

Tesis de doctorado

PEDECIBA Biología

Biología Celular y Molecular

Título:

Diferenciación celular y remodelación de tejidos durante la metamorfosis larvaria de cestodos

Estudiante: Mag. Jimena Montagne

Orientador: Dr. Uriel Koziol

Sección Biología Celular de la Facultad de Ciencias -  
Universidad de la República, Uruguay.

Tribunal:

Dra. Inés Carrera (presidente)

Dra. Paola Lepanto (vocal)

Dr. Daniel Prieto (vocal)

Fecha: 29 de agosto de 2024



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)



## Agradecimientos

El trabajo fue realizado en la Facultad de Ciencias (Universidad de la República); en su mayor parte en la Sección Biología Celular y también en parte en la Sección Bioquímica. De los diferentes laboratorios en los que he trabajado, estoy muy agradecida con todos. Destaco en particular la buena disposición para el trabajo de Uriel y los integrantes del grupo de Biología Celular y Desarrollo en Platelminfos Parásitos.

Cabe agradecer a varios colaboradores que aparecen también mencionados o citados en el texto de la tesis o el artículo científico publicado. Agradecemos la colaboración de Jenny Saldaña y demás integrantes del Laboratorio de Experimentación Animal de la Facultad de Química (Universidad de la República) por el mantenimiento conjunto del ciclo de vida de *Hymenolepis microstoma* en el laboratorio. Agradezco en particular la ayuda de Anita Asienberg, Laura Montes de Oca y Paulina Pintos, del Departamento de Ecología y Biología Evolutiva del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (MEC), para realizar la cría de escarabajos *Tenebrio molitor*, y a Beatriz Goñi (Facultad de Ciencias) por su asesoramiento sobre el procedimiento de anestesia de los escarabajos. Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas en la Unidad de Bioimagenología Avanzada de la Universidad de la República y el Instituto Pasteur de Montevideo, donde me entrené en el uso del microscopio con el asesoramiento de Marcela Díaz. Los análisis de microscopía electrónica fueron realizados en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias, con asistencia y asesoramiento de Gabriela Casanova, Magela Rodao y Gaby Martínez.

En el marco de esta tesis se publicó un artículo científico: “Montagne, J., Preza, M. y Koziol, U. (2023). *Stem cell proliferation and differentiation during larval metamorphosis of the model tapeworm Hymenolepis microstoma*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13, 1–16. doi: 10.3389/fcimb.2023.1286190”. Previamente, el trabajo fue publicado como *preprint* en el servidor *bioRxiv*: “Montagne,J., Preza,M. y Koziol, U. (2023). *bioRxiv* 2023 09, 13.557592. doi: 10.1101/2023.09.13.557592”.

Este trabajo fue financiado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica, proyecto CSIC I+D 2018-162 a UK y CSIC iniciación 2021 a JM, por la Comisión Académica de Posgrado, (beca de doctorado y de finalización a JM), y PEDECIBA, Universidad de la República, Uruguay.

*Si tu voz irrumpiera*

*y quebrara esta misma*

*línea... ¡Adelante!*

*Ya te esperaba. Pasa.*

*Vamos al fondo. Hay algunos frutales.*

*Ya verás. Entra.*

Circe Maia

Dedico la tesis a mi madre y a mi abuela.

# Tabla de contenidos

Resumen .....	5
1. Introducción.....	6
1.1. Células madre de platelmintos.....	6
1.1.1. Planarias .....	11
1.1.2. Platelmintos parásitos.....	12
1.2. Metamorfosis larvaria .....	19
1.2.1 Metamorfosis larvaria en cestodos.....	21
1.3. Cultivo <i>in vitro</i> de cestodos .....	25
1.4. Tegumento .....	27
1.5. Miogénesis .....	28
1.5.1. Miogénesis en vertebrados e invertebrados modelo .....	28
1.5.2. Miogénesis en platelmintos .....	32
1.6. Neurogénesis.....	34
1.6.1. Neurogénesis en vertebrados e invertebrados modelo .....	34
1.6.2. Sistema nervioso de platelmintos parásitos .....	39
1.7. Hipótesis y objetivos .....	43
2. Metodología .....	44
2.1. Mantenimiento de <i>Hymenolepis microstoma</i> .....	44
2.2. Manipulación experimental de las larvas de <i>H. microstoma</i> .....	44
2.2.1. Infección de <i>T. confusum</i> .....	44
2.2.2. Cultivo <i>in vitro</i> .....	45
2.2.3. Marcado metabólico con 5-etil-2'-desoxiuridina <i>ex vivo</i> .....	45
2.2.4. Infección de <i>T. molitor</i> y marcado metabólico <i>in vivo</i> con EdU .....	46
2.2.5. Activación de cisticercoides .....	47
2.3 Revelado de la marca de EdU.....	48
2.4. Detección de la fragmentación de ADN y la actividad de caspasas <i>in situ</i> .....	48
2.4.1. Detección de la fragmentación de ADN mediante marcado de cortes en el ADN con dUTP y deoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) <i>in situ</i> .....	48
2.4.2. Detección de la actividad de caspasas <i>in situ</i> .....	49
2.5. Marcado del tegumento con dextrano .....	50
2.6. Microscopía electrónica de transmisión .....	51
2.7. Inmunofluorescencia.....	51

2.7.1. Inmunofluorescencia <i>in toto</i> .....	52
2.7.2 Inmunofluorescencia en criocortes.....	54
2.8. Tinciones generales.....	54
2.9. Montaje de muestras, obtención de imágenes y análisis .....	55
2.10. Hibridación <i>in situ</i> en larvas enteras .....	55
2.10.1. Identificación de genes en datos genómicos de <i>H. microstoma</i> .....	55
2.10.2. Isoformas de tropomiosina de alto peso molecular .....	56
2.10.3. Homólogos de factores de transcripción relacionados con el desarrollo muscular .....	56
2.10.4. Identificación de homólogos de factores de transcripción relacionados con el desarrollo neural .....	57
2.10.5. Preparación de sondas específicas.....	58
2.11. Análisis estadístico .....	60
3. Resultados .....	61
3.1. Revisión del desarrollo de la metamorfosis larvaria de <i>H. microstoma</i> .....	61
3.2. Cultivo <i>in vitro</i> de la metamorfosis larvaria de <i>H. microstoma</i> .....	64
3.2.1. Ensayo de las condiciones para el cultivo <i>in vitro</i> de larvas en metamorfosis .....	64
3.2.2. Marcado metabólico con EdU <i>ex vivo</i> .....	68
3.3. Proliferación celular en la metamorfosis larvaria <i>in vivo</i> .....	70
3.4. Detección de eventos de eliminación de células durante la metamorfosis larvaria y en el desarrollo de las oncosferas.....	77
3.4.1. Detección de eventos de eliminación de núcleos durante la metamorfosis larvaria .....	77
3.4.2. Detección de la activación de caspasas durante la metamorfosis larvaria.....	77
3.4.3. Detección de la eliminación de núcleos durante el desarrollo de las oncosferas .....	78
3.5. Desarrollo del tegumento con la formación de citones tegumentarios .....	82
3.5.1. Tegumento de las oncosferas .....	82
3.5.2. Formación de citones tegumentarios en la metamorfosis larvaria .....	83
3.5.3. Análisis ultraestructural del tegumento.....	83
3.6. Desarrollo del sistema muscular .....	88
3.6.1. Expresión de genes relacionados con la diferenciación de células musculares .....	96
3.7. Desarrollo del sistema nervioso .....	99
3.7.1. Análisis del sistema nervioso de pre-oncosferas por inmunofluorescencia .....	99
3.7.2. Análisis del desarrollo del sistema nervioso de larvas en metamorfosis por inmunofluorescencia.....	100

3.7.3. Análisis del desarrollo del sistema nervioso por hibridación <i>in situ</i> para marcadores de diferentes sistemas de neurotransmisión.....	103
3.7.4. Expresión de genes conservados relacionados con procesos de neurogénesis y diferenciación neural .....	105
3.7.5. Análisis de procesos de diferenciación neural mediante ensayos de pulso y seguimiento con EdU .....	108
4. Discusión.....	110
4.1. Consideraciones sobre el cultivo <i>in vitro</i> de larvas en metamorfosis.....	112
4.2. Consideraciones sobre el marcado de larvas en metamorfosis con EdU en condiciones <i>ex vivo</i> .....	116
4.3. Proliferación y diferenciación celular durante la metamorfosis larvaria de <i>H. microstoma</i> .....	116
4.3.1. Proliferación celular durante la metamorfosis larvaria .....	117
4.3.2. Heterogeneidad de las células germinativas en la metamorfosis larvaria .....	120
4.3.3. Diferenciación celular durante la metamorfosis larvaria de <i>H. microstoma</i> .....	123
4.3.3.1. Desarrollo del tegumento .....	123
4.3.3.2. Miogénesis en la metamorfosis larvaria .....	125
4.3.3.3. Neurogénesis en la metamorfosis larvaria.....	130
4.3.3.4. Perspectivas sobre el estudio de procesos de diferenciación celular en <i>H. microstoma</i> .....	133
5. Bibliografía.....	136
Figura I1 .....	9
Figura I2 .....	10
Figura I3 .....	18
Figura I4 .....	24
Figura I5 .....	42
Figura R1.....	63
Figura R2.....	67
Figura R3.....	69
Figura R4.....	74
Figura R5.....	75
Figura R6.....	81
Figura R7.....	85
Figura R8.....	86
Figura R9.....	87
Figura R10.....	92
Figura R11.....	94

Figura R12.....	95
Figura R13.....	98
Figura R14.....	101
Figura R15.....	104
Figura R16.....	107
Figura R17.....	109
Figura D1.....	111
Figura D2.....	115
Tabla M1.....	59
Tabla M2.....	60
Tabla R1.....	66

## Resumen

Las larvas de cestodos causan importantes enfermedades en humanos y animales domésticos. Durante la infección, el primer estadio larvario (oncosfera) sufre una metamorfosis en la que los tejidos se forman *de novo* a partir de una población de células madre denominadas células germinativas. Este proceso es difícil de estudiar en el caso de los patógenos humanos, ya que estas larvas son infecciosas y difíciles de mantener en el laboratorio. En este trabajo, analizamos la proliferación y diferenciación celular durante la metamorfosis larvaria en el cestodo modelo *Hymenolepis microstoma*, mediante el marcaje *in vivo* de células proliferantes con el análogo de timidina 5-etil-2'-desoxiuridina (EdU), evaluando su diferenciación con un conjunto de marcadores moleculares específicos para diferentes tipos celulares. Las células proliferantes son muy abundantes y de ciclo rápido durante la metamorfosis temprana: el número total de células se duplica cada diez horas, y la duración de G2 es de sólo 75 minutos. Las nuevas células tegumentarias, musculares y nerviosas se diferencian a partir de este conjunto de células germinativas proliferantes, y estos procesos son muy rápidos, ya que los marcadores de diferenciación de las neuronas y de las células musculares aparecen a las 24 horas tras salir del ciclo celular, y la fusión de las nuevas células con el sincitio tegumentario puede detectarse al cabo de sólo 4 horas. Nuevas células tegumentarias y musculares aparecen desde las primeras fases de la metamorfosis (24 a 48 horas post-infección, estadio 1); por el contrario, la mayoría de los marcadores de neuronas en diferenciación aparecen más tarde (en el estadio 2), y la detección de sinapsina y neuropéptidos se correlaciona con la retracción del escólex (estadio 4). Por último, identificamos poblaciones de células proliferantes y post-mitóticas que expresan genes conservados asociados a progenitores y precursores neuronales, lo que sugiere la existencia de linajes específicos de tejido entre las células germinativas. Estos resultados proporcionan por primera vez una visión completa del desarrollo de nuevos tejidos durante la metamorfosis larvaria de cestodos, proporcionando un marco para estudios similares en patógenos humanos y veterinarios.

## 1. Introducción

### 1.1. Células madre de platelmintos

Los platelmintos (phylum Platyhelminthes) son animales con simetría bilateral, con cuerpo ovalado o alargado y aplanado dorso-ventralmente. En la filogenia de los animales, los platelmintos pertenecen al grupo de los Bilateria y dentro de este a Lophotrochozoa (Halanych y col., 1995; Marlétaz y col., 2019). Las teorías iniciales sobre la evolución de los animales consideraron a los platelmintos como un grupo candidato de transición entre los cnidarios y los animales bilaterales por sus características morfológicas simples. Pero los análisis de filogenias moleculares (establecidas inicialmente usando secuencias de ADN ribosomal 18S, y más recientemente mediante filogenómica) permitieron por un lado distinguir a los platelmintos como un grupo monofilético y por otro lado establecieron que su posición en la filogenia no es en ramas de divergencia basal sino como un grupo dentro del clado Lophotrochozoa (figura I1; Bagnù y col., 2008; Egger y col., 2015). Algunas características generales de Lophotrochozoa son el patrón de segmentación espiral y el desarrollo de larvas trocóforas, pero estas características no están presentes en todos los grupos. Dentro de platelmintos, los grupos de divergencia basal (Catenulida, Macrostomorpha y Polycladida) presentan el patrón espiral al menos en etapas tempranas de la segmentación, sin embargo esta característica no está presente en la mayoría de los platelmintos más derivados (clado Neophora, figura I1; Martín-Durán and Egger, 2012). También, se ha identificado a los platelmintos como un grupo de rápida evolución en las filogenias moleculares (Marlétaz y col., 2019).

Los platelmintos en general presentan cierto grado de centralización del sistema nervioso y órganos sensoriales en el extremo anterior. Son triblásticos y acelomados, con un mesénquima (también llamado parénquima) entre el tubo digestivo y la pared del cuerpo, que incluye una variedad de tipos celulares (Brusca y Brusca, 2003b). Como característica general, las células diferenciadas no proliferan y presentan células madre somáticas con morfología indiferenciada localizadas en el parénquima que pueden dar lugar a todos los tipos celulares del animal, incluyendo a la línea germinal (Reuter y Kreshchenko, 2004; Sato y col., 2006). Por ejemplo, para el recambio normal de células de la epidermis se ha observado que las nuevas células provienen de las células madre del parénquima y no de

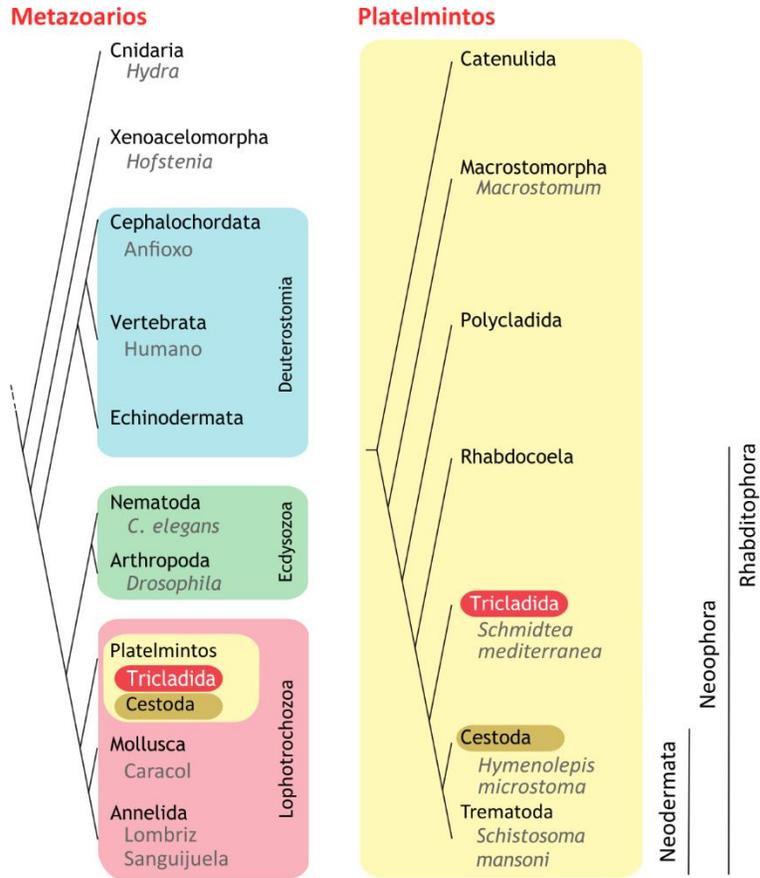
células proliferantes residentes en la epidermis (Ladurner y col., 2000; Newmark y Sánchez Alvarado, 2000; Egger y col., 2009).

El phylum incluye animales de vida libre y parásitos. Las formas de vida libre son marinas, de aguas dulces o terrestres y se estiman entre 4000 y 5000 especies. Por otra parte los platelmintos parásitos presentan un mayor número de especies que se puede estimar entre 10.000 y 100.000 (Baguñà y Riutort, 2004). Los platelmintos presentan una importante plasticidad morfológica y del desarrollo. En general son capaces de algún grado de regeneración de partes del cuerpo y pueden cambiar sus dimensiones de acuerdo a la disponibilidad de alimento (Reuter y Kreshchenko, 2004). También se observa una variedad de ciclos de vida incluyendo en diferentes casos desarrollo directo, una o más formas larvianas, y reproducción sexual (típicamente hermafroditas con fecundación cruzada) o asexual. Estas características se pueden relacionar con su particular sistema de células madre indiferenciadas mantenido en el estadio adulto (Reuter y Kreshchenko, 2004; Koziol, 2017).

Las células madre indiferenciadas se denominan neoblastos en los grupos de platelmintos de vida libre. Los grupos de divergencia basal en los platelmintos, como Catenulida y Macrostomorpha, incluyen especies de vida libre, de tamaño pequeño y que presentan capacidad de multiplicación asexual y regeneración (Palmberg, 1990). En la especie *Stenostomum leucops* (Catenulida) se identificaron los neoblastos mediante microscopía electrónica y ensayos de incorporación de timidina tritiada. Son células con una relación núcleo/citoplasma alta y citoplasma que contiene ribosomas libres y pocas mitocondrias. Se encuentran localizados en el parénquima y asociados al tubo digestivo. En esta especie se demostró también que los neoblastos migran y se diferencian hacia los diferentes tipos celulares del animal (Palmberg, 1990). Por otro lado, un trabajo reciente, con la especie *Stenostomum brevipharyngium* identificó células proliferantes también en los tejidos diferenciados (Gąsiorowski y col., 2024).

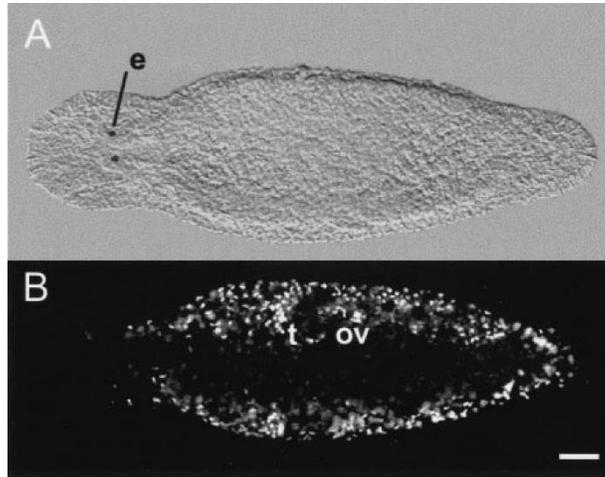
Del clado Macrostomorpha, se ha estudiado en detalle el sistema de neoblastos de *Macrostomum* sp., animales que habitan en el ambiente marino en la zona inter-mareal con

arena fina. Son pequeños, de 1 mm de longitud, hermafroditas y con desarrollo directo (Ladurner y col., 2000). Presentan una gran capacidad de regeneración en estadios juveniles y adultos. Pueden regenerar partes anteriores, posteriores o laterales siempre y cuando estructuras de la cabeza como el cerebro y la faringe estén presentes (Egger y col., 2006). Los neoblastos en esta especie se encuentran ubicados a lo largo de dos bandas laterales internas (figura 12). En el eje central del cuerpo se encuentran en menor número, en dos pequeñas áreas y asociadas al tubo digestivo (Ladurner y col., 2000). Se ha demostrado la ausencia proliferación celular en la epidermis o en áreas rostrales (anteriores a los ojos) mientras que células descendientes de neoblastos migran para formar parte de estas regiones no proliferantes (Ladurner y col., 2000). Se obtienen resultados análogos al estudiar procesos de renovación celular o regeneración en las planarias de agua dulce (Newmark y Sánchez Alvarado, 2000; Egger y col., 2009) lo que sugiere que la proliferación celular restringida a los neoblastos y su posterior incorporación a los tejidos diferenciados es una estrategia común para la renovación de los tejidos de platelmintos.



i Figura 11

Figura 11. Filogenia de los platelmintos. A la izquierda: relaciones filogenéticas entre los platelmintos y los principales grupos taxonómicos de los animales (metazoarios). Los recuadros indican los principales clados y en letra gris se indican especies modelo bien estudiadas. A la derecha: relaciones filogenéticas entre los principales grupos taxonómicos dentro de platelmintos, tener en cuenta que no todos los grupos aparecen esquematizados. Con rojo se resalta Tricladida y con tostado Cestoda. Esquema adaptado de Ivankovic y col., 2019.



ii Figura 12

Figura 12. Células proliferantes de *Macrostomum* sp. (A) Imagen de referencia de un adulto de la especie obtenida mediante contraste interferencial de Nomarski. Se señala la posición de los ojos (e). (B) Células proliferantes marcadas por la incorporación de BrdU (bromo-deoxiuridina) en un pulso de 30 min. Las células proliferantes somáticas se encuentran en dos bandas laterales. También se observan agrupaciones de células proliferantes en testes (t) y ovarios (ov). No se encuentran células proliferantes en la epidermis o en la región anterior a los ojos. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ . Figura tomada de Ladurner y col., 2000.

### 1.1.1. Planarias

De los platelmintos de vida libre las planarias de agua dulce (orden Tricladida, figura 11; Baguñà y Riutort, 2004; Sluys y col., 2009) han sido intensamente estudiadas por su gran capacidad regenerativa (Ivankovic y col., 2019). Las planarias tienen una anatomía compleja que incluye cerebro y ojos en el extremo anterior, cordones nerviosos ventrales, diferentes capas de musculatura somática y visceral, un intestino conectado a la faringe, protonefridios y una epidermis que es ciliada en la parte ventral (Hyman, 1951). Pueden reproducirse asexualmente o sexualmente siendo hermafroditas con fecundación cruzada. Aunque se ha probado la capacidad de regeneración en diferentes especies, el trabajo de investigación más reciente ha sido realizado principalmente usando la especie modelo *Schmidtea mediterranea*. Ésta presenta dos razas o líneas, una asexual que no desarrolla órganos reproductivos y se reproduce por fisión, y otra sexual, de mayor tamaño, que desarrolla órganos reproductivos, se aparea y produce puestas en forma de capullo. Las dos líneas también presentan diferencias cromosómicas y genotípicas, que se han usado para experimentos de trasplante de tejidos o células (Saló y Baguñà, 1985; Wagner y col., 2011).

El parénquima de las planarias incluye los neoblastos, que fueron inicialmente reconocidos como células pequeñas (7 – 12  $\mu\text{m}$ ) de morfología indiferenciada, con núcleo relativamente grande, ovoide y con nucléolos prominentes, y un escaso citoplasma (Baguñà y Romero, 1981; Baguñà, 2012). Diversas estrategias de experimentación con métodos de irradiación (para eliminar los neoblastos de un animal), trasplante de neoblastos, detección de transcritos y proteínas, y manipulación de la expresión génica en los neoblastos mediante ARN de interferencia, ha demostrado que todas las nuevas células en el recambio normal de los tejidos o durante la regeneración provienen de neoblastos y estos son colectivamente pluripotentes (Wagner y col., 2011; Reddien, 2018). Entre ellos se ha identificado una subclase de neoblastos, llamados neoblastos clonogénicos, que se caracterizan por su capacidad de autorenovación y por ser verdaderamente pluripotentes a nivel individual (Wagner y col., 2011). Los análisis transcripcionales de célula-única (*single-cell*) en combinación con métodos de clasificación celular y experimentos *in vivo* permitieron la caracterización molecular más específica de este sub-tipo de neoblastos y

observar que constituyen el 7% del total de células de las planarias (Zeng y col., 2018), mientras que los neoblastos en sentido amplio constituyen un 30%. De un amplio conjunto de observaciones se desprende que los neoblastos incluyen células madre pluripotentes y numerosos neoblastos especializados distintos (Reddien, 2018; Molina y Cebrià, 2021). Estudios sobre la regeneración de los ojos y protonefridios de las planarias descubrieron por primera vez clases de neoblastos especializados con linajes restringidos (Lapan y Reddien, 2011; Scimone y col., 2011). Trabajos posteriores identificaron neoblastos candidatos especializados y factores de transcripción involucrados para la especificación de numerosos tipos celulares adicionales (Scimone y col., 2014). Los análisis transcripcionales de célula-única confirmaron la heterogeneidad de la población de neoblastos (Hayashi y col., 2010; van Wolfswinkel y col., 2014). La clasificación de los neoblastos es un tema en discusión (García-Castro y Solana, 2022), pero en general se pueden identificar subpoblaciones que expresan diferentes niveles de *piwi* (Reddien y col., 2005; Zeng y col., 2018), a lo que se suma un conjunto específico de factores de transcripción. Estudios transcripcionales de célula única también permitieron reconstruir las posibles trayectorias de diferenciación de neoblastos a los principales tipos celulares de planarias (García-Castro y Solana, 2022). Por ejemplo, para la renovación de la epidermis, los neoblastos epidérmicos salen del ciclo celular y progresan por una serie de estadios durante su diferenciación a la vez que cambian su localización en el parénquima al migrar hacia la epidermis donde finalmente se integran a la capa epitelial. Al estudiar este proceso se encontró que algunos genes característicos de las células diferenciadas son expresados por los progenitores en diferenciación que también presentan características particulares según su localización en el cuerpo del animal (Wurtzel y col., 2017).

### 1.1.2. Platelminos parásitos

La enorme mayoría de los platelmintos parásitos forman un grupo monofilético que es llamado Neodermata e incluye a los grupos Monogenea, Trematoda y Cestoda (figura I1) y se caracteriza por presentar una epidermis sincitial y no-ciliada en las formas adultas, que se denomina tegumento (ver sección 1.4; Tyler y Hooge, 2004). Las infecciones por

platelmintos parásitos causan numerosas enfermedades de importancia para la salud humana y animal, especialmente en países en vías de desarrollo (Hotez y col., 2014).

Los platelmintos parásitos comparten la característica de presentar un sistema de células madre somáticas similar a los neoblastos de platelmintos de vida libre. En los platelmintos parásitos, con ciclos de vida complejos, las células madre participan en la formación de los diferentes estadios del ciclo de vida (Koziol y col., 2010; Wang y col., 2018). Sin embargo, todavía no se conoce cuán similares son estas células a nivel molecular entre los platelmintos o entre diferentes estadios del ciclo de vida de la misma especie (Koziol, 2017).

Para el trematodo *Schistosoma mansoni* se describieron células madre en adultos y larvas (Collins y col., 2013; Wang y col., 2013). Su ciclo de vida incluye una etapa de infección de un hospedador intermediario invertebrado donde tiene lugar la multiplicación asexual en la forma larvaria esporocisto. En el interior de un esporocisto se generan embriones de esporocistos o cercarias a partir de las células madre, sin fecundación de gametos (poliembrionía). Las cercarias son larvas infectivas que invaden a un hospedador vertebrado (hospedador definitivo) a través de la piel. Luego de la invasión, las larvas presentan la forma de schistosomula y a continuación se desarrollan para dar lugar al estadio adulto (macho o hembra).

Las células madre del esporocisto se han llamado células germinales y sus características morfológicas son compartidas con las células madre del estadio adulto. Tienen forma redondeada con una proporción entre núcleo y citoplasma alta, presentando el núcleo un gran nucléolo y el pequeño anillo de citoplasma puede presentar una proyección delgada. A nivel molecular, expresan factores asociados con el ciclo celular, homólogos de genes reguladores de los neoblastos (*ago2*, *fgfrA*) y reguladores post-transcripcionales asociados tradicionalmente con la línea germinal (parálogos de *vasa*; Collins y col., 2013; Wang y col., 2013). También para esta especie se observó heterogeneidad a nivel molecular en las células germinales, con la identificación de al menos dos poblaciones en las larvas, solo una de las cuales contribuiría a la línea germinal (Wang y col., 2013). En la transición de schistosomula a adulto, se desarrollan primordios de las gónadas a partir de estas células

madre. En los gusanos adultos las células proliferantes somáticas (llamadas también neoblastos) se encuentran restringidas al parénquima, presentan la capacidad de autorenovarse y se ha demostrado su diferenciación hacia células intestinales, células musculares (Collins y col., 2013) y citones tegumentarios (Collins y col., 2016).

Los cestodos presentan también ciclos de vida complejos con sucesivos estadios larvarios y adultos que habitan en diferentes hospedadores. El hospedador definitivo en los cestodos es un vertebrado y las transferencias de un hospedador a otro tienen lugar de forma pasiva, cuando son ingeridos (Freeman, 1973; Caira y col., 2017). Pero a diferencia de los trematodos, las transiciones entre estadios tienen lugar mediante procesos de metamorfosis o desarrollo siendo poco común la multiplicación asexual en estadios larvales que se observa en contadas excepciones (ver sección 1.2.1). Anatómicamente el cuerpo de los gusanos adultos se compone por un escólex (cabeza) que contiene los principales elementos del sistema nervioso, con órganos de adhesión (ventosas o surcos), un cuello que constituye la región germinativa para el crecimiento posterior, y segmentos (estróbila) conteniendo las repeticiones seriadas de los órganos reproductivos. Internamente, la estróbila se puede subdividir en una zona cortical con un tegumento superficial, capas de fibras musculares y fibras nerviosas, y una zona medular conteniendo fibras musculares longitudinales, el parénquima medular, los órganos reproductores y los principales cordones nerviosos y ductos del sistema excretor. En particular los cestodos carecen de tubo digestivo o boca (Lumsden y Specian, 1980). Las células proliferantes indiferenciadas se encuentran ubicadas en el cuello y estróbila, principalmente en la parte externa del parénquima medular, adyacentes a la capa muscular interna (Kozioł y Castillo, 2011).

El ciclo de vida de los cestodos se ilustra en la figura I3 tomando como ejemplo modelo a la especie *Hymenolepis microstoma*. La secuencia básica del ciclo de vida incluye un adulto (usualmente hermafrodita) que habita en el tubo digestivo del hospedador definitivo y produce gametos. El hospedador definitivo para *H. microstoma* puede ser el ratón, entre otros roedores (Cunningham y Olson, 2010). Como resultado de la fecundación se desarrollan embriones que forman cada uno una larva (primera larva). Esta primera larva es de tipo hexacanto (con seis ganchos; también llamada oncósfera) en la gran mayoría de

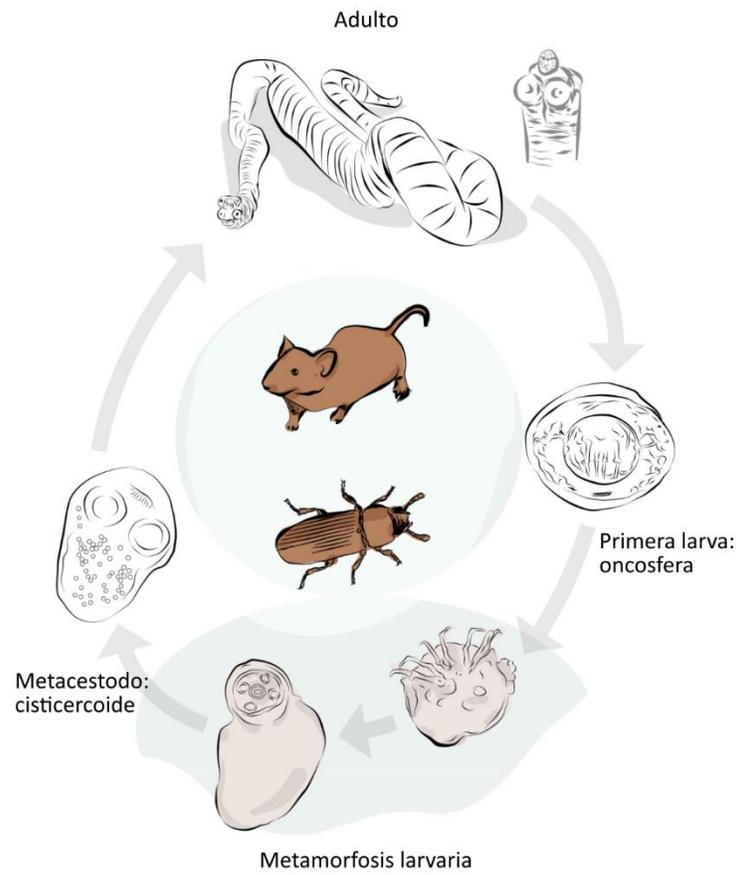
los cestodos, y estas formas larvales son transferidas de un hospedador a otro al ser ingeridas. La primera larva es infectiva para el hospedador intermediario, atraviesa el intestino tras ser ingerida y migra a zonas parenterales donde realiza una metamorfosis larvaria para desarrollar la segunda larva, llamada a modo general metacestodo (existen nombres específicos para los metacestodos de diferentes grupos de cestodos). El hospedador intermediario para especies del género *Hymenolepis* puede ser más de una especie de escarabajos (Voge, 1964; Voge y Graiwer, 1964; Cunningham y Olson, 2010). Los metacestodos que han culminado el desarrollo presentan un escólex similar al del estadio adulto y son infectivos para el hospedador definitivo. El desarrollo posterior del adulto incluye la formación de estróbila (Freeman, 1973).

Células proliferantes indiferenciadas se encuentran presentes en todos los estadios del ciclo de vida de los cestodos y se denominan células germinativas en general, pero se desconoce cuán similares o diferentes son entre especies o entre estadios del ciclo de vida de una especie (Koziol, 2017). Estas células son similares en morfología a los neoblastos de planarias y las células proliferantes de trematodos; son pequeñas, con un citoplasma basófilo debido a la abundancia de ribosomas, con pocas extensiones citoplasmáticas, un núcleo grande y un nucléolo grande y prominente (Sakamoto y Sugimura, 1970; Bolla y Roberts, 1971; Koziol y col., 2014; Koziol, 2017). Estudios iniciales analizaron la localización de las células germinativas en el cuerpo de los gusanos y su participación en la formación de nuevas estructuras, en particular en el proceso de estrobilación en la transición de larva metacestodo a adulto de varias especies como *Diphyllbothrium dendriticum* (Diphyllbothriidea), *Mesocestoides corti* (Cyclophyllidea) y especies del género *Hymenolepis* (Cyclophyllidea) (Bolla y Roberts, 1971; Wikgren y col., 1971; Koziol y col., 2010). Se ha estudiado las características del ciclo celular de las células germinativas en el cuello durante la transición de metacestodos a adultos, que se estima dura 8,5 hs en *Hymenolepis citelli* a 37°C y 19 hs en *D. dendriticum* a 39°C (Bolla y Roberts, 1971; Gustafsson, 1990). También se han estudiado procesos de diferenciación celular en el estadio adulto de *D. dendriticum* y se ha encontrado que las células germinativas dan lugar a células tegumentarias, células musculares, tipos celulares del parénquima y células

nerviosas (Gustafsson, 1976, 1990). Los estudios más recientes han probado la importancia de las células germinativas de la zona del cuello de los gusanos adultos para el proceso de estrobilación, encontrando que señales extrínsecas en la zona del cuello regulan su actividad (Rozario y col., 2019). La caracterización molecular de estas células germinativas mediante estudios de transcriptómica (*RNA-seq*) e hibridación *in situ* realizada para la especie *H. diminuta* encontró un grupo de transcritos expresados en las células germinativas que se encuentran compartidos con los neoblastos de planarias (Rozario y col., 2019). También se observó que las células germinativas del cuello son heterogéneas en la expresión génica, encontrando subpoblaciones de células proliferantes que expresan genes típicos de células no-proliferantes y posiblemente constituyen progenitores para diferentes linajes de células diferenciadas (Rozario y col., 2019).

Se han estudiado las células germinativas de las larvas (metacestodos) de *Echinococcus multilocularis*, *Taenia crassiceps* y *Taenia solium* que representan ejemplos de multiplicación asexual en la familia Taeniidae, de importancia por las enfermedades que causan en humanos y animales domésticos (Brehm y Koziol, 2017; Orrego y col., 2021, 2022). Las células germinativas de estas larvas son totipotenciales a nivel poblacional, como lo demuestra su capacidad para regenerar larvas por completo a partir de cultivos primarios de células (Toledo y col., 1997; Spiliotis y col., 2008). La potencialidad real de las células germinativas individuales no se ha determinado, aunque se han sugerido amplias capacidades de renovación celular mediante experimentos de agotamiento de células germinativas por tratamiento con hidroxurea (tóxica para las células proliferantes) seguidos de recuperación (Koziol y col., 2014). En la especie *E. multilocularis* se observó por primera vez en cestodos que las células germinativas son heterogéneas en la expresión génica (Koziol y col., 2014). También se encontró un marcador molecular característico y expresado por todas las células germinativas de *E. multilocularis* pero éste es un elemento específico de la familia Taeniidae (retrotransposón no-autónomo *ta-TRIM*; Koziol y col., 2015). Recientemente, mediante análisis de transcriptómica y diseños experimentales particulares, se identificó un conjunto de genes asociados a las células germinativas de los metacestodos de esta especie. Por un lado se identificó un nuevo marcador general de las

células germinativas (*EmCIP2Ah*) y por otro lado se avanzó en la identificación de subpoblaciones de células germinativas con características particulares (Herz y col., 2024). En el genoma de los cestodos se han perdido genes expresados característicamente en la línea germinal en otros animales como *vasa* y *piwi* (Tsai y col., 2013; Skinner y col., 2014) y no se cuenta con un marcador molecular general para las células germinativas de las diferentes especies, que en general se identifican por su capacidad de proliferar mediante el marcado metabólico con análogos de timidina.



iii Figura 13

Figura 13. Representación esquemática del ciclo de vida de *Hymenolepis microstoma*.

## 1.2. Metamorfosis larvaria

Los ciclos de vida de los animales se pueden clasificar como directos o indirectos. En las especies con ciclo de vida directo, el desarrollo de los embriones, que típicamente ocurre bajo cuidado de los parentales (en forma de puesta, cápsula, etc.), da lugar a juveniles con un plan corporal con características definitivas del plan corporal de los adultos. En las especies con ciclo de vida indirecto el desarrollo embrionario da como resultado un estadio larval relativamente simple que es diferente del adulto de la misma especie y a partir del cual se desarrolla el estadio juvenil o adulto, en un proceso de metamorfosis (Peterson y col., 1997; Brusca y Brusca, 2003a). El desarrollo de la metamorfosis larvaria involucra la formación de nuevas estructuras características del estadio juvenil y adulto y, a su vez, la eliminación de estructuras específicas de la larva como es el caso de los ojos larvales o estructuras ciliadas de las larvas pelágicas de anélidos poliquetos, moluscos gasterópodos y nemertinos (Peterson y col., 1997; Fischer y col., 2010; Hunt y Maslakova, 2017). En general, las larvas contienen células madre reservadas para el desarrollo posterior. En los casos en que la mayor parte de las estructuras larvales son eliminadas como ocurre en nemertinos, se considera que el desarrollo es máximo indirecto (Davidson y col., 1995; Peterson y col., 1997). Para los casos en que la metamorfosis larvaria es gradual y las estructuras nerviosas de la larva se incorporan al sistema nervioso del adulto como en anélidos se introdujo el término de desarrollo mínimo indirecto (Marlow y col., 2014).

La mayoría de los platelmintos de vida libre, incluyendo al orden Tricladida presentan desarrollo directo (Martín-Durán y Egger, 2012), con la excepción del orden Polycladida, con formas larvales en ambientes marinos. Entre los platelmintos parásitos se encuentran ciclos de vida complejos con uno o más estadios larvales. En trematodos digeneos los ciclos de vida típicamente incluyen tres hospedadores y presentan una forma de multiplicación en estadios larvales llamada poliembrionía. En los cestodos, el ciclo típico involucra dos hospedadores, siendo las larvas los estadios que son responsables de la infección en cada caso, y a diferencia de los trematodos no suelen presentar multiplicación asexual. La primera larva es un organismo sumamente reducido, más aún en los cestodos más derivados (clado Eucestoda) en los que es del tipo oncosfera. La oncosfera se encuentra

protegida por envolturas dentro de un huevo. Cuando estos huevos son ingeridos por el hospedador intermediario, las oncosferas atraviesan el intestino y alcanzan sitios parenterales donde tiene lugar la metamorfosis larvaria. La oncosfera contiene células madre indiferenciadas (células germinativas) que contribuyen al desarrollo de dicha metamorfosis (Rybicka, 1967; Ogren, 1968; Freeman, 1973; Koziol, 2017). Se ha demostrado que durante esta metamorfosis se establece el eje antero-posterior definitivo de los cestodos, con la expresión polarizada de genes que en otros animales están involucrados en el establecimiento de los ejes corporales durante la embriogénesis (Koziol y col., 2016). También durante la metamorfosis larvaria se pierden algunas estructuras específicas de la oncosfera. En particular el sistema de seis ganchos asociados a un complejo sistema de fibras musculares para la motilidad de la oncosfera deja de ser funcional. Los ganchos y posiblemente otras estructuras relacionadas quedan desplazados hacia el extremo posterior de la larva (Freeman, 1973; Koziol, 2017) y probablemente son eliminadas. Por estas características, la metamorfosis larvaria de cestodos (eucestodos) posiblemente constituya un ejemplo de desarrollo máximo indirecto (Koziol, 2017).

Los cestodos son particularmente derivados en su morfología y desarrollo. Por un lado el desarrollo embrionario temprano es particular, consiste en divisiones celulares asimétricas y asincrónicas (Rybicka, 1967). Por otro lado los cestodos carecen de tubo digestivo y no presentan estructuras endodérmicas durante el desarrollo. Por estas características ha sido un desafío realizar comparaciones con el desarrollo embrionario de otros animales, incluso con platelmintos de vida libre. La metamorfosis larvaria, por otro lado, representaría un proceso de desarrollo comparable con etapas tardías del desarrollo embrionario de otros platelmintos (Martín-Durán y Egger, 2012; Koziol y col., 2016; Koziol, 2017). Además, la metamorfosis larvaria es crítica para el establecimiento del parásito en el hospedador intermediario; es en esta etapa que el parásito es más susceptible, y una vez que la metamorfosis finaliza, el parásito puede mantenerse en forma estable en los tejidos del hospedador (Brehm y Koziol, 2017). A pesar de la importancia de esta metamorfosis en el ciclo vital de los cestodos, es muy poco lo que se sabe del proceso.

Por otra parte, la transición del estadio de metacestodo a gusano adulto, que ocurre en el proceso de infección del hospedador definitivo, involucra una metamorfosis sin cambios en la organización general del plan corporal. El metacestodo completamente formado presenta ya un escólex en el extremo anterior, con un sistema nervioso organizado, mientras que el extremo posterior se encuentra relativamente indiferenciado y constituye el cuello presuntivo (Webb y Davey, 1975). El crecimiento en esta transición involucra la activación de la proliferación celular en las células germinativas del cuello presuntivo (Bolla y Roberts, 1971; Pouchkina-Stantcheva y col., 2013; Koziol y col., 2014) y la posterior diferenciación de estróbila (Wikgren y col., 1971; Smyth y McManus, 1989; Koziol y col., 2010b).

