarrollo muscular en un platelminto parásito modelo de laboratorio: <i>Hymenolepis microstoma</i>	17

3.2.3 Organización de los componentes musculares en <i>Taenia solium</i>	19
3.2.4 Diferencias en la expresión de <i>myoD</i> según el estadio y la región de <i>H. microstoma</i>	20
4. Snail-1 es un factor de transcripción TEM también presente en platelmintos	22
4.1 Importancia de <i>snail-1</i> en platelmintos de vida libre.....	22
4.1.1 <i>snail-1</i> se expresa en los neoblastos de planarias	22
4.1.2 La migración celular en planarias requiere de <i>snail-1</i>	23
4.2 <i>snail-1</i> en un platelminto parásito modelo de laboratorio	24
4.2.1 <i>snail-1</i> se expresa en el gusano adulto de <i>H. microstoma</i>	24
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
1. Diseño general	26
2. Obtención de cisticercos	26
3. Experimento piloto para estandarización de condiciones de cultivo	26
4. Cultivo de cisticercos	27
5. Identificación y caracterización <i>in silico</i> de las secuencias de los genes <i>myoD</i> , <i>snail-1</i> y <i>h2b</i> en <i>Taenia solium</i>	30
6. Diseño de primers	30
7. Preparación de la muestra para la extracción de ARN total	30
8. Extracción de ARN total.....	31
9. Generación de cDNA mediante transcripción reversa (RT-PCR).....	31
10. PCR en tiempo real (qPCR).....	31
11. Determinación del gen de referencia	32
12. Análisis estadístico	33
13. Aspectos éticos	34
IV. RESULTADOS.....	35
1. Identificación <i>in silico</i> de los genes <i>myoD</i> , <i>snail-1</i> y <i>h2b</i> en <i>Taenia solium</i>	35
2. <i>rpl13</i> es el gen más estable entre cinco candidatos a genes de referencia evaluados para todas las condiciones experimentales	39
3. Análisis estadístico realizado con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de Dunn	41
4. La histona <i>h2b</i> se sobreexpresa en los quistes no evaginados y su expresión	

disminuye cuando ocurre la evaginación.....	47
5. La evaginación de la larva de <i>T. solium</i> se asocia con la subexpresión del gen <i>myoD</i>	49
6. El gen del factor de transcripción Snail-1 se expresa diferencialmente en cisticercos de <i>T. solium</i> antes y después de evaginar el escólex.....	51
V. DISCUSIÓN	53
Se estableció un diseño experimental, basado en la morfología del estadio larval de <i>T. solium</i> , para estudiar genes marcadores de procesos de desarrollo	53
La mayor actividad proliferativa ocurre antes de la evaginación del escólex de <i>T. solium</i>	54
La miogénesis predomina en el desarrollo temprano de la larva metacestode de <i>T. solium</i> , antes de la evaginación del escólex.....	58
La transición epitelio-mesénquima puede ser un proceso incompatible con un estado altamente proliferativo en <i>T. solium</i> , por lo que la expresión de <i>snail-1</i> aumenta después de la evaginación del escólex	61
VI. CONCLUSIONES	64
VII. LIMITACIONES DEL TRABAJO Y RECOMENDACIONES	65
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	73
Anexo 1. Secuencias de los primers para los genes de interés (<i>myoD</i> , <i>snail-1</i> y <i>h2b</i>) y los candidatos a genes de referencia (<i>mdh</i> , <i>rpl13</i> , <i>cox-1</i> , <i>mapk3</i> y <i>pgk1</i>) de <i>Taenia solium</i>	73
Anexo 2. Cuantificación fluorométrica, por Qubit, del ARN total extraído de 10 muestras de cada condición (cisticercos no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados y evaginados en crecimiento).....	74
Anexo 3. Integridad del ARN extraído, evaluada mediante geles de agarosa con lejía al 1%	75
Anexo 4. Valores calculados del fold change ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) de cada gen de interés (<i>myoD</i> , <i>snail-1</i> y <i>h2b</i>) para todas las muestras de los grupos experimentales	76
Anexo 5. Hibridación <i>in situ</i> de <i>h2b</i> en cisticercos con escólex evaginado de <i>Taenia solium</i> que permaneció hasta 250h en cultivo	77

RESUMEN

Taenia solium es un cestodo endémico en el Perú; sus hospederos son el cerdo y el humano. Solo en el intestino humano, el cisticerco (fase larval) se transforma y madura como gusano adulto (fase diseminativa). Esta transformación ocurre a partir de la evaginación del escólex, que permite al parásito adherirse a la pared intestinal, donde crece formando un estróbilo compuesto por proglótides.

El desarrollo hacia gusano adulto implica eventos de proliferación, migración celular y reorganización del tejido muscular. Estos procesos se han estudiado en cestodos como *Hymenolepis*, *Echinococcus* y *Mesocestoides*, pero han sido poco explorados en *T. solium*. Conocer el desarrollo del parásito puede ayudar a identificar blancos terapéuticos. En este trabajo se comparó la expresión de genes clave de *T. solium* asociados a la proliferación celular (*h2b*), la miogénesis (*myoD*) y la transición epitelio-mesénquima (TEM; *snail-1*), relacionada con migración celular, antes y después de la evaginación del escólex.

Mediante RT-qPCR, se observó que la mayor expresión de *myoD* y *h2b* ocurre antes de la evaginación. La expresión de *snail-1* es menor en esta etapa que después de la evaginación, lo que sugiere una mayor migración celular hacia las nuevas regiones en formación del cisticerco evaginado.

Este es el primer estudio en el que se ponen a prueba marcadores de miogénesis, TEM y proliferación celular, como procesos críticos para el desarrollo de *T. solium*. Conocer el papel de estos mecanismos y de sus factores de transcripción (MyoD y Snail-1), contribuye a entender la biología del parásito.

Palabras clave: *Taenia solium*, proliferación celular, miogénesis, transición epitelio-mesénquima (TEM)

ABSTRACT

Taenia solium is an endemic cestode in Peru; its hosts are pigs and humans. Cysticercus (larval phase) transforms and matures into an adult worm (disseminative phase) in the human intestine. This transformation starts with the evagination of the scolex, which allows the parasite to adhere to the intestinal wall, where it grows to form a strobila composed of proglottids.

The development of the adult worm involves proliferation events, cell migration, and reorganization of muscle tissue. These processes have been studied in cestodes, such as *Hymenolepis*, *Echinococcus*, and *Mesocestoides*, but have been scarcely explored in *T. solium*. Understanding the development of this parasite can help to identify therapeutic targets. In this study, the expression of key genes in *T. solium* associated with cell proliferation (*h2b*), myogenesis (*myoD*), and epithelial-mesenchymal transition (EMT; *snail-1*), related to cell migration, was compared before and after the evagination of the scolex.

RT-qPCR revealed that the highest expression of *myoD* and *h2b* occurred prior to evagination. *snail-1* expression was lower at this stage than after evagination, suggesting greater cell migration towards the new regions of the evaginated cysticercus.

This is the first study in which markers of myogenesis, EMT, and cell proliferation were tested as part of critical processes for the development of *T. solium*. Knowing the role of these mechanisms and their transcription factors (MyoD and Snail-1) contributes to understanding the biology of the parasite.

Key words: *Taenia solium*, cell proliferation, myogenesis, epithelial-mesenchymal transition (EMT)

I. INTRODUCCIÓN

Taenia solium es el platelminto parásito de mayor importancia en salud pública, causante de una zoonosis endémica en diversos países en vías de desarrollo, como el Perú (1–3). Dada la complejidad de las interacciones hospedero-parásito, el ciclo de vida completo de *T. solium* es imposible de reproducir en el laboratorio. Por ello, se emplean platelmintos parásitos modelo, como *Hymenolepis* y *Mesocestoides*, para estudiar la biología del desarrollo de los cestodos (4–11). *Hymenolepis microstoma* es el cestodo más estudiado en el que ya se han caracterizado vías de señalización involucradas en su desarrollo larval y estrobilar (9,11).

A pesar de las dificultades logísticas y experimentales asociadas al trabajo con *T. solium*, se han realizado estudios sobre el desarrollo de la oncosfera hacia el cisticerco (12–14). Sin embargo, hay escasa información sobre la metamorfosis larval del cisticerco hacia el gusano adulto, un proceso que incluye etapas clave para el desarrollo del parásito, como la evaginación del escólex y la formación del estróbilo. Aunque estos procesos han sido descritos desde un punto de vista morfológico (15,16), aún no se ha explorado su regulación a nivel genético. Por lo tanto, sigue siendo una incógnita qué genes controlan el desarrollo de *T. solium*. Dado que el gusano adulto es el estadio diseminativo de este cestodo, estudiar sus mecanismos de desarrollo es esencial para comprender la biología del parásito y encontrar formas de interrumpir su ciclo de vida.

Las modificaciones morfológicas que *T. solium* atraviesa para convertirse en gusano adulto, que se hacen evidentes a partir de la evaginación del escólex, involucran cambios transcripcionales que aún no han sido caracterizados. En este trabajo, se analiza la expresión de los genes *myoD* y *snail-1*, reguladores de la miogénesis y la transición epitelio-mesénquima (TEM), respectivamente, durante la evaginación del escólex en larvas metacestode de *T. solium*. Además, se evalúa la proliferación celular, un proceso clave que impulsa el desarrollo a lo largo del ciclo de vida de los cestodos.

Todos estos mecanismos son fundamentales a nivel molecular, celular y fisiológico durante el complejo desarrollo del cisticerco hacia gusano adulto. Entender los eventos clave que permiten el establecimiento de *T. solium* en el intestino humano puede ayudar a identificar blancos terapéuticos que eviten el desarrollo del parásito adulto en el huésped.

1. Generalidades sobre *Taenia solium*

1.1 Ciclo de vida e impacto en la salud pública

Taenia solium forma parte del filo de los Platelminetos o gusanos planos. Estos se caracterizan por tener simetría bilateral, ser acelomados, no contar con órganos circulatorios ni respiratorios y tener un sistema digestivo incompleto (17). Dentro de este filo existen organismos de vida libre y parásitos obligados, siendo estos últimos parte del clado Neodermata (18,19). Este grupo abarca las clases taxonómicas Monogenea, Trematoda y Cestoda, a la cual pertenece *T. solium* (18,19).

T. solium es un cestodo endémico en diversos países en vías de desarrollo de América Latina, África y Asia (1,16). En el Perú, persiste como problema de salud pública al causar una zoonosis en diferentes regiones de la sierra, la costa norte y la selva alta (2). Su ciclo de vida es complejo, ya que involucra dos hospederos: el cerdo como hospedero intermediario y el humano como hospedero definitivo. El gusano adulto se desarrolla y crece en el intestino delgado humano (teniasis) luego de que este ingiera cisticercos viables enquistados en carne de cerdo mal cocida. El estadio adulto se autofecunda y produce una abundante cantidad de huevos microscópicos, altamente infecciosos, que se diseminan a través de las heces del teniásico. Por contaminación fecal-oral, cerdos y humanos pueden ingerir estos huevecillos, que tras desplazarse en la sangre se alojarán como cisticercos en diferentes tejidos blandos (cisticercosis). La infección del cerebro con cisticercos se conoce como neurocisticercosis (NCC) y es la causa de diversos cuadros neurológicos (1,3).

Se ha estimado que la NCC genera de 0.25 - 9.00 AVADs (años laborales perdidos debido a enfermedad) por cada 1,000 personas por año (20). En el 2010, la OMS

determinó que más de 370,000 personas en todo el mundo tuvieron epilepsia asociada a NCC. Esto provocó 28,000 muertes y 2.8 millones de AVADs (21). En nuestro país, aproximadamente el 54% de un salario mínimo se utiliza para costear el tratamiento de la NCC durante el primer año. Dentro de los gastos de la atención médica, el diagnóstico de la enfermedad (36%) y la compra de medicinas (27%) son los rubros que generan una mayor repercusión económica (22).

Además, la cisticercosis porcina genera una reducción significativa del valor del cerdo en el mercado, afectando la economía de los criadores (20,23). En un estudio realizado en Camerún, África, el precio del cerdo se reduce hasta en un 30% (24). En Perú, se ha visto que en Andahuaylas los campesinos pueden llegar a perder entre un tercio y la mitad del precio del cerdo, o todo, si este es confiscado (25).

1.2 Metamorfosis del estadio larval al adulto

1.2.1 Evaginación del escólex

A nivel morfológico, la transformación de una larva cisticerco vesicular hacia gusano adulto empieza con la evaginación del escólex y continúa con la formación de proglótides (estrobilación). Ambos procesos son proliferativos, críticos en el desarrollo del parásito (1,16,26).

El estadio larval o cisticerco es una vesícula membranosa, con forma de quiste, llena de fluido. En su interior se encuentran invaginados el escólex (pseudocabeza) y cuello del parásito (1,16) (Figura 1A). Estudios *in vitro* han revelado que el cisticerco viable muestra movimientos continuos, pero lentos, de relajación y contracción, gracias a la doble capa de fibras musculares ubicadas debajo del tegumento (16). La interacción con enzimas digestivas y sales biliares induce la evaginación del escólex, un proceso en el cual este emerge del quiste (Figura 1B). Una vez liberado en el duodeno, el escólex se adhiere a la mucosa intestinal utilizando sus órganos de fijación: ganchos y ventosas (1,15,16,26).

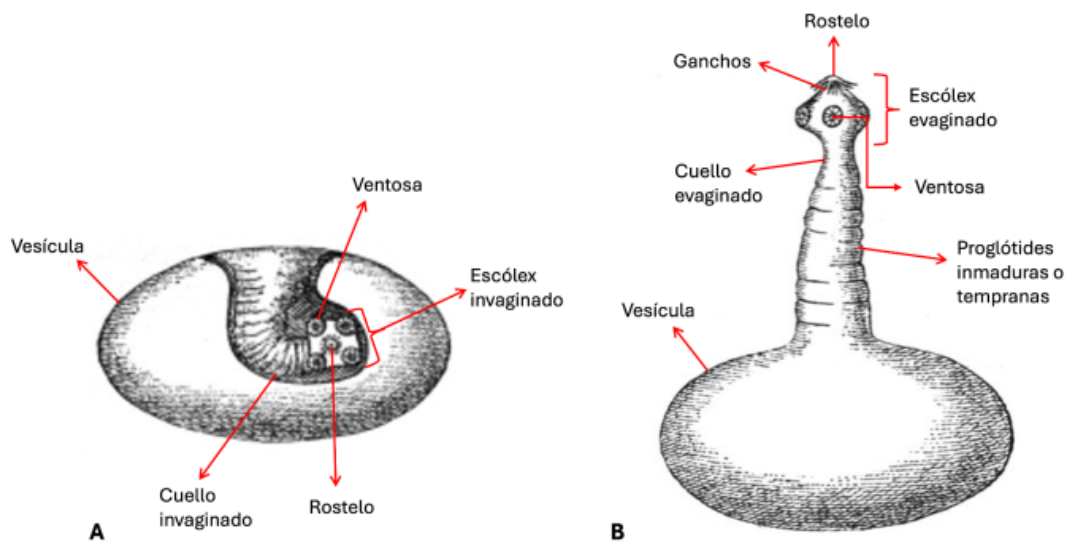


Figura 1. Dibujo de cisticerco sin evaginar el escólex (A) y de cisticerco con el escólex evaginado (B) mostrando sus estructuras correspondientes. Figura modificada de Leunis, J. (1891). Schul-Naturgeschichte. Editorial: Hannover Hahn.

La evaginación también ocurre espontáneamente, pero *in vitro* se ha visto que la bilis induce este proceso (15,27–29). Debido a su naturaleza anfipática, las sales biliares actúan como agentes tensoactivos que incrementan la permeabilidad de la membrana del quiste (30). Esto facilita la entrada de enzimas digestivas, las cuales contribuyen a la degradación de la vesícula y favorecen la liberación del escólex (30). Este proceso no sería solamente mecánico, porque el uso de hormonas como la progesterona y la gonadotropina coriónica humana (hCG) favorece la evaginación (31,32). Sin embargo, se han estudiado muy poco los mecanismos celulares, moleculares y eventos de señalización implicados.

1.2.2 Generación del estróbilo por acción de células proliferativas

El cuerpo o estróbilo del parásito está conformado por cientos de proglótides sucesivas. Las proglótides son segmentos hermafroditas que se encuentran en grados de madurez creciente a lo largo del gusano. Las más distales al escólex son las más maduras, producen cientos de huevecillos infecciosos por autofecundación y reciben el nombre de proglótides grávidas. El desarrollo de

las proglótides se inicia después de la evaginación del escólex, a partir de células proliferativas presentes en la base del escólex y en el cuello (1,16,26).

Estas células proliferativas se han identificado y caracterizado mediante técnicas histológicas, ultraestructurales, celulares y moleculares en platelmintos de vida libre (planarias) y parásitos como el tremátodo *Schistosoma mansoni* y los cestodos *Echinococcus* e *Hymenolepis* (10,33–35). Dichas poblaciones de células reciben el nombre de neoblastos en planarias, células somáticas proliferativas (PSC) en *S. mansoni* y células germinativas en *Echinococcus* e *Hymenolepis* (10,33–36). En el caso de *T.solium*, se han detectado células proliferativas morfológicamente similares a neoblastos, mediante el marcaje con bromodesoxiuridina (BrdU), en quistes no evaginados y evaginados *in vitro* (37). No obstante, aún se requiere caracterizar estas células y así comprobar si realmente se trata de neoblastos, los cuales por definición cuentan con un núcleo y nucleolo bastante grandes, pero un escaso citoplasma que contiene mitocondrias y ribosomas libres (36,37).

Para detectar las células en replicación se toma como referencia la expresión de histona de tipo *h2b*. Esta actúa como un marcador molecular bastante conservado y se expresa de manera específica en células proliferativas de planarias, tremátodos y cestodos (10,33,34,36). Se considera un marcador de células proliferativas, porque la síntesis de las histonas canónicas, como lo es la histona *h2b*, es dependiente del ciclo celular (38). En este caso, los transcritos de *h2b* solamente se acumulan durante la fase S, que es cuando se requieren nuevas histonas para acompañar la replicación del ADN (38).

En *Hymenolepis diminuta* se vio que *h2b* se expresa en el parénquima del cuello, mas no en los bordes del gusano, donde están el tegumento y el músculo (10). Por lo que la posición de las células proliferativas está espacialmente restringida a la zona central del cuerpo del parásito, siguiendo un patrón conservado (10). A pesar del potencial de *h2b* como marcador de

proliferación, no se ha evaluado su expresión en los distintos estadios de *T. solium* que pueden mantenerse *in vitro*.

2. Mecanismos moleculares claves en el desarrollo

2.1 Miogénesis y los principales genes reguladores

2.1.1 Miogénesis y su regulación génica en vertebrados

La miogénesis es la formación del tejido muscular, proceso que se ha estudiado sobre todo en vertebrados, especialmente en mamíferos (39,40). En estos organismos, los reordenamientos celulares, durante la miogénesis, son controlados por genes que se expresan de manera periódica. Esto se conoce como expresión génica oscilante (39–41). A partir de este mecanismo, se establecen los precursores del músculo esquelético: las somitas (41).

Las somitas son segmentos derivados del mesodermo que dan lugar al músculo esquelético en los vertebrados. Los morfógenos secretados de tejidos adyacentes determinan el destino miogénico de las somitas (39,40).

Estudios en mamíferos también pusieron en evidencia a un gen regulador clave de la diferenciación muscular: *myoD*. Este gen codifica un factor de transcripción que pertenece a los factores reguladores miogénicos (MRFs) (39,40). MyoD determina el destino de un linaje celular, convirtiendo células no especializadas en células musculares (39,40).

2.1.2 Factores de transcripción miogénicos de tipo bHLH y su identificación en los bilateria

En los últimos diez años, se ha identificado en mamíferos una compleja red de factores de transcripción responsables de regular la formación del músculo esquelético (40). La determinación y diferenciación de los mioblastos somáticos son procesos dirigidos, esencialmente, por cuatro proteínas MRF, caracterizadas por su dominio bHLH (*basic helix-loop-helix*): MyoD, Myf5, miogenina y MRF4 (Factor Regulador Miogénico 4) (40).

Los MRFs no trabajan de manera aislada, sino que interactúan con otros factores para dirigir las células hacia la miogénesis (40). Entre ellos están los factores de transcripción Pax, que actúan *upstream* de MyoD. Otros genes reguladores involucrados son *six1* y *six4*, sus cofactores *eya1* y *eya4*, al igual que el gen *dach2*. Este complejo (Six-Eya-Dach) activa a genes como *pax3*, *myoD*, *mrf4* y *miogenina* (40,42). Cada uno de ellos interviene en distintas etapas del desarrollo muscular, trabajando en conjunto para establecer el fenotipo del músculo esquelético (40,43).

La red de factores responsables de la miogénesis ha sido estudiada en diversos animales bilaterales, abarcando tanto protostomados (gusanos, moluscos, artrópodos) como deuterostomados (equinodermos, cordados). En protostomados se han identificado genes ortólogos de *myoD*, como *hllh-1* en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* y *nautilus* en el artrópodo *Drosophila melanogaster* (40,44,45). Por su parte, entre los deuterostomados, se han reportado ortólogos en organismos como el equinodermo *Strongylocentrotus purpuratus* (*Sp-MyoD2*), el urocordado *Ciona intestinalis* (*Ci-MRF*) e incluso en el cefalocordado *Amphioxus* (*AmphiMyoD*) (40,44,46). Este último ortólogo señala la conexión evolutiva entre los procesos de miogénesis en invertebrados y vertebrados (46). A diferencia de los vertebrados, los invertebrados parecen haber mantenido solo un factor de transcripción, con alto grado de homología, dentro de toda la familia de MRFs del tipo bHLH (45).

