



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



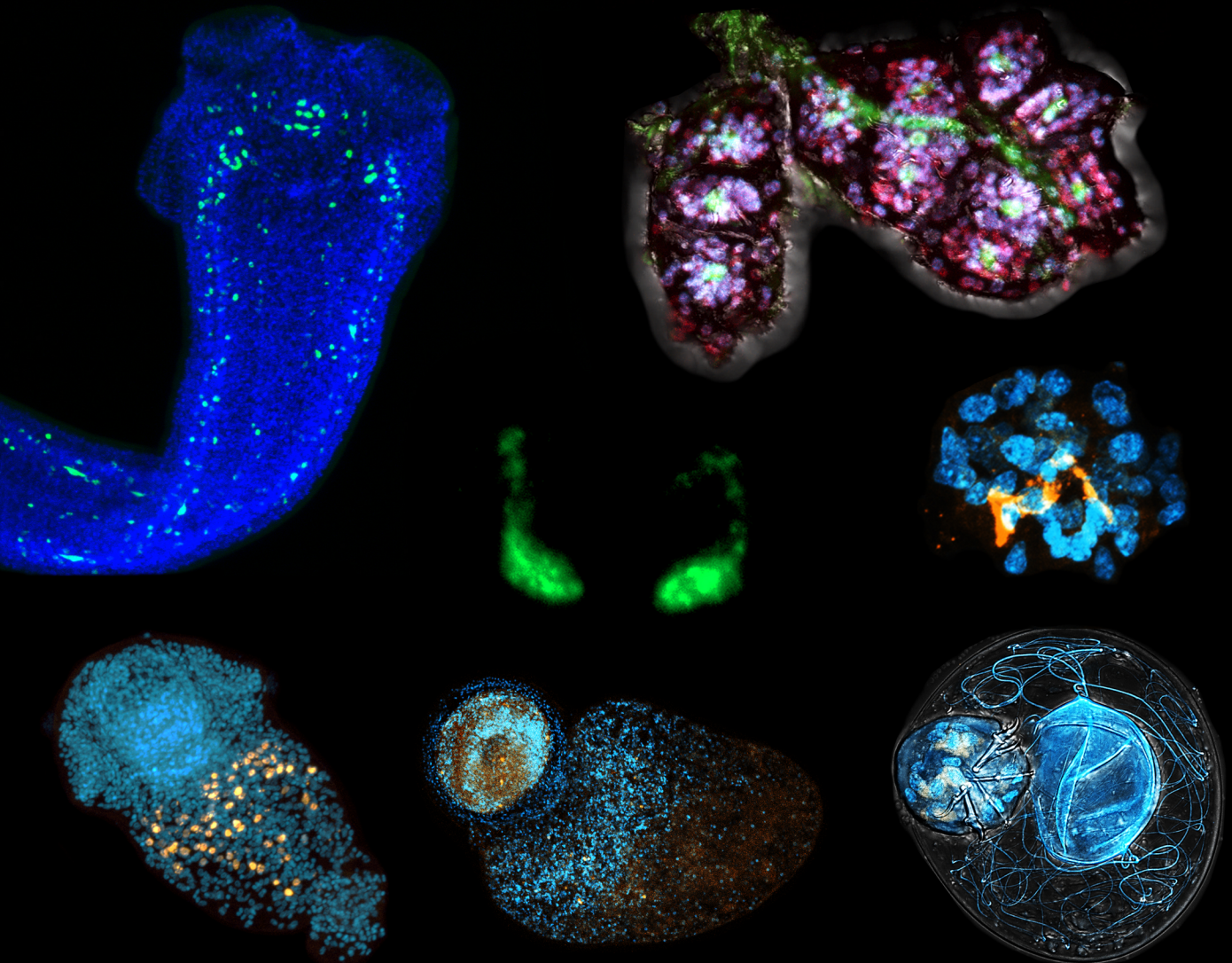
FACULTAD DE  
**CIENCIAS**

UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)

Tesis de Doctorado PEDECIBA-Biología

# Estudio de los diferentes roles que cumplen los Neuropéptidos en el ciclo de vida del cestodo modelo *Hymenolepis microstoma*

Lic. Matías Preza Pérez



Tribunal:

Dra. Cecilia Fernández

Dr. Flavio Zolessi

Dr. Héctor Romero

Orientadores:

Dr. Uriel Koziol

Dra. Estela Castillo

## **Agradecimientos.**

Tal vez me extienda un poco en esto, pero realmente es necesario, esta tesis es el trabajo de varios años, pero en los que no estuve solo, mucha gente estuvo presente y es la oportunidad de darles las gracias por su ayuda para llegar a este momento.

Primero que nada, quiero agradecer a mis tutores, la verdad que no podría haber tenido mejor combinación de orientadores en esta etapa. Gracias Uriel, por aceptarme como tu estudiante cuando recién volvías de Alemania y enseguida mostrarme caminos a seguir para hacer mi posgrado, gracias por ese conocimiento de la Biología que puede superar ciertos límites inesperados en una persona que motiva a querer autosuperarse, por tener siempre una respuesta ante las dificultades y enseñarme cada día algo nuevo. Gracias Estela, por rescatarme cuando en los pasillos de facultad te diste cuenta que yo estaba perdido y me invitaste a trabajar contigo en lo que resultó ser el mejor grupo de investigación, siempre mostrándome que yo podía dar más, también gracias por contagiarme tu espíritu de lucha, que me hizo involucrarme de a poco en diferentes aspectos de la ciencia más allá de la mesada. A los dos, gracias por siempre hablarme de frente, por la horizontalidad cuando tuvieron que ponerme un freno y por la confianza cuando me dieron más libertad, y también por bancarme en los momentos complicados dentro y fuera del laboratorio. Gracias a ustedes tengo claro hacia donde quiero seguir creciendo en el mundo de la ciencia.

A los miembros del Tribunal, Cecilia Fernández, Héctor Romero y Flavio Zolessi, por dedicarle parte de su tiempo a la corrección de esta tesis en plena emergencia sanitaria, cursos y demás cosas.

También a los integrantes de mi CAS, a Gustavo Salinas y nuevamente a Héctor Romero y Flavio Zolessi por acompañarme en su rol de CAS durante estos años. A Gustavo, en particular por permitirme el acceso al WormTracker para los ensayos de motilidad de tetratiridios. Y en esta parte me gustaría agradecer especialmente a Flavio, que ha estado presente de una forma u otra a lo largo desde casi el comienzo de mi carrera, en mi primer proyecto de investigación, evaluando proyectos, siendo parte de mi CAS, del Tribunal y siendo un gran encargado de la Sección de Biología Celular de Facultad de Ciencias, donde trabajo ya hace algunos años.

Al PEDECIBA por ser ese tipo de programa de posgrado que te hace sentir parte de un todo más grande, una familia académica que lucha por el bien común y por resolver infinidad de incógnitas del mundo desde este lugarcito del mundo.

A Jenny Saldaña y a todo el equipo del LEA de Facultad de Química, que siempre estuvieron ahí para cada intercambio, desde el comienzo, trabajando en conjunto para mantener el ciclo de vida de *Hymenolepis*, y compartir la pasión por la investigación de la Biología de estos parásitos.

A Andrés Iriarte y a todos los integrantes del Laboratorio de Biología Computacional del Instituto de Higiene, por recibirme con la mejor energía para poder hacer todos los

análisis transcriptómicos por allí y mostrarse afines a ayudarme con las dudas que tuviera durante y también luego de la pasantía que realicé con ustedes.

Gracias a los compañeros de la Sección de Bioquímica. A Fer por hacer los primeros experimentos al lado mío. A Ali por siempre estar para dar una mano y hacer magia en bioinformática. A Manu y Ana por perdonarme cuando los volví locos por el lab más de una vez. A Juli, claro que a Juli, que es la mejor incorporación que el 313 podía tener, con tremenda energía para hacer mil experimentos en paralelo, sin volverse loca, y sobre todo por su gigante amistad. A César por concursar conmigo en la sección, por ser un gran competidor y ganador, priorizando siempre a lo humano en el cruel sistema de concursos de Fcien. A Vale por ser la mejor compañera delegada en el PEDECIBA, lugar desde el cual aprendimos un montón y donde dejamos un montón de energía juntos. Claro que a todos los compañeros del 313 y de la Sección Bioquímica: Juan, Vivi, Lore, Mauri, Marcos, Stefy, Bea, Cami, Tania... y no sigo porque si los nombro a todos se me va más largo los agradecimientos que la tesis, que sección grande.

A los compañeros de la Sección de Biología Celular, por el día a día con los experimentos y los intercambios académicos... pero a quien engaño, también por los gloriosos English Day, los pingpongs y otros detalles. A Cami, que desde 2010 me banca en Fcien, y desde ese año todos sabemos va a llegar hasta donde quiera. A Jime por ayudarnos a mí y a Cami cuando preparábamos aquel concurso de celular que ella también daba y valoró más enseñarnos que sacar ventaja de estar ahí desde antes. A Gonza, por la competencia infinita, desde dardos y pool, hasta un concurso de la sección que me hizo crecer muchísimo. A Lu, por las carreras de bici y la mirada crítica a la sociedad que te hacen pensar que no todo está perdido. A Inés, que fue de mis mejores estudiantes y ahora es de las mejores compañeras de lab, de esa gente que te hace decir ¿cómo era antes que llegara por acá? Y claro que a todos los integrantes del piso 7 de Fcien.

A mis amigos, gracias por bancarme siempre: Fede, Mari, Meli, Nico, Fran, Facu, Gabi, Ana, Nico, Lore, a Vivi también por ayudarme con la carátula y a Sofi por la compañía en el confocal y ayudarme con varias fotos. Claro que también a Marc, gran responsable de la próxima aventura científica para los próximos años. Y sin dudas a Indy, que tuve la suerte de cruzar mi camino con el de ella hace un tiempito y desde ahí es todo lo que está bien, no sé dónde estaba hoy mi cabeza sin vos este último tiempo.

Por último, a mi familia, a toda mi familia, a todos y cada uno de ellos, sobre todo a Dani, la incondicional, de la que estoy seguro y feliz no voy a estar realmente lejos nunca. Y finalmente a mis viejos, que de una forma u otra siempre estuvieron ahí, en cada paso, cada curso, cada examen, cada congreso, cada resultado y cada página de esta tesis, ¡Lo logramos!

**¡Gracias!**

# Índice.

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	3
Generalidades de los cestodos.....	3
Hymenolepis microstoma como organismo modelo.....	7
Generalidades de los Neuropeptidos.....	11
Neuropeptidos en platelmintos.....	17
Hipótesis y Objetivos.....	26
Hipótesis del trabajo.....	26
Objetivo general.....	26
Objetivos específicos.....	26
<b>Resultados</b> .....	27
Capítulo 1: “Análisis de marcadores de neurotransmisión clásica en cestodos: evidencia de una pérdida amplia de vías de neurotransmisores.....	27
Capítulo 2: “Análisis transcriptómico de los diferentes estadios del ciclo de vida del cestodo modelo <i>Hymenolepis microstoma</i> ”.....	56
Capítulo 3. Estudio de la expresión de genes implicados en las diferentes vías de neurotransmisión en el ciclo de vida de <i>H. microstoma</i> .....	82
Capítulo 4. El estadio adulto: expresión de los sistemas de comunicación neuropeptidérgicos en este estadio y su cultivo <i>in vitro</i> .....	96
Capítulo 5. La oncósfera, primer estadio larval: expresión de neuropeptidos en este estadio reducido y ensayos de motilidad.....	131
Capítulo 6. Resultados obtenidos para metacestodos: cisticercoides de <i>Hymenolepis microstoma</i> y tetratiridios de <i>Mesocestoides corti</i> .....	159
<b>Discusión y Perspectivas</b> .....	182
Identificación de componentes moleculares involucrados en la neurotransmisión en el genoma de <i>H. microstoma</i> y cestodos en general.....	182
Expresión de vías de neurotransmisión clásicas y peptidérgicas en el ciclo de vida de <i>H. microstoma</i> .....	184
Cultivo in vitro de adultos y cisticercoides.....	196

Efecto de drogas y neuropéptidos en el crecimiento y proliferación de cisticercoides.....	198
Ensayos funcionales: Estudio del efecto sobre la motilidad de oncósferas.....	200
Ensayos funcionales: estudios sobre la motilidad en cisticercoides y tetratiridios.....	205
Síntesis.....	209
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>211</b>
1- Obtención y mantenimiento del material parasitario.....	211
Mantenimiento del ciclo de vida de <i>Hymenolepis microstoma</i> .....	211
Aislamiento de huevos (con oncósferas).....	211
Obtención de cisticercoides y adultos.....	212
2- Técnicas de Biología Celular y Molecular.....	212
Consideraciones generales para el trabajo con ARN.....	212
Extracción de ARN.....	213
Diseño de cebadores.....	214
RT-PCR semicuantitativa.....	218
Generación de sondas de ARN marcadas con digoxigenina para hibridación <i>in situ</i> .....	219
Hibridación <i>in situ</i> fluorescente <i>in toto</i> (WMISH).....	220
Tinciones nucleares.....	220
Detección por Inmunohistofluorescencia (IHF).....	221
Detección de EdU.....	221
Obtención y Análisis de imágenes de microscopía.....	221
Detección por peptidómica de neuropéptidos.....	222
3- Métodos de cultivo de parásitos.....	223
Activación de cisticercoides.....	223
Cultivo de cisticercoides.....	223
Drogas Utilizadas en los ensayos <i>in vitro</i> .....	225
Análisis del efecto de drogas sobre la proliferación celular en cisticercoides.....	226
Neuropéptidos utilizados en ensayos <i>in vitro</i> .....	226

Análisis del efecto de neuropéptidos sobre la proliferación de cisticercoides tras la activación .....	227
Efectos de Neuropéptidos sobre el crecimiento de cisticercoides en cultivo .....	228
Cultivo de adultos y experimentos de pulso y caza con EdU .....	228
Activación de oncósferas .....	228
Ensayos de motilidad de oncósferas .....	229
Ensayos de motilidad de cisticercoides .....	230
Ensayos de motilidad utilizando <i>Mesocostoides corti</i> .....	230
<b>Bibliografía</b> .....	<b>232</b>
<b>Apéndice 1: RT-PCR semicuantitativa</b> .....	<b>269</b>
<b>Apéndice 2: Hibridación <i>in situ in toto</i> (Whole-mount <i>in situ</i> hybridization, WMISH)</b> .....	<b>271</b>
<b>Apéndice 3: Generación de sonda marcada con DIG-UTP y cuantificación de marca por DotBlot, para WMISH</b> .....	<b>279</b>
<b>Apéndice 4: Inmunohistofluorescencia sobre criocortes</b> .....	<b>281</b>
<b>Apéndice 5: Inmunohistofluorescencia <i>in toto</i>, sobre oncósferas activadas</b> .....	<b>282</b>
<b>Apéndice 6: Activación y Cultivo de cisticercoides</b> .....	<b>284</b>
<b>Apéndice 7: Activación de oncósferas con Homogeneizador</b> .....	<b>286</b>
<b>Apéndice 8: Conteo de Núcleos Manual</b> .....	<b>287</b>
<b>Apéndice 9: Cuantificación Movimiento cisticercoides activados por videos de corta duración</b> .....	<b>288</b>

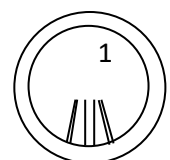
## Resumen.

Los platelmintos parásitos son organismos de gran importancia a nivel sanitario y económico. Dentro de estos parásitos, los cestodos son un subgrupo, los cuales presentan ciclos de vida complejos que pueden involucrar a varios hospederos. A lo largo de su ciclo de vida se identifican tres estadios bien diferenciados: oncósfera (primer estadio larvario), metacestodo (segundo estadio larvario) y adulto.

Los sistemas de neurotransmisión de los platelmintos parásitos son considerados posibles blancos para el desarrollo de nuevos fármacos contra estos organismos. En este trabajo se indagó en la presencia de sistemas de neurotransmisión clásica y neuropeptidérgica en el ciclo de vida de cestodos, utilizando a *Hymenolepis microstoma* como modelo de estudio. Se buscaron genes relacionados a estas vías de señalización en el genoma de *H. microstoma* y otros platelmintos parásitos por métodos bioinformáticos, demostrando la pérdida evolutiva de algunos sistemas de neurotransmisión clásica en cestodos como ser dopamina, octopamina, tiramina, histamina y GABA. Por otro lado, se demostró la presencia de los genes necesarios para las vías serotoninérgicas, colinérgicas y glutamatérgicas. Además, nuestro grupo describió previamente una gran cantidad de genes de neuropéptidos en el genoma de *H. microstoma*, muchos de los cuales fueron validados mediante peptidómica y utilizados como base para el estudio de estos sistemas en esta tesis.

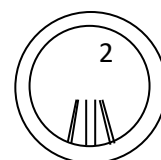
Se detectó mediante análisis transcriptómicos, RT-PCR e hibridación *in situ* fluorescente la expresión diferencial de genes relacionados a las vías de neurotransmisión clásica y peptidérgica en los diferentes estadios del ciclo de vida de *H. microstoma*. En el estadio adulto se identificó la expresión de genes marcadores de cada una de estas vías en forma localizada al sistema nervioso. En cambio, en el estadio de oncósfera, sumamente reducido en tamaño y morfología, sólo existe expresión de marcadores glutamatérgicos y peptidérgicos. En particular nuestros resultados sugieren que existen solamente dos a tres células peptidérgicas en la oncósfera, en donde detectamos la expresión de un nuevo neuropéptido específico de este estadio.

Se realizaron estudios funcionales *in vitro* para analizar a los sistemas de comunicación peptidérgicos, mediante el agregado de neuropéptidos sintetizados químicamente y de drogas que afectan las vías de señalización de segundos mensajeros que estos sistemas comunmente utilizan. Los estudios funcionales consistieron en estudios de motilidad de oncósferas y metacestodos activados de *H. microstoma*, y de larvas de *Mesocestoides corti* (otro cestodo modelo). Comprobamos que la motilidad de estas larvas es afectada por inhibidores de las vías de proteínas quinasas A y C, y se detectó que el



neuropéptido denominado Npp-33 (homólogo del neuropéptido SIFamida descrito en otros animales) promueve la motilidad de las larvas *in vitro*. También se realizaron estudios de los efectos de los neuropéptidos sintéticos sobre el crecimiento y desarrollo de los metacestodos activados de *H. microstoma* en cultivos *in vitro*, en donde se obtuvieron resultados preliminares que sugieren un rol regulatorio de la proliferación celular por parte de los sistemas neuropeptidérgicos.

El trabajo realizado durante esta tesis permitió un amplio estudio de los sistemas de comunicación neuropeptidérgica en las diferentes etapas del ciclo de vida de los cestodos, utilizando a *H. microstoma*, que permitió introducir en Uruguay a un organismo novedoso en esta área de estudio.



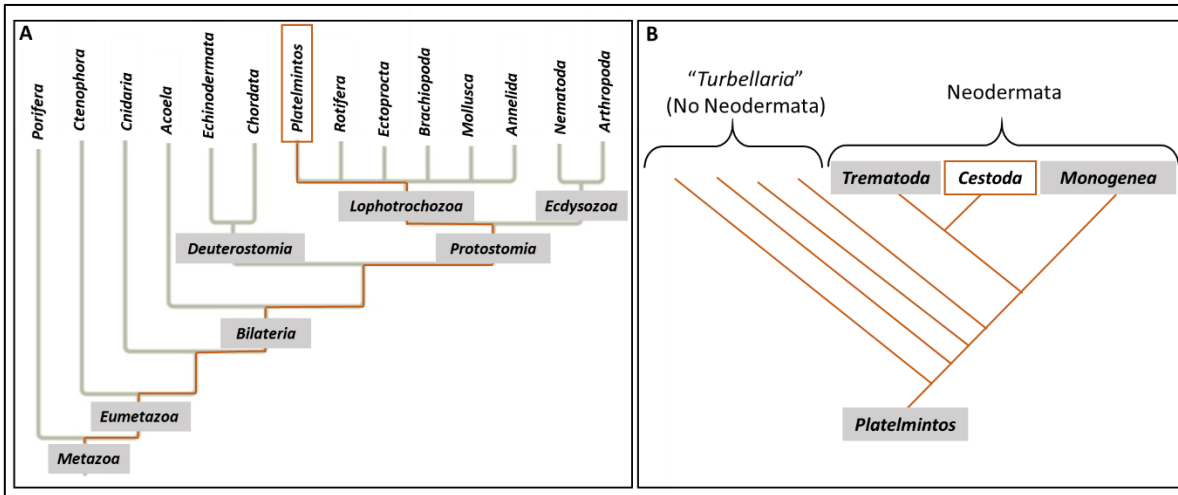


## Introducción.

### - Generalidades de los cestodos:

Los platelmintos, también llamados gusanos planos, son un grupo de animales que comprende tanto organismos de vida libre como así también parásitos. Los platelmintos pertenecen a los protostomados, un gran grupo de animales invertebrados que es uno de los dos grandes grupos que dividen a los denominados animales bilaterales (organismos con simetría bilateral). Dentro de los protostomados existen dos grandes grupos: ecdysozoa y lophotrochozoa, en el primero se agrupan (entre otros filos) los artrópodos y los nemátodos, mientras que en el segundo se encuentra, junto a otros grupos, a moluscos, anélidos y a los platelmintos [1,2]. En la **Figura I.1** se muestra una filogenia con la disposición de estos grupos en el árbol evolutivo.

Dentro de los platelmintos, existe un clado compuesto exclusivamente por animales parásitos, este grupo recibe el nombre de Neodermata [3], nombre dado por el tegumento, o *neodermis*, que recubre a estos organismos, siendo un sincitio celular especializado de gran importancia para su vida como parásitos. En la **Figura I.1 B** puede observarse un árbol filogenético simplificado de los platelmintos, en donde se muestran a los tres grandes grupos dentro de Neodermata: Monogéneos, Tremátodos y Cestodos. En este trabajo nos enfocaremos en los cestodos, un grupo de platelmintos parásitos con ciclos de vida complejos. La variedad de especies de cestodos es tan grande, que se ha postulado que para prácticamente todas las especies de vertebrados conocidas existe una especie de cestodo que la puede parasitar [4]. Por estas razones los cestodos son responsables de problemas sanitarios y económicos en todo el mundo, ya que tanto el humano como los animales domésticos pueden verse afectados por estos parásitos. Existen estudios previos en Uruguay, por ejemplo, que muestran el impacto económico del cestodo *Echinococcus granulosus*. Este cestodo causaba, en el año 2000, un costo total de 2,9 a 22 millones de dólares americanos por año en nuestro país [5]. Por otro lado, las enfermedades causadas por estos organismos representan a algunas de las llamadas “enfermedades desatendidas”, ya que infectan en mayor medida a la población mundial vulnerable (niveles altos de pobreza, junto a escasos hábitos de higiene y procesamiento de sus alimentos). Las escasas opciones terapéuticas que hoy en día existen contra estos parásitos, junto a evidencias de resistencia frente a las drogas actuales mostradas por algunas especies de cestodos y de otros platelmintos parásitos [6,7] da cuenta de la urgencia de conocer más sobre la biología de estos animales, para a través de un mejor entendimiento de la misma desarrollar nuevas alternativas terapéuticas para enfrentar a las enfermedades que generan.



**Figura I.1. Localización de los cestodos en el árbol evolutivo de los animales. A,** se muestra un árbol filogenético simplificado, en donde se destaca la localización de los platelmintos en el árbol evolutivo de los Metazoa. **B,** árbol filogenético simplificado de los platelmintos, en donde se observa al grupo monofilético de platelmintos parásitos Neodermata y a los tres grupos de animales que lo componen; por otro lado se muestran a los "No Neodermata" comúnmente llamados "*Turbellaria*", aunque este término carece en la actualidad de soporte evolutivo y se ha convertido en meramente descriptivo.

Los cestodos generalmente parasitan a más de un hospedero a lo largo de su ciclo de vida, en el cual tienen tres etapas bien marcadas: oncósfera, metacestodo y adulto [8]. El ciclo comienza con los huevos, que contienen a la oncósfera, una larva reducida en tamaño y morfología (de unos 30  $\mu\text{m}$ ), la cual posee 6 ganchos que le da el nombre alternativo de hexacanto y que utiliza para fijarse y atravesar el tubo digestivo. Los ganchos pueden moverse por estar acoplados a un sistema muscular, que se cree es coordinado por un sistema nervioso (SN) reducido, descrito en algunas especies por la presencia de únicamente un par de células nerviosas [9], aunque la identidad de éstas células como células nerviosas aún no ha sido debidamente confirmada. Al ingresar en el hospedero apropiado, la oncósfera sufre un proceso de metamorfosis en el que se dan cambios morfológicos profundos, generando tejidos *de novo* para así alcanzar el estadio de metacestodo (segundo estadio larvario). El metacestodo generalmente se encuentra enquistado y quiescente. En este estadio puede darse reproducción asexual de las larvas, aunque esto se da en unas pocas especies de cestodos, como *Echinococcus spp.*, siendo un proceso atípico [10]. Al ser ingerido por el hospedero definitivo, el metacestodo tiene una forma similar a la del escólex del adulto, con los órganos de fijación característicos de cada especie, sin presentar aún la típica segmentación ni el desarrollo del aparato reproductor, estructuras que son generadas post-implantación. El adulto está formado por un extremo anterior, el escólex, con órganos de fijación al hospedador, compuesto generalmente por cuatro ventosas y una corona de ganchos (rostelo). El escólex es seguido por una cadena de segmentos (o proglótides) cada uno de los cuales desarrolla los sistemas de reproducción

tanto masculino como femenino completos, denominada la estróbila. La región inmediatamente posterior al escólex (llamada cuello o región germinativa) genera proglótides continuamente, por lo que las proglótides nuevas, las más inmaduras, son las más cercanas al escólex y las más alejadas las más desarrolladas. Recientemente se ha demostrado, en el cestodo *Hymenolepis diminuta*, que las células diferenciadas de la región anterior del cuello proveen de un nicho para el mantenimiento de la capacidad de las células madre inmediatamente posteriores, para que formen segmentos en forma continua, siendo requerida la presencia de un escólex para mantener el estado indiferenciado [11]. En los proglótides más desarrollados se genera por reproducción sexual la formación de nuevos huevos que contienen oncósferas. Estos huevos serán liberados en las fecas, para ser ingeridos nuevamente por un hospedero intermediario, completando el ciclo.