### 1.2.1 Metamorfosis larvaria en cestodos

En grupos de divergencia basal en cestodos como Amphilinidea y Gyrocotylidea, se reconoce un tipo de larva ciliada, llamada lycophora, que eclosiona en el ambiente acuático (de agua dulce o marino) y alcanzan allí al hospedador intermediario activamente (Rohde, 1994). La lycophora presenta los sistemas nervioso, muscular y excretor relativamente desarrollados, 10 ganchos en el extremo posterior, e infecta activamente al hospedador intermediario (Rohde, 1994; Koziol, 2017). Sin embargo, el desarrollo de la metamorfosis larvaria en estos grupos no ha sido estudiado.

En contraposición, los cestodos pertenecientes al clado Eucestoda presentan larvas hexacantas que presentan 6 ganchos y son reducidas en tamaño y estructuras. En especies del orden Diphylobothriidea la larva hexacanta es ciliada y se la denomina coracidio; nada activamente pero igualmente debe ser ingerida para realizar la infección del hospedador intermediario. Al atravesar el intestino del hospedador (invertebrado) pierde la capa ciliada y se desarrolla en el hemocele para formar una segunda larva con un mayor grado de organización del sistema nervioso (Wikgren, 1986; Gustafsson, 1990). Las larvas hexacantas, presentes en la mayoría de los eucestodos son del tipo oncosfera, carecen de cilias en su superficie, permanecen protegidas por envolturas y se transfieren al hospedador intermediario al ser ingeridas. Se caracterizan por presentar seis ganchos, un complejo sistema de fibras musculares y pocas estructuras nerviosas asociadas (Koziol, 2017). En el

proceso de infección, la larva eclosiona y alcanza sitios parenterales en el hospedador intermediario mediante el movimiento coordinado de los ganchos. El desarrollo de la metamorfosis larvaria ha sido estudiado con cierto grado de detalle en especies del orden Cyclophyllidea por lo que nos enfocaremos en este grupo.

Luego de la infección, los movimientos característicos de la oncosfera cesan y comienza una etapa de crecimiento por proliferación celular a partir de las células germinativas (Ogren, 1968; Sakamoto y Sugimura, 1970; Freeman, 1973). La forma de las larvas (metacestodos) es aproximadamente esférica en una primera etapa. En algunos grupos continúa el desarrollo como una estructura compacta, mientras que en otros grupos se desarrolla una cavidad central como es el caso de las familias Hymenolepididae y Taeniidae.

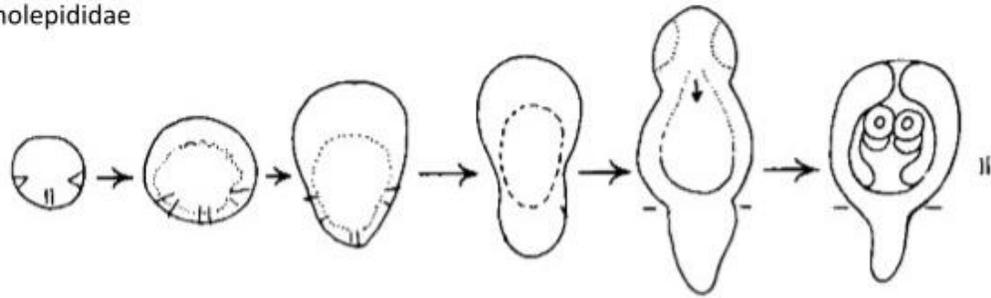
Los metacestodos de Hymenolepididae desarrollan una cavidad central a la vez que crecen gradualmente y adquieren una forma ovoide. Las larvas se vuelven gradualmente más alargadas en el eje antero-posterior y se distinguen en este estadio tres regiones: el pre-escólex en el extremo anterior que se caracteriza por una mayor densidad celular, la zona media que presenta la cavidad central y el extremo posterior que se denomina cercómero (figura 14A). Las larvas en metamorfosis presentan actividad contráctil en forma de onda, y se ha confirmado que presentan fibras musculares sub-tegmentarias y sobre la cavidad. El siguiente estadio en el desarrollo se caracteriza por la retracción del pre-escólex hacia la cavidad que depende de la actividad muscular (Caley, 1974). El metacestodo resultante se denomina cisticercoide y presenta el escólex y cuello presuntivos protegidos por tejidos especializados que forman una cápsula, mientras que la mitad posterior de la larva, donde pueden permanecer como relictos los ganchos de la oncósfera, se denomina cercómero (Voge, 1967; Freeman, 1973). Los tejidos de la cápsula y el cercómero serán luego descartados en el proceso de infección del hospedador definitivo.

En Taeniidae se pueden encontrar varias morfologías de metacestodos siendo la más simple el cisticerco, que presenta un único escólex. Durante la metamorfosis en taenidos también se forma una cavidad central. El extremo anterior se diferencia por un aumento en la densidad de células y el desarrollo del pre-escólex plegado hacia adentro de la cavidad

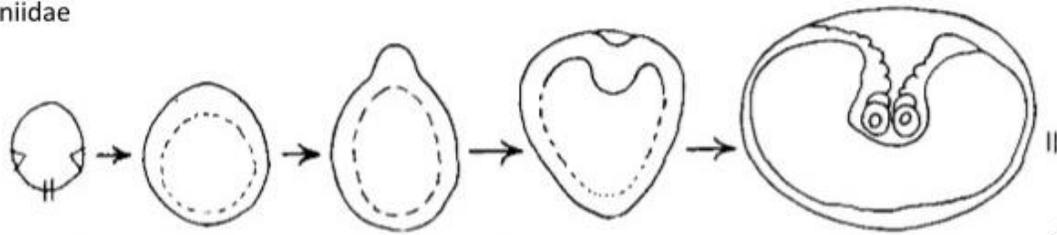
(figura 14B). El escólex queda rodeado por el tejido posterior que se denomina vesícula (Voge, 1967). Existen ejemplos de multiplicación asexual de las larvas en este grupo, con el desarrollo de múltiples escóleces a partir del tejido de la vesícula.

Las larvas de *E. multilocularis* y *E. granulosus*, que son patógenas para seres humanos y muchos animales de producción, se desarrollan como un quiste. El metacestodo desarrolla una gran cavidad y una cubierta acelular en la parte externa, y del tejido del quiste se desarrollan múltiples escóleces (Morseth, 1967; Voge, 1967; Koziol y col., 2016). Al estudiar el desarrollo larvario de *E. multilocularis* en comparación con el desarrollo típico de los cisticercoides de *Hymenolepis sp.* se observó una importante conservación en la expresión de genes que participan en la determinación del eje antero-posterior lo que permite establecer correspondencias entre las diferentes regiones de las larvas y explicar en parte cómo se genera una morfología tan modificada como es el quiste de *E. multilocularis* (Koziol y col., 2016).

(A) Hymenolepididae



(B) Taeniidae



iv Figura 14

Figura 14. Principales patrones de desarrollo de la metamorfosis larvaria en el orden Cyclophyllidea. (A) Patrón que lleva al desarrollo de un cisticercoide en la familia Hymenolepididae. (B) Patrón que lleva al desarrollo de un cisticerco en la familia Taeniidae. Esquemas tomados de Voge, 1967.

### 1.3. Cultivo *in vitro* de cestodos

Ha sido importante contar con métodos de cultivo *in vitro* como herramientas para la investigación sobre la biología de cestodos, para lograr realizar manipulaciones experimentales de los parásitos y estudiar procesos de su desarrollo. La investigación de las condiciones requeridas para el cultivo *in vitro* de cestodos se ha realizado en varias especies y mucho trabajo se ha realizado con especies del género *Hymenolepis* (Evans, 1980).

Inicialmente los ensayos de cultivo *in vitro* de especies de *Hymenolepis* se enfocaron en el desarrollo del estadio adulto. El cultivo de este estadio puede iniciarse con gusanos obtenidos del tubo digestivo de roedores o con larvas cisticercoides obtenidas de insectos, que pueden ser activadas *in vitro* para continuar el desarrollo (Evans, 1980). Se utilizaron entonces soluciones de enzimas digestivas y sales biliares para la activación de cisticercoides y medios de cultivo bifásicos con una base de agar y sangre (de conejo u oveja) y una solución de sales de Hanks o medio de Eagle para el desarrollo de los gusanos. Las condiciones para el cultivo son de 37°C y se probaron diferentes fases gaseosas como 97% N<sub>2</sub> y 3% CO<sub>2</sub> o N<sub>2</sub> con 1 – 20% de oxígeno. Estos cultivos requieren cambios de medio cada 24 hs (Evans, 1980). En varios ensayos se observó el desarrollo de estróbila hasta el estadio grávido (formación de huevos). Este método ha sido probado con éxito para el cultivo *in vitro* de las primeras etapas del desarrollo del adulto en nuestro laboratorio (Preza, 2021).

Para el desarrollo *in vitro* de las larvas cisticercoides de *Hymenolepis* sp., que requieren un insecto como hospedador se han probado medios de cultivo comúnmente usados para células de insecto. Estos ensayos pioneros usaron un medio de cultivo de Landureau, inicialmente diseñado para el cultivo de células de cucaracha, adicionado con suero bovino (Evans, 1980). El medio de cultivo incluye aminoácidos, sales, azúcares, ácidos orgánicos y componentes complejos como extracto de levaduras e hidrolizado de lactoalbúmina. Los cultivos se mantuvieron a 28°C (o 26°C) y en atmósfera natural o con CO<sub>2</sub> (5%) y N<sub>2</sub> (95%), con variantes según la especie. Para distintas especies del género *Hymenolepis* se logró realizar el desarrollo completo de la metamorfosis larvaria desde oncosfera a cisticercoide maduro en condiciones de cultivo *in vitro* y axénico. Es el caso de *H. citelli* (Voge y Green,

1975), *H. diminuta* (Voge, 1975), *H. microstoma* (Seidel, 1975) e *H. nana* (Seidel y Voge, 1975).

El desarrollo de las larvas *in vitro* es similar a lo que se ha reportado de muestras desarrolladas *in vivo* (sección 1.2.1). Las cuatro especies estudiadas presentaron los siguientes cuatro estadios del desarrollo. Primero, la oncósfera crece y se forma una estructura esférica con una cavidad central. Segundo, la larva se alarga y pasa a tener forma ovoide o de pera identificándose dos regiones (anterior y posterior). Tercero, la larva se alarga más y son distinguibles tres zonas diferentes (escólex, quiste y cercómero). En cuarto lugar, la porción anterior se retrae hacia la zona media o quiste que la recubre. A continuación, los cisticercoides continúan desarrollándose por varios días antes de ser infectivos. En general, la tasa de desarrollo varía según la especie y se observó que el desarrollo es más lento *in vitro* al comparar con el desarrollo normal *in vivo*. El desarrollo de *H. microstoma in vitro* presentó algunas diferencias con el desarrollo *in vivo* (Seidel, 1975), en particular se observó un mayor desarrollo del pre-escólex previo al proceso de retracción.

#### 1.4. Tegumento

Los platelmintos parásitos del clado Neodermata no están cubiertos por una epidermis típica, sino que presentan un tegumento sincitial (Tyler y Hooge, 2004). El tegumento consiste en una banda superficial de citoplasma (el tegumento distal) que está conectada por finos puentes citoplasmáticos a cuerpos celulares nucleados individuales (llamados citones), situados debajo de la lámina basal y la musculatura superficial. El tegumento distal es continuo, cubre todo el cuerpo del animal y cumple funciones de protección y absorción de nutrientes.

La superficie del tegumento distal presenta especializaciones diferentes en cada grupo de parásitos. Los trematodos digeneos presentan espinas cuticulares ancladas a la lámina basal, que proyectan la membrana apical la cual adquiere su forma (Morris y Threadgold, 1968). En monogeneos la membrana presenta microvellosidades o pliegues irregulares. Los cestodos adultos presentan microvellosidades cilíndricas de forma regular que se denominan microtricos (Morseth, 1967).

Se encuentran diferencias de grosor del tegumento distal y en las especializaciones de la membrana apical en los diferentes estadios del desarrollo del ciclo de vida de los parásitos. Las larvas nadadoras de trematodos y monogeneos presentan una epidermis celular y ciliada, mientras que el tegumento sincitial se forma por debajo de la misma y la sustituye en la metamorfosis larvaria (Tyler y Hooge, 2004).

El tegumento de las larvas de cestodos es también sincitial, aunque se diferencia por ser más delgado y por la falta de los microtricos característicos del estadio adulto. Las larvas hexacantas de Diphylobothriidea (coracidio) presentan un sincitio ciliado que luego es reemplazado por el sincitio tegumentario en la metamorfosis larvaria (Lumsden y col., 1974). Las larvas hexacantas de otros eucestodos (oncosferas) presenta un tegumento sincitial que puede presentar extensiones o pliegues irregulares (Collin, 1969). El tegumento distal crece durante la metamorfosis larvaria y se ha observado que desarrolla microvellosidades, que en el pre-escólex son similares a las del estadio adulto (Morseth, 1967; Collin, 1970; Rybicka, 1973). Como hipótesis general, se considera que el tegumento

distal es remodelado durante la metamorfosis larvaria con la incorporación de nuevos citones tegumentarios al sincitio (Rybicka, 1973).

Una serie de trabajos recientes sobre el tegumento en el trematodo *S. mansoni* demostraron que tiene lugar un importante proceso de renovación celular para el mantenimiento normal de esta estructura (Collins y col., 2016; Wendt y col., 2018, 2020). Se considera un modelo según el cual se especifican progenitores tegumentarios proliferantes a partir de los neoblastos (células madre), que migran hacia el tegumento, extienden proyecciones celulares y se fusionan con el tegumento distal. Para este parásito se encontraron genes marcadores del tegumento diferenciado y se desarrolló un método para marcar el tegumento distal y los citones tegumentarios de forma específica. El método se basa en la incubación de los parásitos vivos en una solución hipotónica con dextrano fluorescente de 10 kDa. Dado que en condiciones isotónicas no se logra el marcado, se interpreta que el método involucra un daño en la membrana externa del tegumento (Wendt y col., 2018). Este protocolo fue adaptado con éxito a los diferentes estadios del ciclo de vida de *H. microstoma* en nuestro laboratorio (Guarnaschelli, 2020; Montagne y col., 2023).

En *S. mansoni* se identificaron dos genes que participan en la especificación del linaje tegumentario. Son miembros de la familia de proteínas ZFP-1 que es específica de platelmintos. Presentan dominios de dedos de zinc C2H2 que pueden interaccionar con ADN, ARN o proteínas. Un gen homólogo en planarias (*zfp-1*) es expresado en una subpoblación de neoblastos que dan lugar al linaje epidérmico (van Wolfswinkel y col., 2014).

## 1.5. Miogénesis

### 1.5.1. Miogénesis en vertebrados e invertebrados modelo

Los músculos se clasifican por su estructura y función en estriados y no-estriados. En los vertebrados e insectos los músculos estriados se subdividen en músculos esqueléticos (o somáticos) y músculo cardíaco, mientras que los músculos no-estriados constituyen los músculos lisos o viscerales. En cambio, en muchos invertebrados, todos los músculos son de aspecto liso en su ultraestructura. Estudios comparativos de los componentes moleculares de los músculos, involucrados en la función de contracción, indican que las

moléculas clave para la contracción muscular son compartidas por todos los animales y su origen es aún más antiguo. Sin embargo, se identificaron innovaciones específicas que diferencian a los músculos de animales bilaterales y cnidarios (Steinmetz y col., 2012). Los músculos estriados se consideran homólogos entre los animales bilaterales con base en la presencia de moléculas características como Troponinas (I y T) y algunos componentes de la estructura de los discos Z como  $\alpha$ -actinina y Titina (Steinmetz y col., 2012). También se ha postulado la homología de los músculos lisos y cardíacos de vertebrados e invertebrados (Brunet y col., 2016).

En la mayoría de los animales triblásticos, durante el desarrollo embrionario, diferentes regiones del embrión generan poblaciones progenitoras de diferentes músculos. Las células musculares en los animales vertebrados e insectos como la mosca *Drosophila* se generan en el desarrollo embrionario a partir del mesodermo. El mesodermo se subdivide en diferentes regiones donde se especifican las células progenitoras (mioblastos) de los diferentes tipos de músculo. El desarrollo de músculos involucra procesos de morfogénesis celular acompañados por la expresión de genes reguladores específicos (Andrikou y Arnone, 2015). Existe un alto grado de conservación en los procesos y los genes que participan en la formación del músculo esquelético de vertebrados y el músculo somático de *Drosophila* (que son equivalentes en sentido amplio; Taylor, 2006) y nos enfocaremos en este tipo de músculo.

En los vertebrados, los músculos esqueléticos se forman a partir de los somites (mesodermo paraxial). Los progenitores musculares se especifican en el derma-miotomo (en la parte dorsal de cada somite), influenciados por una combinación de gradientes de morfógenos y por la activación de la vía Notch (Vasyutina y col., 2007). La especificación y diferenciación de los mioblastos involucra la expresión secuencial de factores de transcripción. Los precursores de mioblastos expresan los genes *Pax7* y *Pax3* que en una jerarquía de regulación, actúan río arriba de los siguientes. En la especificación de los mioblastos participa una familia de genes reguladores miogénicos (MRFs) que codifican para factores de transcripción de tipo hélice-bucle-hélice básica (bHLH). Entre ellos *myf5* y *myoD* tienen una función en la especificación de todos los músculos (Davis y col., 1987; Andrikou y

Arnone, 2015). En contraste, la expresión de *miogenina* es importante para el proceso de diferenciación de músculo esquelético (Edmondson y Olson, 1990; Taylor, 2006). En la etapa de diferenciación del músculo esquelético, los mioblastos se fusionan para formar fibras musculares multinucleadas.

El músculo esquelético de los adultos mantiene células madre quiescentes llamadas células satélite que se caracterizan por la expresión de *Pax7*. El músculo puede repararse o regenerarse gracias a las células satélite que pueden ser activadas para proliferar y dar lugar a progenitores musculares. Los mioblastos disminuyen la expresión de *Pax7* y comienzan a expresar MRFs, se diferencian y fusionan para formar nuevas fibras musculares (Dumont y col., 2015).

Otro factor de transcripción importante para la diferenciación de músculo es Mef2 (de la familia MADS), que participa en la diferenciación de los tres tipos de músculo en los vertebrados y en *Drosophila*. En los vertebrados Mef2 es regulado directamente por MRFs y potencia su actividad mediante regulación transcripcional cooperativa (Molkentin y Olson, 1996).

En el embrión de *Drosophila* las regiones del mesodermo se establecen con la influencia de morfógenos provenientes del ectodermo (Wg, Hh, Dpp). En cada segmento el mesodermo con forma de hoja se subdivide en cuatro zonas, una de las cuales es el mesodermo somático, en la parte anterior de cada segmento, que expresa *twist* (*twi*, de tipo bHLH). En esta región de alta expresión de *twi*, se generan precursores para músculo cardíaco y músculo somático. El factor Twi activa *tinman* y *mef2* que participan en el desarrollo de diferentes tipos de músculo. En particular, altos niveles de Twi llevan a la formación de músculo somático (Baylies y col., 1998; Tixier y col., 2010).

Los mioblastos se especifican en un proceso de inhibición lateral mediado por las vías de MAPK y Notch. Los mioblastos progenitores individuales mantienen activa la vía MAPK que lleva a aumentar la actividad de Notch en las células vecinas, que serán en su mayoría mioblastos de fusión. Los progenitores se dividen y dan lugar a células fundadoras para el desarrollo de músculos de la larva o células precursoras musculares para los músculos del

estadio adulto. Cada célula fundadora inicia el desarrollo de un músculo específico y tiene lugar la fusión con mioblastos de fusión, generando así los músculos multinucleados de la larva. Las células precursoras musculares adultas mantienen la actividad de Notch, se mantienen indiferenciadas durante el desarrollo embrionario y generan luego los nuevos músculos del adulto en el proceso de metamorfosis (Tixier y col., 2010).

El gen homólogo a los MRFs de vertebrados en *Drosophila* es *nautilus (nau)*, pero a diferencia de los MRFs que participan en la especificación de diferentes tipos de músculo, *nau* participa en la especificación y el desarrollo de algunos músculos somáticos específicamente y constituye entonces un gen de identidad muscular (Abmayr y Keller, 1997). Los músculos difieren de uno a otro por la expresión de una combinación de genes de identidad muscular, que inicialmente son expresados por las células fundadoras y participan en los procesos de diferenciación (Tixier y col., 2010).

El nematodo *Caenorhabditis elegans* también presenta un solo gen homólogo de los MRFs de vertebrados (*hlh-1*, Krause y col., 1990). Los genes *hlh-1* (MyoD, bHLH), *unc-120* (homólogo de *Mef2*, MADS) y *hnd-1* (HAND, bHLH) actúan de forma redundante para especificar los músculos de la pared corporal en estadios embrionarios (Baugh y Hunter, 2006). En comparación, en *Drosophila* los homólogos de *unc-120* y *hnd-1* se relacionan con el desarrollo de músculo liso y cardíaco.

Durante el desarrollo de músculos en larvas de *Platynereis dumerilii* (Annelida, un phylum más cercano a los platelmintos que los modelos clásicos de biología del desarrollo) el gen *mef2* aparece expresado en todos los músculos (viscerales y somáticos) mientras que *myoD* se expresa únicamente en los músculos somáticos longitudinales (estriados). Los músculos estriados en esta especie presentan estriación oblicua con elementos Z discontinuos como es característico de los invertebrados protostomados. Los músculos viscerales son lisos y presentan cuerpos densos distribuidos (Brunet y col., 2016).

### 1.5.2. Miogénesis en platelmintos

Los platelmintos presentan músculos sub-epidérmicos organizados en capas ordenadas y músculos dorso-ventrales, que mantienen la forma y la integridad del cuerpo. También presentan fibras musculares asociadas con algunos órganos como el sistema digestivo, la faringe u órganos reproductivos. Las fibras musculares de planarias son uninucleadas y pequeñas (de 150 – 200  $\mu\text{m}$  de longitud y de 5 – 10  $\mu\text{m}$  de ancho). A nivel ultra-estructural presentan elementos densos discontinuos dispuestos con cierta regularidad y las variantes de cadena pesada de miosina (*mhc*) que expresan son más similares a las del músculo estriado de vertebrados (Hooper y Thuma, 2005; Cebrià, 2016).

En planarias, el músculo de la pared corporal consiste en capas ordenadas de fibras con orientaciones particulares. La más externa es de músculo circular, por debajo se encuentra una capa de fibras diagonales y finas fibras longitudinales, y la más interna es una capa de gruesas fibras longitudinales (Cebrià, 2016; Scimone y col., 2017). Al estudiar la regulación de la formación de las fibras musculares en planarias adultas se validaron dos factores de transcripción: *myoD* y *nkx1-1* que son específicos para la formación de las fibras longitudinales y circulares respectivamente (Scimone y col., 2017). *nkx1-1* codifica para un factor de transcripción con homeodominio NK1 y es homólogo al factor slouch de *Drosophila* (codificado por el gen *slou*). Como *nau* (gen homólogo de *myoD*), *slou* es un gen de identidad de músculo, requerido para la formación de solo algunos músculos (Knirr y col., 1999).

Los cestodos y tremátodos presentan también capas de músculo sub-tegumentario. En los cestodos se encuentran dos capas en orientación circular y longitudinal, mientras que los trematodos tienen también músculos diagonales asociados a las fibras longitudinales (Collins y col., 2011). En ambos casos presentan además organizaciones particulares de músculos en los órganos internos o en los órganos de adhesión específicos de cada parásito como las ventosas (Cousin y col., 1995; Mair y col., 2000, 2003; Collins y col., 2011). Los cestodos presentan además del músculo sub-tegumentario, también músculos internos con orientación longitudinal, dorso-ventral o transversal (Koziol y col., 2011).

Estudios de microscopía electrónica observaron que las células musculares de los cestodos suelen presentar dos regiones bien distinguidas, una de fibrillas contráctiles y otra que contiene organelos y el núcleo, llamada miocitón. En diferentes especies o estadios del ciclo de vida la zona de conexión de las dos regiones puede ser amplia o de finos puentes citoplasmáticos (Conn, 1993). En el citoplasma del miocitón se pueden encontrar organelos membranosos como retículo endoplasmático rugoso, ribosomas libres, reservas de glucógeno y gotas lipídicas (Gustafsson, 1976; Conn, 1993).

De los factores relacionados con la diferenciación de músculos, se ha estudiado la expresión de *myoD* en larvas y adultos de *H. microstoma* y se ha relacionado con el desarrollo de estructuras musculares (Olson y col., 2018). Los genes ortólogos de *myoD* y *nkx1-1* en *E. multilocularis* se relacionaron con la formación de fibras musculares en ensayos *in vitro* (Maisl, 2019).

## 1.6. Neurogénesis

### 1.6.1. Neurogénesis en vertebrados e invertebrados modelo

En el desarrollo embrionario de vertebrados y *Drosophila* el proceso de neurogénesis se inicia con progenitores que forman parte de una capa epitelial de origen ectodérmico, con el potencial para generar neuronas y glía (Bertrand y col., 2002). Factores de transcripción de la familia SoxB aparecen expresados en las regiones con potencial neurogénico (Hartenstein y Stollewerk, 2015).

En el embrión de *Drosophila* se generan células progenitoras neurales (neuroblastos) en el neuroectodermo, en la zona ventral-lateral del estadio de blastodermo celular, que delaminan hacia el interior del embrión. Son considerados células madre neurales embrionarias, se dividen de forma asimétrica un número limitado de veces dando lugar a un neuroblasto y una célula madre ganglionar que genera neuronas y glía (Homem y Knoblich, 2012). Los factores de transcripción Dichaete y SoxN (de la familia SoxB) se encuentran expresados en áreas del neuroectodermo y son importantes para la formación de neuroblastos (Crews, 2019). La especificación de neuroblastos individuales involucra la expresión del ligando Delta de la vía de Notch y genes de la familia de *atonal* y *achaete-scute*, con funciones pro-neurales. Los genes pro-neurales aparecen expresados en el neuroectodermo previo a la aparición de alguna señal de diferenciación neuronal y promueven la generación de las células progenitoras neurales (Bertrand y col., 2002). Además algunos genes de estas familias aparecen expresados más tardíamente y participan en procesos de diferenciación. Son factores de transcripción con dominio bHLH que unen específicamente secuencias de ADN con un motivo de seis nucleótidos (CANNTG) conocido como E-box. Los factores bHLH pro-neurales y otros bHLH neurales son, en su mayoría, activadores transcripcionales (Bertrand y col., 2002).

En *Drosophila* se identificó al gen *elav* por su expresión temprana en las neuronas post-mitóticas, que se mantiene en las neuronas maduras (Robinow y White, 1988). El factor Elav es una proteína de unión al ARN que regula de procesos de splicing y poli-adenilación de ARNm generando isoformas específicas de neuronas. Se han identificado genes parálogos de la familia Elav/Hu que participan del mismo tipo de regulación y su actividad es

compensatoria (Lee y col., 2021). Las proteínas homólogas en mamíferos, de la familia Hu, regulan tanto el procesamiento de pre-ARNm, así como también la estabilidad y la traducción de los ARNm (Zhu y col., 2006; Lee y col., 2021). Diversos experimentos han demostrado que las proteínas Hu específicas de neuronas son importantes para la diferenciación neuronal (Akamatsu y col., 2005).

Una vez concluido el desarrollo embrionario, el sistema nervioso larvario de *Drosophila* consiste en dos lóbulos cerebrales unidos por conectivos al cordón ventral. Presenta un gran número de neuroblastos quiescentes que se reactivan durante el desarrollo larvario para dar lugar a neuronas específicas del estadio adulto (Homem y Knoblich, 2012). Estas neuronas se mantienen inmaduras hasta que ocurre la metamorfosis al estadio adulto. Durante la metamorfosis tiene lugar un proceso de remodelado del sistema nervioso central. Las neuronas larvales que se conservan (que constituyen un bajo porcentaje), así como las neuronas inmaduras específicas del adulto generadas durante el desarrollo larvario, desarrollan neuritas. Como resultado los neuropilos del cerebro y del área torácica del cordón nervioso se expanden. También tienen lugar procesos de degeneración de neuronas y una reducción del cordón nervioso de la zona del abdomen (Truman, 1990).

El sistema nervioso del nematodo *C. elegans* hermafrodita está formado por 302 neuronas organizadas en varios ganglios en la cabeza y la cola y un cordón nervioso ventral. Para esta especie se ha descrito en detalle la anatomía del sistema nervioso y los linajes de diferenciación. El estudio de los linajes en esta especie muestra que las neuronas provienen de diferentes linajes, de forma no-clonal. Sin embargo, se identifican genes que controlan decisiones en linajes que dan lugar a neuronas. Entre ellos *lin-32* (tipo *atonal*), *hlh-14* (tipo *achaete-scute*) y *cnd-1* (tipo *neuroD*) tienen función pro-neural. De forma complementaria, las células también pueden ser influenciadas por factores anti-neurales como *lin-22* (tipo *hairy*) que se vincula con células de la hipodermis. A continuación, factores de transcripción que actúan río abajo se relacionan con la identidad específica de los linajes neuronales individuales. Más adelante, los factores de transcripción selectores terminales regulan procesos de diferenciación y mantienen la identidad específica de la neurona (Hobert, 2008, 2010).

En los embriones de vertebrados, los progenitores neurales se encuentran formando parte del tubo neural (neuroepitelio); tienen propiedades de autorenovación y producen progenitores intermedios restringidos a un destino neuronal o glial, que proliferan previo a diferenciarse. Los genes de la familia *soxB* son reguladores del desarrollo del sistema nervioso central. Genes de la sub-familia *soxB1* participan en el establecimiento del neuroectodermo (inducción neural) y el mantenimiento de las células madre neurales en un estado pluripotencial y proliferativo, mientras que la sub-familia *soxB2* participa en procesos de diferenciación neuronal (Guth y Wegner, 2008). En el proceso de especificación de progenitores neurales tiene lugar un proceso de inhibición lateral mediante la expresión de ligandos de la vía de Notch en los futuros progenitores, que activan la vía en las células vecinas. Algunos genes de las familias de *achaete-scute* y *neurogenina* (relacionados con *atonal*) tienen funciones pro-neurales. Otros genes bHLH neurales participan en procesos más tardíos como la especificación de destinos neuronales (en contraposición de glía) o la diferenciación neuronal. Entre ellos, los genes de la familia de *neuroD* actúan río abajo de los genes pro-neurales y participan en procesos de diferenciación neuronal (Bertrand y col., 2002).

Los factores de transcripción de la familia *coe* participan en el desarrollo del sistema nervioso en vertebrados siendo expresados principalmente en neuronas en diferenciación. Constituyen una familia específica con un dominio hélice-bucle-hélice atípico. En el desarrollo del sistema nervioso de *Drosophila* el gen ortólogo *collier* se expresa principalmente en células post-mitóticas y se asocia con interneuronas de varios tipos. Los genes ortólogos se han relacionado con el desarrollo del sistema nervioso también en otros invertebrados deuterostomados y protostomados (Demilly y col., 2011).

De los modelos invertebrados del clado Lophotrochozoa se han estudiado en detalle procesos de neurogénesis embrionaria y post-embriónica en anélidos y en planarias. En el desarrollo de la larva trocófora del anélido *Platynereis* se distingue un neuroectodermo en la zona ventral medial, con expresión de *neuroD* y *soxB*, que gradualmente desarrolla múltiples capas más profundas. Las células progenitoras neurales (proliferantes) del sistema nervioso central se encuentran ubicadas cercanas a la línea media ventral mientras que las

células post-mitóticas (neuronas en diferenciación) se ubican en áreas más profundas y laterales. Las células progenitoras neurales expresan marcadores pro-neurales como *achaete-scute* y *neurogenina* (Demilly y col., 2013). En particular el gen *olig* se expresa en células progenitoras neurales ubicadas en áreas laterales. La expresión temprana de *neuroD* en el neuroectodermo en esta especie se diferencia de su expresión más tardía en los vertebrados (Simionato y col., 2008). El gen *elav* se expresa tempranamente en células post-mitóticas así como en algunas células proliferantes (Simionato y col., 2008; Demilly y col., 2013). Gradualmente, durante el desarrollo larvario se desarrollan estructuras de la zona del tronco como el cordón nervioso ventral y neuronas periféricas asociadas con los apéndices llamados parapodios (Simionato y col., 2008). El gen *coe* se expresa en el sistema nervioso en desarrollo, en particular en células post-mitóticas del cordón nervioso (Demilly y col., 2011, 2013). En este organismo tiene lugar una metamorfosis de asentamiento, en la cual la larva pelágica se transforma en un juvenil de hábitos bentónicos, que involucra la pérdida de estructuras larvales y el crecimiento rápido del cerebro con la formación de nuevas neuronas (Fischer y col., 2010).

A diferencia de casi todos los otros grupos de animales, en el desarrollo embrionario de los platelmintos no se identifica una región específica del ectodermo dedicada a la neurogénesis. En los embriones de planarias, los progenitores para el desarrollo del sistema nervioso se generan tardíamente a partir de células mesenquimales (blastómeras) dispersas que expresan *piwi* (Davies y col., 2017). Se detecta la expresión de *soxB1* (*soxB1-1*) en blastómeras dispersas en los estadios 2 – 3 (S2-3). En el estadio 4 la expresión de *soxB1* coincide con *elav* (*elav-4*) que constituye un marcador temprano relacionado con el destino neural. El rudimento inicial del sistema nervioso (*elav*<sup>+</sup>) en este estadio presenta forma de anillo y se localiza en el margen de la mitad ventral del embrión (Monjo y Romero, 2015). En el estadio 5 se identifica un primordio neural formado por dos agrupamientos de células ventro-laterales a partir del cual se desarrolla el cerebro y el cordón nervioso ventral bilateralmente. En los estadios de morfogénesis y organogénesis (S5-6) se evidencia la expresión de factores de transcripción asociados con la especificación de neuronas (entre ellos *coe* y *pax6*; Davies y col., 2017). *soxB1* se expresa en células progenitoras al igual que

*achaete-scute* y *neuroD* (genes pro-neurales bHLH). Por otro lado, la expresión de *soxB2* se asocia con procesos de diferenciación en etapas tardías como ocurre en vertebrados (Monjo y Romero, 2015).

El sistema nervioso de las planarias presenta un constante recambio de células y puede adaptar su tamaño o regenerarse en el estadio adulto, por lo que se ha utilizado para el estudio de procesos de desarrollo (Wyss y col., 2022). Estudios de transcriptómica (*single cell RNA-seq*) han identificado diferentes poblaciones neuronales, que suelen coexpresar genes marcadores de diferentes sistemas de neurotransmisión. Las células madre para el linaje neural se encuentran entre los neoblastos (células *piwi-1<sup>+</sup>*). Varios estudios han identificado posibles progenitores neurales en un estadio de transición hacia destinos neurales basados en la coexpresión de marcadores característicos de neoblastos y células neurales (Cowles y col., 2013; Scimone y col., 2014). Se identificó un reservorio de neoblastos especializados (neurales) en la región ventral-medial entre los dos lóbulos del cerebro, que es regulado por actividad de señalización de hedgehog (Hh) proveniente de las neuronas diferenciadas (Currie y col., 2016). Los factores de transcripción con homeodominio *nkx2.1* y *arx* se asocian con algunos tipos neuronales y neoblastos especializados. Por otro lado, *soxB1* (*soxB1-2*) se expresa como factor pionero en neoblastos que dan lugar a subpoblaciones de células neurales y epidérmicas que comparten la característica de desarrollar cilias (Ross y col., 2018). De los factores bHLH *hesl-3*, *coe* y *sim* se han vinculado con el desarrollo neural y son expresadas en pequeñas poblaciones de neoblastos proliferantes *piwi-1<sup>+</sup>*. En planarias algunos genes que codifican para enzimas requeridas para la síntesis y utilización de ciertos neurotransmisores son expresados tempranamente en procesos de diferenciación neuronal, entre ellos las enzimas colina-O-acetil-transferasa *chat* y pro-hormona convertasa *pc2* (Cowles y col., 2013; Wyss y col., 2022). Otros genes se pueden asociar con procesos de maduración neuronal posteriores, como el canal de potasio y cloruro *kcc* (Wyss y col., 2022).

### 1.6.2. Sistema nervioso de platelmintos parásitos

El sistema nervioso de los platelmintos parásitos es anatómicamente difuso. El sistema nervioso central se compone típicamente por un cerebro formado por dos ganglios, conectados entre sí por una o más comisuras. Estos ganglios se conectan con dos pares de cordones nerviosos longitudinales (dorsales y ventrales), los cuales a su vez se unen por comisuras transversales formando un patrón ortogonal. Los parásitos trematodos digéneos y monogéneos presentan asimetría dorso-ventral, con un mayor desarrollo de los cordones ventrales. En cestodos existen en cambio dos cordones nerviosos longitudinales principales laterales y dos pares de cordones nerviosos longitudinales mediales, simétricos dorso-ventralmente. Adicionalmente los platelmintos parásitos presentan estructuras nerviosas asociadas con los órganos reproductivos y el intestino (excepto cestodos, ya que carecen de aparato digestivo), y suelen poseer órganos de fijación con gran desarrollo muscular y altamente inervados. También presentan terminaciones nerviosas periféricas que llegan a los músculos de la pared corporal y estructuras sensoriales (Maule y col., 2006).

Los sistemas de neurotransmisión presentes en platelmintos parásitos incluyen neurotransmisores clásicos y neuropéptidos. Sin embargo, en trematodos y cestodos se han perdido algunos de los sistemas de neurotransmisión clásicos en comparación con otros grupos de animales, incluyendo los platelmintos de vida libre. En particular en cestodos los sistemas de neurotransmisión clásicos presentes (con ortólogos en el genoma de genes conservados codificantes para enzimas requeridas en su síntesis, transportadores y receptores) son los de tipo colinérgico, serotoninérgico y glutamatérgico, además de la señalización peptidérgica (Preza y col., 2018).

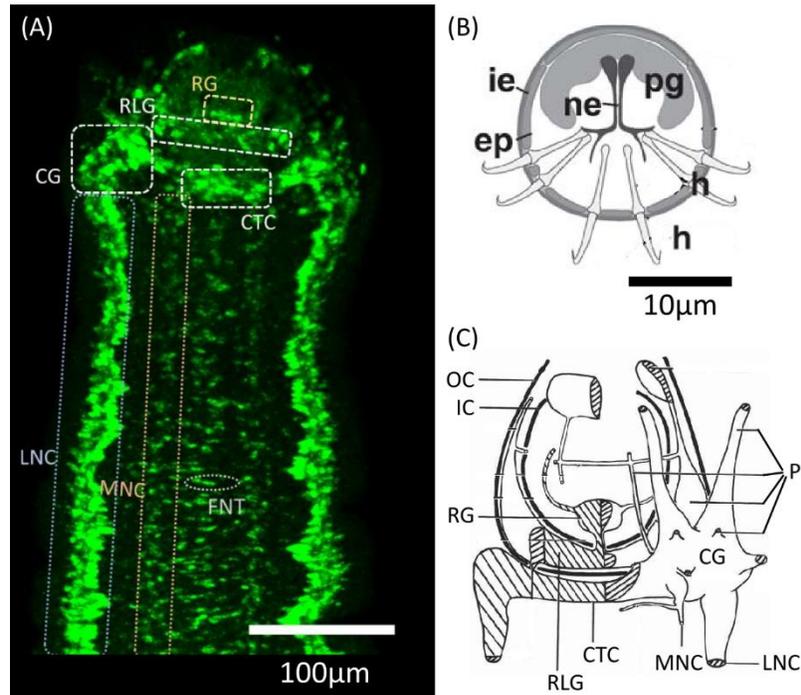
Los análisis mediante inmunomarcación o histoquímica habían detectado inmunoreactividad para serotonina, y actividad de la enzima acetilcolinesterasa en especies del género *Hymenolepis*, logrando una descripción detallada de la anatomía del sistema nervioso (Wilson y Schiller, 1969; Lee y col., 1978). Tratamientos con agonistas colinérgicos asociaron a esta molécula con una función inhibitoria de la actividad muscular general (Wilson y Schiller, 1969) de forma similar a lo que ocurre en planarias (Buttarelli y col., 2000), pero en contraste con la función mioexcitatoria en los vertebrados y otros

invertebrados. Por otra parte, los neurotransmisores serotonina y glutamato se relacionan con funciones mioexcitatorias en cestodos y otros platelmintos parásitos. También los neuropéptidos tipo RFamida (con la secuencia arginina-fenilalanina-amida C-terminal) se han relacionado con funciones mioexcitatorias en los platelmintos (revisado por Maule y col., 2006). Más recientemente, nuestro grupo de trabajo caracterizó la globalidad de neuropéptidos presentes en *H. microstoma* mediante estudios *in silico*, peptidómica y análisis de expresión mediante hibridación *in situ*. Este análisis permitió observar una importante complejidad y singularidad en la señalización peptidérgica, ya que de los neuropéptidos identificados en cestodos y otros platelmintos parásitos la mayoría no presentan homólogos en otros grupos de animales. Sin embargo, de los neuropéptidos conservados con otras especies se caracterizó al neuropéptido SIF-amida (atachina), que estimula la motilidad y la adhesión en el cestodo *M. corti* (Preza y col., 2022).

En el estadio adulto de *H. microstoma* se identifican en el escólex los dos ganglios del cerebro conectados por la comisura cerebral (transversal), un par de ganglios del rostellum y un ganglio más rostral. Del cerebro nacen proyecciones hacia la zona anterior, que se ubican entre las ventosas. En la parte posterior del escólex los ganglios cerebrales se conectan con los cordones nerviosos del cuello: dos longitudinales laterales (o principales) y dos pares de cordones nerviosos mediales (un par dorsal y un par ventral). Delicadas comisuras transversales unen los pares de cordones mediales en las zonas dorsal o ventral (Preza y col., 2018). El sistema nervioso de las larvas cisticercoides maduras presenta la misma organización general (Webb y Davey, 1975; figuras I5A y C).