La identificación de estos ortólogos destaca la notable conservación de *myoD* en vertebrados e invertebrados (45), lo que facilita estudios comparativos en los Bilateria para corroborar su papel esencial en el proceso de miogénesis (40,44).

2.1.3 MyoD, una proteína de función conservada y determinante en la miogénesis

MyoD fue el primer factor regulador miogénico identificado en esta familia de MRFs (39,43). Su dominio bHLH le permite reconocer y unirse a la secuencia E-box en el promotor de los genes asociados al músculo esquelético, activando su transcripción (39,43). Este dominio de unión es altamente conservado en

animales bilaterales, lo cual explica la existencia de los diferentes ortólogos mencionados previamente (39,43). Esto convierte a MyoD en un regulador universal de la miogénesis, capaz de inducir y dirigir la diferenciación muscular (39).

Asimismo, se lo conoce como un "regulador maestro" debido a su capacidad de convertir diversos tipos celulares, como fibroblastos, células nerviosas, adipocitos y hepatocitos, en músculo esquelético (39). Este descubrimiento demostró, por primera vez, que un único gen puede inducir un proceso complejo de diferenciación (39). Además, como "factor pionero", MyoD accede a genes en cromatina abierta y cerrada, facilitando la reprogramación de células de diferentes linajes hacia el linaje muscular (39). Esto lo logra al reclutar acetiltransferasas de histonas (HATs) y el complejo Swi/Snf para remodelar y abrir la cromatina cerrada (39).

Tanto MyoD como todo el grupo MRF tienen una función conservada, cumpliendo con el principio de estabilidad evolutiva (40). Esto es característico de secuencias con alta presión de selección, debido a su importancia biológica (40). Precisamente, los factores de transcripción miogénicos tienen un papel esencial durante el desarrollo y han permanecido a lo largo de la evolución, lo que se refleja en la conservación de su dominio de unión al ADN (bHLH) (40). Estas familias, con secuencias altamente conservadas, comparten un origen y una función en común (40).

La función de MyoD ha sido extensamente documentada, esencialmente en mamíferos, pero esta función también se conserva en invertebrados. Además de los ortólogos en artrópodos, nemátodos, tunicados y equinodermos (40,44), también se han reportado secuencias ortólogas de *myoD* en platelmintos de vida libre y parásitos: *myoD* en *Schmidtea mediterranea* y *HmN_000553800* en *Hymenolepis microstoma* (8,47).

2.2 Transición epitelio-mesénquima (TEM) y los principales genes reguladores

2.2.1 La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso complejo en vertebrados

La conversión de células epiteliales a mesenquimales, transición epitelio-mesénquima (TEM), es esencial para varios aspectos de la embriogénesis, la reparación de tejidos e incluso durante diversos estados patológicos (48). En la TEM, las células epiteliales pierden su polaridad apical-basal y adherencia con otras células (uniones célula-célula) (48,49). En cambio, adquieren características mesenquimales, como motilidad celular, mayor capacidad migratoria, invasividad de la membrana basal y elevada resistencia a la apoptosis (48,50).

Se ha clasificado la TEM en tres subtipos distintos según el entorno biológico en el que ocurren. El tipo 1 se da durante eventos de desarrollo como la implantación, la formación del embrión y el desarrollo de órganos (49,50). La TEM del tipo 2 está relacionada con la cicatrización de heridas, la regeneración de tejidos y la fibrosis de órganos (50). Por otro lado, la TEM de tipo 3 se lleva a cabo en células neoplásicas que previamente han sufrido cambios genéticos en oncogenes y genes supresores de tumores (49,50).

La TEM es un proceso altamente conservado y, a su vez, bastante complejo. Es activado por factores intrínsecos y extrínsecos y está finamente regulado de manera temporal y espacial. Específicamente, requiere de factores de transcripción, proteínas efectoras y moléculas de señalización (49).

Generalmente, la TEM se caracteriza por la supresión de los marcadores epiteliales que incluyen a proteínas de unión tipo Gap (como la conexina), proteínas de uniones adherentes (en especial, E-cadherina) y proteínas de uniones estrechas (occludina, claudina). Entre todos los marcadores epiteliales, la E-cadherina es el más representativo, porque actúa en conjunto con el sistema de adhesión intercelular para mantener la polaridad de las células

(49). Además, como parte de la TEM, existe una regulación positiva de marcadores mesenquimales como la vimentina, N-cadherina, fibronectinas, Slug, Twist y Snail (49).

2.2.2 Factores de transcripción involucrados en la TEM de vertebrados

En vertebrados, el complejo programa de la TEM está coordinado por diversos factores de transcripción pertenecientes a las familias Snail, Twist y Zeb, las cuales controlan la expresión genética necesaria para los cambios en los fenotipos celulares. Estos factores colaboran con reguladores epigenéticos, postranscripcionales y postraduccionales, respondiendo a vías de señalización como las de TGF- β , Wnt, Hedgehog y Notch (49,51).

Los reguladores transcripcionales más estudiados en la TEM son las proteínas con el dominio de unión dedo de zinc (Snail y Zeb) y la familia Twist de factores de transcripción con el dominio bHLH (49). Todos ellos se unen a la secuencia E-box en el promotor de la E-cadherina y reprimen su transcripción (48). La familia Snail, conformada por los factores Snail-1 y Snail-2, regula directamente la disminución de la adhesión célula-célula y aumenta la motilidad celular (48).

Cabe recalcar que estas descripciones de la TEM y de sus factores de transcripción corresponden esencialmente a vertebrados, pues se conoce poco de este mecanismo en invertebrados; los más estudiados a este nivel son *D. melanogaster* y *C. elegans* (52–55).

2.2.3 Snail-1 es un factor de transcripción inductor de la TEM en vertebrados

Dentro de la familia de factores de transcripción Snail, Snail-1 y Snail-2 se consideran necesarios y suficientes para dar inicio a muchos de los pasos de la TEM (48). Específicamente, Snail-1 es un represor transcripcional caracterizado por tener los dominios dedos de zinc C₂H₂ (56). Este factor tiene un papel fundamental, pues se ha observado ampliamente su expresión en procesos de la TEM que anteceden a los demás factores de transcripción (57).

Incluso se ha visto que Snail-1 puede inducir otros factores de transcripción como Zeb-1, Zeb-2 y Snail-2 (57). Además, la pérdida de Snail-1 afecta considerablemente ciertos procesos de desarrollo, como la formación del mesodermo durante la embriogénesis en ratones (57). Incluso se ha visto que ratones *knockout* para *snail-1* mueren durante la gastrulación, debido a una TEM defectuosa (58). Por ello, ha sido bastante estudiado como marcador clave de este programa de transición epitelio-mesénquima (57).

Snail-1 no solamente se encarga de la represión de proteínas epiteliales como E-cadherina y claudinas, sino que también es responsable de la regulación positiva de vimentina y fibronectina, entre otros biomarcadores mesenquimales (56). Además, promueve la invasión a través de la lámina basal y contribuye en la activación de fibroblastos, un proceso impulsado en células mesenquimales (48,57).

Diferentes vías de señalización convergen en Snail-1 para activar la TEM (58). Eso lo convierte en un regulador central en este proceso, ya sea en condiciones fisiológicas como patológicas (58). Según lo que se ha visto en diferentes sistemas, se ha planteado un modelo en el que los miembros de la superfamilia TGF- β /BMP activan a Snail-1, cuyos niveles son regulados por la señalización del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (58). Al mismo tiempo, Snail-1 mantiene la regulación negativa de la E-cadherina (58). Esto permite que la β -catenina se acumule en el citosol, estabilizada por la vía de señalización Wnt, y esté disponible para reclutar a los factores de transcripción TCF (factor de células T) y LEF (factor potenciador linfoide) en el núcleo (58,59). De esta manera, promueve la expresión de más genes de la TEM (58). Asimismo, la expresión de Snail-1 aumenta la señalización de Wnt, lo que propone un circuito de retroalimentación positiva (48).

3. Miogénesis y su regulación molecular en platelmintos

3.1 Miogénesis en platelmintos de vida libre

3.1.1 Desarrollo muscular en planarias

Las planarias son conocidas por su capacidad regenerativa y de renovación de tejidos mediante la proliferación y diferenciación de neoblastos, células madre adultas pluripotentes (47). Estas células proliferativas han sido ampliamente estudiadas, por lo que se ha descrito *Smed-H2B* como una variante específica de histona que se usa como marcador molecular de neoblastos en la planaria *Schmidtea mediterranea* (33,47,60).

Tras una amputación o lesión, los neoblastos próximos a la herida proliferan y dan lugar al blastema regenerativo, un grupo de células indiferenciadas que se transformarán en los diferentes tipos de células requeridos para restaurar las estructuras perdidas (47). En planarias, las nuevas células musculares derivan específicamente de estos neoblastos pluripotentes (47).

Durante el proceso de regeneración en planarias, las células musculares, en particular los miocitos, desempeñan un papel fundamental. Ante una lesión, los miocitos de la pared corporal, en la región afectada, se contraen para así cerrar la herida, preparando el área donde se desarrollará el blastema (61). Además de su función contráctil, estas células musculares proporcionan información posicional que dirige tanto la renovación de tejidos como el proceso de regeneración (62). Esto ocurre gracias a la activación de genes de control posicional (PCGs) en la mayoría de las células musculares, otorgándole al músculo una doble función: la contracción y el control de patrones corporales (62). La expresión de estos PCGs, en el músculo, ocurre incluso en ausencia de neoblastos en *S. mediterranea*, sugiriendo que el músculo proporciona, de manera independiente, las instrucciones posicionales cruciales para regenerar cualquier parte del cuerpo (62).

La pared corporal de las planarias está compuesta por una red subepidérmica de fibras musculares (61). La capa más externa es la de fibras circulares,

seguida por una capa intermedia de fibras diagonales y una capa interna de fibras longitudinales (61). En conjunto, esta red muscular preserva la forma y la integridad del cuerpo de la planaria (61).

Asimismo, existen fibras musculares rodeando el sistema digestivo, los órganos reproductivos, la abertura bucal y la faringe (47,61). En particular, se ha planteado que los neoblastos situados en la base de la faringe ingresan a esta estructura, donde comienzan a diferenciarse en miocitos (47,61). Posteriormente, estas células migran hacia el músculo subepitelial, integrándose entre las células musculares preexistentes (47,61).

3.1.2 Papel específico de myoD en el desarrollo muscular de planarias

El tejido muscular que forma la pared corporal de las planarias es de naturaleza esquelética, debido a la expresión de genes específicos de este tipo de músculo, como la miosina esquelética de cadena pesada y el factor de transcripción miogénico MyoD (47).

En *Schmidtea mediterranea* se identificó un ortólogo de *myoD*, cuya expresión se confirmó en neoblastos, sugiriendo también su expresión en células progenitoras miogénicas (47). Además, *myoD* se expresa en las fibras subepidérmicas distribuidas por todo el cuerpo del animal, sobre todo en la superficie ventral (47).

MyoD es esencial, específicamente, para la formación de las fibras musculares longitudinales que recorren el eje anteroposterior (AP) en las planarias (63). En *Schmidtea*, el silenciamiento de *myoD* provoca la pérdida de dichas fibras, lo que resulta en una incapacidad total de regeneración (63). Después de la amputación, estas planarias no logran regenerar los polos anterior y posterior que son esenciales para establecer los patrones iniciales en el blastema, los cuales marcan el inicio del proceso regenerativo (63). Además, estos animales experimentan un cambio en su fenotipo, mostrándose más alargados y delgados, probablemente debido a la falta de desarrollo muscular (63).

3.2 Miogénesis en platelmintos parásitos

3.2.1 Musculatura del gusano adulto

Por lo general, los platelmintos parásitos poseen músculo de tipo liso (64,65). Esta musculatura lisa corresponde a los músculos "lentos", capaces de contraerse durante períodos prolongados con un bajo consumo energético, lo que les permite contrarrestar la peristalsis del hospedero (65).

En la mayoría de los platelmintos adultos, se observan tres sistemas musculares claramente definidos. El primero es el músculo somático, responsable tanto del movimiento locomotor como de la conformación del cuerpo (64,65). El segundo sistema corresponde a los músculos de los órganos de fijación, que están compuestos por fibras musculares estriadas y fibras de paramiosina (64,65). El tercer sistema muscular se relaciona con funciones específicas: en los tremátodos, está vinculado al tracto alimenticio, mientras que en los cestodos, se asocia al sistema reproductor (64,65).

El músculo somático en los platelmintos parásitos está compuesto por tres tipos de fibras, cada una vinculada con movimientos típicos que realizan estos organismos (64). Las fibras circulares permiten los estiramientos, las fibras longitudinales permiten que el gusano se encoja y las fibras diagonales posibilitan las flexiones (64).

La miogénesis es fundamental en la fisiología de los cestodos, ya que la contracción muscular les permite desplazarse dentro de su hospedero y adherirse al epitelio intestinal del mismo (65,66). A pesar de ello, la información disponible sobre *T. solium* es limitada y se reduce a una descripción general del entramado de miofilamentos presente en las proglótides (16). Lo que se conoce con mayor detalle es la presencia de isoformas de actina en el cisticerco. Las isoformas de miosina tipo II también se han identificado, tanto en las etapas larvales como en el estadio adulto (67,68).

3.2.2 Desarrollo muscular en un platelminto parásito modelo de laboratorio: *Hymenolepis microstoma*

Ciertas especies de cestodos dentro del género *Hymenolepis* se han aprovechado como organismos modelo, entre ellas, *Hymenolepis microstoma* (7). Esto se debe a que su ciclo de vida completo se ha logrado mantener en condiciones de laboratorio (7), a diferencia de *T.solium*. Además, los hospederos de *H. microstoma* (el ratón y el escarabajo de la harina) facilitan la logística de mantenimiento (7). Por ello es que se ha descrito a mayor detalle cada uno de sus estadios (oncósfera, cisticercoide y gusano adulto), documentando incluso las cinco fases (S1-S5) del desarrollo de la oncósfera hacia larva cisticercoide (4,5,9) (Figura 2A). Recientemente, se han podido subdividir mejor estas cinco fases larvales en base a detalles anatómicos aún más finos (69) (Figura 2B). De esta manera, se facilita un estudio más completo de los procesos de desarrollo en cada uno de los estadios descritos del parásito.

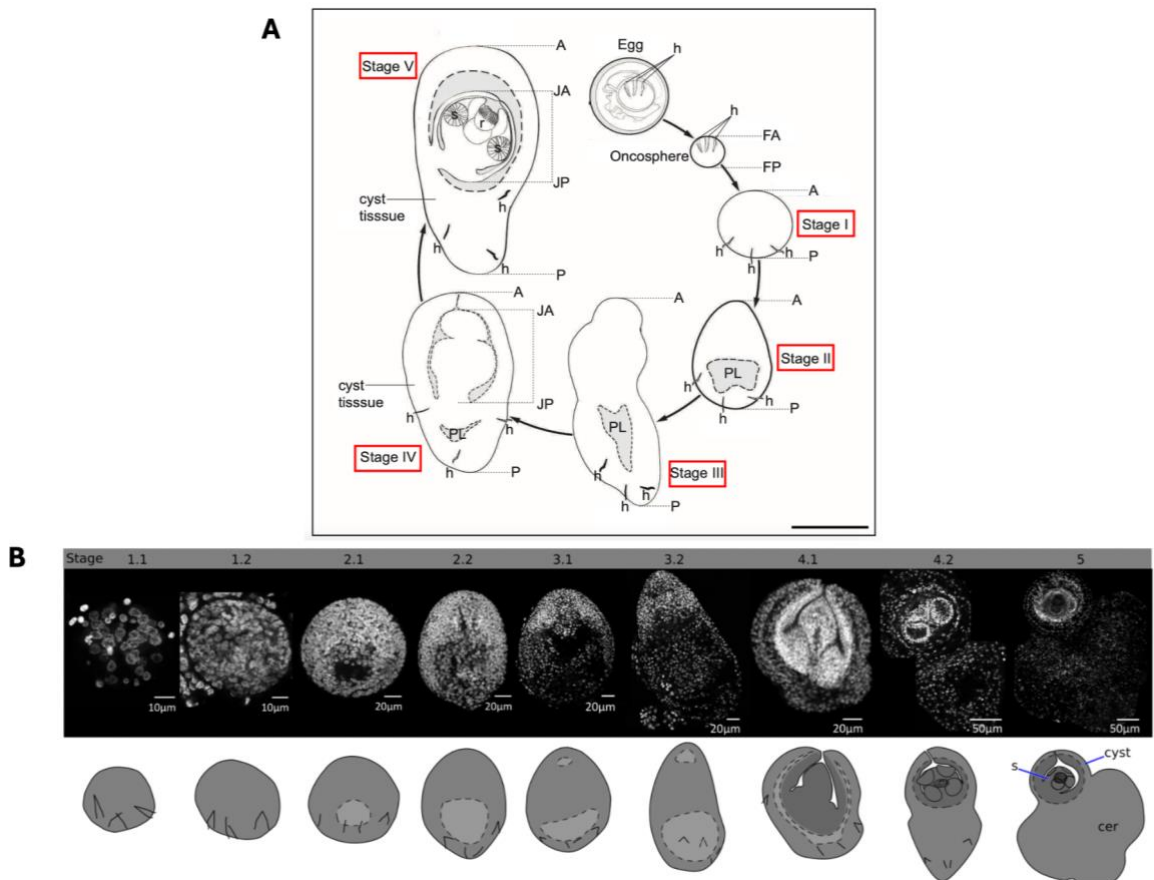


Figura 2. Desarrollo de la larva de *Hymenolepis microstoma*.

(A) Se representan las cinco fases del desarrollo de la oncósfera hacia larva cisticercoide (S1 - S5). (B) Estas cinco etapas de desarrollo se han subdividido, en función a detalles anatómicos más precisos. Figuras modificadas de Jarero *et al.* (9) y Montagne *et al.* (69)

Al igual que en otros cestodos, *H. microstoma* presenta una musculatura conformada por fibras longitudinales, transversales y circulares (9,66). Además, se ha observado la presencia de un anillo subepidérmico de miocitos no contráctiles (9).

La musculatura del estróbilo se divide en dos láminas corticales: el músculo superficial y el músculo medular. El músculo superficial está formado por fibras delgadas, tanto longitudinales como circulares. Por otro lado, el músculo medular consiste también en fibras longitudinales y circulares, pero

de mayor grosor. Además, los límites entre las proglótides están delimitados por fibras musculares transversales (66).

En la corteza del gusano adulto de *H. microstoma*, como ocurre en todas las tenias, se encuentra una región particular donde el tejido nervioso, las células germinativas y los músculos longitudinales están interconectados (9). Esta área se conoce como "cilindro de señalización del desarrollo" (DSC) (9). Estudios han revelado la expresión de diversos factores pertenecientes a las vías de señalización Wnt, Notch y Hedgehog (Hh) dentro del DSC (9). Se sabe que los factores de las vías Hh y Notch se relacionan con el sistema nervioso y, por otro lado, se presume que los factores Wnt se expresan predominantemente en las células musculares (9).

3.2.3 Organización de los componentes musculares en *Taenia solium*

El cuerpo de *T. solium* está conformado por una sucesión de segmentos, denominados proglótides, recubiertos por una capa tegumentaria (16). La morfología muscular de este parásito no se ha estudiado a profundidad (16).

La disposición de los miofilamentos es una característica notable que sí se ha descrito en el tejido del estróbilo de *T. solium*. Este entramado de fibras incluye fibras somáticas del músculo liso, dispuestas en haces de miofilamentos longitudinales, que se conectan con haces de miofilamentos perpendiculares (16). Como consecuencia, se forma una red densa de miofibrillas que abarca toda la capa externa del tejido del estróbilo (16).

En base a estudios previos realizados en otros cestodos, especialmente en *H. diminuta*, se presume que *T. solium* presenta una disposición similar en su musculatura, con fibras circulares externas y longitudinales internas ubicadas debajo del tegumento (26,64–66). Además, en capas más profundas, sería razonable encontrar más fibras longitudinales junto con fibras transversales que delimiten los segmentos individuales de las proglótides (66).

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

El análisis del transcriptoma, mediante la secuenciación de mRNA (mRNA-seq), en *H. microstoma*, reveló la expresión diferencial de múltiples genes implicados en diferentes procesos de desarrollo (8). Entre ellos, destacó *myoD*, cuya expresión variaba dependiendo del estadio y de la región específica del cuerpo del gusano (8).

El análisis de mRNA-seq reveló una alta expresión del gen *myoD* en el estadio larval y en el adulto (8). En particular, su expresión es mayor en las áreas del escólex y el cuello del gusano adulto (8). A diferencia de las muestras larvales, no se llevó a cabo la hibridación *in situ* de montaje completo (WMISH) con las muestras correspondientes al escólex y el cuello del adulto. Esto impidió observar la distribución espacial del gen en estas regiones específicas (8).

Por otro lado, la hibridación *in situ* realizada en las larvas permitió examinar la expresión espacial y temporal de *myoD* durante la metamorfosis larval (Figura 3). Se observaron diferencias en la expresión del gen en las tres regiones de la larva cisticercoide (gusano juvenil, quiste y cola) (8). En la región anterior del estadio larval S1, la expresión de *myoD* es difusa, pero se observa una mayor expresión en las áreas correspondientes a las ventosas y el rostelo. En la región posterior, se evidencia una alta expresión de *myoD* en los tejidos del quiste, alrededor de la cavidad larval, donde se desarrollan láminas musculares delgadas. Por el contrario, las células responsables de formar la cola del cisticercoide no expresan el gen en las etapas iniciales de la metamorfosis (S1). Este mismo patrón de expresión se conserva en el estadio larval S3. A medida que avanza el desarrollo, en el estadio cisticercoide juvenil post-enquistamiento (S4), la expresión de *myoD* sigue siendo fuerte en la región anterior; sin embargo, en el cisticercoide maduro (S5), la expresión comienza a limitarse al área de la cola (Figura 3) (8).