En el estadio adulto existe un SN formado por dos ganglios cerebroideos ubicado en el escólex, unidos por una comisura central, junto a otros ganglios asociados al rosetelo, y varios cordones nerviosos longitudinales que se extienden a lo largo de todo el cuerpo. Dentro de los cordones nerviosos existen dos cordones nerviosos laterales principales, y junto a estos cordones se encuentran otros dos cordones nerviosos laterales a cada lado, uno ventral y uno dorsal, al conjunto de todos estos cordones los denominaremos en conjunto como cordones nerviosos laterales. En la parte media se encuentra adicionalmente un par de cordones mediales ventrales y otro par de cordones dorsales, a los que denominaremos en conjunto como cordones nerviosos mediales. Finalmente, estos cordones longitudinales se conectan por fibras nerviosas transversales (FNT) que conectan los cordones de un lado a otro (**Figura 1.2**). Esto genera un aspecto simétrico del SN de los cestodos, tanto en el eje izquierda derecha como en el sentido dorso-ventral de la pared corporal y de los músculos que inervan, que también son simétricos [12]. No es simétrica, en cambio, la inervación del aparato reproductor, en forma relacionada a la asimetría de estos aparatos.

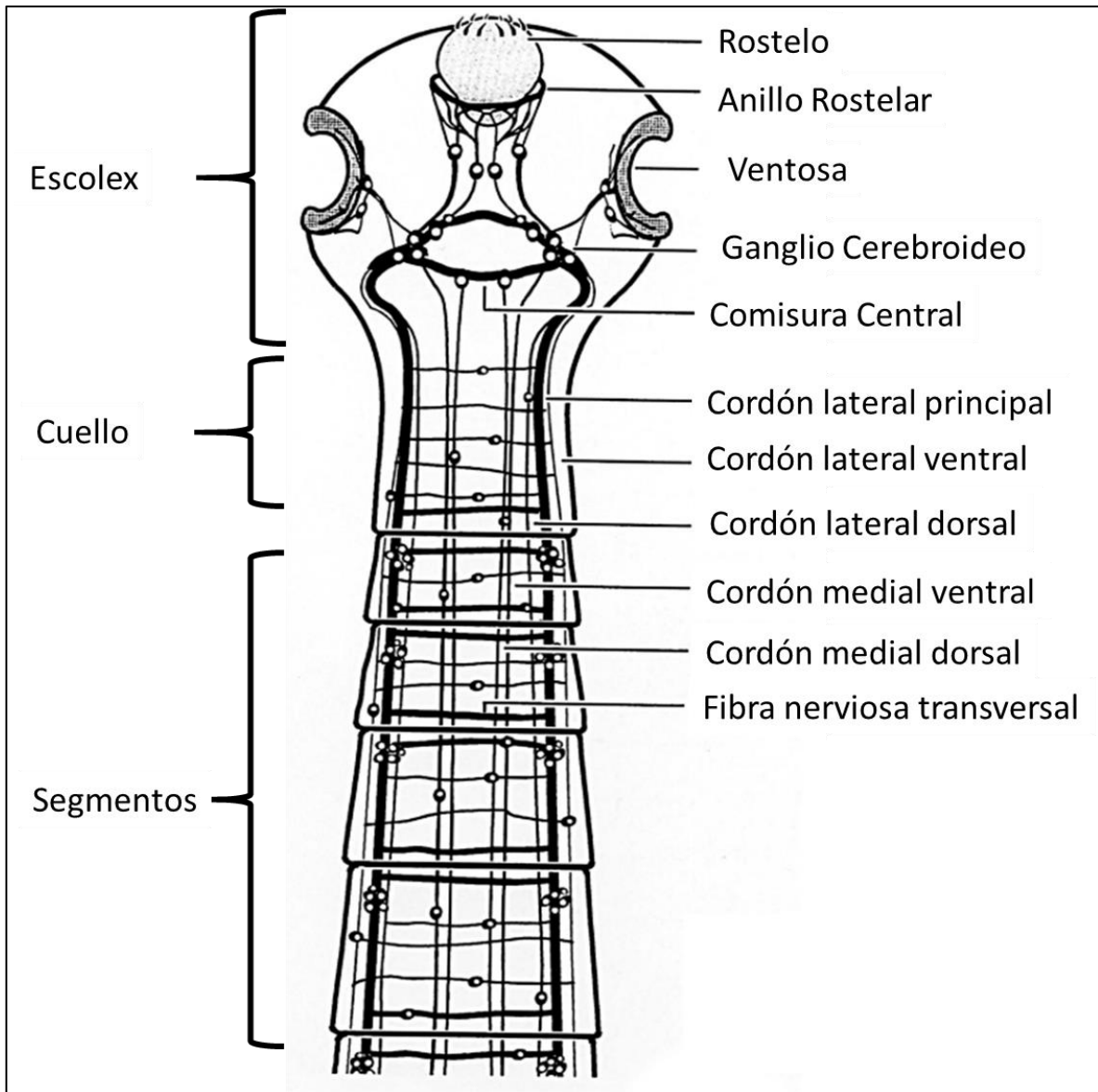


Figura 1.2. Sistema nervioso de un cestodo adulto. Modificado de Halton & Maule, 2006 [12].

Dentro de las especies de cestodos que causan las enfermedades más graves encontramos a *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus granulosus* y *Taenia solium*. Estas especies son difíciles de estudiar directamente por tener condiciones de mantenimiento demandantes, tanto del punto de vista de bioseguridad, como de sus costos asociados a la infección, en algunos estadios, en animales de gran porte. Por este motivo, otras especies de cestodos han sido tomadas como modelos de estudio para indagar en la biología básica de estos parásitos. Idealmente, los modelos a utilizar deben ser cercanos filogenéticamente a los organismos de interés, este es el caso de *Hymenolepis microstoma* y *Mesocestoides corti* que pertenecen al orden ciclofilidea. Este orden de cestodos terrestres, incluye a

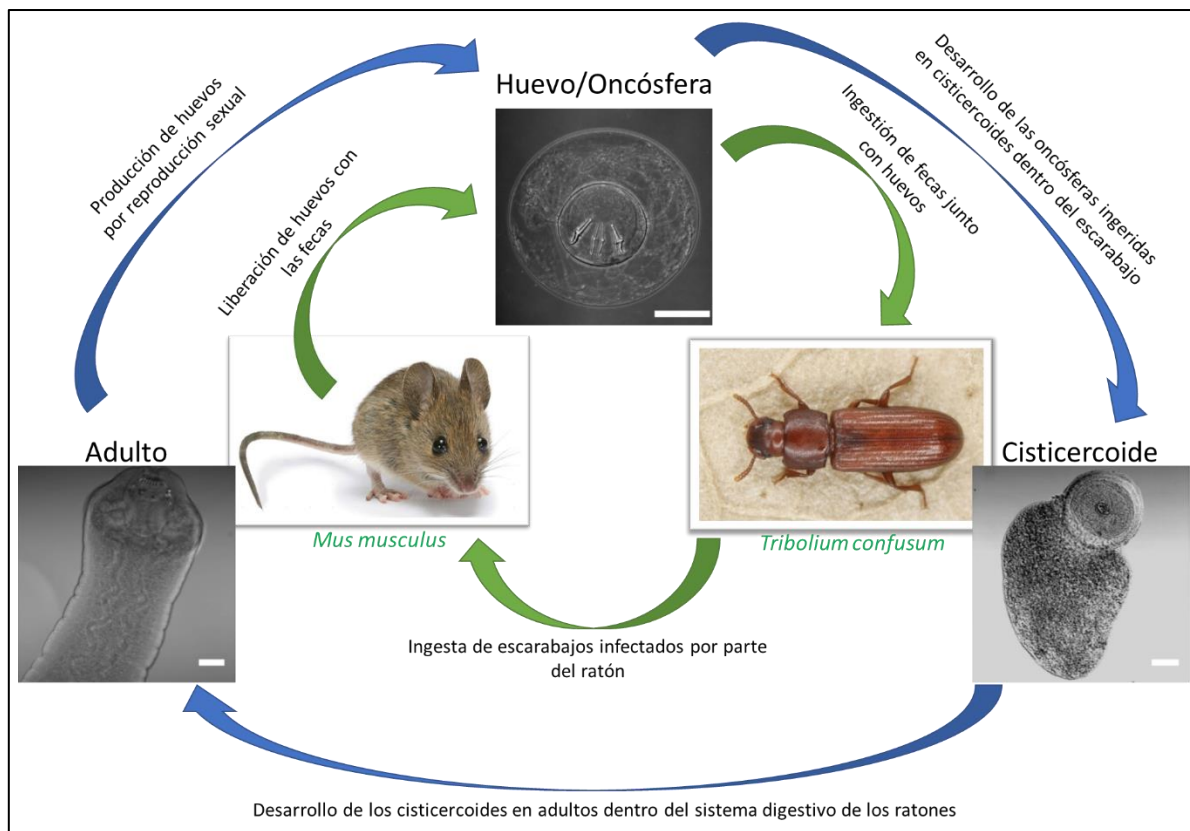
*Taeniidae* (en donde se encuentran las especies antes mencionadas que producen infecciones graves) y otras especies de importancia sanitaria y/o veterinaria. En Uruguay se ha utilizado previamente a *M. corti* como modelo de estudio de cestodos ciclofilídeos [13–16]. *M. corti* genera infecciones en ratón en su forma de metacestodo (llamada tetratiridios en esta especie), generando una gran cantidad de material biológico para trabajar, lo cual es una de sus grandes ventajas. Por otro lado, una de las principales limitaciones de *M. corti*, es que no es posible acceder fácilmente a todas las etapas de su ciclo de vida en condiciones de laboratorio, incluso uno de los hospederos de su complejo ciclo de vida sigue sin ser identificado [17]. Otro modelo de estudio de cestodos ciclofilídeos, que sí permite fácilmente el acceso a todas las etapas de su ciclo de vida, es *H. microstoma*, comúnmente llamado “Tenia de ratón”, el cual se ha implementado de forma relativamente reciente para su estudio en nuestro laboratorio y nuestro país. *H. microstoma* es el cestodo principalmente utilizado en el presente trabajo, y los detalles de este organismo se describen a continuación.

#### **- *Hymenolepis microstoma* como organismo modelo:**

*Hymenolepis microstoma* es un modelo muy completo para el estudio de la biología de los cestodos, presentando varias ventajas para su uso en investigación [18]. Desde el punto de vista de bioseguridad, se destaca que este organismo no causa infecciones en humanos, salvo casos excepcionales, más específicamente un reporte de cuatro personas en Australia con una coinfección con *Hymenolepis nana* [19]. Por otro lado, es posible acceder a todas las etapas de su ciclo de vida de forma sencilla, dado que sus hospederos naturales son de fácil mantenimiento en el laboratorio. El ciclo de vida de *H. microstoma* tiene dos hospederos, el hospedero intermediario es el escarabajo de la harina, *Tribolium confusum* (aunque también pueden utilizarse escarabajos *T. castaneum*, *Tenebrio molitor*, y *Oryzaephilus surinamensis*), y el hospedero definitivo es el ratón, *Mus musculus*, ambos relativamente fáciles de mantener desde el punto de vista logístico y económico. Su ciclo de vida presenta tres etapas principales: la oncósfera (primer estadio larval), el metacestodo (segundo estadio larval, llamado cisticercoide en esta especie) y el adulto (la etapa en la que se producen órganos reproductores y que por reproducción sexual genera los huevos que contienen nuevas oncósferas), un esquema de este ciclo de vida puede observarse en la **Figura I.3**. En la naturaleza, los ratones ingieren a un escarabajo infectado con cisticercoides de *H. microstoma*. El cisticercoide completamente desarrollado en su forma enquistada tiene un tamaño de unos 500  $\mu\text{m}$ , aunque puede seguir creciendo hasta unos 3 mm si tiene suficiente espacio, y persiste mucho tiempo dentro de los escarabajos (hasta que estos mueren). Al ingresar al sistema digestivo del ratón los cisticercoides se

activan, este proceso consiste en la degradación de los tejidos protectores de esta larva enquistada, y la salida, desde una zona denominada cápsula, del cisticercoide activado de unos 150  $\mu\text{m}$  de largo. El cisticercoide activado es muy similar al adulto, e incluye al escólex, con las cuatro ventosas y la corona de ganchos, junto a la región del cuello, aunque con estas estructuras más pequeños que en el adulto. Luego de activarse las larvas comienzan a moverse, fijándose con sus ventosas y su corona de ganchos al intestino, para posteriormente migrar y establecer la infección en el ducto biliar del ratón, en donde se desarrollarán como adultos (alargándose y generando segmentos). El adulto es el más grande de los estadios, llegando a medir varios centímetros de largo dentro del intestino del ratón. El tamaño de los segmentos es variable, dependiendo de su grado de maduración. Por ejemplo, la zona del cuello tiene unos 250  $\mu\text{m}$  de ancho mientras que los segmentos más desarrollados rondan el milímetro. Los segmentos van desarrollándose de la siguiente manera: comienzan sin estructuras internas definidas, posteriormente desarrollan un primordio genital desde el cual se desarrolla inicialmente el aparato reproductor masculino, y luego el femenino, lo que permite que se dé la fecundación para comenzar la generación de huevos dentro del útero. Cada segmento generará tanto los órganos reproductores femeninos como masculinos, y los huevos se producirán por medio de reproducción sexual por autofecundación o fecundación cruzada. Los huevos contienen a las oncósferas, las cuales son liberadas al medio externo junto con las heces del ratón. Los huevos de *H. microstoma* con sus correspondientes membranas protectoras (cáscara y membranas internas) mide en su totalidad unos 60  $\mu\text{m}$ , mientras que la oncósfera activada (al eclosionar) tiene un tamaño de unos 30-35  $\mu\text{m}$ . Los huevos así liberados pueden ser ingeridos por escarabajos, en este proceso de ingestión la cáscara de las oncósferas se rompe, junto con sus membranas internas, estimulando que las mismas se activen y comiencen a moverse. El movimiento de las oncósferas consiste en un movimiento cíclico de extensión y retracción de sus ganchos, gracias a este movimiento atravesarán el intestino de los escarabajos y se localizarán en el hemocele, en donde se desarrollarán como cisticercoides, completando el ciclo. Las oncósferas se desarrollan en cisticercoides en aproximadamente una semana, mientras que los cisticercoides se desarrollan en adultos con segmentos grávidos en aproximadamente 14 días, por lo que en menos de un mes se puede completar el ciclo de vida [18]. En condiciones de laboratorio, los cisticercoides desarrollados son fácilmente extraídos por disección de escarabajos y pueden ser introducidos en el sistema digestivo de ratones por una sonda gástrica, generando la infección de los mismos. Los adultos pueden ser recolectados de ratones mediante disección del intestino y el ducto biliar, de esta forma se pueden conseguir segmentos grávidos (que contienen oncósferas), estos son expuestos a los escarabajos que los ingieren, infectando a los escarabajos y de esta forma completando el ciclo de vida.

El genoma de *H. microstoma* fue publicado en 2013 [20] y mejorado en 2020 [21], lo cual es una gran ventaja para poder utilizar diferentes técnicas de biología molecular en este organismo. Además se ha encontrado que en este modelo es factible realizar aproximaciones experimentales mediante ARN de interferencia (ARNi) en la etapa de cisticercoide, para evaluar la función de diferentes genes mediante supresión de la expresión génica por este método [22]. *H. microstoma* tiene la particularidad de ser un modelo en el cual se realizó una gran cantidad de investigación en el siglo pasado, y que en los últimos años ha resurgido el interés en utilizarlo para investigación de cestodos, por sus características ventajosas antes mencionadas. En este sentido, muchos de los artículos descriptivos del mantenimiento de las diferentes etapas del ciclo de vida de este organismo en cultivo requieren de cierto cuidado, por su antigüedad, para extrapolar la información allí descrita y trabajar adecuadamente en la actualidad [23–27]. Gran cantidad de información sobre la biología de este organismo también es producto de la extrapolación de resultados obtenidos de otras especies de *Hymenolepis* como *H. diminuta* y *H. nana*, por ser muy cercanas evolutivamente.



**Figura 1.3. Ciclo de vida de *Hymenolepis microstoma*.** Se muestran los tres estadios principales del ciclo de vida de *H. microstoma* y sus dos hospederos. En las flechas azules se muestra el desarrollo desde cada etapa de del ciclo de vida de *H. microstoma* hacia la siguiente. En flechas verdes se muestran los roles clave de los

hospederos en la naturaleza para cerrar el ciclo. Las barras de escala son de 25  $\mu\text{m}$  en la oncósfera y de 50  $\mu\text{m}$  en cisticercoide y adulto.

La estructura del sistema nervioso de *H. microstoma* varía a lo largo de su ciclo de vida. Se ha propuesto que el sistema nervioso de las oncósferas, en *H. diminuta*, está compuesto únicamente por 2 o 3 células nerviosas con axones que proyectan sobre la región de los ganchos posteriores. Estas células nerviosas fueron descritas mediante tinción con un anticuerpo contra Tubulina acetilada, un marcador de microtúbulos estabilizados que detecta, entre otras estructuras, a las proyecciones neuronales [28]. A su vez la presencia de células neuronales en oncósferas también ha sido demostrada por microscopía electrónica de transmisión (MET) en *Hymenolepis nana* [29]. El conjunto de neuronas reducido en oncósferas parece ser conservado entre cestodos ya que también se han observado al par de células nerviosas en la zona central de oncósferas en *E. multilocularis* [30] y en *Mosgovoyia ctenoides* [9], entre otras especies. Al infectar al hospedero intermediario las oncósferas pierden sus diferentes tejidos diferenciados (entre ellos el nervioso), para generar durante la metamorfosis a cisticercoide tejidos diferenciados *de novo* a partir de sus células madre [31]. El sistema nervioso del adulto cumple en líneas generales con lo descrito previamente para los adultos de cestodos en general (**Figura 1.2**), con los ganglios cerebrales, los ganglios asociados al rostelo y los cordones nerviosos laterales, mediales y transversales. El sistema nervioso de los cisticercoides es muy similar al del adulto, y ha sido estudiado en detalle mediante microscopía electrónica evidenciando la presencia de 3 grupos principales de ganglios que componen al SN central (SNC) [32] y la presencia de células nerviosas con cuatro tipos diferentes de vesículas sinápticas, que llevaron a la clasificación de 4 tipos neuronales (un tipo de neuronas sensoriales, dos tipos de interneuronas y un cuarto tipo con características de inter y motoneuronas) [33]. Los estudios del sistema muscular y los mecanismos de innervación en este cestodo, mostraron una intrincada conexión neuro-muscular, donde cada fibra muscular puede estar en contacto sináptico con más de una neurona, y cada neurona realiza contactos sinápticos con múltiples fibras musculares [34]. En estos estudios ultraestructurales se encontraron prolongaciones neuronales con vesículas denominadas de núcleo denso, evidenciando la presencia de células neurosecretoras, o neuropeptidérgicas [35,36]. Este tipo de células, son básicamente células nerviosas que sintetizan y secretan péptidos de pequeño tamaño denominados neuropéptidos. Otros estudios realizados mediante MET de la zona del cuello y el escólex en adultos de *H. nana* y *H. diminuta*, llevaron a la postulación de la presencia de glándulas unicelulares, algunas en la zona de cuello y otras en estrecha relación a la musculatura de las ventosas [37]. Estos sistemas de comunicación neuropeptidérgicos son el foco de investigación de este trabajo,



que busca caracterizar a los mismos en el ciclo de vida de los cestodos, utilizando a *H. microstoma* como modelo central de estudio. Las características generales de los neuropéptidos son descriptas a continuación.

### **- Generalidades de los Neuropéptidos:**

Los neuropéptidos u hormonas peptídicas son péptidos de pequeño tamaño, típicamente entre 4 y 40 aminoácidos, sintetizados y liberados tanto por células nerviosas como endócrinas. Los neuropéptidos se utilizan como mecanismos de comunicación celular siendo liberados al medio circundante o al torrente sanguíneo (actuando como hormonas). Los neuropéptidos actúan en conjunto con neurotransmisores clásicos, y tienen diferentes efectos en las células receptoras, incluyendo efectos inmediatos (por ejemplo, afectando a la regulación del potencial de membrana de la célula receptora, lo que en neuronas puede afectar la probabilidad de disparar un potencial de acción) así como efectos a largo plazo, modificando la regulación de la expresión génica, sinaptogénesis, entre otros. [38]. Muchos neuropéptidos y sus efectos han sido estudiados en invertebrados [39], mostrando una gran diversidad de funciones en las que están involucrados estos sistemas en diferentes organismos.

A diferencia de los neurotransmisores clásicos que son producidos en las terminales sinápticas por enzimas específicas, los neuropéptidos son producidos, como otras proteínas de secreción, en ribosomas asociados al Retículo Endoplasmático Rugoso, posteriormente pasan al Aparato de Golgi y finalmente son transportados en vesículas de secreción, siendo acumulados en estas últimas. Las vesículas de secreción en donde se acumulan los neuropéptidos son denominadas de núcleo denso. A modo general, las vesículas sinápticas pueden clasificarse en dos grandes grupos por su aspecto al MET [40]: las vesículas de núcleo denso, originadas por síntesis en el Aparato de Golgi y asociadas a secreciones del tipo peptídicas, y vesículas pequeñas de núcleo lúcido, asociadas al almacenaje de moléculas de pequeño tamaño (como acetilcolina o glutamato), utilizadas en la neurotransmisión denominada clásica (en el primer capítulo de la sección de resultados se da información más detallada de las vías de neurotransmisión clásica).

La maduración de los neuropéptidos es un proceso particular con varios pasos, los cuales se esquematizan en la **Figura I.4** y se detallan a continuación. Los genes de neuropéptidos generan ARN mensajeros, que al traducirse generan un denominado prepropéptido, un péptido inmaduro que contiene un péptido señal y a una o más porciones peptídicas que no serán incluidas en los péptidos maduros. Los péptidos maduros son la o las porciones peptídicas de los prepropéptidos que finalmente serán utilizados para

la comunicación celular. En los primeros pasos de maduración, se da la remoción del péptido señal. El péptido resultante, aún inmaduro, se pasa a denominar propéptido. Posteriormente, el propéptido sufre un clivaje en sitios dibásicos (o raramente monobásicos) de Arginina y Lisina, mediante enzimas prohormona convertasas específicas de la familia PCSK (por su nombre en inglés, *Proprotein convertase subtilisin/kexin family*). Dentro de la familia PCSK en diferentes especies de animales hay dos prohormona convertasas que se encargan del clivaje de la mayoría de los neuropéptidos en las vías de secreción reguladas en neuronas y células endócrinas, denominadas PC2 y PC1/3 [41]. Si bien los clivajes mediados por PCSK pueden ser considerados las vías canónicas y más conocidas en este proceso de síntesis, en trabajos recientes se ha encontrado que otras proteínas pueden encargarse de los clivajes para la maduración de neuropéptidos, en particular la L catepsina ha demostrado tener un rol sumamente importante para la maduración de algunos neuropéptidos [42,43]. Por otro lado, existen otros péptidos no neurales, como la bradiquinina y la angiotensina procesados por otras enzimas para la formación de péptidos maduros [44]. Por ejemplo, para el procesamiento de la angiotensina tienen un rol catalizador las enzimas convertidoras de angiotensina 1 y 2 (ACE1 y ACE2, respectivamente, es interesante destacar, por el contexto coyuntural en el que se escribe esta tesis, que se ha descrito que la enzima ACE2 es el receptor del virus SARS-COV-2 [45]). Luego del clivaje de los neuropéptidos, el proceso de maduración continúa, removiendo a los aminoácidos remanentes en los extremos (Argininas y Lisinas, de los sitios de clivaje) mediante Carboxipeptidasas E, y posteriormente se pueden dar una serie de modificaciones postraduccionales para completar la maduración. Una de las modificaciones postraduccionales más típicas, está dada por la amidación del extremo C-terminal de los neuropéptidos, por la modificación de una glicina presente en esta posición en particular (luego del clivaje y de la remoción de los sitios de corte). En los animales este proceso puede darse de dos maneras, por una reacción secuencial de dos enzimas PHM y PAL (siglas por sus nombres en inglés, *peptidylglycine  $\alpha$ -hydroxylating monooxygenase*, y *peptidyl  $\alpha$ -hydroxyglycine  $\alpha$ -amidating lyase*, respectivamente) y/o por una única enzima bifuncional denominada PAM (sigla por su nombre en inglés, *peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase*) que produce ambas reacciones secuenciales. La presencia de estas enzimas es variable entre los diferentes grupos [46]: en mamíferos el proceso se da por la enzima bifuncional PAM, en *Drosophila melanogaster* por las enzimas PHM y PAL por separado, mientras que en el platelminto parásito *Schistosoma mansoni* estarían presentes las tres enzimas PAM, PHM y PAL, la presencia de estas tres enzimas en el genoma parece ser ancestral entre bilaterales, perdiéndose algunas de ellas a lo largo de la evolución.