Por otra parte las larvas oncosferas presentan un sistema nervioso mínimo y pobremente descrito. Las oncosferas no presentan un ganglio cerebroide sino solamente contadas células nerviosas que se asocian con el sistema muscular, como demostraron los análisis iniciales de histología clásica, inmunomarcación y microscopía electrónica (Fairweather y Threadgold, 1981; Hartenstein y Jones, 2003; Świdorski y col., 2018). Análisis de inmunomarcación para estructuras generales como microtúbulos acetilados identificaron solo dos neuronas en especies de *Hymenolepis*, con sus cuerpos celulares ubicados en la línea media próximo al extremo anterior de la larva, con axones que se extienden hacia la

parte posterior y llegan a los músculos asociados a los ganchos (Hartenstein y Jones, 2003; figura 15B). En las oncosferas de *H. microstoma* se distinguen al menos tres neuronas mediante la inmunomarcación para péptidos RFamida y dos de esas neuronas son inmunoreactivas además para el neuropéptido 46 (npp-46) (Preza, 2021). Destacamos que no se ha estudiado el desarrollo del sistema nervioso en la metamorfosis larvaria de cestodos, en particular cómo tiene lugar la transición desde el sistema nervioso mínimo de la larva oncosfera infectiva al sistema nervioso complejo del cisticercoide (Webb y Davey, 1975; Koziol y col., 2013).



v Figura 15

Figura 15. Sistema nervioso de *H. microstoma*: adulto, oncosfera y cisticercoide. (A) La detección de la expresión de la enzima *pc2* mediante hibridación in situ permite distinguir las principales estructuras que forman el sistema nervioso central en el estadio adulto. Tomado de Preza, 2021. (B) Representación esquemática de la oncosfera de *Hymenolepis* sp. Se ilustra la ubicación de las neuronas (*ne*) y sus prolongaciones. Se indican también otras estructuras características de la oncosfera. *ie*: embrióforo; *ep*: epidermis sincitial; *pg*: glándula de penetración; *h*: ganchos. Tomado de Hartenstein y Jones, 2003. (C) Representación esquemática del sistema nervioso de la zona del escólex de la larva cisticercoide madura (activada) de *H. microstoma*. Tomado de Webb y Davey, 1975. *CG*: ganglio cerebral; *CTC*: comisura cerebral transversal; *FNT*: fibras nerviosas transversales; *IC*: cápsula interna del roseto; *LNC*: cordones nerviosos laterales; *MNC*: cordones nerviosos mediales; *OC*: cápsula externa del roseto; *P*: proyecciones nerviosas anteriores; *RG*: ganglio rostral; *RLG*: ganglio rostral.

## 1.7. Hipótesis y objetivos

### Hipótesis del trabajo

Durante la metamorfosis larvaria de cestodos ocurre un remodelado general de la larva en el cual se eliminan los tejidos específicos de la oncosfera, y se forman los nuevos tejidos del metacestodo a partir de células germinativas, utilizando procesos semejantes a los que ocurren durante el desarrollo embrionario en otros organismos.

### Objetivo general

Describir a nivel celular la metamorfosis larvaria en un cestodo modelo e identificar los linajes progenitores de los diferentes tipos celulares diferenciados de cestodos.

### Objetivos específicos

OE1 Identificar mediante marcadores moleculares la formación de nuevas células diferenciadas (células musculares, nerviosas y tegumentarias) durante la metamorfosis larvaria de *H. microstoma*.

OE2 Identificar posibles células progenitoras para los tipos celulares muscular, nervioso y tegumentario, estableciendo posibles linajes entre células germinativas y células diferenciadas.

## 2. Metodología

### 2.1. Mantenimiento de *Hymenolepis microstoma*

El mantenimiento de *H. microstoma* se realizó usando los hospedadores naturales: *Mus musculus* C57BL/6 como hospedadores definitivos y escarabajos *Tribolium confusum* como hospedadores intermediarios como había sido descrito previamente (Cunningham y Olson, 2010). Los procedimientos se realizaron según el protocolo de “Mantenimiento del ciclo vital completo del cestodo *H. microstoma* utilizando sus hospedadores naturales *Mus musculus* (ratón) y *Tribolium confusum* (escarabajo de la harina)” n° 10190000025215, aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de Uruguay, en colaboración con el Laboratorio de Experimentación Animal de la Facultad de Química (Universidad de la República, Uruguay).

### 2.2. Manipulación experimental de las larvas de *H. microstoma*

Se utilizaron dos estrategias para la obtención de larvas de *H. microstoma*. Por un lado, la mayoría de las muestras para ser manipuladas *ex vivo* fueron obtenidas de infecciones de *T. confusum*. Por otro lado, se optimizó el procedimiento de infección de la especie *Tenebrio molitor* para realizar tratamientos *in vivo*.

#### 2.2.1. Infección de *T. confusum*

Aproximadamente 50-55 escarabajos *T. confusum* son mantenidos en ayuno por 5 a 7 días (en un recipiente plástico de 6 cm de diámetro, con orificios para el intercambio de aire) para luego ser infectados al exponerlos a una preparación de porciones posteriores de gusanos adultos (conteniendo larvas oncosferas) que se presenta como alimento sobre papel de filtro. Los escarabajos infectados se incubaron rutinariamente a  $28 \pm 1$  °C (Voge, 1964). Para algunos experimentos, la incubación se realizó a temperaturas más bajas (25 °C) o más altas (30 °C) como forma de acelerar o retrasar el desarrollo con el fin de acomodar los tiempos en los que las larvas en etapas específicas de desarrollo tenían que ser colectadas. Los días siguientes a la infección, se recolectaron larvas en metamorfosis del hemocele de los escarabajos mediante disección de los mismos en una placa con solución PBS. Estas muestras se utilizaron para la detección de diferentes estructuras y marcadores moleculares mediante inmunofluorescencia, hibridación *in situ* y otros métodos específicos. Esta estrategia fue también utilizada para obtener larvas en metamorfosis para los

procedimientos de cultivo *in vitro* y *ex vivo* (secciones 2.2.2 y 2.2.3), así como para los análisis de microscopía electrónica (sección 2.6).

### 2.2.2. Cultivo *in vitro*

Se utilizaron dos medios de cultivo: de Schneider (Gibco 21720-024) y de Grace (Gibco 11605) a los que se adiciona suero fetal bovino inactivado (Capricorn FBS-11A, 10%) y antibiótico-antimicótico (solución de Anfotericina B, Penicilina, Estreptomina, Gibco 15240062, 1%). Iniciamos los cultivos con larvas en estadios de 1.2 a 2.1, obtenidas el cuarto día luego de la infección para observar su desarrollo. Las larvas se obtienen por disección de escarabajos en solución salina PBS (o en medio de cultivo). A continuación los procedimientos se realizan en condiciones de asepsia usando cámara de flujo laminar horizontal y con soluciones pre-calentadas a 30°C. Se realizan lavados con medio (2 lavados de 20 min) esperando que las larvas sedimenten por gravedad (sin centrifugación). El cultivo se realiza en placa de 24 pocillos con 1mL de medio y alrededor de 40 larvas por pocillo. Los cultivos se mantienen en estufa incubadora a 30°C en atmósfera natural. Para evitar la evaporación del líquido se colocó solución salina PBS en los pocillos vacíos y toda la placa dentro de una bolsa tipo Ziploc sellada. Se realizó la observación de las muestras y el registro fotográfico de los experimentos usando un microscopio invertido Leitz Labovert FS con lentes de 2,5x 0,08 AN y 6,3x 0.20 AN, cámara CMOS modelo MikrOcular (Bressler) y programa CamLabLite.

### 2.2.3. Marcado metabólico con 5-etil-2'-desoxiuridina *ex vivo*

Se recolectaron larvas en metamorfosis del hemocele de escarabajos *T. confusum* mediante disección de los mismos en una placa con medio de cultivo de Schneider con suero fetal bovino inactivado (SFB, 10 %) y 5-etil-2'-desoxiuridina (EdU, 10 µM, Thermo-Fisher) precalentado a 28°C. Se recolectaron larvas por 20 min llegando a aproximadamente 85 larvas para iniciar la incubación en medio fresco (con SFB y EdU) por 2 h a 28°C en tubo de 1,5 mL. Durante esta incubación se resuspendieron las larvas por pipeteo suave del líquido (con pipeta de 20 µL) en 4 instancias. A continuación se realizó un paso de centrifugación (1500g 2 min) para sustituir el medio por un lavado con paraformaldehído y la posterior

fijación con paraformaldehído fresco por 18 h a 4-8°C. En un ensayo preliminar se realizó previamente la incubación en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) con SFB 10% y EdU 10 µM.

#### 2.2.4. Infección de *T. molitor* y marcado metabólico *in vivo* con EdU

Para realizar el marcado metabólico de larvas con EdU *in vivo* se utilizaron escarabajos *T. molitor* como hospedadores. Los escarabajos *T. molitor* se compraron a proveedores locales, o se criaron a 20-26 °C con un fotoperiodo de 12 h:12 h, en recipientes de 20 x 10 cm con un 90% de harina integral y un 10% de levadura, a lo que se agrega fruta fresca una vez a la semana. Estos escarabajos son de gran tamaño (90 mg en promedio, n=8 escarabajos).

#### Infección:

Previo a la infección, se mantiene a los escarabajos en ayuno por 24 - 48 h a 23 °C en recipientes individuales de plástico de 9 cm de diámetro con papel de filtro como sustrato. Es importante cuidar a los escarabajos de la deshidratación, colocando los recipientes dentro de una cámara húmeda.

El protocolo que establecimos para una infección eficiente requiere del uso de huevos aislados. Los huevos con oncosferas se aíslan de los segmentos posteriores del gusano adulto (segmentos grávidos) por un procedimiento que ha sido validado en nuestro laboratorio (Preza y col., 2021a, 2021b). En concreto, los segmentos grávidos son disecados cuidadosamente en solución salina PBS, usando pinzas y bajo observación con microscopio de disección. Los huevos sedimentan hacia el fondo del recipiente donde son recolectados mediante pipeteo en dicha solución. A continuación se realiza un lavado de la muestra con PBS. La muestra obtenida es reservada a 6 – 8°C por un mínimo de 18 h previo a su uso, porque esta incubación mejora la infectividad de las larvas lo que ha sido evaluado en ensayos de eclosión y activación de oncosferas *in vitro* (Collings y Hutchins, 1965; Preza y col., 2021b).

La infección se realiza con los huevos colectados presentados como botón de 5 uL de material sobre papel que se deja disponible durante 20 – 24 h. Los escarabajos infectados

se incubaron rutinariamente a  $26$  o  $28 \pm 1$  °C en ambiente húmedo, evitando temperaturas más altas para maximizar la sobrevivencia de los mismos.

Anestesia:

Para el marcaje con EdU, se anestesió a los escarabajos infectados en atmósfera con trietilamina en un recipiente cerrado durante uno a dos minutos hasta notar un enlentecimiento en los movimientos del animal. El anestésico se coloca sobre la punta de un cotonete de algodón (1 – 2 gotas para un recipiente de 50 mL) y se introduce en un recipiente con tapa de esponja polifón. Para anestesiarse un escarabajo se lo coloca en este recipiente evitando el contacto directo con la punta de algodón.

Inyección:

Se retira la mitad posterior de un élitro con pinzas y se corta el ala con tijeras. Se inyecta 5  $\mu$ L de una solución de PBS conteniendo EdU 200  $\mu$ M (Thermo-Fisher) con jeringa de precisión de 10  $\mu$ L modelo 701 N con punta biselada tipo 4 (Hamilton) en la zona dorsal expuesta para alcanzar el hemocele del abdomen. Estimamos que la concentración aproximada de EdU en la hemolinfa del escarabajo es de 10  $\mu$ M, teniendo en cuenta el tamaño promedio de los mismos (90 mg, de 8 escarabajos medidos).

Los escarabajos se mantienen con harina integral y cáscara de fruta como sustrato, en recipientes individuales y en cámara húmeda. Las larvas del parásito se pueden obtener tras diferentes tiempos, por disección de los escarabajos sumergidos en PBS.

#### 2.2.5. Activación de cisticercoides

La activación *in vitro* de los cisticercoides se realizó según el protocolo optimizado en nuestro laboratorio (Preza, 2021). Los cisticercoides se obtuvieron por disección de escarabajos (con más de 2 semanas de desarrollo de la infección) en solución PBS. En un primer paso se incuban en una solución PBS conteniendo pepsina (1%) y con pH ácido (HCl 0,17%) por 30 minutos. En un segundo paso se incuban a los cisticercoides en una solución de sales de Hanks, taurocolato de sodio (0,1%) y tripsina (0,5%), a 37°C. En estas condiciones los cisticercoides se activan y se desprenden de los tejidos del cercómero y la cápsula en 20 – 40 min.

Los cisticercoides activados se fijaron de forma rutinaria para la mayoría de los protocolos posteriores utilizando paraformaldehído al 4% preparado en solución salina PBS, a 4 – 8 °C durante una noche.

### 2.3 Revelado de la marca de EdU

El revelado de la marca de EdU se realizó con el reactivo Click-iT™ Alexa Fluor Imaging Kit con azidas conjugadas a Alexa Fluor™ 555 o 488 (Thermo-Fisher C10337 y C10338), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante y probado previamente para larvas de cestodos (Koziol, 2014).

### 2.4. Detección de la fragmentación de ADN y la actividad de caspasas *in situ*

#### 2.4.1. Detección de la fragmentación de ADN mediante marcado de cortes en el ADN con dUTP y deoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) *in situ*

Realizamos la detección de la fragmentación de ADN en los núcleos mediante el reactivo Click-iT™ TUNEL Alexa Fluor™ 488 (Thermo-Fisher C10245) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Se detallan a continuación los pasos realizados para el procesamiento de las muestras.

##### a) Fijación e histología:

Realizamos la fijación del material biológico en paraformaldehído (4%) por 1 h a temperatura ambiente. Realizamos lavados con PBS y los pasos de deshidratación con alcohol etílico de concentración creciente para iniciar el protocolo de inclusión en bloque de parafina. Los cortes histológicos de 7 – 8 µm de espesor fueron colectados sobre vidrios portaobjetos adhesivos (silanizados, Citoglas).

##### b) Desparafinación:

Para iniciar el ensayo realizamos los pasos de desparafinación con xilol y rehidratación con alcohol etílico de concentración decreciente, con un paso de incubación larga (20 min) con etanol 70%, pasando por 50% y agua destilada.

##### c) Permeabilización:

Lavado con PBS-Tritón 0,3% (PBST) por 5 min.

Incubación con proteinasa K (20 µg/mL) preparada en PBS-Tritón 0,3% (PBST) por 8 min.

Lavado con agua destilada.

d) Tratamiento con DNasal (control +):

Incubación con DNasal (1:100) preparada siguiendo las indicaciones del fabricante (150 – 200 µL por vidrio) por 30 min. Se realiza solo en el vidrio elegido para control positivo de la reacción.

Lavado con agua destilada.

e) Reacción deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT):

Lavado con la solución Buffer (Componente A) por 10 min.

Incubación con la mezcla de reacción conteniendo EdUTP y la enzima TdT (1:25) por 1 h a 37°C.

Lavado con solución de PBS y seroalbúmina bovina (BSA) 3% por 2 min, dos veces.

f) Reacción Click-iT:

Incubar con la mezcla de reacción Click-iT por 30 min protegido de la luz.

Lavar con PBS-BSA 3% por 5 min.

A continuación, es posible realizar inmunofluorescencia mediante el protocolo típico y la tinción nuclear general con DAPI o verde de metilo.

Para realizar el ensayo de TUNEL en larvas enteras (*in toto*) se modifica el paso de permeabilización que debe ser realizado con proteinasa K por 15 min. También es recomendable resuspender el material por pipeteo unas dos veces durante esta incubación.

#### 2.4.2. Detección de la actividad de caspasas *in situ*

La detección de la actividad de caspasas se realizó con el reactivo Cell Event para la detección de la activación de las caspasas 3 o 7 (Thermo-Fisher C10723). El reactivo consiste en un péptido de cuatro aminoácidos (DEVD) conjugado con un colorante de unión a ácido nucleico. El sustrato es permeable a las células pero no tiñe los núcleos ya que el péptido

DEVD inhibe la unión al ADN. Por la actividad de las caspasas ejecutoras en las células apoptóticas, el péptido DEVD se escinde, permitiendo que el colorante se una al ADN y sea fluorescente con un máximo de absorción/emisión de 502/530 nm. Probamos el reactivo con larvas en los estadios 2 – 3, pero este reactivo se conserva estable por pocos meses y pudo ser usado en contados ensayos.

Se recolectaron las larvas de escarabajos infectados y se mantuvieron en condiciones óptimas, en medio de cultivo de Schneider (Gibco 21720-024) con suero fetal bovino inactivado (10 %) y a 28°C. El ensayo experimental se realizó con el agregado del reactivo Cell Event en la concentración 5  $\mu$ M. Esta incubación se realizó por 40 min, con aproximadamente 100 larvas, en tubo de 1,5 mL con 500  $\mu$ L de líquido. Para realizar un ensayo control positivo, previamente al paso de incubación con el reactivo, se incubó a las larvas en una solución de medio de cultivo con peróxido de hidrógeno (1 mM) por 3 horas (Cabrera y col., 2008), con tres pasos de resuspensión por pipeteo suave dentro de ese tiempo.

Se realizó la fijación con paraformaldehído (4%) por una noche a 8°C, luego se realizaron lavados con solución PBST y la tinción nuclear general con DAPI.

#### 2.5. Marcado del tegumento con dextrano

Se recogieron larvas en PBS, y se tiñeron con dextrano conjugado con tetrametil-rhodamina y biotina (10.000 MW, fijable con lisina, Thermo-Fisher D3312) mediante un protocolo modificado de Wendt y col. (2018). Se incubaron hasta 300 larvas en 250  $\mu$ l de una solución de 2-5 mg/mL de dextrano conjugado; las larvas recogidas durante los dos primeros días post-infección se incubaron brevemente sin agitación, mientras que las larvas recogidas a partir de los tres días post-infección se incubaron durante 2 a 3 min con agitación en vórtex a baja velocidad. A continuación, las larvas se fijaron añadiendo 1 mL de paraformaldehído al 4% preparado en PBS, y la solución se sustituyó inmediatamente por 1 mL de solución fresca de paraformaldehído al 4% para completar la fijación hasta el día siguiente a 8°C.

Las muestras marcadas con dextrano pueden ser guardadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  en metanol hasta su posterior uso. Puede realizarse el revelado de la marca de EdU y la tinción nuclear general con DAPI o verde de metilo.

## 2.6. Microscopía electrónica de transmisión

Se obtuvieron larvas de escarabajos *Tribolium confusum* infectados y mantenidos a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Se recolectaron las larvas en solución PBS a  $28^{\circ}\text{C}$ , y luego de un paso de centrifugación suave (800g 2 min) se fijaron en glutaraldehído (2,5%) y paraformaldehído (2%) preparados en solución de cacodilato (50 mM cacodilato, 50 mM KCl, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$  pH 7,2) durante 3 horas. Tras el lavado con solución de cacodilato (50 mM cacodilato, pH 7,2), las muestras se posfijaron en tetróxido de osmio al 1 % por 2 h siguiendo el protocolo de Spiliotis y col. 2008. A continuación se realizó la deshidratación con etanol y la infiltración e inclusión con resina Araldita. Se obtuvieron secciones ultrafinas de 70 nm utilizando un ultramicrotomo RMC MT-X y se montaron en rejillas de cobre recubiertas de *formvar*. La observación y adquisición de imágenes se realizó con un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM 1010 operado a 100 kV, equipado con una cámara digital Hamamatsu C4742-95 (Unidad de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay).

## 2.7. Inmunofluorescencia

Se obtuvieron larvas de escarabajos *Tribolium confusum* infectados y mantenidos a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Se recolectaron las larvas en solución PBS precalentada a  $28^{\circ}\text{C}$  que lo más pronto posible se sustituye por PFA 4% para realizar la fijación por una noche a  $8^{\circ}\text{C}$ .

Para la detección de figuras mitóticas se usó un anticuerpo policlonal de conejo anti-fosfohistona H3 (Ser10) en dilución 1:100 (Cell Signalling Technology #9701). Solo para este anticuerpo primario realizamos un paso de recuperación de antígeno mediante incubación de los tejidos a  $99^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos en solución de citrato 10 mM (pH6) (Failache, 2023).

La detección específica de fibras musculares se realizó principalmente mediante inmunofluorescencia para tropomiosinas de alto peso molecular con un anticuerpo primario policlonal de conejo (Koziol y col., 2011) en dilución 1:500. Adicionalmente se realizó una detección general de la actina filamentosa mediante Faloidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína en dilución 1:100 (FITC, Merck).

Para detectar estructuras nerviosas los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-FMR1 policlonal de conejo (Immunostar, ID 20091) en dilución 1:300; anti-serotonina policlonal de conejo (Immunostar, ID 20080) en dilución 1:300 y anticuerpo monoclonal de ratón anti-sinapsina (clon 3C11, Developmental Studies Hybridoma Bank), dilución 1:100.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anticuerpos anti-conejo conjugados con Alexa Fluor 546 (Invitrogen A11010) en dilución 1:500 y anticuerpos anti-ratón conjugados con Alexa Fluor 647 (Invitrogen A31571) en dilución 1:1000.

Se utilizó una tinción nuclear general con fluoróforos específicos para ADN como 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en dilución 1:10000 o verde de metilo en dilución 1:5000 (Prieto y col., 2014) y para algunos experimentos se usó ioduro de propidio (2,5 µg/mL) para lograr una tinción citoplasmática en las células con importante cantidad de ARN.

#### 2.7.1. Inmunofluorescencia *in toto*

La inmunodetección *in toto* (WMIHF) fue realizada siguiendo el protocolo descrito por Koziol y col., 2013 y Montagne y col., 2023. En general los lavados se realizan a temperatura ambiente, excepto las incubaciones con anticuerpos u otras incubaciones largas, de una noche o más que se realizan a 8°C.

##### Día 1

Lavados:

Luego de la fijación se realizan tres lavados con PBS-Tritón 0,3% (PBST) de 10 min.

Permeabilización:

Incubación con solución de dodecil sulfato sódico (SDS) 1% en PBS.

Lavados:

Tres lavados con PBS-Tritón 0,3% (PBST) de 10 min.

Bloqueo:

Incubación con solución de PBST + BSA 3% + suero de oveja inactivado 5% (previamente incubado a 60° por 30 min) por dos horas.

Incubación con anticuerpo primario:

La solución del anticuerpo se prepara en PBST + BSA 3% + NaN<sub>3</sub> 0,02%.

Incubación durante una noche a 8°C.

## Día 2

Lavados:

Cinco lavados con PBST de 30 min.

Incubación con anticuerpo secundario:

La solución del anticuerpo se prepara en PBST + BSA 3% + NaN<sub>3</sub> 0,02%.

Incubación durante una noche a 8°C protegido de la luz. A partir de esta incubación, es necesario proteger las muestras de la luz usando papel de aluminio.

## Día 3

Lavados y tinciones generales

Lavados con PBST. Un lavado breve y cuatro lavados de 30 min.

Incubación con fluoróforos para tinción general nuclear o faloidina en PBST por 30 min o por una noche, para lo cual se debe incluir NaN<sub>3</sub> 0,02%.

Se utiliza 1 mL de líquido para cada paso de lavado o incubación con excepción de las incubaciones con anticuerpos en las cuales se utiliza 300 µL de solución por muestra. En general los lavados se realizan con movimiento suave.

Este protocolo es adecuado para el trabajo con oncosferas eclosionadas o larvas en metamorfosis de 1 a 6 d.p.i. (estadios 1.1 a 4.1). Las larvas de 2 a 6 d.p.i se manipulan usando tubos de 1,5 mL, realizando un paso de centrifugación (800 – 1000 g por 2 min) para

sedimentarlas y retirar el líquido para luego añadir el líquido siguiente. Sin embargo, para evitar perder las larvas más pequeñas (oncosferas eclosionadas y larvas de 1 – 2 d.p.i.) se utilizaron pocillos con membrana de tereftalato de polietileno de 8  $\mu\text{m}$  en la base (BRAND *insert strips* 782870). Estos pocillos funcionan como canasto para para co-cultivo de dos tipos de muestras (cultivo *transwell*). Usamos estos canastos sobre pocillos de una placa de 24 pocillos para retener las pequeñas larvas al realizar los lavados. Se pueden usar en todos los pasos del protocolo, desde la etapa de fijación.

### 2.7.2 Inmunofluorescencia en criocortes

Para las larvas en estadio 4.1 (6 d.p.i) se realizaron ensayos de inmunodetección sobre criosecciones para detectar las estructuras presentes en el pre-escólex que se encuentra retraído y protegido por la cápsula en este estadio. Luego del paso de fijación se realizaron tres lavados con PBS (10 min cada uno) y una incubación con sacarosa 30% por una noche a 8 °C que luego se sustituye por medio OCT Tissue-Tek (Sakura FineTek cat. no. 4583). El bloque de OCT se realizó en tubo de 1,5 mL con los tejidos cerca del fondo, logrando así un bloque con forma cónica. Esta preparación se congela por contacto con N<sub>2</sub> líquido y se puede conservar a -20 °C.

Realizamos cortes de 20  $\mu\text{m}$  de grosor con un criostato, que colocamos sobre vidrios portaobjetos adhesivos silanizados (Sigma-Aldrich). Estos preparados se mantienen por 2 horas a temperatura ambiente y luego son conservados a -20°C. El protocolo de inmunodetección se realizó como ha sido descrito previamente (Koziol y col., 2013; Koziol, 2014; Preza, 2021). En comparación con el protocolo de inmunodetección *in toto* se utiliza menos detergente en los lavados (PBS-Tween 0,1%), el paso de permeabilización se realiza con PBS-Tritón 0,1% por 10 minutos y las incubaciones en general se realizan por menor tiempo.

### 2.8. Tinciones generales

La tinción de estructuras generales como núcleos con fluoróforos específicos para ADN (DAPI o verde de metilo), ácidos nucleicos en general con yoduro de propidio o actina filamentosa con Faloidina conjugada con FITC (Sigma-Aldrich) o Atto 488 (Abcam) se realizan al final del protocolo para la detección de estructuras específicas (revelado de la

marca de EdU, TUNEL, detección de la actividad de caspasas, inmunodetección o hibridación *in situ*).

Se realiza sobre tejidos que han sido previamente permeabilizados al menos con detergentes. La incubación en solución PBST con alguno de los fluoróforos mencionados en esta sección para detección de estructuras generales puede realizarse por 30 min a temperatura ambiente o por una noche a 8 °C, para lo cual se debe incluir NaN<sub>3</sub> 0,02%.

## 2.9. Montaje de muestras, obtención de imágenes y análisis

Las muestras se montaron con glicerol al 80% con Tris 50 mM, pH 8, o con medio de montaje comercial ProLong Glass Antifade Mountant (Thermo-Fisher). Las muestras se visualizaron mediante microscopía confocal con microscopios Zeiss LSM 800CyAn y Zeiss LSM 880 en la Unidad de Bioimagenología Avanzada del Instituto Pasteur de Montevideo.

Las imágenes se analizaron y procesaron utilizando FIJI (Schindelin y col., 2012). Se usó la herramienta *Cell Counter* para realizar conteos de células en forma manual (semi-automática).

## 2.10. Hibridación *in situ* en larvas enteras

### 2.10.1. Identificación de genes en datos genómicos de *H. microstoma*

Para identificar los genes de interés para el trabajo en la especie de estudio, *H. microstoma*, se utilizó el proteoma predicho disponible en WormBase ParaSite (Howe y col., 2017, [https:// parasite.wormbase.org/](https://parasite.wormbase.org/), versión 14). Se realizó una búsqueda mediante BLASTP con las secuencias de los genes candidatos obtenidas de especies bien estudiadas como *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Schmidtea mediterranea* y en algunos casos otros cestodos como *Echinococcus multilocularis* y *Mesocestoides corti*. Los genes de *H. microstoma* seleccionados en el primer paso luego son probados en un BLASTP recíproco con los proteomas predichos (en su versión de una única isoforma por gen) de las especies anteriormente mencionadas a modo de verificar si el gen que se encuentra en este segundo BLASTP es el indicado. Este procedimiento se denomina BLASTP recíproco (Hernández-Salmerón y Moreno-Hagelsieb, 2020). Usamos para estos análisis el programa BioEdit (v7.0.5, ©Tom Hall). A continuación, realizamos la búsqueda de dominios

InterPro (Paysan-Lafosse y col., 2023) para confirmar la presencia de dominios específicos en las proteínas predichas.

Para los factores de transcripción de tipo bHLH realizamos adicionalmente un análisis filogenético con las secuencias de dichos dominios, usando el método de *neighbor joining*, como forma de evaluar si los genes de *H. microstoma* encontrados son ortólogos con los genes seleccionados originalmente.

#### 2.10.2. Isoformas de tropomiosina de alto peso molecular

Para diseñar las sondas específicas para las formas de tropomiosina de alto peso molecular (*hmw*) se realizó una búsqueda mediante BLASTP utilizando las secuencias definidas por los exones 4b, 5a, 6b, 7a, 8a y 9b en los genes correspondientes de *E. multilocularis* y *M. corti* (Koziol y col., 2011) para definir la región codificante correspondiente a los mismos exones en *H. microstoma*. Dado que estos genes presentan *splicing* alternativo y las isoformas de alto y bajo peso molecular comparten el uso del exón 3, es importante la elección de estos exones exclusivos de la isoforma muscular (*hmw*) para evitar hibridación cruzada con el ARNm de las otras isoformas.

#### 2.10.3. Homólogos de factores de transcripción relacionados con el desarrollo muscular

Se realizó la búsqueda mediante BLASTP recíproco de homólogos de *myoD1* de *H. sapiens* y se encontró un resultado con mayor apoyo estadístico: HmN\_000553800. Mediante análisis filogenéticos confirmamos que es el único gen de *H. microstoma* que forma parte del clado definido por *nautilus* de *D. melanogaster*, *myoD1*, *myf5*, *myf6* y *miogenina* de *H. sapiens*. El análisis de dominios InterPro confirmó la presencia de los dominios MyoD\_N (IPR002546) y bHLH (IPR011598).

La búsqueda mediante BLASTP con *nkx1-1* de *S. mediterranea* (GenBank: ATG31913.1) mostró un resultado con mayor apoyo estadístico (HmN\_000409500) y la búsqueda con esta secuencia como entrada encuentra al gen correspondiente en la lista de genes de *S. mediterranea* y *slou* en la lista de genes *D. melanogaster*. El análisis de dominios InterPro confirmó la presencia del dominio homeobox (IPR001356).

#### 2.10.4. Identificación de homólogos de factores de transcripción relacionados con el desarrollo neural

Se realizó la búsqueda de homólogos *neuroD*, *soxB* y *coe*, utilizando secuencias de *H. sapiens*, *D. melanogaster* y *S. mediterranea*.

Para *neuroD* realizamos la búsqueda mediante BLASTP con *neuroD1* de *H. sapiens* y encontramos un gen de *H. microstoma* (HmN\_000123500) con mayor apoyo estadístico. El análisis de dominios InterPro confirmó la presencia de un dominio bHLH (IPR011598) y el dominio específico de *neuroD* (IPR022575) en el C-terminal de la proteína predicha. El análisis filogenético realizado lo ubica como único gen bHLH de *H. microstoma* en el clado definido por genes de la familia de *neuroD* y *neurogenina* de *H. sapiens* y el gen ortólogo de *neurogenina* en *D. melanogaster*, *tap (target of poxn)* (Ledent y Vervoort, 2001).

Para *soxB* encontramos dos secuencias homólogas a *soxB* de planarias y *sox2* de *H. sapiens* (HmN\_000097600 y HmN\_000627700) y elegimos para este trabajo la secuencia HmN\_000097600 por ser la más similar a *sox2* de *E. multilocularis* que ya ha sido estudiado y se vincula con las células germinativas de esta especie (Koziol, 2014; Cheng y col., 2017; Herz y col., 2024). El análisis de dominios InterPro confirmó la presencia del dominio HMG (IPR009071).

En el caso de *coe*, la búsqueda mediante BLASTP con la secuencia de *coe* de *S. mediterranea* o *D. melanogaster* encuentra una sola secuencia candidata en *H. microstoma* (HmN\_000631100). El análisis de dominios InterPro confirmó la presencia del dominio específico COE de unión al ADN (IPR032200) y del dominio IPT (IPR002909) y el dominio HLH (IPR032201).

Para el complejo *achaete-scute* de *D. melanogaster* se identificó un gen homólogo en *H. microstoma* (HmN\_000506700.1) pero no se logró detectar su expresión por hibridación *in situ*. Para los genes *atonal* no encontramos un gen ortólogo en *H. microstoma*, y mediante el análisis filogenético no se encuentra un gen en este clado.

#### 2.10.5. Preparación de sondas específicas

Se obtuvieron fragmentos de la secuencia codificante de cada gen mediante RT-PCR del ADNc total adulto de *H. microstoma* utilizando cebadores específicos (tabla M1), y se clonaron en el vector pGEM-T (Promega) con el objetivo de obtener moldes para la síntesis de sondas. Los fragmentos de ADNc utilizados para la síntesis de sondas para *pc2*, *chat*, *vglut* y *tph* fueron los mismos que los descritos en Preza y col., 2018.

Las sondas marcadas con digoxigenina se transcribieron con los reactivos indicados en la tabla M2. Se usaron polimerasas SP6 o T7 (Thermo- Fisher) de acuerdo al sentido del gen en el vector de clonado, para sintetizar sondas anti-sentido (complementarias al ARNm del gen) o sondas control (sentido, que no hibridan con el ARNm de la muestra). En las reacciones se utiliza 3,5 mM de digoxigenina-UTP (dig UTP, Merck), 6,5 mM de UTP y 10 mM de ATP, GTP y CTP (NTP mix). La reacción de transcripción se realiza por 2 horas a 37°C, seguida de un paso de tratamiento con DNAsal por 15 min a la misma temperatura.

Se comprobó la integridad del ARN sintetizado mediante electroforesis (no-desnaturalizante) en gel de agarosa 1% y se evaluó la marca de cada sonda mediante un ensayo de inmunodetección en gotas (dot-blot) sobre membrana (Hybond-N) como se detalla en Koziol, 2014.

El procedimiento de hibridación *in situ* fluorescente se realizó en larvas enteras (WMISH) de acuerdo con el protocolo descrito previamente (Koziol, 2014; Koziol y col., 2014, 2016; Montagne y col., 2019). Se trabajó con las muestras de larvas en tubos de 1,5 mL, con pasos de centrifugación breves para realizar cada cambio del líquido.

Las muestras se tiñeron con DAPI o verde de metilo al final del protocolo. Cuando el método de WMISH se combinó con la detección de EdU o WMIHF, estos protocolos se llevaron a cabo después de completar WMISH.

**Tabla M1**

Lista de oligonucleótidos utilizados para RT-PCR

<b>Código del gen</b>	<b>gen</b>	<b>Oligonucleótido <i>forward</i></b>	<b>Oligonucleótido <i>reverse</i></b>
HmN_000188900	<i>tpm-1</i>	AGTCGTAAGGCCCTTGAGACCAG	GAAGTGAGTTCCTCGAAAGTGGTG
HmN_000471300	<i>tpm-2</i>	GGCTGCAAAGTGCTCGAGAAC	AAAGTTTGCTCCAATTCCTCTGC
HmN_000553800	<i>myoD</i>	GTAACAGCGATTACTCGAGCAGTG	ATCTATAGCGGTGCGAAGAATCTC
HmN_000409500	<i>nkx1-1</i>	GAACACCAACGATAGTGGATGAGG	GGATTGCTACCACTATTCTCACGATC
HmN_000123500	<i>neuroD</i>	AATAACAGCAACAATACTTCATCAACCCTC	GTAGAAAGCCATGAGGAAAGGGAATG
HmN_000097600	<i>soxB</i>	ATGCTCTTCTCATCAACTGAACCC	CTAATCTCTCGAAACCTGAACCTCAAACCTC
HmN_000631100	<i>coe</i>	TCTGGTGGTCATAGTACTGATCAATCAC	TTCGTGGAACCTTTCGTCCATG
HmN_000583100	<i>pc2</i>	CTCTTTCGTAAAGAATGGTACATCCAC	CCTAATGCAGGATCTGGACCTTC
HmN_000095900	<i>chat</i>	TACCAGTGCCAGAGCTTCGAAC	ACCTTGCTGGAAGCGTCTTG
HmN_000994100	<i>tph</i>	ATCGGTGACTTTGTCAACCTGC	CATCTGGGCTTTGATATCCTCC
HmN_000748900	<i>vglut</i>	GGTGAACCTCCTGACACGCATC	TTTCATCTGCGCATCTTCAGC

**Tabla M2**

Reacción de transcripción *in vitro*

Reactivos	Vol ( $\mu\text{L}$ )
buffer 5x	4
NTP mix	2
dig UTP	2
RNAsa out	0,5
polimerasa SP6 o T7	2
ADN molde (200 ng/ $\mu\text{L}$ )	9,5

**2.11. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con el programa Graphpad Prism 8: gráficos, regresión lineal y prueba no paramétrica de Mann-Whitney (se consideró significativo un  $p < 0,05$ ).

### 3. Resultados

#### 3.1. Revisión del desarrollo de la metamorfosis larvaria de *H. microstoma*

El desarrollo de la metamorfosis larvaria de *H. microstoma* ha sido descrito por Voge (1964) y Goodchild y Stullken (1970). Para nuestro trabajo hemos adoptado el sistema de numeración de estadios de Voge (1964), subdividiendo los estadios de desarrollo en función de detalles anatómicos más precisos. Estos estadios y su correspondiente momento de aparición (en días posinfección, d.p.i.) a 28°C, se muestran en la figura R1 y se describen brevemente a continuación:

Estadio 0 (0 d.p.i). Nos referimos a la oncosfera infectiva eclosionada como estadio 0 (que no fue incluido en el sistema de numeración de Voge, 1964). El diámetro de la larva es de aproximadamente 25-30  $\mu\text{m}$ .

Estadio 1.1 (1-2 d.p.i). La larva es compacta, tiene un contorno aproximadamente circular y un diámetro de aproximadamente 35-50  $\mu\text{m}$ .

Estadio 1.2. (2-3 d.p.i.). La larva tiene un contorno más o menos circular, con un diámetro de aproximadamente 50-70  $\mu\text{m}$ . Comienza a formarse una pequeña cavidad central entre las células más profundas, es el inicio de la formación de la llamada cavidad central, también conocida como laguna primaria (Freeman, 1973).

Estadio 2.1 (3-4 d.p.i.). El contorno de la larva comienza a ser ovoide. La cavidad central se agranda y se desplaza hacia la parte posterior (más cerca de los ganchos remanentes de la oncosfera). Los núcleos de las células de la región anterior, que se convertirá en el escólex (llamada pre-escólex), son más pequeños y están distribuidos de forma más compacta. La longitud de la larva es de aproximadamente 70-110  $\mu\text{m}$ .

Estadio 2.2 (4-5 d.p.i.). El contorno de la larva es ovoide, continúa creciendo en el eje antero-posterior y la cavidad central se agranda. La longitud de la larva es de aproximadamente 95-150  $\mu\text{m}$ .

Estadio 3.1 (4-5 d.p.i.). El contorno de la larva es ovoide y se distinguen los primordios de los órganos de fijación del pre-escólex. El primordio del rostelo

(órgano de fijación apical) se distingue por un espacio entre el primordio y el resto de la larva, y los primordios de las cuatro ventosas pueden verse como pequeñas masas de células. La longitud de la larva es de aproximadamente 150-200  $\mu\text{m}$ .

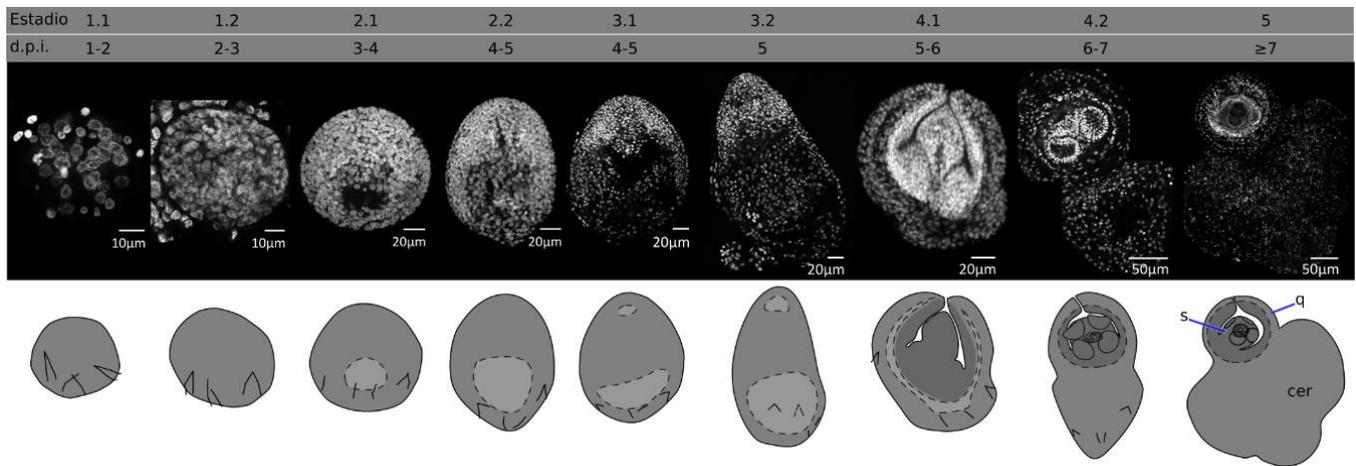
Estadio 3.2 (5 d.p.i.). La larva se alarga y los primordios de las ventosas se hacen más prominentes. La longitud de la larva es de aproximadamente 200-270  $\mu\text{m}$ .

Estadio 4.1 (5-6 d.p.i.). La parte anterior de la larva (el futuro escólex y cuerpo del cisticercoide) se retrae hacia la cavidad, quedando rodeada por los futuros tejidos del quiste. La cavidad central colapsa al retraerse el extremo anterior. Esta retracción del pre-escólex y del cuerpo hacia los tejidos del quiste es un proceso rápido mediado por fibras musculares (Caley, 1974). El primordio del escólex se sitúa así en el extremo posterior del tejido retraído, y el cuerpo en desarrollo se pliega alrededor. La región más posterior de la larva comienza a crecer, convirtiéndose en el cercómero.

Estadio 4.2 (6-7 d.p.i.). Continúa el desarrollo del pre-escólex, que incluye la diferenciación del rostelo (con la aparición de la corona de ganchos) y las ventosas. Los tejidos del quiste se desarrollan alrededor del pre-escólex y el cuerpo. El cercómero crece hasta alcanzar un tamaño comparable al del quiste.

Estadio 5 (8 d.p.i.). Se completa el desarrollo del escólex y del quiste. El crecimiento del cercómero puede continuar más allá de este estadio y alcanzar longitudes varias veces superiores a la del quiste.

Existe cierta variabilidad en los estadios de desarrollo de las larvas encontradas entre distintos escarabajos y dentro de un mismo escarabajo, lo que puede deberse en parte a la prolongada exposición de los escarabajos a los huevos infectivos, que se realiza durante una noche (18-24 hs) y puede dar lugar a tiempos de infección ligeramente diferentes.



vi Figura R1

Figura R1. Fases de desarrollo de la metamorfosis larvaria en *H. microstoma*. Estadios 1.1 a 5 y su correspondiente momento de aparición en días posinfección (d.p.i.) a 28°C. La morfología en cada estadio se muestra mediante micrografías con tinción nuclear (DAPI, imágenes superiores) y diagramas (imágenes inferiores). s, escólex; cer, cercómero; q, quiste.