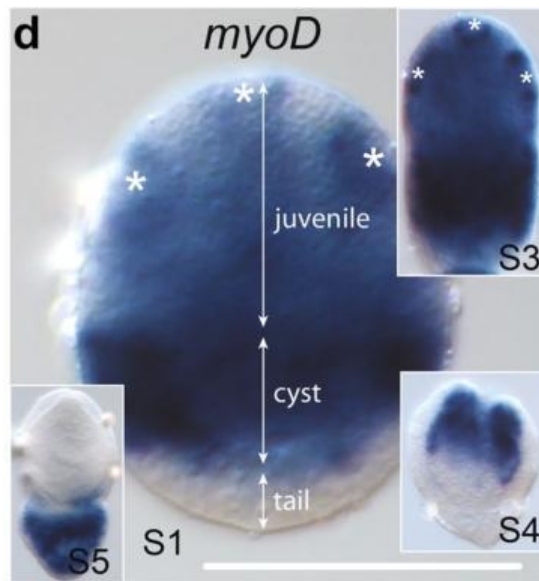


Figura 3. Expresión espacial de *myoD* durante la metamorfosis larval de *H. microstoma*. Los asteriscos laterales indican las ventosas nacientes y el asterisco central indica el bulbo perteneciente al roseto. Las flechas indican las regiones de la larva que dan origen al gusano juvenil (“juvenile”), los tejidos del quiste (“cyst”) y la cola (“tail”). Figura obtenida de Olson *et al.* (8).

Resultados similares se obtuvieron por Montagne *et al.* (69) al evaluar la expresión de *myoD* como factor de transcripción relacionado con el desarrollo muscular, durante la metamorfosis larval de *H. microstoma*. Hubo una fuerte expresión de *myoD* en los futuros tejidos del quiste en el estadio larval 3.2, cerca de la parte posterior. No obstante, *myoD* no se expresó del todo en la banda de miocitos marginales (dv) durante el estadio 2.2 (Figura 4) (69).

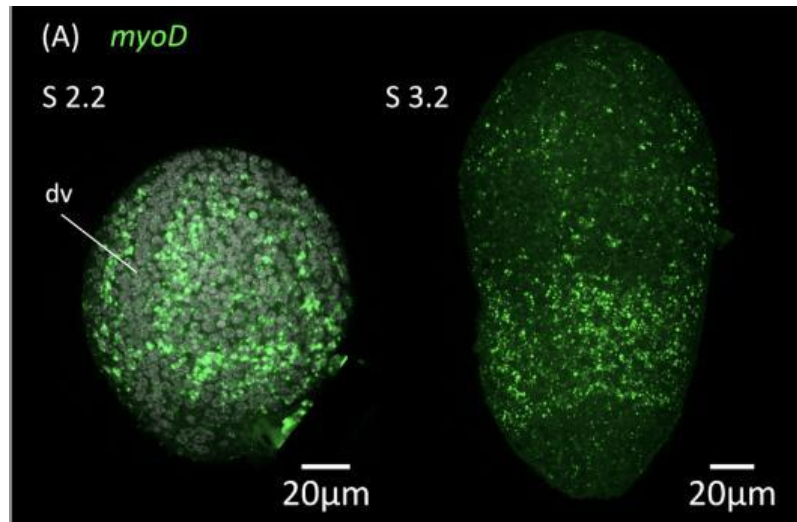


Figura 4. Expresión del ortólogo de *myoD* en *H. microstoma* durante la metamorfosis larval de este cestodo. dv: banda lateral de miocitos marginales. Figura obtenida de Montagne *et al.* (69).

Aunque MyoD sea un factor de transcripción relevante, al inducir un proceso crítico en el desarrollo, no ha sido caracterizado en *T. solium*. Esto podría deberse a lo complicado que es acceder a los estadios de este parásito y que, a su vez, estos sean útiles para la experimentación. No obstante, estudiar a MyoD en *T. solium* ayudaría a dilucidar la función del tejido muscular durante el desarrollo del parásito, específicamente, en la metamorfosis de larva cisticerco a gusano adulto.

4. Snail-1 es un factor de transcripción TEM también presente en platelmintos

4.1 Importancia de *snail-1* en platelmintos de vida libre

4.1.1 *snail-1* se expresa en los neoblastos de planarias

En planarias también se ha observado la expresión de este regulador transcripcional. Un homólogo de *snail-1* se expresó junto con *colágeno* en un 83,8% de las células de planarias que no sufrieron lesión alguna (70). *snail-1* también se expresó en el 2,3% de neoblastos y se coexpresó con *myoD* en el 35,7% de células de planarias heridas (70). Esto sugiere un posible papel de *snail-1* en la especificación del tejido muscular. Además, este factor se

expresó en células positivas para *smedwi-1* (marcador de neoblastos) durante la regeneración (70).

4.1.2 La migración celular en planarias requiere de *snail-1*

Abnave *et al.* (71) establecieron un ensayo para estudiar el control molecular de la migración de neoblastos. Con ello demostraron que los homólogos de factores de transcripción de la TEM (*snail-1*, *snail-2* y *zeb-1*) son necesarios para la migración celular a los sitios donde haya ocurrido una lesión (71). También determinaron que estos factores son importantes para establecer la morfología de las células migratorias (71).

En el contexto de este ensayo de migración, las planarias a las que se les había realizado ARN de interferencia (ARNi), ya sea de *snail-1* o *snail-2*, no lograron regenerarse luego de una lesión (71). Esto sugiere que el silenciamiento de estos genes provocó un fallo en la migración celular. Asimismo, en estas planarias hubo una disminución en el porcentaje de células que mostraron proyecciones citoplasmáticas extendidas, las cuales son un indicativo de la morfología migratoria (71).

A nivel de expresión, se vio que tanto *snail-1* como *snail-2* se expresaron en neoblastos, positivos para *smedwi-1*, en la región migratoria después de ocurrida una lesión (71). Un 87% de neoblastos expresaron *snail-1* y un 93% expresaron *snail-2* (71). Este patrón de expresión sugiere que estos factores de transcripción actúan de forma autónoma durante el control de la migración de neoblastos (71). Además, esto demuestra que los miembros de la familia Snail mantienen una función conservada, en planarias, respecto a la regulación de la migración celular ante un daño tisular (71). De esta manera, también se establece que los mecanismos de la TEM se conservan a lo largo de los animales bilaterales (71).

4.2 *snail-1* en un platelminto parásito modelo de laboratorio

4.2.1 *snail-1* se expresa en el gusano adulto de *H. microstoma*

Se evaluó la expresión de un ortólogo de *snail-1* en diferentes estadios y regiones de *H. microstoma* (8). Los experimentos de WMISH demostraron que *snail-1* se expresa a manera de gradiente a lo largo del parásito adulto (8) (Figura 5). Hay una mayor expresión en la zona central del cuello que se extiende a través de la parte central del estróbilo; sin embargo, la expresión disminuye hacia la región inferior del estróbilo, donde se encuentran los primordios genitales (8). No se observa expresión de *snail-1* en la parte cortical o más externa del gusano adulto, lo cual podría explicarse por la presencia de células miogénicas ya diferenciadas en esta zona (8). Dichas células, en estado de proliferación, pueden haber migrado desde la zona del parénquima del gusano hacia el tegumento para finalmente diferenciarse (8).



Figura 5. a. Expresión espacial de *snail-1* en el escólex, cuello y estróbilo inmaduro. **f.** Expresión de *snail-1* en los primordios genitales. Figura obtenida de Olson *et al.* (8).

A pesar de que Snail-1 es inductor de un proceso clave del desarrollo, como lo es la transición epitelio-mesénquima, no se ha evaluado su expresión en los diferentes estadios de *T.solium*, considerando que este parásito sufre modificaciones morfológicas notables como la evaginación y estrobilación.

El estudio tanto de MyoD como Snail-1 estaría contribuyendo a confirmar el papel determinante de estos factores de transcripción en la biología del desarrollo de un parásito de importancia en salud pública.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis:

Los genes *myoD* y *snail-1* muestran expresión diferencial en el cisticerco de *T. solium*, dependiendo de la evaginación del escólex; esta variación en los niveles de expresión está relacionada con la proliferación celular.

2. Objetivos:

2.1. Objetivo general:

Evaluar procesos fundamentales en el desarrollo de *T. solium*, tales como la miogénesis, la transición epitelio-mesénquima y la proliferación celular, a través de la expresión de genes clave implicados en estos mecanismos (*myoD*, *snail-1* y *h2b*, respectivamente) en larvas metacestode, según la evaginación del escólex.

2.2. Objetivos específicos:

- a) Identificar y analizar las secuencias de los factores de transcripción *myoD* y *snail-1* y del marcador de proliferación histona *h2b* de *T. solium* con herramientas bioinformáticas.
- b) Comparar la expresión relativa de mensajeros de *myoD*, *snail-1* y *h2b*, a través de RT-qPCR, en larvas de *T. solium* sin evaginar el escólex y después de evaginar el escólex *in vitro*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño general

En este trabajo se midió la expresión de los genes *myoD* y *snail-1* que codifican factores de transcripción que inducen la miogénesis y la transición epitelio-mesénquima (TEM), respectivamente. Igualmente, se evaluó la expresión del marcador de proliferación histona *h2b*. El análisis de expresión de estos genes se realizó por ensayos de PCR cuantitativa de transcripción reversa (RT-qPCR), a partir del ARN extraído de cisticercos de *T. solium* sin evaginar y evaginados.

2. Obtención de cisticercos

Los cisticercos de *T. solium* fueron colectados por el grupo colaborador de veterinarios en el Centro de Salud Global de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en la región de Tumbes, tras la necropsia de un solo cerdo naturalmente infectado en esa misma región para el proyecto “Identificación transcriptómica de determinantes celulares en la transición *in vitro* de larva metacestode (cisticerco) a gusano adulto en *Taenia solium*” (SIDISI 209290). Los quistes fueron trasladados el mismo día a Lima, por vía aérea, en un medio de transporte que consiste en PBS 1X con una dilución al 1X de Gibco™ Antibiotic-Antimycotic (penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y anfotericina B 0.25 µg/ml) (15240-062, Thermo Fisher Scientific).

3. Experimento piloto para estandarización de condiciones de cultivo

Previo a la realización de la presente tesis, se llevó a cabo un experimento piloto con 70 cisticercos provenientes de un solo cerdo igualmente identificado en Tumbes. El objetivo fue estandarizar las condiciones de cultivo de cisticercos de *T. solium* para que se lleve a cabo la evaginación del escólex *in vitro*. Se empleó el medio de cultivo RPMI 1640, HEPES (Gibco™ 23400-021, Thermo Fisher Scientific), el cual fue suplementado con NaHCO₃ 2g/L, β-mercaptoetanol 1.6 µM y con Gibco™ Antibiotic-Antimycotic al 1X.

En el experimento se consideraron siete grupos, un grupo control no cultivado y seis grupos bajo condiciones de cultivo distintas, empleando 10 cisticercos por grupo:

1. Grupo control: cisticercos no cultivados que fueron preservados inmediatamente en solución caotrópica (RNA Later®, Invitrogen AM7021, Thermo Fisher Scientific).
2. Cisticercos en medio RPMI suplementado, sin suero fetal bovino (FBS) y sin ácido taurocólico (AT)
3. Cisticercos en medio RPMI suplementado, sin FBS + AT 0.1%
4. Cisticercos en medio RPMI suplementado, con FBS 1% y sin AT
5. Cisticercos en medio RPMI suplementado, con FBS 1% + AT 0.1%
6. Cisticercos en medio RPMI suplementado, con FBS 10% y sin AT
7. Cisticercos en medio RPMI suplementado, con FBS 10% + AT 0.1%

Para el cultivo, se utilizaron placas de 24 pozos con 1 quiste por pozo en 1.5 ml de medio RPMI 1640 suplementado. El cambio de medio se realizó cada 48h.

Se registró el momento de evaginación de los cisticercos de cada grupo, ya sea a las 20, 44, 64, 88 o 116 horas de permanecer en cultivo. A partir de esta información, se determinó el porcentaje de evaginación de los cisticercos para cada condición de cultivo y tiempo determinado.

4. Cultivo de cisticercos

Las condiciones de cultivo descritas a continuación se determinaron a partir de los resultados obtenidos en el experimento piloto. Se definió que el suero fetal bovino es prescindible, por lo que se decidió eliminarlo al contener factores de crecimiento que podrían afectar procesos de desarrollo en *T. solium*. Además, se comprobó que el ácido taurocólico es un buen inductor de la evaginación *in vitro*; entre las 24 y 48h en cultivo con AT al 0.1%, la mayoría de cisticercos evaginó el escólex.

Al llegar al laboratorio, las muestras fueron lavadas 3 veces, durante 1 minuto, con una solución de PBS 1X más Gibco™ Antibiotic-Antimycotic 1X. Después de los lavados, se seleccionaron aquellos quistes enteros y de buen aspecto para proceder con el cultivo en el medio RPMI 1640, HEPES, pH 7.4. El medio fue suplementado con NaHCO₃ 2g/L, β-mercaptoetanol 1.6 μM y con Gibco™ Antibiotic-Antimycotic al 1X; también se agregó ácido taurocólico (AT) al 0.1% para simular el ambiente del

intestino. Se emplearon placas de cultivo de 24 pozos de 1.9 cm² con 1 quiste por pozo en 1.5 ml de medio RPMI 1640 suplementado. El cambio de medio se realizó cada 48h.

Se empleó un total de 40 cisticercos, los cuales fueron distribuidos equitativamente en 4 grupos (ver Figura 6). Los quistes no cultivados (control) fueron inmediatamente preservados en solución caotrópica (RNA Later®, Invitrogen AM7021, Thermo Fisher Scientific) después de haber sido lavados. Los quistes de los grupos “no evaginados”, “recién evaginados” y “evaginados en crecimiento” fueron cultivados en medio RPMI 1640 suplementado e inducidos a evaginación *in vitro* con AT al 0.1%:

1. **Parásitos no cultivados (control):** individuos recién recolectados que no se colocaron en cultivo. Su escólex no había evaginado.
2. **Parásitos “no evaginados”:** individuos mantenidos 6 horas en cultivo. Escólex no evaginado.
3. **Parásitos “recién evaginados”:** individuos colectados cuando mostraron el escólex fuera de la vesícula (cabeza y cuello visibles, o retraídos en el parénquima vestibular). Estas formas se observaron entre las 24 y 48h en cultivo.
4. **Parásitos “evaginados en crecimiento”:** individuos que mostraron el escólex fuera de la vesícula, cultivados hasta las 120h.

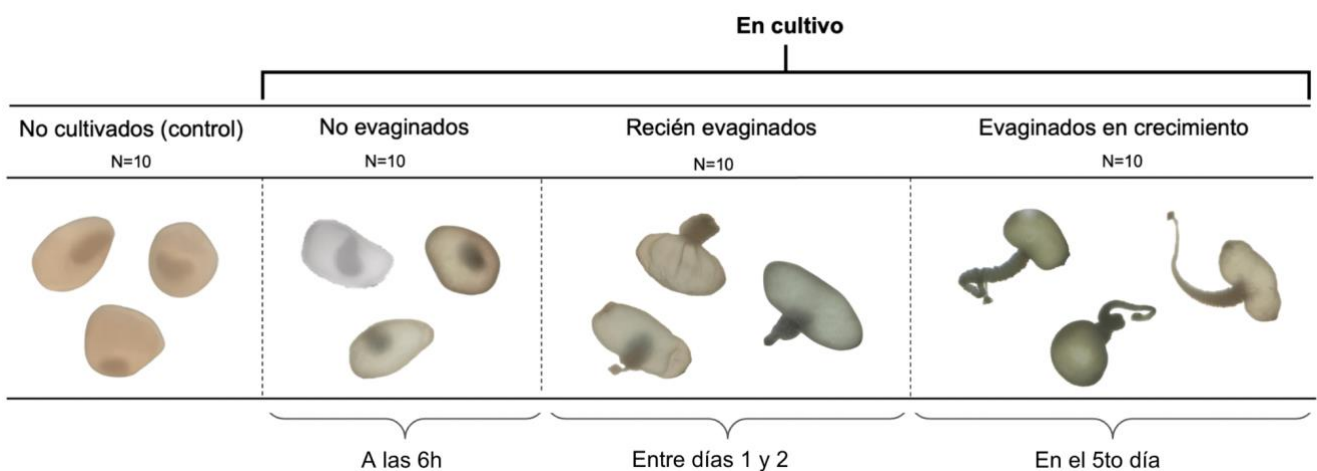


Figura 6. Distribución de muestras en grupos para análisis de expresión por RT-qPCR.

La selección y colecta de cisticercos para cada grupo (“no evaginados”, “recién evaginados” y “evaginados en crecimiento”) se realizó tomando en cuenta el **fenotipo del individuo** en el momento dado, utilizando como referencia datos de una curva de evaginación realizada en un experimento piloto con 70 cisticercos colectados de un solo cerdo igualmente identificado en Tumbes. Según el experimento piloto, hubo un pico en el número de cisticercos evaginados entre las 24 y 48 horas de iniciado el cultivo en presencia de AT (inductor de evaginación). Dicha información fue ratificada en la presente tesis.

Después de coleccionar los cisticercos de cada grupo, estos se preservaron en RNA Later® hasta la posterior extracción de ARN.

5. Identificación y caracterización *in silico* de las secuencias de los genes *myoD*, *snail-1* y *h2b* en *Taenia solium*

Mediante la herramienta “Basic Local Alignment Search Tool” ([BLAST](#)), se realizó la identificación de los ortólogos de *myoD* (TsM_000079400), *snail-1* (TsM_000952500) y *h2b* (TsM_000989300) en el genoma de *T. solium* (disponible en [WormBase Parasite](#) gracias a la contribución de Tsai *et al.* (72)). Con BLAST se buscaron e identificaron secuencias homólogas, en *T. solium*, a los genes ya anotados de *myoD* y *snail-1* en *H. microstoma* (8) y al gen de la histona *h2b* en *H. diminuta* (10).

Adicionalmente, se realizó un alineamiento global con [EMBOSS Needle](#). Esto sirvió para comprobar que el grado de identidad de los ortólogos de *myoD*, *snail-1* y *h2b*, entre *Taenia* e *Hymenolepis*, fuera superior al 25% en zonas de alineamiento de al menos 100 aminoácidos y así considerar homología (Figuras 7-9 y Tabla 1).

La identificación de las secuencias obtenidas se reforzó con un análisis de dominios conservados de las proteínas resultantes, para ello se utilizó [InterPro](#) del European Bioinformatics Institute (EBI) y la base [Conserved Domain Database](#) (CDD, NCBI). Las proteínas codificadas por *myoD*, *snail-1* y *h2b* presentaron sus dominios característicos (Figuras 10-12).

6. Diseño de primers

Con ayuda del *software* [Primer-BLAST](#) se diseñaron oligonucleótidos (primers) para los ensayos de expresión por qPCR de los genes *myoD*, *snail-1* y *h2b* (Anexo 1). La herramienta [Oligo Analyzer](#) permitió evaluar la calidad de los primers en base a su capacidad de formación de estructuras secundarias, homodímeros y heterodímeros.

7. Preparación de la muestra para la extracción de ARN total

Previo a la extracción de ARN, se retiró cada cisticerco del RNA Later®, este se lavó con 1ml de agua grado biología molecular y se lo colocó en una placa Petri estéril, donde la vesícula del quiste se retiró con ayuda de un bisturí. Cabe resaltar que no se realizaron secciones anatómicas del parásito. Se trabajó con el cisticerco entero de *T. solium*, exceptuando la vesícula. El cisticerco sin vesícula fue transferido a un tubo

con 600 μ L de la solución estabilizadora DNA/RNA Shield TM (R1200, Zymo Research), donde fue lisado utilizando un homogeneizador de tejidos, trabajando sobre hielo molido.

8. Extracción de ARN total

Se extrajo el ARN total de cada uno de los 10 cisticercos pertenecientes a cada grupo: no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados y evaginados en crecimiento. La extracción se realizó mediante columnas de sílice, siguiendo las indicaciones del kit de extracción de ARN Quick-RNATM Miniprep Plus Kit (R1057, Zymo Research). El ARN obtenido se cuantificó a través de una medición de fluorescencia usando el fluorómetro Qubit 4 (Q33238, Thermo Fisher Scientific) y el kit respectivo de cuantificación de ARN Qubit RNA HS Assay Kit (Q32852, Thermo Fisher Scientific). Se verificó la integridad del ARN con un gel de agarosa con lejía al 1%. La concentración e integridad del ARN extraído se muestran en los Anexos 2 y 3.

9. Generación de cDNA mediante transcripción reversa (RT-PCR)

Se generó cDNA por transcripción reversa a partir de 100ng del ARN total de cada una de las 10 muestras pertenecientes a cada grupo. Para ello, se utilizó el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814, Applied BiosystemsTM), siguiendo el protocolo respectivo en el termociclador: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos y 85°C durante 5 minutos.