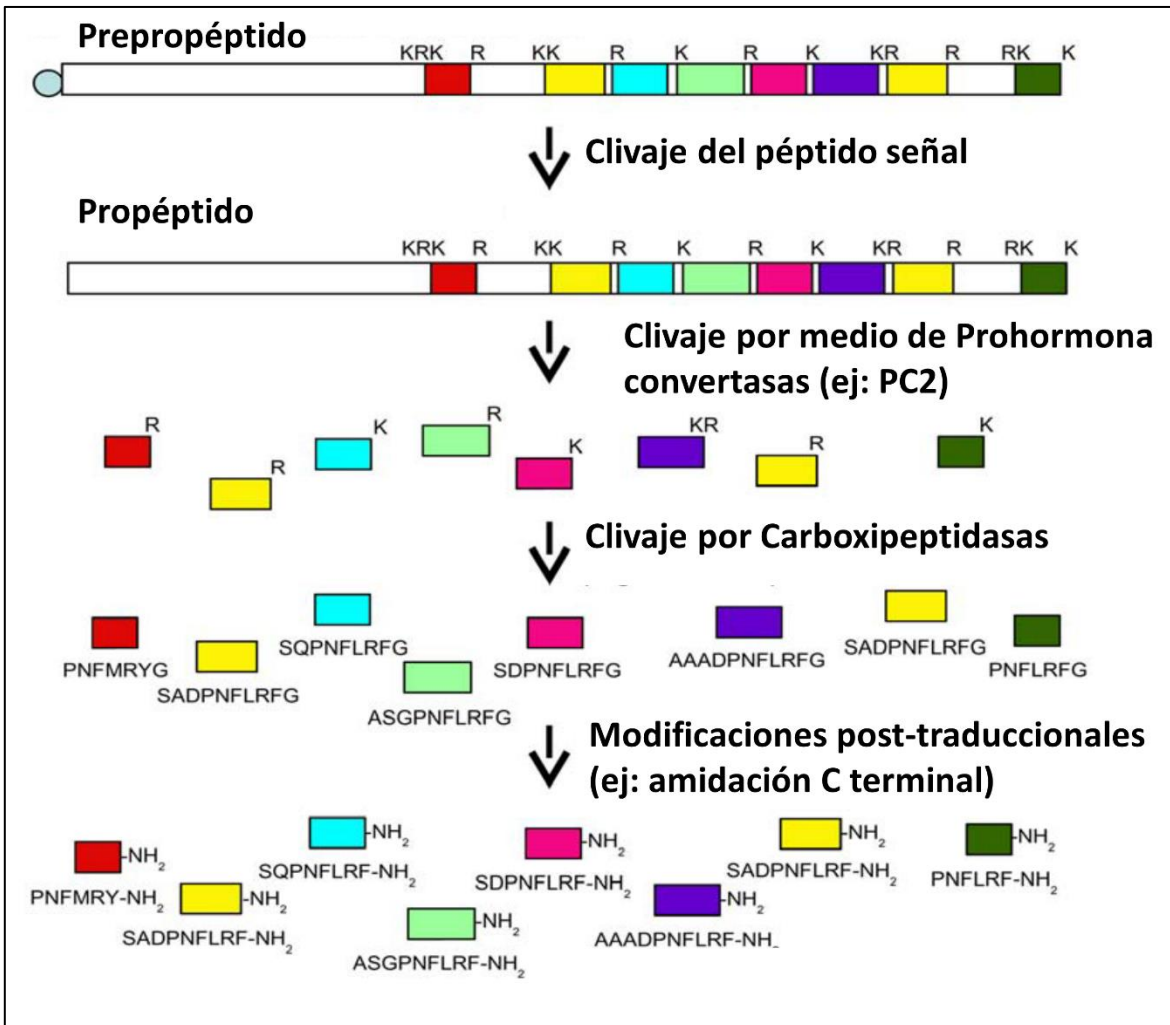
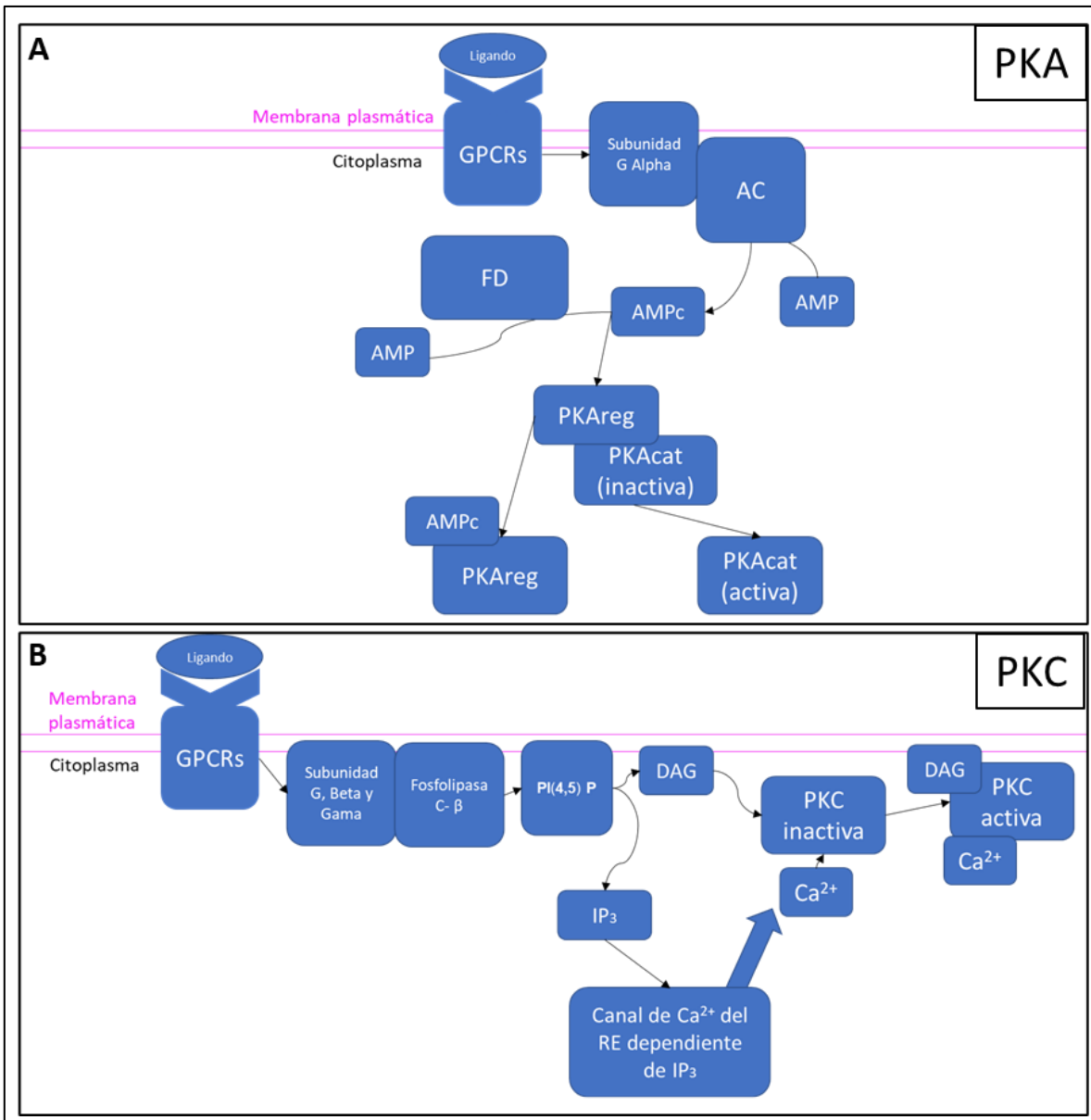


Figura I.4. Esquema del proceso de síntesis de Neuropéptidos. Modificado de Li and Kim, 2008 [47].

Los neuropéptidos generan cambios sobre las células blanco al interactuar con receptores específicos, acoplados usualmente a proteínas G (GPCRs, por su nombre en inglés, *G protein-coupled receptor*). El modo general de acción de los GPCRs es mediante cambios conformacionales que sufren al unirse a su ligando, generando este cambio una modificación en la proteína G que tienen acoplada. Estas proteínas G se componen de tres subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , los cambios conformacionales se dan en la subunidad  $\alpha$  la cual está acoplada a un GDP en su modo inactivo, y al ser el receptor activado por su ligando se produce un cambio conformacional en esta unidad  $\alpha$  que estimula la unión a un GTP, lo cual a su vez generará otro cambio conformacional que liberará a la subunidad  $\alpha$  de las otras dos subunidades. Estas subunidades al ser activadas interactúan con diferentes proteínas para continuar con la vía de señalización en la que estén involucradas. Estas vías de comunicación generalmente funcionan mediante cascadas de segundos mensajeros, principalmente por medio de las vías de PKA y PKC (siglas por sus nombres en inglés, *protein kinase A*, y *protein kinase C*, respectivamente).

La vía de PKA (**Figura I.5, A**) está dada por la activación de una proteína G  $\alpha$  estimuladora ( $G_s$ ) la cual interaccionará con una enzima adenilato ciclasa, la cual se encargará de producir AMP cíclico (AMPc) a partir de ATP [40,48,49]. Este AMPc es lo que se considera el segundo mensajero de la vía, ya que de él depende la actividad de PKA, la proteína quinasa principal de esta vía de señalización. PKA tiene dos subunidades, una reguladora (PKAreg) y una catalítica (PKAcat), la PKAreg mantiene inactiva a la PKAcat que es la que tiene la actividad quinasa. Al unirse AMPc a la PKAreg esta deja de interaccionar con PKAcat permitiendo que fosforile diferentes sustratos generando modificaciones a corto y largo plazo. Las modificaciones a corto plazo están dadas, por ejemplo, en la modificación de canales iónicos, activando o inhibiendo su apertura, o promoviendo la disposición de más o menos canales en la membrana celular, entre otros. Por otro lado, las modificaciones a largo plazo están dadas por la modificación de la expresión génica de la célula blanco, por ejemplo, mediante la activación de factores de transcripción como CREB (por su nombre en inglés, *cyclic-AMP response element-binding*). Algunos canales como los HCN pueden activarse tanto por las modificaciones provocadas por PKA como directamente por la interacción con AMPc [50,51]. Esta vía de PKA también puede estar regulada por las proteínas G inhibitorias ( $G_i$ ) las cuales inhiben a la producción de AMPc mediante la inhibición de la enzima adenilato ciclasa (teniendo el efecto inverso de la  $G_s$ ).

La otra vía principal de acción de los GPRCs es mediante la vía de PKC (**Figura I.5, B**), esta vía tiene como proteína  $G\alpha$  asociada en la mayoría de los casos a una denominada  $G_q$  la cual activará a una Fosfolipasa C [40,52,53]. Esta fosfolipasa tiene como sustrato a un fosfolípido de la membrana plasmática, denominado Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, que clivará dando lugar a diacilglicerol e inositol trifosfato (IP3), siendo liberado este último de forma soluble en el citoplasma. El IP3 favorecerá la liberación de calcio del retículo endoplasmático, el calcio se unirá a la proteína quinasa principal de esta vía, la PKC (por su nombre en inglés, *protein kinase calcium-dependent*), que para activarse necesita tanto de la unión de calcio como de diacilglicerol, ambos producidos en esta vía de señalización, lo que llevará como en el caso de PKA a la fosforilación de sustratos específicos a partir de esta quinasa, generando cambios en la actividad celular. El calcio liberado también se unirá a otras proteínas reguladoras de respuesta a calcio como las calmodulinas, teniendo otros efectos.



**Figura I.5. Componentes moleculares principales de las vías de PKA y PKC activadas por GPCRs. A,** vía de PKA, AC: adenilato ciclasa; FD: fosfodiesterasa; PKAreg: subunidad reguladora de PKA; PKAcat subunidad catalítica de PKA. **B,** vía de PKC, PI(4,5)P: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; DAG: diacilglicerol; IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato.

Además de los GPCR, existen otros receptores peptídicos denominados receptores de guanilil ciclasas, que promueven la producción de GMP cíclico (GMPc), molécula que es necesaria para la activación de la quinasa PKG (por su nombre en inglés, *cGMP-dependent protein kinase*) [40,54]. Un receptor del tipo PKG fue descrito en insectos, más específicamente en la mosca *Bactrocera dorsalis*, el cual tiene como ligando a la hormona de eclosión, donde gracias a la acción de esta hormona y su receptor se liberan grandes

cantidades de la hormona desencadenante de la ecdisis, favoreciendo este proceso de muda característico de artrópodos [55]. Otro ejemplo de estos receptores que producen GMPc son los del péptido natriurético atrial (ANP) NPRA y NPRB, la acción de esta vía contrarresta los efectos de hipertensión e inhiben la hipertrofia cardíaca [56]. Un dato interesante de los receptores de ANP es que el aumento de GMPc que producen interviene en la regulación de los denominados ENaC (por su nombre en inglés, *epithelium sodium channel*) en las células receptoras [57]. Los ENaC permiten el ingreso de sodio a las células, lo cual es importante en la reabsorción de sodio en el riñón, pero también como factor despolarizante de las células, siendo encontrado también en el sistema nervioso periférico y central [58]. En definitiva, las cascadas de segundos mensajeros son activadas por la acumulación de grandes concentraciones de AMPc (PKA), calcio (PKC) o GMPc (PKG) en el medio intracelular, los cuales activarán a las quinasas generando la fosforilación de sustratos específicos, los que finalmente producirán cambios en la actividad celular [40].

Otra forma de acción de los neuropéptidos, aunque menos común, es mediante la apertura directa de canales iónicos, esto fue descrito inicialmente en moluscos, en donde se detectó un canal de sodio que tiene como ligando un péptido de secuencia FMRFamida [59]. Canales iónicos activados directamente por neuropéptidos también han sido descritos en otros grupos, como en cnidarios [60], los cuales son grupos clave en la investigación sobre la evolución de estos sistemas.

Se considera a los sistemas de comunicación peptidérgicos como los primeros en ser utilizados para la comunicación nerviosa en la historia evolutiva de los animales [61], por lo que estos sistemas de comunicación han derivado enormemente, generando una gran variedad en las diferentes especies de animales presentes en la actualidad. Algunos de estos sistemas de comunicación, se mantienen presentes en diferentes grupos cumpliendo funciones extraordinariamente relacionadas, como en el caso de los neuropéptidos promotores de ecdisis (muda), también presentes en animales deuterostomados como vertebrados (los cuales no mudan), y que recientemente se describió se expresan fuertemente en las transiciones morfológicas más significativas de este segundo grupo durante su vida, lo que muestra una función ancestral extremadamente conservada de algunos de estos sistemas neuropeptidérgicos [62]. Por otro lado, en otras vías peptidérgicas, pueden observarse grandes diferencias al comparar los genes de neuropéptidos presentes en los genomas de animales, entre grandes grupos filogenéticamente distantes. Por ejemplo, existen grandes diferencias al comparar entre animales bilaterales (organismos con simetría bilateral que incluye a deuterostomados y protostomados) y no bilaterales (poríferos, cnidarios, placozoos y ctenóforos), y también al comparar dentro de bilaterales entre deuterostomados (equinodermos, protocordados, cordados, vertebrados, etc) y protostomados (insectos, nemátodos, moluscos,

platelmintos, etc) [63]. Esta divergencia evolutiva lleva a que estos sistemas sean muy diferentes, por ejemplo, entre platelmintos parásitos y sus hospedadores. Esto último, junto a que estos sistemas actúan generalmente mediante GPCRs (los cuales son comunmente accesibles al diseño de drogas que afecten su actividad [64]), han ocasionado que los sistemas de comunicación neuropeptidérgicos sean propuestos como posibles blancos farmacológicos para la generación de nuevas drogas contra platelmintos parásitos y las infecciones que estos producen [20,65]. La gran divergencia de estos sistemas neuropeptidérgicos permitirían afectar terapéuticamente a los parásitos y no al hospedador, lo cual ha impulsado el estudio de estos sistemas en platelmintos parásitos y helmintos en general (lo que incluye a nemátodos), ya que siempre se busca afectar terapéuticamente a sistemas específicos del parásito con el menor efecto posible sobre componentes que pertenezcan al hospedador. A continuación, se detallan características de estos sistemas en platelmintos.

#### **- Neuropeptidos en platelmintos:**

Los sistemas de comunicación neuropeptidérgicos han sido estudiados en diferentes especies de platelmintos, tanto en organismos de vida libre como las planarias, como así también en especies parásitas, como cestodos y otros platelmintos parásitos del grupo Neodermata (tremátodos y monogéneos). La visión general, dada por el estudio en conjunto de estos grupos, ha aportado considerablemente al entendimiento global de los sistemas neuropeptidérgicos en estos organismos. Se ha encontrado que una gran cantidad de estos sistemas que están presentes en otros animales bilaterales se han perdido en platelmintos, especialmente en parásitos, y a su vez se ha encontrado que muchos de ellos son específicos de estas especies. A continuación, se mencionan algunos de los principales descubrimientos de este campo de investigación.

La investigación de los sistemas neuropeptidérgicos en platelmintos de vida libre ha sido desarrollada utilizando diferentes aproximaciones experimentales. Los estudios de este campo comenzaron con los estudios clásicos, mediante el uso de anticuerpos contra neuropeptidos conocidos en otros animales. Un ejemplo es el descubrimiento del neuropeptido GYIRFamida en la planaria *Dugesia tigrina*, en extractos de este organismo, mediante el uso de anticuerpos contra FMRFamida detectados en moluscos [66]. Más recientemente, se han realizado estudios más globales de los neuropeptidos presentes en planarias utilizando al organismo *Schmidtea mediterránea*, el cual es el único platelminto en el que se han hecho análisis peptidómicos globales. Mediante la combinación de análisis peptidómicos y detección bioinformática se han descubierto una gran cantidad de neuropeptidos en *S. mediterránea*. Se encontraron a varios neuropeptidos conservados en

otros animales bilaterales como: el péptido cerebral, hormona liberadora de gonadotropina, péptidos relacionados a insulina, miomodulina, piroquinina, péptido pedal (ppl), y una expansión de genes en este organismo de la superfamilia de Neuropéptidos Y (NPY, compuesta por una gran cantidad de neuropéptidos tanto en vertebrados como invertebrados, que cumplen diversas funciones). Tras estos análisis se detectó la presencia de muchos de estos neuropéptidos en el sistema nervioso y en los órganos reproductores, incluyendo al aparato copulador y a células glandulares alrededor de éste, en los testes y en el oviducto. Los resultados sugieren que estos sistemas tendrían roles nerviosos y en la reproducción de planarias [67]. Para estudiar la implicancia de estos sistemas, otros trabajos estudiaron más en detalle los neuropéptidos que pudieran tener un rol en la regeneración (característica esencial de estos organismos), identificando al neuropéptido de secreción *spp-20* sobreexpresado durante el proceso regenerativo [68]. Para llevar a cabo experimentos funcionales de estos sistemas neuropeptidérgicos, se llevaron a cabo estudios de interferencia génica en planaria. Una buena estrategia para observar de manera global las diferentes funciones en las que están implicados los sistemas neuropeptidérgicos, es mediante la alteración, no de un neuropéptido en particular, sino de factores clave del proceso de biosíntesis de los mismos, los cuales son compartidos entre ellos (**Figura 1.3**). Por ejemplo, una de las enzimas clave de este proceso de biosíntesis, es la prohormona convertasa PC2. Al silenciar la expresión de *pc2* en la planaria *Schmidtea mediterránea* (mediante ARN de interferencia) se encontró que los niveles de péptidos procesados correctamente, analizados mediante espectrometría de masa, se ven alterados. La interferencia de *pc2*, a su vez, altera de formas diversas a este organismo, llevando a que se produzcan problemas en la regeneración, en el desarrollo de órganos reproductivos y en la coordinación del movimiento [65,67,69]. Estos resultados remarcan la importancia de estos sistemas de comunicación, y la diversidad de funciones que cumplen en estos organismos. De forma más específica, se encontró que al menos 5 neuropéptidos son responsables de los movimientos de la faringe, que este organismo realiza para alimentarse [69], y que un neuropéptido de la superfamilia NPY, llamado *npy-8* tiene un rol clave en el desarrollo del sistema reproductor de *S. mediterránea* [67], mediante interacción con el receptor NPYR-1 [70]. Más allá de que estos organismos están muy relacionados evolutivamente con los parásitos, existen diferencias evidentes entre estos organismos dada por sus estilos de vida parásitos o de vida libre, por lo que el estudio de estos sistemas también se ha realizado directamente sobre especies de platelmintos parásitos como se describe a continuación.

La detección de neuropéptidos en platelmintos parásitos comenzó con estudios bioquímicos, utilizando grandes cantidades de extractos de material biológico (en algunos casos 1 kg de parásito [71]), junto al aislamiento de péptidos por HPLC, e inmunoreactividad cruzada con péptidos ya conocidos para otras especies, como se mencionó anteriormente



para planarias. El primer neuropéptido descrito mediante estas técnicas bioquímicas en cestodos, fue el Neuropéptido F (NPF), en la Tenia Ovina, *Moniezia expansa*, el cual fue el primer homólogo conocido en invertebrados de la familia de neuropéptidos Y (NPY) presente en vertebrados [71]. Por estas mismas técnicas también fueron descritos NPF en otras especies de platelmintos parásitos como *Fasciola hepatica* y *Schistosoma* spp. [72]. Recientemente, se han descrito neuronas de *M. expansa* con presencia de NPF, que tienen como blanco de sus prolongaciones a diferentes grupos de fibras musculares, tanto en el parénquima como en los órganos de fijación [73]. Más allá de las dificultades de estas técnicas bioquímicas (entre ellas la obtención de suficiente material biológico), fueron descritos mediante las mismas diferentes neuropéptidos en platelmintos parásitos. Se encontraron 7 neuropéptidos en total, 5 dentro de un grupo denominado FLP (siglas por sus nombres en inglés, *FMRFamide-like peptides*) y dos dentro de los NPF antes mencionados [65]. La familia de los FLP es considerada la familia más grande de neuropéptidos presente en invertebrados, acompañado esto con un amplio rango de funciones encontradas para los mismos, como la neuromodulación de la locomoción, reproducción y alimentación [74]. Más allá de los importantes resultados obtenidos por estos estudios pioneros en el área, hoy en día la búsqueda de nuevos genes de neuropéptidos se ha visto acelerada a pasos agigantados por el avance de la secuenciación de organismos. Algunos de estos neuropéptidos encontrados en platelmintos parásitos incluso han sido evaluados en ensayos funcionales, con claros ejemplos sobre la motilidad en diferentes grupos, como tremátodos [75] o en cestodos [76].

Luego de secuenciar el genoma de diferentes especies de platelmintos parásitos, se avanzó a gran velocidad en el hallazgo de nuevos genes de neuropéptidos *in silico*, estos estudios permiten obtener rápidamente un panorama global de los diferentes genes que componen a estos sistemas de comunicación, aunque esta detección debe venir acompañada de validaciones experimentales luego de su detección. Para poner en números concretos esto último, y entender la diferencia entre la búsqueda de neuropéptidos mediante estas técnicas y las anteriores, basta ver por ejemplo un trabajo de 2009 de Paul McVeigh y colaboradores donde encontraron: 96 posibles neuropéptidos en 60 precursores de neuropéptidos putativos utilizando datos genómicos de 10 especies de platelmintos, mediante búsqueda BLAST. En este trabajo intentaron identificar los neuropéptidos inicialmente mediante BLAST de secuencias conocidas para estos genes de otros organismos, aunque no tuvieron resultados positivos, por lo que pasaron a una búsqueda mediante blast degenerados con un molde base como el siguiente  $KRX_{3-11}GKRX_{3-11}GKRX_{3-11}GKRX_{3-11}GKR$ , donde “KR” representa a los sitios de corte por parte de las prohormonas convertasas, “X<sub>3-11</sub>” una variable de diferentes largos de cualquier aminoácido para pequeños péptidos, y “G” un residuo de glicina terminal (que será procesado de forma de generar una amidación C-terminal en el péptido). De esta forma encontraron diferentes

neuropéptidos, algunos de ellos conservados evolutivamente en otros animales bilaterales, y una gran cantidad de neuropéptidos únicamente presentes en platelmintos. Junto a este análisis bioinformático, también se detectaron para algunos de estos genes sus patrones de expresión mediante Inmunohistofluorescencia (IHF) en *Schistosoma mansoni*, mostrando su expresión en el SN. Sin embargo, se encontraron muy pocos genes de precursores neuropéptidos en cestodos mediante esta metodología [77]. Tanto en este último trabajo mencionado, como en otros donde el foco son grupos de invertebrados no platelmintos [78], la búsqueda por blast de neuropéptidos se ve facilitada por la presencia de paracopias repetidas de un mismo neuropéptido (o neuropéptidos similares) dentro de un mismo precursor. Esto quiere decir que un mismo prepropéptido genera varios péptidos maduros iguales o similares al ser procesado. Sin embargo, aunque la presencia de paracopias de neuropéptidos maduros es un buen insumo a la hora de comparación entre secuencias para la búsqueda por BLAST, esta característica es poco común en platelmintos parásitos, especialmente en cestodos [20].

Más allá de los grandes avances en la búsqueda de genes de neuropéptidos mediante BLAST entre diferentes genomas, esta técnica tiene sus limitaciones, por las características intrínsecas de su biosíntesis discutida previamente. ¿Por qué? Porque los genes de neuropéptidos codifican para la secuencia de aminoácidos que será el neuropéptido maduro, pero también codifican para otras partes del prepropéptido inicial, que serán degradadas proteolíticamente durante el proceso de biosíntesis, por consecuencia de esta degradación, estas secuencias de aminoácidos del prepropéptido, se encuentran bajo menor presión evolutiva de conservación que las del péptido maduro, las zonas de clivaje por prohormona convertasas o el péptido señal. Esto en conjunto, genera que, incluso entre especies relativamente cercanas evolutivamente, sólo una pequeña parte del gen de cada neuropéptido sea conservado, lo que implica que muchos de ellos no pueden ser detectables únicamente mediante BLAST. Sumado a lo anterior, la búsqueda por BLAST, en el mejor de los casos, solo encontrará neuropéptidos homólogos a los ya conocidos en otros organismos, otra limitante importante de esta forma de búsqueda. En 2016, nuestro grupo utilizó estas características, que complejizan la búsqueda bioinformática de neuropéptidos de forma clásica por BLAST, para generar un novedoso método bioinformático que detecta este tipo de genes mediante comparación evolutiva. Este método básicamente busca genes relativamente cortos (ORFs de 250 aminoácidos o menores) con péptido señal, que al comparar entre diferentes especies tenga una región muy conservada (neuropéptido maduro) flanqueada por sitios dibásicos de arginina y lisina (sitios de corte por prohormona convertasas), y rodeadas estas últimas por secuencias no tan conservadas (secuencias del propéptido no utilizadas en la comunicación neuropeptidérgica). Este método, publicado por Koziol y colaboradores en 2016 [79], fue validado utilizándolo sobre genomas de organismos modelo donde se han confirmado

experimentalmente gran cantidad de genes de neuropéptidos (*Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* y la planaria *Schmidtea mediterranea*). Al utilizar este método en estos organismos modelo, se detectó a la mayoría de los neuropéptidos detectados previamente por métodos experimentales, e incluso se encontraron muchos otros que no habían sido detectados, incluyendo a homólogos claros de neuropéptidos conservados en otros animales. Gracias a este método bioinformático se detectaron una gran cantidad de genes de neuropéptidos en el genoma de diferentes especies de platelmintos parásitos y más específicamente de cestodos, entre ellos *Hymenolepis microstoma*.

Mediante el método bioinformático descrito anteriormente se detectaron para *H. microstoma*, 39 genes de neuropéptidos, de los cuales 11 muestran homología clara con neuropéptidos ancestrales presentes en otros animales bilaterales, mientras que el resto serían específicos de platelmintos o incluso de cestodos. Estos genes para precursores de neuropéptidos se muestran en la **Tabla I.1**.