### 3.2. Cultivo *in vitro* de la metamorfosis larvaria de *H. microstoma*

Para el estudio de la diferenciación celular en el desarrollo de la metamorfosis larvaria resulta conveniente contar con larvas que se desarrollan en condiciones *in vitro*. Por un lado, permitiría seleccionar larvas en un estadio particular del desarrollo para ser estudiadas. Por otro lado, permitiría realizar ensayos experimentales. En este trabajo interesaba en particular realizar el marcado metabólico de las células proliferantes para realizar el seguimiento de las células que incorporaron la marca y evidenciar procesos de diferenciación celular. Con este motivo en particular, se pusieron a prueba dos estrategias para realizar ensayos de marcado y seguimiento para el estudio de la diferenciación celular: 1) desarrollo en condiciones *in vitro*, y 2) manipulación de escarabajos para el marcado *in vivo* (esta estrategia fue elegida finalmente para todos los ensayos posteriores). En esta sección se describen los resultados de los ensayos realizados para obtener el desarrollo de larvas *in vitro*.

#### 3.2.1. Ensayo de las condiciones para el cultivo *in vitro* de larvas en metamorfosis

En el presente trabajo probamos adaptar los métodos usados en los ensayos pioneros de desarrollo *in vitro* de la metamorfosis larvaria, para el estudio de la metamorfosis larvaria de *H. microstoma*. Probamos diferentes medios de cultivo comerciales candidatos por ser usados para el cultivo de células de insectos (Schneider, 1966, 1972), que suplementamos con suero bovino como había sido usado en el trabajo pionero para el cultivo de larvas de esta especie (Seidel, 1975). Preferimos usar un medio de cultivo comercial para evitar la preparación de un medio con muchos ingredientes que resulta laborioso y puede ser poco reproducible.

El suero fetal bovino (SFB) suele ser inactivado por calor (a 56°C por 30 min) para inactivar el complemento (porque su actividad puede provocar lisis de células) y para destruir posibles contaminantes virales o bacterianos (Kingston, 2003). En nuestros ensayos obtuvimos desarrollo de larvas solo en los casos que el suero fue inactivado previamente. De los medios de cultivo comerciales que probamos, solo usando el medio de Schneider obtuvimos larvas desarrolladas. Como componentes del medio de cultivo de Schneider que son comunes al medio de Landureau usado en los ensayos pioneros destacamos la

presencia de aminoácidos, sales inorgánicas, ácidos orgánicos, los azúcares glucosa y trehalosa, extracto de levaduras y suero bovino.

Comenzamos el cultivo con larvas de 4 días (estadios 2.1 a 2.2), obtenidas de escarabajos *T. confusum* previamente infectados. Se realizaron cuatro ensayos independientes (usando medio de Schneider) con desarrollo exitoso de larvas en tres de ellos. En dos ensayos exitosos cuantificamos la viabilidad al día 7 de cultivo que fue 35 y 38% (tabla R1). En los tres ensayos exitosos se observó el desarrollo de larvas hasta el estadio 4. Esto incluye procesos de crecimiento general de las larvas, expansión de la cavidad, diferenciación del pre-escólex en el extremo anterior, el proceso de retracción y la posterior diferenciación de estructuras del pre-escólex invaginado. El desarrollo de los cisticercoides *in vitro* se ilustra en la figura R2 y se describe brevemente a continuación:

Día inicial (0): Larvas esféricas a ovoides de 91 – 123  $\mu\text{m}$  de longitud antero-posterior (n=10 larvas medidas), con cavidad central pequeña apenas distinguible (estadio 2.1) o con la cavidad central más expandida (estadio 2.2, figura R2A).

Días 2-5: Larvas en desarrollo en los estadios 2.2 a 4.1. Es llamativa la abundancia de movimientos en la pared corporal. Algunas larvas que no retrajeron el extremo anterior presentan un mayor desarrollo del pre-escólex que en las muestras desarrolladas *in vivo*. El mayor desarrollo del pre-escólex previo a la retracción del mismo había sido observado previamente por J. Seidel (1975) y puede ser interpretado como una demora en el proceso de retracción del escólex hacia la cavidad central respecto al desarrollo del escólex.

Día 6-10: Larvas en estadios 4.1 – 4.2, en general con menor cantidad de movimientos de la pared corporal. La morfología general es normal pero el cercómero presenta un área clara a diferencia de las muestras desarrolladas *in vivo*. Esta área más clara se corresponde con la cavidad central que no se ha colapsado completamente. Las larvas que alcanzan el estadio 4 son entre 82 – 100% de las larvas viables (tabla R1) y son minoritarias las que presentan morfologías anormales (más allá del área clara en el cercómero).

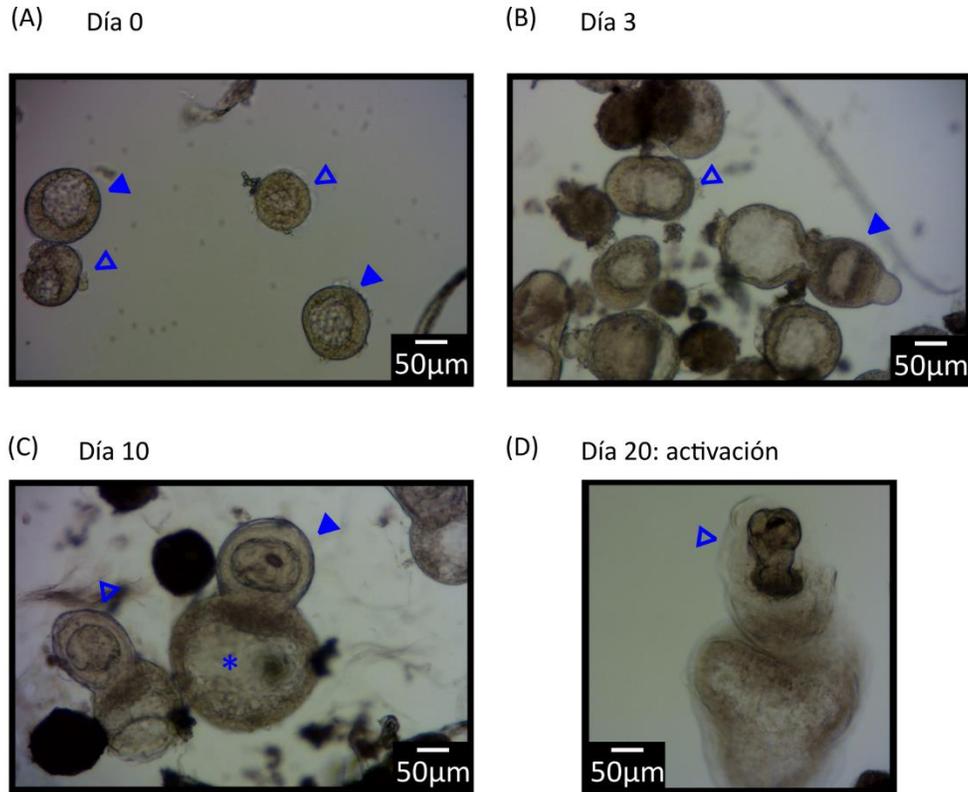
Tras 20 días de desarrollo *in vitro*, se realizaron experimentos para determinar la capacidad de activación de los cisticercoides, utilizando cisticercoides desarrollados *in vivo* como control. Los cisticercoides desarrollados *in vitro* respondieron al tratamiento *in vitro* para activación en una proporción de 4/10 (n=10, figura R2D) luego de 40 min, mientras que la muestra control se activó en una proporción de 5/6 (n=6) y en menor tiempo (20 min). Adicionalmente se realizó un experimento para determinar la infectividad de los cisticercoides *in vivo*, utilizando el método estándar de infección de un ratón mediante sonda gástrica. En este caso, no se obtuvieron gusanos adultos a partir de cisticercoides desarrollados *in vitro* (n=6 cisticercoides para un ratón), pero sí en controles con cisticercoides desarrollados *in vivo* (n=10 cisticercoides para cada ratón, N=5 ratones).

iii Tabla R1

### Tabla R1

Viabilidad de las larvas en el cultivo *in vitro*

	Día 0 (n de larvas)	Día 7 (n / % de larvas iniciales)	Estadio 4 en días 6-10 (n / % de larvas iniciales)
Ensayo 1	20	7 / 35%	6 / 30%
Ensayo 2	64	0 / 0%	-
Ensayo 3	45	17 / 38%	14 / 31%



vii Figura R2

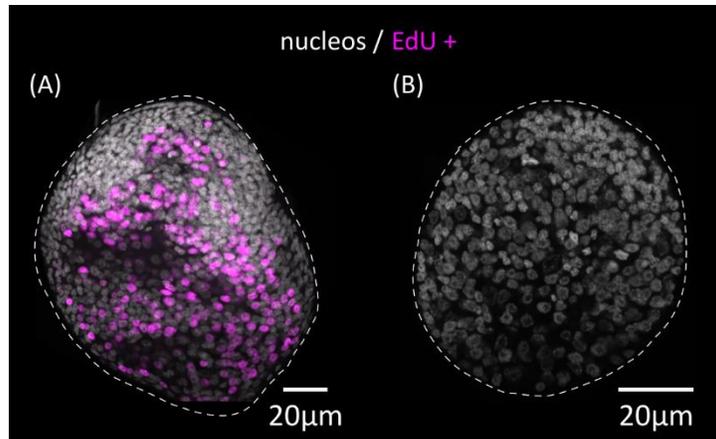
Figura R2. Desarrollo *in vitro* de *H. microstoma* a 30°C. (A) Muestra de larvas en estadios 2.1 (flecha clara) a 2.2 (flecha rellena) obtenidas de escarabajos en el cuarto día de la infección, preparadas para iniciar el cultivo. (B) Día 3 de cultivo se observan larvas en los estadios 2.2 (flecha clara) a 3.2 (flecha rellena). (C) Día 10 de cultivo, se observan larvas en estadio 4.1 (flecha clara) y 4.2 (flecha rellena), esta última con morfología normal y desarrollo de los ganchos del roseto, pero con un área clara en el cercómero (\*) (D) Cisticercoide activado (flecha clara) luego de 20 días de desarrollo *in vitro*.

### 3.2.2. Marcado metabólico con EdU *ex vivo*

Como primera aproximación para evaluar la posibilidad de realizar manipulaciones experimentales de las larvas, probamos realizar el marcado metabólico con EdU en medio de cultivo inmediatamente tras la obtención de larvas a partir de escarabajos infectados. Definimos a este tipo de ensayos que se realizan por un tiempo corto en medio de cultivo como condiciones *ex vivo*.

Los resultados del procedimiento de marcado *ex vivo* de larvas en metamorfosis con EdU son variables, y en general observamos que una parte de las larvas en la muestra no incorporan marca (figura R3). Cuantificamos la proporción de larvas marcadas *ex vivo* en muestras obtenidas del cuarto día post-infección (4 dpi, estadios 1.2 a 3.1), observando un 16% (n= 25 larvas) en un ensayo preliminar usando un medio de cultivo para células de mamífero (RPMI 1640) y 26% (n= 31 larvas) y 74% (n= 23 larvas) en dos ensayos con medio de cultivo de Schneider, elegido para el cultivo *in vitro*.

Las muestras obtenidas pueden ser usadas para ensayos de hibridación *in situ* con el fin de analizar si un determinado marcador se encuentra expresado por células proliferantes, mediante colocación con la incorporación de EdU, pero es necesario usar un gran número de larvas porque una parte no tienen marca de EdU (figura R3). En comparación, el procedimiento de marcado *in vivo* mediante inyección de EdU a los escarabajos infectados es más robusto y permite obtener un mayor número de larvas tratadas (ver sección 3.3, figuras R5B – E).



viii Figura R3

Figura R3. Marcado metabólico *ex vivo* con 5-etil-2'-desoxiuridina (EdU) por 2 h. Los núcleos con señal positiva para EdU se detectaron por fluorescencia y se indican con color magenta. (A) Larva que incorporó EdU, proyección de 1  $\mu\text{m}$  (en el eje z). (B) Larva que no incorporó EdU, proyección de 0,8  $\mu\text{m}$  (en el eje z).

### 3.3. Proliferación celular en la metamorfosis larvaria *in vivo*

Al inicio de la metamorfosis larvaria observamos que tiene lugar un proceso de crecimiento que involucra un aumento del número de células con morfología característica de las células germinativas: con núcleo grande y un nucléolo grande y prominente, con citoplasma basófilo debido a la abundancia de ribosomas y con pocas extensiones citoplasmáticas (Sakamoto y Sugimura, 1970; Bolla y Roberts, 1971; Koziol y col., 2014; Koziol, 2017). Identificamos seis células germinativas en las oncosferas eclosionadas mediante una preparación con yoduro de propidio (que tiñe todos los ácidos nucleicos, por lo que tiñe en forma intensa el citoplasma de las células ricas en ARN ribosomal) y DAPI. Presentan una tinción intensa del citoplasma, de aspecto liso (no granular), un gran nucleolo y están ubicadas bilateralmente (figura R4A). Cabe aclarar que la larva oncosfera presenta también otros tipos de células que adquieren una tinción citoplasmática menos intensa. En las larvas al inicio de la metamorfosis (1 d.p.i) observamos un mayor número de células con morfología y tinción citoplasmática típica de las células germinativas (tinción citoplasmática intensa y homogénea), y también otros tipos de células. Por un lado, algunas células presentan una tinción citoplasmática heterogénea que interpretamos como células ricas en ARN ribosomal pero con posibles estructuras internas como gránulos y vesículas. Por otro lado identificamos también células que no presentan tinción citoplasmática (figura R4B).

Mediante un análisis de conteo de núcleos, registramos un aumento exponencial del número total de núcleos en las larvas durante los tres primeros días de metamorfosis (de una media de 43, a 1219 núcleos, figura R5A). El tiempo para la duplicación del número total de núcleos se estimó a partir de la ecuación de la recta del ajuste lineal de los datos de número de núcleos en escala logarítmica (LOG10) en función del tiempo de desarrollo:

$$LOG10(n) = 0,03(t) + 0,91$$

Consideramos dos ecuaciones en las cuales el número de núcleos aumenta de  $n$  a  $2n$  en un tiempo desde  $t_i$  a  $t_f$  por lo que el tiempo de duplicación ( $\lambda$ ) será  $t_f - t_i$ . Restamos ambas ecuaciones para despejar el tiempo de duplicación.

$$LOG10(2n) - LOG10(n) = (0,03 t_f + 0,91) - (0,03 t_i + 0,91) = 0,03\lambda$$

$$\text{LOG}_{10}(2) = 0,03(\lambda)$$

$$\lambda = 9,9 \text{ horas}$$

Por lo tanto el tiempo de duplicación es aproximadamente 10 horas. Considerando que la salida del ciclo celular y la diferenciación de algunos tipos de células ya está en marcha en estos estadios (ver más adelante), esto representa un límite superior para la duración total del ciclo celular de las células proliferantes durante la metamorfosis larvaria temprana.

Con el fin de identificar la distribución de las células proliferantes durante la metamorfosis larvaria, y teniendo en cuenta las dificultades encontradas para realizar el procedimiento *ex vivo*, desarrollamos un protocolo para el marcado metabólico de las células proliferantes *in vivo*. Para ello, infectamos a escarabajos de la especie *Tenebrio molitor*, que es susceptible a la infección por *H. microstoma* (Voge y Graiwer, 1964) y por su tamaño puede manipularse experimentalmente con facilidad. Realizamos el marcado metabólico de células que se encontraban en proceso activo de síntesis de ADN utilizando el análogo de timidina EdU. Se inyectó EdU en el hemocele de cada escarabajo (figura R5B) en diferentes momentos tras la infección, y se analizó la incorporación de EdU por las células de las larvas de *H. microstoma* 2 horas luego de la inyección (figura R5C). Destacamos que el procedimiento es robusto ya que observamos una alta proporción de larvas marcadas (cerca del 100%) en más de 5 ensayos independientes realizados en los días 3 o 4 de la infección. Por este motivo, este sistema de marcado *in vivo* fue elegido para todos los análisis que requieren del marcado metabólico con EdU y que se describen a continuación.

En los estadios 1.1 y 1.2, las células EdU<sup>+</sup> son muy abundantes y están distribuidas por toda la larva. Sus núcleos son relativamente grandes, de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro en promedio (diámetro mayor,  $n = 27$  células de una larva), y presentan un nucléolo central. Sólo unos pocos núcleos más pequeños en la periferia de las larvas parecen ser siempre EdU negativos (figura R5C). Su diámetro es de 3  $\mu\text{m}$  en promedio ( $n = 6$  células, de la misma larva).

En estadios posteriores (2.1 a 3.2), las células EdU<sup>+</sup> siguen siendo abundantes y se identifica un grupo asociado con el desarrollo del pre-escólex en un área central de la zona anterior. A su vez, hay muchas regiones que parecen carecer de proliferación, especialmente en la

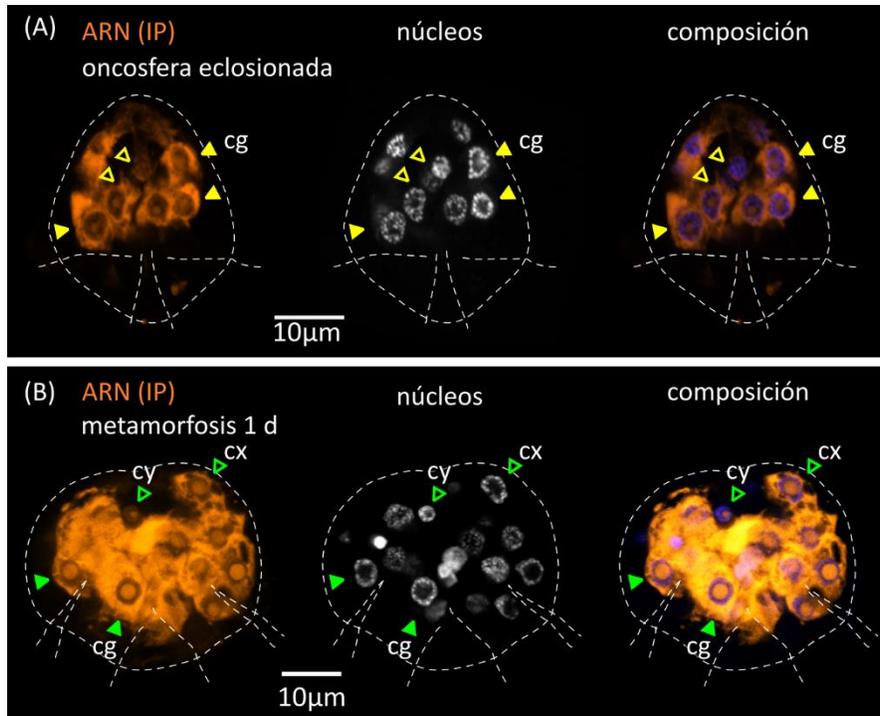
superficie de la larva y en regiones específicas del extremo anterior, incluido el polo anterior y regiones laterales (figura R5C). Por último, en los estadios 4.1 y 4.2 (que han retraído el extremo anterior), las células EdU<sup>+</sup> están ausentes del escólex en desarrollo, pero están presentes en el cuerpo del cisticercoide y en el cercómero. Estos resultados sugieren que el desarrollo del pre-escólex luego de su retracción, involucra la diferenciación de células que ya son post-mitóticas.

Realizando experimentos similares, pero variando el momento en que los parásitos son recolectados luego de la inyección de EdU (tiempo de "caza"), pudimos seguir el destino de las células descendientes de las células proliferantes en distintos momentos del desarrollo. Cuando las larvas fueron expuestas a EdU en los estadios 1.1 a 1.2 y se les permitió desarrollarse durante 24 a 48 horas, la progenie de las células que incorporaron EdU pudo detectarse en todas las regiones de las larvas, con una fuerte acumulación en la periferia y el pre-escólex de las larvas en los estadios 2.2 y 3.2 (figura R5D). Por el contrario, cuando las larvas se expusieron a EdU en el estadio 4.1 (5 d.p.i.), se les permitió completar la metamorfosis y se activaron *in vitro*, las células marcadas se restringieron al cuerpo del cisticercoide y estuvieron ausentes del escólex (n=9 cisticercoides activados; figura R5E). Por lo tanto, existe un pronunciado gradiente anteroposterior en el desarrollo del cisticercoide, y sólo la proliferación celular durante las primeras fases de desarrollo (hasta la fase 3.2) contribuye a la formación del escólex.

Para estimar algunos parámetros del ciclo celular durante la metamorfosis larvaria temprana, combinamos el marcaje de EdU con inmunofluorescencia para la histona H3 fosforilada (PH3), un marcador mitótico (Sauvé y col., 1999). Realizamos el análisis clásico de la fracción de mitosis marcadas (FLM) con intervalos de 30 minutos (Shackney y Ritch, 1987; figuras R5F, G). Las larvas en los estadios 2.1 a 2.2 fueron expuestas a EdU *in vivo*, y recogidas a diferentes tiempos (de diferentes escarabajos) para la doble detección de EdU y PH3. Como era de esperar, después de sólo 30 minutos casi no hay colocalización de ambas marcas, ya que las células que incorporan EdU se espera que estén todavía en fase S o en fase G2. La fracción de mitosis marcadas con EdU aumentó de forma constante a medida que las células marcadas alcanzaban la fase M, y casi todas las mitosis estaban

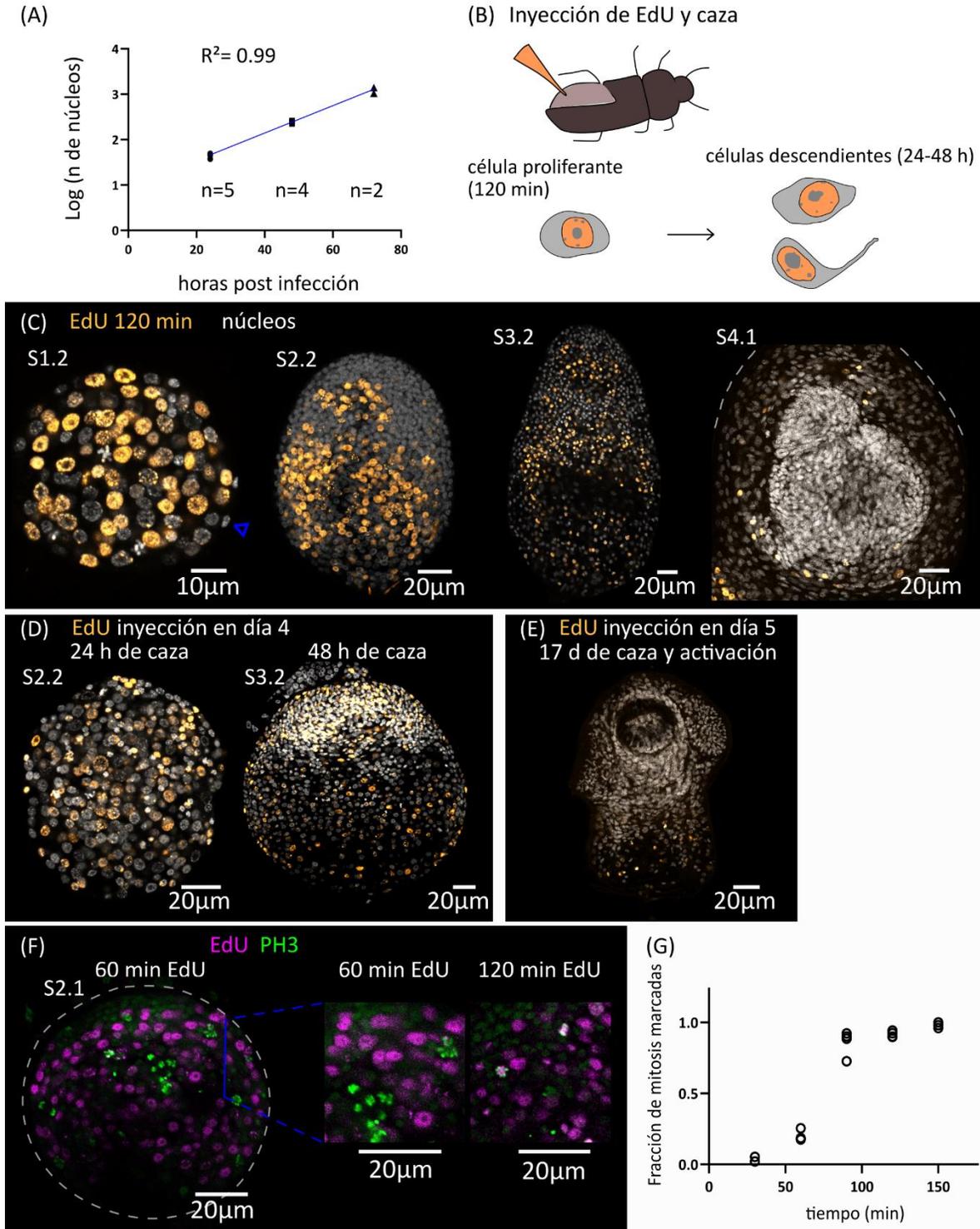
marcadas después de 120 minutos. La duración media de la fase G2 puede estimarse como el punto de tiempo en el que el 50% de las mitosis están marcadas (Shackney y Ritch, 1987). Obtuvimos la estimación de la duración media de esta fase directamente del gráfico, que es de aproximadamente 75 minutos (figura R5G).

En un experimento diferente con tiempos de caza más largos, encontramos que sólo el 14% de las mitosis estaban marcadas 27 horas después de la inyección de EdU. Aunque la duración exacta del pulso de EdU (es decir, el periodo de tiempo durante el cual el EdU está disponible para su captación en el hemocoele tras la inyección) no puede ser controlado porque no es posible realizar un lavado de EdU *in vivo*, estos resultados indican que la duración del pulso de EdU en el hemocoele debe ser relativamente corta (si el pulso de EdU durara en el orden de 27 horas, la fracción de mitosis marcadas no descendería en este periodo de tiempo).



ix Figura R4

Figura R4. Identificación de las células germinativas mediante la tinción con yoduro de propidio (IP) que marca el citoplasma rico en ARN ribosomal y el nucleolo. (A) Las células germinativas de la oncosfera eclosionada presentan una tinción citoplasmática intensa y homogénea (cg, indicadas con cabezas de flecha rellenas), mientras que otras células de la oncosfera presentan una tinción citoplasmática más suave y heterogénea (cabezas de flecha vacías). (B) Células con morfología de células germinativas de una larva de 1 día de metamorfosis (cg, cabezas de flecha rellenas). Se indica también dos tipos de células que presentan una tinción citoplasmática diferente: células con tinción citoplasmática heterogénea (cx) y sin tinción citoplasmática (cy, cabezas de flecha vacías). Las imágenes son proyecciones de máxima intensidad de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  del espesor de las larvas (no incluyen todas las células).



x Figura R5

Figura R5. Proliferación celular durante la metamorfosis larvaria en *H. microstoma*. (A) Cuantificación del aumento del número total de núcleos, representado como logaritmo del

número de núcleos, durante la metamorfosis larvaria temprana. Se indica en el gráfico la recta correspondiente a la regresión lineal con  $R^2$  0.99:  $\text{LOG}_{10}(n)=0,03(t)+0,91$ , a partir de la cual se estimó el tiempo de duplicación del número de núcleos en aproximadamente 10 horas. (B) Diagrama que ilustra el método utilizado para la inyección de EdU en escarabajos *T. molitor* infectados (arriba) y diagrama de los patrones de marcado esperados en diferentes momentos de caza tras la inyección (abajo). (C) Localización de la marca de EdU a las 2 h de la inyección para larvas en diferentes estadios de desarrollo (S1.2-4.1). En S1.2 se indica un núcleo superficial típico sin marca de EdU (cabeza de flecha). (D) Localización de la marca de EdU en larvas a las 24-48 h de caza tras la inyección. (E) Localización de la marca de EdU en una larva cisticercoide que fue expuesta a EdU a los 5 d.p.i., se desarrolló completamente *in vivo* durante 17 días adicionales, y fue activada imitando *in vitro* la infección del huésped definitivo. (F) Detección de EdU e histona H3 fosforilada (PH3) en larvas en desarrollo a diferentes tiempos de caza luego de la inyección de EdU a escarabajos infectados. Se muestra en detalle un área de una larva de 60 min de caza con escasa colocalización de las dos marcas, y un área representativa de una larva de 120 min de caza con extensa colocalización de las dos marcas en las figuras mitóticas. (G) Cuantificación de la fracción de mitosis marcadas en larvas tras diferentes tiempos de caza ( $n= 2-4$  larvas, con 19-63 células mitóticas analizadas por larva, para cada tiempo; cada punto representa una larva). La duración media de la fase G2 se estimó directamente del gráfico como el tiempo en el que la curva alcanza la proporción 0,5 que corresponde a 75 min.

### 3.4. Detección de eventos de eliminación de células durante la metamorfosis larvaria y en el desarrollo de las oncosferas

#### 3.4.1. Detección de eventos de eliminación de núcleos durante la metamorfosis larvaria

Con el objetivo de detectar las células específicas de la oncósfera, que no participarán en el desarrollo del metacestodo y son eliminadas durante la metamorfosis larvaria, detectamos células con ADN fragmentado en el núcleo (Gavrieli y col., 1992). Realizamos el procedimiento de TUNEL, un ensayo que usa la enzima transferasa terminal para agregar nucleótidos modificados si hay cortes doble hebra en el ADN. El ensayo control positivo de la técnica fue realizado por incubación de las muestras con DNAsal y se observó señal TUNEL<sup>+</sup> en núcleos en toda la larva.

Observamos que los núcleos TUNEL<sup>+</sup> son escasos en las larvas en estadio 2.1 (3 d.p.i.). Los núcleos TUNEL<sup>+</sup> en estas larvas presentaron una tinción muy escasa con el fluoróforo DAPI (figura R6A) y no presentaron la morfología típica de los núcleos apoptóticos con condensación de la cromatina que ha sido observada en planarias (Gavrieli y col., 1992; Pellettieri y col., 2010). Los mecanismos y la morfología presentada por las células en proceso de eliminación son desconocidos para estas larvas. También resultó llamativo encontrar que, en algunos casos, las células del escarabajo hospedador que se encuentran adheridas a la parte externa de la larva son TUNEL<sup>+</sup> (figura R6A).

#### 3.4.2. Detección de la activación de caspasas durante la metamorfosis larvaria

Con el objetivo de identificar si tienen lugar eventos de apoptosis en las larvas en metamorfosis realizamos la detección de la activación de las caspasas ejecutoras *in situ* mediante el reactivo Cell Event. El reactivo consiste en un péptido de cuatro aminoácidos (DEVD) conjugado con un colorante de unión a ácido nucleico y es permeable a las membranas celulares. La actividad de las caspasas ejecutoras en las células apoptóticas escinde el péptido DEVD permitiendo que el colorante se una al ADN y sea fluorescente.

Observamos algunas células marcadas en larvas en metamorfosis en el estadio 2.2 (figura R6B). Las células marcadas presentaron un núcleo relativamente pequeño y con brillo moderado en la tinción con DAPI. El ensayo control positivo, por incubación de las larvas ex

vivo con peróxido de hidrógeno, presenta más células marcadas en comparación (figura R6C) y demuestra que la señal detectada se relaciona con procesos de apoptosis.

En general los eventos de degradación de ADN o activación de las caspasas efectoras son escasos en las larvas analizadas. Podemos interpretar que la eliminación de células no es un proceso predominante en estos estadios de la metamorfosis larvaria (1.2 y 2.2) y las células específicas de la oncosfera pudieron ser eliminadas en un estadio anterior. Para responder a esta pregunta se debería realizar el ensayo con muestras de larvas al inicio de la metamorfosis (estadio 1.1) lo que es técnicamente desafiante debido a su pequeño tamaño (35 – 50  $\mu\text{m}$  de diámetro).

Adicionalmente, como se describe a continuación, otros resultados del grupo de investigación obtenidos en paralelo indicaron que la eliminación de los núcleos de muchas células de estructuras específicas de la oncosfera ocurre durante el desarrollo embrionario, resultando en células anucleadas ya en la oncosfera infectiva.

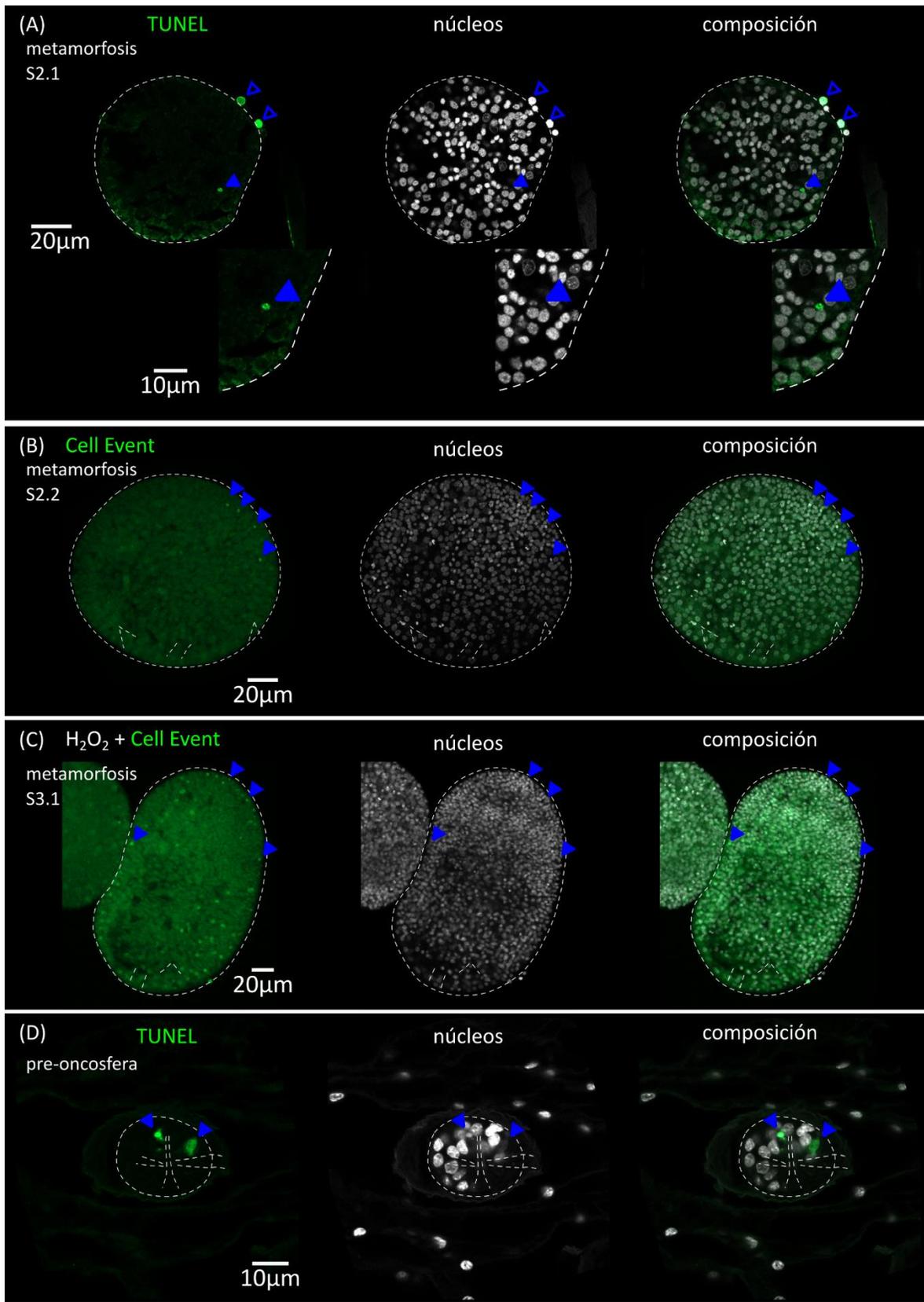
#### 3.4.3. Detección de la eliminación de núcleos durante el desarrollo de las oncosferas

El desarrollo de las larvas oncosferas tiene lugar en el útero de los segmentos grávidos del gusano adulto. En el desarrollo embrionario se distinguen tres etapas: una primera etapa de clivaje, con divisiones completas y asimétricas, una segunda etapa reconocida como pre-oncosfera que se caracteriza por procesos de proliferación y diferenciación celular, y una etapa final de oncosfera que se caracteriza por mantener una morfología estable, sin cambios aparentes (Rybicka, 1967). Observaciones de nuestro grupo de investigación indican que durante el desarrollo final de las pre-oncosferas tiene lugar un proceso de disminución del número de núcleos. Consideramos como hipótesis general que la mayoría de los núcleos de la pre-oncosfera son eliminados durante su desarrollo final y la oncosfera infectiva es un organismo reducido, en el que muchas células son anucleadas.

En una aproximación complementaria al estudio de la metamorfosis larvaria, analizamos el desarrollo de las larvas pre-oncosferas en el útero de los gusanos adultos. Se identificó un estadio del desarrollo que presenta un número máximo de núcleos (82 núcleos, estadio *max*, en que ya se encuentra avanzada la diferenciación de células nerviosas, musculares,

tegumentarias y la formación de los ganchos), mientras que estadios más avanzados presentan menor número, y las oncosferas infectivas presentan solo 25 – 30 núcleos (datos no publicados). En este período final del desarrollo de las pre-oncosferas ensayamos el procedimiento de TUNEL para la detección de la eliminación de núcleos. Detectamos núcleos TUNEL<sup>+</sup> en el estadio *max*, y en pre-oncosferas en etapas más avanzadas del desarrollo. Observamos núcleos TUNEL<sup>+</sup> con dos morfologías principales que se ilustran en la figura R6D. Por un lado, son menos frecuentes los núcleos pequeños y brillantes en la tinción de ADN con DAPI. Por otro lado, es más frecuente observar núcleos con tinción de TUNEL intensa pero muy escaso brillo para la tinción con DAPI.

Encontramos evidencia de la eliminación de núcleos en el tegumento y el sistema nervioso de las pre-oncosferas que será mostrada en las secciones 3.5 y 3.7. Por ejemplo, el tegumento sincitial que recubre a la larva no presenta citones (cuerpos celulares tegumentarios nucleados) en la oncosfera infectiva (figura R7A). Los núcleos de células musculares también se reducen en número en etapas finales del desarrollo (datos no publicados). Igualmente, dado que las oncosferas infectivas presentarían algunos tipos celulares nucleados especializados como células glandulares y algunas células musculares (Collin, 1969; Świdorski y col., 2018), resta evaluar si estas células y sus núcleos son eliminados o mantenidos al inicio de la metamorfosis larvaria. Cabe señalar y tener en cuenta que de los 25 – 30 núcleos de la oncosfera infectiva solo 6 corresponden a células germinativas en *H. microstoma* como hemos confirmado recientemente mediante reconstrucción ultraestructural de estas larvas (proyecto CSIC I+D 2022 “Viajando ligero: eliminación de núcleos somáticos en las etapas finales del desarrollo de la larva del cestodo *Hymenolepis microstoma*”, responsable U. Koziol).



xi Figura R6

Figura R6. Eliminación de núcleos en larvas de *H. microstoma*. (A) Ensayo de TUNEL sobre corte histológico de una larva en metamorfosis (en estadio 2.1). Mediante TUNEL se detecta ADN fragmentado en una célula en el interior de la larva (cabeza de flecha llena) que se destaca con mayor magnificación en la fila inferior. También se puede observar señal TUNEL<sup>+</sup> en dos células del escarabajo hospedador (cabeza de flecha abierta). (B y C) Detección de la actividad de caspasas mediante el reactivo Cell Event. Se indican con cabezas de flecha ejemplos de células con señal positiva. (C) Detección de la actividad de caspasas luego de realizar una incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inducir apoptosis. (D) Detección de la degradación de ADN (TUNEL) en una pre-oncosfera en desarrollo. Se indican dos núcleos TUNEL<sup>+</sup>: a la izquierda el núcleo es pequeño y parece fragmentado, a la derecha se trata de un núcleo de tamaño normal y con bajo brillo en la tinción nuclear general. Se indica con líneas punteadas el contorno de la larva y la ubicación de los ganchos en cada caso.

### 3.5. Desarrollo del tegumento con la formación de citones tegumentarios

Con el objetivo de estudiar la organización del tegumento y la formación de citones tegumentarios durante la metamorfosis larvaria, adaptamos un método desarrollado originalmente para para la tinción específica del tegumento del trematodo *S. mansoni*. El método consiste en la incubación de los parásitos vivos en una solución hipotónica con dextrano fluorescente que resulta en el ingreso del dextrano al tegumento distal y a los citones que tienen continuidad citoplasmática con el mismo (Wendt y col., 2018). Aplicamos además el mismo método a oncosferas eclosionadas.

#### 3.5.1. Tegumento de las oncosferas

En el desarrollo de las oncosferas de la mayoría de los cestodos, incluidos *Hymenolepis* spp., se ha descrito un único citón binucleado (Ubelaker, 1980; Swiderski, 1983). En la oncosfera eclosionada de *Hymenolepis microstoma* observamos que no hay citones (células tegumentarias nucleadas) en este estadio, como se ha confirmado también mediante un análisis de reconstrucción ultraestructural (proyecto CSIC I+D 2022 “Viajando ligero: eliminación de núcleos somáticos en las etapas finales del desarrollo de la larva del cestodo *Hymenolepis microstoma*”, responsable U. Koziol). Interpretamos que el citón binucleado ha sido eliminado en etapas finales del desarrollo de las oncosferas. La tinción con dextrano en la oncosfera eclosionada marca sólo el tegumento distal y las células glandulares que constituyen las glándulas de penetración (figura R7A).

La glándula de penetración es sincitial y con dos núcleos celulares, se dispone en forma de U, con dos largas extensiones citoplasmáticas que contactan el tegumento distal entre los ganchos mediales y laterales (Ubelaker, 1980). En el proceso de eclosión, la glándula de penetración se fusiona con el tegumento distal y su contenido se libera en forma de *blebs* (protuberancias citoplasmáticas) que se han observado mediante microscopía electrónica (Collin, 1969; Ubelaker, 1980). La tinción del tegumento distal y las glándulas de penetración observada en nuestros ensayos confirma la continuidad citoplasmática entre estas dos estructuras en la oncosfera eclosionada, y sirve como un control interno que demuestra que mediante este método se marcan los cuerpos celulares asociados al

tegumento. Este control interno nos permite validar la ausencia de citones tegumentarios en esta etapa.

### 3.5.2. Formación de citones tegumentarios en la metamorfosis larvaria

Se identificaron pocos citones tegumentarios en larvas de 1 día (en promedio 6 citones de 5 larvas analizadas) y no se observaron estructuras específicas de la oncosfera como la glándula de penetración en este estadio. El número de citones conectados al tegumento distal aumentó proporcionalmente con el número total de células de las larvas durante los tres primeros días de metamorfosis y se encontraron distribuidos en toda la superficie de las larvas (figuras R7B y C). El análisis de estos datos sugiere que una proporción constante de la producción proliferativa de las células germinativas se destina a citones tegumentarios (figura R7C).