10. PCR en tiempo real (qPCR)

El análisis de expresión relativa de los genes *myoD*, *snail-1* y *h2b* se realizó por qPCR con el kit PowerUpTM SYBRTM Green Master Mix (A25742, Applied BiosystemsTM). Se trabajó por triplicado para cada muestra (tres réplicas técnicas), utilizando 1 μ L del cDNA generado en la etapa anterior y los primers específicos para cada gen evaluado. Las reacciones se realizaron en un termociclador de tiempo real C1000 Dx Thermal Cycler with CFX96 Real-Time System (1841000-IVD, BIO-RAD) con el siguiente protocolo de ciclado: 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos y 39 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto. Como parte del protocolo de ciclado,

se evaluó la especificidad de los primers mediante una curva de fusión que oscilaba entre 60°C y 95°C con incrementos de 0.5°C.

La expresión génica relativa se calculó utilizando el método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) (73,74). Para ello, se normalizó la expresión del gen de interés respecto al gen de referencia (*rpl13*) y se calibró frente al grupo control (parásitos no cultivados).

Primero, se calculó la diferencia del ciclo de cuantificación (ΔCq) entre el gen de interés y el gen de referencia para cada muestra, lo que constituye el paso de normalización:

$$\Delta Cq = Cq (\text{gen de interés}) - Cq (\text{gen de referencia})$$

Luego, se calculó la diferencia entre el valor ΔCq de la muestra experimental y el valor ΔCq promedio del grupo control (parásitos no cultivados). Esto se realizó para cada una de las muestras experimentales. La diferencia entre estos valores da lugar al $\Delta\Delta Cq$:

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq (\text{muestra experimental}) - \Delta Cq \text{ promedio (muestra control)}$$

Finalmente, aplicando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$ se obtiene el cambio relativo en la expresión del gen de interés (*fold change*). Este valor representa un aumento o disminución de la expresión del gen de interés, relativo al grupo control (parásitos no cultivados).

11. Determinación del gen de referencia

Los datos obtenidos por qPCR se normalizaron con el gen de la proteína ribosomal L13 (*rpl13*), perteneciente a la subunidad mayor 60S del ribosoma (75). Este gen resultó ser el más estable luego de un análisis de estabilidad de la expresión génica para cinco candidatos a genes de referencia: malato deshidrogenasa citosólica (*mdh*), proteína ribosomal L13 (*rpl13*), citocromo c oxidasa subunidad 1 (*cox-1*), proteína quinasa 3 activada por mitógeno (*mapk3*) y fosfoglicerato quinasa 1 (*pgk1*). Los primers para estos genes candidatos (Anexo 1) habían sido previamente diseñados y analizados como parte de un trabajo independiente del laboratorio. A partir de dicho trabajo, se desarrolló un manuscrito que actualmente se encuentra en revisión y que

busca justamente validar genes de referencia para análisis de expresión en estadios pre-adultos de *T. solium*.

Para la presente tesis, la estabilidad de expresión de los cinco genes candidatos se probó en las cuatro condiciones experimentales. Para ello, utilizando los primers específicos de cada gen candidato, se realizaron corridas de qPCR con el cDNA generado a partir de parásitos no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados y evaginados en crecimiento. De esta manera, se obtuvieron los valores del ciclo de cuantificación (Cq) de todos los genes candidatos para cada condición experimental.

Estos valores de Cq se ingresaron a la herramienta en línea RefFinder, la cual realizó el análisis de estabilidad de la expresión génica, integrando los resultados de los algoritmos estadísticos principales (geNorm, NormFinder, BestKeeper y el método comparativo de ΔCt) en un puntaje final para cada gen. Esta puntuación final se calculó automáticamente por RefFinder mediante la media geométrica de los valores obtenidos por los cuatro algoritmos estadísticos. Los puntajes finales más bajos indican menos variabilidad y, por lo tanto, mayor estabilidad genética.

12. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con el software Graphpad Prism 9 (Graphpad® San Diego, CA). Para evaluar la distribución de los datos se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y se inspeccionó gráficamente la distribución mediante el gráfico cuantil-cuantil o gráfico Q-Q. A partir de estas pruebas, se determinó que uno o más grupos independientes, a evaluar, no cumplían con el supuesto de normalidad. Por lo tanto, se optó por utilizar la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, utilizando el estadístico H, para comparar la expresión relativa (*fold change*, $2^{-\Delta\Delta\text{Cq}}$) de un determinado gen entre cuatro grupos independientes de cisticercos con fenotipos distintos, basados en la evaginación del escólex (no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados y evaginados en crecimiento).

De esta manera, se consideraron las siguientes variables:

- **Variable dependiente:** condición diferencial de la expresión relativa al grupo control (*fold change*, $2^{-\Delta\Delta Cq}$) de los genes de interés (*myoD*, *snail-1* y *h2b*).
- **Variable independiente:** evaginación del escólex de los cisticercos pertenecientes a cada grupo experimental (no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados, evaginados en crecimiento).

Para la prueba de Kruskal Wallis, se consideraron las siguientes hipótesis:

- **H₀ (Hipótesis nula):** Los rangos promedio de los datos de expresión relativa (*fold change*, $2^{-\Delta\Delta Cq}$) de un determinado gen son iguales en todos los grupos de cisticercos.
- **H₁ (Hipótesis alternativa):** Al menos uno de los grupos de cisticercos tiene un rango promedio diferente.

Posteriormente, se realizó la prueba post hoc de Dunn para determinar específicamente entre qué grupos existen diferencias significativas.

Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de p eran <0.05.

13. Aspectos éticos

El presente trabajo está inscrito con registro SIDISI 207862 y fue exonerado de revisión por parte de la Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT) de la UPCH. Además, se encuentra vinculado al proyecto amplio SIDISI 209290 (“Identificación transcriptómica de determinantes celulares en la transición *in vitro* de larva metacestode (cisticerco) a gusano adulto en *Taenia solium*”), el cual regula el sacrificio de cerdos infectados bajo sedación para coleccionar cisticercos de *T. solium* y fue aprobado por el Comité Institucional de Ética Animal (CIEA) de la UPCH. Esta aprobación se mantuvo vigente durante la colección del material empleado en la tesis.

IV. RESULTADOS

1. Identificación *in silico* de los genes *myoD*, *snail-1* y *h2b* en *Taenia solium*

Olson y colaboradores (8) identificaron las secuencias de *myoD* y *snail-1* durante el análisis del transcriptoma completo de *H. microstoma*. Estas secuencias se utilizaron para realizar la búsqueda de genes ortólogos en *T. solium*. En el caso de *h2b*, se utilizó la secuencia reportada por Rozario *et al.* (10) en *H. diminuta*. En base a estas secuencias, se realizó una búsqueda mediante pBLAST, en la base de datos WormBase Parasite, por homólogos presentes en *T. solium*. De esta manera, se identificaron las secuencias TsM_000079400, TsM_000952500 y TsM_000989300 correspondientes a *myoD*, *snail-1* y *h2b*, respectivamente.

Tras realizar el alineamiento global por EMBOSS Needle (Figuras 7-9), *myoD*, *snail-1* y *h2b* de *T. solium* tuvieron un porcentaje de identidad del 63.3%, 63.7% y 99.2%, respectivamente, con las secuencias de *H. microstoma* (*myoD* y *snail-1*) y *H. diminuta* (*h2b*) (Tabla 1). Al ser estos valores mayores al 25%, las secuencias de ambos platelmintos se consideraron homólogas.

Las tres secuencias de aminoácidos correspondientes a *myoD*, *snail-1* y *h2b* también pasaron por un análisis de dominios conservados mediante InterPro y CDD. Las tres presentaron los dominios ya reportados de las respectivas proteínas. Respecto a MyoD, se observa correspondencia con la familia de factores reguladores miogénicos (MRFs) (Figura 10). Además, se confirmó la presencia del dominio bHLH ([IPR011598](#)), característico de este factor de transcripción, que pertenece a la superfamilia bHLH. En cuanto a Snail-1, el análisis mostró el dominio dedo de zinc tipo C₂H₂ ([IPR013087](#)), propio de esta proteína (Figura 11). Por ello, corresponde a la superfamilia dedos de zinc C₂H₂. Por otro lado, para H2B se observa correspondencia con la superfamilia de pliegues de histonas (Histone-fold superfamily). Dentro de este grupo, la secuencia pertenece a la familia histona H2B y tiene el dominio [IPR007125](#), propio de esta histona canónica (Figura 12).

HmN_000553800	1	MLGGSNSDYSSSEVAPNAT-----AKLHDESSNSASRSEVVYPYPEYA	44
TsM_000079400	1	ML-ESSGDY-TSEVTTATPSVPQPSKLDADSNNGSGGR-ENIYPYPEYP	47
HmN_000553800	45	NLMGYETAGVNQNRPFPTDHPGGLQTLVSQLVAKSELTSNEGNYDHLLY	94
TsM_000079400	48	NLMGYDNS-ASHGRPFLNDTHPGPLQTLVSQLVAKSELGSNEANYDHLLY	96
HmN_000553800	95	SATTSAAAPGYPPFYGNQPAAGVMPPSFEGFYPSYAYMSDHLNSSTD	144
TsM_000079400	97	SASSTAAVAAYSPPFYGNQ--SGGMSTSFENFYPHSYAYMSDHLNSTD	144
HmN_000553800	145	NGFAYSGGYPTNRGYETSDY---AGTEYPSQHPATSSANKPAAATANALD	191
TsM_000079400	145	NGFPYSSYASNRYVETSEYGSATSNTYQNHQHPSTTNANK-SAPTSSAID	193
HmN_000553800	192	SSSTSSVNSTCSAMEPGFSNNGPYLKP EEGKLP GFFSAPNSGVQSAPN	241
TsM_000079400	194	SSSTSSVTSTCSAMDSTFSST-GFYIKPEEGKVG GFFANPNNA-----T	237
HmN_000553800	242	TAGTTPPTCNLNSSIDKNQGKRMVDTRRNSGDMRKKVRS LQTPKKADS-	290
TsM_000079400	238	AAVTTTTTCNTNSSIDKEQRKRIVEPRKNGADMRKKIRTHQQA-KKAESS	286
HmN_000553800	291	--VTEKTAKSSLGMS EDRSPISM-GDSGDDTCSSDDE-HGPGNKEEHVLA	336
TsM_000079400	287	PCITDKDVKTS LAVREDHSPSLGGDSGDDSTSSDDDG HSGNKEEHI IA	336
HmN_000553800	337	PGSHGQCLLWACKACKKKT M QVDRRKAATMRERRRLR KVNEAFETLKRRT	386
TsM_000079400	337	PGSHGQCLLWACKACKKKT M QVDRRKAATMRERRRLR KVNEAFETLKRRT	386
HmN_000553800	387	CSNPNQRM PKVEILRTAIDYIENLEEM LHRNGVLLGTSPTGTSPSAGNLL	436
TsM_000079400	387	CSNPNQRM PKVEILRTAIDYIENLEEM LHRNGVLLGPSASSSSAAAGTLL	436
HmN_000553800	437	RSAGRYPS---TNPSTPSNKINSVDGARIQRV VSGTRGRKAGGISKGDKA	483
TsM_000079400	437	RSSRYSTGAGANNAAVNSKITSV ESGRIQRTGNGNRGRKAAALTKGDKV	486
HmN_000553800	484	GDQTRPEYSNIVPTSGTPNGTQASFMK METAQAPMQTEEQSYRGYASILA	533
TsM_000079400	487	GN-NRADYTGIAATSAANTG-QASFMK METSQAMPTED ESYRGYTTSLA	534
HmN_000553800	534	NNGWPPSIQVHDPNSVSGVTV----SPPPWRHMAPPLNSNTSEKSATAVP	579
TsM_000079400	535	NNGWPASIPVHDPNSVGGASVPAVSPPPWRHVTPSLSG--AETPTSAVP	582
HmN_000553800	580	EKALC	584
TsM_000079400	583	EKALC	587

Figura 7. Alineamiento global, por medio de Emboss Needle, de dos secuencias de aminoácidos de MyoD pertenecientes a *H. microstoma* (HmN_000553800) y *T. solium* (TsM_000079400).

HmN_000348000	1	MWSAFEPNGILLPASQSGNDTNTNPIQAPDVFQMMWNSAFSSFVNPNTI	50
TsM_000952500	1	MWSALDSDAV-LPTVKS-----EQPDVFQMMWNSAFS-----LV	33
HmN_000348000	51	KPGIERDEAVLQKHLCATSLLQQALSILSKR----PSELADTSIPSKNT	96
TsM_000952500	34	GPSPQMGEMVLQQLNASSLLHHALTILSERVPEPPESEAIA---APKLTA	80
HmN_000348000	97	EGESGGNSPPSFQ---NLSCSETTPNSPPWLPFGV---VSTQPIKQTPPI	140
TsM_000952500	81	DGLAGGDSPPSFQPLSNESLNQTPP--PPWLAFALPSVQDNQSSQQP-	127
HmN_000348000	141	IDLSKEKPQSPRKYDKFSIPHLLGQVSSSPDENVRPGKVCFCENCGRSY	190
TsM_000952500	128	IDLSKEK--SP-KYSNFSIPHLLGQL---PDENARPSKTCFCENYCGRSY	171
HmN_000348000	191	VTKTGLQRHQNLCSSRVSES--IPASPESLDPEDIQTTSPPNNSNVSQR	238
TsM_000952500	172	VTKTGLQRHQNC-SRVDSGGLTPSPESLDPDE-QASSPSPASSATSRQ	219
HmN_000348000	239	YTCHVCTKVVYSMSALKMHIRTHTLPCKCNICGKAFSRMWLLNGHLRHT	288
TsM_000952500	220	YTCHVCAKIYYSMSALKMHIRTHTLPCKCNICGKAFSRMWLLNGHLRHT	269
HmN_000348000	289	GEKPFACRVCQRAFADRSNLRAHMQTHSEVKRYRCEDCGKTFSRMGLLTK	338
TsM_000952500	270	GEKPFACRVCQRAFADRSNLRAHMQTHSEVKRYRCEECGKTFSRMGLLTK	319
HmN_000348000	339	HTRSGCTNKTSTSSPTPQ-----SAAQFPWNPPSIFS	370
TsM_000952500	320	HTRSGCSTQTSASSPLPPPPPEHVDSSQLQWNPASIFS	357

Figura 8. Alineamiento global, por medio de Emboss Needle, de dos secuencias de aminoácidos de Snail-1 pertenecientes a *H. microstoma* (HmN_000348000) y *T. solium* (TsM_000952500).

HDID_00003706	1	MGPKVVSGKAAKKASKVKVPKTDKAKKRRRKESYAIYIYKVLQRVHPDTG	50
TsM_000989300	1	MAPKVVSGKAAKKASKVKVPKTDKAKKRRRKESYAIYIYKVLQRVHPDTG	50
HDID_00003706	51	ISSKAMSIMNSFVNDIFERIAAESSRLAHYNKKSTITSREIQTAVRLLLLP	100
TsM_000989300	51	ISSKAMSIMNSFVNDIFERIAAESSRLAHYNKKSTITSREIQTAVRLLLLP	100
HDID_00003706	101	GELAKHAVSEGKAVTKYTGSK	122
TsM_000989300	101	GELAKHAVSEGKAVTKYTGSK	122

Figura 9. Alineamiento global, por medio de Emboss Needle, de dos secuencias de aminoácidos de H2B pertenecientes a *H. diminuta* (HDID_0000370601) y *T. solium* (TsM_000989300).

Tabla 1. Modelos de los genes *myoD*, *snail-1* y *h2b* de *T. solium* homólogos a los genes reportados en *Hymenolepis*

Especie	Nombre del gen	Número de acceso <i>Hymenolepis</i>	Número de aminoácidos <i>Hymenolepis</i>	Número de acceso <i>T. solium</i>	Número de aminoácidos <i>T. solium</i>	Porcentaje de identidad (%)
<i>H. microstoma</i>	<i>myoD</i>	HmN_000553800	584	TsM_000079400	587	63.3
<i>H. microstoma</i>	<i>snail-1</i>	HmN_000348000	370	TsM_000952500	357	63.7
<i>H. diminuta</i>	<i>h2b</i>	HDID_0000370601	122	TsM_000989300	122	99.2

MyoD

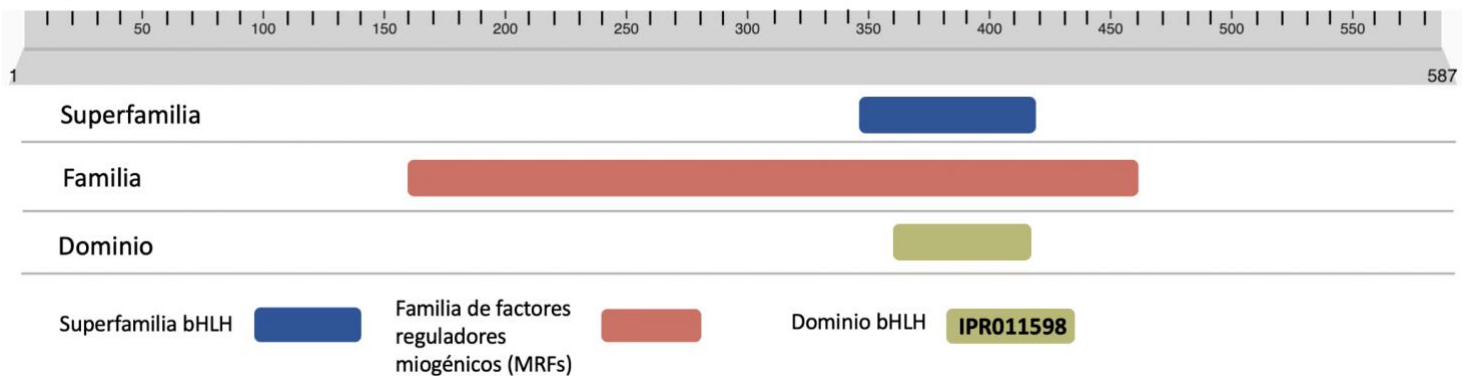


Figura 10. Dominios conservados en la proteína MyoD de *T. solium* identificados en CDD e InterPro. Se observa el dominio bHLH ([IPR011598](#)), característico de los miembros de la familia MRF.

Snail-1

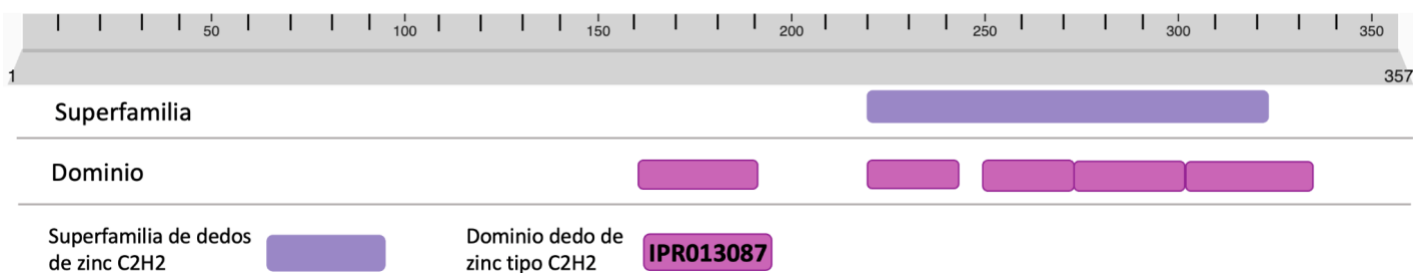


Figura 11. Dominios conservados en la proteína Snail-1 de *T. solium* identificados en CDD e InterPro. Se observan los dominios dedos de zinc C₂H₂ ([IPR013087](#)), propios de esta superfamilia.

H2B

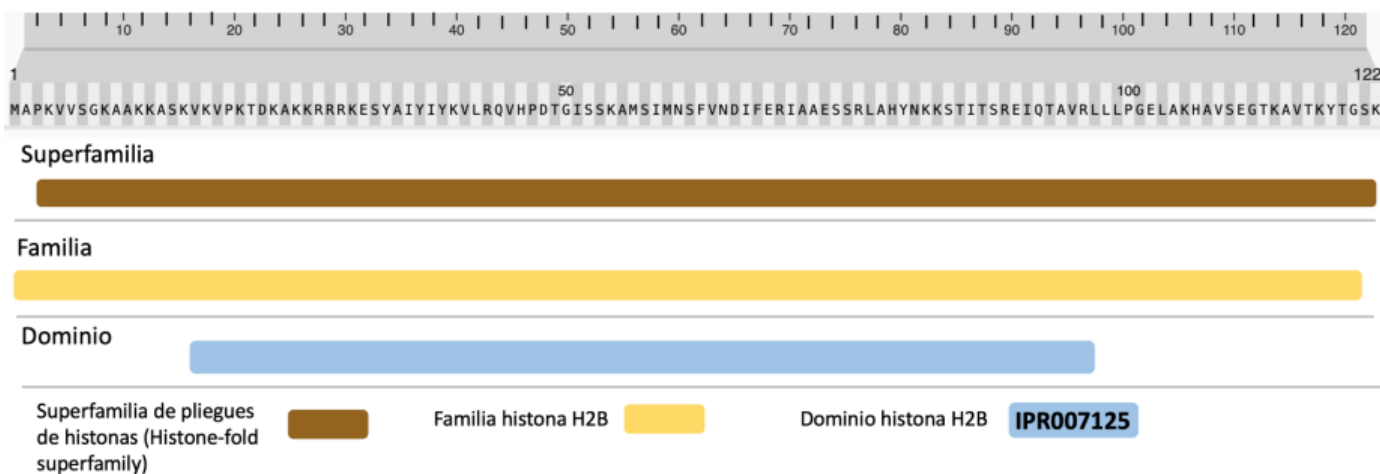


Figura 12. Dominio conservado presente en la histona H2B ([IPR007125](#)) de *T. solium* identificado en CDD e InterPro que corresponde con la superfamilia de pliegues de histonas (Histone-fold superfamily).