GeneIDs	Nombre	Neuropéptido conservado
HmN_000556000	npp-1	-
HmN_000050100	npp-2	-
HmN_000166500	npp-4	-
HmN_000072750	npp-5	-
<b>HmN_000648800</b>	<b>npp-6</b>	<b>Miomodulina</b>
HmN_000787500	npp-14	-
HmN_000592500	npp-15.1	-
HmN_000592400	npp-15.2	-
<b>HmN_000462100</b>	<b>npp-20.1</b>	<b>NPF</b>
<b>HmN_000295600</b>	<b>npp-20.2</b>	<b>NPF</b>
<b>HmN_000069000</b>	<b>npp-20.3.1</b>	<b>NPF</b>
<b>HmN_000069100</b>	<b>npp-20.3.2</b>	<b>NPF</b>
<b>HmN_000206600</b>	<b>npp-20.4</b>	<b>NPF</b>
<b>HmN_000096800</b>	<b>npp-20.5</b>	<b>NPF</b>
HmN_000377100	npp-24	-
HmN_000165500	npp-26	-
HmN_000326200	npp-27.1	-
HmN_000326100	npp-27.2	-
HmN_000234350	npp-28	-
HmN_000212550	npp-29.1	-
HmN_000212650	npp-29.2	-
HmN_000183900	npp-30	-
HmN_000223650	npp-31/32.1	-

HmN_000205400	npp-31/32.2	-
HmN_000142950	npp-31/32.3	-
<b>HmN_000514300</b>	<b>npp-33</b>	<b>SIFamida</b>
<b>HmN_000315550</b>	<b>npp-34</b>	<b>Luqina</b>
<b>HmN_000148600</b>	<b>npp-35</b>	<b>Pirokinina</b>
HmN_000511300	npp-36	-
HmN_000695950	npp-37	-
HmN_000382900	npp-38	-
HmN_000430600	npp-40	-
<b>HmN_000866400</b>	<b>npp-41</b>	<b>CCAP</b>
HmN_000876950	npp-42	-
HmN_000508100	npp-43	-
HmN_000197700	npp-44.1	-
HmN_000827150	npp-44.2	-
HmN_000540950	npp-45	-
HmN_000088450	npp-46	-

**Tabla I.1. Genes de neuropéptidos de *H. microstoma* identificados en Koziol et al, 2016 [79].** Se muestran los GeneIDs de cada gen de la versión del genoma utilizada en esta publicación, Tsai et al, 2013 [20]. Los números de los npp están dados por familias conservadas dentro de platelmintos. Los parálogos de esa familia dentro del genoma de *H. microstoma* están representados por números tras un punto después del número de cada familia. Los genes de neuropéptidos que están conservados en otros organismos bilaterales se encuentran destacados, y el nombre utilizado comunmente para estos neuropéptidos aparece en la tercera columna. NPF: *Neuropeptide F*; CCAP: *crustacean cardioactive peptide*.

En este trabajo de 2016 Koziol y colaboradores, también se investigó a los posibles receptores de neuropéptidos presentes en el genoma de *H. microstoma* y otros cestodos mediante análisis filogenéticos, encontrando genes relacionados a receptores para todos los neuropéptidos detectados que presentan homólogos en otros organismos bilaterales. En este trabajo también se encontraron receptores ortólogos a los receptores de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH, por su nombre en inglés, *Thyrotropin-releasing hormone*) y de taquicinina (TK), aunque no se encontraron homólogos claros de los neuropéptidos TRH y TK. A continuación, se detallan características generales de estos neuropéptidos que se encuentran conservados entre cestodos y otros animales bilaterales.

La Miomodulina (cuyo homólogo es *npp-6* en *H. microstoma*) fue descrita inicialmente en *Aplysia californica*, un caracol muy utilizado en la investigación del sistema nervioso de moluscos. Este neuropéptido fue identificado como un promotor de la velocidad y fuerza de mordida cuando este animal se alimenta, teniendo su acción en conjunto con serotonina y otros péptidos denominados cardioactivos [80]. Utilizando anticuerpos contra miomodulina de *A. californica* se detectaron zonas inmunorreactivas en

*D. melanogaster*, tanto en el sistema nervioso central como en la zona peritraqueal, sugiriendo funciones neuropeptidérgicas en estas regiones [81].

El neuropéptido SIFamida (cuyo homólogo es *npp-33* en *H. microstoma*) fue aislado primariamente en moscas de la carne *Sarcophaga bullata* (*Neobellieria bullata* en la publicación original), en donde se describió su acción miotrópica [82]. La distribución de este neuropéptido fue encontrada por inmunofluorescencia *in toto* en diferentes especies de artrópodos, en donde se encontró una distribución conservada de dos pares de células inmunorreactivas en el *pars intercerebralis* (uno de los centros principales del sistema neuroendócrino central de estos organismos) con proyecciones hacia el cordón nervioso central [83]. Posteriormente se caracterizó funcionalmente a este neuropéptido y su receptor en *D. melanogaster*, donde se encontró que su actividad es importante en el control del ciclo sueño-vigilia [84]. Los roles encontrados para este neuropéptido muestran la gran diversidad funcional de este y otros sistemas neuropeptidérgicos, pudiendo afectar diferentes funciones incluso en el mismo organismo u organismos similares.

El neuropéptido Luqina (cuyo homólogo es *npp-34* en *H. microstoma*), también descubierto en *A. californica* (dado su nombre por encontrarse en el cuadrante izquierdo superior del ganglio abdominal, en inglés, *Left Upper Quadrant cells*), con neuropéptidos maduros con motivo C-terminal RY amida, ha sido estudiado en diferentes grupos de invertebrados, mostrando una amplia cantidad de funciones en las que se encuentra implicada: la regulación de la alimentación, la puesta de huevos, la locomoción y en el tiempo de esperanza de vida [85].

Pirokinina (cuyo homólogo es *npp-35* en *H. microstoma*), fue el primer neuropéptido descubierto en cucarachas *Leucophaea maderae* en 1986, donde se encontró que tenía actividad en la contracción del intestino [86]. También es conocido en *D. melanogaster* con el nombre de miotropina. En *D. melanogaster* se logró detectar a la localización de este neuropéptido con el anticuerpo anti-miomodulina de moluscos que se comentó previamente [81], por similitud de su secuencia aminoacídica con la miomodulina. En *D. melanogaster* estudios en mutantes mostraron un rol adicional de la Pirokinina, siendo importante para la sobrevivencia de las larvas luego de la ecdisis (muda) y en la ingesta de alimentos [87].

El péptido cardioactivo de crustáceos (CCAP, cuyo homólogo es *npp-41* en *H. microstoma*), es el neuropéptido considerado como el más conservado entre diferentes especies de artrópodos [88]. La secuencia PFCNAFTGC-NH<sub>2</sub> se mantiene extremadamente conservada entre las especies de insectos y crustáceos en donde ha sido investigado. Las cisteínas de su secuencia son altamente conservadas entre especies y forman un puente disulfuro que es esencial para su función. Como su nombre indica, este neuropéptido está

involucrado en la actividad cardíaca, la cual es estimulada por el mismo. Por otro lado, tiene un rol central en la estimulación de la ecdisis. Recientemente se ha comprobado que este, junto a otros neuropéptidos relacionados, no sólo tienen un rol en la ecdisis, sino que son altamente expresados en transiciones morfológicas bruscas de la vida de los animales, tanto de protostomados como de deuterostomados, con una posible analogía/homología de función sumamente interesante para los animales que no realizan muda en donde también este neuropéptido está presente [62].

Por otro lado, tenemos a los neuropéptidos que no fueron encontrados en el genoma de *H. microstoma*, pero sí sus posibles receptores. La TK (cuyo homólogo podría ser *npp-24* en *H. microstoma*, si bien la similitud de secuencia es limitada) tiene diversas funciones que ejerce a través de su unión a sus receptores GPCRs específicos. Estos neuropéptidos se expresan en el sistema nervioso y en células enteroendócrinas del aparato digestivo de invertebrados y vertebrados [89,90]. Se ha observado que los receptores identificados para TK, pueden ser activados sin embargo por una serie de neuropéptidos del tipo FMRFamida en *C. elegans* [91]. A su vez, tenemos al receptor de TRH, fuertemente estudiado en vertebrados por su estimulación de la liberación de Tirotopina (TSH) [92], y que por mucho tiempo fue considerado como un neuromodulador ausente en protostomados. Recientemente, la caracterización en invertebrados de neuropéptidos que activan a ortólogos del receptor de TRH, revelaron que este receptor es activado por neuropéptidos del tipo EFLGamidas, los cuales están presentes en planarias, pero no fueron encontrados en platelmintos parásitos. Otro punto interesante es que el receptor de TRH fue bien caracterizado en *C. elegans* en donde se encontró que el mismo está implicado en la estimulación de una vía de señalización que promueve el crecimiento de este organismo [93].

En el presente trabajo realizamos un análisis general de las diferentes vías de neurotransmisión presentes en el ciclo de vida de los cestodos, con foco en los sistemas de señalización neuropeptidérgicos, utilizando a *H. microstoma* como modelo principal de estudio. En la sección de Resultados mostramos el trabajo realizado con este objetivo. En el **Capítulo 1** mostramos nuestros análisis de las diferentes vías de neurotransmisión presentes en platelmintos parásitos, donde encontramos una pérdida masiva de vías de neurotransmisión en cestodos. En el **Capítulo 2** se encuentra el análisis transcriptómico de los tres principales estadios del ciclo de vida de *H. microstoma*, teniendo datos de buena calidad por primera vez para todas las etapas principales del ciclo de vida de una especie de cestodo. En el **Capítulo 3** se hace foco en el estudio de la expresión de genes implicados en las diferentes vías de neurotransmisión en el ciclo de vida de *H. microstoma*, de genes de neuropéptidos y de los que se identificaron en el trabajo que se muestra en el primer capítulo de resultados. Los siguientes capítulos muestran los resultados obtenidos para

cada estadio principal del ciclo de vida de *H. microstoma*. En el **Capítulo 4** se muestran resultados para el estadio adulto, tanto de la detección de la expresión génica en diferentes tejidos por hibridación *in situ*, como así también la optimización de su cultivo *in vitro*. En el **Capítulo 5** el estadio protagonista será el primer estadio larval, la oncósfera, con la detección de la expresión de diferentes genes de precursores de neuropéptidos, y el desarrollo de diferentes ensayos de motilidad. Finalmente, en el **Capítulo 6** se muestran los resultados obtenidos para metacestodos, en donde se utilizaron cisticercoides de *H. microstoma* y también tetratiridios de *M. corti*, centrándonos en ensayos funcionales de motilidad y de cultivo *in vitro*.

## **Hipótesis y Objetivos.**

### **- Hipótesis del trabajo.**

Los neuropéptidos y las vías de neurotransmisión clásica cumplen importantes y diversas funciones a través de las diferentes etapas del ciclo de vida de los cestodos, expresándose en el sistema nervioso y en otros tejidos.

Los genes de neuropéptido detectados previamente en el genoma de cestodos por métodos bioinformáticos son procesados y utilizados como hormonas peptídicas para cumplir diferentes funciones.

### **- Objetivo general.**

Caracterizar a los diferentes sistemas de neurotransmisión en *Hymenolepis microstoma* enfocándonos en los sistemas de comunicación neuropeptidérgicos, mediante estudios de expresión génica, profundizando a nivel funcional en algunos de estos sistemas.

### **- Objetivos específicos.**

Estudiar la expresión de genes de neuropéptidos y de otros genes implicados en vías de neurotransmisión en el ciclo de vida de cestodos, utilizando a los tres estadios principales del ciclo de vida de *H. microstoma*, e identificar diferencias de expresión específicas entre estadios.

Validar experimentalmente a los neuropéptidos detectados previamente para *H. microstoma in silico*, mediante estudios peptidómicos.

Identificar, mediante hibridación *in situ*, los tejidos en donde se expresan los genes de neurotransmisión clásica y neuropeptidérgicos en las diferentes etapas del ciclo de vida de *H. microstoma*.

Optimizar métodos de cultivo *in vitro* para las tres principales etapas del ciclo de vida de *H. microstoma*: oncósfera, cisticercoide y adulto.

Indagar en las funciones que tienen algunos de los neuropéptidos identificados previamente, en el ciclo de vida de *H. microstoma*, estudiando sus efectos sobre la motilidad, los patrones de proliferación celular y sobre el desarrollo.



## **Resultados.**

### **Capítulo 1: “Análisis de marcadores de neurotransmisión clásica en cestodos: evidencia de una pérdida amplia de vías de neurotransmisores”**

Se detectaron *in silico* las vías de comunicación nerviosa en el genoma de cestodos y otros platelmintos parásitos. Este primer capítulo de resultados fue publicado en formato de artículo en 2018.

**Publicación original:** M. Preza, J. Montagne, A. Costábile, A. Iriarte, E. Castillo, and U. Koziol, “Analysis of classical neurotransmitter markers in tapeworms: Evidence for extensive loss of neurotransmitter pathways,” *International Journal for Parasitology.*, vol. 48, pp. 979–992, 2018 [94]. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.06.004>

Para esta publicación participé en: el diseño experimental, la identificación de componentes moleculares utilizados para la comunicación nerviosa en organismos modelo, el desarrollo del Script utilizado para encontrar a los genes asociados a estos componentes moleculares en platelmintos parásitos, los análisis filogenéticos preliminares utilizando al programa MEGA [95], la obtención de material biológico, la realización experimental de WMISH (incluyendo síntesis de las sondas de ARN marcadas con digoxigenina, análisis de imágenes obtenidas por microscopía confocal mediante FIJI), análisis de los resultados, armado de figuras y correcciones del artículo antes de ser enviada la versión final.

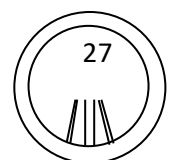
La información suplementaria de este artículo puede ser observada y descargada en el siguiente enlace:

[https://drive.google.com/drive/folders/1EcYTuxJWCbSTP\\_CPvjPV\\_aRjhzqDkHDD0?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/1EcYTuxJWCbSTP_CPvjPV_aRjhzqDkHDD0?usp=sharing)

### **Analysis of classical neurotransmitter markers in tapeworms: evidence for extensive loss of neurotransmitter pathways**

Matías Preza <sup>a</sup>, Jimena Montagne <sup>a</sup>, Alicia Costábile <sup>b</sup>, Andrés Iriarte <sup>c</sup>, Estela Castillo <sup>b</sup>, Uriel Koziol <sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup> Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Iguá 4225, CP11400, Montevideo, Uruguay.



<sup>b</sup> Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Iguá 4225, CP11400, Montevideo, Uruguay.

<sup>c</sup> Laboratorio Biología Computacional, Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Av. Alfredo Navarro 3051, Montevideo CP 11600, Uruguay

**\* Corresponding author: Uriel Koziol**

Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, CP11400, Montevideo, Uruguay.

Tel: +598 25258618

Fax: +598 25258617

e-mail: ukoziol@gmail.com

**Note: Supplementary data associated with this article**

## **Abstract**

Parasitic flatworms have complex neuromuscular systems that serve important functions in their life cycles. However, our understanding of neurotransmission in parasitic flatworms is limited. Pioneering studies have suggested the presence of several classical neurotransmitter systems, but their molecular components have not been characterized in most cases. Because these components are conserved in bilaterian animals, we searched the genomes of parasitic flatworms for orthologs of genes required for neurotransmitter synthesis, vesicular transport, reuptake, and reception. Our results show that tapeworms have lost the genes that are specifically required in other animals for synaptic signaling using the classical neurotransmitters dopamine, tyramine, octopamine, histamine and gamma-aminobutyric acid (GABA). These results indicate that these signaling pathways are either absent in these parasites, or that they require completely different molecular components in comparison to other animals. The orthologs of genes related to histaminergic and GABA signaling are also missing in trematodes (although *Schistosoma*-specific histaminergic receptors have been previously described). In contrast, conserved genes required for glutamatergic, serotonergic and cholinergic signaling could be found in all analyzed flatworms. We analyzed the expression of selected markers of each pathway in the tapeworm *Hymenolepis microstoma* by whole-mount in situ hybridization. Each marker was specifically expressed in the nervous system, although with different patterns. In addition,

we analyzed the expression of proprotein convertase 2 as a marker of peptidergic cells. This gene showed the widest expression in the nervous system, but was also expressed in other tissues, suggesting additional roles of peptidergic signaling in tapeworm development and reproduction.

**Keywords:** Neurotransmitter, Cestode, Trematode, Monogenean, Planarian, Neuropeptide F

## 1. Introduction

Parasitic flatworms, including monogeneans, trematodes (flukes) and cestodes (tapeworms), are responsible for many helminthiases of medical and veterinary importance. Although parasitic flatworms are popularly regarded as reduced and degenerate, they have complex neuromuscular systems that serve essential functions in their life cycles [12,96,97]. These functions include migration of the parasites within their hosts, as well as attachment using muscular holdfast organs. The importance of the neuromuscular system for helminth parasites is highlighted by the fact that it is the main target of many anthelmintic drugs currently in use, and is considered to be a key target for the development of novel anthelmintics [98–101].

Classical neurotransmitters are evolutionarily ancient and their signaling pathways are widely conserved in bilaterian animals. This includes their biosynthetic pathways and their receptors, as well as distinct transporters for their accumulation in synaptic vesicles and for reuptake following synaptic release. With few exceptions, these activities are performed by homologous proteins in different animal phyla, including vertebrates, nematodes and arthropods [102–115]. In comparison to these model organisms, knowledge of neurotransmission mechanisms in parasitic flatworms is still sketchy, especially in the case of tapeworms. The nervous system of parasitic flatworms is particularly challenging to study, as it is diffuse, difficult to dissect, and hard to identify in living tissues or with common histological methods [37,100,116]. Early research in the field focused on searching for the presence of different neurotransmitter substances through chemical and immunohistochemical methods (which provided great detail on the anatomy of the nervous system), as well as characterizing the effects of different neurotransmitters on whole worms or muscle strip preparations (reviewed by Maule et al., 2006 [100]; Ribeiro et al., 2005 [117]). These early studies provided strong evidence for roles of 5-hydroxytryptamine (serotonin; 5-HT) and glutamate as myoexcitatory neurotransmitters, and of acetylcholine (ACh) as a myoinhibitory neurotransmitter, in stark contrast with the classical myoexcitatory role of ACh in vertebrates. Additionally, more limited evidence indicated the

presence and effects of other neurotransmitters such as dopamine (DA), tyramine (TA), octopamine (OA), histamine (HA), and gamma-aminobutyric acid (GABA) in parasitic flatworms.

More recently, with the advent of molecular biology and parasite genomics, several studies have focused on the characterization of flatworm neurotransmitter receptors, transporters and biosynthetic enzymes, including their biochemical characterization by expression in heterologous systems. For example, in the trematodes of genus *Schistosoma mansoni*, several receptors were de-orphanized, including G-protein coupled receptors (GPCRs) for ACh, DA, HA, 5-HT and glutamate, and Cys-loop ligand gated ion channels (LGICs) for ACh and glutamate [118–127]. Recently, the first tapeworm receptors were characterized, as two GPCRs from *Echinococcus granulosus* and another GPCR from *Mesocestoides corti* were shown to be activated by serotonin [128]. In these and other studies [129–131], phylogenetic analyses were performed for particular families of neurotransmitter receptors, transporters and biosynthetic enzymes in some species. However, no systematic classification has been done of the different components of classical neurotransmitter pathways in the predicted genomes of parasitic flatworms.

We have recently described the neuropeptide complement of parasitic flatworms, and analyzed the expression of selected neuropeptide genes in the tapeworm *Echinococcus multilocularis* [79]. The various expression patterns exhibited by these genes indicated a hidden complexity of the nervous system of tapeworms, and motivated us to examine the expression of markers of classical neurotransmitter pathways. In this work, we analyzed the published genomes of parasitic flatworms in order to systematically characterize which conserved components of neurotransmitter pathways are present in each species. For each neurotransmitter we study the phylogenetic distribution of genes coding for proteins involved in biosynthetic pathways, receptors, vesicular transporters and proteins responsible for synaptic reuptake. Our results indicate that tapeworms lack the genes that are required in all other animals for biosynthesis and synaptic signaling of the classical neurotransmitters DA, TA, OA, HA and GABA. Furthermore, the genes related to HA and GABA signaling are also absent in trematodes. These results suggest that those signaling pathways are absent in these parasites, or that they require completely different molecular components in comparison to other animals. We consequently focused on general markers of cholinergic, serotonergic, glutamatergic and peptidergic signaling and studied their expression through whole-mount in situ hybridization in the model tapeworm *Hymenolepis microstoma* [18]. This allowed us to map for the first time the detailed localization of the perikarya of all the main nervous signaling systems using specific markers.

## 2. Materials and Methods.

### 2.1. Detection of genes related to classical neurotransmission in parasitic flatworms

We searched for genes involved in classical neurotransmission pathways on the predicted proteomes of parasitic flatworms with published genome sequences: *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, *Hymenolepis microstoma* and *Taenia solium* [20], *Clonorchis sinensis* [132], *Fasciola hepatica* [133], *Gyrodactylus salaris* [134], *Mesocestoides corti* (a tapeworm that was sequenced by the Wellcome Trust Sanger Institute in the context of the 50 Helminth Genomes Project using gDNA that was provided by our group), *Opisthorchis viverrini* [135], *Schistosoma japonicum* (*Schistosoma japonicum* Genome Sequencing and Functional Analysis Consortium, 2009 [136]), and *Schistosoma mansoni* [113]. For most species, we used the WormBaseParasite9 versions of the predicted proteome (WBPS9, downloaded on 16/11/2017, <https://parasite.wormbase.org/index.html>, [137]), except for *E. multilocularis*, *E. granulosus*, and *H. microstoma*, for which we used the original published versions (version 3). The gene models of *F. hepatica* and *S. japonicum* were in many cases too fragmented to use in global analyses, and we did not use these sequences in the rest of this work. For comparison, we included the proteome of the mollusk *Lottia gigantea* and the published proteins from *Aplysia californica* (both from UniProt (<http://www.uniprot.org/>, downloaded on 14/11/2017), as well as the proteome of the free living-flatworm *Schmidtea mediterranea* from SmedGD [138] ([http://smedgd.stowers.org/downloads/#Smed\\_Unigenes](http://smedgd.stowers.org/downloads/#Smed_Unigenes), downloaded on 16/02/2016). For *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* and *Homo sapiens* we used the UniProt reference proteomes (without isoforms, [https://www.ebi.ac.uk/reference\\_proteomes](https://www.ebi.ac.uk/reference_proteomes), downloaded on 11/03/2015).

We searched the predicted proteomes of flatworms and *Lottia gigantea*, using for each protein family the complement of sequences from the model organisms *D. melanogaster*, *C. elegans* and *H. sapiens* as queries in BLASTp searches [139], with an e-value cutoff of 10<sup>-5</sup>. This is a conservative cutoff, especially when taking into consideration that the queries from *H. sapiens* produced hits with e-values between 10<sup>-40</sup> and 10<sup>-180</sup> to their orthologs in *C. elegans*. Then, we removed the flatworm sequences that despite showing some similarity to the initial reference queries, actually belong to more distant protein subfamilies (for example, removing neuropeptide receptors from the set of amine GPCRs). For this, we applied a filter with a modified reciprocal BLASTp search using the flatworm sequences as queries against a protein database containing the complete reference proteomes of *D. melanogaster*, *C. elegans*, and *H. sapiens*. We then removed the flatworm sequences for which their best hit was not any of those used in the initial search. Because we observed

that several conserved proteins were absent from tapeworms (see sections 3.1 to 3.8), we also used the corresponding sequences that we identified in *S. mansoni* and *S. mediterranea* to search for additional proteins in the predicted proteome of tapeworms, but no additional proteins belonging to these clades were identified. For the final datasets, we also included additional experimentally characterized sequences from other invertebrate species. The complete fasta files including the original queries and the sequences from flatworms used in this work are included as Supplementary Data S1.

In some cases, we removed incomplete gene models that could hinder the alignment and further phylogenetic analyses. We conducted BLASTp searches using these sequences as queries against the reference proteomes of *D. melanogaster*, *C. elegans* and *H. sapiens* to determine if we had probably lost genes of interest at this step for the posterior phylogenetic analysis. We compiled those sequences and included them in a separate list of genes that are likely to be present in the genome of these parasites, but for which we could not provide phylogenetic evidence (these are coded in yellow in Figure 1). Furthermore, we searched for sequences that may have escaped the automatic gene predictions by searching the genomes by tBLASTn, using the reference proteins from *D. melanogaster*, *C. elegans* and *H. sapiens* as queries against the genomes of parasitic flatworms in which the predicted coding sequences were masked, with an e-value cutoff of 10<sup>-10</sup>. However, only very short gene fragments were found by this method, which did not allow us to confidently assign their identities.

## 2.2. Phylogenetic analysis

Protein sequences of each family were aligned using CLUSTAL OMEGA v1.2.4 [140]. At the same time alignments were done using MAFFT v7.3 [141], with the E-INS-i implemented algorithm. In both cases phylogenies were subsequently inferred using the maximum-likelihood method with an amino acid LG+G (with 8 substitution rate categories in the gamma distribution) model by means of PHYML v3.1 [142] with 5 random starting trees. The default SH-like test was used to evaluate branch supports in each analysis [143]. Both alignment methods were used as input for phylogenetic tree construction and results in highly similar branching patterns, thus only clustal phylogenetic trees were reported here (the few observed differences are indicated for each tree in the supplementary material).

### 2.3. Whole-mount *in situ* hybridization (WISH)

The life cycle of *H. microstoma* was maintained in collaboration with Jenny Saldaña and Mahia Minteguiaga, Laboratorio de Experimentación Animal, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay (“Mantenimiento del ciclo vital completo del cestodo *Hymenolepis microstoma* utilizando sus hospedadores naturales *Mus musculus* (ratón) y *Tribolium confusum* (escarabajo de la harina)”); protocol number: 10190000025215, Comisión Honoraria de Experimentación Animal, Uruguay), as previously described [18].

The worms were taken from infected mice and kept in phosphate-buffered saline (PBS). They were anesthetized on ice for 5 minutes and killed with 4% paraformaldehyde (PFA; prepared in PBS) at 90°C, to prevent them from contracting. The worms were then fixed in the 4% PFA solution overnight at 4°C, transferred to 100% methanol on the next day, and kept at -20 °C until further use. The specimens were finally cut with a scalpel into small fragments of approximately 0.5 to 1 cm of length. We performed fluorescent WISH on these fragments using digoxigenin-labeled probes, following the protocol described by Koziol et al. (2014) [144].