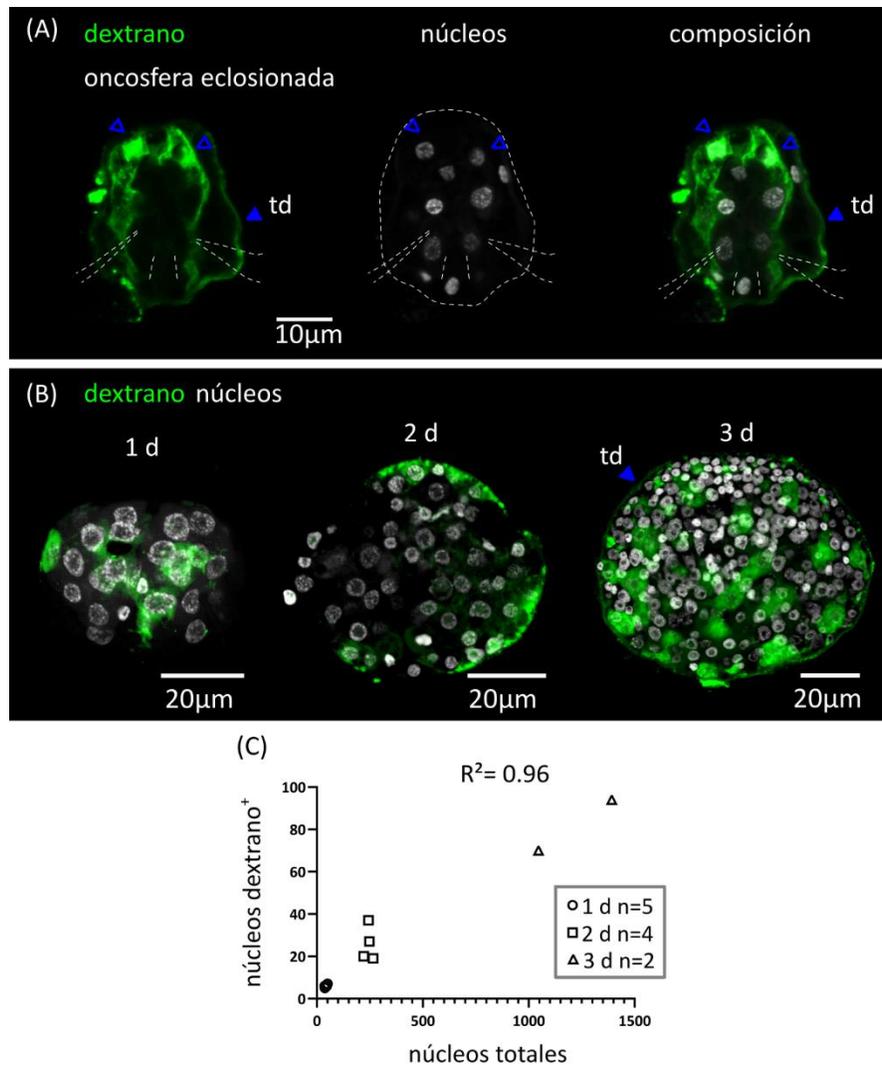
Confirmamos la presencia de citones tegumentarios en los estadios 1.1 a 1.2 (3 d.p.i.) mediante microscopía electrónica de transmisión, con varios procesos citoplasmáticos cortos que los conectan a un citoplasma distal muy delgado (de aproximadamente 200 nm de grosor, figura R9A).

Para estudiar la diferenciación de citones tegumentarios a partir de las células germinativas de las larvas combinamos experimentos de pulso y caza con EdU con el marcado con dextrano. Expusimos larvas en los estadios 2.1 a 3.1 a EdU *in vivo*, y seguimos el destino de las células marcadas (figuras R8A - C). Dos horas después de la exposición a EdU, los citones tegumentarios dextrano<sup>+</sup> son negativos para EdU, lo que confirma que son post-mitóticos. Sin embargo, los citones tegumentarios EdU<sup>+</sup> se detectaron por primera vez 4 horas después de la exposición a EdU (el 17% de los citones tegumentarios fueron EdU<sup>+</sup> tras esta incubación). La proporción de citones EdU<sup>+</sup> es mayor en los experimentos de 27 horas de caza (el 29% de todos los citones dextrano<sup>+</sup> fueron EdU<sup>+</sup>) y sugiere que nuevos citones tegumentarios se generan de forma acumulativa en este período de tiempo (figura R8D).

### 3.5.3. Análisis ultraestructural del tegumento

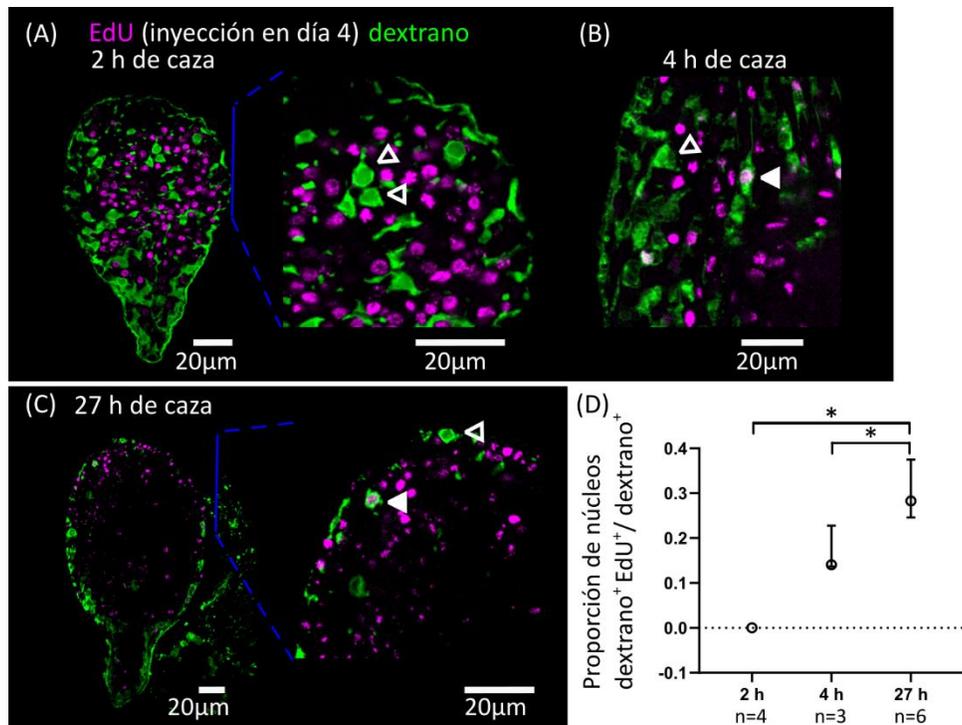
El tegumento distal en las larvas de *Hymenolepis microstoma* es delgado: de 205 nm de espesor promedio en el estadio 2.1 (3 d.p.i.; N= 1 corte de una larva; n= 4 medidas), de 1068 nm en el estadio 2.2 (4 d.p.i.; N= 1 corte de una larva; n= 5 medidas) y de 586 nm en el

estadio 3.1 (5 d.p.i.; N= 1 corte de una larva; n= 5 medidas). La membrana del tegumento distal es en general levemente irregular y con pequeñas ornamentaciones (figura R9). En comparación, trabajos realizados con larvas de cestodos de las familias Cyclophyllidea y Taeniidae en general han observado el desarrollo de microvellosidades (Collin, 1970; Sakamoto y Sugimura, 1970; Holcman y col., 1994; Holcman y Heath, 1997). Para la especie *H. citelli* describieron largas microvellosidades en los estadios 2 y 3 de la metamorfosis (Collin, 1970).



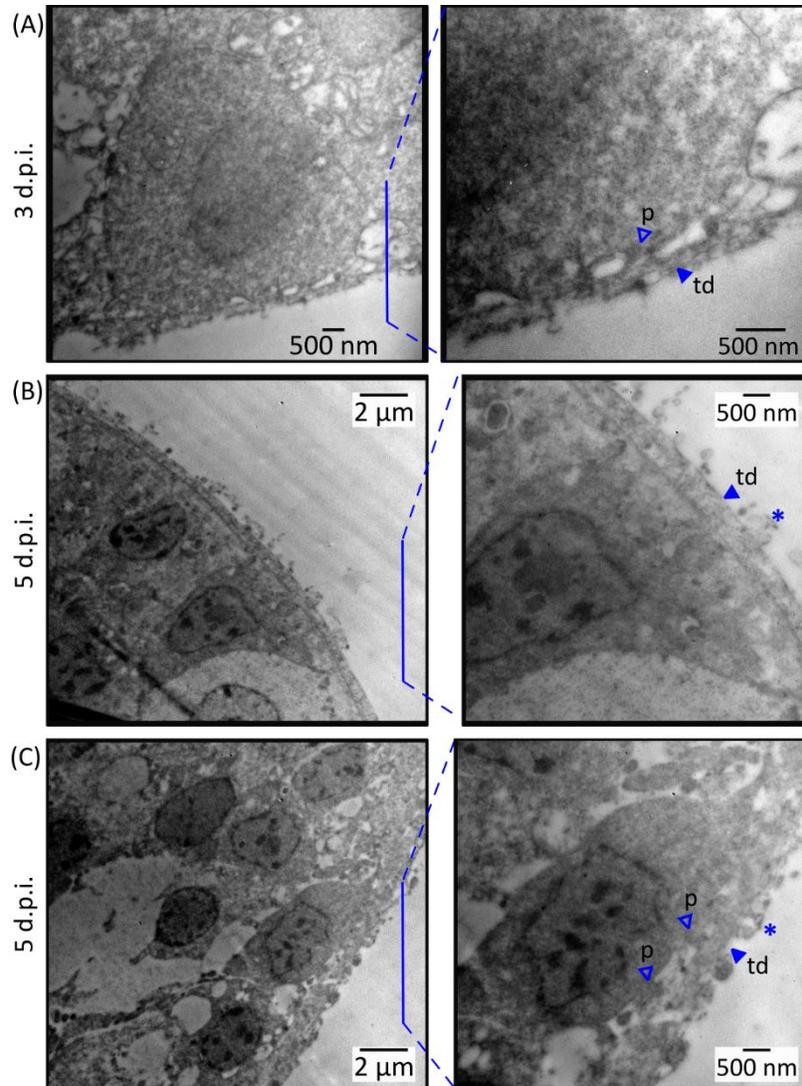
xii Figura R7

Figura R7. Diferenciación de los citones tegumentarios. (A) El procedimiento de marcado con dextrano en la larva oncosfera eclosionada pone en evidencia el tegumento distal (td) y las células que constituyen la glándula de penetración (cabezas de flecha abiertas). En este estadio no hay citones tegumentarios. (B) Marcado con dextrano del tegumento de larvas en diferentes momentos tras la infección (1, 2 y 3 d.p.i., correspondientes a los estadios 1.1, 1.2 y 2.1). (C) Cuantificación del aumento de núcleos marcados con dextrano (dextrano<sup>+</sup>) en comparación con el número total de núcleos de las larvas en metamorfosis.



xiii Figura R8

Figura R8. Cinética de diferenciación de los citones tegumentarios. (A - C) Ejemplos de larvas representativas de los ensayos de marcado con EdU y diferentes tiempos de caza. Se combina el marcado con dextrano del tegumento y la detección de la incorporación de EdU. Las puntas de flecha abiertas y rellenas indican los citones dextrano<sup>+</sup>/EdU<sup>-</sup> y de dextrano<sup>+</sup>/EdU<sup>+</sup>, respectivamente. (D) Cuantificación de la proporción de citones tegumentarios (núcleos de dextrano<sup>+</sup>) marcados por EdU en diferentes tiempos de caza tras el marcado con EdU. Los puntos muestran los valores medios y los bigotes los valores máximos y mínimos (\*p < 0,05, prueba de Mann-Whitney).



xiv Figura R9

Figura R9. Ultraestructura del tegumento de larvas en metamorfosis. (A) Citón tegumentario de una larva de 3 días (3 d.p.i.), a la derecha se incluye una vista detallada del tegumento distal (td) y su conexión con el citón tegumentario a través de puentes citoplasmáticos (p). (B) y (C) Posibles citones tegumentarios en muestras de larvas de 5 días (5 d.p.i.). A la derecha se incluye un detalle de la célula, el tegumento distal (td) y los puentes citoplasmáticos (p) que se señalan en el caso en que se encuentran más definidos. El tegumento distal en este estadio presenta ornamentaciones irregulares (asteriscos). Microscopía electrónica de transmisión.

### 3.6. Desarrollo del sistema muscular

Previo a la metamorfosis, en el estadio de oncosfera, el sistema muscular comprende en su mayoría fibras superficiales circulares, un par de músculos dorsoventrales y una compleja disposición de músculos que están unidos a los ganchos y son responsables de su extensión y retracción (Ubelaker, 1980; Hartenstein y Jones, 2003). El sistema muscular es completamente remodelado durante la metamorfosis larvaria, ya que el cisticercoide tiene un complejo conjunto de fibras musculares que es muy similar al del gusano adulto. Esto incluye fibras musculares longitudinales y circulares de la pared corporal (músculo subtegumentario), fibras musculares longitudinales internas, fibras musculares transversales y una anatomía muscular compleja de fibras intrínsecas y fibras extrínsecas de los órganos de fijación (rostelo y ventosas).

Analizamos la remodelación del sistema muscular mediante la detección de las fibras musculares con un anticuerpo que reconoce isoformas de tropomiosina muscular (isoformas de tropomiosina de alto peso molecular: TPM-HMW; Koziol y col., 2011; figura R10A y C). Se obtuvieron resultados similares al teñir las larvas para la detección de filamentos de actina con faloidina fluorescente (figura R14B, D y E). Durante los estadios iniciales de la metamorfosis (estadios 1.1 a 1.2), las fibras musculares aparecen delgadas y discontinuas en la superficie de las larvas, y los músculos de los ganchos aparecen globosos y desorganizados (figura R10A). Es probable que se trate de las fibras musculares de la oncosfera en proceso de degeneración.

La primera evidencia clara de la diferenciación de nuevas fibras musculares aparece en el estadio 2.1, en el que aparecen fibras musculares circulares y seis haces de fibras musculares longitudinales (dos haces laterales y dos pares de haces dorsales y ventrales, figura R10A). Curiosamente, aunque el sistema muscular de los cestodos adultos es simétrico dorso-ventralmente, estos primeros haces de fibras musculares longitudinales muestran una asimetría dorso-ventral. En un lado (debido a la ausencia de otros puntos de referencia morfológicos, no es posible determinar si corresponde al lado dorsal o ventral), los haces de fibras son más gruesos y están más desarrollados, y cada haz está claramente asociado a un único cuerpo celular grande TPM-HMW<sup>+</sup>.

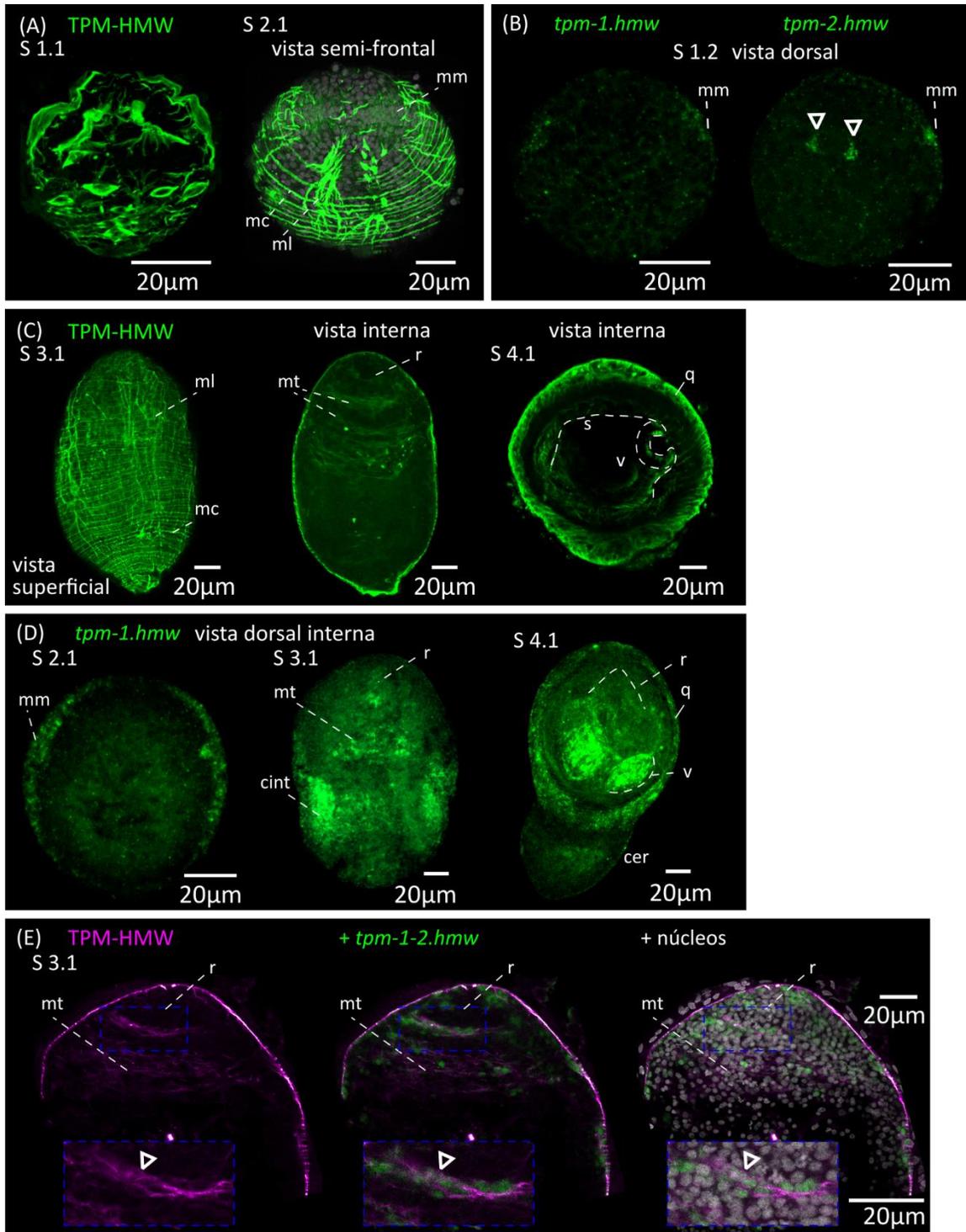
En estadios posteriores (2.2 a 3.2), tanto las fibras musculares circulares como las longitudinales aumentan su número y densidad, formando una retícula ortogonal subtegumentaria (figura R10C). Las fibras longitudinales se extienden por la mayor parte de la longitud de la larva, pero están ausentes en la región más posterior que se convertirá en el cercómero, tal y como describe Caley (1974). Además, aparecen fibras musculares transversales en la región anterior (el futuro escólex), particularmente en la base del rostelo en desarrollo, y entre los primordios de las ventosas (figuras R10C – E). La musculatura intrínseca del rostelo y de las ventosas sólo se diferencia tras la retracción del escólex, durante los estadios 4.1 a 4.2 (figuras R10C y D).

En los cestodos, las células musculares suelen presentar dos regiones bien diferenciadas, el cuerpo celular o miocitón y la fibra muscular, conectadas por delgados cuellos citoplasmáticos (Conn, 1993). Normalmente no es posible identificar los miocitones mediante inmunodetección de tropomiosinas, que marca solo la fibra muscular. Por lo tanto, realizamos hibridación *in situ* (WMISH) con sondas para isoformas de tropomiosina muscular (*tpm-1.hmw* y *tpm-2.hmw*; Koziol y col., 2011) para identificar específicamente los miocitones durante la metamorfosis larvaria (figuras R10B, D y E). Ambas sondas dieron resultados similares, excepto que *tpm.hmw-1* está específicamente ausente del cercómero en desarrollo. La señal robusta más temprana que pudimos detectar fue en el estadio 1.2, en células que formaban una banda en el margen lateral (miocitones marginales), y en el único par de miocitones asimétricos asociados con los primeros haces de fibras musculares longitudinales (figura R10B). Más tarde, en el estadio 2.1, puede detectarse una segunda banda de miocitones en el extremo anterior en la línea media sagital (es decir, perpendicular a los miocitones marginales), formando así una cruz característica cuando las larvas se observan frontalmente (figura R11). Es posible distinguir también los miocitones asimétricos ubicados a los lados de la banda de miocitones sagitales en la figura R11B. Llamativamente, la posición de las bandas de miocitones puede distinguirse mediante la tinción nuclear general, con núcleos organizados de forma compacta con una distribución característica en forma de cremallera (figuras R10A y R11).

En estadios posteriores (2.2 a 3.2), la banda marginal de miocitones se hace más gruesa y aparecen más miocitones por toda la superficie de la larva, especialmente en los tejidos que se convertirán en el quiste, por detrás del pre-escólex. En esta región la marca de WMISH para tropomiosinas musculares forma un cinturón sub-superficial. Aparecen miocitones adicionales en localizaciones internas en la base del pre-escólex que corresponden a los miocitones de las fibras musculares transversales (figuras R10D y E). Para las fibras musculares transversales evidenciamos la asociación de los miocitones y las fibras mediante el doble marcado por WMISH e inmunofluorescencia para tropomiosinas musculares (figura 10E). La expresión de tropomiosinas musculares pudo detectarse en el primordio del rostelo en el estadio 3.1, pero la expresión en las ventosas en desarrollo sólo se produjo tras la retracción del escólex (estadios 4.1 y 4.2, figura R10D). En estos estadios, se detecta un gran número de miocitones en los tejidos del quiste, y también se detectaron algunos en el cercómero en crecimiento. En conjunto, estos resultados amplían los obtenidos mediante inmunofluorescencia e indican que la diferenciación de las células musculares comienza tempranamente durante la metamorfosis larvaria.

Como primera aproximación para evidenciar la diferenciación de células musculares a partir de células germinativas, combinamos los experimentos de pulso y seguimiento con EdU con la detección mediante WMISH de las isoformas musculares de tropomiosina (figuras R12A y B). Para estos experimentos, utilizamos una mezcla de las sondas de *tpm1.hmw* y *tpm2.hmw* para detectar todos los miocitones. Cuando las larvas se expusieron a EdU a los 3 o 4 d.p.i., no se observó colocalización con la expresión de las isoformas de tropomiosina muscular tras 2 horas del marcado con EdU, lo que indica que la expresión de estos genes sólo comienza tras salir del ciclo celular. Se analizaron 4 – 37 células de 2 – 3 larvas para cada condición de marcado (3 o 4 d.p.i.), en las que se analizaron todas las células positivas para cada larva por ser pequeñas (estadios 1.1 a 2.1). Se observaron resultados idénticos en dos experimentos adicionales utilizando sólo la sonda *tpm1.hmw* o *tpm2.hmw* (n=6 larvas en estadios 2.1 a 4.1). Por el contrario, se observó una amplia colocalización después de 24 horas de caza (figura R12). En promedio el 31% de todos los miocitones se marcaron después de 24 horas cuando se inyectó EdU a los 3 d.p.i., y el 18% se marcaron cuando se

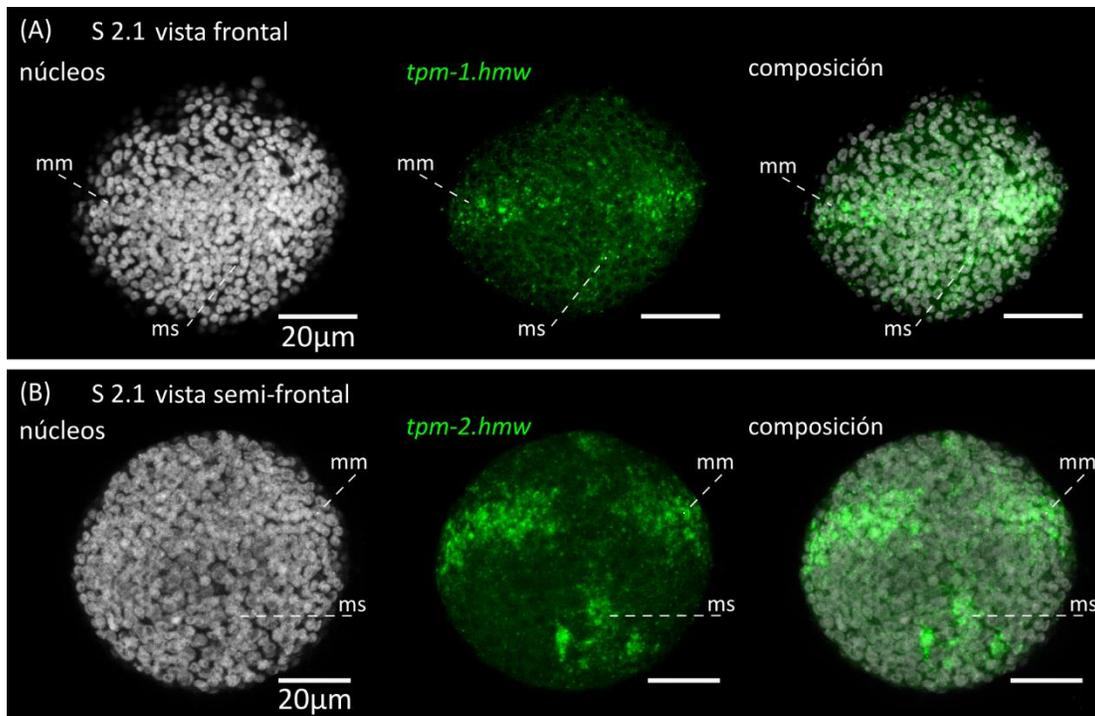
inyectó EdU a los 4 d.p.i. (n=3-4 larvas para cada punto temporal, con 33-101 miocitones analizados para cada larva). Estos resultados confirmaron que entre los 3 y 5 d.p.i. (estadios 1.2 a 4.1) tiene lugar la diferenciación de células que expresan *tpm1.hmw* o *tpm2.hmw* a partir de células proliferantes. También demuestran que la expresión de genes efectores específicos del músculo comienza en un tiempo menor o igual a 24 horas después de la salida del ciclo celular.



xv Figura R10

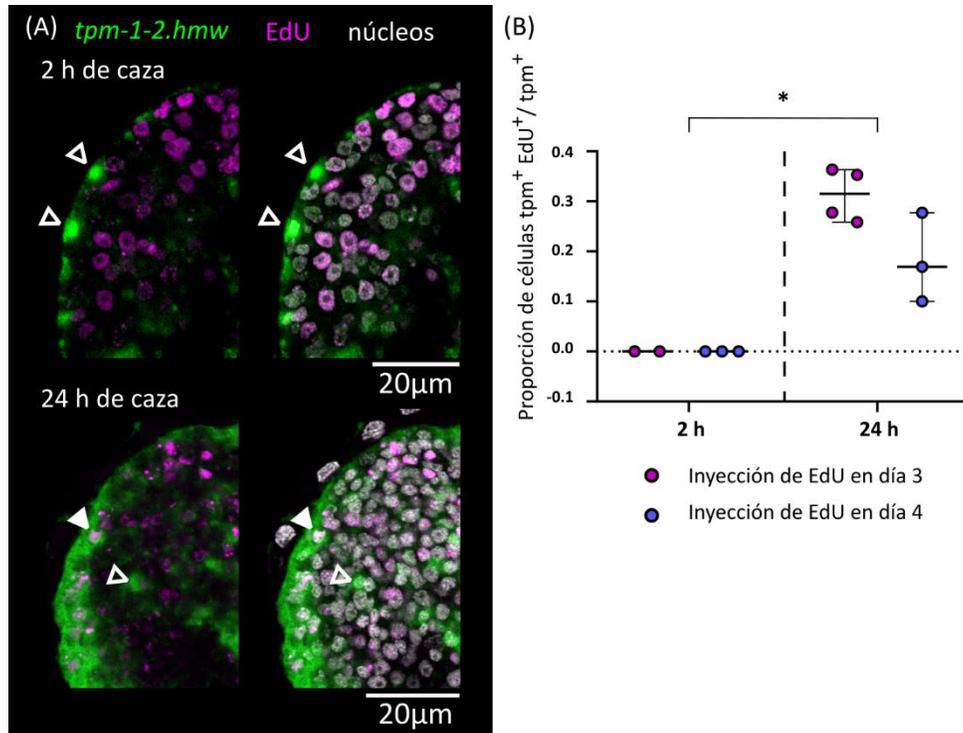
Figura R10. Desarrollo del sistema muscular. (A) Detección de isoformas de tropomiosina muscular (TPM-HMW) mediante inmunofluorescencia en diferentes estadios de desarrollo. La tinción nuclear se incluye en escala de grises para el estadio 2.1, en el que se distinguen

las células dispuestas como cremallera en el margen lateral (mm). (B) Detección más temprana del ARNm para las isoformas de tropomiosina muscular *tpm-1.hmw* y *tpm-2.hmw* mediante WMISH en el estadio 1.2. Las puntas de flecha indican un par de miocitones en la línea media sagital que probablemente corresponden a los primeros haces asimétricos de fibras musculares longitudinales. (C) Inmunofluorescencia para TPM-HMW. Del estadio 3.1, se muestran tanto una vista de planos superficiales como una vista de planos internos de microscopía confocal. Inmunodetección realizada *in toto* excepto en el estadio 4.1, que se realizó sobre un criocorte para mejorar la detección en las estructuras internas. (D) Detección mediante WMISH de *tpm-1.hmw* en diferentes estadios de desarrollo (vista dorsal). (E) Detección de TPM-HMW (IF) y *tpm-1.hmw* y *tpm-2.hmw* (WMISH) en el estadio 3.1. Vista dorsal interna del extremo anterior. Se distinguen miocitones asociados a las fibras musculares transversales, indicados con mayor detalle en el panel inferior (cabeza de flecha). cer, cercómero; cint, cinturón de miocitones; mc, músculo circular; mm, miocitones en el margen lateral; ml, músculo longitudinal; mt, músculo transversal; r, primordio del rostelo; s, escólex en desarrollo; v, ventosa.



xvi Figura R11

Figura R11. Detección de miocitones mediante hibridación *in situ* en los márgenes laterales (mm) y en las líneas medias sagitales (ms) en el estadio 2.1. (A) Detección de *tpm-1.hmw* (vista frontal). (B) Detección de *tpm-2.hmw* (vista semi-frontal).



xvii Figura R12

Figura R12. (A) Ejemplos de larvas con la detección de la incorporación de EdU en combinación con la expresión de *tpm-1.hmw* y *tpm-2.hmw* mediante WMISH con diferentes tiempos de caza tras la inyección de EdU a los escarabajos infectados. Las puntas de flecha abiertas y rellenas indican células  $tpm1-2.hmw^+/EdU^-$  y  $tpm1-2.hmw^+/EdU^+$ , respectivamente. (B) Cuantificación de la proporción de células ( $tpm-1-2.hmw^+$ ) marcadas con EdU en diferentes tiempos de caza tras la inyección de EdU a los escarabajos infectados. Cada punto representa la cuantificación de una larva individual (\* $p < 0,0025$ , prueba de Mann-Whitney para los resultados agrupados de experimentos iniciados en los días 3 y 4 luego de la infección).

### 3.6.1. Expresión de genes relacionados con la diferenciación de células musculares

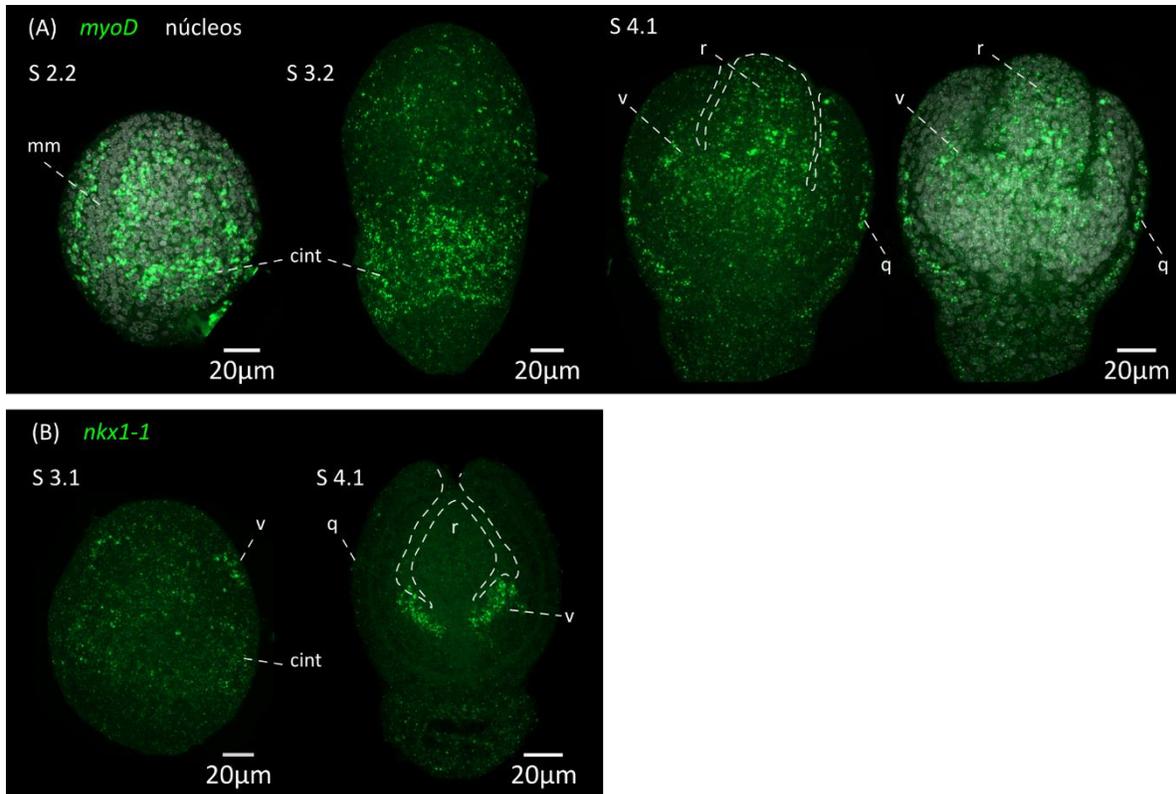
Analizamos la expresión de homólogos de *myoD* y *nkx1-1*, que en planarias se expresan en células de fibras musculares longitudinales y células de fibras musculares circulares, respectivamente (Scimone y col., 2017). También se ha detectado la expresión de estos dos genes en el desarrollo de la larva del parásito *E. multilocularis*. Ambos genes se encuentran expresados en el desarrollo de las cápsulas prolíferas que luego se diferencian en los múltiples protoescólecques que genera esta larva (Maisl, 2019).

El patrón de expresión de *myoD* es principalmente sub-superficial y se encuentra excluido del extremo posterior de forma similar a *tpm-1.hmw*. En el estadio 2.2 las células *myoD*<sup>+</sup> sub-superficiales se localizan a los lados de las bandas de células dispuestas como cremallera en los márgenes laterales, que identificamos previamente como miocitones marginales, y en un cinturón en la zona posterior. También se encuentran células *myoD*<sup>+</sup> en localizaciones internas. En el estadio 3.2 es característica la expresión de *myoD* en un cinturón más extendido en la mitad posterior de la larva, que recuerda a la expresión de *tpm-1.hmw* en este estadio (figuras R13A y R10D). En el extremo anterior las células *myoD*<sup>+</sup> se encuentran más dispersas. También las células *myoD*<sup>+</sup> de localización interna se encuentran dispersas. En el estadio 4.1 la expresión de *myoD* se detecta tanto en la cápsula como en el pre-escólex en desarrollo, con células *myoD*<sup>+</sup> en los primordios de rostelo y ventosas, así como en el cuerpo del cisticercoide y en el quiste (figura R13A).

La expresión de *nkx1-1* se detectó a partir del estadio 3.1, con señal dispersa en la zona del cinturón posterior y en la mitad anterior de la larva. Es llamativa la señal más intensa y localizada en cuatro focos en el pre-escólex en desarrollo que corresponden a los primordios de las ventosas. Esta observación se confirma en estadios posteriores con los primordios de las ventosas más desarrollados, que se distinguen en la tinción general con DAPI y aparecen marcados específicamente para *nkx1-1* en el estadio 4.1 (figura R13B).

En resumen, para ambos genes estudiados, la localización de las células marcadas las relaciona con estructuras musculares en desarrollo. Por un lado, para *myoD* observamos que la distribución de la señal se solapa solo parcialmente con la de *tpm-1.hmw* y *tpm-2.hmw* en el estadio 2.2. La ausencia de señal para *myoD* en las células organizadas como

cremallera, que identificamos previamente como miocitones marginales en este estadio, acompañada de una señal intensa en los alrededores indica que se marcan dos poblaciones de células diferentes pero posiblemente relacionadas. Cabe la posibilidad de que las células *myoD*<sup>+</sup> sean parte del linaje de diferenciación hacia células musculares por estar ubicadas en la cercanía de estructuras musculares. En el estadio 3, el patrón de expresión de *myoD* es similar al de *tpm-1.hmw*. Para *nkx1-1* destacamos la expresión predominante en las ventosas en desarrollo que lo vincula con un tipo particular de célula muscular, aunque se expresa también en menor medida en áreas de expresión de *myoD* como el cinturón (figura R13). También observamos que el patrón de expresión de *nkx1-1* es dinámico siendo que en el estadio 3.1 presenta una expresión más distribuida y en el estadio 4.1 se detecta casi exclusivamente en las ventosas.



xviii Figura R13

Figura R13. Expresión de homólogos de *myoD* (A) y *nkx1-1* (B) durante la metamorfosis larvaria. (A) En el estadio 2.2 *myoD* se expresa ampliamente en regiones sub-superficiales pero está ausente en las células que forman la banda lateral que identificamos previamente como miocitones marginales (mm) y en el extremo posterior. En los estadios 3.1 a 3.2 *myoD* se encuentra expresado en células distribuidas en la mitad anterior y en células agrupadas formando un cinturón en la mitad posterior de la larva. En el estadio 4.1 *myoD* se encuentra expresado ampliamente en el pre-escólex y en el quiste (q). (B) La expresión de *nkx1-1* se detecta en células distribuidas en los dos tercios anteriores de la larva, con cuatro focos más marcados en la zona anterior, que corresponden a los primordios de las ventosas. En el estadio 4.1 se observa una expresión localizada en los primordios de las ventosas (v) y no se detecta expresión en otras áreas del pre-escólex o en el quiste (q). cint, cinturón; r, rostelo.

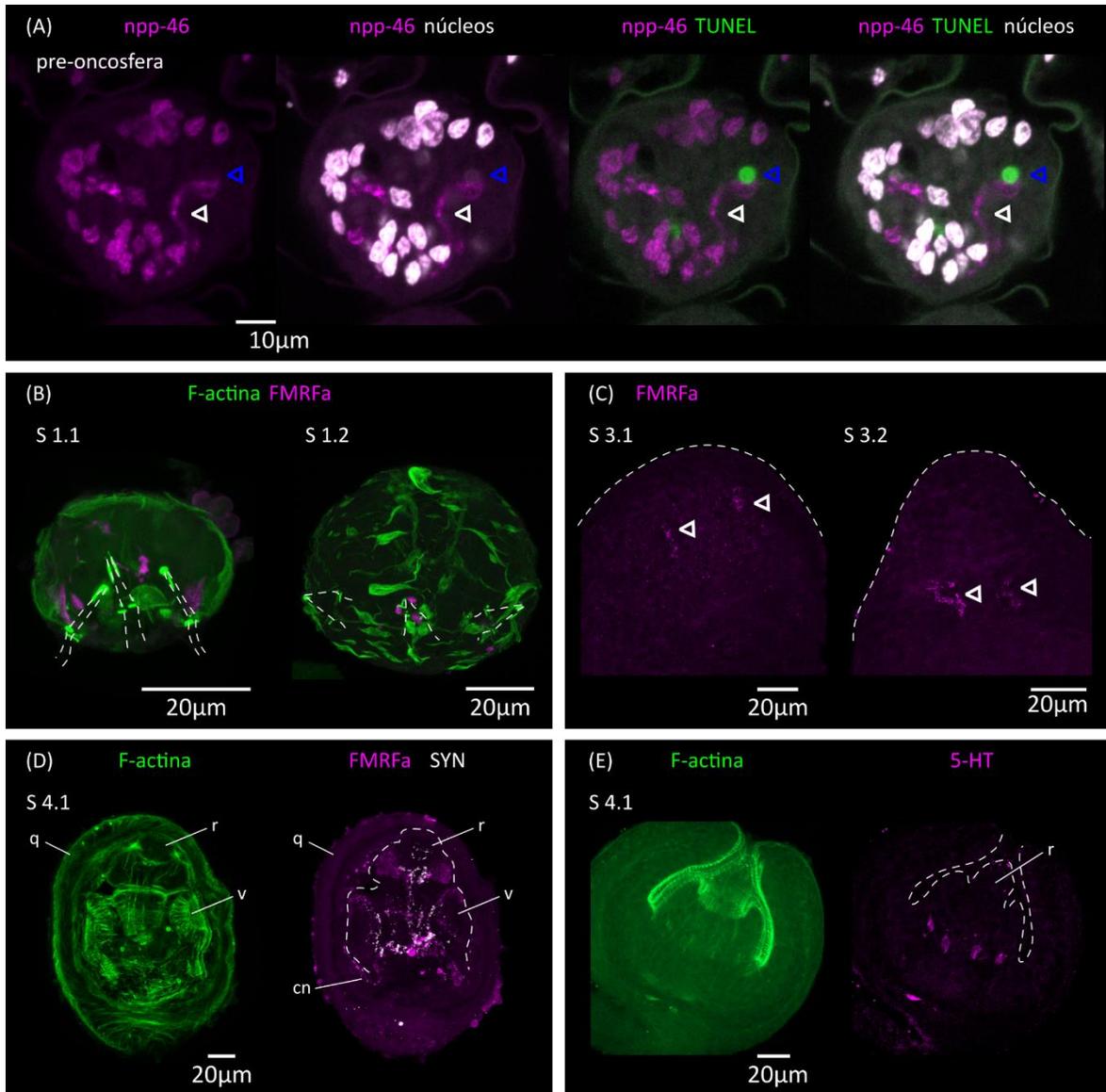
### 3.7. Desarrollo del sistema nervioso

#### 3.7.1. Análisis del sistema nervioso de pre-oncosferas por inmunofluorescencia

Los análisis realizados mediante inmunomarcación en larvas oncosferas han encontrado unas pocas neuronas, que extienden prolongaciones hacia la zona de los ganchos. Por un lado, se describieron dos neuronas en la oncosfera de la especie *H. diminuta* mediante inmunomarcación para estructuras generales como microtúbulos acetilados (Hartenstein y Jones, 2003). Por otro lado, el trabajo con la especie *H. microstoma* en nuestro laboratorio permitió identificar tres neuronas mediante inmunomarcación para FMRFa y sinapsina en pre-oncosferas, de las cuales dos, de ubicación bilateral, expresan el neuropéptido 46 (npp-46) (Preza, 2021). Observaciones realizadas en nuestro laboratorio indican que tiene lugar una reducción en el número de núcleos en etapas tardías del desarrollo de las pre-oncosferas en *H. microstoma* (ver sección 3.4.3). Para evaluar si tienen lugar procesos de eliminación de núcleos en las neuronas, realizamos el ensayo de TUNEL en combinación con inmunofluorescencia para npp-46. Evidenciamos la eliminación específica de los núcleos de neuronas npp-46<sup>+</sup> mientras que las proyecciones npp-46<sup>+</sup> se mantienen (figura R14A). Este constituye un ejemplo de células específicas de la oncósfera (células npp-46<sup>+</sup>) que no presentarían núcleo en la oncosfera infectiva. Los análisis recientes mediante reconstrucción ultraestructural de oncosferas infectivas apoyan esta observación (proyecto CSIC I+D 2022 “Viajando ligero: eliminación de núcleos somáticos en las etapas finales del desarrollo de la larva del cestodo *Hymenolepis microstoma*”, responsable U. Koziol). A continuación presentaremos resultados que indican que estas células no formarán parte del sistema nervioso de las larvas cisticercoides.