2. *rpl13* es el gen más estable entre cinco candidatos a genes de referencia evaluados para todas las condiciones experimentales

Se realizó un análisis de estabilidad genética de cinco candidatos a genes de referencia (*mdh*, *rpl13*, *cox-1*, *mapk3*, *pgk1*). Se consideraron estos genes en función a su estabilidad previamente reportada en otro cestodo, *Echinococcus spp.* (*rpl13* y *mapk3*) (75). También se incluyeron genes en base a su papel en procesos celulares esenciales, como el

metabolismo (*mdh* y *pgk1*) (76,77), y por ser ampliamente utilizados para la normalización de cuantificación relativa (*cox-1*) (78–83).

La herramienta RefFinder integró los resultados de los principales algoritmos estadísticos (geNorm, NormFinder, BestKeeper y el método comparativo de ΔCt) en un puntaje global para cada gen. A partir de ello, se generó una clasificación final de los genes candidatos que demuestra que el gen más estable en todas las condiciones experimentales es *rpl13*, al obtener la puntuación final más baja por RefFinder (Figura 13). Esto indica menos variabilidad que los demás genes. Por el contrario, se determinó que el gen *mdh* fue el menos estable de los cinco candidatos, ya que presentó la puntuación final más alta, indicando mayor variabilidad genética (Figura 13). Por lo tanto, se empleó a *rpl13* como gen de referencia para normalizar los datos obtenidos por qPCR.

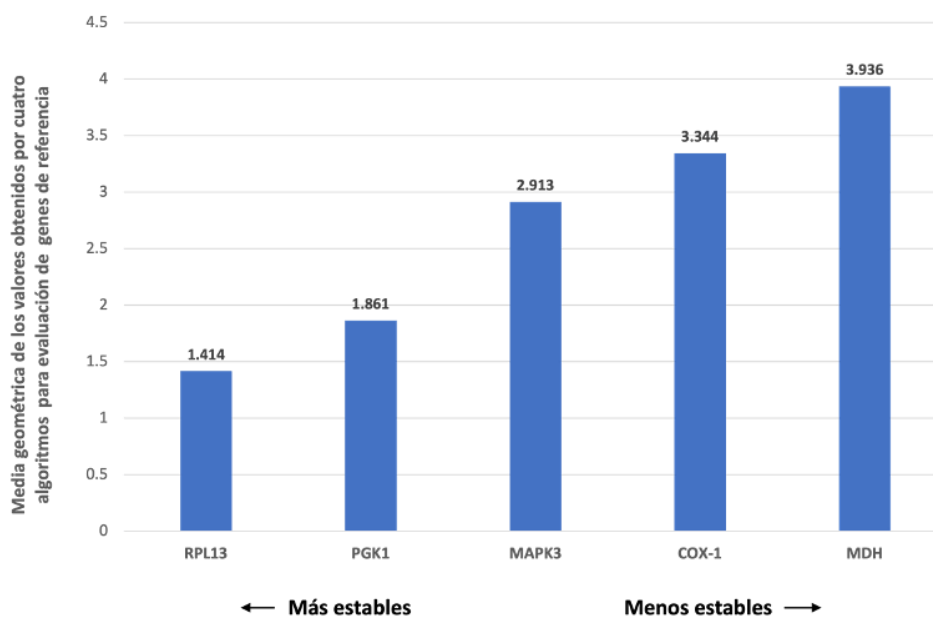


Figura 13. Clasificación integral de RefFinder de los mejores candidatos a genes de referencia en base a sus puntuaciones de estabilidad genética. La puntuación final de cada gen se calculó mediante la media geométrica de los valores obtenidos por los algoritmos geNorm, Normfinder, BestKeeper y el método comparativo ΔCt que permiten analizar la estabilidad genética de cada candidato. Los valores más bajos indican menos variabilidad y, por lo tanto, mayor estabilidad genética.

3. Análisis estadístico realizado con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de Dunn

a) Análisis estadístico no paramétrico de los datos de expresión relativa de *myoD*

Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para determinar si existen diferencias significativas en la expresión relativa del gen *myoD* entre los cuatro grupos experimentales de cisticercos. El valor obtenido para el estadístico H fue de 25.01 con 3 grados de libertad, lo cual implica un valor aproximado de $p < 0.0001$. Este valor permite afirmar que existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión relativa del gen *myoD* entre al menos dos de los grupos de cisticercos (Tabla 2).

Posteriormente, se aplicó la prueba post hoc de Dunn para determinar entre qué grupos exactamente se presentaron diferencias significativas respecto a la expresión relativa de *myoD*. Los valores de p que se muestran en la tabla 3 son valores de p ajustados por multiplicidad, mediante el método de Bonferroni, para minimizar el riesgo de falsos positivos (error tipo I) debido a las comparaciones múltiples.

Se observó que los valores de expresión relativa de *myoD* entre los cisticercos no cultivados y los recién evaginados mostraron diferencias significativas ($p = 0.0028$). Lo mismo sucedió entre los cisticercos no cultivados y los cisticercos evaginados en crecimiento ($p < 0.0001$). Hubo una tercera comparación que mostró diferencias significativas entre los grupos de cisticercos no evaginados y los evaginados en crecimiento ($p = 0.0084$). Las demás comparaciones entre grupos no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3).

Tabla 2. Rangos promedio y estadísticos calculados a partir de la prueba Kruskal-Wallis con los datos de expresión relativa del gen *myoD* en los grupos de cisticercos no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados y evaginados en crecimiento

	Fenotipo de los cisticercos	N	Rango promedio	Estadísticos de prueba	
Expresión relativa del gen <i>myoD</i>	No cultivados (control)	10	32.60	Número de grupos	4
	No evaginados	10	25.90	H de Kruskal-Wallis	25.01
	Recién evaginados	10	14.30	gl	3
	Evaginados en crecimiento	10	9.20	Valor aproximado de p	<0.0001
	Total de observaciones	40			

N: tamaño de la muestra, H: estadístico de prueba de Kruskal-Wallis, gl: grados de libertad

Tabla 3. Resultados de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn con los datos de expresión relativa del gen *myoD* para determinar diferencias estadísticas entre los grupos de cisticercos no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados y evaginados en crecimiento

Comparaciones entre grupos	Z	Valor de p ajustado
No cultivados (control) vs. No evaginados	1.282	>0.9999
No cultivados (control) vs. Recién evaginados	3.501	0.0028
No cultivados (control) vs. Evaginados en crecimiento	4.476	<0.0001
No evaginados vs. Recién evaginados	2.219	0.1589
No evaginados vs. Evaginados en crecimiento	3.195	0.0084
Recién evaginados vs. Evaginados en crecimiento	0.9756	>0.9999

Z: estadístico de prueba de Dunn

b) Análisis estadístico no paramétrico de los datos de expresión relativa de *snail-1*

Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para determinar si existen diferencias significativas en la expresión relativa del gen *snail-1* entre los cuatro grupos experimentales de cisticercos. El valor obtenido para el estadístico H fue de 26.48 con 3 grados de libertad, lo cual implica un valor aproximado de $p < 0.0001$. Este valor permite afirmar que existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión relativa del gen *snail-1* entre al menos dos de los grupos de cisticercos (Tabla 4).

Posteriormente, se aplicó la prueba post hoc de Dunn para determinar entre qué grupos exactamente se presentaron diferencias significativas respecto a la expresión relativa de *snail-1*. Los valores de p que se muestran en la tabla 5 son valores de p ajustados por multiplicidad, mediante el método de Bonferroni, para minimizar el riesgo de falsos positivos (error tipo I) debido a las comparaciones múltiples.

Se observó que los valores de expresión relativa de *snail-1* entre los cisticercos no cultivados y los no evaginados mostraron diferencias significativas ($p < 0.0001$). Lo mismo sucedió entre los cisticercos no evaginados y los recién evaginados ($p = 0.0056$). Hubo una tercera comparación que mostró diferencias significativas entre los grupos de cisticercos no evaginados y los evaginados en crecimiento ($p = 0.0109$). Las demás comparaciones entre grupos no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 5).

Tabla 4. Rangos promedio y estadísticos calculados a partir de la prueba Kruskal-Wallis con los datos de expresión relativa del gen *snail-1* en los grupos de cisticercos no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados y evaginados en crecimiento

	Fenotipo de los cisticercos	N	Rango promedio	Estadísticos de prueba	
Expresión relativa del gen <i>snail-1</i>	No cultivados (control)	10	31.90	Número de grupos	4
	No evaginados	10	5.500	H de Kruskal-Wallis	26.48
	Recién evaginados	10	22.80	gl	3
	Evaginados en crecimiento	10	21.80	Valor aproximado de p	<0.0001
	Total de observaciones	40			

N: tamaño de la muestra, H: estadístico de prueba de Kruskal-Wallis, gl: grados de libertad

Tabla 5. Resultados de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn con los datos de expresión relativa del gen *snail-1* para determinar diferencias estadísticas entre los grupos de cisticercos no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados y evaginados en crecimiento

Comparaciones entre grupos	Z	Valor de p ajustado
No cultivados (control) vs. No evaginados	5.050	<0.0001
No cultivados (control) vs. Recién evaginados	1.741	0.4905
No cultivados (control) vs. Evaginados en crecimiento	1.932	0.3203
No evaginados vs. Recién evaginados	3.309	0.0056
No evaginados vs. Evaginados en crecimiento	3.118	0.0109
Recién evaginados vs. Evaginados en crecimiento	0.1913	>0.9999

Z: estadístico de prueba de Dunn

c) Análisis estadístico no paramétrico de los datos de expresión relativa de *h2b*

Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para determinar si existen diferencias significativas en la expresión relativa del gen *h2b* entre los cuatro grupos experimentales de cisticercos. El valor obtenido para el estadístico H fue de 22.65 con 3 grados de libertad, lo cual implica un valor aproximado de $p < 0.0001$. Este valor permite afirmar que existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión relativa del gen *h2b* entre al menos dos de los grupos de cisticercos (Tabla 6).

Posteriormente, se aplicó la prueba post hoc de Dunn para determinar entre qué grupos exactamente se presentaron diferencias significativas respecto a la expresión relativa de *h2b*. Los valores de p que se muestran en la tabla 7 son valores de p ajustados por multiplicidad, mediante el método de Bonferroni, para minimizar el riesgo de falsos positivos (error tipo I) debido a las comparaciones múltiples.

Se observó que los valores de expresión relativa de *h2b* entre los cisticercos no cultivados y los no evaginados mostraron diferencias significativas ($p < 0.0001$). Lo mismo sucedió entre los cisticercos no evaginados y los cisticercos recién evaginados ($p = 0.0096$). Hubo una tercera comparación que mostró diferencias significativas entre los grupos de cisticercos no evaginados y los evaginados en crecimiento ($p = 0.0013$). Las demás comparaciones entre grupos no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 7).

Tabla 6. Rangos promedio y estadísticos calculados a partir de la prueba Kruskal-Wallis con los datos de expresión relativa del gen *h2b* en los grupos de cisticercos no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados y evaginados en crecimiento

	Fenotipo de los cisticercos	N	Rango promedio	Estadísticos de prueba	
Expresión relativa del gen <i>h2b</i>	No cultivados (control)	10	12.20	Número de grupos	4
	No evaginados	10	35.20	H de Kruskal-Wallis	22.65
	Recién evaginados	10	18.70	gl	3
	Evaginados en crecimiento	10	15.90	Valor aproximado de p	<0.0001
	Total de observaciones	40			

N: tamaño de la muestra, H: estadístico de prueba de Kruskal-Wallis, gl: grados de libertad

Tabla 7. Resultados de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn con los datos de expresión relativa del gen *h2b* para determinar diferencias estadísticas entre los grupos de cisticercos no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados y evaginados en crecimiento

Comparaciones entre grupos	Z	Valor de p ajustado
No cultivados (control) vs. No evaginados	4.400	<0.0001
No cultivados (control) vs. Recién evaginados	1.244	>0.9999
No cultivados (control) vs. Evaginados en crecimiento	0.7079	>0.9999
No evaginados vs. Recién evaginados	3.157	0.0096
No evaginados vs. Evaginados en crecimiento	3.692	0.0013
Recién evaginados vs. Evaginados en crecimiento	0.5357	>0.9999

Z: estadístico de prueba de Dunn

4. La histona *h2b* se sobreexpresa en los quistes no evaginados y su expresión disminuye cuando ocurre la evaginación

Los resultados de abundancia de transcritos, obtenidos por RT-qPCR, se presentan como valores de expresión relativa (*fold change*, $2^{-\Delta\Delta Cq}$) en función de los resultados del grupo control (parásitos no cultivados). El *fold change* se ubica en el eje Y de las gráficas 14 a 16 y representa los valores de $2^{-\Delta\Delta Cq}$, normalizados respecto al gen de referencia *rpl13*. Los valores de *fold change* relativos al grupo control de cada una de las muestras se presentan en el Anexo 4.

Se evaluó la expresión de la histona *h2b*, como marcador de proliferación, en los quistes no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados y evaginados en crecimiento.

La expresión de *h2b* aumenta significativamente en el grupo de quistes no evaginados ($p < 0.0001$) en relación al grupo de cisticercos no cultivados (control), pero esta tendencia no se mantiene cuando se da la evaginación. La expresión disminuye de forma significativa en los cisticercos recién evaginados ($p = 0.0096$) y en los evaginados en crecimiento ($p = 0.0013$), con respecto a los no evaginados (Figura 14 y Tabla 8).

No se observan diferencias en la expresión de *h2b* entre los quistes no cultivados con aquellos recién evaginados ($p > 0.9999$) y con los evaginados en crecimiento ($p > 0.9999$). Pasa lo mismo con la expresión del gen entre los quistes recién evaginados y los evaginados en crecimiento ($p > 0.9999$) (Figura 14 y Tabla 8).

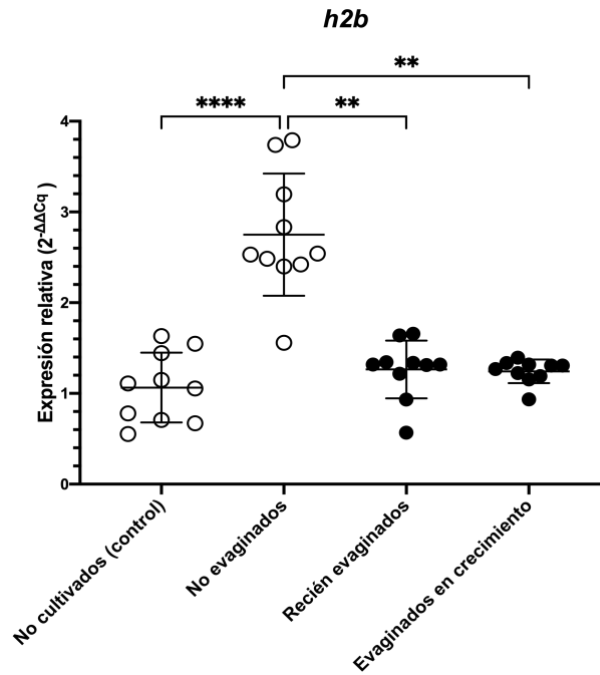


Figura 14. Expresión relativa del gen de la histona *h2b* en 4 condiciones experimentales: no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados y evaginados en crecimiento. **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$. Círculos oscuros: cisticercos evaginados. Círculos blancos: cisticercos no evaginados.

Tabla 8. Significancias estadísticas (valor de p) obtenidas al comparar la expresión relativa del gen *h2b* entre los grupos de cisticercos no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados y evaginados en crecimiento

Grupo	No cultivados (control)	No evaginados	Recién evaginados	Evaginados en crecimiento
No evaginados	<0.0001	-----	0.0096	0.0013
Recién evaginados	>0.9999	0.0096	-----	>0.9999
Evaginados en crecimiento	>0.9999	0.0013	>0.9999	-----

Se realizó un análisis estadístico empleando la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de Dunn para el ensayo de expresión de *h2b*.

5. La evaginación de la larva de *T. solium* se asocia con la subexpresión del gen *myoD*

La expresión de *myoD* en los cisticercos se evaluó en las 4 condiciones experimentales: no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados y evaginados en crecimiento.

Después de estar 6h en cultivo (grupo no evaginados), los quistes permanecían sin evaginar y la expresión de *myoD* en este punto tiende a bajar; sin embargo, no se trata de una disminución estadísticamente significativa ($p > 0.9999$) (Figura 15 y Tabla 9).

Conforme los escólices de los quistes empiezan a evaginar, al cabo de 24-48h (grupo recién evaginados) en cultivo, la expresión de *myoD* disminuye de forma significativa respecto al grupo control ($p = 0.0028$). Esta tendencia se mantiene en el grupo de evaginados en crecimiento al compararlo con el grupo control ($p < 0.0001$) y con el grupo de cisticercos no evaginados ($p = 0.0084$) (Figura 15 y Tabla 9).

No obstante, la expresión en los quistes recién evaginados no se reduce considerablemente al compararla con el grupo de quistes no evaginados ($p = 0.1589$). Lo mismo sucede con la expresión del gen entre los grupos de recién evaginados y evaginados en crecimiento ($p > 0.9999$). A pesar de que las diferencias entre estos grupos no se consideran estadísticamente significativas, se observa una tendencia de reducción en la expresión de *myoD* conforme los quistes evaginan y permanecen en cultivo (Figura 15 y Tabla 9).

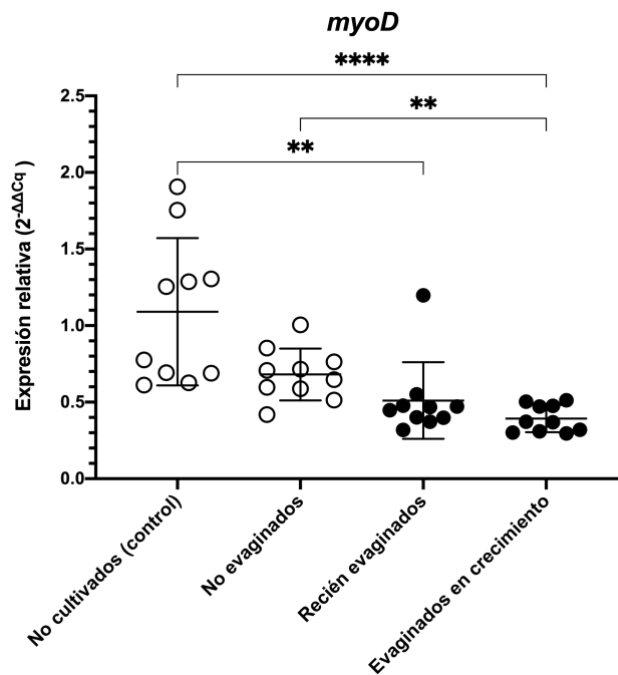


Figura 15. Expresión relativa del gen *myoD* en 4 grupos experimentales: no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados y evaginados en crecimiento. **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$. Círculos oscuros: cisticercos evaginados. Círculos blancos: cisticercos no evaginados.

Tabla 9. Significancias estadísticas (valor de p) obtenidas al comparar la expresión relativa del gen *myoD* entre los grupos de cisticercos no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados y evaginados en crecimiento

Grupo	No cultivados (Control)	No evaginados	Recién evaginados	Evaginados en crecimiento
No evaginados	>0.9999	-----	0.1589	0.0084
Recién evaginados	0.0028	0.1589	-----	>0.9999
Evaginados en crecimiento	<0.0001	0.0084	>0.9999	-----

Se realizó un análisis estadístico empleando la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de Dunn para el ensayo de expresión de *myoD*.

6. El gen del factor de transcripción Snail-1 se expresa diferencialmente en cisticercos de *T. solium* antes y después de evaginar el escólex

Se determinó la expresión de *snail-1* en quistes no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados y evaginados en crecimiento.

En relación al grupo control, la expresión de *snail-1* disminuye significativamente ($p < 0.0001$) en aquellos cisticercos que han permanecido durante 6h en cultivo, pero que no han evaginado (grupo no evaginados). Respecto a los no evaginados, la expresión de *snail-1* tiende a aumentar de forma significativa ($p = 0.0056$) después de que los cisticercos evaginan (recién evaginados). Este aumento en la expresión de *snail-1* se mantiene en los cisticercos evaginados en crecimiento ($p = 0.0109$) (Figura 16 y Tabla 10).

Sin embargo, no se observan diferencias en la expresión entre quistes recién evaginados y los evaginados en crecimiento ($p > 0.9999$), lo cual también sucede al comparar la expresión de *snail-1* entre los quistes no cultivados del grupo control con aquellos recién evaginados ($p = 0.4905$) y con los evaginados en crecimiento ($p = 0.3203$) (Figura 16 y Tabla 10).