We generated probes for hm-pc2 [HmN\_000583100.1], hm-chat [HmN\_000095900.1], hm-tph [HmN\_000994100.1], hm-vglut [HmN\_000748900.1], and hm-npp-20.1 [HmN\_000462100.1] by RT-PCR amplification, cloning into the pGEM-T vector (Promega) and subsequent *in vitro* transcription, as previously described [144]. The primers used for RT-PCR are provided in Supplementary Table 1. For negative controls we used sense probes which did not give any signal (data not shown). DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) was used as a nuclear stain. All samples were analyzed using Leica TCS-SP5 and Zeiss Axio Observer Z1, LSM 800 confocal microscopes (Institut Pasteur Montevideo).

### 2.4. Whole-mount immunohistofluorescence.

Immunohistofluorescence of adult *H. microstoma* specimens was performed with anti-serotonin antibodies (Immunostar, diluted 1:300), following the protocol of Koziol et al (2013) [145]. The specimens were analyzed using a Leica SP5 confocal microscope (Institut Pasteur Montevideo).

### 3. Results.

We systematically searched the published genomes of flatworm parasites for enzymes involved in the synthesis of neurotransmitters, vesicular and reuptake transporters, and ionotropic and metabotropic receptors. All of these belong to a variety of protein families that contain different paralogs that are not involved in neurotransmission. In order to identify the specific clades to which these sequences belong we performed phylogenetic analyses for each protein family, including proteins from *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*, as well as experimentally characterized proteins from other organisms. Furthermore, we included the free-living flatworm *Schmidtea mediterranea*, and the mollusk *Lottia gigantea* as an additional lophotrochozoan for comparison [Supplementary figures 1-14]. Because some genomes from parasitic flatworms contain fragmented gene models, we also performed reciprocal BLAST searches of sequences that were too short to include in our phylogenetic trees, and searched the genomes by tBLASTn for genes that may not be included among the current gene models (see materials and methods, section 2.1). We summarize our results in Figure 1, and provide a detailed analysis of the proteins related to each neurotransmitter below.

			Lgi	Sme	Gsa	Sma	Csi	Ovi	Mco	Hmi	Tso	Egr	Emu	
Acetylcholine	Synthesis	ChAT	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
	Vesicular Transport	VACHT	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
	Ionotropic receptors	nAChR (LGIC)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
	Metabotropic receptors	mAChR (GPCR)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
Serotonin	Synthesis	TPH	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
		L-AADC*	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
	Vesicular Transport	VMAT*	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
	Reuptake	SERT	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
	Metabotropic receptors	5-HT-1/5 GPCR	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)
		5-HT-2 GPCR	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)
5-HT-4 GPCR		Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
	5-HT-7 GPCR	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
Dopamine	Synthesis	TH	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
		L-AADC*	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
	Vesicular Transport	VMAT*	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
	Reuptake	iDAT	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
	Metabotropic receptors	D1/D5 GPCR	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)
		D2/D3/D4 GPCR	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)
Invertebrate specific		Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
Tyramine & Octopamine	Synthesis	TDC	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
		TBH	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
	Vesicular Transport	VMAT*	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
	Reuptake	OAT	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
	Metabotropic receptors	Tyramine-1 GPCR	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)
		Octopamine $\alpha$ - GPCR	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)
Octopamine $\beta$ - GPCR		Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
Glutamate	Vesicular Transport	VGLUT	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
	Reuptake	EAAT	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
	Ionotropic receptors	iGluR	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
		GluCl LGIC	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
Metabotropic receptors	Glutamate GPCR	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)		
GABA	Synthesis	GAD	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
	Vesicular Transport	VIAAT	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
	Reuptake	GAT	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
	Ionotropic receptors	GABA LGIC	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	
	Metabotropic receptors	GABA GPCR	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	Present (Phylogeny)	

Present (Phylogeny)  
 Present (Short Fragment Blast)  
 Absent



**Figure 1. Conserved genes required for synthesis, vesicular transport, reuptake and reception of different neurotransmitters in flatworms.** For each neurotransmitter, the presence (green) or absence (red) of each gene is indicated according to the phylogenetic analyses presented in Supplementary Files 1-14. Short and fragmentary gene models were not included in the phylogenetic analyses, and were analyzed separately by reciprocal BLAST, as indicated in yellow (see materials and methods). Asterisks indicate genes that are shared by different neurotransmitter systems. Gene abbreviations are provided in the main text. Species abbreviations: *Lgi*, *L. gigantea*; *Sme*, *S. mediterranea*; *Gsa*, *G. salaris*; *Sma*, *S. mansoni*; *Csi*, *Clonorchis sinensis*; *Ovi*, *O. viverrini*; *Mco*, *M. corti*; *Hmi*, *H. microstoma*; *Tso*, *T. solium*; *Egr*, *E. granulosus*; *Emu*, *E. multilocularis*.

### 3.1. Acetylcholine

We could find all the conserved components required for cholinergic signaling in the genomes of flatworms, as well as in the mollusk *L. gigantea*. All analyzed flatworm species have an ortholog of choline-O-acetyltransferase (ChAT), the enzyme that catalyzes the single step required for the synthesis of ACh from choline [Supplementary figure S1]. Likewise, all species had a clear ortholog of the vesicular ACh transporter (VACHT), which is a member of the SLC18 family of transporters [146] [Supplementary figure S2]. In other animals, the gene that codes for VACHT is located within the first intron of the ChAT gene, and both genes share the first exon (i.e., they are actually alternative splicing isoforms of the same transcription unit, within the so-called cholinergic locus [105,147]). In all parasitic flatworms except the monogenean *G. salaris*, VACHT is closely adjacent to the 5' region of AChT in the assembled genome, and it is possible that a first shared exon exists but was not included by the automatic gene prediction methods since this first exon is non-coding in other animals. There are no known reuptake transporters of ACh in animals, as this neurotransmitter is hydrolyzed by the enzyme acetylcholinesterase in the synaptic cleft.

Acetylcholine signaling in animals is mediated by metabotropic receptors (mAChR) that belong to the group of amine receptors of the GPCR superfamily, and by ionotropic receptors of the Cys-loop LGIC superfamily that function as homo or heteropentamers [105,107,110,148]. All analyzed flatworms have several members of the clade of mAChR receptors [Supplementary Figure S3]. Furthermore, they all have members of different clades of cholinergic LGICs [Supplementary Figure S4]. Most of the cholinergic LGIC receptors in animals are excitatory. However, a group of inhibitory acetylcholine-gated chloride channels has been described in lophotrochozoans, including in the trematode *S. mansoni* [122,149]. Our phylogenetic analysis shows that members of this group are present in all analyzed flatworms [Supplementary Figure S4]. Indeed, among these

sequences, the vast majority have a conserved Pro-Ala dipeptide in the linker region between the M1 and M2 helices that is characteristic of anionic channels [122,150] (cationic channels typically have a glutamate residue in this linker region, and this residue was never found at this position among the putative acetylcholine-gated chloride channels of parasitic flatworms).

### 3.2. Serotonin

We could also identify all the components required for serotonergic signaling across flatworms and in the mollusk *L. gigantea*. Serotonin is synthesized from tryptophan in two steps that are catalyzed by the enzymes tryptophan hydroxylase (which is specific for serotonin synthesis) and aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC, which also has roles in other pathways, including in the synthesis of DA). An ortholog of tryptophan hydroxylase was found in all analyzed flatworms [Supplementary figure S5], although only small fragments of the gene could be found in the monogenean *G. salaris*. Furthermore, the ortholog of *S. mansoni* has been experimentally confirmed to be a bona fide tryptophan hydroxylase [129]. AADC could also be putatively identified in all analyzed flatworms (although note that the known and putative AADC sequences form a paraphyletic group in the phylogenetic tree of decarboxylases, and that an additional duplication is present in flatworms [Supplementary Figure S6]). Serotonin is transported into synaptic vesicles by the conserved vesicular monoamine transporter (VMAT), which also transports other monoamine neurotransmitters (DA, TA and OA) [109,151,152]. VMATs are part of the SLC18 family of transporters [146], and we could find clear orthologs of VMAT in all analyzed flatworms [Supplementary Figure S2]. Reuptake of serotonin is performed by SERT, a conserved clade of the SLC6 family (this family also contains other neurotransmitter transporters) [108,153,154]. An ortholog of SERT was previously characterized in *S. mansoni* [124], and ortholog sequences were also present in the genomes of all analyzed flatworms [Supplementary Figure S7].

There are several well conserved clades of amine GPCRs that are activated by serotonin [155]. All clades were found in the mollusk *L. gigantea*, but only some clades could be found in flatworms [Supplementary Figure S3]. One clade contains the 5-HT-7 receptors from vertebrates, and contains several receptors that have been shown to respond to serotonin in free-living and parasitic flatworms [125,128,156]. One or more members of this clade were found in all analyzed flatworms. Another conserve clade of serotonin GPCRs contains the vertebrate 5-HT-1 and 5-HT-5 receptors, and members of this clade are also found in all analyzed flatworms. An additional conserved clade that contains the 5-HT-2 receptors of vertebrates could only be identified in the planarian *S. mediterranea*, the monogenean *G.*

*salaris*, and the trematode *O. viverrini*. Finally, a clade that contains the 5-HT-4 was absent from all of the analyzed flatworm genomes.

In addition to the conserved serotonin GPCRs, some animals have serotonin-gated Cys-loop LGIC receptors. These are evolutionary novelties that are only found in particular animal groups, and consistently, no flatworm sequences were allied to these ionotropic serotonin receptors [Supplementary Figure S4].

### 3.3. Dopamine

The biosynthesis of DA starts with tyrosine, and requires two steps that are catalyzed by Tyrosine hydroxylase (TH, which is specific to DA synthesis) and AADC (an enzyme that is shared with the serotonin synthesis pathway, as described above). TH is present in the mollusk *L. gigantea*, the planarian *S. mediterranea*, the monogenean *G. salaris*, and in all analyzed trematodes (in particular, the TH ortholog of *S. mansoni* was characterized by Hamdan and Ribeiro (1998) [157]). However, the ortholog of TH is specifically absent from all tapeworms [Supplementary figure S5]. Similarly, only tapeworms lack orthologs of the invertebrate Dopamine Transporter (iDAT), a clade of the SLC6 family of transporters that is responsible for DA reuptake in invertebrates [108] [Supplementary Figure S7]. This transporter was characterized in *S. mansoni*, and shown to be a bona fide dopamine transporter [158]. Finally, all analyzed flatworms except tapeworms have orthologs of conserved clades of DA receptors of the GPCR amine group [106,109,126,159] [Supplementary Figure S3]. An additional dopaminergic GPCR receptor has been experimentally characterized in *S. mansoni*, as part of a group of flatworm-specific GPCRs that have duplicated and diverged extensively in *Schistosoma spp.* (the SmGPR clade [120]). However, tapeworms lack homologs of this group. Taken together, these results suggest that DA mediated signaling has been lost in tapeworms, but is present in all other flatworms. Note that VMAT, the vesicular transport for DA, is present in all analyzed flatworms as it also transports serotonin (see above).

### 3.4. Octopamine and tyramine

OA and its precursor TA serve as classical neurotransmitters in many animals, but are found as trace amines in vertebrates [109,160–162]. In their biosynthetic pathway, tyrosine is first decarboxylated to TA by Tyrosine Decarboxylase (TDC), and TA is then hydroxylated to Octopamine by Tyramine  $\beta$ -Hydroxylase (T $\beta$ H). These enzymes are present in all analyzed flatworms except tapeworms [Supplementary Figures S6 and S8]. Likewise, tapeworms lack a homolog of the OA reuptake transporter OAT, another member of the SLC6 family of transporters [108,163] [Supplementary Figure S7]. OA and TA are also transported into

synaptic vesicles by VMAT [104], which is present in all analyzed flatworms as it also transports serotonin (see above).

There are several clades of amine GPCRs that serve as receptors for OA and/or TA and are widely conserved in many bilaterian animals. According to the nomenclature of Bauknecht and Jekely (2017) [102], these include the Tyramine-1 and Tyramine-2 groups of receptors for TA, and the Octopamine- $\alpha$  and Octopamine- $\beta$  groups of receptors for OA. Additionally, a GPCR activated by OA has been described in *Drosophila melanogaster* [164], which is orthologous to  $\alpha$ 2-adrenergic receptors from vertebrates and other bilaterians. The relative specificities of these receptors for OA and TA are sometimes variable in different species [102,109,160,165]. Among flatworms, we could identify orthologs of the Tyramine-1 and Octopamine- $\beta$  receptors in the planarian *S. mediterranea*, the monogenean *G. salaris*, and in trematodes (although we couldn't find any Tyramine-1 receptors in *C. sinensis*). We additionally found an ortholog of Octopamine- $\alpha$  receptors in *S. mediterranea*. However, no orthologs of any of these receptors could be found in tapeworms [Supplementary Figure S3]. Together with the lack of specific transporters and biosynthetic enzymes for these neurotransmitters, our results suggest the loss of these neurotransmitters in tapeworms.

Until recently, adrenergic signaling has been considered to be absent in invertebrates. Adrenaline is synthesized from DA by a single reaction step catalyzed by Dopamine  $\beta$ -hydroxylase (D $\beta$ H), which is the invertebrate ortholog of T $\beta$ H. This enzyme can hydroxylate DA and TA in vitro, although with different efficiencies [166]. OA and TA are classically thought as the functional equivalents of adrenaline in invertebrates, and their receptors are closely related. However, orthologs of vertebrate  $\alpha$ 1-adrenergic and  $\alpha$ 2-adrenergic have been recently found in diverse invertebrate phyla, and shown to be most sensitive to adrenaline [102]. This suggested that adrenaline, OA and TA coexisted as neurotransmitters in the last bilaterian ancestor, and have been selectively lost in different lineages. Orthologs of adrenergic receptors are absent from the genomes of parasitic flatworms, but orthologs of  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 adrenergic receptors were found in the planarian *S. mediterranea* [Supplementary Figure S3].

### 3.5. Glutamate

The ubiquitous amino acid glutamate functions as a neurotransmitter in all animals with a nervous system, and we could find the central components of glutamatergic signaling in all analyzed flatworms. Glutamate is specifically packaged into synaptic vesicles by the vesicular glutamate transporter (VGLUT; a specific clade of the SLC17 family of transporters [104,111,153,167]), and is reuptaken from the extracellular space by the Excitatory Amino

Acid Transporters (EAATs, which are members of the SLC1 family of transporters [104,111,168]). Both transporters can be found in the genomes of all analyzed flatworms [Supplementary Figures S9 and S10].

Glutamate ionotropic receptors (iGluRs) constitute an independent superfamily of excitatory receptors, which includes the NMDA and non-NMDA families [103,111]. There are multiple members of both of these groups of iGluRs in all of the analyzed flatworm genomes [Supplementary Figure S11]. In addition, several homologs of the conserved metabotropic glutamate GPCRs [111,169–171] are also present in the genomes of all analyzed flatworms [Supplementary Figure S12]. One of these receptors from *S. mansoni* has been functionally confirmed to be activated by glutamate [127]. Finally, we also searched for glutamate-gated chloride channels of the Cys-loop LGIC superfamily. Such inhibitory ionotropic receptors for glutamate are absent from vertebrates, but can be found in several animal phyla, and evolved convergently in nematodes and different lophotrochozoan phyla [172,173]. Among these, a group of glutamate-gated chloride channels has recently been described in the trematode *S. mansoni*, and close homologs were identified in other trematodes and in tapeworms [118]. In this work, we additionally confirmed the presence of members of this group of receptors in all of the analyzed flatworm genomes [Supplementary Figure S4]. Among flatworm glutamate-gated LGICs, one particular arginine residue within loop A of the principal face of the extracellular domain was proposed to be required for glutamate binding [174]. This residue was conserved in all sequences from this clade, except two receptors from *G. salaris*, suggesting that these are true glutamate receptors. Therefore, all analyzed flatworms have the molecular machinery required for glutamate-mediated neurotransmission, which would include a diverse array of excitatory and inhibitory receptors.

### 3.6. GABA

GABA is an inhibitory neurotransmitter in many animal phyla [107,114,175]. Evidence of the presence of GABA in the nervous system of some trematodes and flatworms has also been reported in the past [176–178]. However, to our surprise, we could only find homologs of the genes required in other animals for GABAergic signaling in the mollusk *L. gigantea*, the planarian *S. mediterranea* and the monogenean *G. salaris*. In contrast, all of these genes were absent in the genomes of trematodes and tapeworms. This included the enzyme glutamate decarboxylase (GAD), which is required for the main biosynthetic route for GABA in the nervous system of animals [Supplementary Figure S6]. An alternative route for GABA synthesis from putrescine has been described in specific regions and developmental stages in the nervous system of mammals [179]. However, ornithine decarboxylase, which is

required for putrescine synthesis, is also absent from the genomes of parasitic flatworms (data not shown). Likewise, the levels of putrescine in the tissues of these parasites have been shown to be extremely low [180].

Vesicular transport of GABA occurs in most GABAergic cells by the vesicular inhibitory amino acid transporters (VIAAT), which constitute the SLC32 family of transporters [104,153,181]. These transporters are similar to those of the SLC36 and SLC38 families, and we included all three families in our phylogenetic analyses. Among flatworms, phylogenetic analyses only identified orthologs of VIAAT in the planarian *S. mediterranea* and the monogenean *G. salaris*, but not in tapeworms and trematodes [Supplementary Figure S13]. On the other hand, there is one conserved clade among SLC6 transporters involved in GABA reuptake in animals (this clade includes the neuronal GAT1 protein of vertebrates; note that additional GABA transporters of the SLC6 family are present in other cell types in vertebrates, but appear to be evolutionary novelties from an expansion of another branch of SLC6 transporters [104,114,153,154]). As with GAD, an ortholog of GAT1 is found in the planarian and monogenean genomes, but not in trematodes and tapeworms [Supplementary Figure S7].

Conserved receptors for GABA in animals include GABA GPCRs which are most closely related to glutamate GPCRs, as well as inhibitory Cys-loop LGIC receptors that are similar to the glutamate-gated chloride channels [107,110,114]. Phylogenetic analyses indicated that orthologs of known GABAergic GPCRs are present in the mollusk *L. gigantea* and in the planarian *S. mediterranea*, but are absent from parasitic flatworms [Supplementary Figure S12]. On the other hand, orthologs of GABA-responsive LGICs are present in *L. gigantea*, *S. mediterranea* and *G. salaris*, but absent from trematodes and tapeworms (similar results were described for *S. mansoni* by Dufour et al. (2013) [118]) [Supplementary Figure S4].

### 3.7. Histamine

Histamine (HA) serves as a neurotransmitter in vertebrates and is also known to be a neurotransmitter in the model mollusk *Aplysia californica* and in *D. melanogaster* [182]. However, it is probably absent in *C. elegans* [109] and its roles as a neurotransmitter in invertebrates are less well characterized. HA is synthesized from histidine in a single reaction catalyzed by Histidine decarboxylase (HDC). Surprisingly, HDC could only be found in the mollusk *L. gigantea*, and is absent from all analyzed flatworm genomes [Supplementary Figure S6]. Vesicular transport of HA is carried out by VMAT, and no high affinity transporters for histamine reuptake have been characterized [107,151]. Therefore, it is not possible to search for additional specific markers of HA signaling.

The best characterized receptors for HA are specific amine GPCRs (H1-H4 receptors) in vertebrates, and two inhibitory Cys-loop LGICs in *D. melanogaster* that are related to GABA ionotropic receptors [182,183]. Interestingly, clear orthologs of the vertebrate H1 and H3-H4 groups of GPCRs were found in the mollusk *L. gigantea* [Supplementary Figure S3], suggesting that GPCR mediated HA signaling may be ancestral in bilaterians. No ortholog of these HA receptors were found in flatworms. However, two HA receptors have been experimentally characterized in the trematode *S. mansoni*, as part of the flatworm-specific SmGPR clade (that also contains DA-responsive receptors, but is absent in tapeworms, as described above) [119,121].

### 3.8. Purinergic signaling

In addition to its many metabolic roles, ATP serves as a chemical messenger in both synaptic and non-synaptic signaling. In mammals, ATP is stored into synaptic vesicles by the vesicular nucleotide transporter (VNUT), a member of the SLC17 family of transporters [167,184]. Orthologs have been found in diverse invertebrate models, but have not been functionally characterized yet [184]. Orthologs of VNUT could be found in the mollusk *L. gigantea* and in most flatworms, but are surprisingly absent from the assembled genomes of taeniid cestodes (*E. granulosus*, *E. multilocularis*, and *T. solium*) [Supplementary Figure S9]. ATP receptors include the ionotropic P2X receptors, which are an ancient and independent family of ATP-gated channels [112]. Several members of this family are found in all analyzed flatworms [Supplementary Data S2], and one member has been characterized in the trematode *Schistosoma mansoni* [185]. In contrast, purinergic receptors of the P2Y GPCR group are absent from flatworms (data not shown), and to the best of our knowledge, are vertebrate-specific.

### 3.9. Expression of markers of neurotransmitter pathways in *Hymenolepis microstoma*.

We determined the expression patterns of genes specifically involved in individual neurotransmitter pathways that we could find in the genome of the tapeworm *H. microstoma*. We chose orthologs of ChAT, TPH and VGLUT as possible markers of cholinergic, serotonergic and glutamatergic cells, respectively. In addition, we were interested in comparing these markers of classical neurotransmitter pathways with a marker that would label the majority of peptidergic cells (ideally, a marker required for the processing of the majority of the neuropeptides that we previously described in *H. microstoma* [79]). Most neuropeptides are processed from longer precursors by proprotein convertases of the PC1/3 and PC2 families [186]. Our phylogenetic analysis showed that

only PC2 is found in parasitic flatworms [Supplementary Figure S14], and a PC2 homolog has been shown to be widely expressed in the nervous system of planarians [67,187], making it a promising candidate. Note however that some neuropeptides may not require cleavage or may be cleaved by additional proteases. Therefore, some peptidergic cells may not be labeled by this marker. We describe the results for each marker below (Figures 2 to 6), and a graphical summary of all expression patterns is provided in Figure 7.

### 3.9.1. Expression of *hm-pc2* as a peptidergic marker

The *H. microstoma hm-pc2* gene shows extensive expression in the nervous system (Figure 2). Indeed, of all the expression patterns that we investigated, it is the one that most completely recapitulates the anatomical description of the nervous system by Webb and Davey based on electron microscopy of serial sections [32]. In the scolex (head) the nervous system has a three-tiered structure that comprises: the paired cerebral ganglia surrounding the main (cerebral) transverse commissure; a pair of rostellar ganglia within the rostellar sac; and a single rostral ganglion within the rostellar bulb (Figure 2A, Figure 7). All of these structures contain numerous *hm-pc2* + cells, and in the case of the cerebral ganglia and commissure, the cell bodies are clearly located in the periphery, surrounding the central neuropile. The cerebral ganglia have dorsal and ventral projections, the so called anterior cerebral nerves, which run between the suckers and also have associated *hm-pc2*+ positive cell bodies. Within the suckers, only a few positive cells were found.

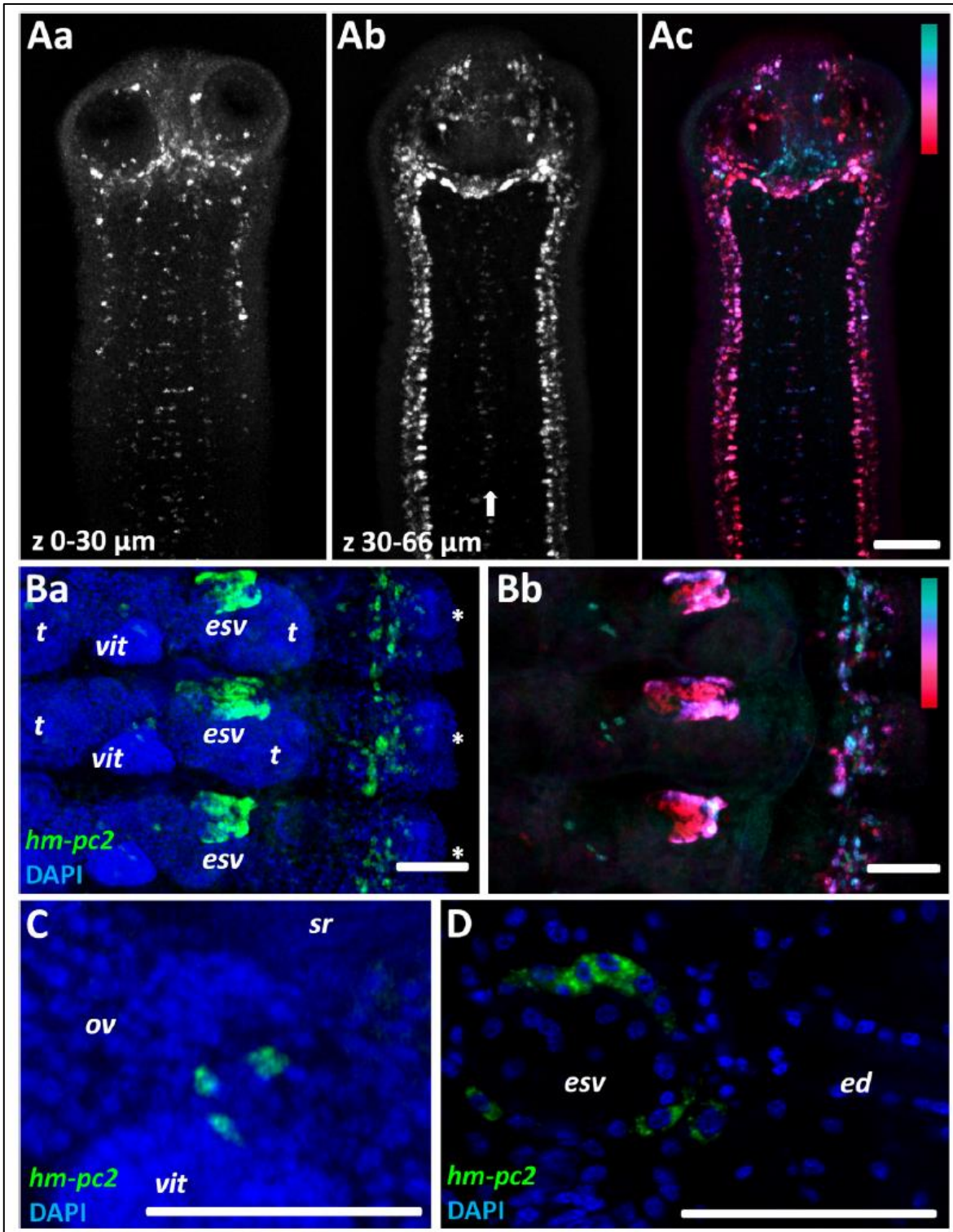
In the posterior of the scolex, the cerebral ganglia transition smoothly into the lateral nerve cords of the neck and segments (also known as the main longitudinal nerve cords) (Figure 2A). In these nerve cords, *hm-pc2*+ cell bodies surround a central region that contains the nerve fibers. The dorsal and ventral pairs of medial nerve cords also arise from the cerebral ganglia, and have numerous small *hm-pc2*+ cell bodies. At the dorsal and ventral midlines between these medial nerve cords, many small *hm-pc2*+ cells are found with bipolar projections that form the delicate transverse commissures linking the nerve cords [188].