### 3.7.2. Análisis del desarrollo del sistema nervioso de larvas en metamorfosis por inmunofluorescencia

Analizamos el desarrollo del sistema nervioso durante la metamorfosis larvaria por inmunofluorescencia para FMRFamida (FMRFa), serotonina (5-HT) y la proteína sinapsina (figura R14B – E). Durante los primeros 3 d.p.i. (estadios 1.1 a 2.1), FMRFamida fue detectada en puntos asociados a los ganchos vestigiales de la oncosfera en la parte posterior de la larva en metamorfosis, que posteriormente desaparecieron (figura R14B). Estas estructuras son probablemente los restos del sistema nervioso de la oncosfera. Por el contrario, en el escólex en desarrollo aparecieron células FMRFa<sup>+</sup> recién a los 5 d.p.i (estadios 3.1 a 3.2) como un par de células débilmente positivas en la base del primordio del rostelo (figura R14C). Solo tras la retracción del pre-escólex se detectó ampliamente la inmunoreactividad para FMRFa y sinapsina, a partir del estadio 4.1, en el rostelo, las ventosas, la comisura cerebral y los cordones nerviosos longitudinales en desarrollo (figura R14D). Por otro lado, la serotonina se detectó en el pre-escólex solo luego de su retracción (estadio 4.1), primero como cuatro células positivas asociadas a la base del rostelo en desarrollo (figura R14E), y posteriormente de forma más extensa en el pre-escólex y en los cordones nerviosos longitudinales en desarrollo. Estos resultados indican claramente que el sistema nervioso del cisticercoide se desarrolla independientemente del de la oncosfera, dada la separación espacial y temporal en su desarrollo.



xix Figura R14

Figura R14. Estructuras nerviosas detectadas mediante inmunofluorescencia (IF) en pre-oncosferas (A) y larvas en metamorfosis (B – E). Ensayos realizados en larvas enteras o secciones (en cuyo caso se menciona). (A) Detección de la eliminación de núcleos asociados a estructuras inmunoreactivas para el neuropéptido npp-46 en un estadio avanzado del desarrollo de la pre-oncosfera. Se señala con flecha blanca una estructura npp46<sup>+</sup> y con flecha azul la localización del núcleo asociado, que se detecta con una señal intensa en el ensayo de degradación de ADN (TUNEL, verde) y una señal muy baja en la tinción general de ADN con DAPI (gris claro). En este estadio, la señal de IF (magenta) es baja por lo que al

registrarla se detecta también señal inespecífica en los núcleos. Ensayo realizado en secciones histológicas. (B) Inmunodetección de FMRFa en estructuras vestigiales (remanentes del estadio de oncosfera) en estadios tempranos de la metamorfosis larvaria (1.1 y 1.2). La tinción con faloidina de los filamentos de actina (F-actina) marca las fibras musculares desorganizadas en estos estadios tempranos. Las posiciones de los ganchos de la larva se indican con líneas discontinuas. (C) Detección más temprana de FMRFa en el escólex en desarrollo durante los estadios 3.1 y 3.2. Las puntas de flecha señalan células FMRFa<sup>+</sup> en la base del primordio del rostelo, en el pre-escólex. (D) Detección de estructuras inmunoreactivas para FMRFa y sinapsina (SYN), y tinción de los filamentos de actina durante el desarrollo posterior del pre-escólex (estadio 4.1). La tinción de la actina filamentosa permite identificar claramente el rostelo (r) y las ventosas en desarrollo (v). Ensayo realizado en crio-secciones. (E) La detección más temprana de inmunoreactividad para serotonina (5-HT) se produce tras la retracción del pre-escólex (estadio 4.1). cn, cordón nervioso; q, quiste; r, rostelo en desarrollo; v, ventosa en desarrollo.

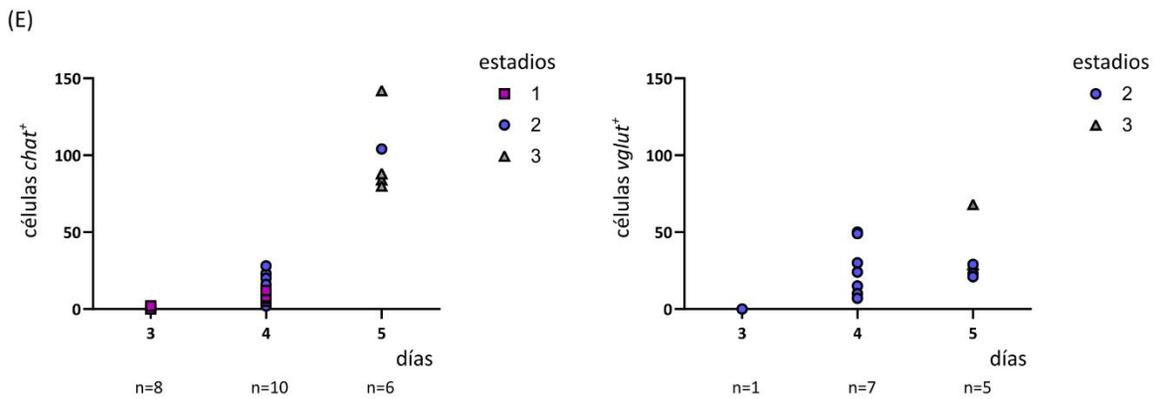
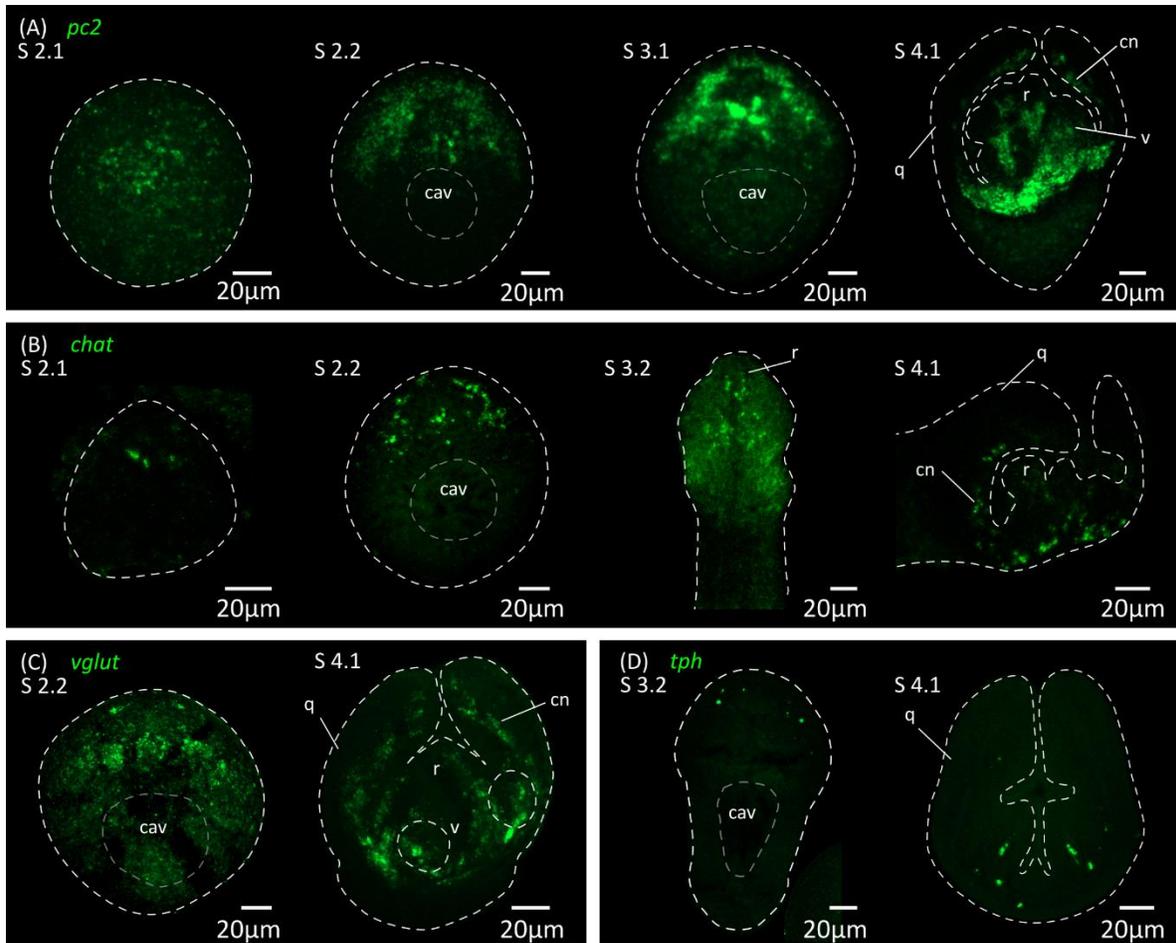
### 3.7.3. Análisis del desarrollo del sistema nervioso por hibridación *in situ* para marcadores de diferentes sistemas de neurotransmisión

Analizamos la expresión de marcadores de los diferentes sistemas de neurotransmisión presentes en *H. microstoma*, que también se expresan en el sistema nervioso del gusano adulto (Preza y col., 2018): prohormona convertasa 2 (*pc2*) como marcador de células peptidérgicas; colina acetiltransferasa (*chat*) como marcador de células colinérgicas; transportador vesicular de glutamato (*vglut*) como marcador de células glutamatérgicas; y triptófano hidroxilasa (*tph*) como marcador de células serotoninérgicas (figura R15).

La expresión de *pc2*, *chat* y *vglut* pudo detectarse en general a partir de los 4 d.p.i. (en el estadio 2.1), en unas pocas células de la mitad anterior de la larva, y el número de células positivas aumentó en los estadios 2.2 a 3.2 (figura R15). De estos marcadores observamos que *chat* se puede detectar en larvas más pequeñas, a partir del estadio 1.2 (figura R15E). La expresión en estos estadios tempranos se asoció con las estructuras más anteriores del sistema nervioso, incluidos los ganglios rostelares en desarrollo, los ganglios cerebrales y la comisura transversal. Tras la retracción del escólex, el desarrollo continúa con dominios de expresión ampliados en el escólex y con la aparición de los cordones nerviosos longitudinales (figura R15).

La expresión de *tph* comenzó más tarde, a los 5 d.p.i. (estadio 3.2, figura R15D), en pocas células del escólex. El número total de células positivas fue siempre pequeño, lo que se correlaciona con el pequeño número de células serotoninérgicas que se encuentran en el gusano adulto (Preza y col., 2018).

El patrón de expresión de *pc2*, *chat* y *vglut* indica que la diferenciación celular en el sistema nervioso ya está en marcha en el estadio 2.1. Observamos también que la expresión inicial de marcadores de neurotransmisión a nivel de ARNm precede a la aparición de la inmunoreactividad para FMRFa, serotonina y sinapsina, que se detectó en los estadios 3.1 a 4.1, al menos 24 horas después (figuras R14C – E).



xx Figura R15

Figura R15. (A) Análisis del desarrollo del sistema nervioso en larvas en metamorfosis mediante hibridación *in situ* de marcadores de neurotransmisión. Se muestran los patrones de expresión de *pc2* (A), *chat* (B), *vglut* (C) y *tph* (D) durante la metamorfosis larvaria. (E) Cuantificación del número total de células *chat*<sup>+</sup> y *vglut*<sup>+</sup> en larvas en metamorfosis de 3 a 5 d.p.i. cn, cordón nervioso; q, quiste; r, rostelo en desarrollo; v, ventosa en desarrollo.

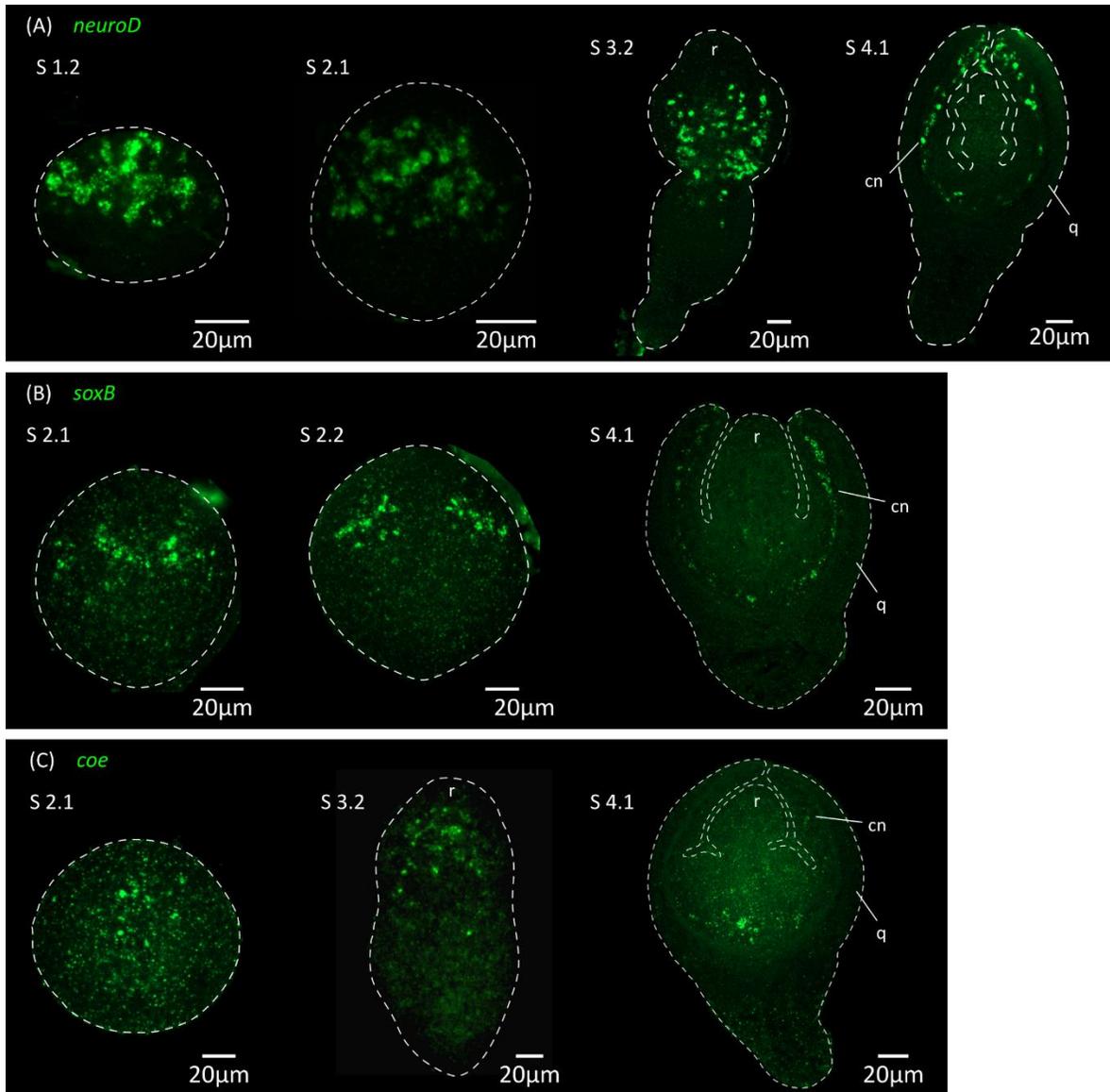
#### 3.7.4. Expresión de genes conservados relacionados con procesos de neurogénesis y diferenciación neural

Analizamos mediante WMISH la expresión de homólogos de genes que codifican para factores de transcripción relacionados con la neurogénesis y la diferenciación neural en animales, incluyendo *soxB*, *coe* y *neuroD*.

Todos estos genes presentaron patrones de expresión asociados con sistema nervioso en desarrollo (figura R16). Tanto *soxB* como *coe* se detectaron en un número relativamente pequeño de células del sistema nervioso en desarrollo a partir del estadio 2.1, y mostraron poca incorporación de EdU tras dos horas de marcaje (8% de las células *soxB*<sup>+</sup> incorporaron EdU, n=189 células de 2 larvas; 2% de las células *coe*<sup>+</sup> incorporaron EdU, n=179 células de 3 larvas), lo que sugiere que la mayoría de estas células corresponden a precursores neurales post-mitóticos. En cambio, *neuroD* pudo detectarse al menos desde el estadio 1.2 en el hemisferio anterior de las larvas (no examinamos su expresión en momentos anteriores), en células proliferantes de tamaño grande. Aproximadamente el 80% de todas las células *neuroD*<sup>+</sup> fueron EdU<sup>+</sup> en el marcado por 2 horas, y las células *neuroD*<sup>+</sup> corresponden al 14% de todas las células proliferantes EdU<sup>+</sup> en las larvas tempranas (n=110 células *neuroD*<sup>+</sup> y 836 células EdU<sup>+</sup> examinadas de 6 larvas en estadios 1.2 a 2.1). La expresión de *neuroD* también se observó en células mitóticas. Durante el desarrollo posterior, las células *neuroD*<sup>+</sup> se encontraron asociadas con las regiones del sistema nervioso en desarrollo. Por lo tanto, *neuroD* parece expresarse en una subpoblación de células germinativas en proliferación y, con base en sus dominios de expresión y funciones conservadas en otros animales, los resultados sugieren que se expresa en una fase temprana de la neurogénesis (en células germinativas especificadas para un destino neural).

Tras la retracción del escólex, en el estadio 4.1, la expresión de *neuroD* se encontró reducida en el pre-escólex, pero continuó en la zona de los cordones nerviosos en desarrollo (figura R16A). En este estadio también se observa expresión de *soxB* en la zona de los cordones nerviosos y en menor medida en el pre-escólex (figura R16B). Por otra parte, el factor de transcripción *coe* se encuentra expresado principalmente en células de la base del pre-escólex invaginado, que corresponde al desarrollo de la comisura principal, mientras que

también se detectan pocas células que expresan *coe* en la zona de los cordones nerviosos (figura R16C). Considerando la información obtenida en ensayos previos, la expresión de *coe* en el pre-escólex en este estadio indica que se expresa en células post-mitóticas destinadas al desarrollo del sistema nervioso.



xxi Figura R16

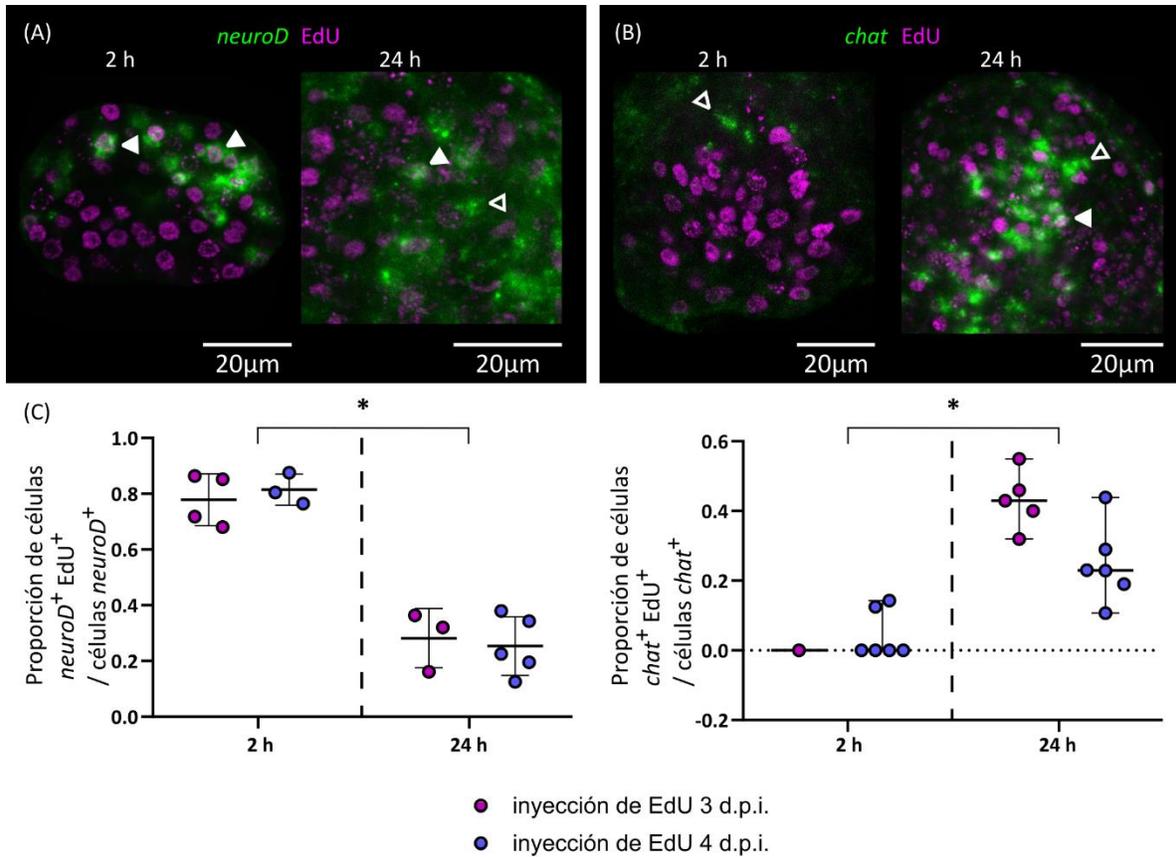
Figura R16. Expresión de genes conservados relacionados con la neurogénesis y la diferenciación neural. Patrones de expresión de *neuroD* (A), *soxB* (B) y *coe* (C), detectados mediante hibridación *in situ*, durante la metamorfosis larvaria. cn, cordón nervioso; q, quiste; r, primordio del rostelo.

### 3.7.5. Análisis de procesos de diferenciación neural mediante ensayos de pulso y seguimiento con EdU

Seguimos la diferenciación de células nerviosas mediante ensayos de pulso y seguimiento con EdU. Nos centramos en la expresión del gen *chat* como marcador de la diferenciación neuronal porque se detecta su expresión con buena intensidad de señal fluorescente y en un número intermedio de células, lo que permite la identificación de los núcleos de las células positivas individuales.

Inyectamos EdU en escarabajos infectados a los 3 y 4 d.p.i., y analizamos la marca de EdU en células *chat*<sup>+</sup> tras 2 o 24 horas. A las dos horas se detectaron muy pocas células *chat*<sup>+</sup> o no se detectaron (ya que correspondían a larvas en los estadios 1.2 a 2.1) y la mayoría de las células *chat*<sup>+</sup> de estas larvas eran negativas para EdU (figuras R17B y C). Sin embargo, en dos larvas, una única célula EdU<sup>+</sup> fue débilmente positiva para *chat*. El análisis de larvas en estadios posteriores marcadas durante dos horas con EdU tampoco mostró colocalización entre *chat* y EdU. Por lo tanto, la expresión de *chat* parece activarse tras la salida del ciclo celular en la mayoría de los casos. En comparación, 24 horas después de la inyección de EdU se encontró una amplia colocalización de *chat* y EdU (43% y 25% de todas las células *chat*<sup>+</sup> son EdU<sup>+</sup> después de 24 horas, cuando la inyección ocurrió 3 d.p.i o 4 d.p.i., respectivamente; figuras R17B y C). Observamos que la expresión de *chat* comienza dentro de las 24 horas luego de la salida del ciclo celular y constituye un evento relacionado con procesos de neurogénesis temprana.

Por el contrario, el análisis análogo para la expresión de *neuroD* muestra una disminución de la proporción de células marcadas con EdU entre las células *neuroD*<sup>+</sup> después de 24 horas (figuras R17A y C). Este resultado es compatible con la hipótesis de que las células *neuroD*<sup>+</sup> eran progenitores proliferantes de corta vida que desactivaron la expresión de *neuroD* a medida que se diferenciaban durante las 24 h del ensayo. Por otra parte, la disminución de la marca de EdU entre las células *neuroD*<sup>+</sup> también podría deberse a las repetidas divisiones celulares de estas células durante el periodo de seguimiento de 24 h, lo que provocaría la dilución de la marca de EdU.



xxii Figura R17

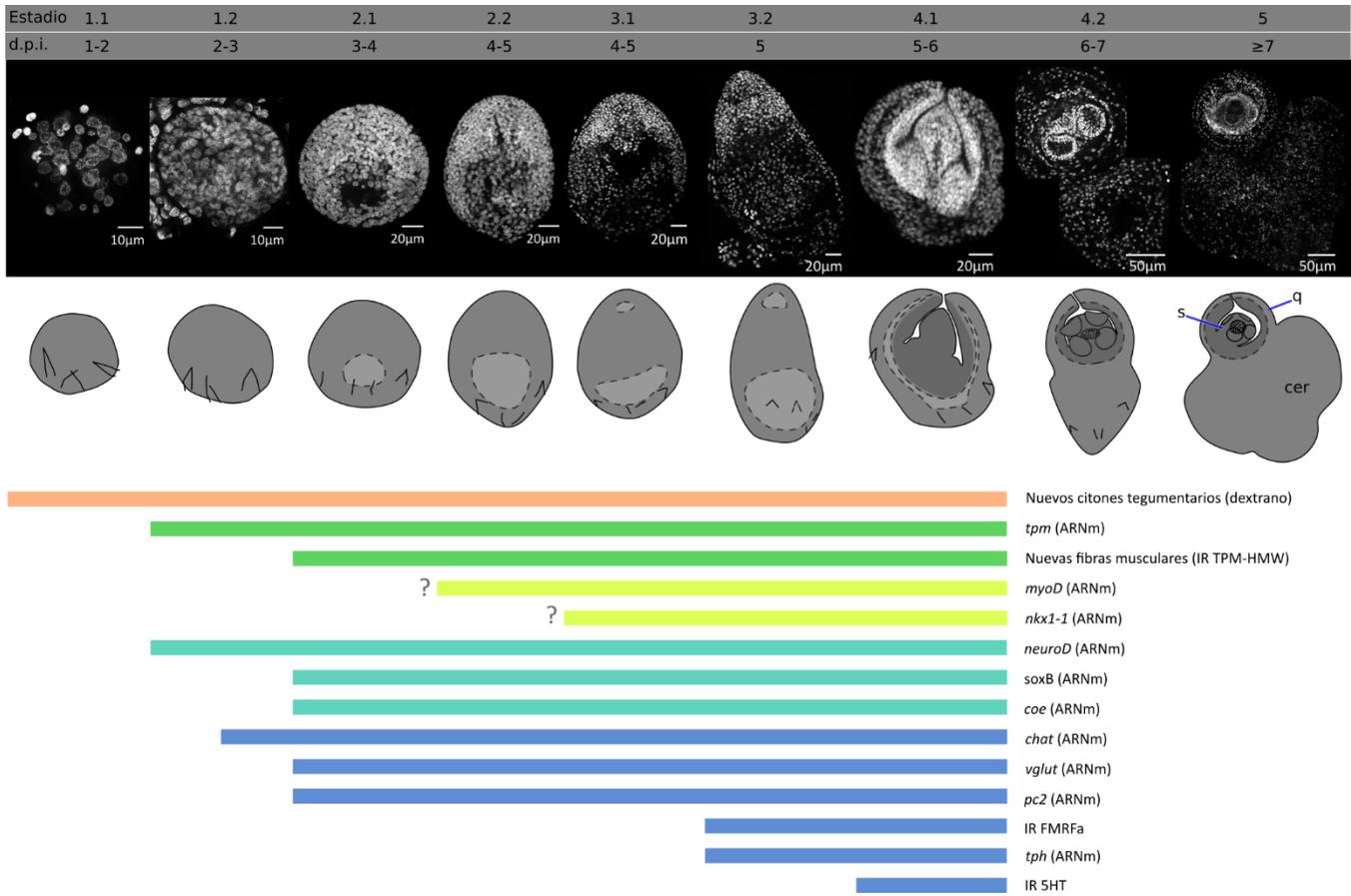
Figura R17. Diferenciación de las células nerviosas durante la metamorfosis larvaria. Figuras representativas de larvas marcadas con EdU en combinación con la detección de *neuroD*<sup>+</sup> (A) y *chat*<sup>+</sup> (B) tras 2 o 24 h de seguimiento (las puntas de flecha abiertas y rellenas indican células EdU<sup>-</sup> y EdU<sup>+</sup>, respectivamente). (C) Cuantificación de la fracción de células *neuroD*<sup>+</sup> y *chat*<sup>+</sup> marcadas con EdU en diferentes tiempos de seguimiento luego del marcado con EdU. Cada punto representa la cuantificación de una larva (\*p < 0,001, prueba de Mann-Whitney para los resultados agrupados de 3 y 4 d.p.i.).

#### 4. Discusión

Realizamos una descripción de la metamorfosis larvaria de *H. microstoma*, incluyendo el estudio del desarrollo de los tejidos tegumentario, muscular y nervioso. Esta transición del desarrollo en los cestodos se ha considerado una "caja negra", ya que rastrear el desarrollo y la remodelación de los tejidos larvarios ha resultado complicado debido al tamaño extremadamente pequeño de las larvas y sus células, la compleja histología de los cestodos y la falta de marcadores específicos. Además los métodos que habían sido probados para el cultivo *in vitro* de larvas de *Hymenolepis* sp. no son de uso habitual en algún laboratorio actualmente. En general, los antecedentes en el estudio de la metamorfosis larvaria en estas especies son de instantáneas espaciales y temporales o de la observación de larvas por breves períodos en condiciones *ex vivo* (Voge, 1964; Caley, 1974). Más recientemente un estudio de transcriptómica (*RNA-seq*) en combinación con la detección de la expresión de genes por hibridación *in situ* identificó factores de transcripción relacionados con el desarrollo en animales que se encuentran expresados en las larvas en metamorfosis (Olson y col., 2018). También se ha estudiado la participación de la señalización por Wnt en el desarrollo de las larvas (Koziol y col., 2016; Montagne y col., 2019).

En este trabajo, estudiamos los procesos de remodelado de la larva que tienen lugar al inicio de la metamorfosis en los estadios 1.1 y 1.2, así como el desarrollo de los nuevos tejidos como el tegumento, el sistema muscular y el sistema nervioso, hasta el estadio 4.1. En la figura D1 se ilustran los principales cambios morfológicos de las larvas en metamorfosis y el patrón temporal de expresión de los diferentes marcadores moleculares utilizados para seguir el desarrollo de los tres destinos de diferenciación celular mencionados.

A continuación, revisaremos los resultados, incluyendo los diferentes métodos probados para estudiar la metamorfosis larvaria y más adelante explicaremos con mayor nivel de detalle las observaciones realizadas sobre el desarrollo de los tres destinos de diferenciación celular estudiados.



xxiii Figura D1

Figura D1. Resumen ilustrativo de la detección de los diferentes marcadores de diferenciación celular usados en el trabajo, en relación con los estadios de desarrollo de la metamorfosis larvaria en *H. microstoma*. La morfología en cada estadio de desarrollo se muestra mediante tinción nuclear (imágenes superiores) y diagramas (imágenes inferiores). La detección de marcadores específicos en los estadios correspondientes se ilustra con barras coloreadas. s, escólex; cer, cercómero; q, quiste.

#### 4.1. Consideraciones sobre el cultivo *in vitro* de larvas en metamorfosis

Pusimos a prueba un sistema para el cultivo *in vitro* de la metamorfosis de *H. microstoma* basado en el trabajo previo de Seidel (1975) en la misma especie y Voge y Green (1975) para *H. citelli*. En comparación con esos trabajos, que usaban un medio de cultivo de Landureau modificado e indicaban la importancia de incluir L-cisteína (101 mg/L) en el medio de cultivo, probamos un medio de cultivo comercial de Schneider que también contiene L-cisteína (60 mg/L). Observamos que el medio de cultivo de Grace que probamos sin tener éxito, carece de trehalosa y L-cisteína, por lo que sugerimos que pueden ser componentes importantes para el desarrollo de las larvas de *H. microstoma*. Otras diferencias metodológicas de nuestros cultivos con trabajos previos incluyen los volúmenes de medio (a diferencia de esos trabajos previos que usaban tubos con 6 mL de medio, usamos placas de plástico para cultivo con 1 mL de medio para facilitar el registro fotográfico de las larvas en desarrollo) y que iniciamos el cultivo con larvas en estadio 2, obtenidas de escarabajos *T. confusum*. (para evitar realizar el paso de eclosión de las oncosferas que estaba siendo optimizado en nuestro laboratorio (Preza y col., 2021b)).

Los ensayos de cultivo *in vitro* de larvas en metamorfosis presentaron resultados variables, encontrando muestras que no se desarrollan a pesar de encontrarse en las mismas condiciones generales que las otras (Tabla R1). A su vez, el método de cultivo *in vitro* resultó en un bajo número de larvas desarrolladas incluso en los cultivos exitosos. Sin embargo, se logró obtener larvas desarrolladas con la misma morfología general observada en el trabajo previo realizado con larvas de esta especie por Seidel (1975) que se ilustra en la figura D2. A los tres días de iniciado su cultivo, las larvas alcanzaron los estadios 1.2 y 2.1, que son los estadios utilizados para el inicio de nuestros cultivos (ver figuras R2A y D2A para comparación). Las larvas desarrolladas *in vitro* alcanzaron el estadio 3.1 a los cinco días de desarrollo *in vitro* en el cultivo de Seidel (figura D2B) mientras que en nuestros ensayos observamos varios estadios entre 2.2 y 4.1 entre el segundo y quinto día de cultivo (sección 3.2.1; figura R2B). En el cultivo de Seidel el estadio 3.2 se alcanzó en el día 9 y el proceso de retracción se inició en el día 13 (estadio 4.1; figura D2C). Los cisticercoides en estadio 5 son

capaces de activarse luego de 21 días de desarrollo *in vitro*, que en este trabajo probamos a los 20 días de cultivo (figuras D2D y R2D).

Las observaciones realizadas sobre el desarrollo de las larvas *in vitro* indican que es similar al desarrollo que tiene lugar *in vivo* pero ocurre a una tasa menor y con algunas diferencias morfológicas como el mantenimiento de un área clara en la zona del cercómero como se observa en las figuras R2C y D2D. Esta área clara puede interpretarse como un remanente de la cavidad central que quedó desplazada hacia la zona del cercómero. También observamos un mayor desarrollo del pre-escólex en el estadio 3 (es decir, previo a su retracción), al igual que Seidel (1975; figuras R2B y D2C), que puede relacionarse con una dificultad en el proceso de retracción del pre-escólex hacia la cavidad.

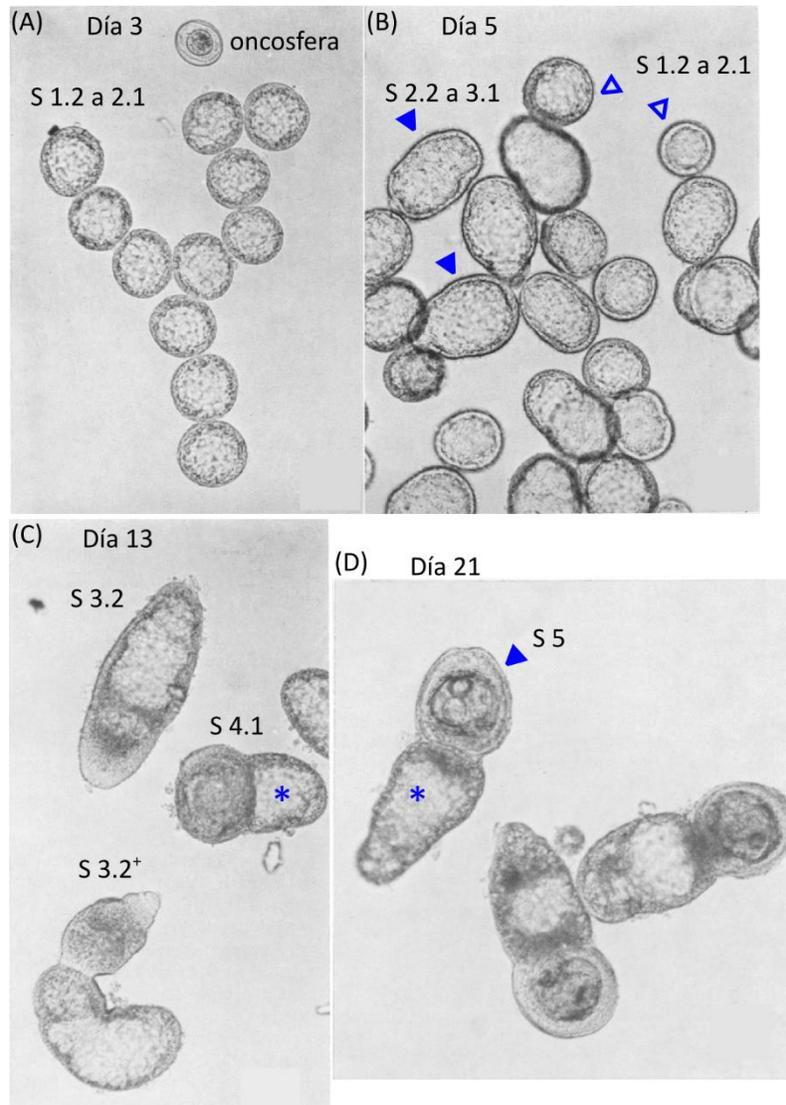
En general el procedimiento de cultivo *in vitro* de la metamorfosis larvaria de *H. microstoma*, logró un éxito similar a los trabajos previos realizados con *Hymenolepis* sp. (Seidel, 1975), pero resulta en un bajo número de larvas desarrolladas que es insuficiente para la mayoría de los ensayos de detección de marcadores moleculares específicos realizados en este trabajo.

El cultivo *in vitro* de cestodos presenta diversas dificultades técnicas. El medio de cultivo debe proveer los componentes nutricionales que requieren y un ambiente físico adecuado. Los cestodos presentan un metabolismo reducido. El metabolismo energético utiliza carbohidratos como fuente de energía y es principalmente fermentativo (Smyth y McManus, 1989; Preza y col., 2021a). El proceso de glicólisis se separa en dos ramas en el nivel del fosfoenol-piruvato y tienen lugar las reacciones de fermentación láctica y/o de dismutación del malato. Estas reacciones generan como productos los ácidos orgánicos succinato, acetato y lactato. En lo que refiere al anabolismo, los cestodos no sintetizan la mayoría de los aminoácidos ni lípidos (Smyth y McManus, 1989; Tsai y col., 2013). Para la síntesis de colesterol dependen de la captación de esteroides del medio y para la síntesis de fosfolípidos captan ácidos grasos y glicerol del medio. Tampoco realizan la síntesis de ácidos grasos *de novo*, sino que alargan los ácidos grasos por la adición de acetil-CoA. En general, los medios usados para el cultivo *in vitro* de estadios larvales y adultos contienen

aminoácidos, azúcares, sales, ácidos orgánicos e ingredientes complejos como el suero bovino y extracto de levaduras que son fuentes de lípidos. Además, se adicionan otros componentes como taurocolato de sodio (una sal biliar), para el desarrollo de la transición de la larva cisticercoide a gusano juvenil (Preza, 2021).

El ambiente físico de cultivo también puede influir en el desarrollo *in vitro* de los cestodos. Por ejemplo, para el desarrollo *in vitro* de juveniles y adultos de *Hymenolepis* sp. se utiliza un medio bifásico con una base de agar con triptona y sangre ovina. Este medio bifásico posiblemente provee una superficie más adecuada para los parásitos, que no se desarrollan en los pocillos de plástico sin esta base de agar (Evans, 1980; Smyth, 1990; Preza, 2021). Estos cultivos se realizan en condiciones anaerobias o de micro-aerobiosis, con atmósfera de 95% de N<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> (Preza, 2021). Otro ejemplo sobre cómo el ambiente físico puede ser clave para los eventos del desarrollo *in vitro* de estos parásitos es el cultivo *in vitro* de las formas adultas de *Schistocephalus solidus*. Estos parásitos requieren ser cultivados dentro de bolsas de diálisis que simulan la cavidad intestinal, comprimiendo su pared corporal, de forma de que pueda ocurrir físicamente la auto-inseminación por parte del cirro en el mismo poro genital (Smyth, 1990).

Para el desarrollo de la metamorfosis larvaria de *Hymenolepis* sp. las condiciones de cultivo *in vitro* ensayadas en este trabajo pueden ser usadas como base para ser optimizadas, explorando la gran variedad de factores físicos y químicos que pueden influir en el desarrollo *in vitro* de los cestodos. Entre estos factores, sugerimos que se puede realizar una prueba con estos mismos métodos de cultivo pero en atmósfera con CO<sub>2</sub> (5%) por ser esta una de las condiciones probada para el desarrollo de larvas de alguna de las especies (*H. nana*; Seidel y Voge, 1975). También destacamos que una vez que el procedimiento de eclosión de las oncosferas ya ha sido optimizado (Preza y col., 2021b), puede iniciarse el cultivo con oncosferas eclosionadas lo que permitiría el estudio de los procesos más iniciales de la metamorfosis larvaria.



xxiv Figura D2

Figura D2. Desarrollo de la metamorfosis larvaria en condiciones *in vitro* de acuerdo con Seidel 1975. (A) En el tercer día de cultivo *in vitro* se identifican larvas en los estadios 1.2 a 2.1. (B) Al quinto día algunas larvas ya alcanzaron los estadios 2.2 a 3.1. (C) A los 13 días de desarrollo *in vitro* se identificaron larvas en estadio 3.2, de las cuales algunas presentan un mayor desarrollo del pre-escólex (3.2<sup>+</sup>), y en estadio 4.1, con un área clara en el cercómero (\*). (D) A los 21 días de desarrollo las larvas en estadio 5 presentan un mayor desarrollo del pre-escolex y mantienen el área clara en el cercómero (\*).

#### 4.2. Consideraciones sobre el marcado de larvas en metamorfosis con EdU en condiciones *ex vivo*

Destacamos también que el procedimiento para el marcado metabólico con EdU *ex vivo* presentó resultados variables: 26 y 74 % de las larvas incorporaron la marca en dos ensayos independientes (ver sección 3.2.2; figura R3). Es decir que una parte de las larvas, en una proporción variable, no incorporan la marca. Interpretamos que estas larvas pueden haber modificado sus procesos de captación de moléculas del medio o la actividad proliferativa de sus células y desconocemos si podrían retomar su desarrollo en cultivo *in vitro* o ya no serían viables. Esta observación nos indica que son organismos sumamente sensibles a alguna de las condiciones de su ambiente, que desconocemos y no hemos logrado remediar. Por otra parte, no podemos descartar que algunas larvas sufran daño estructural durante la manipulación, y el tegumento que las recubre es especialmente delgado en este estadio (ver sección 3.5.2; figura R9A). En comparación, los estadios de cisticercoide activado o gusano estrobilado (adulto) son más tolerantes a manipulaciones cortas en condiciones *ex vivo* e incorporan la marca de EdU en una proporción cercana al 100% (Preza, 2021).