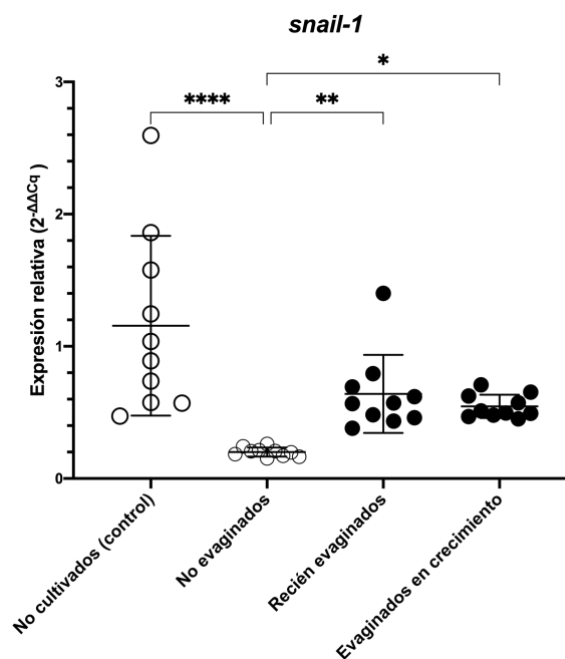


Figura 16. Expresión relativa del gen *snail-1* en 4 condiciones experimentales: no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados y evaginados en crecimiento. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$. Círculos oscuros: cisticercos evaginados. Círculos blancos: cisticercos no evaginados.

Tabla 10. Significancias estadísticas (valor de p) obtenidas al comparar la expresión relativa del gen *snail-1* entre los grupos de cisticercos no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados y evaginados en crecimiento

Grupo	No cultivados (Control)	No evaginados	Recién evaginados	Evaginados en crecimiento
No evaginados	<0.0001	-----	0.0056	0.0109
Recién evaginados	0.4905	0.0056	-----	>0.9999
Evaginados en crecimiento	0.3203	0.0109	>0.9999	-----

Se realizó un análisis estadístico empleando la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de Dunn para el ensayo de expresión de *snail-1*.

V. DISCUSIÓN

Este trabajo tuvo como finalidad determinar si existen cambios en la expresión de genes (*myoD* y *snail-1*) asociados a mecanismos claves del desarrollo durante la evaginación del escólex de *T. solium*. Como esta evaginación marca la transición del estadio larval al adulto, que implica crecimiento y por tanto requiere alta actividad proliferativa, también se evaluó la expresión del marcador de proliferación, histona *h2b*, durante este proceso. Este es el primer estudio en el que se ponen a prueba marcadores de la miogénesis y la transición epitelio-mesénquima, como procesos de desarrollo en *T. solium*. Los resultados confirman que la evaginación del escólex se asocia con proliferación, según la expresión de *h2b*. Además, existen diferencias en la expresión de los genes *myoD* y *snail-1* en larvas antes y después de evaginar el escólex.

Se estableció un diseño experimental, basado en la morfología del estadio larval de *T. solium*, para estudiar genes marcadores de procesos de desarrollo

Las investigaciones relacionadas a la biología del desarrollo de platelmintos se han realizado, sobre todo, en platelmintos de vida libre (planarias) (33,47,60–63,70,71). Respecto a platelmintos parásitos, ha sido posible establecer modelos para trabajo en el laboratorio con cestodos como *Hymenolepis* y *Mesocestoides corti*, que permiten evaluar diferentes aspectos de su desarrollo gracias a su fácil obtención, mantenimiento y manipulación (4–10,36,69). *H. microstoma* es uno de los gusanos parásitos modelo: se han descrito todos sus estadios larvales detalladamente, desde el estadio 1 (S1) al estadio 5 (S5) (4,5,9,69). Esto facilita el estudio de sus etapas de desarrollo.

En cambio, en *T. solium* no existe una definición y clasificación específica de cada uno de los estadios de la metamorfosis larval. Al no tener puntos de tiempo definidos para estudiar mecanismos de desarrollo en *T. solium*, trabajos previos del laboratorio (82,83) tomaron, como referencia, puntos de tiempo aproximados. Así fue como se establecieron 3 puntos de tiempo (horas en cultivo) en los cuales se realizaba la colecta de los individuos para su análisis, según el diseño experimental: 0h, 24h y 120h. Los individuos mostraban diferencias morfológicas en cada uno de esos tiempos y se observó que a las 120h los cisticercos tenían escólex, cuello y proglótides

inmaduras fuera de la vesícula (82,83). Si bien estos puntos de tiempo eran útiles para observaciones únicamente morfológicas, no había información para conocer si correspondían necesariamente a momentos importantes en el desarrollo a nivel molecular o celular. Por lo tanto, para esta tesis se optó por definir estos puntos en base al fenotipo del individuo, pero teniendo como eje central a la evaginación del escólex. A partir de ello, se tomaron puntos antes, durante y después de dicho proceso y se definieron los grupos experimentales de “no evaginados”, “recién evaginados” y “evaginados en crecimiento”, todo ello sin límites de tiempo muy marcados.

Esta es una aproximación muy gruesa comparada con las subdivisiones de estadios larvales que se manejan en *Hymenolepis*, según detalles anatómicos más finos: estadio 0, estadio 1.1, estadio 1.2, estadio 2.1, estadio 2.2, estadio 3.1, estadio 3.2, estadio 4.1, estadio 4.2 y estadio 5 (4,5,9,69). Sin embargo, es un primer alcance que se debe ir perfeccionando para analizar genes pioneros en el desarrollo de *T. solium*.

La mayor actividad proliferativa ocurre antes de la evaginación del escólex de *T. solium*

La histona *h2b* se ha empleado como marcador de células proliferativas en platelmintos de vida libre (planarias) y parásitos como *Schistosoma mansoni*, *Hymenolepis diminuta* y *Echinococcus multilocularis* (10,33,34,36). Por lo tanto, se optó por usar un homólogo de *h2b*, como marcador molecular conservado, para evaluar la proliferación en cisticercos de *T. solium* antes y después de evaginar el escólex.

Se observó la mayor expresión de *h2b*, y por tanto mayor actividad proliferativa, en cisticercos antes de evaginar el escólex (Figura 14). El escólex invaginado del cisticercos es una zona de crecimiento celular (84). En *Echinococcus granulosus* y *E. multilocularis*, estudios ultraestructurales demostraron la existencia de células germinativas que proliferan y se acumulan en el protoescólex en formación (36,85,86). A partir de esta zona, las acumulaciones masivas de células proliferativas se proyectan gradualmente hacia el interior de la vesícula hija del quiste hidatídico, en forma de elipse, formando así el protoescólex inicial (36,85,86) (Figura 17). Se ha descrito, a nivel morfológico, este tipo de crecimiento en la larva cisticercos de *T.*

solium. Se menciona que una proliferación sucesiva en la zona de crecimiento, ubicada en la región del escólex invaginado, permite que el rostelo y las ventosas adquieran su posición correcta. A partir de la zona de crecimiento, continúa el desarrollo del cisticerco invaginado y, en consecuencia, también la morfogénesis del futuro cestodo (84) (Figura 18). Por lo tanto, la proliferación en la base del cuello invaginado estaría continuando el crecimiento larvario, acomodando las estructuras del escólex (ventosas y rostelo) en su disposición final y forzando o “empujando” al escólex para que este finalmente pueda salir (evaginar) de la vesícula. De esta manera, el crecimiento del cisticerco estaría ocurriendo desde el polo posterior hacia el anterior (84).

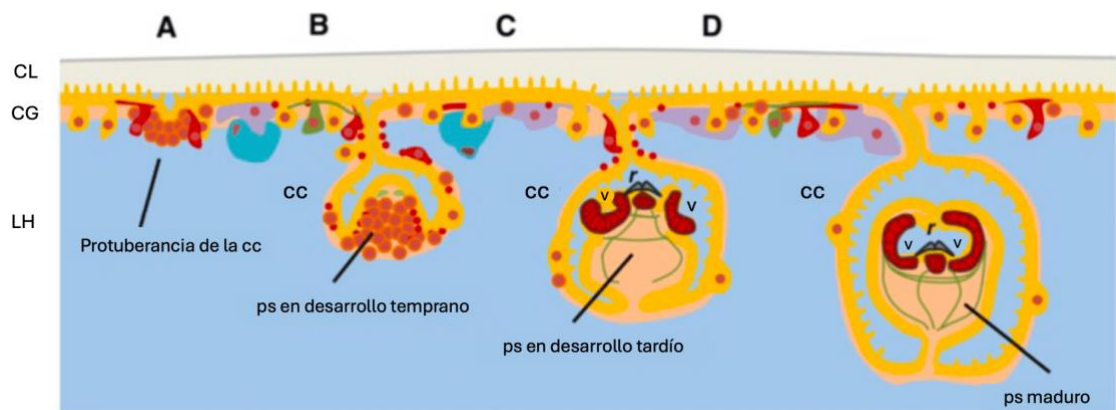


Figura 17. Esquema que representa el desarrollo de la larva metacestode de *Echinococcus multilocularis*. (A) Protuberancia temprana de la cápsula de cría. (B) Cápsula de cría con protuberancia del protoescólex. (C) Cápsula de cría con protoescólex en desarrollo tardío. (D) Cápsula de cría con protoescólex invaginado. El tegumento sincitial está de color naranja, las células germinativas en marrón, las células de almacenamiento de glucógeno/lípidos en violeta, las células del corpúsculo calcáreo en azul, las células nerviosas en verde y las células y fibras musculares en rojo. CL: capa laminada, CG: capa germinal, LH: líquido hidatídico, cc: cápsula de cría, ps: protoescólex, r: rostelo, v: ventosa. Figura modificada de Koziol *et al.* (36).

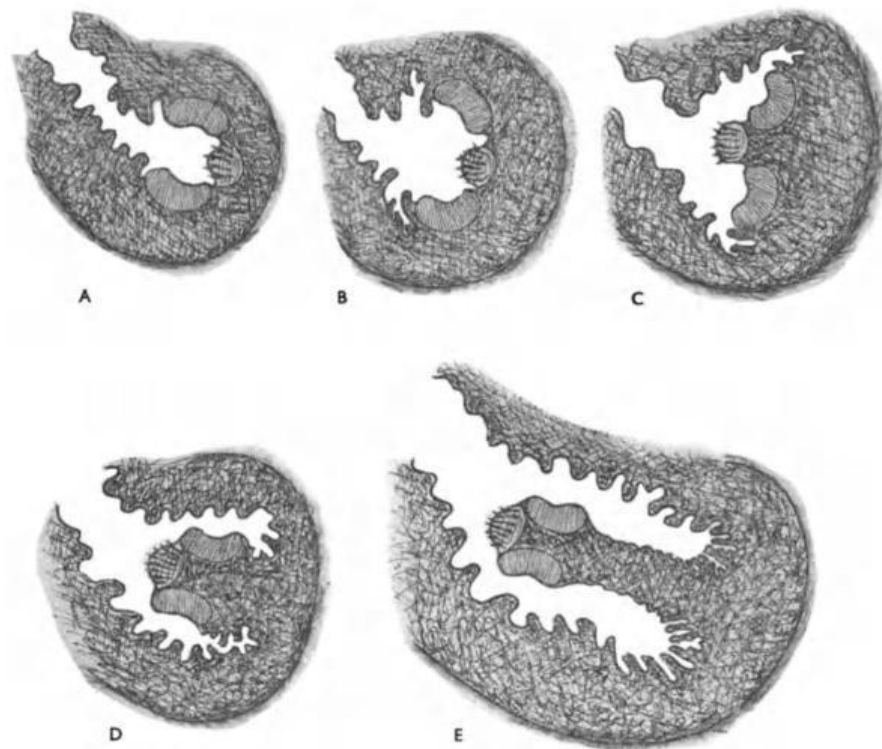


Figura 18. Esquema que representa la proliferación sucesiva de la zona de crecimiento ubicada en la región del escólex invaginado (A, B, C). Esta proliferación lleva al rostelo y a las ventosas a su posición normal (D) y dirige el crecimiento sucesivo del escólex hacia el canal invaginado (E) en cisticercos de mayor edad. Figura obtenida de Slais *et al.* (84).

En los cisticercos recién evaginados y en los evaginados en crecimiento también se detectó proliferación, ya que la zona central del cuello es el foco de la actividad proliferativa que permite generar las proglótides (6,8,10,26,36,87,88). Sin embargo, la proliferación en dichos cisticercos es menor en comparación con los no evaginados (Figura 14). Esto podría estar sucediendo porque en los cisticercos recién evaginados y en los evaginados en crecimiento se han empezado a desarrollar estructuras posteriores del gusano, como la zona debajo del cuello que vendría a ser el estróbilo temprano o en formación. En *M. corti* se ha determinado que el número de células proliferativas es más abundante en las regiones anteriores (escólex y cuello) y disminuye en las zonas posteriores del parásito, específicamente, en la región inmediatamente después del cuello (6). Esto podría explicar la reducción en la expresión de *h2b* en cisticercos evaginados, porque ya han empezado a desarrollar estructuras posteriores al escólex y cuello que requieren mayor migración y

diferenciación celular, por encima de proliferación. Por ello, es posible que luego de que las células proliferen en el cuello, algunas migren hacia la región que se encuentra inmediatamente después del mismo, es decir, hacia la proglótide en formación más joven e inmadura. Es ahí donde estas células finalmente se diferenciarían y disminuirían su expresión de *h2b*. Este proceso de migración se ha observado en el estadio larval (tetratiridio) y adulto de *Mesocostoides corti* (6). Se determinó que las células proliferativas se originan en el parénquima medular, pero, en aproximadamente 24 horas, migran y se pueden encontrar en el parénquima cortical y tejido subtegumentario, donde se diferencian (6).

En el marco del presente trabajo, se pudo corroborar la presencia de células proliferativas en el parénquima medular de *T. solium*, gracias a pruebas preliminares de WMISH realizadas durante un entrenamiento en el Laboratorio de Biología Celular de Cestodos del Dr. Uriel Koziol (Universidad de la República, Montevideo, Uruguay). En dicho laboratorio se utiliza como cestodo modelo a *Hymenolepis microstoma*. No obstante, gracias al vasto conocimiento que el grupo de investigación tiene en la técnica de hibridación *in situ*, se pudo trabajar también con muestras de *T. solium*. Al realizar el entrenamiento se usaron cisticercos evaginados que estuvieron un mayor tiempo en cultivo, es decir, más de los 5 días (120h) establecidos en el diseño experimental de la presente tesis. Dado que los cisticercos usados para hacer WMISH no tenían las mismas características que los empleados para los ensayos de qPCR, no se consideraron los resultados obtenidos como parte principal de este trabajo.

Sin embargo, es importante resaltar que los resultados de la hibridación *in situ* en *T. solium*, utilizando la histona *h2b* como marcador de proliferación (Anexo 5), son bastante informativos y similares a lo observado en *Hymenolepis diminuta* (10). La histona *h2b* tiene una mayor expresión en la zona del parénquima medular del cuello e incluso en la base del escólex del cisticercos evaginado de *T. solium*. Dicha expresión va disminuyendo conforme se desciende a lo largo del parénquima medular del estróbilo. También se observa bastante ruido de fondo en la parte superior del escólex, lo cual no asegura que la señal en esa región sea del todo verdadera. Además, *h2b* no se expresa en los bordes del gusano, donde se encuentran el músculo y el tegumento.

Este patrón de distribución de las células proliferativas es conservado en cestodos adultos, como *Hymenolepis*, *Echinococcus* y *Mesocestoides corti* y también se ha descrito durante las primeras etapas de la segmentación (6,10,11,26,36). En platelmintos parásitos, las células proliferativas se encuentran principal o exclusivamente en el parénquima interno (medular) del gusano adulto, sobre todo en el parénquima del cuello (10,11,26,36). En la zona del parénquima externo (cortical), es decir, en los bordes del animal, la proliferación está ausente o se restringe a las regiones más internas (6,26). De esta manera, se puede inferir que el patrón de expresión de *h2b* y, por ende, la localización de las células proliferativas, también son características que se conservan en gusanos adultos de *T. solium*.

Cabe mencionar que se presentaron dificultades técnicas al momento de trabajar con cisticercos evaginados y no evaginados de *T. solium*, durante el entrenamiento en la Universidad de la República (Uruguay). Dado que el tegumento es significativamente más grueso que el de *H. microstoma*, hubo problemas de penetración de la sonda y montaje de las muestras. En especial, el montaje de los cisticercos no evaginados fue bastante complicado, pues las estructuras aún están envueltas y apretadas. Por ello, es que las larvas no evaginadas de *T. solium* presentan un volumen considerable. No son muestras “planas” como los gusanos adultos de *H. microstoma*. En base a esto, se propone optimizar el protocolo de WMISH para *T. solium*, extendiendo tiempos de incubación y optando por criocortes al momento de hacer los montajes con cisticercos no evaginados y con aquellos evaginados parcialmente.

La miogénesis predomina en el desarrollo temprano de la larva metacestode de *T. solium*, antes de la evaginación del escólex

El análisis transcriptómico realizado por Olson *et al.* (8) en *H. microstoma* determinó que *myoD* fue uno de los genes sobreexpresados en el gusano adulto, específicamente en las zonas del escólex y cuello. Por el contrario, en el presente trabajo se observa una disminución progresiva en la expresión de *myoD* conforme los quistes evaginan (grupo recién evaginados) y se mantienen en cultivo por 120h (grupo evaginados en crecimiento) (Figura 15). Esta diferencia de resultados podría deberse a que Olson *et al.* (8) utilizaron secciones del gusano para realizar el análisis transcriptómico. A partir de ello, se vio que *myoD* se sobreexpresó en la sección del “escólex-cuello”

(escólex unido al cuello), a comparación de la sección “media” (segmentos con proglótides maduras) y “final” (segmentos subterminales, grávidos) de *H. microstoma* adulto (8). En cambio, en el presente estudio se empleó como unidad de análisis al cisticerco entero sin vesícula (evaginado y no evaginado) de *T. solium*. No se han realizado secciones anatómicas de la muestra, por ende, es probable que una expresión eventualmente elevada de *myoD* en el escólex y cuello de los gusanos evaginados se haya visto disminuida por la presencia de algunas proglótides en formación, posiblemente de baja expresión de *myoD*. En estudios futuros sería recomendable seccionar cada cisticerco evaginado de *T. solium* en escólex, cuello y proglótides inmaduras. Esta aproximación resultaría más informativa al identificar la expresión de marcadores en regiones específicas del parásito.

Por otra parte, puede que la expresión de *myoD* sea mayor en los cisticercos no evaginados que en los recién evaginados y evaginados en crecimiento (Figura 15), porque las etapas iniciales de la miogénesis están determinadas por una expresión muy temprana de genes reguladores específicos, dentro de los cuales está *myoD* (89). En *C. elegans*, la expresión de estos genes, que regulan la determinación y diferenciación del músculo, comienza en las primeras etapas de la embriogénesis (89). La expresión del gen *hlf-1* de *C. elegans* (homólogo a *myoD* de vertebrados) y la presencia de su producto proteico, CeMyoD, se identifican específicamente en los blastómeros individuales (89). Estas estructuras posteriormente dan lugar al sistema muscular del nemátodo (89). De esta forma, la determinación de células del linaje miogénico en *C. elegans* se lleva a cabo en las primeras etapas del desarrollo (89). Por ende, es probable que *myoD* se esté expresando, sobre todo, en los estadios más tempranos del desarrollo de *T. solium*. En este trabajo, este estadio vendría a ser el cisticerco no evaginado.

Esta expresión temprana de *myoD* también coincide con lo que se ha descrito en vertebrados. Cada factor de transcripción, dentro de la familia de MRFs, se expresa y regula una cierta etapa de la miogénesis (89). En particular, MyoD suele observarse en los mioblastos en proliferación, pues se encarga de la determinación inicial de las células precursoras hacia el programa miogénico (89). Por otro lado, factores como miogenina y MRF4 se observan en células musculares postmitóticas, ya que estos

factores participan principalmente en la diferenciación terminal del tejido muscular (89). En el caso de *T. solium*, al igual que en otros invertebrados, parece que se ha conservado solo MyoD como factor de transcripción, dentro de la familia de MRFs (45,90). Por ello, luego de la expresión temprana de *myoD* en cisticercos no evaginados, empezarían a activarse directamente genes específicos del músculo, como aquellos genes estructurales que codifican proteínas contráctiles: miosina y actina (39,89).

Aparte de cuantificar la expresión de *myoD* en tiempo real, también es relevante analizar la expresión del gen a nivel espacial en los tejidos del parásito. Olson *et al.* (8) y Montagne *et al.* (69) realizaron hibridación *in situ* (WMISH) de *myoD* en las larvas cisticercoides de *H. microstoma*, mas no en el gusano adulto (Figuras 3 y 4). Se observó que la expresión de *myoD* fluctúa a través de las diferentes regiones de los estadios larvales (S1 a S5) de *H. microstoma*, pero mayormente se expresa en las zonas donde se desarrollarán estructuras con alta función muscular (ventosas, rostelo y cola del cisticercoide) (8,69). Este patrón de expresión implica que la metamorfosis larval es un proceso altamente dinámico y corrobora que la especificación del destino celular y la diferenciación probablemente comienzan desde las primeras etapas. Por lo tanto, se propone evaluar también la expresión de *myoD*, mediante WMISH, en el estadio más temprano del parásito que se puede mantener *in vitro*: el cisticerco no evaginado. Esto permitirá observar con mayor claridad la distribución de factores de transcripción, como MyoD, que regulan etapas iniciales de la miogénesis. No obstante, a partir del entrenamiento realizado en el Laboratorio de Biología Celular de Cestodos (Uruguay), debe tomarse en cuenta que en el cisticerco que aún no ha evaginado el escólex, las estructuras están muy enrolladas y compactas. Esto dificulta la interpretación de las imágenes obtenidas por medio de la hibridación *in situ*, pues no se pueden reconocer las estructuras del parásito con facilidad.