In the chain of segments (strobila), weakly positive cells can also be seen in the ring commissures that link the nerve cords (an anterior, median, and posterior commissure is present in each segment, as described with other markers in *Hymenolepis diminuta* [189,190](data not shown). Many small *hm-pc2* + cells are found in the nerve plexus that innervates the genital atrium and pore in each segment (Figure 2B). Additional positive cells appear in nervous structures that are associated with the developing reproductive system, including two to three *hm-pc2*+ cells that are located in the proximity of the ovary and vitelline gland, next to the ootype (Figure 2C).



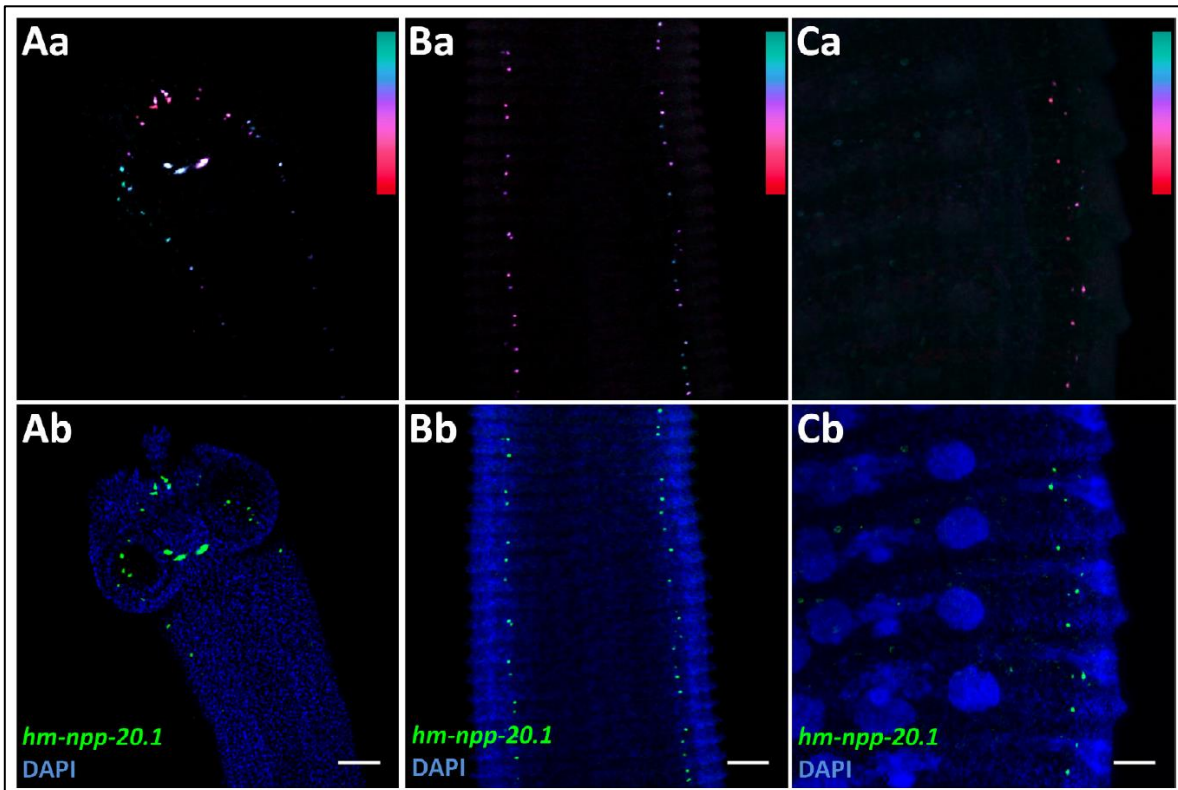
Interestingly, we could also detect *hm-pc2* expression in two cell populations that are probably non-neuronal. On the one hand, there is a population of *hm-pc2*<sup>+</sup> cells located in a row in the center of the germinative neck region (indicated by an arrow in Figure 2A). These cells are only inherited by some of the developing segments as these are formed in the posterior neck. On the other hand, strong expression is also seen in the cells of the wall of the external seminal vesicle (Figure 2B, 2D). These additional sites of expression suggest that peptides processed by PC2 may have additional, non-nervous roles in cestode development and reproduction (see the discussion).

In comparison, we also analyzed the expression of the neuropeptide precursor gene *hm-npp-20.1* (Figure 3). This is one of six paralogs of Neuropeptide F precursors that are present in the genome of *H. microstoma* [79], and we chose this particular gene because it is the ortholog of *Moniezia expansa* NPF (MeNPF), the first neuropeptide isolated from any parasitic flatworm [191]. Antibodies against MeNPF have been extensively used for the detection of peptidergic cells in different flatworms [192]. In contrast to the abundance of *hm-pc2*<sup>+</sup> cells, *hm-npp-20.1* is only expressed in a few cells in the scolex: three to four large cells in the main transverse commissure and four to eight cells in the rostellar sac. It is also expressed by few cells in the lateral nerve cords, but not in any other nervous or non-nervous structures (Figure 3).



**Figure 2.** WISH of *hm-pc2* in *H. microstoma* adults. A. Scolex and neck (A1, maximum intensity projection of the dorsal-most focal planes (0-30  $\mu\text{m}$ ) showing the medial nerve cords; A2, maximum intensity projection of focal planes in the middle region (30-66  $\mu\text{m}$ ) showing the main lateral nerve cords, rostral ganglion, rostellar ganglia, cerebral ganglia and cerebral commissure; notice the *hm-pc2* positive cells in the middle of the neck region as well (arrow); A3, maximum intensity projection of the complete z-stack with color-coded depth). B.

Mature segment (B1, maximum intensity projection of WISH (green) and DAPI nuclear staining (blue); B2, maximum intensity projection of WISH with color-coded depth). C. Detail of *hm-pc2* positive cells in the vicinity of the vitelline gland and ovary (green, WISH; blue, DAPI). D. Detail of a section of an immature segment showing *hm-pc2* positive cells in the external seminal vesicle (green, WISH; blue, DAPI). Abbreviations: *ed*, ejaculatory duct; *esv*, external seminal vesicle; *ov*, ovary; *sr*, seminal receptacle; *t*, testis; *vit*, vitelline gland. The asterisks mark the position of genital pores. Bars: 50  $\mu$ m.

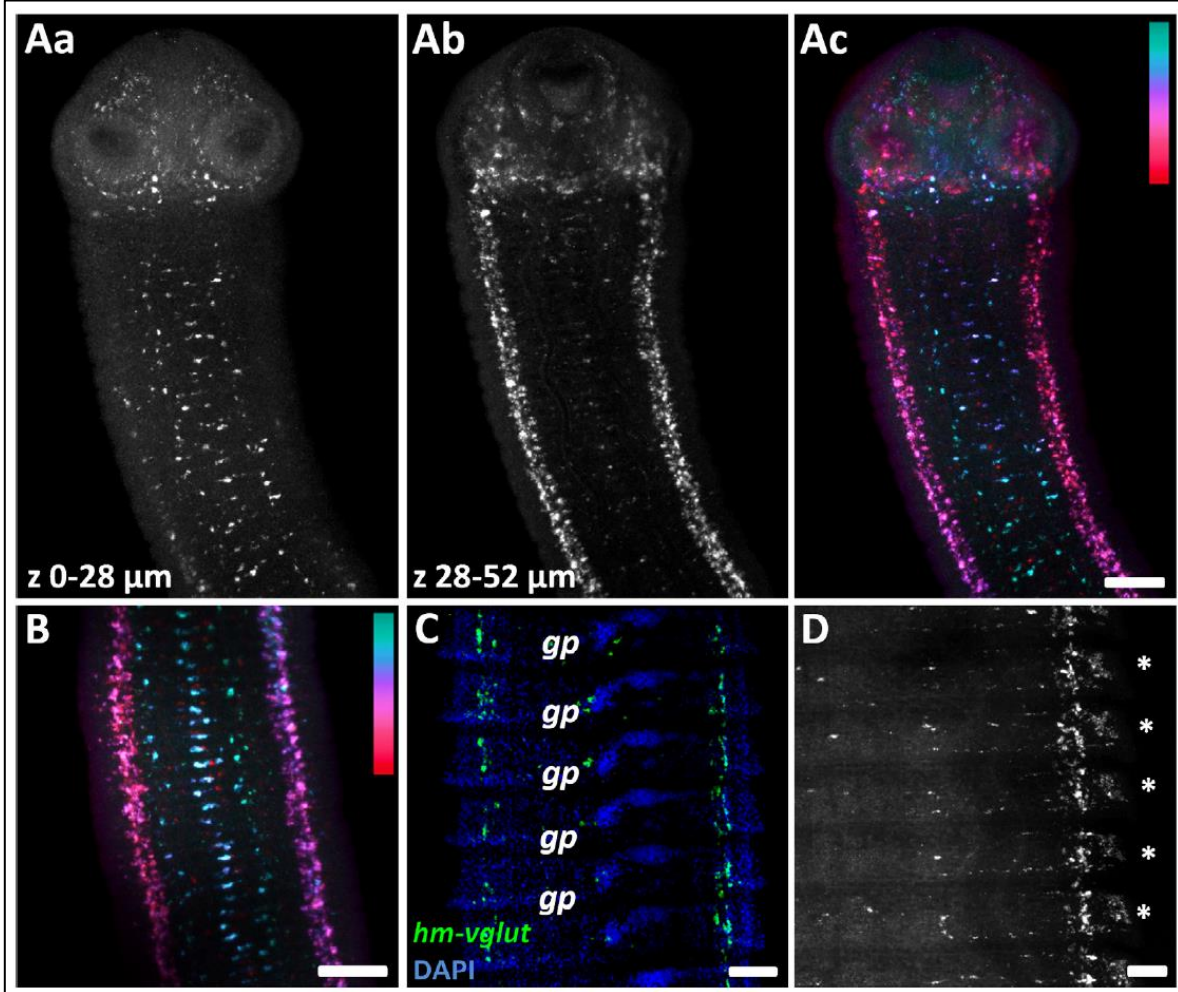


**Figure 3.** WISH of *hm-npp-20.1* in *H. microstoma* adults. A. Scolex and neck. B. Immature segments. C. Mature segments. In all cases, the top panel shows maximum intensity projections of WISH with color-coded depth, and the bottom panel shows maximum intensity projections of WISH (green) and DAPI (blue). Bars: 50  $\mu$ m.

### 3.9.2. Expression of *hm-vglut* as a glutamatergic marker

This gene is expressed in numerous cells in the nervous system, including the cerebral ganglia and cerebral commissure, the rostellar ganglia, the main longitudinal and medial nerve cords, and the transverse and ring commissures of the neck and strobila (Figure 4A, 4B).

In the developing reproductive system, expression is also seen in the cells of the plexus surrounding the genital atrium and pore, and in a few dorsal and ventral cells that are associated with the male and female reproductive organs, respectively (Figure 4C, 4D).



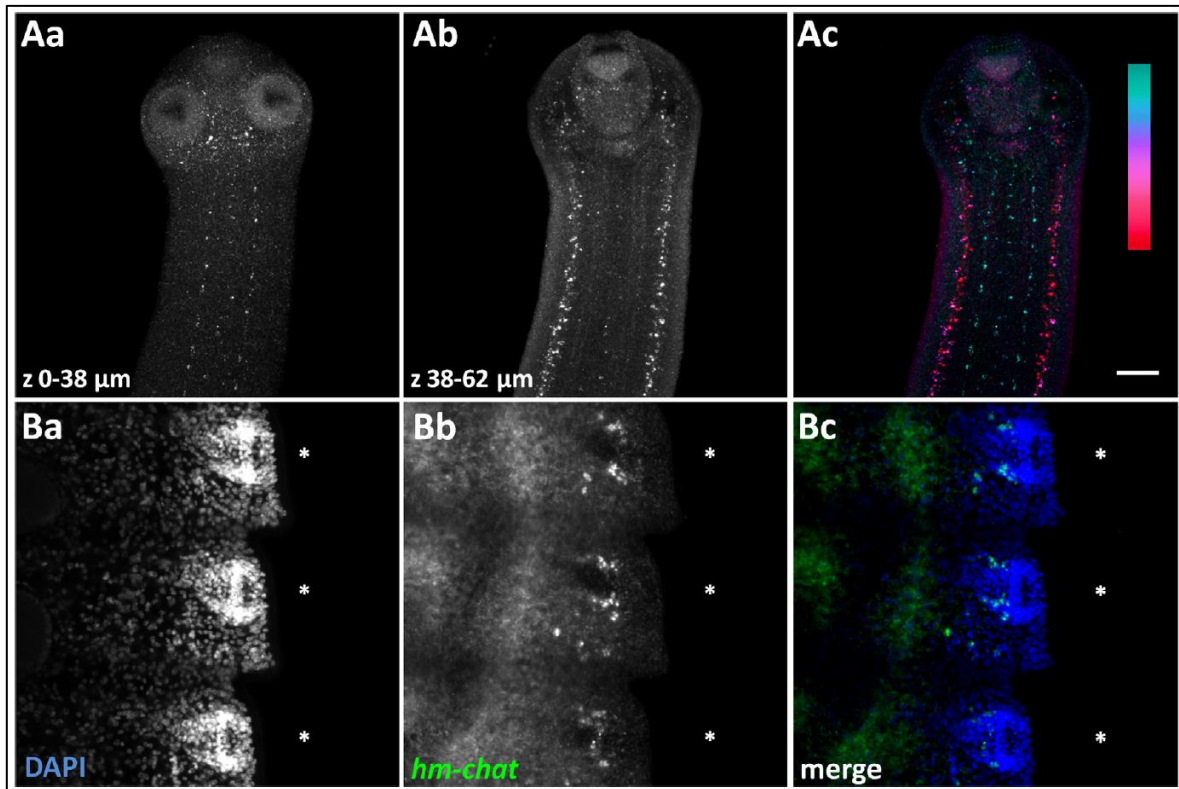
**Figure 4.** WISH of *hm-vglut* in *H. microstoma* adults. A. Scolex and neck (A1, maximum intensity projection of the dorsal-most focal planes (0-28  $\mu\text{m}$ ) showing the medial nerve cords; A2, maximum intensity projection of focal planes in the middle region (28-52  $\mu\text{m}$ ) showing the main lateral nerve cords, rostellar ganglia, cerebral ganglia and cerebral commissure; A3, maximum intensity projection of the complete z-stack with color-coded depth). B. Early immature segments (maximum intensity projection with color-coded depth). C. Later immature segments with developing genital primordia (gp) (maximum intensity projections of WISH (green) and DAPI (blue)). D. Mature segments, right side. The asterisks mark the position of genital pores. Bars: 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.9.3. Expression of *hm-chat* as a cholinergic marker

Although *hm-chat* expression is found in most of the nervous structures of the adult, the number of cells that express this gene in each region is relatively low. Most *hm-chat*<sup>+</sup> cells

can be found at the base of the suckers, in all nerve cords, and in anterior nerves and transverse commissures (Figure 5A). In contrast, very few positive cells can be found in the ganglia of the scolex or in the cerebral commissure.

In mature segments, positive cells are also found in the nerve plexus surrounding the genital atrium and the genital pore (Figure 5B).



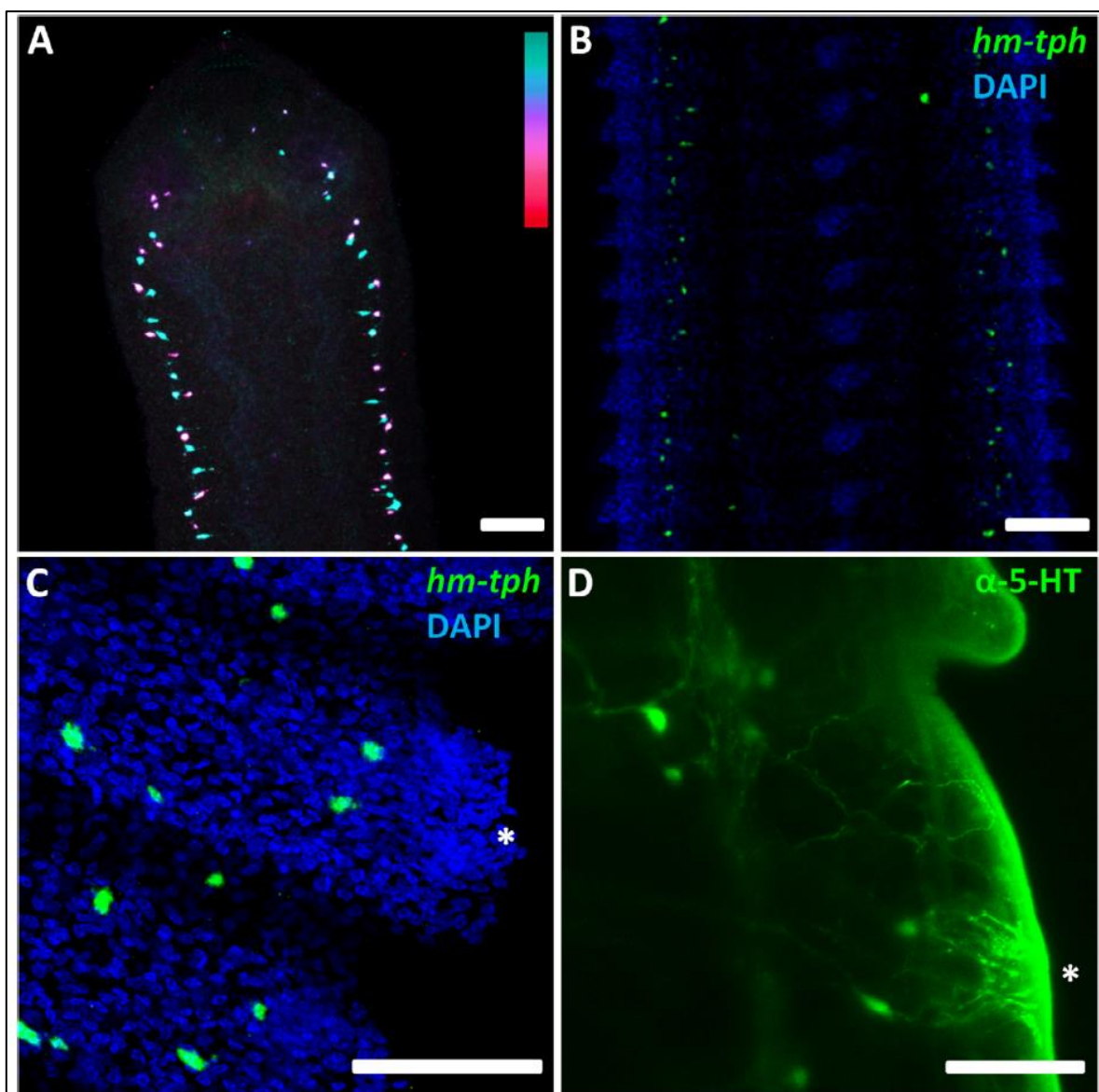
**Figure 5. WISH of *hm-chat* in *H. microstoma* adults.** A. Scolex and neck (A1, maximum intensity projection of the dorsal-most focal planes (0-38  $\mu\text{m}$ ) showing the medial nerve cords; A2, maximum intensity projection of focal planes in the middle region (38-62  $\mu\text{m}$ ) showing the main lateral nerve cords, rostellar ganglia, cerebral ganglia and cerebral commissure; A3, maximum intensity projection of the complete z-stack with color-coded depth). B. Mature segments, right side. The asterisks mark the position of genital pores (B1, DAPI; B2, WISH; B3, merge with DAPI in blue and WISH in green). Bars: 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.9.4. Expression of *hm-tph* as a serotonergic marker

Of all the markers investigated in this work, *hm-tph* is expressed in the fewest cells. Almost all of the *hm-tph*<sup>+</sup> cells are found along the lateral nerve cords and at their initial portion adjacent to the cerebral ganglia (Figure 6A, 6B). Very few positive cells are seen in the rostellar ganglia, and only one weakly positive cell is found in the main transverse commissure. No expression is seen in the medial nerve cords or in the transverse and ring

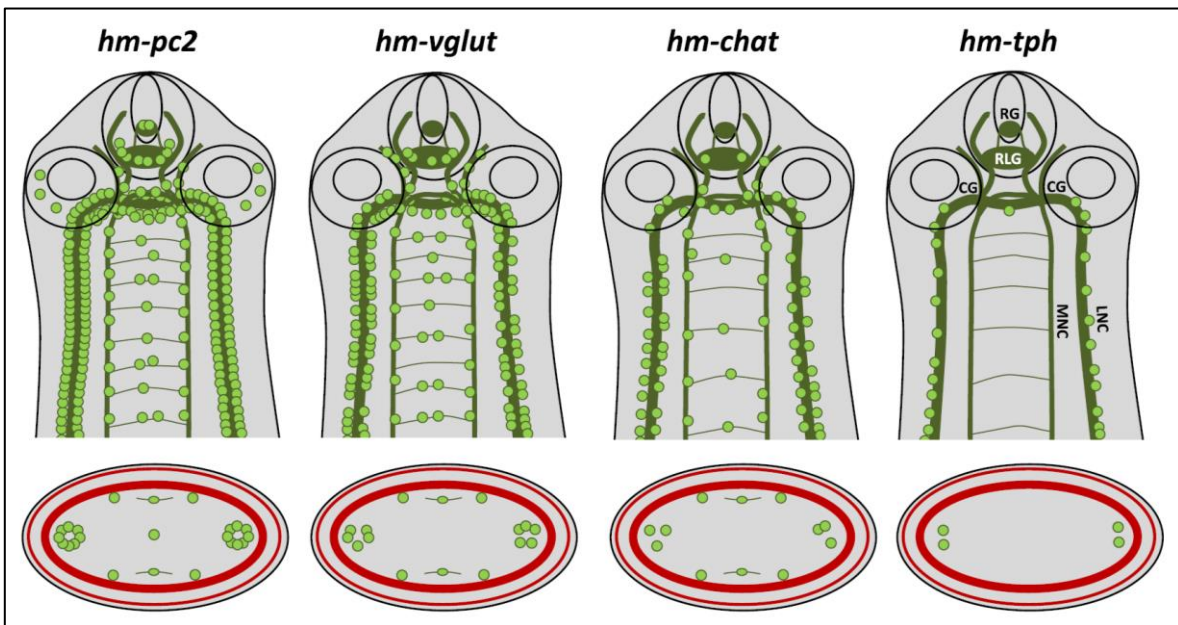
commissures. In mature segments, two to three positive cells are found at the base of the cirrus sac (Figure 6C).

Staining with an anti-serotonin polyclonal antibody shows an identical localization of the positive cell bodies as that obtained with WMSH for *hm-tph*, but also demonstrates their projections (Figure 6D and Koziol (2017) [10]; see also similar results published for anti-serotonin staining in *Hymenolepis diminuta* [188]). These projections run through all of the main nerve cords and commissures, and also innervate the genital pore (Figure 6D and data not shown).



**Figure 6. WISH of *hm-tph* and anti-serotonin immunoreactivity in *H. microstoma* adults.** A. Scolex and neck (WISH, maximum intensity projection with color-coded depth showing the main lateral nerve cords). B.

Immature segments (maximum intensity projection of WISH (green) and DAPI (blue)). C. WISH of mature segments, right side. The asterisks mark the position of genital pores (WISH in green, DAPI in blue). D. Anti-serotonin immunohistofluorescence of mature segments (right side). Notice the pair of positive cells associated with the genital pore in C and D. Bars: 50  $\mu$ m.



**Figure 7. Summary of WISH expression patterns obtained in this work.** The top panel shows the expression in the scolex and neck (light-green circles on top of a dark green diagram of the nervous system), and the bottom panel shows a cross section of the neck (red indicates the position of the external and inner muscle layers). Abbreviations: CG, cerebral ganglia; LNC, lateral nerve cords; MNC, medial nerve cords; RG, rostral ganglia; RLG, rostellar ganglia.

#### 4. Discussion

Work on model species from different phyla has shown that the molecular components required for neurotransmitter synthesis, transport and reception are remarkably conserved in bilaterian animals. However, our work clearly indicates that many of these components were lost in tapeworms, and in some cases also in other flatworms. The databases that we used for our analyses includes high-quality genome assemblies obtained with different sequencing technologies [113,193], and the results are largely identical among different species of tapeworms and trematodes. Furthermore, for every neurotransmitter in each species, all the specific components of the pathway were either present or absent simultaneously, with few exceptions. These exceptions are found only in genome

assemblies of lower quality, and may be due to insufficient coverage. The generation of genome assemblies from additional flatworm species, together with continued improvements on currently existing genome assemblies and gene predictions will be important to confirm or refute our results.