#### 4.3. Proliferación y diferenciación celular durante la metamorfosis larvaria de *H. microstoma*

Para analizar procesos de proliferación y diferenciación celular se eligió el sistema para marcado metabólico *in vivo* usando escarabajos *T. molitor* como hospedadores. Como antecedente, el marcado metabólico de las células proliferantes *in vivo*, se había realizado previamente para el parásito trematodo *S. mansoni* mediante inyección intraperitoneal a ratones infectados (Collins y col., 2013). Por otro lado, los estudios iniciales sobre la diferenciación celular en la transición de larva plerocercarioide a gusano juvenil del cestodo *D. dendriticum* se realizaron mediante una combinación de dos pasos, el primero de incubación de las larvas con <sup>3</sup>H-timidina en condiciones *ex vivo* y el segundo paso de desarrollo *in vivo* por administración de las larvas marcadas a hámsters (hámster dorado). El sistema que ideamos para el marcado metabólico con EdU de larvas de *H. microstoma in vivo* mediante la inyección de EdU en el hemocele de escarabajos infectados es robusto y reproducible, y soluciona las dificultades que presenta realizar el marcado *ex vivo* en las larvas (sección 4.2). El desarrollo de las larvas tiene lugar en las condiciones naturales que

consideramos como condiciones óptimas dado que cerca del 100% de las larvas incorporan EdU (ver sección 3.3). Mediante este método se obtiene un número adecuado de larvas tratadas que posibilita realizar los sucesivos análisis de detección de marcadores específicos.

Usamos marcadores moleculares específicos, algunos previamente validados por nuestro grupo (Koziol y col., 2011; Preza y col., 2018) y otros validados durante el trabajo, en combinación con el marcado metabólico *in vivo* con EdU, lo que nos permitió obtener una visión global de los procesos de proliferación celular y diferenciación de los sistemas tegumentario, muscular y nervioso (que se resume en la figura D1).

#### 4.3.1. Proliferación celular durante la metamorfosis larvaria

En este trabajo evidenciamos que las primeras etapas de la metamorfosis larvaria de *H. microstoma* se caracterizan por un crecimiento importante del número de células que forman las larvas. En los primeros tres días de la metamorfosis registramos un aumento exponencial del número de células y estimamos el tiempo de duplicación celular en 10 horas. Destacamos que esta estimación representa un límite superior para la duración total del ciclo celular de las células proliferantes durante la metamorfosis larvaria temprana porque ya están ocurriendo procesos de diferenciación de algunos tipos de células en las larvas correspondientes. En comparación, también se ha observado un crecimiento exponencial durante la transición de la larva cisticercoide al gusano adulto en la especie cercana *H. citelli* (Loehr y Mead, 1980). En ambos casos, se considera que las células germinativas reservadas son quiescentes antes de la infección y se activan rápidamente durante la infección del nuevo hospedador (Koziol, 2017).

El análisis realizado para la estimación de las fases del ciclo celular realizado en larvas de *H. microstoma* en el cuarto día de metamorfosis (4 d.p.i., estadios 2.1 a 2.2) nos permitió estimar la duración de la fase G2 en aproximadamente 75 minutos (figura R5G). Sin embargo no pudimos estimar la duración de S o del ciclo total en nuestro experimento. Dado que el marcado fue realizado mediante inyección de EdU *in vivo*, la proporción de mitosis marcadas puede mantenerse alta por un tiempo mayor a lo que se vería en un ensayo de pulso breve en condiciones *in vitro*.

Como antecedentes del estudio de la proliferación celular en un proceso de desarrollo en *Hymenolepis* sp., Bolla y Roberts (1971) analizaron características de la proliferación celular en gusanos juveniles (de 4 días) en el proceso de transición de larva cisticercoide a gusano estrobilado. El trabajo realizado con la especie *H. diminuta* permitió estimar la duración de las fases S y G2 del ciclo celular (S en 2,3 horas y G2 en 3,2 horas) y la duración total del ciclo en 8,5 horas. En comparación con nuestros datos, la duración de G2 es más larga en las células proliferantes de esos gusanos juveniles. Cabe la posibilidad entonces de que la duración total del ciclo celular de las células proliferantes en las larvas en metamorfosis estudiadas en este trabajo sea más corta.

Un trabajo similar había sido realizado con larvas plerocercoides de la especie *D. dendriticum* (en la transición de plerocercoide a gusano juvenil). Mediante ensayos de incubación con  $^3\text{H}$ -timidina en condiciones *ex vivo* y autoradiografía, Wikgren y Gustafsson (1967) estimaron la duración del ciclo celular de las células germinativas en 19 horas, y las fases S y G2 en 10 horas y 3 horas aproximadamente. Los autores observaron que la estimación realizada de G2 incluye también el tiempo de duración de la profase, dado que los datos de figuras mitóticas marcadas obtenidos para construir el gráfico incluyeron solo las etapas de metafase y anafase que son más fácilmente distinguibles. En comparación, el uso del método de inmunomarcación para la histona H3 fosforilada en la serina 10, que se asocia con la cromatina condensada de las células en mitosis (Sauvé y col., 1999), nos permitió registrar las figuras mitóticas más fácilmente. Observamos también las diferentes morfologías correspondientes al proceso de mitosis, de profase a anafase tardía, marcadas con este método (figura R5F).

Las células proliferantes se identificaron mediante el marcado metabólico con EdU en ensayos de 2 horas, como se había realizado previamente utilizando EdU o F-ara-EdU en larvas y gusanos adultos de *Hymenolepis* sp. (Rozario y col., 2019; Preza, 2021; Montagne y col., 2023). Las células germinativas identificadas por este método son de un tamaño relativamente grande en comparación con otras células de la larva, de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro nuclear, y con nucléolo prominente (ver sección 3.3). Estas características coinciden con la descripción previa de las células con morfología indiferenciada de las larvas en

metamorfosis (Collin, 1970) y las células germinativas en el estadio juvenil (Bolla y Roberts, 1971) de *Hymenolepis* sp.

En estadios iniciales de la metamorfosis larvaria de *H. microstoma* (estadios 1.1 y 1.2), las células germinativas son muy abundantes y están distribuidas por toda la larva (figura R5C). Algunas células superficiales son post-mitóticas y presentan núcleos de menor tamaño. Más adelante, en los estadios 2 y 3, las células proliferantes se detectan exclusivamente en las regiones más internas. En cambio, cuando las larvas fueron expuestas a EdU en los estadios 1.1 a 1.2 y se les permitió desarrollarse durante 24 a 48 horas hasta los estadios 2 a 3, la marca de EdU pudo detectarse en núcleos ubicados en todas las regiones de las larvas, con una importante acumulación de células marcadas en la superficie y en el pre-escólex (figura R5D). Interpretamos que tiene lugar un proceso de desplazamiento de células post-mitóticas (que retienen la marca de EdU luego de la salida del ciclo celular) hacia la superficie de la larva y hacia el pre-escólex en desarrollo. Sugerimos que estas células pueden ser incorporadas a las estructuras en diferenciación como el tegumento, las capas musculares superficiales y el sistema nervioso en desarrollo en estos estadios.

En comparación, se habían observado procesos similares al estudiar la diferenciación de células musculares, intestinales y tegumentarias en el parásito *S. mansoni*. Cabe destacar que la incorporación de células derivadas de los neoblastos de esta especie a los tejidos diferenciados se detectó luego de 3 a 7 días en el estadio adulto (Collins y col., 2013, 2016). En cestodos, se estudió la diferenciación de células a partir de las células germinativas en la zona del cuello del gusano juvenil de la especie *D. dendriticum*, con la observación de la incorporación de nuevas células al tegumento (que retienen la marca de <sup>3</sup>H-timidina) luego de 2 días de cultivo (Gustafsson, 1976, 1990). En forma similar, el desplazamiento de células que incorporan BrdU desde la zona medular hasta la región subtegumentaria requiere 24 a 72 horas en las larvas y juveniles de *Mesocestoides corti* (Kozioł, 2010). Es posible que los procesos de desplazamiento e incorporación de células a los tejidos sean más rápidos en un proceso de desarrollo como la metamorfosis larvaria, en comparación con estos trabajos previos, como se analizará en la sección 4.3.3.

En una etapa intermedia de la metamorfosis de *H. microstoma* (estadios 2 y 3) la localización de las células proliferantes en las larvas se asemeja a la de otros estadios del ciclo de vida de la especie y a otras especies de cestodos en el sentido de que se encuentran en una región medular y están ausentes en la pared del cuerpo donde se encuentran los citones tegumentarios y de fibras musculares (Bolla y Roberts, 1971; Wikgren y col., 1971; Koziol y col., 2010; Koziol y Castillo, 2011). Las células proliferantes en los estadios 2 y 3 se encuentran ampliamente distribuidas en la región interna de la mitad posterior de la larva pero en la mitad anterior, identificamos un pequeño grupo de células proliferantes, ubicadas en una zona central, que vinculamos con el desarrollo del pre-escólex (figura R5C).

A continuación, en el estadio 4.1 no se detecta proliferación celular en el pre-escólex invaginado (figura R5C), que continúa su diferenciación a partir de células post-mitóticas, con cambios visibles en solo 24 horas de desarrollo (estadios 4.1 a 4.2; figura R1). También los ensayos de pulso y caza iniciados con larvas en el estadio 4.1 (5 d.p.i.) apoyan esta observación ya que las larvas completamente desarrolladas y activadas *in vitro* no presentaron células marcadas (EdU<sup>+</sup>) en el escólex, sino que las células marcadas se encontraron restringidas al cuerpo del cisticercoide (figura R5E).

De forma análoga, en el desarrollo de protoescóleces de *E. multilocularis* se observó una acumulación importante de células proliferantes en el primordio (*bud*) que luego pasan a encontrarse más distribuidas en la mitad posterior del protoescólex en desarrollo y restringidas a áreas particulares del escólex como la base de las ventosas en desarrollo (Koziol y col., 2014).

#### 4.3.2. Heterogeneidad de las células germinativas en la metamorfosis larvaria

Las células germinativas de cestodos se han identificado por su actividad proliferativa y por sus características morfológicas (Sakamoto y Sugimura, 1970; Bolla y Roberts, 1971; Koziol y col., 2014; Koziol, 2017). Sin embargo, la caracterización molecular de estas células germinativas mediante estudios de transcriptómica (RNA-seq) e hibridación *in situ* ha mostrado que es una población heterogénea.

El estudio realizado por Rozario y col. (2019) para la especie *H. diminuta* mostró que las células germinativas del cuello del adulto son heterogéneas en la expresión génica, encontrando subpoblaciones de células proliferantes que se distinguen por la expresión de un gen particular (*prospero*, *prox1*) o por la expresión de genes típicos de células no proliferantes y posiblemente constituyen progenitores para diferentes linajes de células diferenciadas. Por otro lado en metacestodos de la especie *E. multilocularis*, Koziol y col. (2014) habían observado que los genes tipo *nanos* y *argonauta* se expresan en subpoblaciones de células proliferantes. Los genes *nanos*, *nos1* y *nos2* se expresan en solo en subpoblaciones pequeñas de las células proliferantes (5% de las células EdU<sup>+</sup> expresan alguno de los dos genes). El gen *argonauta*, *ago2* a su vez se expresa también en células que no proliferan (EdU<sup>-</sup>). Recientemente, mediante análisis de transcriptómica se avanzó en la identificación de subpoblaciones de células germinativas con características particulares (Herz y col., 2024). El factor de transcripción *sox2* se encuentra expresado en las células proliferantes de la larva de *E. multilocularis* en activa proliferación (Cheng y col., 2017). Para este gen se sugiere una función similar a la del gen homólogo *sox2* de mamíferos que se identificó como uno de los genes expresados por las células madre embrionarias, que además es necesario para lograr la inducción de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) a partir de fibroblastos (Takahashi y Yamanaka, 2006). Sin embargo, el gen ortólogo en *H. microstoma*, *soxB*, se encuentra expresado en una población de células específicamente asociadas con el desarrollo del sistema nervioso, de las cuales un bajo porcentaje incorporaron la marca de EdU en nuestros ensayos (solo 8%; figura R16B; sección 3.7.4). La asociación de los factores de transcripción de la familia *soxB* con el desarrollo del sistema nervioso central se ha observado previamente en vertebrados (*soxB1*), *Drosophila* (*Dichaete* y *soxN*), *Platynereis* (*soxB*) y planarias (*soxB1-1*) con expresión temprana en estadios iniciales de la formación del sistema nervioso (Guth y Wegner, 2008; Simionato y col., 2008; Hartenstein y Stollewerk, 2015; Monjo y Romero, 2015; Crews, 2019). La expresión de estos genes se ha relacionado con funciones de especificación del potencial neurogénico y el mantenimiento del estado proliferativo (Graham y col., 2003; Hartenstein y Stollewerk, 2015). Por otro lado, la sub-familia *soxB2* se asocia con procesos

de diferenciación neuronal en etapas más tardías en vertebrados y planarias (Guth y Wegner, 2008; Monjo y Romero, 2015). El patrón de expresión de *soxB* observado en larvas de *H. microstoma* nos permite sugerir que puede ser expresado en precursores neurales principalmente post-mitóticos.

También, en el estudio del desarrollo del sistema nervioso de las larvas de *H. microstoma* identificamos una subpoblación de células germinativas que expresan el gen *neuroD* (14% de las células germinativas en estadios 1.2 a 2.1). Consideramos que este constituye un ejemplo de la probable heterogeneidad en la población de células germinativas en las larvas en metamorfosis. También los procesos de diferenciación de células tegumentarias y musculares, identificados en estadios iniciales de la metamorfosis larvaria (sección 3.5.2 y 3.6) sugieren que puedan existir en estos estadios iniciales, otras subpoblaciones de células germinativas destinadas a estos linajes de diferenciación. Resulta interesante continuar la investigación de la expresión génica en las células germinativas de larvas en metamorfosis e incluir en el análisis a los estadios iniciales de oncosfera eclosionada y larvas de 1 a 2 días de desarrollo.

Queda como interrogante también cómo se mantiene una subpoblación de células germinativas reservada para el desarrollo de los siguientes estadios, ya que el cisticercoide maduro presenta células germinativas que son importantes para el desarrollo de la transición al estadio juvenil y adulto.

En el desarrollo larvario del trematodo *S. mansoni* tiene lugar un proceso de multiplicación asexual de las larvas en el estadio de esporocisto (poliembrionía). Wang y col. (2013) investigaron la expresión génica de las células de los esporocistos en desarrollo para las cuales observaron diferencias en la expresión del gen *nanos-2*. Entre las células proliferantes, una parte es negativa para este marcador y se expande rápidamente (con un tiempo de duplicación de 24 horas). Por otro lado, una subpoblación de células proliferantes se caracteriza por la expresión de *nanos-2* y una tasa de proliferación menor. Por estas características se ha considerado que las células de rápida proliferación *nanos-2*<sup>-</sup> pueden estar vinculadas con linajes somáticos mientras que la subpoblación *nanos-2*<sup>+</sup> puede ser

totipotente y estar vinculada con el tipo de células que son reservadas para el desarrollo posterior o para la línea germinal, dado que *nanos-2* se expresa también en las células madre somáticas y en las células germinales de la gónada en el estadio adulto de la especie (Collins y col., 2013; Wang y col., 2013).

#### 4.3.3. Diferenciación celular durante la metamorfosis larvaria de *H. microstoma*

En este trabajo identificamos procesos de diferenciación celular vinculados con el desarrollo del tegumento, el sistema muscular y el sistema nervioso, en la metamorfosis larvaria de *H. microstoma*.

##### 4.3.3.1. Desarrollo del tegumento

La metamorfosis larvaria se inicia a partir de una oncosfera infectiva que no presenta citones tegumentarios (figura R7A). En larvas de 1 a 3 d.p.i., analizamos la formación de citones tegumentarios (figura R7B y C) que identificamos mediante el marcado específico con dextrano fluorescente (ver sección 3.5.2). El marcado específico del tegumento distal y los citones tegumentarios se explica por la continuidad citoplasmática de estas dos estructuras mediante puentes delgados (Wendt y col., 2018). Observamos que la fusión de nuevas células al tegumento distal comienza en etapas iniciales de la metamorfosis larvaria, que detectamos a partir de 1 d.p.i. Nuestros resultados indican también que en la etapa inicial de crecimiento de las larvas (entre 1 y 3 d.p.i.) una proporción constante de la producción proliferativa de las células germinativas se destina a citones tegumentarios (figura R7C).

El tegumento distal de las larvas de 3 a 5 d.p.i. (estadios 2.1 a 3.1) es delgado: de aproximadamente 200 nm de espesor en una larva de 3 d.p.i y de 500 a 1000 nm en larvas de 4 y 5 d.p.i. Observamos que presenta irregularidades en su membrana apical (figura R9). En comparación, trabajos realizados con larvas de cestodos de las familias Cyclophyllidea y Taeniidae en general han observado el desarrollo gradual de microvellosidades (Sakamoto y Sugimura, 1970; Holcman y col., 1994; Holcman y Heath, 1997). A diferencia de nuestras observaciones, para la especie cercana *H. citelli* se describieron largas microvellosidades en los estadios correspondientes (S2 – 3; Collin, 1970). Cabe la posibilidad de que el tegumento distal de nuestras larvas no se haya preservado correctamente en las etapas de disección y

fijación de nuestras muestras para microscopía electrónica, pero en ningún caso encontramos microvellosidades largas, e interpretamos que la ausencia de microvellosidades regulares puede ser una característica de la especie *H. microstoma* en estos estadios.

Trabajos previos estudiaron el desarrollo del tegumento en la metamorfosis larvaria de *Echinococcus* sp mediante microscopía electrónica (Sakamoto y Sugimura, 1970; Holcman y col., 1994; Holcman y Heath, 1997). El tegumento distal desarrolla especializaciones de membrana (microvellosidades y microtricos) y se produce además una capa laminar (acelular) externa, por fuera de la membrana apical del tegumento, a diferencia de *Hymenolepis* sp. que no la presentan. Se identificaron citones tegumentarios en la metamorfosis temprana de *Echinococcus* sp. (Sakamoto y Sugimura, 1970), sin embargo no se han realizado estudios enfocados en los procesos de fusión de citones al tegumento distal o la diferenciación de estas células.

En este trabajo, evidenciamos procesos de fusión de nuevos citones con el tegumento distal mediante experimentos de pulso y caza con EdU en combinación con el marcado con dextrano. Observamos primero, que los citones tegumentarios son post-mitóticos (EdU<sup>-</sup> en los ensayos de 2 horas) y luego, detectamos la fusión de citones al tegumento distal en ensayos de 4 horas y 27 horas de seguimiento de la marca de EdU (figuras R8A – C). Observamos una mayor proporción de citones EdU<sup>+</sup> en los ensayos de 27 horas (29%) en comparación con los de 4 horas (17%) que interpretamos como un proceso acumulativo de formación de nuevos citones tegumentarios que retienen la marca de EdU (figura R8D).

La fusión de precursores al sincitio tegumentario puede ser un paso muy temprano del proceso de diferenciación de estas células, ya que puede detectarse tras sólo 4 horas de marcaje con EdU. Teniendo en cuenta que la marca de EdU es incorporada en la fase S del ciclo celular y nuestra estimación realizada de la duración de la fase G2 (aproximadamente 75 min), la fusión al tegumento distal en estos casos tuvo lugar en menos de tres horas después de la última mitosis.

Los procesos de incorporación de células al tegumento no habían sido estudiados utilizando un marcador específico en cestodos. Los trabajos previos en esta temática analizaron el desplazamiento de células derivadas de células germinativas hacia la región sub-tegumentaria, mediante ensayos de pulso y seguimiento con análogos de timidina, pero sin detectar específicamente los citones tegumentarios. Por un lado, en la zona del cuello del gusano juvenil de la especie *D. dendriticum*, se observó la incorporación de nuevas células a la zona sub-tegumentaria (que retienen la marca de  $^3\text{H}$ -timidina) luego de 2 días de cultivo (Gustafsson, 1990). En el estadio equivalente (tetratiridio) en la especie *M. corti* se observó el desplazamiento de células que retienen la marca de BrdU hacia la zona sub-tegumentaria en ensayos de 24 horas (Kozioł y col., 2010). Rozario y col (2019) evidenciaron la incorporación de células a la zona sub-tegumentaria en ensayos de 3 días, en el estadio adulto de *H. diminuta*. En comparación, el trabajo realizado por Wendt y col. (2018) sobre el recambio normal del tegumento del trematodo *S. mansoni* en estadio adulto, observó la marca de EdU en citones tegumentarios en el quinto día luego del marcado. En el mismo trabajo los autores identificaron una población de células progenitoras tegumentarias, *tsp-2*<sup>+</sup>. En general, destacamos que la cinética de incorporación de nuevos citones al tegumento es más rápida en las larvas de *H. microstoma* en la etapa de metamorfosis.

#### 4.3.3.2. Miogénesis en la metamorfosis larvaria

Al inicio de la metamorfosis larvaria, en los estadios 1.1 a 1.2, observamos fibras musculares delgadas y discontinuas en la superficie de las larvas, mientras que los músculos de los ganchos aparecen globosos y desorganizados (figuras R10A y R14B). Interpretamos que tiene lugar un proceso de remodelado y degeneración de estas fibras musculares que corresponden al sistema muscular de la larva oncosfera. La primera evidencia clara de la diferenciación de nuevas fibras musculares TPM-HMW<sup>+</sup> aparece en el estadio 2.1, en el que aparecen fibras musculares circulares y seis haces de fibras musculares longitudinales (dos haces laterales y dos pares de haces dorsales y ventrales, figura R10A). Resulta llamativo que estos primeros haces de fibras musculares longitudinales muestran una asimetría dorso-ventral. En un lado (sin otros puntos de referencia morfológicos, no es posible determinar si corresponde al lado dorsal o ventral), los haces de fibras son más gruesos y

están más desarrollados, y cada haz está claramente asociado a un único cuerpo celular grande TPM-HMW<sup>+</sup> (figura R10A). De forma complementaria, la identificación de los miocitones mediante hibridación *in situ* para isoformas de tropomiosina muscular permitió observar claramente dos miocitones en un área medial sub-superficial en el estadio 1.2 que, por su localización, muy probablemente corresponden a esas fibras musculares longitudinales mediales más desarrolladas (figura R10B).

Durante la metamorfosis temprana, la distribución de los miocitones es muy regular. La larva en el estadio 1.2 presenta, además de los miocitones mediales asimétricos, también miocitones en los márgenes laterales (miocitones marginales) en el hemisferio anterior (figura R10B). A continuación, en el estadio 2.1 los miocitones se concentran en una banda marginal lateral más extendida (en la línea media dorsoventral), a la que sigue una segunda banda en la línea media sagital que queda flanqueada por los miocitones asimétricos que se identifican claramente mediante el marcado para *tpm-2.hmw* (figura R11). Es posible, dada su posición y su momento de aparición, que los miocitones marginales correspondan a las primeras fibras musculares circulares que aparecen con una organización regular en el estadio 2.1, aunque no hemos podido confirmar su continuidad citoplasmática. Se observó un patrón similar de distribución de los miocitones durante el desarrollo temprano del protoescólex de *E. multilocularis* con dos bandas laterales (marginales) bien definidas, mientras que en la zona medial los miocitones se localizan más internamente (Koziol y col., 2014). Comparativamente, en la metamorfosis larvaria de *H. microstoma* encontramos miocitones en regiones internas en el estadio 3, que asociamos con el desarrollo de fibras musculares transversales en el pre-escólex (figuras R10D y E).

Observamos que la diferenciación de las células musculares comienza tempranamente durante la metamorfosis larvaria y su localización ordenada en los márgenes laterales y en la línea media dorsal y ventral sugiere que pueden tener una función de señalización en la regulación del desarrollo. Los miocitones son fuentes de moléculas de señalización que regulan el desarrollo en cestodos y otros platelmintos (Witchley y col., 2013; Koziol y col., 2016; Diaz Soria y col., 2020; Wendt y col., 2020). La vía de señalización *Wnt/β-catenina* participa en la formación del eje corporal en la metamorfosis larvaria de cestodos (Koziol y

col., 2016), con expresión de ligandos *Wnt* en la mayor parte de la larva, con diferentes dominios de expresión, e inhibidores de *Wnt* en el extremo anterior. Koziol y col. (2016) demostraron también la expresión de *Wnt* posteriores en las células musculares de la capa germinativa en *E. multilocularis*. Dos genes de la familia SFRP de inhibidores de *Wnt*, *sfrp* y *sfl* son expresados tempranamente en la metamorfosis larvaria de cestodos y marcan el extremo anterior de las larvas (o protoescóleces) en desarrollo. Curiosamente, *sfl* se expresa en dos bandas laterales que comienzan sub-apicalmente y no llegan hasta el polo opuesto (Koziol y col., 2016; Jarero y col., 2024), en un patrón muy similar a la localización de los miocitones marginales identificados en este trabajo. También la expresión de los diferentes ligandos *Wnt* se encuentra localizada en los márgenes laterales (Koziol y col., 2016). Sin embargo, falta confirmar si la expresión de estas moléculas de señalización tiene lugar en los miocitones, que podría realizarse mediante ensayos de doble marcado por hibridación *in situ*. Como hemos observado antes, el marcado de las fibras musculares mediante inmunofluorescencia para tropomiosinas de alto peso molecular (TPM-HMW) en general no marca claramente la localización de los miocitones (sección 3.6).

De forma complementaria, se ha observado la expresión de *hedgehog* en larvas de *H. microstoma*, en los márgenes dorsal y ventral (Jarero y col., 2024). Hedgehog es una proteína que actúa como morfógeno para el desarrollo del sistema nervioso en los embriones de los cordados, en los que aparece expresado en la notocorda, y en la zona ventral del tubo neural (Rétaux y Kano, 2010). El gen *hedgehog* de planarias se encuentra expresado en la zona medial ventral del cerebro en el estadio adulto (Currie y col., 2016; Wang y col., 2016). En el desarrollo de la metamorfosis de *H. microstoma*, *hedgehog* se expresa en una línea media en la superficie dorsal y ventral del hemisferio anterior de las larvas en estadio 2.1, que se mantiene en la línea media pero con una localización más interna en los estadios 3 y 4.1. La expresión temprana de *hedgehog* en la línea media dorsal y ventral puede relacionarse con la localización de los miocitones en el estadio 2.1, con la posibilidad de que sea expresado por los miocitones o por células adyacentes. De todos modos, la señalización por Hedgehog podría relacionarse con la regulación del desarrollo de los sistemas muscular o nervioso en este estadio. Luego, la expresión de *hedgehog* en la

línea media pero más internamente en las larvas en los estadios 3 y 4.1 puede relacionarse más estrechamente con el sistema nervioso en desarrollo, como se ha observado en planarias.

Por otra parte, los miocitones son la principal fuente de componentes de la matriz extracelular en cestodos, como también se ha demostrado en planarias (Conn, 1993; Witchley y col., 2013; Cote y col., 2019). Recientemente se ha demostrado la expresión específica de colágeno en los miocitones de adultos y larvas de *H. microstoma*, mediante hibridación *in situ* (Jarero y col., 2024). Se analizó la expresión de colágeno en larvas en los estadios 3 y 4.1, y es posible observar su expresión en las regiones que participan en la formación del quiste o cápsula (Jarero y col., 2024). En particular, se marcan células que forman un cinturón en la mitad posterior de la larva en el estadio 3, donde también observamos expresión de tropomiosinas (*tpm-1.hmw*, figura R10D), luego esta área pasa a formar la cápsula en el estadio 4.1 como había sido descrito por Caley (1974). La expresión de colágeno en el desarrollo del quiste concuerda con la importante presencia de fibras en dicha estructura (Caley, 1974).

El sistema muscular de las larvas es simétrico dorso-ventralmente a partir del estadio 2. En los estadios 2.2 a 3.2, tanto las fibras musculares circulares como las longitudinales aumentan su número y densidad, formando una retícula ortogonal subtegumentaria (figura R10C). Las fibras longitudinales se extienden por la mayor parte de la longitud de la larva, pero están ausentes en la región más posterior que se convertirá en el cercómero, como describió Caley (1974). Aparecen fibras musculares transversales en la región anterior (el pre-escólex) (figuras R10C – E) y se desarrolla la musculatura intrínseca del rostelo y de las ventosas sólo luego de la retracción del pre-escólex, durante los estadios 4.1 a 4.2 (figuras R10C y D). Destacamos que la actividad muscular es necesaria para la retracción del escólex (Caley, 1974), que se produce en la transición del estadio 3.2 al 4.1, tras sólo 5 o 6 días de metamorfosis. Las fibras musculares del pre-escólex en el estadio 4.1 (figuras R10C y R14D) presentan una organización similar a la descrita para protoescóleces de *E. multilocularis* (Koziol y col., 2013).

El análisis de la expresión de los factores de transcripción *myoD* y *nkx1-1*, mostró diferentes territorios de expresión durante la metamorfosis larvaria, que relacionamos con las estructuras musculares en desarrollo. En el estadio 2.2 observamos expresión de *myoD* en células que flanquean las bandas de células organizadas como cremallera que identificamos previamente como miocitones marginales. Estas células *myoD*<sup>+</sup> pueden ser progenitores en el linaje de diferenciación de células musculares por encontrarse adyacentes a los miocitones diferenciados. También, la expresión de *myoD* en un cinturón posterior en el estadio 2.2 precede a la identificación de este tipo de cinturón mediante el marcado para tropomiosinas musculares en el estadio 3, para el cual se mantiene la expresión de *myoD* (figura R13A). Para *nkx1-1* destacamos la expresión predominante en las ventosas en desarrollo, aunque se expresa también en menor medida en áreas de expresión de *myoD* como el cinturón (figura R13).

En planarias se había demostrado la importancia de cada uno de estos dos factores de transcripción, *myoD* y *nkx1-1*, para la diferenciación de fibras musculares longitudinales y circulares respectivamente (Scimone y col., 2017). Pero, por el momento no encontramos evidencia que nos permita discernir cuáles cuerpos celulares corresponden a miocitones de fibras musculares circulares o longitudinales superficiales en *H. microstoma*. De los dos factores de transcripción estudiados, *myoD* se encuentra expresado en mayor medida y en áreas extensas en la superficie de las larvas en los estadios 2 a 3, por lo que podría estar relacionado con el desarrollo de las fibras musculares superficiales (circulares o longitudinales) en estos estadios. Por otra parte, la expresión de *myoD* en el cinturón posterior en el estadio 3, se continúa en el estadio 4.1 en la zona del quiste, indicando que participa en el desarrollo de dicha estructura. En el estadio 4.1 también es amplia el área de expresión de *myoD* en el pre-escólex invaginado. En general, podemos vincular la expresión de este factor de transcripción con diferentes estructuras, lo que sugiere que puede relacionarse con células musculares con diferentes características, en diferentes regiones de la larva.

A futuro, resulta importante probar si los factores de transcripción *myoD* y *nkx1-1* se expresan en células proliferantes y/o post-mitóticas, que puede ser realizado mediante

ensayos de hibridación *in situ* en combinación con el marcado de las células proliferantes con EdU. También sería posible validar su participación en linajes de diferenciación muscular si se detectara la expresión de un marcador de células musculares como las isoformas musculares de tropomiosina en las mismas células. Para esto deberíamos realizar una doble detección mediante hibridación *in situ* porque el marcado de las fibras musculares mediante inmunofluorescencia para TPM-HMW, en general no muestra la localización de los miocitones. Queda como interrogante si puede ser detectada la expresión de estos factores de transcripción en larvas más tempranas siendo que la detección de la expresión de tropomiosinas (*tpm1/2.hmw*) permite identificar miocitones a partir del estadio 1.2 (figura D1).

En este trabajo, evidenciamos la diferenciación de miocitones *tpm1/2.hmw*<sup>+</sup> a partir de células germinativas en ensayos de 24 hs de seguimiento de la marca de EdU (figura R12). Las isoformas musculares de tropomiosina (*tpm1/2.hmw*) representan un ejemplo de genes efectores específicos del músculo, que son expresados en células post-mitóticas. Nuestros experimentos muestran que en el linaje de diferenciación de músculos, la expresión de estos genes efectores se inicia en menos de 24 horas luego de la salida del ciclo celular.

#### 4.3.3.3. Neurogénesis en la metamorfosis larvaria

En los primeros estadios de la metamorfosis larvaria (estadios 1.1 y 1.2) detectamos estructuras nerviosas vestigiales en forma de puntos asociados a los ganchos, que interpretamos como remanentes del sistema nervioso de la oncosfera (figura R14B). El sistema nervioso del cisticercoide se forma *de novo* post-embriónariamente, durante la metamorfosis larvaria. En una primera instancia observamos una acumulación de células *pc2*<sup>+</sup>, *chat*<sup>+</sup> y *vGlut*<sup>+</sup> en el interior del hemisferio anterior de las larvas en los estadios 2.1 y 2.2, en larvas de 4 días post-infección (figura R15). De estos marcadores observamos que *chat* se puede detectar en larvas ligeramente más pequeñas, en el estadio 1.2 avanzado, con 60 µm de longitud antero-posterior, (figura R15E). Observamos entonces que en estos estadios tienen lugar procesos de diferenciación celular en el linaje de células nerviosas, que identificamos tempranamente por la expresión de estos genes marcadores a nivel de ARN mensajero.

El factor de transcripción *neuroD* se detecta en células proliferantes del hemisferio anterior de las larvas en el estadio 1.2, en larvas aún más pequeñas (de 42 a 71  $\mu\text{m}$ ,  $n=5$  larvas) y en un mayor número de células en comparación con las células *chat*<sup>+</sup> (figura R16A). La expresión de este factor de transcripción generalmente relacionado con la neurogénesis en los animales bilaterales, precede la expresión de los marcadores de células nerviosas en diferenciación en la metamorfosis larvaria. La expresión temprana de *neuroD* en los estadios 1.2 y 2.1 en el hemisferio anterior de la larva, marca un territorio amplio relacionado con el desarrollo del sistema nervioso (figura R15A). Esta observación se asemeja a la expresión temprana de *neuroD* en el neuroectodermo en larvas del anélido *Platynereis* (Simionato y col., 2008). Cabe destacar que en los platelmintos no se identifica un neuroectodermo sino que el sistema nervioso se forma a partir de progenitores con una organización mesenquimal (Monjo y Romero, 2015; Davies y col., 2017).

Nuestro análisis de la expresión de *coe*, un factor de transcripción generalmente relacionado con la diferenciación de neuronas, permite establecer un vínculo con el desarrollo del sistema nervioso en la metamorfosis larvaria de cestodos. Observamos expresión de *coe* en áreas vinculadas con el sistema nervioso en desarrollo a partir del estadio 2.1 (larvas de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  en el eje antero-posterior). En el estadio 3 se expresa en la zona interna del extremo anterior de las larvas, donde se desarrollan las estructuras más anteriores del sistema nervioso, incluidos los ganglios rostelares en desarrollo, los ganglios cerebrales y la comisura transversal. También se observaron células *coe*<sup>+</sup> más dispersas distribuidas hasta la zona media de la larva, que pueden vincularse con los cordones nerviosos en desarrollo. En el estadio 4.1, se encuentra expresado principalmente en células de la base del pre-escólex invaginado (figura R16C). De las células marcadas, un muy bajo porcentaje (2%) incorpora EdU en ensayos de 2 horas, sugiriendo que se expresa principalmente en células post-mitóticas. Una característica de estas células es su pequeño tamaño como observamos en general en las células post-mitóticas (EdU) en toda la región anterior de la larva. Estas observaciones son compatibles con su expresión en células post-mitóticas en el linaje de diferenciación de neuronas, tal como se ha

observado en vertebrados e invertebrados (*Drosophila*, *Platynereis* y planarias; Demilly y col., 2011; Davies y col., 2017).

En comparación, el patrón de expresión de *neuroD* es más dinámico siendo que se pierde su expresión en el centro del pre-escólex invaginado mientras que predomina su expresión en el área de desarrollo de los cordones nerviosos en el estadio 4.1 (figura R16A). Queda en evidencia también un patrón de desarrollo con un orden antero-posterior, con estructuras posteriores, como los cordones nerviosos que se desarrollan en este estadio avanzado de la metamorfosis. Como habíamos observado mediante ensayos de marcado con EdU, el desarrollo del pre-escólex en el estadio 4 no involucra procesos de proliferación celular sino que debe realizarse a partir de células post-mitóticas (figura R5C, secciones 3.3 y 4.3.1). Por lo tanto, la desaparición de la expresión de *neuroD* en la región del escólex en el estadio 4 podría corresponder a la diferenciación de los precursores neurales generados durante las etapas más tempranas.

El factor de transcripción *soxB*, relacionado generalmente con células proliferantes o con procesos de diferenciación neural, se encuentra expresado en áreas típicas del sistema nervioso en desarrollo en los estadios 2 a 4 (figura R16B). En el estadio 4.1 la marca de *soxB* se encuentra en menor medida en el pre-escólex y en mayor medida en los cordones nerviosos en desarrollo, de forma similar a *neuroD* en este estadio. El patrón de expresión de *soxB* observado en este trabajo nos permite sugerir que puede ser expresado en precursores neurales principalmente post-mitóticos ya que solo el 8% incorpora EdU (sección 3.7.4).

Por otro lado, los cestodos parecen carecer de muchos reguladores conservados del desarrollo neuronal, como *neurogenina* y *elav* (que no se encuentran mediante BLASTP y análisis de los genes de la familia correspondiente), lo que sugiere que el programa neurogénico está modificado en comparación con los invertebrados modelo más estudiados, *Caenorhabditis*, *Drosophila*, *Platynereis* y planarias. También, identificamos el gen ortólogo de *achaete-scute* en *H. microstoma* pero no se pudo detectar su expresión por hibridación *in situ* en larvas. Resulta interesante investigar si los patrones particulares de

expresión génica observados en la metamorfosis larvaria también tienen lugar durante el desarrollo neuronal en otras etapas del ciclo de vida, como el desarrollo embrionario que da lugar a las oncosferas o durante la remodelación del sistema nervioso del cisticercoide (juvenil) que se desarrolla hacia el estadio adulto.

Por último, nuestro análisis de procesos de diferenciación neural mediante ensayos de pulso y seguimiento con EdU permitió observar la formación de células *chat*<sup>+</sup> a partir de células germinativas en ensayos de 24 horas de seguimiento. Observamos que la expresión de *chat* comienza dentro de 24 horas luego del último ciclo celular e interpretamos que constituye un evento temprano de un proceso de neurogénesis. También la expresión de *chat* en una célula débilmente positiva para EdU en larvas pequeñas en ensayos de 2 horas (observado en 2 larvas) sugiere que este gen se expresa tempranamente en el linaje de diferenciación de neuronas *chat*<sup>+</sup>, como había sido observado previamente en planarias (Wagner y col., 2011, Cowles y col. 2013, Wyss y col. 2022).

El análisis análogo para la expresión de *neuroD* muestra una disminución de la proporción de células marcadas con EdU entre las células *neuroD*<sup>+</sup> después de 24 horas de seguimiento (figuras R17A y C). Interpretamos que las células *neuroD*<sup>+</sup> eran progenitores proliferantes de corta vida que desactivaron la expresión de *neuroD* a medida que se diferenciaban. Es posible interpretar también que la marca de EdU se pierde debido a repetidas divisiones celulares.

#### 4.3.3.4. Perspectivas sobre el estudio de procesos de diferenciación celular en *H. microstoma*

El análisis realizado de la expresión de factores de transcripción relacionados con la miogénesis y la neurogénesis en la metamorfosis larvaria de *H. microstoma* deja en evidencia una posible relación de los genes *myoD* y *nkx1-1* con procesos de diferenciación de células musculares, y *neuroD*, *coe* y *soxB* con procesos de diferenciación de células nerviosas, con base en el patrón espacial y temporal de expresión observado en cada caso. Para todos los casos, una forma de validar su vínculo con linajes de diferenciación hacia célula muscular o neurona sería evaluar si en algún caso tiene lugar la coexpresión de uno de estos genes para factor de transcripción con uno de los genes marcadores de célula

muscular o neurona en diferenciación que estudiamos previamente. Destacamos que la detección de la expresión de los genes que codifican para proteínas efectoras específicas de los dos tipos celulares a nivel de ARN mensajero por hibridación *in situ* puede identificar tanto células diferenciadas como en proceso de diferenciación. Nuestro análisis de la diferenciación del sistema nervioso en la metamorfosis larvaria puso en evidencia que la detección de los marcadores para diferentes sistemas de neurotransmisión a nivel de ARN mensajero (*chat*, *vGlut* y *pc-2*, a partir del estadio 2.1) precede la detección de proteínas típicas del sistema nervioso como sinapsina o neuropéptidos mediante inmunofluorescencia (SYN y FMRFa, en los estadios 3.1 a 4.1, figura R14C y D) en al menos 24 horas (tiempo aproximado que lleva el desarrollo del estadio 2.1 a 3.1, ver figura D1).

Para realizar el ensayo de doble marcado con un factor de transcripción y un gen de proteína efectora del tipo celular particular, hace falta ajustar el protocolo de marcado doble mediante hibridación *in situ* que probamos hasta ahora sin éxito en larvas de *H. microstoma*. Por un lado, sería de utilidad contar con anticuerpos para realizar la detección de alguno de los factores de transcripción mencionados a nivel de proteína y poder combinar este ensayo con la detección de la expresión de genes de células diferenciadas. Para los cestodos en muchos casos no han funcionado los anticuerpos generados para proteínas ortólogas de otras especies por lo que sería necesario generar anticuerpos específicos para estos ensayos.

Por otro lado, proponemos como un camino posible extender el análisis de la expresión de los factores de transcripción estudiados a otros estadios del ciclo de vida de la especie. En particular parece conveniente enfocarse en el sistema muscular y el sistema nervioso del estadio adulto para los cuales ya hemos validado la expresión de los genes marcadores de células musculares y neuronas (Preza y col., 2018; Jarero y col., 2024). El análisis de la expresión de los factores de transcripción permitiría observar si la ubicación de las células marcadas se relaciona con estructuras musculares o nerviosas y mediante ensayos de doble marcado mediante hibridación *in situ* se podría evaluar si en algunas células se detecta la expresión de ambos genes, que sería indicativo de células en diferenciación. A su vez, sería posible caracterizar procesos de diferenciación celular en el estadio adulto de *H.*

*microstoma*, y evaluar posibles similitudes o diferencias con las características observadas en este trabajo, durante el desarrollo de la metamorfosis larvaria.