La transición epitelio-mesénquima puede ser un proceso incompatible con un estado altamente proliferativo en *T. solium*, por lo que la expresión de *snail-1* aumenta después de la evaginación del escólex

La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso en el que las células epiteliales pierden su polaridad apical y adquieren un fenotipo mesenquimal, aumentando así las propiedades migratorias de las células, la invasividad y la resistencia apoptótica (56). Snail-1 es un represor transcripcional de la E-cadherina, por lo que disminuye la adherencia entre células y aumenta su capacidad migratoria (56). Como inductor de la TEM (56), se ha observado que es indispensable para que se lleve a cabo la migración celular en planarias y para establecer la propia morfología de las células migratorias (71).

Al evaluar la expresión de *snail-1* en *T. solium*, se vio que esta tiene su menor expresión en cisticercos no evaginados, con respecto al control y los otros estadios. En cambio, cuando se da la evaginación (cisticercos recién evaginados), la expresión de *snail-1* aumenta y se mantiene en los cisticercos evaginados en crecimiento (Figura 16). Dichos resultados podrían estar indicando una baja migración celular, vista a través de la subexpresión de *snail-1*, durante las etapas más tempranas del desarrollo de *T. solium*, es decir, antes de la evaginación. Esto podría deberse a que en los estadios iniciales estaría predominando la proliferación celular, lo cual es sustentado por la sobreexpresión de *h2b* en los cisticercos no evaginados. La presencia de abundantes células proliferativas, antes de la evaginación, permite el crecimiento del cuello y el acomodo de las estructuras del escólex invaginado (84). Posteriormente, al darse la evaginación, aumentaría la migración celular, representada por una mayor expresión de *snail-1*. Esto implicaría que las células que estaban proliferando en el cisticerco no evaginado, específicamente las células del cuello, empezarían a migrar hacia las nuevas estructuras en formación (específicamente, hacia la proglótide más proximal al escólex, primera en una serie de proglótides jóvenes e inmaduras) para luego diferenciarse en el gusano recién evaginado y en el evaginado en crecimiento.

T. solium es un platelminto pseudosegmentado. La pseudosegmentación es un tipo de organización corporal en la que el organismo, externamente, aparenta ser segmentado (91). Sin embargo, internamente no existen divisiones verdaderas, como los septos,

que separen las proglótides (91,92). Los septos son finas paredes de tejido conectivo que actúan como divisiones internas entre las unidades repetitivas del cuerpo de organismos verdaderamente segmentados, como los anélidos (92). Al carecer de septos, todas las proglótides de *T. solium* están interconectadas por el parénquima, lo que implica que no son completamente autónomas ni independientes (91,93). En consecuencia, si bien cada proglótide tiene su propio sistema reproductivo, sigue dependiendo del resto del estróbilo para procesos vitales como la distribución de nutrientes y la eliminación de desechos (91,92). La pseudosegmentación, por lo tanto, afecta la independencia total de las proglótides, haciendo que su unicidad sea principalmente a nivel reproductivo y no estructural.

En este sentido, la pseudosegmentación podría facilitar, en cierta medida, la migración de células mesenquimales desde el cuello hacia la proglótide en formación que está más próxima al escólex. Esto podría deberse a la continuidad del tejido parenquimatoso y a la ausencia de verdaderas barreras (septos) a lo largo del cuerpo del parásito (91).

Asimismo, la transición de tejido epitelial a mesenquimal implica una profunda reorganización del citoesqueleto que puede ser incompatible con un estado altamente proliferativo (94). Por lo tanto, cuando las células están proliferando, es probable que su capacidad para llevar a cabo la TEM disminuya. Esto podría explicar la subexpresión de *snail-1* en los cisticercos no evaginados, los mismos que mostraron una mayor proliferación celular. Esta oposición entre ambos procesos podría deberse a los factores de transcripción y mecanismos que promueven la TEM, los cuales pueden estar inhibiendo la proliferación. Esto ha podido corroborarse en mamíferos y nemátodos, teniendo a Snail-1 como inhibidor de la proliferación celular (55,94).

En un estudio realizado en mamíferos por Vega *et al.* (94) se observó que células epiteliales de ratón, transfectadas con *snail-1*, presentaron una menor tasa de proliferación celular. Lo mismo se confirmó en regiones de un embrión de ratón que expresaban *snail-1* de manera endógena (94). De esta manera, se determinó que la expresión de este gen inhibe la proliferación celular gracias a que Snail-1 reprime la transcripción del gen de la ciclina D2, esencial para la transición de la fase G1 a la S

(94). Así es cómo el gen *snail-1* altera la progresión del ciclo celular tanto en células cultivadas como en embriones en desarrollo (94).

En *C. elegans* también se ha visto que el gen *ces-1*, que codifica una proteína de la familia Snail, puede regular la progresión del ciclo celular en neuroblastos (55). Específicamente, CES-1 inhibe la transcripción de *cdc-25.2*. Este gen codifica una fosfatasa homóloga a CDC25, necesaria para activar la quinasa dependiente de ciclina (CDK) que permite la transición de la célula de la fase G2 hacia la mitosis (55). Yan *et al.* (55) determinaron que CES-1 se une a una región *upstream* del gen *cdc-25.2*, reprimiendo directamente su transcripción y, por ende, bloqueando el ciclo celular (55).

Se puede inferir, entonces, que en los cisticercos no evaginados de *T. solium* se están dando las condiciones propicias para favorecer una alta proliferación celular por sobre los demás mecanismos de desarrollo evaluados (miogénesis y transición epitelio-mesénquima). Como parte de estas condiciones que favorecen la proliferación, está la subexpresión de *snail-1* que disminuye la TEM en este grupo. En base a los estudios mencionados en mamíferos y nematodos, Snail-1 también puede actuar como inhibidor de la proliferación. Por lo tanto, es posible que la subexpresión de *snail-1* en cisticercos no evaginados esté evitando una posible inhibición de la proliferación celular en este estadio de *T. solium*. Al ser el estadio más temprano que puede mantenerse *in vitro*, estaría necesitando más del crecimiento y división celular para seguir desarrollando el cuello, acomodando las estructuras del escólex (ventosas y rostelo) y, eventualmente, evaginar.

Por otro lado, en *H. microstoma* (8) se realizó hibridación *in situ* para observar la expresión de *snail-1* en gusanos adultos (Figura 5). Este factor de transcripción se expresa en la parte del parénquima a lo largo del cuerpo del parásito adulto, mas no en las zonas de los bordes del gusano (8). La zona central del cuello es la que presenta mayor expresión de este gen y conforme se desciende hacia la región inferior del estróbilo, donde están los primordios genitales, la expresión disminuye (8). Por lo tanto, se trata de un patrón de expresión, a manera de gradiente, a través del cuerpo de *H. microstoma* (8). Olson *et al.* (8) recalcan también que no se observa expresión

del gen en la zona cortical o más externa del gusano adulto, porque es probable que en esta región las células migratorias hayan pasado ya a un estado de diferenciación. Al ser *H. microstoma* un cestodo, como *T. solium*, se puede esperar que la expresión de *snail-1* sea similar en ambas especies. En consecuencia, para observar la distribución espacial de este factor de transcripción en *T. solium* y así analizar mejor su función a nivel celular, se sugiere hacer también tinciones, mediante WMISH, de *snail-1* y otros marcadores epiteliales y mesenquimales que puedan estar presentes en el parásito. De esta forma, se tendría la figura más completa de la TEM durante el desarrollo del mismo. No obstante, se deben tomar en cuenta las dificultades identificadas, previamente, al momento de realizar WMISH con cisticercos de *T. solium* y así tomar las aproximaciones más adecuadas para solucionarlas.

VI. CONCLUSIONES

1. Se identificaron *in silico* secuencias homólogas de los factores de transcripción MyoD y Snail-1 y del marcador de proliferación histona H2B en el genoma de *T. solium*. Para corroborar la ortología de los genes, se realizó un análisis bioinformático de dominios conservados para cada secuencia.
2. La expresión de *myoD* es mayor en cisticercos no evaginados en comparación con los recién evaginados y los evaginados en crecimiento.
3. El gen *snail-1* se subexpresa en los cisticercos no evaginados, pero su expresión aumenta en cisticercos recién evaginados y evaginados en crecimiento.
4. La mayor expresión del gen *h2b* se observó en cisticercos no evaginados que en cisticercos recién evaginados y evaginados en crecimiento, lo que se relaciona con mayor actividad proliferativa antes de la evaginación.
5. Al ocurrir la evaginación (en cisticercos recién evaginados y en los evaginados en crecimiento), la expresión de *myoD* y *h2b* disminuye.
6. Entre los cisticercos de los grupos recién evaginados y evaginados en crecimiento, la expresión de *myoD*, *snail-1* y *h2b* se mantiene similar.

VII. LIMITACIONES DEL TRABAJO Y RECOMENDACIONES

Entre las limitaciones del trabajo están aquellas relacionadas a aspectos logísticos de la obtención, transporte y procesamiento de las muestras. Los cisticercos se obtienen por el grupo colaborador de veterinarios en el Centro de Salud Global de Tumbes, a partir de un solo cerdo naturalmente infectado que se adquiere de criadores informales de esa región. Por ello, el estudio estuvo sujeto a la disponibilidad de cerdos infectados y a la pericia del grupo colaborador de Tumbes. Aunque el transporte de las muestras se realizó por vía aérea hacia Lima, aún existe un rango de tiempo de hasta 20 horas, desde que los cisticercos son extraídos del cerdo hasta que llegan al laboratorio, en el que parte de su desarrollo no estuvo bajo condiciones controladas. Además, al recibir los cisticercos en el laboratorio, estos se deben cultivar inmediatamente y de forma simultánea. Las muestras no pueden almacenarse para un procesamiento posterior, ya que no se sabe cómo detener su desarrollo una vez que se encuentran fuera de la carne del cerdo vivo. Todos estos factores dificultan la reproducibilidad de experimentos. En la presente tesis se trabajó únicamente con cisticercos provenientes de un mismo cerdo y no se repitió el experimento. Por ende, no se ha hecho una comparación entre cisticercos obtenidos de diferentes cerdos, la cual habría permitido verificar los resultados, detectar errores y variabilidad y reforzar la fiabilidad de los datos en general.

Otra limitación importante es la ausencia de una definición y clasificación precisa para cada etapa de la metamorfosis larval de *T. solium*, por lo que no se tienen puntos de tiempo concretos para estudiar mecanismos de desarrollo en el parásito. Por el contrario, en *Hymenolepis* se han establecido 5 estadios larvales (S1-S5) con características anatómicas particulares (4,5,9,69). Esta clasificación permite abarcar las principales fases del desarrollo desde oncósfera hacia larva cisticercoide de *Hymenolepis* (4,5,9,69).

A nivel técnico, no se seccionó al parásito evaginado en porciones anatómicas independientes, por ejemplo, en escólex, cuello y proglótides inmaduras, como sí lo han hecho en estudios de cestodos del género *Hymenolepis* (8,11). El haber trabajado con el organismo completo no permite evaluar la expresión de factores

reguladores en estructuras particulares de *T. solium*, considerando que el cisticerco contiene una larva compleja ya formada. Por ello, en este estudio no se ha determinado qué mecanismos moleculares se llevan a cabo en cada región específica del parásito.

Cabe mencionar también que el cisticerco no evaginado presenta sus propias limitaciones. Dado que el escólex y cuello están superenrollados dentro de la vesícula del cisticerco, no es viable seccionar este estadio del parásito. Además, el propio tegumento de *T. solium* en larvas con el escólex evaginado y, sobre todo, en las que aún no evaginan el escólex, es bastante grueso y complica el desarrollo de técnicas como la hibridación *in situ*. Por tal razón, se puede optar por criocortes antes de hacer el montaje en láminas; sin embargo, la identificación de las estructuras del parásito también resulta compleja.

Además, para estudiar el desarrollo del cisticerco hacia gusano adulto, se recomienda incluir la etapa más temprana, es decir, antes de la evaginación del escólex, pues es la que proporcionará mayor información sobre eventos vinculados con la alta actividad proliferativa que precede a la evaginación.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García HH, Gonzalez AE, Evans CAW, Gilman RH. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet*. 2003 Aug 16;362(9383):547–56.
2. García HH, Gonzalez AE, Rodríguez S, Gonzalvez G, Llanos-Zavalaga F, Tsang VC, *et al.* Epidemiología y control de la cisticercosis en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2010 Dec;27(4):592–7.
3. García HH, Rodríguez S, Friedland J, The Cysticercosis Working Group in Peru. Immunology of *Taenia solium* taeniasis and human cysticercosis. *Parasite Immunol*. 2014;36(8):388–96.
4. Voge M. Development of *Hymenolepis microstoma* (Cestoda: Cyclophyllidea) in the Intermediate Host *Tribolium confusum*. *J Parasitol*. 1964;50(1):77–80.
5. Goodchild CG, Stullken RE. *Hymenolepis microstoma*: Cysticercoid Morphogenesis. *Trans Am Microsc Soc*. 1970;89(2):224–9.
6. Koziol U, Domínguez MF, Marín M, Kun A, Castillo E. Stem cell proliferation during in vitro development of the model cestode *Mesocestoides corti* from larva to adult worm. *Front Zool*. 2010 Jul 13;7(1):22.
7. Cunningham LJ, Olson PD. Description of *Hymenolepis microstoma* (Nottingham strain): a classical tapeworm model for research in the genomic era. *Parasit Vectors*. 2010 Dec 31;3(1):123.
8. 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 Nov 9;9(1):21.
9. Jarero F. Wnt, Hedgehog and Notch signalling in relation to tapeworm anteroposterior polarity and segmentation. University College London; 2018.
10. Rozario T, Quinn EB, Wang J, Davis RE, Newmark PA. Region-specific regulation of stem cell-driven regeneration in tapeworms. *eLife*. 2019 Sep 24;8:1–23.
11. Jarero F, Baillie A, Riddiford N, Montagne J, Koziol U, Olson PD. Muscular remodeling and anteroposterior patterning during tapeworm segmentation. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*. 2024 Apr 30;1–26.
12. Chile N, Clark T, Arana Y, Ortega YR, Palma S, Mejia A, *et al.* In Vitro Study of *Taenia solium* Postoncospherical Form. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Feb 10;10(2):e0004396.
13. Arora N, Tripathi S, Kumar P, Mondal P, Mishra A, Prasad A. Recent advancements and new perspectives in animal models for Neurocysticercosis immunopathogenesis. *Parasite Immunol*. 2017 Jul;39(7).
14. Palma S, Chile N, Carmen-Orozco RP, Trompeter G, Fishbeck K, Cooper V, *et al.* In vitro model of postoncosphere development, and in vivo infection abilities of *Taenia solium* and *Taenia saginata*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 Mar 14;13(3):e0007261.
15. Rabiela MaT, Hornelas Y, García-Allan C, Rodríguez-del-Rosal E, Flisser A. Evagination of *Taenia solium* Cysticerci A Histologic and Electron Microscopy Study. *Arch Med Res*. 2000;31(6):605–7.
16. Willms K. Morphology and biochemistry of the pork tapeworm, *Taenia solium*. *Curr Top Med Chem*. 2008;8(5):375–82.

17. Baguñà J, Riutort M. Molecular phylogeny of the Platyhelminthes. *Can J Zool.* 2004 Feb;82(2):168–93.
18. Egger B, Lapraz F, Tomiczek B, Müller S, Dessimoz C, Girstmair J, *et al.* A Transcriptomic-Phylogenomic Analysis of the Evolutionary Relationships of Flatworms. *Curr Biol.* 2015 May 18;25(10):1347–53.
19. Laumer CE, Hejnol A, Giribet G. Nuclear genomic signals of the ‘microturbellarian’ roots of platyhelminth evolutionary innovation. Sánchez Alvarado A, editor. *eLife.* 2015 Mar 12;4:e05503.
20. Larkins A, Bruce M, Di Bari C, Devleeschauwer B, Pigott DM, Ash A. A scoping review of burden of disease studies estimating disability-adjusted life years due to *Taenia solium*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2022 Jul 6;16(7):e0010567.
21. Havelaar AH, Kirk MD, Torgerson PR, Gibb HJ, Hald T, Lake RJ, *et al.* World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLOS Med.* 2015 dic;12(12):e1001923.
22. 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.
23. Dupont F, Trevisan C, Moriku Kaducu J, Ovuga E, Schmidt V, Winkler AS, *et al.* Human health and economic impact of neurocysticercosis in Uganda. *Trop Med Int Health.* 2022;27(1):99–109.
24. Praet N, Speybroeck N, Manzanedo R, Berkvens D, Nforinwe DN, Zoli A, *et al.* The disease burden of *Taenia solium* cysticercosis in Cameroon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(3).
25. 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.
26. Koziol U. Evolutionary developmental biology (evo-devo) of cestodes. *Exp Parasitol.* 2017 Sep 1;180:84–100.
27. Cañedo L, Lacleste JP, Morales E. Evagination of the metacestode of *Taenia solium*. In *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives.*. Acad Press N Y. 1982;363.
28. Cervantes-Vazquez M, Correa D, Merchant M, Hicks JJ, Lacleste JP. Respiratory Changes Associated with the In vitro Evagination of *Taenia solium* Cysticerci. *J Parasitol.* 1990 Feb;76(1):108.
29. Mahanty S, Paredes A, Marzal M, Gonzalez A, Rodriguez S, Dorny P, *et al.* Sensitive In Vitro System To Assess Morphological and Biochemical Effects of Praziquantel and Albendazole on *Taenia solium* Cysts. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Dec 20;55:211–7.
30. Khanna D, Yadav P. *Biology Of Helminthes.* Vol. 1. Nueva Delhi: Discovery Publishing House; 2004. 168–173 p.
31. 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.
32. 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.
 33. Solana J, Kao D, Mihaylova Y, Jaber-Hijazi F, Malla S, Wilson R, *et al.* Defining the molecular profile of planarian pluripotent stem cells using a combinatorial RNA-seq, RNA interference and irradiation approach. *Genome Biol.* 2012 Mar 22;13(3):R19.
 34. Collins III JJ, Wang B, Lambrus BG, Tharp ME, Iyer H, Newmark PA. Adult somatic stem cells in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nature.* 2013 Feb;494(7438):476–9.
 35. Koziol U, Brehm K. Recent advances in *Echinococcus* genomics and stem cell research. *Vet Parasitol.* 2015 Oct 30;213(3):92–102.
 36. Koziol U, Rauschendorfer T, Zanon Rodríguez L, Krohne G, Brehm K. The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*. *EvoDevo.* 2014 Mar 6;5(1):10.
 37. Orrego-Solano MÁ, Cangalaya C, Nash TE, Guerra-Giraldez C, Grupo de Trabajo en Cisticercosis en Perú. Identification of proliferating cells in *Taenia solium* cysts. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2014;31(4):702–6.
 38. Jaeger S, Barends S, Giegé R, Eriani G, Martin F. Expression of metazoan replication-dependent histone genes. *Biochimie.* 2005 Oct;87(9–10):827–34.
 39. Tapscott SJ. The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription. *Dev Camb Engl.* 2005 Jun;132(12):2685–95.
 40. Andrikou C, Arnone MI. Too many ways to make a muscle: Evolution of GRNs governing myogenesis. *Zool Anz - J Comp Zool.* 2015 May 1;256:2–13.
 41. Moreno-Risueno MA, Benfey PN. Time-based patterning in development: The role of oscillating gene expression. *Transcription.* 2011;2(3):124–9.
 42. Buckingham M, Rigby PWJ. Gene Regulatory Networks and Transcriptional Mechanisms that Control Myogenesis. *Dev Cell.* 2014 Feb 10;28(3):225–38.
 43. 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.
 44. 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.
 45. Abmayr SM, Keller CA. *Drosophila* myogenesis and insights into the role of nautilus. *Curr Top Dev Biol.* 1998;38:35–80.
 46. 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 Pol.* 2014 Aug 1;69(9):1210–21.
 47. Cebrià F. Planarian Body-Wall Muscle: Regeneration and Function beyond a Simple Skeletal Support. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:8.