Therefore, our results imply that several neurotransmitters were either lost from these species, or that the pathways that are required for their synthesis, transport and reception are completely different between these species and other animals. Either conclusion would have important consequences for our understanding of the biology of parasitic flatworms, and for the search of novel anthelmintics targeting the neuromuscular system. However, there are several reasons why it is not possible to decide between both alternatives solely on the basis of *in silico* data. In particular, although neurotransmitter pathways are largely conserved among bilaterian animals, there are several exceptions. These exceptions are based on the promiscuity of some of the components, and from non-orthologous gene displacement of others. One well studied example are the trace amines in vertebrates, which include TA and OA [162]. Although vertebrates have lost the TDC enzyme, they produce very low levels of TA from tyrosine in a reaction catalyzed by AADC (a paralog of TDC), albeit less efficiently. They also produce trace levels of OA from TA through the D $\beta$ H enzyme. Vertebrates lack the TA and OA receptors found in other animals, and although OA and TA do not function as classical neurotransmitters in vertebrates, TA is a ligand for the Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1), a member of an unrelated group of vertebrate-specific GPCRs. Additional examples of novel, clade-specific receptors for known neurotransmitters are the TA-gated and DA-gated Cys-loop LGIC receptors from *C. elegans* [194], and the *Sm-GPR* clade of GPCRs from *S. mansoni* [119,120], which includes novel DA and HA receptors. Substrate promiscuity and changes in substrate specificity may also occur among transporters. For example, VMAT2 has been proposed to transport GABA in specific nerve cells in mammals [195]. Similarly, *Drosophila* lacks the OAT transporter, and OA has been proposed to be reuptaken by other transporters in this species [104,160].

In the case of flatworms, there are other uncertainties that make this question even more complex. On the one hand, our analyses suggest that there are entire clades of receptors and transporters with unknown specificities that are only found in flatworms and other lophotrochozoans. Two good examples are the sister groups to the VGLUT and VNUT receptors, with members that are only found in flatworms and *Lottia gigantea* [Supplementary Figure S10]. Likewise, there are many lophotrochozoan and flatworm-specific GPCRs with similarity to amine receptors [Supplementary Figure S3] as well as Cys-loop LGICs [Supplementary Figure S4]. Additionally, parasitic flatworms may obtain some neurotransmitters from their host. For example, high-affinity tegumental transport of serotonin in *Hymenolepis diminuta* was demonstrated *in vitro* [196]. The source of HA in *S.*



*mansoni* has also been hypothesized to be from the host rather than from the parasite [117]. If true, this may explain the presence of a HA receptor in the absence of the HA synthesis pathway, and would indicate that HA sensitivity evolved convergently for this GPCR.

The best characterized neurotransmitters in parasitic flatworms are ACh, serotonin and glutamate [100]. Their presence in the tissues of tapeworms is well documented from different species, as is their activity on muscle contractility. Our results are in good agreement, as the required synthetic enzymes, transporters and receptors are present in all analyzed flatworms. In contrast, reports on the presence of other neurotransmitters in flatworms are more variable and species-dependant. In the case of tapeworms, many studies that searched for biogenic amines were unable to identify DA, TA or OA, or found them only in small amounts [197,198]. In the tapeworm *Diphyllobothrium dendriticum*, DA could be found in larger amounts, and its precursor L-DOPA was highly abundant in gravid proglottids [199]. In these proglottids, L-DOPA is synthesized by the enzyme Tyrosinase during the process of quinone tanning of the eggshells [200]. We were able to find an ortholog of tyrosinase in the draft genome of the related species *Diphyllobothrium latum* ([137]; data not shown). However, eggshell tanning is absent from higher cestodes [200], and the gene was concordantly absent from the genomes of *Echinococcus spp.*, *T. solium*, *H. microstoma* and *M. corti* (data not shown). The data that is most contradictory with our results is that from Ribeiro and Webb (1983) [198], who provided evidence for the synthesis of TA and OA from tyrosine by adults of *Hymenolepis diminuta in vitro*. To the best of our knowledge, this is the only report of TA and OA synthesis in any tapeworm, and it would be very interesting to replicate these results in this and additional species with modern methods that can directly confirm the identity of the neurotransmitters, such as liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry or to fast-scan cyclic voltammetry detection [201,202].

The absence of genes required for GABA synthesis, transport and reception in the genomes of trematodes and tapeworms was particularly surprising. GABA-like immunoreactivity has been described in the nervous system of some trematodes and tapeworms [177,178,203]. Furthermore, glutamate decarboxylase (GDC) activity was biochemically detected in extracts of *S. mansoni* [178], but we were unable to find an ortholog of GDC in its genome. It is possible that another decarboxylase is the source of this activity, but its identity and its relevance *in vivo* is unclear. On the other hand, GDC activity was reported to be absent from extracts of the tapeworm *Moniezia expansa* [204].

WISH expression analysis of *H. microstoma* allowed us to easily localize cells involved in different neurotransmitter systems with great detail and specificity. However, one

drawback of this strategy is that only the perikarya are labeled (where the mRNA are located), but not the projections of these cells. Antibodies against epitopes that are conserved within these validated markers across parasitic flatworms would be a highly convenient tool. Although all of the marker genes were expressed in the nervous system, their expression patterns were different from each other. Orthologs of ChAT and TPH were expressed in relatively few cells, which were mostly absent from the main nervous ganglia. Their localization was congruent with previous immunofluorescence and histochemical studies of serotonergic and cholinergic cells in different species of *Hymenolepis* [188,190]. In contrast, the ortholog of VGLUT was widely expressed in a large number of cells in the nervous system. Because of the ubiquity of glutamate in all tissues, antibodies against glutamate typically give a relatively strong background (for example (Webb and Eklove, 1989 [205])), and the use of VGLUT as a marker is a significant improvement for the localization of glutamatergic cells. Although ACh is the fast-acting excitatory neurotransmitter in the neuromuscular junction of vertebrates and nematodes [105,107], neuromuscular transmission mediated by glutamate is typical in insects [206,207], and both cholinergic and glutamatergic neurotransmission has been reported in mollusks [208]. In combination with the known myoexcitatory effects of glutamate and the myoinhibitory effects of ACh on muscle activity in tapeworms [100], our data suggest that glutamate could signal directly on the muscle fibers of tapeworms, perhaps as a fast neurotransmitter.

On the other hand, the proprotein convertase PC2 served as an excellent marker for the nervous system. Because PC1/3 is absent from parasitic flatworms, its expression should label the majority of peptidergic cells. Antibodies against MeNPF have also been extensively used to describe peptidergic cells in many parasitic flatworms, providing great detail of the anatomy of their nervous systems[100,209]. It is likely that the antibody cross-reacts with several NPF paralogs and with other neuropeptides that have the common C-terminal RF-amide motif [210]. However, unlike PC2, it would not label peptidergic cells that produce other neuropeptides. Co-release of classical neurotransmitters and neuropeptides is typical in neurons of model animals, but has not been demonstrated in parasitic flatworms. Double immunostaining for MeNPF and serotonin has usually shown little co-localization in different flatworm species [97], and in the future it will be interesting to determine if the more general peptidergic marker PC2 is co-localized with classical neurotransmitters.

Interestingly, we found expression sites for *hm-pc2* outside the nervous system, indicating that PC2 could process peptides that serve other roles besides neural transmission. The *hm-pc2*<sup>+</sup> cells in the neck are particularly interesting. These cells may correspond to the so-called unicellular endocrine cells that were described by Specian et al. (1979) [37]. Their localization could indicate a role of these cells in regulating proliferation and development in the neck germinative region. In addition, there was a very conspicuous expression of hm-

pc2 in cells surrounding the external seminal vesicle, suggesting that these cells may produce and secrete a substance that is stored together with the spermatozoa. Little is known about accessory male reproductive glands in tapeworms, and none had been previously described in *Hymenolepis spp.* Unicellular accessory glands have been described in the cestode *Cylindrotaenia hickmani* [211], and these cells secrete electron-dense particles that adhere to spermatozoa in the lumen of the external sperm duct. Thus, it is possible that seminal secretions of tapeworms include peptides that are transferred during insemination. In *Drosophila melanogaster*, the peptide Acp70A (also known as sex peptide) is produced in the male accessory glands and is transferred (attached to the spermatozoa) to the female during mating. In the female, it is released and interacts with the myoinhibitory peptide receptor that is expressed in the female reproductive tracts, inducing post-mating responses such as decreased receptivity to mating and increased egg production [212,213]. It is tempting to speculate that the secretions of the accessory male glands could have analogous functions on post-mating regulation of the female reproductive system in tapeworms.

**Declarations of interest:** none

### **Acknowledgments**

This work was supported by CSIC (Uruguay), Dirección para el Desarrollo de la Ciencia y el Conocimiento (D2C2, Uruguay, Grant Number FVF2017/014) and PEDECIBA (Uruguay). M.P. was the recipient of a M.Sc. fellowship from ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay).

### **Legend to Supplementary Figures**

**Supplementary Figure S1.** Maximum Likelihood phylogenetic analysis of Choline-O-acetyltransferases and related sequences. Numbers next to nodes represent branch support values. In all phylogenetic trees included as supplementary figures, the species of origin of the sequences are represented as follows: mollusks are indicated with black circles, planarians with blue circles, the monogenean *Gyrodactylus salaris* with magenta circles, trematodes with red circles (gene codes starting with Smp indicate sequences from *S. mansoni*; Csin indicates *C. sinensis*; and T265 indicates *O. viverrini*), and cestodes with green circles (gene codes starting with MCOS indicate sequences from *M. corti*; HmN indicates *H.*

*microstoma*; EgrG indicates *E. granulosus*; EmuJ indicates *E. multilocularis*). We indicate with different colors the neurotransmitter pathways to which the sequences may belong, based on experimentally characterized members of each clade, according to the following color code: cholinergic signaling (green), serotonergic signaling (red; note that components that are also shared by other pathways have been colored in red exclusively), histaminergic (light blue), tyraminergetic/octopaminergic (orange), dopaminergic (yellow), GABAergic (blue), glutamatergetic (purple). Numbers next to nodes represent branch support values.

**Supplementary Figure S2.** Maximum Likelihood phylogenetic analysis of Solute Carrier Family 18 (SLC18) transporters. Numbers next to nodes represent branch support values.

**Supplementary Figure S3.** Maximum Likelihood phylogenetic analyses of biogenic amine GPCRs and related sequences. Numbers next to nodes represent branch support values. In phylogenetic analyses using the MAFFT alignment and in trimmed alignments, the SmGPR sequences from *S. mansoni* and the related sequences from other flatworms clustered with the Tyramine-2 receptors.

**Supplementary Figure S4.** Maximum Likelihood phylogenetic analysis of Cys-Loop Ligand Gated Ion Channels. Numbers next to nodes represent branch support values.

**Supplementary Figure S5.** Maximum Likelihood phylogenetic analysis of aromatic amino acid hydroxylases. Numbers next to nodes represent branch support values.

**Supplementary Figure S6.** Maximum Likelihood phylogenetic analysis of Group II amino acid decarboxylases. Numbers next to nodes represent branch support values. In the phylogenetic analysis using the MAFFT alignment, the glutamate decarboxylase clade was not resolved.

**Supplementary Figure S7.** Maximum Likelihood phylogenetic analysis of Solute Carrier Family 6 (SLC6) transporters. Numbers next to nodes represent branch support values.

**Supplementary Figure S8.** Maximum Likelihood phylogenetic analysis of Copper-enzyme hydroxylases. Numbers next to nodes represent branch support values.

**Supplementary Figure S9.** Maximum Likelihood phylogenetic analysis of Solute Carrier Family 17 (SLC17) transporters. Numbers next to nodes represent branch support values.

**Supplementary Figure S10.** Maximum Likelihood phylogenetic analysis of Solute Carrier Family 1 (SLC1) transporters. Numbers next to nodes represent branch support values.

**Supplementary Figure S11.** Maximum Likelihood phylogenetic analysis of ionotropic glutamate receptors. Numbers next to nodes represent branch support values.

**Supplementary Figure S12.** Maximum Likelihood phylogenetic analysis of Class C GPCRs (also known as the Glutamate family of GPCRs). Numbers next to nodes represent branch support values.

**Supplementary Figure S13.** Maximum Likelihood phylogenetic analysis of the Solute Carrier Family 32, 36 and 38 (SLC32, SLC36 and SLC38) transporters. Numbers next to nodes represent branch support values.

**Supplementary Figure S14.** Maximum Likelihood phylogenetic analysis of proprotein convertases. Numbers next to nodes represent branch support values. In the phylogenetic analysis using the trimmed MAFFT alignment, the SMU15000885 sequence from *Schmidtea mediterranea* did not cluster with the PC1/3 clade.

## **Capítulo 2: “Análisis transcriptómico de los diferentes estadios del ciclo de vida del cestodo modelo *Hymenolepis microstoma*”**

Se llevó a cabo el análisis transcriptómico mediante RNAseq de las diferentes etapas del ciclo de vida de *H. microstoma*. Este segundo capítulo de resultados de la tesis también se muestra en formato de artículo científico, publicado en 2021.

**Artículo original:** M. Preza et al., “Stage-specific transcriptomic analysis of the model cestode *Hymenolepis microstoma*,” *Genomics*, vol. 113, no. 2, pp. 620–632, Mar. 2021. [214] [10.1016/j.ygeno.2021.01.005](https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.01.005)

Para esta publicación participé en: la obtención del material biológico, extracción de ARN de cada estadio, análisis bioinformáticos (todos los descritos en el artículo) utilizando la versión 1 del genoma de *H. microstoma* (WBPS-1), la realización experimental de WMISH (incluyendo síntesis de las sondas de ARN marcadas con digoxigenina, análisis de imágenes obtenidas por microscopía confocal mediante FIJI), análisis de los resultados, armado de figuras y correcciones del artículo antes de ser enviada la versión final.

La información suplementaria de este artículo puede ser observada y descargada en el siguiente enlace:

[https://drive.google.com/drive/folders/1EcYTuxJWCbSTP\\_CPvjPV\\_aRjhzqDkHDO?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/1EcYTuxJWCbSTP_CPvjPV_aRjhzqDkHDO?usp=sharing)

### **Stage-specific transcriptomic analysis of the model cestode *Hymenolepis microstoma***

Matías Preza<sup>1</sup>, Javier Calvelo<sup>1,2</sup>, Mauricio Langleib<sup>2</sup>, Federico Hoffmann<sup>3</sup>, Estela Castillo<sup>4</sup>, Uriel Koziol<sup>1\*</sup>, Andrés Iriarte<sup>2\*</sup>

1. Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay.
2. Laboratorio Biología Computacional, Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo 11600, Uruguay.

3. Department of Biochemistry, Molecular Biology, Entomology, and Plant Pathology, Mississippi State University, MS 39762 United States of America.

4. Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay.

\*Corresponding authors.

E-mail addresses: ukoziol@gmail.com (U. Koziol) & airiarteo@gmail.com (A. Iriarte)

## Abstract

Most parasitic flatworms go through different life stages with important physiological and morphological changes. In this work, we used a transcriptomic approach to analyze the main life-stages of the model tapeworm *Hymenolepis microstoma* (eggs, cysticercoids, and adults). Our results showed massive transcriptomic changes in this life cycle, including key gene families that contribute substantially to the expression load in each stage. In particular, different members of the cestode-specific hydrophobic ligand-binding protein (HLBP) family are among the most highly expressed genes in each life stage. We also found the transcriptomic signature of major metabolic changes during the transition from cysticercoid to adult worms. Thus, this work contributes to uncovering the gene expression changes that accompany the development of this important cestode model species, and to the best of our knowledge represents the first transcriptomic study with robust replicates spanning all of the main life stages of a tapeworm.

**Keywords:** *Tapeworm, RNA-seq, Flatworms functional genomics, Gene family evolution, Antigen B.*

## 1. Introduction

Many parasitic flatworms have complex life cycles, with divergent life stages that are well adapted to their respective hosts. Their genomes encode the genetic information required for the development and maintenance of very different life forms and for their metabolic and immunological interactions with their respective hosts.

In the case of cestodes (tapeworms), most species have a hermaphroditic adult stage that is an enteric parasite of a vertebrate definitive host. Within this host, adults generate a chain of segments from the neck (each segment containing male and female reproductive systems) and reproduce sexually to generate thousands of infective eggs that are released to the environment. These eggs contain the first larval stage, known as the oncosphere, a highly reduced larval form that can passively infect the intermediate host. Once in the

intermediate host, the oncosphere invades parenteral tissues and undergoes a drastic metamorphosis into a second larval stage, the metacestode. The metacestode infects the definitive host when it is ingested together with the intermediate host and develops into the adult, closing the life-cycle.

Many zoonotic diseases of humans and domestic animals are caused by the larval stages of tapeworms, including the metacestodes of *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis* and *Taenia solium*. Thus, it is very important to study in detail the life-stage specific adaptations of these species, however this is not easy due to their infectivity to man and to the challenges of maintaining their complete life cycle in the laboratory. Genomic and transcriptomic analyses of these and other tapeworms have shed light on their transcriptional adaptations, confirming previously known differences in gene expression between life stages and identifying hundreds of differentially expressed genes (DEGs). Among differentially expressed genes many members of gene families have been identified [20,215–219]. Genes families are made up of paralogous copies of genes that emerge as a result of duplication and speciation [220–222]. As a general rule gene family expansions are associated to 1) the functional diversification of the resulting duplicates, or 2) proteins that keep the original function but increase gene dosage to increase protein product [223,224]. Kinases, proteases, ion-channels, and detoxification proteins, among many others, have been identified as functional categories coded by gene families that tend to expand in many platforms lineages but also in other worms [225]. Duplicated genes within these categories have been shown to be differentially expressed throughout the parasite cycle of many species (see for instance [16,226], among many others). Thus, sequence divergence after duplication may not only affect coding sequences but also regulatory regions.

*Hymenolepis diminuta* and *Hymenolepis microstoma* have been the workhorses of classical studies of cestode physiology and biochemistry, due to the simplicity of their *in vivo* culture. Their life cycles include rodents as definitive hosts and beetles as intermediate hosts, where the metacestodes (named cysticercoids in these species) reside in the hemocoel. The genomes of these tapeworms have been recently published [21,227]. Furthermore, Olson et al [21] have published transcriptomic data from *H. microstoma* larvae undergoing metamorphosis from oncosphere to metacestode, and of the different regions of the adult worm [219]. Their work identified genetic regulators that participate in these complex developmental processes. In a related manner, Rozario et al have analyzed transcriptomic data of the germinative neck region of adults and of irradiated neck tissues (depleted of their stem cells) of *H. diminuta* in order to identify the specific factors that provide the neck region with its unique proliferative capacity [11]. However, no studies have analyzed the transcriptomic profiles of each of the life-stages of *Hymenolepis* species comparatively.



In this work, we generated transcriptomic data for all of the main life-stages of *H. microstoma* (eggs containing infective oncospheres, infective cysticercoids, and adults). Our results identified hundreds of highly expressed, stage-specific transcripts. These genes include many cases of stage-specific expression of different paralogs within expanded families of secreted proteins which may be of relevance for host-parasite interaction. In particular, members of the cestode-specific Antigen B / hydrophobic ligand-binding protein (HLBP) family are among the most highly expressed genes in each life stage. Furthermore, we identified a strong transcriptional signature of a metabolic shift between larval and adult stages which correlates well with classical biochemical studies of *Hymenolepis*. As far as we know, no single transcriptomic study has covered all of the main life stages with robust biological replicates in any tapeworm species so far. Thus, this work contributes to reaching a comprehensive understanding of the life cycle and evolution of cestodes.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Organisms and samples.

The life cycle of *H. microstoma* was maintained using C57 mice as definitive hosts, and *Tribolium confusum* as intermediate hosts, as described [18] in collaboration with Jenny Saldaña and Laura Domínguez, Laboratorio de Experimentación Animal, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay (“Mantenimiento del ciclo vital completo del cestodo *H. microstoma* utilizando sus hospedadores naturales *Mus musculus* (ratón) y *Tribolium confusum* (escarabajo de la harina)”; Protocol number: 10190000025215, Comisión Honoraria de Experimentación Animal, Uruguay). Four samples of each stage were used as biological replicates. Adults were obtained from the bile duct and intestine of infected mice 3 to 4 months post-infection, and the posterior-most segments containing developing eggs were removed before further processing. A maximum of ten adults was obtained from each mouse. Cysticercoids were obtained from the dissection of infected beetles in phosphate-buffered saline (PBS) 2 to 3 months post-infection. Eggs were obtained by collecting them after careful dissection of gravid segments of adult worms in PBS, washed several times with PBS, and treated with 0,5% trypsin for 30 minutes at room temperature in order to remove any remaining contamination of adult tissues. The eggs were then incubated overnight at 8 °C, since this procedure is known to increase the ability of oncospheres to become activated [228], and we have found it to increase egg infectivity (Preza and Koziol, unpublished results). Finally, the eggs were placed on a filter with a 27 µm mesh and washed extensively with PBS. Microscopical analysis of the resulting egg preparations after staining with Hoechst 33342 demonstrated the absence of any remaining

contaminating cells from adult tissues (data not shown). These eggs were obtained from the posterior-most regions of the adult worm and included fully-formed, infective oncospheres (as determined by the infection of *T. confusum*) but probably also included eggs with oncospheres at the latest stages of embryonic development. Note that egg manipulation conditions (trypsin treatment and maintenance of isolated eggs at low temperatures) are likely similar to those encountered by the eggs in the natural life cycle of this species as they are released, first to the contents of the intestine, and later to the environment; therefore it is possible that some aspects of gene expression could have been influenced by their handling for isolation although to a very minor extent.

## **2.2 RNA extraction, library preparation, and sequencing.**

Total cellular RNA was isolated and purified with TRI Reagent (Sigma Aldrich) in combination with the Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research), including the DNase treatment step to remove contamination with genomic DNA. RNA yield was estimated with the Qubit RNA Broad Range Assay Kit (Thermo Fisher), and RNA integrity was evaluated by means of agarose gel electrophoresis. RNA yields were between 1 and 3 µg of total RNA for eggs and cysticercoids, and between 10 and 30 µg of total RNA for adults. Libraries from individual samples were sequenced with Illumina's HiSeq4000 at Macrogen (Korea), by means of 100 bp paired-end reads. Libraries were prepared from total RNA, using poly(A) enrichment of mRNAs. Libraries were barcoded and multiplexed for sequencing.

## **2.3 Reference genome and annotation.**

The genome sequence of *H. microstoma* version 3 (HMN\_v3, GCA\_000469805.3), recently published by Olson et al [21], was downloaded from the Wormbase ParaSite database available at [parasite.wormbase.org](http://parasite.wormbase.org) [137]. Coding sequences and annotations were also downloaded from this site. Mitochondrial genes were identified with MITOS web server [229] and added manually to the annotation file. Available cestode coding sequences were also downloaded from the Wormbase ParaSite database in order to identify homologous gene clusters for multigene family evolution analysis. Protein sequences secreted by the canonical pathway were predicted employing SignalP v 5 [230].

#### **2.4 Reads trimming, mapping reads, and read count.**

Reads quality was assessed with FASTQC v0.11.8 (available at [bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc](http://bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc)). The proportion of reads with an average Phred quality score above Q30 and Q20 were measured with Seqkit v0.13.0 [231]. Sequences were trimmed based on quality using sickle v1.33 (available at [github.com/najoshi/sickle](https://github.com/najoshi/sickle)), a Phred score of 30 was used as the threshold. High-quality reads were mapped against the genome using HISAT v2.1.0 [232]. Mapped reads were counted based on the available annotation data using the python script htseq-count v0.11.1 [233].

#### **2.5 Differential expression analysis.**

All pairwise comparisons between stages were done: Adults vs. Cysticercoids, Cysticercoids vs. Eggs, and Eggs vs. Adults. In each case, differentially expressed genes (DEGs) were detected using the R package edgeR (v3.12.0) [234]. This package uses the trimmed mean of M-values (TMM) as the RNA-Seq normalization method, calculates gene-wise negative binomial dispersion parameters using an empirical Bayes procedure, and fits generalized linear models followed by likelihood ratio tests for detecting DEGs [235]. Only genes with read counts greater than 10 in at least 9 of the samples were considered for differential expression analysis and functional enrichment test. The P-values were adjusted for multiple testing using the FDR procedure [236]. Genes with an FDR p-value < 0.01 were considered as statistically significantly differentially expressed. In order to visualize the overall relationship between the samples under study, a multidimensional scaling (MDS) analysis was performed. Transcript per million (TPM) was estimated for each gene in each biological replicate. All these analyses were also done using edgeR. Heatmaps shown in the main text were generated with Heatmapper [237] and Volcano plots with the EnhancedVolcano v3.11 package in R [238]. The heatmap summarizing all DEG genes presented as Supplementary Figure 1 was generated with the R package v1.0.12. TPM measurements were normalized per gene following the formula  $(\text{Gen TPM in Sample} - [\text{Lowest TPM measured}]) / ([\text{Largest TPM measured}] - [\text{Lowest TPM measured}])$ .

#### **2.6 Functional enrichment analysis.**

Gene Ontology (GO) annotation for whole-genome proteins was predicted using the EggNOG mapper tool v1.0.3 [239]. Significantly enriched GO terms among differentially expressed genes were identified using Fisher's exact test, using the package topGO v3.11

[240]. For these analyses, the predicted DEGs for each life-stage comparison were compared with the expressed genes as background set. GO terms with weight Fisher < 0.005 were considered significant.

## **2.7 Comparative analysis**

For selected multigene families we reconstructed phylogenetic relationships in a maximum likelihood framework. Homologous genes were grouped using blastp v2.8.0 searches seeded with well-known reference proteins [241] followed by manual curation. A minimum identity of 70%, and a minimum query coverage of 70% were set as thresholds for significant blast hits. The resulting sets were aligned using MAFFT v7.471 using the L-INS-i method [242]. Model selection [243] and phylogenetic analyses were done using IQ-Tree v1.6.12 [244], and support for the nodes was evaluated with the ultrafast bootstrap procedure [245]. The expression values of *E. granulosus* and *E. multilocularis* were taken from previous published works [20,217,246]. Plotting of phylograms and corresponding expression heatmaps in supplementary figures were done with the R package ggtree v3.11 [247].

## **2.8 qPCR.**

We used the kit QuantiNova SYBR® Green PCR Kit (Qiagen) in the Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System to carry out the qPCR analysis. We used three different samples with two technical replicates for each life cycle stage and we analyzed the seven genes of the Hydrophobic Ligand Binding Proteins (HLBPs) present in the genome of *H. microstoma*. The forward and reverse primers used for each gene are provided in Supplementary Table 1. Based on the RNA-seq results, we selected the gene HmN\_000337500 (Translation Initiation factor 4E-1A) as a housekeeping gene for normalization. This gene has a low coefficient of variation between samples and a relatively high expression level. We used the method of delta-delta-Ct to estimate relative expression levels between samples [248].