## 5. Bibliografia

- Abmayr, S. M. y Keller, C. A. (1997). "Drosophila myogenesis and insights into the role of nautilus," in *Current Topics in Developmental Biology*, eds. R. A. Pedersen and G. P. Schatten (Academic Press), 35–80. doi: 10.1016/S0070-2153(08)60244-6.
- Akamatsu, W., Fujihara, H., Mitsuhashi, T., Yano, M., Shibata, S., Hayakawa, Y. y col. (2005). The RNA-binding protein HuD regulates neuronal cell identity and maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 4625–4630. doi: 10.1073/pnas.0407523102.
- Andrikou, C. y Arnone, M. I. (2015). Too many ways to make a muscle: Evolution of GRNs governing myogenesis. *Zool. Anzeiger - A J. Comp. Zool.* 256, 2–13. doi: 10.1016/j.jcz.2015.03.005.
- Baguñà, J. (2012). The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 19–37. doi: 10.1387/ijdb.113463jb.
- Baguñà, J., Martínez, P., Paps, J. y Riutort, M. (2008). Back in time: a new systematic proposal for the Bilateria. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 363, 1481–1491. doi: 10.1098/rstb.2007.2238.
- Baguñà, J. y Riutort, M. (2004). Molecular phylogeny of the Platyhelminthes. *Can. J. Zool.* 82, 168–193. doi: 10.1139/z03-214.
- Baguñà, J. y Romero, R. (1981). Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planarians *Dugesia mediterranea* and *Dugesia tigrina*. *Hydrobiologia* 84, 181–194. doi: 10.1007/BF00026179.
- Baugh, L. R. y Hunter, C. P. (2006). MyoD, modularity, and myogenesis: conservation of regulators and redundancy in *C. elegans*. *Genes Dev.* 20, 3342–3346. doi: 10.1101/gad.1507606.
- Baylies, M. K., Bate, M. y Gomez, M. R. (1998). Myogenesis: A view from *Drosophila*. *Cell* 93, 921–927. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81198-8.
- Bertrand, N., Castro, D. S. y Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of

- neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 517–530. doi: 10.1038/nrn874.
- Bolla, R. I. y Roberts, L. S. (1971). Developmental physiology of cestodes. IX Cytological characteristics of the germinative region of *Hymenolepis diminuta*. *J. Parasitol.* 57, 267–277. [www.jstor.org/stable/3278024?seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](http://www.jstor.org/stable/3278024?seq=1#page_scan_tab_contents).
- Brehm, K. y Koziol, U. (2017). “Echinococcus–host interactions at cellular and molecular levels,” in *Advances in Parasitology Echinococcus and Echinococcosis, Part A*, eds. R. C. A. Thompson, P. Deplazes y A. J. Lymbery (Academic Press), 147–212. doi: 10.1016/bs.apar.2016.09.001.
- Brunet, T., Fischer, A. H., Steinmetz, P. R., Lauri, A., Bertucci, P. y Arendt, D. (2016). The evolutionary origin of bilaterian smooth and striated myocytes. *Elife* 5, 1–24. doi: 10.7554/eLife.19607.
- Brusca, R. C. y Brusca, G. J. (2003a). “Animal development, life histories and origins,” in *Invertebrates* (Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates), 92–119.
- Brusca, R. C. y Brusca, G. J. (2003b). “Phylum Platyhelminthes,” in *Invertebrates* (Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates), 285–318.
- Buttarelli, F. R., Pontieri, F. E., Margotta, V. y Palladini, G. (2000). Acetylcholine/dopamine interaction in planaria. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 125, 225–231. doi: 10.1016/S0742-8413(99)00111-5.
- Cabrera, G., Cabrejos, M. E., Loureiro-Morassutti, A., Cabezón, C., Orellana, J., Hellman, U. y col. (2008). DNA damage, RAD9 and fertility/infertility of *Echinococcus granulosus* hydatid cysts. *J. Cell. Physiol.* 216, 498–506. doi: 10.1002/jcp.21418.
- Caira, J. N., Jensen, K., Georgiev, B. B., Kuchta, R., Littlewood, D. T. J., Mariaux, J. y col. (2017). “An overview of tapeworms from vertebrate bowels of the Earth,” in *Planetary Biodiversity Inventory (2008– 2017): tapeworms from Vertebrate Bowels of the Earth*, ed. Caira, J.N.; Jensen, K (Natural History Museum. University of Kansas, Lawrence), 1–20.

- Caley, J. (1974). The functional significance of scolex retraction and subsequent cyst formation in the cysticeroid larva of *Hymenolepis microstoma*. *Parasitology* 68, 207–227. doi: 10.1017/S0031182000045741.
- Cebrià, F. (2016). Planarian Body-Wall Muscle: Regeneration and Function beyond a Simple Skeletal Support. *Front. Cell Dev. Biol.* 4, 1–10. doi: 10.3389/fcell.2016.00008.
- Cheng, Z., Liu, F., Dai, M., Wu, J., Li, X., Guo, X. y col. (2017). Identification of EmSOX2, a member of the Sox family of transcription factors, as a potential regulator of *Echinococcus multilocularis* germinative cells. *Int. J. Parasitol.* 47, 625–632. doi: 10.1016/j.ijpara.2017.03.005.
- Collin, W. (1970). Electron microscopy of postembryonic stages of the tapeworm, *Hymenolepis citelli*. *J. Parasitol.* 56, 1159–1170. doi: 10.2307/3277562.
- Collin, W. K. (1969). The cellular organization of hatched oncospheres of *Hymenolepis citelli* (Cestoda, Cyclophyllidea). *J. Parasitol.* 55, 149. doi: 10.2307/3277366.
- Collings, S. B. y Hutchins, C. P. (1965). Motility and hatching of *Hymenolepis microstoma* oncospheres in sera, beetle extracts, and salines. *Exp. Parasitol.* 16, 53–56. doi: 10.1016/0014-4894(65)90032-9.
- Collins, J. J., King, R. S., Cogswell, A., Williams, D. L. y Newmark, P. A. (2011). An atlas for schistosoma mansoni organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5. doi: 10.1371/journal.pntd.0001009.
- Collins, J. J., Wang, B., Lambrus, B. G., Tharp, M. E., Iyer, H. y Newmark, P. A. (2013). Adult somatic stem cells in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nature* 494, 476–479. doi: 10.1038/nature11924.
- Collins, J. J., Wendt, G. R., Iyer, H. y Newmark, P. A. (2016). Stem cell progeny contribute to the schistosome host-parasite interface. *Elife* 5, 1–10. doi: 10.7554/eLife.12473.
- Conn, D. B. (1993). The biology of flatworms (Platyhelminthes): parenchyma cells and extracellular matrices. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 112, 241–261. doi: 10.2307/3226561.

- Cote, L. E., Simental, E. y Reddien, P. W. (2019). Muscle functions as a connective tissue and source of extracellular matrix in planarians. *Nat. Commun.* 10, 1–13. doi: 10.1038/s41467-019-09539-6.
- Cousin, C., Dorsey, C., Kennedy, V. y Ofori, K. (1995). Ultrastructure of the ventral sucker of *Schistosoma mansoni* cercaria. *J. Morphol.* 223, 215–223. doi: 10.1002/jmor.1052230209.
- Cowles, M. W., Brown, D. D. R., Nisperos, S. V., Stanley, B. N., Pearson, B. J. y Zayas, R. M. (2013). Genome-wide analysis of the bHLH gene family in planarians identifies factors required for adult neurogenesis and neuronal regeneration. *Development* 140, 4691–4702. doi: 10.1242/dev.098616.
- Crews, S. T. (2019). *Drosophila* embryonic CNS development: neurogenesis, gliogenesis, cell fate, and differentiation. *Genetics* 213, 1111–1144. doi: 10.1534/genetics.119.300974.
- Cunningham, L. J. y Olson, P. D. (2010). Description of *Hymenolepis microstoma* (Nottingham strain): A classical tapeworm model for research in the genomic era. *Parasites and Vectors* 3, 1–9. doi: 10.1186/1756-3305-3-123.
- Currie, K. W., Molinaro, A. M. y Pearson, B. J. (2016). Neuronal sources of hedgehog modulate neurogenesis in the adult planarian brain. *Elife* 5, 1–18. doi: 10.7554/eLife.19735.
- Davidson, E. H., Peterson, K. J. y Cameron, R. A. (1995). Origin of bilaterian body plans: evolution of developmental regulatory mechanisms. *Science (80- )*. 270, 1319–1325. doi: 10.1126/science.270.5240.1319.
- Davies, E. L., Lei, K., Seidel, C. W., Kroesen, A. E., McKinney, S. A., Guo, L. y col. (2017). Embryonic origin of adult stem cells required for tissue homeostasis and regeneration. *Elife* 6, 1–35. doi: 10.7554/eLife.21052.
- Davis, R. L., Weintraub, H. y Lassar, A. B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987–1000. doi: 10.1016/0092-

8674(87)90585-X.

- Demilly, A., Simionato, E., Ohayon, D., Kerner, P., Garcès, A. y Vervoort, M. (2011). Coe genes are expressed in differentiating neurons in the central nervous system of protostomes. *PLoS One* 6. doi: 10.1371/journal.pone.0021213.
- Demilly, A., Steinmetz, P., Gazave, E., Marchand, L. y Vervoort, M. (2013). Involvement of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in neurectoderm architecture in *Platynereis dumerilii*. *Nat. Commun.* 4, 1915. doi: 10.1038/ncomms2915.
- Diaz Soria, C. L., Lee, J., Chong, T., Coghlan, A., Tracey, A., Young, M. D. y col. (2020). Single-cell atlas of the first intra-mammalian developmental stage of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat. Commun.* 11, 1–16. doi: 10.1038/s41467-020-20092-5.
- Dumont, N. A., Wang, Y. X. y Rudnicki, M. A. (2015). Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development* 142, 1572–1581. doi: 10.1242/dev.114223.
- Edmondson, D. G. y Olson, E. N. (1990). A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev.* 4, 1450–1450. doi: 10.1101/gad.4.8.1450.
- Egger, B., Ladurner, P., Nimeth, K., Gschwentner, R. y Rieger, R. (2006). The regeneration capacity of the flatworm *Macrostomum lignano*—on repeated regeneration, rejuvenation, and the minimal size needed for regeneration. *Dev. Genes Evol.* 216, 565–577. doi: 10.1007/s00427-006-0069-4.
- Egger, B., Lapraz, F., Tomiczek, B., Müller, S., Dessimoz, C., Girstmair, J. y col. (2015). A transcriptomic-phylogenomic analysis of the evolutionary relationships of flatworms. *Curr. Biol.* 25, 1347–1353. doi: 10.1016/j.cub.2015.03.034.
- Egger, B., Steinke, D., Tarui, H., De Mulder, K., Arendt, D., Borgonie, G. y col. (2009). To be or not to be a flatworm: The Acoel controversy. *PLoS One* 4, 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0005502.

- Evans, W. S. (1980). "The cultivation of *Hymenolepis* in vitro," in *Biology of the Tapeworm Hymenolepis diminuta* (Elsevier), 425–448. doi: 10.1016/B978-0-12-058980-7.50011-7.
- Failache, E. (2023). Estudio de la expresión de la ciclina B (Hm-cycB) en el cestodo modelo *Hymenolepis microstoma*. Tesis de grado, Universidad de la República, Uruguay. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/41019>
- Fairweather, I. y Threadgold, L. T. (1981). *Hymenolepis nana*: the fine structure of the "penetration gland" and nerve cells within the oncosphere. *Parasitology* 82, 445–458.
- Fischer, A. H., Henrich, T. y Arendt, D. (2010). The normal development of *Platynereis dumerilii* (Nereididae, Annelida). *Front. Zool.* 7, 31–39. doi: 10.1186/1742-9994-7-31.
- Freeman, R. S. (1973). Ontogeny of cestodes and its bearing on their phylogeny and systematics. *Adv. Parasitol.* 11, 481–557. doi: 10.1016/S0065-308X(08)60191-8.
- García-Castro, H. y Solana, J. (2022). Single-cell transcriptomics in planaria: new tools allow new insights into cellular and evolutionary features. *Biochem. Soc. Trans.* 50, 1237–1246. doi: 10.1042/BST20210825.
- Gąsiorowski, L., Chai, C., Rozanski, A., Purandare, G., Ficze, F., Mizi, A. y col. (2024). Regeneration in the absence of canonical neoblasts in an early branching flatworm. *bioRxiv* 2024.05.24, 11–13. doi: <https://doi.org/10.1101/2024.05.24.595708>.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. y Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119, 493–501. doi: 10.1083/jcb.119.3.493.
- Goodchild, C. G. y Stullken, R. E. (1970). *Hymenolepis microstoma*: Cysticeroid Morphogenesis. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 89, 224. doi: 10.2307/3224378.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P. y Pevny, L. (2003). SOX2 Functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 39, 749–765. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00497-5.

- Guarnaschelli, I. (2020). Marcado del tegumento y determinación del patrón de expresión espacial de SLC5 y CntA en el cestodo modelo *Hymenolepis microstoma*. Tesis de grado, Universidad de la República, Uruguay.  
<https://hdl.handle.net/20.500.12008/26008>
- Gustafsson, M. K. S. (1976). Studies on cytodifferentiation in the neck region of *Diphyllobothrium dendriticum* Nitzsch, 1824 (Cestoda, Pseudophyllidea). *Zeitschrift für Parasitenkd.* 50, 323–329. doi: 10.1007/BF02462976.
- Gustafsson, M. K. S. (1990). *Diphyllobothrium dendriticum* as a model in cell biology. *Acta Acad. Abo. Ser.* 50, 13–44.
- Guth, S. I. E. y Wegner, M. (2008). Having it both ways: Sox protein function between conservation and innovation. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3000–3018. doi: 10.1007/s00018-008-8138-7.
- Halanych, K. M., Bacheller, J. D., Aguinaldo, A. M. A., Liva, S. M., Hillis, D. M. y Lake, J. A. (1995). Evidence from 18 S ribosomal DNA that the Lophophorates are protostome animals. *Science (80-. )*. 267, 1641–1643. doi: 10.1126/science.7886451.
- Hartenstein, V. y Jones, M. (2003). The embryonic development of the bodywall and nervous system of the cestode flatworm *Hymenolepis diminuta*. *Cell Tissue Res.* 311, 427–435. doi: 10.1007/s00441-002-0687-8.
- Hartenstein, V. y Stollewerk, A. (2015). The evolution of early neurogenesis. *Dev. Cell* 32, 390–407. doi: 10.1016/j.devcel.2015.02.004.
- Hayashi, T., Shibata, N., Okumura, R., Kudome, T., Nishimura, O., Tarui, H. y col. (2010). Single-cell gene profiling of planarian stem cells using fluorescent activated cell sorting and its “index sorting” function for stem cell research. *Dev. Growth Differ.* 52, 131–144. doi: 10.1111/j.1440-169X.2009.01157.x.
- Hernández-Salmerón, J. E. y Moreno-Hagelsieb, G. (2020). Progress in quickly finding orthologs as reciprocal best hits: comparing blast, last, diamond and MMseqs2. *BMC Genomics* 21, 741. doi: 10.1186/s12864-020-07132-6.

- Herz, M., Zarowiecki, M., Wessels, L., Pätzelt, K., Herrmann, R., Braun, C. y col. (2024). Genome-wide transcriptome analysis of *Echinococcus multilocularis* larvae and germinative cell cultures reveals genes involved in parasite stem cell function. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 14, 1–24. doi: 10.3389/fcimb.2024.1335946.
- Hobert, O. (2008). Regulatory logic of neuronal diversity: Terminal selector genes and selector motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 20067–20071. doi: 10.1073/pnas.0806070105.
- Hobert, O. (2010). “Neurogenesis in the nematode *Caenorhabditis elegans*,” in *WormBook*, ed. Wormbook (The *C. elegans* Research Community, WormBook), 1–24. doi: 10.1895/wormbook.1.12.2.
- Holcman, B. y Heath, D. D. (1997). The early stages of *Echinococcus granulosus* development. *Acta Trop.* 64, 5–17. doi: 10.1016/S0001-706X(96)00636-5.
- Holcman, B., Heath, D. D. y Shaw, R. J. (1994). Ultrastructure of oncosphere and early stages of metacystode development of *Echinococcus granulosus*. *Int. J. Parasitol.* 24, 623–635. doi: 10.1016/0020-7519(94)90114-7.
- Homem, C. C. F. y Knoblich, J. A. (2012). *Drosophila* neuroblasts: a model for stem cell biology. *Development* 139, 4297–4310. doi: 10.1242/dev.080515.
- Hooper, S. L. y Thuma, J. B. (2005). Invertebrate muscles: Muscle specific genes and proteins. *Physiol. Rev.* 85, 1001–1060. doi: 10.1152/physrev.00019.2004.
- Hotez, P. J., Alvarado, M., Basáñez, M.-G., Bolliger, I., Bourne, R., Boussinesq, M. y col. (2014). The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2865. doi: 10.1371/journal.pntd.0002865.
- Howe, K. L., Bolt, B. J., Shafie, M., Kersey, P. y Berriman, M. (2017). WormBase ParaSite – a comprehensive resource for helminth genomics. *Mol. Biochem. Parasitol.* 215, 2–10. doi: 10.1016/j.molbiopara.2016.11.005.

- Hunt, M. K. y Maslakova, S. A. (2017). Development of a lecithotrophic pilidium larva illustrates convergent evolution of trochophore-like morphology. *Front. Zool.* 14, 1–19. doi: 10.1186/s12983-017-0189-x.
- Hyman, L. H. (1951). *The Invertebrates: Platyhelminthes and Rhyncho-coela The acoelomate bilateria Volume II*. New York: McGraw-Hill Book Company Inc.
- Ivankovic, M., Haneckova, R., Thommen, A., Grohme, M. A., Vila-Farré, M., Werner, S. y col. (2019). Model systems for regeneration: planarians. *Development* 146, 0–1. doi: 10.1242/dev.167684.
- Jarero, F., Baillie, A., Riddiford, N., Montagne, J., Koziol, U. y Olson, P. D. (2024). Muscular remodeling and anteroposterior patterning during tapeworm segmentation. *Dev. Dyn.*, 1–26. doi: 10.1002/dvdy.712.
- Kingston, R. E. (2003). "Introduction of DNA into mammalian cells," in *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G; Smith, J. A.; Struhl, K. (John Wiley & Sons, Inc.), 9.0.1.-9.0.5.
- Knirr, S., Azpiazu, N. y Frasch, M. (1999). The role of the NK-homeobox gene slouch (S59) in somatic muscle patterning. *Development* 126, 4525–4535. doi: 10.1242/dev.126.20.4525.
- Koziol, U. (2014). Molecular and developmental characterization of the Echinococcus multilocularis stem cell system. Tesis de doctorado, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Alemania.
- Koziol, U. (2017). Evolutionary developmental biology (evo-devo) of cestodes. *Exp. Parasitol.* 180, 84–100. doi: 10.1016/j.exppara.2016.12.004.
- Koziol, U. y Castillo, E. (2011). "Cell proliferation and differentiation in cestodes," in *Research in Helminths*, ed. A. Esteves, 121–138.
- Koziol, U., Costábile, A., Domínguez, M. F., Iriarte, A., Alvite, G., Kun, A. y col. (2011). Developmental expression of high molecular weight tropomyosin isoforms in

- Mesocestoides corti. *Mol. Biochem. Parasitol.* 175, 181–191. doi: 10.1016/j.molbiopara.2010.11.009.
- Koziol, U., Domínguez, M. F., Marín, M., Kun, A. y Castillo, E. (2010a). Stem cell proliferation during in vitro development of the model cestode *Mesocestoides corti* from larva to adult worm. *Front. Zool.* 7, 1–12. doi: 10.1186/1742-9994-7-22.
- Koziol, U., Domínguez, M. F., Marín, M., Kun, A. y Castillo, E. (2010b). Stem cell proliferation during in vitro development of the model cestode *Mesocestoides corti* from larva to adult worm. *Front. Zool.* 7, 1–12. doi: 10.1186/1742-9994-7-22.
- Koziol, U., Jarero, F., Olson, P. D. y Brehm, K. (2016). Comparative analysis of Wnt expression identifies a highly conserved developmental transition in flatworms. *BMC Biol.* 14, 10. doi: 10.1186/s12915-016-0233-x.
- Koziol, U., Krohne, G. y Brehm, K. (2013). Anatomy and development of the larval nervous system in *Echinococcus multilocularis*. *Front Zool* 10, 24. doi: 10.1186/1742-9994-10-24.
- Koziol, U., Radio, S., Smircich, P., Zarowiecki, M., Fernández, C. y Brehm, K. (2015). A novel terminal-repeat retrotransposon in miniature (TRIM) is massively expressed in *Echinococcus multilocularis* stem cells. *Genome Biol. Evol.* 7, 2136–2153. doi: 10.1093/gbe/evv126.
- Koziol, U., Rauschendorfer, T., Zanon Rodríguez, L., Krohne, G. y Brehm, K. (2014). The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*. *Evodevo* 5, 1–23. doi: 10.1186/2041-9139-5-10.
- Krause, M., Fire, A., Harrison, S. W., Priess, J. y Weintraub, H. (1990). CeMyoD accumulation defines the body wall muscle cell fate during *C. elegans* embryogenesis. *Cell* 63, 907–919. doi: 10.1016/0092-8674(90)90494-Y.
- Ladurner, P., Rieger, R. y Baguñà, J. (2000). Spatial distribution and differentiation potential of stem cells in hatchlings and adults in the marine platyhelminth *Macrostomum* sp.: a bromodeoxyuridine analysis. *Dev. Biol.* 226, 231–241. doi:

10.1006/dbio.2000.9867.

Lapan, S. W. y Reddien, P. W. (2011). *dlx* and *sp6-9* control optic cup regeneration in a prototypic Eye. *PLoS Genet.* 7, e1002226. doi: 10.1371/journal.pgen.1002226.

Ledent, V. y Vervoort, M. (2001). The basic Helix-Loop-Helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Res.* 11, 754–770. doi: 10.1101/gr.177001.

Lee, M. B., Bueding, E. y Schiller, E. L. (1978). The occurrence and distribution of 5-hydroxytryptamine in *Hymenolepis diminuta* and *H. nana*. *J. Parasitol.* 64, 257. doi: 10.2307/3279668.

Lee, S., Wei, L., Zhang, B., Goering, R., Majumdar, S., Wen, J. y col. (2021). ELAV/Hu RNA binding proteins determine multiple programs of neural alternative splicing. *PLOS Genet.* 17, e1009439. doi: 10.1371/journal.pgen.1009439.

Loehr, K. A. y Mead, R. W. (1980). Changes in embryonic cell frequencies in the germinative and immature regions of *Hymenolepis citelli* during development. *J. Parasitol.* 66, 792–796. [www.jstor.org/stable/3280670](http://www.jstor.org/stable/3280670).

Lumsden, R. D., Oaks, J. A. y Mueller, J. F. (1974). Brush border development in the tegument of the tapeworm, *Spirometra mansonoides*. *J. Parasitol.* 60, 209. doi: 10.2307/3278452.

Lumsden, R. D. y Specian, R. (1980). "The morphology, histology and fine structure of the adult stage of the cyclophyllidean tapeworm *Hymenolepis diminuta*," in *Biology of the Tapeworm Hymenolepis Diminuta*, ed. H. P. Arai (New York and London: Elsevier), 157–280. doi: 10.1016/B978-0-12-058980-7.50008-7.

Mair, G. R., Maule, A. G., Day, T. A. y Halton, D. W. (2000). A confocal microscopical study of the musculature of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 121, 163–170. doi: 10.1017/S0031182099006174.

Mair, G. R., Maule, A. G., Fried, B., Day, T. A. y Halton, D. W. (2003). Organization of the

musculature of schistosome cercariae. *J. Parasitol.* 89, 623–5. doi: 10.1645/0022-3395(2003)089[0623:OOTMOS]2.0.CO;2.

Maisl, A. (2019). Molecular and cellular analysis of differentiation factors in the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*. Tesis de grado, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Alemania.

Marlétaz, F., Peijnenburg, K. T. C. A., Goto, T., Satoh, N. y Rokhsar, D. S. (2019). A New Spiralian Phylogeny Places the Enigmatic Arrow Worms among Gnathiferans. *Curr. Biol.* 29, 312-318.e3. doi: 10.1016/j.cub.2018.11.042.

Marlow, H., Tosches, M. A., Tomer, R., Steinmetz, P. R., Lauri, A., Larsson, T. y col. (2014). Larval body patterning and apical organs are conserved in animal evolution. *BMC Biol.* 12, 7. doi: 10.1186/1741-7007-12-7.

Martín-Durán, J. M. y Egger, B. (2012). Developmental diversity in free-living flatworms. *Evodevo* 3, 1–22. doi: 10.1186/2041-9139-3-7.

Maule, A. G., Marks, N. J. y Day, T. A. (2006). “Signaling molecules and nerve-muscle function,” in *Parasitic Flatworms. Molecular Biology, Biochemistry, Immunology and Physiology*, ed. Maule, A.G., Marks, N. J. (CABI Publishing, Oxfordshire, UK), 369–386.

Molina, M. D. y Cebrià, F. (2021). Decoding stem cells: an overview on planarian stem cell heterogeneity and lineage progression. *Biomolecules* 11, 1532. doi: 10.3390/biom11101532.

Monjo, F. y Romero, R. (2015). Embryonic development of the nervous system in the planarian *Schmidtea polychroa*. *Dev. Biol.* 397, 305–319. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.10.021.

Montagne, J., Preza, M., Castillo, E., Brehm, K. y Koziol, U. (2019). Divergent Axin and GSK-3 paralogs in the beta-catenin destruction complexes of tapeworms. *Dev. Genes Evol.* 229. doi: 10.1007/s00427-019-00632-w.

Montagne, J., Preza, M. y Koziol, U. (2023). Stem cell proliferation and differentiation

- during larval metamorphosis of the model tapeworm *Hymenolepis microstoma*.  
*Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13, 1–16. doi: 10.3389/fcimb.2023.1286190.
- Morris, G. P. y Threadgold, L. T. (1968). Ultrastructure of the tegument of adult  
*Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 54, 15. doi: 10.2307/3276867.
- Morseth, D. J. (1967). Fine structure of the hydatid cyst and protoscolex of *Echinococcus*  
*granulosus*. *J. Parasitol.* 53, 312. doi: 10.2307/3276582.
- Newmark, P. A. y Sánchez Alvarado, A. (2000). Bromodeoxyuridine specifically labels the  
regenerative stem cells of planarians. *Dev. Biol.* 220, 142–153. doi:  
10.1006/dbio.2000.9645.
- Ogren, R. E. (1968). Characteristics for Two Classes of Embryonic Cells in Oncospheres of  
*Hymenolepis diminuta* Stained for Cytoplasmic Substances. *Trans. Am. Microsc. Soc.*  
87, 82. doi: 10.2307/3224340.
- Olson, P. D., Zarowiecki, M., James, K., Baillie, A., Bartl, G., Burchell, P. y col. (2018).  
Genome-wide transcriptome profiling and spatial expression analyses identify signals  
and switches of development in tapeworms. *Evodevo* 9, 21. doi: 10.1186/s13227-  
018-0110-5.
- Orrego, M. A., Verastegui, M. R., Vasquez, C. M., Garcia, H. H. y Nash, T. E. (2022).  
Proliferative cells in racemose neurocysticercosis have an active MAPK signalling  
pathway and respond to metformin treatment. *Int. J. Parasitol.* 52, 377–383. doi:  
10.1016/j.ijpara.2022.01.001.
- Orrego, M. A., Verastegui, M. R., Vasquez, C. M., Koziol, U., Laclette, J. P., Garcia, H. H. y  
col. (2021). Identification and culture of proliferative cells in abnormal *Taenia solium*  
larvae: Role in the development of racemose neurocysticercosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.*  
15, e0009303. doi: 10.1371/journal.pntd.0009303.
- Palmberg, I. (1990). Stem cells in microturbellarians. *Protoplasma* 158, 109–120. doi:  
10.1007/BF01323123.

- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B. L., Salazar, G. A. y col. (2023). InterPro in 2022. *Nucleic Acids Res.* 51, D418–D427. doi: 10.1093/nar/gkac993.
- Pellettieri, J., Fitzgerald, P., Watanabe, S., Mancuso, J., Green, D. R. y Sánchez Alvarado, A. (2010). Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration. *Dev Biol.* 338, 76–85.
- Peterson, K. J., Cameron, R. A. y Davidson, E. H. (1997). Set-aside cells in maximal indirect development: Evolutionary and developmental significance. *BioEssays* 19, 623–631. doi: 10.1002/bies.950190713.
- Pouchkina-Stantcheva, N. N., Cunningham, L. J., Hrčková, G. y Olson, P. D. (2013). RNA-mediated gene suppression and in vitro culture in *Hymenolepis microstoma*. *Int. J. Parasitol.* 43, 641–646. doi: 10.1016/j.ijpara.2013.03.004.
- Preza, M. (2021). Estudio de los diferentes roles que cumplen los neuropéptidos en el ciclo de vida del cestodo modelo *Hymenolepis microstoma*. Tesis de doctorado, Universidad de la República, Uruguay. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/36209>.
- Preza, M., Calvelo, J., Langleib, M., Hoffmann, F., Castillo, E., Koziol, U. y col. (2021a). Stage-specific transcriptomic analysis of the model cestode *Hymenolepis microstoma*. *Genomics* 113, 620–632. doi: 10.1016/j.ygeno.2021.01.005.
- Preza, M., Guarnaschelli, I., Castillo, E. y Koziol, U. (2021b). Inhibitors of protein kinases A and C impair the motility of oncospheres of the model tapeworm *Hymenolepis microstoma*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 246. doi: 10.1016/j.molbiopara.2021.111423.
- Preza, M., Montagne, J., Costábile, A., Iriarte, A., Castillo, E. y Koziol, U. (2018). Analysis of classical neurotransmitter markers in tapeworms: evidence for extensive loss of neurotransmitter pathways. *Int. J. Parasitol.* 48, 979–992. doi: 10.1016/J.IJPARA.2018.06.004.
- Preza, M., Van Bael, S., Temmerman, L., Guarnaschelli, I., Castillo, E. y Koziol, U. (2022). Global analysis of neuropeptides in cestodes identifies Attachin, a SIFamide homolog,

- as a stimulant of parasite motility and attachment. *J. Neurochem.* 162, 467–482. doi: 10.1111/jnc.15654.
- Prieto, D., Aparicio, G., Morande, P. E. y Zolessi, F. R. (2014). A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green. *Histochem. Cell Biol.* 142, 335–345. doi: 10.1007/s00418-014-1215-0.
- Reddien, P. W. (2018). The cellular and molecular basis for planarian regeneration. *Cell* 175, 327–345. doi: 10.1016/j.cell.2018.09.021.
- Reddien, P. W., Oviedo, N. J., Jennings, J. R., Jenkin, J. C. y Alvarado, A. S. (2005). SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science (80-. )*. 310, 1327–1330. doi: 10.1126/science.1116110.
- Rétaux, S. y Kano, S. (2010). Midline signaling and evolution of the forebrain in chordates: a focus on the lamprey hedgehog case. *Integr. Comp. Biol.* 50, 98–109. doi: 10.1093/icb/icq032.
- Reuter, M. y Kreshchenko, N. (2004). Flatworm asexual multiplication implicates stem cells and regeneration. *Can. J. Zool.* 82, 334–356. doi: 10.1139/z03-219.
- Robinow, S. y White, K. (1988). The locus *elav* of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons at all developmental stages. *Dev. Biol.* 126, 294–303. doi: 10.1016/0012-1606(88)90139-X.
- Rohde, K. (1994). The minor groups of parasitic Platyhelminthes. *Adv. Parasitol.* 33, 145–234. doi: 10.1016/S0065-308X(08)60413-3.
- Ross, K. G., Molinaro, A. M., Romero, C., Dockter, B., Cable, K. L., Gonzalez, K., et al. (2018). SoxB1 activity regulates sensory neuron regeneration, maintenance, and function in planarians. *Dev. Cell* 47, 331-347.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2018.10.014.
- Rozario, T., Quinn, E. B., Wang, J., Davis, R. E. y Newmark, P. A. (2019). Region-specific regulation of stem cell-driven regeneration in tapeworms. *Elife* 8, 1–23. doi: 10.7554/eLife.48958.

- Rybicka, K. (1967). "Embryogenesis in cestodes," in *Advances in Parasitology*, ed. B. Dawes (Academic Press), 107–186. doi: 10.1016/S0065-308X(08)60449-2.
- Rybicka, K. (1973). Ultrastructure of the embryonic syncytial epithelium in a cestode *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology* 66, 9–18. doi: 10.1017/S0031182000044395.
- Sakamoto, T. y Sugimura, M. (1970). Studies on echinococcosis XXIII: Electron microscopical observations on histogenesis of larval echinococcus multilocularis. *Jpn. J. Vet. Res.* 18, 131–144. doi: 10.14943/jjvr.18.3.131.
- Saló, E. y Baguña, J. (1985). Cell movement in intact and regenerating planarians. Quantitation using chromosomal, nuclear and cytoplasmic markers. *Development* 89, 57–70. doi: 10.1242/dev.89.1.57.
- Sato, K., Shibata, N., Orii, H., Amikura, R., Sakurai, T., Agata, K. y col. (2006). Identification and origin of the germline stem cells as revealed by the expression of nanos -related gene in planarians. *Dev. Growth Differ.* 48, 615–628. doi: 10.1111/j.1440-169X.2006.00897.x.
- Sauvé, D. M., Anderson, H. J., Ray, J. M., James, W. M. y Roberge, M. (1999). Phosphorylation-induced rearrangement of the histone H3 NH2-terminal domain during mitotic chromosome condensation. *J. Cell Biol.* 145, 225–235. doi: 10.1083/jcb.145.2.225.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T. y col. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019.
- Schneider, I. (1966). Histology of larval eye-antennal disks and cephalic ganglia of *Drosophila* cultured in vitro. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 15, 271–279. doi: 10.1242/dev.15.3.271.
- Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *Development* 27, 353–365. doi: 10.1242/dev.27.2.353.

- Scimone, M. L., Cote, L. E. y Reddien, P. W. (2017). Orthogonal muscle fibres have different instructive roles in planarian regeneration. *Nature* 551, 623–628. doi: 10.1038/nature24660.
- Scimone, M. L., Kravarik, K. M., Lapan, S. W. y Reddien, P. W. (2014). Neoblast specialization in regeneration of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Stem Cell Reports* 3, 339–352. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.06.001.
- Scimone, M. L., Srivastava, M., Bell, G. W. y Reddien, P. W. (2011). A regulatory program for excretory system regeneration in planarians. *Development* 138, 4387–4398. doi: 10.1242/dev.068098.
- Seidel, J. S. (1975). The life cycle in vitro of *Hymenolepis microstoma* (Cestoda). *J. Parasitol.* 61, 677–681. [www.jstor-org.proxy.timbo.org.uy:88/stable/3279462](http://www.jstor-org.proxy.timbo.org.uy:88/stable/3279462).
- Seidel, J. S. y Voge, M. (1975). Axenic development of cysticercoids of *Hymenolepis nana*. *J. Parasitol.* 61, 861–4. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1185425](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1185425).
- Shackney, S. E. y Ritch, P. S. (1987). “Percent labeled mitosis curve analysis,” in *Techniques in Cell Cycle Analysis*, ed. J W. Gray y Z. Darzynkiewicz (Humana Totowa, NJ), 31–45. doi: 10.1007/978-1-60327-406-7\_2.
- Simionato, E., Kerner, P., Dray, N., Le Gouar, M., Ledent, V., Arendt, D. y col. (2008). atonal- and achaete-scute-related genes in the annelid *Platynereis dumerilii*: Insights into the evolution of neural basic-Helix-Loop-Helix genes. *BMC Evol. Biol.* 8, 1–13. doi: 10.1186/1471-2148-8-170.
- Sluys, R., Kawakatsu, M., Riutort, M. y Baguñà, J. (2009). A new higher classification of planarian flatworms (Platyhelminthes, Tricladida). *J. Nat. Hist.* 43, 1763–1777. doi: 10.1080/00222930902741669.
- Smyth, J. D. (1990). *In vitro cultivation of parasitic helminths*. London: CRC Press doi: 10.1201/9780203711798.
- Smyth, J. D. y McManus, D. P. (1989). *The physiology and biochemistry of cestodes*.

Cambridge University Press doi: 10.1017/CBO9780511525841.

- Spiliotis, M., Lechner, S., Tappe, D., Scheller, C., Krohne, G. y Brehm, K. (2008). Transient transfection of *Echinococcus multilocularis* primary cells and complete in vitro regeneration of metacystode vesicles. *Int. J. Parasitol.* 38, 1025–1039. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.11.002.
- Swiderski, Z. (1983). *Echinococcus granulosus*: Hook-muscle systems and cellular organisation of infective oncospheres. *Int. J. Parasitol.* 13, 289–299. doi: 10.1016/0020-7519(83)90040-1.
- Świderski, Z., Miquel, J., Azzouz-Maache, S. y Pétavy, A.-F. (2018). *Echinococcus multilocularis* (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae): functional ultrastructure of the penetration glands and nerve cells within the oncosphere. *Parasitol. Res.* 117, 2653–2663. doi: 10.1007/s00436-018-5957-9.
- Takahashi, K. y Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Taylor, M. V. (2006). “Comparison of Muscle Development in *Drosophila* and Vertebrates,” in *Muscle Development in Drosophila*, ed. H. Sink (New York: Springer), 169–203. doi: 10.1007/0-387-32963-3\_14.
- Tixier, V., Bataillé, L. y Jagla, K. (2010). Diversification of muscle types: Recent insights from *Drosophila*. *Exp. Cell Res.* 316, 3019–3027. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.07.013.
- Toledo, A., Cruz, C., Fragoso, G., Laclette, J. P., Merchant, M. T., Hernandez, M. y col. (1997). In vitro culture of *Taenia crassiceps* larval cells and cyst regeneration after injection into mice. *J. Parasitol.* 83, 189–193. doi: 10.2307/3284437.
- Truman, J. W. (1990). Metamorphosis of the central nervous system of *Drosophila*. *J. Neurobiol.* 21, 1072–1084. doi: 10.1002/neu.480210711.
- Tsai, I. J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garcarrubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K. L. y

- col. (2013). The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 496, 57–63. doi: 10.1038/nature12031.
- Tyler, S. y Hooge, M. (2004). Comparative morphology of the body wall in flatworms (Platyhelminthes). *Can. J. Zool.* 82, 194–210. doi: 10.1139/z03-222.
- Ubelaker, J. E. (1980). “Structure and ultrastructure of the larvae and metacestodes of *Hymenolepis diminuta*,” in *Biology of the Tapeworm Hymenolepis diminuta*, ed. H. P. Arai (New York and London: Academic Press), 59–156. doi: 10.1016/B978-0-12-058980-7.50007-5.
- van Wolfswinkel, J. C., Wagner, D. E. y Reddien, P. W. (2014). Single-cell analysis reveals functionally distinct classes within the planarian stem cell compartment. *Cell Stem Cell* 15, 326–339. doi: 10.1016/j.stem.2014.06.007.
- Vasyutina, E., Lenhard, D. C. y Birchmeier, C. (2007). Notch function in myogenesis. *Cell Cycle* 6, 1450–1453. doi: 10.4161/cc.6.12.4372.
- Voge, M. (1964). Development of *Hymenolepis microstoma* (Cestoda: Cyclophyllidea) in the intermediate host *Tribolium confusum*. *J. Parasitol.* 50, 77. doi: 10.2307/3276032.
- Voge, M. (1967). “The post-embryonic developmental stages of cestodes,” in *Advances in Parasitology*, ed. B. Dawes (London: Academic Press), 247–297. doi: 10.1016/S0065-308X(08)60379-6.
- Voge, M. (1975). Axenic Development of Cysticercoids of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *J. Parasitol.* 61, 563. doi: 10.2307/3279351.
- Voge, M. y Graiwer, M. (1964). Development of Oncospheres of *Hymenolepis diminuta*, Hatched In vivo and In vitro, in the Larvae of *Tenebrio molitor*. *J. Parasitol.* 50, 267. doi: 10.2307/3276284.
- Voge, M. y Green, J. (1975). Axenic Growth of Oncospheres of *Hymenolepis citelli* (cestoda) to Fully Developed Cysticercoids. *J. Parasitol.* 61, 291–297. doi:

10.2307/3279007.

Wagner, D. E., Wang, I. E. y Reddien, P. W. (2011). Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science (80-. )*. 332, 811–816. doi: 10.1126/science.1203983.

Wang, B., Collins, J. J. y Newmark, P. A. (2013). Functional genomic characterization of neoblast-like stem cells in larval *Schistosoma mansoni*. *Elife* 2, 1–15. doi: 10.7554/eLife.00768.

Wang, B., Lee, J., Li, P., Saberi, A., Yang, H., Liu, C. y col. (2018). Stem cell heterogeneity drives the parasitic life cycle of *Schistosoma mansoni*. *Elife* 7, 1–23. doi: 10.7554/eLife.35449.

Wang, I. E., Lapan, S. W., Scimone, M. L., Clandinin, T. R. y Reddien, P. W. (2016). Hedgehog signaling regulates gene expression in planarian glia. *Elife* 5. doi: 10.7554/eLife.16996.

Webb, R. A. y Davey, K. G. (1975). The gross anatomy and histology of the nervous system of the metacestode of *Hymenolepis microstoma*. *Can. J. Zool.* 53, 661–677. doi: 10.1139/z75-081.

Wendt, G. R., Collins, J. N. R., Pei, J., Pearson, M. S., Bennett, H. M., Loukas, A. y col. (2018). Flatworm-specific transcriptional regulators promote the specification of tegumental progenitors in *Schistosoma mansoni*. *Elife* 7, 1–24. doi: 10.7554/eLife.33221.

Wendt, G., Zhao, L., Chen, R., Liu, C., O'Donoghue, A. J., Caffrey, C. R. y col. (2020). A single-cell RNA-seq atlas of *Schistosoma mansoni* identifies a key regulator of blood feeding. *Science (80-. )*. 369, 1644–1649. doi: 10.1126/science.abb7709.

Wikgren, B.-J. y Gustafsson, M. S. (1967). Duration of the cell cycle of germinative cells in plerocercoids of *Diphyllobothrium dendriticum*. *Zeitschrift fur Parasitenkd.* 29, 275–281. doi: 10.1007/BF00260183.

- Wikgren, B.-J., Gustafsson, M. S. y Knuts, G. (1971). Primary anlage formation in diphyllbothriid tapeworms. *Zeitschrift für Parasitenkd.* 36, 131–139. doi: 10.1007/BF00259584.
- Wikgren, M. C. (1986). The nervous system of early larval stages of the cestode *Diphyllbothrium dendriticum*. *Acta Zool.* 67, 155–163. doi: 10.1111/j.1463-6395.1986.tb00859.x.
- Wilson, V. C. L. C. y Schiller, E. L. (1969). The neuroanatomy of *Hymenolepis diminuta* and *H. nana*. *J. Parasitol.* 55, 261. doi: 10.2307/3277387.
- Witchley, J. N., Mayer, M., Wagner, D. E., Owen, J. H. y Reddien, P. W. (2013). Muscle cells provide instructions for planarian regeneration. *Cell Rep.* 4, 633–641. doi: 10.1016/j.celrep.2013.07.022.
- Wurtzel, O., Oderberg, I. M. y Reddien, P. W. (2017). Planarian epidermal stem cells respond to positional cues to promote cell-type diversity. *Dev. Cell* 40, 491-504.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2017.02.008.
- Wyss, L. S., Bray, S. R. y Wang, B. (2022). Cellular diversity and developmental hierarchy in the planarian nervous system. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 76, 101960. doi: 10.1016/j.gde.2022.101960.
- Zeng, A., Li, H., Guo, L., Gao, X., McKinney, S., Wang, Y. y col. (2018). Prospectively isolated tetraspanin+ neoblasts are adult pluripotent stem cells underlying planaria regeneration. *Cell* 173, 1593-1608.e20. doi: 10.1016/j.cell.2018.05.006.
- Zhu, H., Hasman, R. A., Barron, V. A., Luo, G. y Lou, H. (2006). A nuclear function of Hu proteins as neuron-specific alternative RNA processing regulators. *Mol. Biol. Cell* 17, 5105–5114. doi: 10.1091/mbc.e06-02-0099.