48. Ahlstrom J. Molecular Organization of Cells. In: Handbook of Stem Cells Pluripotent Stem Cells and Cell Biology. 2nd ed. London: Academic Press; 2013. p. 37–45.
49. Imodoye SO, Adedokun KA, Muhammed AO, Bello IO, Muhibi MA, Oduola T, *et al.* Understanding the Complex Milieu of Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Metastasis: New Insight Into the Roles of Transcription Factors. *Front Oncol.* 2021;11(762817):1–19.
50. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009 Jun 1;119(6):1420–8.
51. Lu W, Kang Y. Epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression and metastasis. *Dev Cell.* 2019 May 6;49(3):361–74.
52. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E, Kluding H. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*: I. Zygotic loci on the second chromosome. *Wilhelm Roux Arch Dev Biol.* 1984 Sep;193(5):267–82.
53. Grau Y, Carteret C, Simpson P. Mutations and Chromosomal Rearrangements Affecting the Expression of Snail, a Gene Involved in Embryonic Patterning in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 1984 Oct;108(2):347–60.
54. Leptin M. twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev.* 1991 Sep;5(9):1568–76.
55. Yan B, Memar N, Gallinger J, Conradt B. Coordination of Cell Proliferation and Cell Fate Determination by CES-1 Snail. *PLOS Genet.* 2013 Oct 31;9(10):e1003884.
56. Kaufhold S, Bonavida B. Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014 Aug 2;33(1):62.
57. Baulida J, Díaz VM, García de Herreros A. Snail1: A Transcriptional Factor Controlled at Multiple Levels. *J Clin Med.* 2019 May 28;8(6):757.
58. Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Mar;3(3):155–66.
59. Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, Tan TK, Lee SR, *et al.* E-Cadherin/ β -Catenin Complex and the Epithelial Barrier. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:567305.
60. Guo T, Peters AHFM, Newmark PA. A Bruno-like gene is required for stem cell maintenance in planarians. *Dev Cell.* 2006 Aug;11(2):159–69.
61. 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.
62. 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.
63. Scimone ML, Cote LE, Reddien PW. Orthogonal muscle fibres have different instructive roles in planarian regeneration. *Nature.* 2017;551(7682):623–8.
64. Halton DW, Maule AG. Flatworm nerve-muscle: Structural and functional analysis. *Can J Zool.* 2004 Feb;82(2):316–33.
65. Korneva ZV. Characterization of Cestoda tissue organization. *Biol Bull.* 2013 Apr;40(2):146–57.
66. Rozario T, Newmark PA. A confocal microscopy-based atlas of tissue architecture in

- the tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Exp Parasitol*. 2015 Nov;158:31–41.
67. Ambrosio JR, Reynoso-Ducoing O, Hernández-Sánchez 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.
 68. 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.
 69. Montagne J, Preza M, Koziol U. Stem cell proliferation and differentiation during larval metamorphosis of the model tapeworm *Hymenolepis microstoma*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023 Oct 16;13.
 70. Scimone ML, Kravarik KM, Lapan SW, Reddien PW. Neoblast Specialization in Regeneration of the Planarian *Schmidtea mediterranea*. *Stem Cell Rep*. 2014 Jul 4;3(2):339–52.
 71. Abnave P, Aboukhatwa E, Kosaka N, Thompson J, Hill MA, Aboobaker AA. Epithelial-mesenchymal transition transcription factors control pluripotent adult stem cell migration in vivo in planarians. *Development*. 2017 Oct 1;144(19):3440–53.
 72. Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garcarrubio 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.
 73. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 2001 Dec 1;25(4):402–8.
 74. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, *et al*. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem*. 2009 Apr 1;55(4):611–22.
 75. Espínola SM, Ferreira HB, Zaha A. Validation of Suitable Reference Genes for Expression Normalization in *Echinococcus* spp. Larval Stages. *PLoS ONE*. 2014 Jul 11;9(7):e102228.
 76. Minárik P, Tomášková N, Kollárová M, Antalík M. Malate Dehydrogenases – Structure and Function. *Gen Physiol Biophys*. 2002;21:257–65.
 77. Liu H, Wang X, Shen P, Ni Y, Han X. The basic functions of phosphoglycerate kinase 1 and its roles in cancer and other diseases. *Eur J Pharmacol*. 2022 Apr 5;920:174835.
 78. Silveira GO, Amaral MS, Coelho HS, Maciel LF, Pereira ASA, Olberg GGO, *et al*. Assessment of reference genes at six different developmental stages of *Schistosoma mansoni* for quantitative RT-PCR. *Sci Rep*. 2021 Aug 19;11(1):16816.
 79. Dvořák J, Mashiyama ST, Sajid M, Braschi S, Delcroix M, Schneider EL, *et al*. SmCL3, a Gastrodermal Cysteine Protease of the Human Blood Fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009 Jun 2;3(6):e449.
 80. Horn M, Fajtová P, Arreola LR, Ulrychová L, Bartošová-Sojtková P, Franta Z, *et al*. Trypsin- and Chymotrypsin-Like Serine Proteases in *Schistosoma mansoni* – ‘The Undiscovered Country.’ *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Mar 27;8(3):e2766.
 81. Fajtová P, Štefanić S, Hradilek M, Dvořák J, Vondrášek J, Jílková A, *et al*. Prolyl

- Oligopeptidase from the Blood Fluke *Schistosoma mansoni*: From Functional Analysis to Anti-schistosomal Inhibitors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Jun 3;9(6):e0003827.
82. Blume La Torre J. 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]. [Lima]: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2020.
 83. Castañeda Carpio D. Cambios en la expresión de transportadores de glucosa de *Taenia solium* asociados al proceso de evaginación [Tesis de licenciatura]. [Lima]: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2021.
 84. Slais J. The Morphology and Pathogenicity of the Bladder Worms: *Cysticercus cellulosae* and *Cysticercus bovis*. Czechoslovak Academy of Sciences; 1970. 169 p.
 85. Sakamoto T, Sugimura M. Studies on echinococcosis. 23. Electron microscopical observations on histogenesis of larval *Echinococcus multilocularis*. *Jpn J Vet Res*. 1970 Sep;18(3):131–44.
 86. Galindo M, Paredes R, Marchant C, Miño V, Galanti N. Regionalization of DNA and protein synthesis in developing stages of the parasitic platyhelminth *Echinococcus granulosus*. *J Cell Biochem*. 2003 Oct 1;90(2):294–303.
 87. Reuter M, Kreshchenko N. Flatworm asexual multiplication implicates stem cells and regeneration. *Can J Zool*. 2004 Feb;82(2):334–56.
 88. Merchant MT, Corella C, Willms K. Autoradiographic Analysis of the Germinative Tissue in Evaginated *Taenia solium* Metacestodes. *J Parasitol*. 1997;83(3):363–7.
 89. Ozerniuk ND. Comparative properties of myogenesis in invertebrates and in lower and higher vertebrates. *Ontogenez*. 2004;35(6):441–50.
 90. Ratcliffe LE, Asiedu EK, Pickett CJ, Warburton MA, Izzi SA, Meedel TH. The *Ciona* myogenic regulatory factor functions as a typical MRF but possesses a novel N-terminus that is essential for activity. *Dev Biol*. 2019 Apr 15;448(2):210–25.
 91. Smyth JD, McManus DP. *The Physiology and Biochemistry of Cestodes*. Cambridge: Cambridge University Press; 1989. 398 p.
 92. Ruppert EE, Fox RS, Barnes RD. *Invertebrate Zoology: A Functional Evolutionary Approach*. 7th ed. Michigan: Thomson-Brooks/Cole; 2004. 989 p.
 93. Sukhdeo SC, Sukhdeo MVK. Mesenchyme cells in *Fasciola hepatica* (platyhelminthes): Primitive glia? *Tissue Cell*. 1994 Feb;26(1):123–31.
 94. Vega S, Morales AV, Ocaña OH, Valdés F, Fabregat I, Nieto MA. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev*. 2004 May 15;18(10):1131–43.
 95. Muyal JP, Muyal V, Kaistha BP, Seifart C, Fehrenbach H. Systematic comparison of RNA extraction techniques from frozen and fresh lung tissues: checkpoint towards gene expression studies. *Diagn Pathol*. 2009;4:9.

ANEXOS

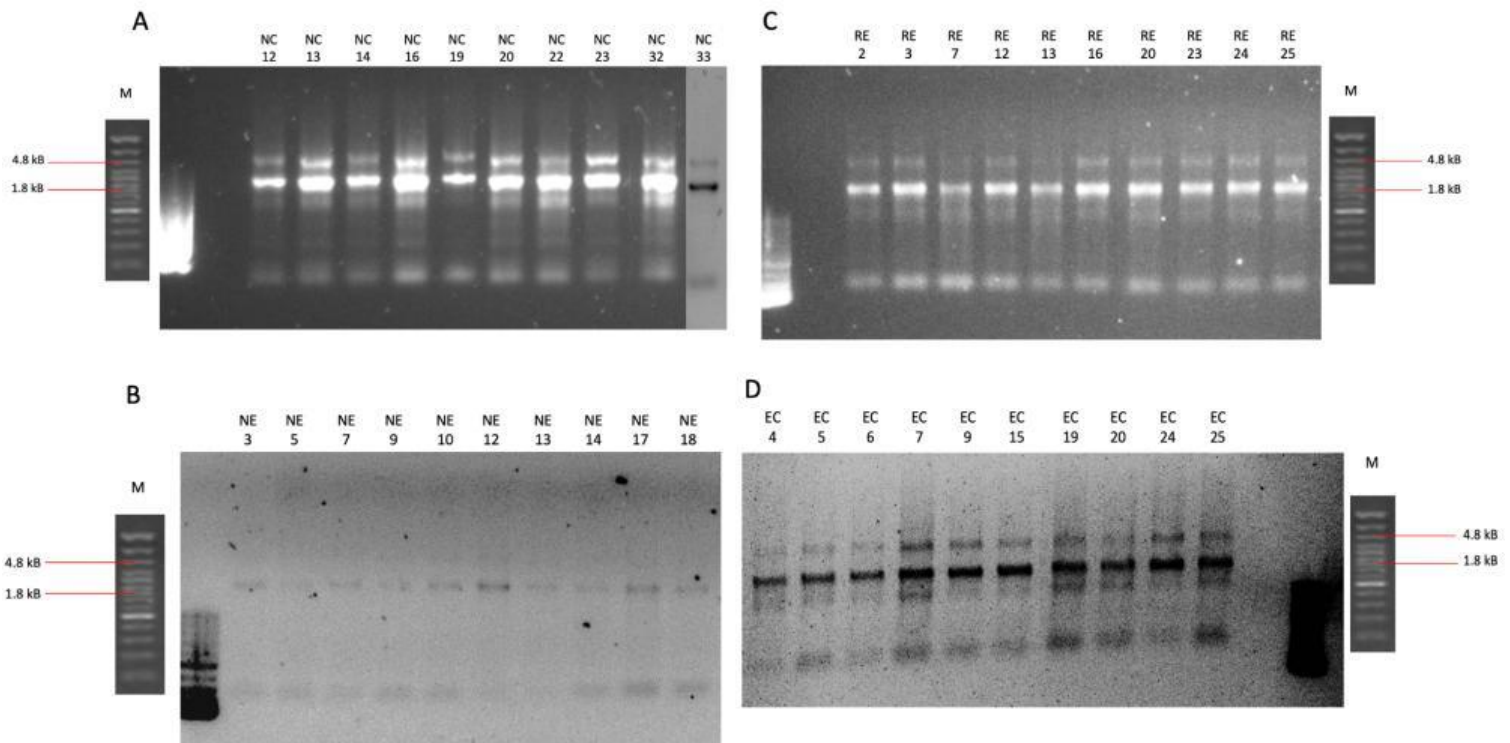
Anexo 1. Secuencias de los primers para los genes de interés (*myoD*, *snail-1* y *h2b*) y los candidatos a genes de referencia (*mdh*, *rpl13*, *cox-1*, *mapk3* y *pgk1*) de *Taenia solium*

Nombre del gen		Secuencia de los primers (5' → 3')	Tamaño del producto (pb)	Número de acceso (WormBase Parasite)
<i>myoD</i>	F	TGCCGTCACTACTACCACTAC	195	TsM_000079400
	R	TCCTCCCTCACAGCAAGACT		
<i>snail-1</i>	F	TGTGGCTCCTAAATGGTCAC	127	TsM_000952500
	R	TTCACTTCCGAGTGCGTCTG		
<i>h2b</i>	F	GCTCCTAAAGTAGTGTCAGGCA	104	TsM_000989300
	R	ATGGCGTAGCTCTCCTTCCT		
<i>mdh</i>	F	TAAGGTGCTGGTTGTTGGCA	131	TsM_000048200
	R	CGACCTGATAGATGGCACGG		
<i>rpl13</i>	F	TCCAATGCTATCGGGTGAAT	74	TsM_000621100
	R	CGCCTCGTGGATCGTATATT		
<i>cox-1</i>	F	CCGTTAGGAGGTGGTGATCC	154	TsM_000113400
	R	ACCCATAAAAGCCAAAAGCA		
<i>mapk3</i>	F	TCAAGCCGGACTACTTACCG	140	TsM_000447200
	R	CACGGTTGCTGTACATCTCG		
<i>pgk1</i>	F	GACACCGCTACTTGTGTGC	125	TsM_000796500
	R	TCCGAAAGAGCTGATACGCC		

Anexo 2. Cuantificación fluorométrica, por Qubit, del ARN total extraído de 10 muestras de cada condición (cisticercos no cultivados (control), no evaginados, recién evaginados y evaginados en crecimiento).

Estado	Condición según fenotipo	Código de la muestra	Concentración por Qubit (ng/mL)
No evaginado	No cultivado (control)	NC12	37.2
No evaginado	No cultivado (control)	NC13	58
No evaginado	No cultivado (control)	NC14	38.2
No evaginado	No cultivado (control)	NC16	70
No evaginado	No cultivado (control)	NC19	30.1
No evaginado	No cultivado (control)	NC20	55
No evaginado	No cultivado (control)	NC22	49.4
No evaginado	No cultivado (control)	NC23	43.1
No evaginado	No cultivado (control)	NC32	37
No evaginado	No cultivado (control)	NC33	53
No evaginado	No evaginado	NE3	16.6
No evaginado	No evaginado	NE5	13.5
No evaginado	No evaginado	NE7	14.3
No evaginado	No evaginado	NE9	12.2
No evaginado	No evaginado	NE10	15
No evaginado	No evaginado	NE12	20.9
No evaginado	No evaginado	NE13	10.8
No evaginado	No evaginado	NE14	12.9
No evaginado	No evaginado	NE17	27.5
No evaginado	No evaginado	NE18	16.8
Evaginado	Recién evaginado	RE2	26.8
Evaginado	Recién evaginado	RE3	42.3
Evaginado	Recién evaginado	RE7	28.6
Evaginado	Recién evaginado	RE12	30.8
Evaginado	Recién evaginado	RE13	25.2
Evaginado	Recién evaginado	RE16	36.7
Evaginado	Recién evaginado	RE20	30.4
Evaginado	Recién evaginado	RE23	27.1
Evaginado	Recién evaginado	RE24	31
Evaginado	Recién evaginado	RE25	27.3
Evaginado	Evaginado en crecimiento	EC4	26.9
Evaginado	Evaginado en crecimiento	EC5	23.6
Evaginado	Evaginado en crecimiento	EC6	18.4
Evaginado	Evaginado en crecimiento	EC7	28.4
Evaginado	Evaginado en crecimiento	EC9	23.2
Evaginado	Evaginado en crecimiento	EC15	21.4
Evaginado	Evaginado en crecimiento	EC19	54
Evaginado	Evaginado en crecimiento	EC20	29.6
Evaginado	Evaginado en crecimiento	EC24	28.4
Evaginado	Evaginado en crecimiento	EC25	33.5

Anexo 3. Integridad del ARN extraído, evaluada mediante geles de agarosa con lejía al 1%

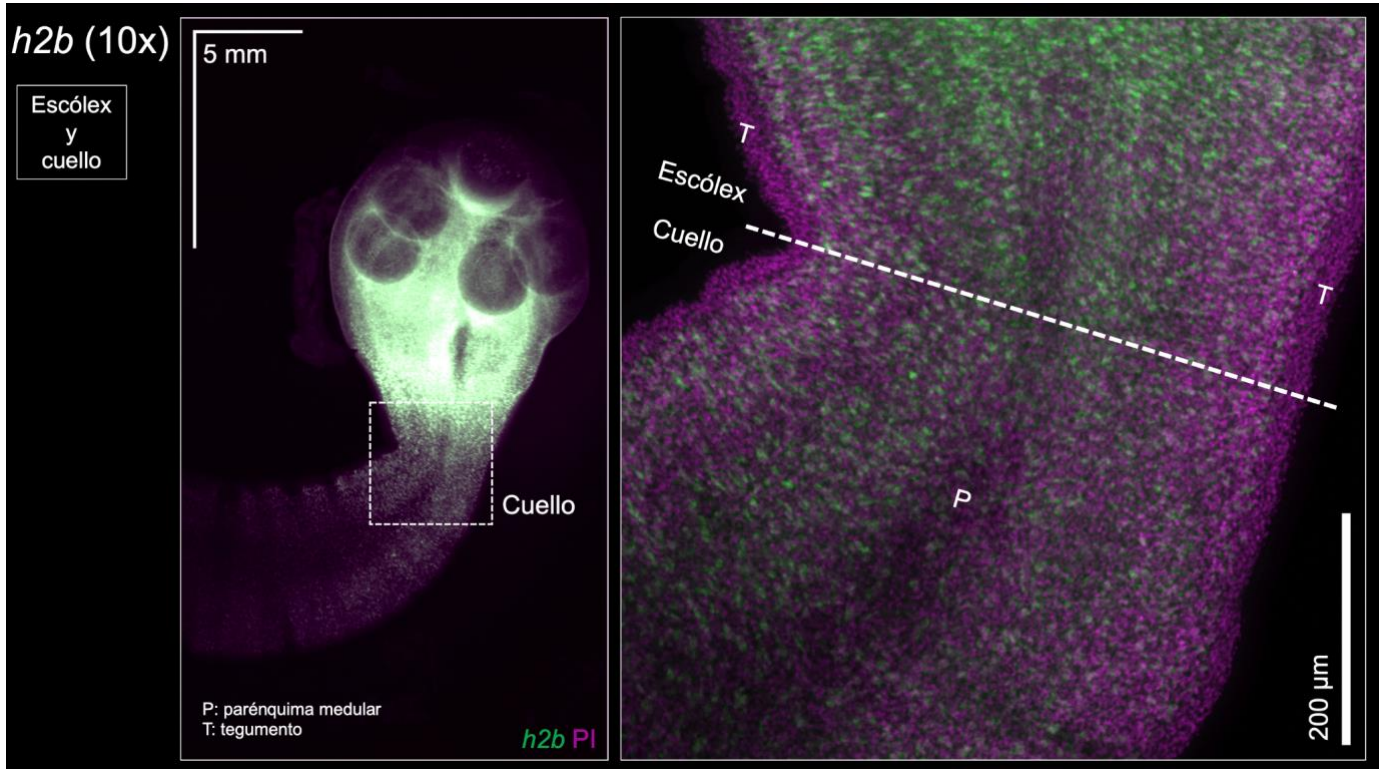


Geles de agarosa con lejía al 1% para observar la integridad del ARN total de las muestras de *T. solium* correspondientes a las cuatro condiciones experimentales: **A.** Cisticercos no cultivados (control); **B.** Cisticercos no evaginados; **C.** Cisticercos recién evaginados; **D.** Cisticercos evaginados en crecimiento. En todas las muestras se observan las dos bandas, a 4.8 kB y 1.8 kB, que representan al ARN ribosomal 28S y 18S, respectivamente. No se observa degradación del ARN. Los marcadores de peso molecular utilizados en las cuatro corridas no migraron correctamente, por lo que se tomó la imagen del marcador (M) de ADN de 0.5kb – 7.0kb de Muyal *et al.* (95) para determinar el peso aproximado de las bandas. NC: cisticercos no cultivados (control). NE: cisticercos no evaginados. RE: cisticercos recién evaginados. EC: cisticercos evaginados en crecimiento.

Anexo 4. Valores calculados del *fold change* ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) de cada gen de interés (*myoD*, *snail-1* y *h2b*) para todas las muestras de los grupos experimentales

Condición según fenotipo	Código de la muestra	$2^{-\Delta\Delta Cq}$		
		<i>myoD</i>	<i>snail-1</i>	<i>h2b</i>
No cultivados (control)	NC12	1.9061566	2.5951777	1.631275
	NC13	0.6116027	0.4727557	0.5532487
	NC14	0.7759309	0.7367089	0.7788046
	NC16	0.6928748	0.5753453	0.6702014
	NC19	1.2546921	1.5773469	1.54685
	NC20	1.2869892	1.0370605	1.1090569
	NC22	0.6258982	0.5700525	0.708415
	NC23	1.7540218	1.8606843	1.4432621
	NC32	1.3049549	1.2447304	1.1481677
	NC33	0.6896805	0.8903843	1.0540914
No evaginados	NE3	0.4187032	0.1718434	1.5576092
	NE5	0.6464751	0.2140223	2.5420634
	NE7	0.5880456	0.1648432	3.1954077
	NE9	0.5131076	0.1527418	2.4840026
	NE10	1.005096	0.2435855	3.7912318
	NE12	0.7156536	0.1837522	2.5303437
	NE13	0.7074336	0.2062549	2.3993883
	NE14	0.5962544	0.1983105	2.4216662
	NE17	0.7634823	0.2076895	3.7390368
	NE18	0.853029	0.2610684	2.83366
Recién evaginados	RE2	0.4678117	0.5713711	1.3128178
	RE3	0.3979521	0.7932422	1.3188983
	RE7	0.4710656	0.4598281	1.3373094
	RE12	0.3187874	0.6194959	1.6578728
	RE13	0.4765392	0.5661148	1.6388305
	RE16	0.4477194	0.4815753	1.3435034
	RE20	0.5512072	0.6921548	1.2164413
	RE23	0.4007201	0.3804644	0.9326019
	RE24	0.3721613	0.43402	0.5674899
	RE25	1.1980322	1.4003945	1.3188983
Evaginados en crecimiento	EC4	0.3093546	0.4793551	1.3940993
	EC5	0.3195248	0.4514068	1.3342232
	EC6	0.3687377	0.4951142	1.3067653
	EC7	0.5119235	0.6533071	1.2249023
	EC9	0.4710656	0.6238048	1.3067653
	EC15	0.3015913	0.4928316	0.9347592
	EC19	0.2953846	0.5113915	1.3188983
	EC20	0.3721613	0.4684066	1.1914073
	EC24	0.5037105	0.7083332	1.2680984
	EC25	0.4754394	0.5726928	1.1534856

Anexo 5. Hibridación *in situ* de *h2b* en cisticerco con escólex evaginado de *Taenia solium* que permaneció hasta 250h en cultivo



Expresión espacial de la histona *h2b*, mediante WMISH, en un cisticerco que permaneció hasta 250h en cultivo con el escólex y cuello evaginados. Se observa una mayor expresión de *h2b* en el parénquima medular del cuello y en la base del escólex, mas no en el tegumento del gusano. Este patrón de distribución de las células proliferativas es conservado en otros cestodos como *Hymenolepis*, *Echinococcus* y *Mesocestoides*. La tinción de núcleos se realizó con yoduro de propidio (PI).