## **2.9 Fluorescent whole-mount in situ hybridization.**

The partial coding sequence of HmN\_000056300.1 was amplified from adult cDNA with primers Fw “TTTGCCCTTGATTCCTTGC” and Rv “CCCAGCCTTTGTCTTAGTCG” and cloned into pGEM-T (Promega). Tyramide-FITC based fluorescent whole-mount in situ

hybridization (WMISH) of *H. microstoma* adults was performed with a digoxigenin-labeled antisense probe for the cDNA fragment of gene HmN\_000056300.1, as previously described [94,144]. Control experiments with sense probes did not result in any signal (Data not shown). Samples were co-labeled with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as a nuclear stain and imaged using Zeiss Axio Observer Z1 LSM 800/880 confocal microscopes, either directly or after cutting into cryosections of 10  $\mu\text{m}$  of thickness.

### **2.10 Nile Red staining.**

The distribution of lipids in *H. microstoma* adults was studied by staining with Nile Red [249]. Briefly, worms were fixed with 4% paraformaldehyde prepared in PBS for one hour at room temperature, washed extensively with PBS, and stained with 100 ng/ml Nile Red in PBS. Nile Red shows a spectral shift to shorter wavelengths with decreasing solvent polarity. Therefore, the distribution of polar lipids was analyzed in the rhodamine channel and that of neutral lipids in the FITC channel using Zeiss Axio Observer Z1 LSM 800/880 confocal microscopes.

## **3. Results and Discussion**

### **3.1 Overall transcriptomic results and differential gene expression analysis between pairs of stages.**

We sequenced whole transcriptomes for each of the four replicates of each life stage. Reads and metadata can be accessed in the NCBI SRA database under the accession numbers SRR11928941-52 linked to Bioproject: PRJNA637398. A summary of sequencing statistics and read alignment to the reference genome is presented in Table 1. In brief, more than  $12 \times 10^6$  paired-end reads were produced for each replicate. After trimming by length and quality an average of  $11 \times 10^6$  high-quality reads were mapped to the reference genome of *H. microstoma*. The average mapping rate was 90%, approximately 85% of these were uniquely mapped, that is, reads mapped to exactly one location within the reference genome. This number of reads is enough to accurately quantify the expression level of genes in eukaryotes (see for instance [250]). Note that gene expression among replicates is highly correlated, so, besides sequencing depth, the four biological replicates in each stage confirm the robustness of the study. Previous RNA-seq expression analyses in flatworms used similar sequencing depth and a similar number of replicates [193,219].

A total of 8627 genes were considered expressed (a threshold of 10 reads mapped to each gene in at least nine samples was set). On average the 5% top expressed genes account for 58.3% of the total reads generated (SD= $\pm$ 5.8%). A high correlation in expression level is observed among replicates from the same stage (Pearson,  $r^2 > 0.97$ ), but very low correlation values were observed between different life stages ( $r^2 < 0.12$  for all comparisons), suggesting that clear differences exist in gene expression between them (Supplementary Figure 1). A multidimensional scaling (MDS) analysis was done in order to study the overall similarities and differences in gene expression between the samples under study. The MDS plot shows the distribution of the 12 samples in a two-dimensional space, axis x, dimension 1, and axis y, dimension 2 (Supplementary Figure 1). The scatter plot clearly shows that the replicates of the same stage cluster together and apart from the replicates from other stages. The greatest variation represented by dimension 1, is observed between the adult stage and the other two stages. On the other hand, dimension 2 mainly differentiates eggs from cysticeroid and adult stages. This result suggests that our estimates of differences in gene expression are robust. The number of differentially expressed genes (DEGs) (FDR  $< 0.01$ , Fold Change  $> |2|$ ) between stages was very high, between 2078 and 2763 in all comparisons, representing 20-27% of the total annotated genes in the genome (Supplementary Figure 2 and Supplementary Table 2). Once again, this result indicates a major regulatory reprogramming in the successive stages of the life cycle of *H. microstoma*.

Based on our pairwise comparisons between life-stages, we performed a functional enrichment analysis of Gene Ontology Terms (Supplementary Table 3). In general, we found the application of these analyses to *H. microstoma* to be problematic. On the one hand, automatic assignment of orthology for transferring functional information is not trivial, given the large phylogenetic distance of tapeworms to most model organisms, and their very fast rate of molecular evolution. On the other hand, we noticed that a relatively small number of genes contributed to a large proportion of the enriched GO terms (even for many GO terms that appear to represent very different processes). Thus, the total 135 enriched GO terms are associated with 1301 up and down-regulated genes, however, the top 179 genes generated 124 enriched GO terms. For example, many annexin paralogs were differentially expressed between life stages, and these are associated with many different GO terms, thus contributing to tenths of enriched GO terms in all comparisons. However, invertebrate annexins have radiated and diverged independently of vertebrate annexins [251], so orthology assignments between them are not truly meaningful, making functional inference doubtful.

Despite these difficulties, manual inspection of the enriched GO terms and their contributing genes allowed us to identify individual processes and components that are

robustly enriched. One GO Cellular Component term that was enriched for both up and downregulated genes in all pairwise comparisons is GO:0005887 (Integral component of plasma membrane). Within this very general term, an inspection of the DEGs contributing to its enrichment revealed an assortment of different types of transporters, channels, and receptors. It is likely that some of these genes are of tegumental expression, which would be of direct relevance to the interaction between each life stage of the parasite and their respective host. Additionally, important differences were found among DEGs within this GO term for a variety of receptors and transporters that are involved in neurotransmission (Supplementary Table 4; [20,79,94]), hinting at important differences in the use of signaling pathways in the nervous system of each life stage. Another robust pattern that we identified was a strong enrichment in the adult stage of partially overlapping terms related to cilia and flagella (e.g. GO:0005930 axoneme, GO:0031514 motile cilium, GO:0036126 sperm flagellum, GO:0003341 cilium movement, among others). This is probably related to the production of sperm in the adult strobila, as in tapeworms motile cilia or flagella are only found in sperm and in the flame cells of protonephridia (flame cells are absent from the oncosphere larvae of *Hymenolepis* and other cyclophyllidean cestodes).

Additionally, many of the enriched terms are difficult to relate directly to the highly divergent biology of tapeworms. For example, gluconeogenesis (GO:0006094) is known to be absent in tapeworms and other parasitic flatworms [252]. Enrichment of this pathway in the adult can probably be explained because the DEGs that contributed to this GO term are also key genes for malate dismutation, an anaerobic catabolic pathway that is of paramount importance for most parasitic flatworms (described in more detail below), but which lacks a corresponding GO term as it is not found in most typical model organisms such as vertebrates. It is likely that other enriched GO terms that are difficult to reconcile with the biology of tapeworms are related to the use of conserved gene regulatory networks and metabolic pathways for other novel, parasite-specific functions.

**Table 1:** Basic metrics of the RNA-seq transcriptomic analysis.

Sample	Raw read pairs	Trimmed read pairs	Quality Q20/Q30 (%) <sup>*</sup>	Mapped read pairs <sup>**</sup>	Overall mapping rate (%)	Reads mapped to coding genes	# Genes with TPM $\geq$ 5
A1	13003765	12119272	99.3/96.7	10105091	93.6	8879150	6847
A2	13781380	12765319	99.3/96.6	10543072	92.7	9322827	6870
A3	14485798	13460237	99.3/96.7	11121804	91.5	9867759	7156
A4	13884001	12907688	99.3/96.7	11030018	95.6	9791696	7243
C1	14559774	12908088	99.1/95.6	8256739	74.9	7369083	6029
C2	14255917	12708756	99.2/95.7	8757778	83.7	7822549	5922
C3	12923240	11281056	99.1/95.5	8769499	93.7	7804563	5903
C4	14680727	13020017	99.1/95.6	10311655	94.0	9344934	5952
O1	12937021	11548953	99.1/95.7	9350746	96.5	7832648	5928
O2	13357430	11916569	99.1/95.6	9489088	96.1	7857542	5541
O3	13180435	11809998	99.1/95.7	9664822	96.8	7780812	5632
O4	12360240	11055632	99.1/95.6	8648472	95.6	7167762	5409

<sup>\*</sup> Quality of reads after trimming measure as Q20 and Q30, % of reads with an average Phred quality score above 20 and 30, respectively.

<sup>\*\*</sup> Total mapped reads pairs.



### **3.2 Stage-specific expressed genes substantially contribute to the top highly expressed genes in all stages.**

An interesting pattern that was apparent from our transcriptomic analysis is that there are many highly expressed genes (i.e. with expression levels > 1000 TPM) that are stage-specific or very highly overrepresented in one stage (i.e. with fold changes > 10 between the stage with the highest expression and any of the two other stages) (Figure 1, Supplementary Table 2). We refer to these genes as highly-expressed, highly-enriched (HE-HE) genes. For example, among the top 100 most highly expressed genes in adults, cysticercoids or eggs, 46, 7, and 35 of these genes showed expression fold-changes above 10 in comparison to all the other stages, respectively. Among the HE-HE genes, we found large multigenic families for which different paralogs were preferentially expressed in each life-stage (Supplementary Table 5). Some of these families are well known and have been shown to be of importance for the host-parasite interaction in parasitic flatworms and nematodes [253–256].

Among these, the Hydrophobic Ligand Binding Proteins (HLBPs) are a family of small, cestode-specific proteins that bind to a variety of lipids and other hydrophobic ligands [257]. There have been many independent expansions of these genes in different cestode species; in *Echinococcus spp.*, these proteins are referred to as Antigen B1 to B5, and some of these are very highly expressed in the metacestode stage that infects the intermediate hosts (including man) [254]. In *H. microstoma*, we observed that all HLBP genes are massively expressed in specific life-stages, with at least one HLBP that is uniquely expressed in each life stage (Figure 2A, Supplementary Table 5). In cysticercoids, two HLBP genes (HmN\_000893100 and HmN\_000893200) are the most highly expressed genes in this stage and together comprise over 20% of all mRNA transcripts. In adults, four HLBP genes (HmN\_000056300, HmN\_000056400, HmN\_000056500 and HmN\_000804500) are among the top 10 most highly expressed genes. Finally, HmN\_000893300 is most highly expressed in the eggs, and HmN\_000893200 is also expressed in this stage, but at lower levels than in cysticercoids. We further confirmed by qPCR these gene expression differences between the different life stages of *H. microstoma* (Figure 2B). Most of these genes have a predicted signal peptide for secretion, as is the case with all the studied Antigen B genes from *Echinococcus spp.*, but the adult-specific gene HmN\_000056500 lacks a signal peptide and is predicted to have a cytoplasmic localization, as has been shown for its characterized orthologs from *Moniezia expansa* [258] and *H. diminuta* [259,260].

The *H. microstoma* HLBP genes are found in two genomic clusters (Figure 2C). One of these contains genes HmN\_000893100, HmN\_000893200, HmN\_000893300, and HmN\_000804500, which are most similar to the known Antigen B genes from *Echinococcus*

spp. This cluster from *H. microstoma* is syntenic to the known cluster of Antigen B genes from *Echinococcus multilocularis* (genes EmuJ\_000381100 to EmuJ\_000381800, consisting of Antigen B1 to B5 [261]) (Figure 2C). The other cluster of *H. microstoma* comprises genes HmN\_000056300, HmN\_000056400, and HmN\_000056500, and these genes are most similar and syntenic to an uncharacterized pair of HLBP genes from *E. multilocularis*, EmuJ\_000525100, and EmuJ\_000525400. We could not find strong evidence of expression for these *E. multilocularis* genes in any life stage in previously published transcriptomic data [20,246] (Figure 2C and Supplementary Figure 3). Therefore, different lineages of cestodes appear to have selected the expression of different HLBP genes in their homologous life stages.

Finally, we studied by WMISH the expression of HmN\_000056300, a putatively secreted HLBP, in the adult stage of *H. microstoma* (Figure 3A). The gene was highly expressed in the strobila, as predicted by the regional transcriptome of [219] and is the most highly expressed member of this family in this stage according to our results. Interestingly, the expression was mainly observed in the cells of the inner parenchyma and little expression was observed in the cells that form the tegumental syncytium that covers the parasite (Figure 3A). This indicates that the protein is probably mainly secreted to the interstitial extracellular milieu, and not directly towards the host. Although this gene is strongly expressed in the parenchymal cells of the adult that surround the eggs (Figure 3A, bottom row), almost no signal was seen in our RNA-Seq data of dissected eggs, further supporting the absence of contaminating adult cells in this sample. Interestingly, the expression of this gene in the inner parenchymal cells of the strobila correlates well with the distribution of large lipid droplets in the inner parenchyma, as observed with Nile Red staining (Figure 3B) and as described by Sudan Black staining [262,263]. In comparison, Antigen B of *E. multilocularis* is known to be a major component of the hydatid fluid within the metacestode and is thought to be exposed to the host given the presence of antibodies against these proteins in infected patients. However, it is not clear if this exposure is the result of active secretion of the protein towards the host, or the result of hydatid fluid leakage from damaged larvae [254,264].

Another well-known family of secreted proteins that are thought to be related to host-parasite interactions is the CAP domain family (an acronym for CRISP, Ag5, and PR-1), also known as VAL (Venom Allergen-Like) proteins, an ancestral family of proteins that has undergone many species-specific expansions in parasitic flatworms and nematodes [16,265]. In line with possible functions in the interaction of each life-stage with its respective host and host location, the majority of the 25 VAL genes found in the genome of *H. microstoma* were DEGs (Supplementary Figure 4, Supplementary Table 2 and 5), in some cases with levels of expression above 1000 TPM. Interestingly, this included several genes

that were expressed in the eggs, which could be potentially involved as part of the secretions of the oncosphere during the infection phase [266]. Some VAL genes are also highly expressed in the oncosphere of *E. multilocularis* [16,246]. However, the VAL genes that are highly expressed in the oncosphere of each species are not orthologous to each other (Supplementary Figure 4), indicating that although the expression of many VAL genes is stage-specific for both tapeworms, different paralog genes are expressed in each life stage of each tapeworm species. This process supports the idea that the VAL family has undergone recurrent duplications events throughout the cestode evolution followed by functional divergence [16].

The family of monodomain Kunitz-type inhibitors has also been proposed to have a role in the interaction between the parasite and the host. These proteins were well studied in *E. granulosus* previously and were shown to include peptidase inhibitors as well as channel blockers that are secreted towards the host [255,256]. We found 11 genes coding for monodomain Kunitz proteins in the predicted proteome of *H. microstoma*, 9 of which have a putative signal peptide (Supplementary Table 5). Many of these genes show differential expression between stages, with one gene with relatively high expression in eggs (22 to 162 times more highly expressed as compared to other life stages), one gene enriched in cysticercoids (3 to 10 times more highly expressed as compared to other life stages), and three genes enriched in adults (more than 25 times more highly expressed as compared to other life stages), whereas the other Kunitz genes have relatively low expression in all the stages. We performed a phylogenetic analysis to detect the relationships between the monodomain Kunitz proteins of *H. microstoma*, *E. granulosus* and *E. multilocularis*, and compared gene expression between orthologs using the transcriptomic data available [20,217] Supplementary Figure 5). It appears that many Kunitz genes are differentially expressed in the life cycle of tapeworms, but similar to what was observed for VAL proteins, orthologous genes are not always expressed in homologous life stages. The expression of some of these genes is enriched in homologous life stages, as in the case of *H. microstoma ku-2* (HmN\_000881100) and its orthologs from *E. granulosus* (EG\_10096; EG\_04958) that are expressed in the adult stage, and *ku-11* (HmN\_002041400) and its ortholog from *E. granulosus* (EG\_05482) that are expressed in eggs and oncospheres, but in other cases orthologs are expressed in different life stages. Intriguingly, orthologous genes are highly expressed in cysticercoids of *H. microstoma* and in oncospheres of *Echinococcus multilocularis*, both of which will be exposed to the digestive enzymes of rodents (as definitive and intermediate hosts, respectively).

Additionally, we identified two novel protein families of clustered, HE-HE genes, which unlike those discussed above, showed similar stage-specific expression for all their paralogs. We have named the first family as putatively “Secreted Oncospheral Acidic Proteins”, or

SOAPs (Figure 4A, Supplementary Table 5). These nine genes are clustered together within 58 kb of scaffold HMN\_06\_pilon, interspersed with a few other genes within that region. All of these genes share similar signal peptides (even at the nucleotide level, indicating that they have originated from recent duplications), followed by short (ca. 50 to 400 amino acid residues), low complexity and highly-charged, acidic sequences (with estimated isoelectric points between 2.95 and 4.79, and with glutamate plus aspartate content between 18% and 56 %). Their gene structure contains several small exons, and Olson and col. have recently described these genes as a family of related micro exon genes (MEGs), in which these small exons can be alternatively skipped during splicing. An increased copy of recently duplicated genes with no functional divergence after duplication is usually linked to an increased protein product demand. Many secreted proteins that are required in specific moments in huge amounts tend to duplicate more than other genes, thus this gene expansion increases the fitness of the organisms [224,267]. Interestingly, these proteins showed differences in the low complexity region suggesting that besides increased dosage there may be some level of functional divergence to cope with specific functional requirements in the oncosphere. All of these genes are highly expressed in the eggs, with combined expression values above 37,000 TPM for this stage as compared to <40 TPM for other stages (Figure 4A, Supplementary Table 5). Interestingly, we have also found an undescribed and putatively secreted protein with a repetitive, acidic sequence that is massively expressed in *E. multilocularis* oncospheres (EmuJ\_001142400). This gene is one of the three most highly expressed genes in oncospheres, as determined from the data of Huang et al [246] (RPKM values above 19,000 for all oncosphere replicates), and its ortholog in *E. granulosus* (EG\_07633) is the most highly expressed gene in the oncospheres, as determined from the data published by Zheng et al [217] (RPKM value of 71960). Note, however, that it is not possible to resolve orthology between these proteins of *Echinococcus* and *Hymenolepis* given the low complexity of their sequence and the lack of flanking syntenic regions.

We have named the second novel family of clustered, HE-HE genes as Adult specific, Single exon, putatively Anchored Proteins (ASAPs, Figure 4B, Supplementary Table 5). These are single-exon genes that code for proteins sharing similar N and C terminal regions (with clear conservation even at the nucleotide level), for which in most cases a signal peptide and a Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchorage site were predicted, respectively. Before the GPI anchorage site, these proteins share a short track that is rich in serine and threonine residues. In between the conserved termini, these genes encode for low complexity proteins, and in most cases these sequences and/or the serine and threonine tract are predicted to be subjected to O-glycosylation. In their overall structure, these genes are reminiscent of the apomucins that are produced by the metacestodes of *Echinococcus* spp. [20,268], although they do not share any clear sequence similarity. These genes are distributed in a few clusters in the genome of *H. microstoma* (Supplementary Table 5), and

genes within each cluster are most similar to each other, indicating that they have arisen from lineage-specific tandem duplications (Supplementary Figure 6). Most of these genes are highly expressed in adults (with combined expression values above 76,000 TPM for this stage as compared to <40 TPM for other stages) (Figure 4). Although technically challenging due to their sequence similarity and repetitive nature, it would be very interesting to determine if these proteins are found on the surface of adult worms in the future.

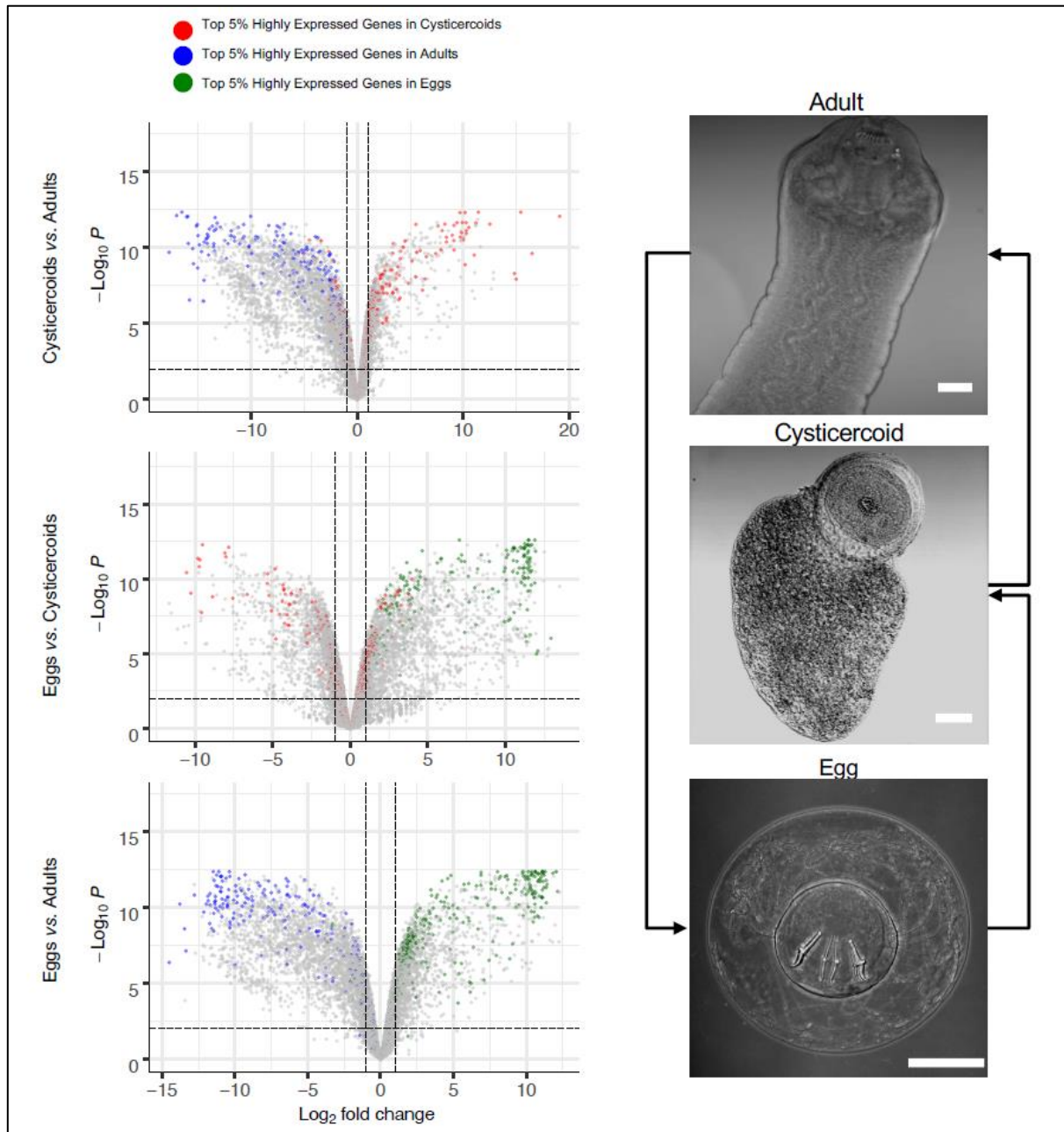
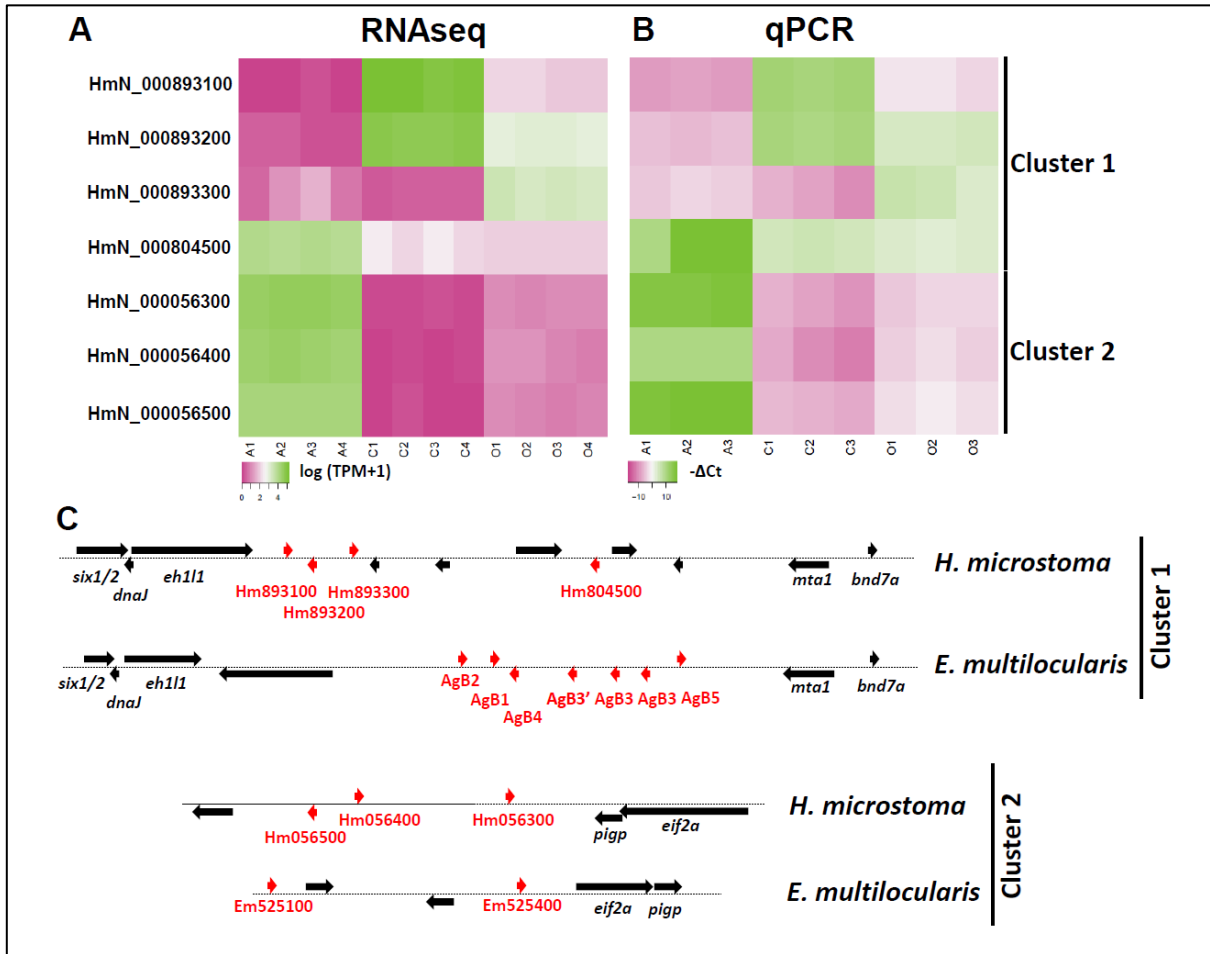
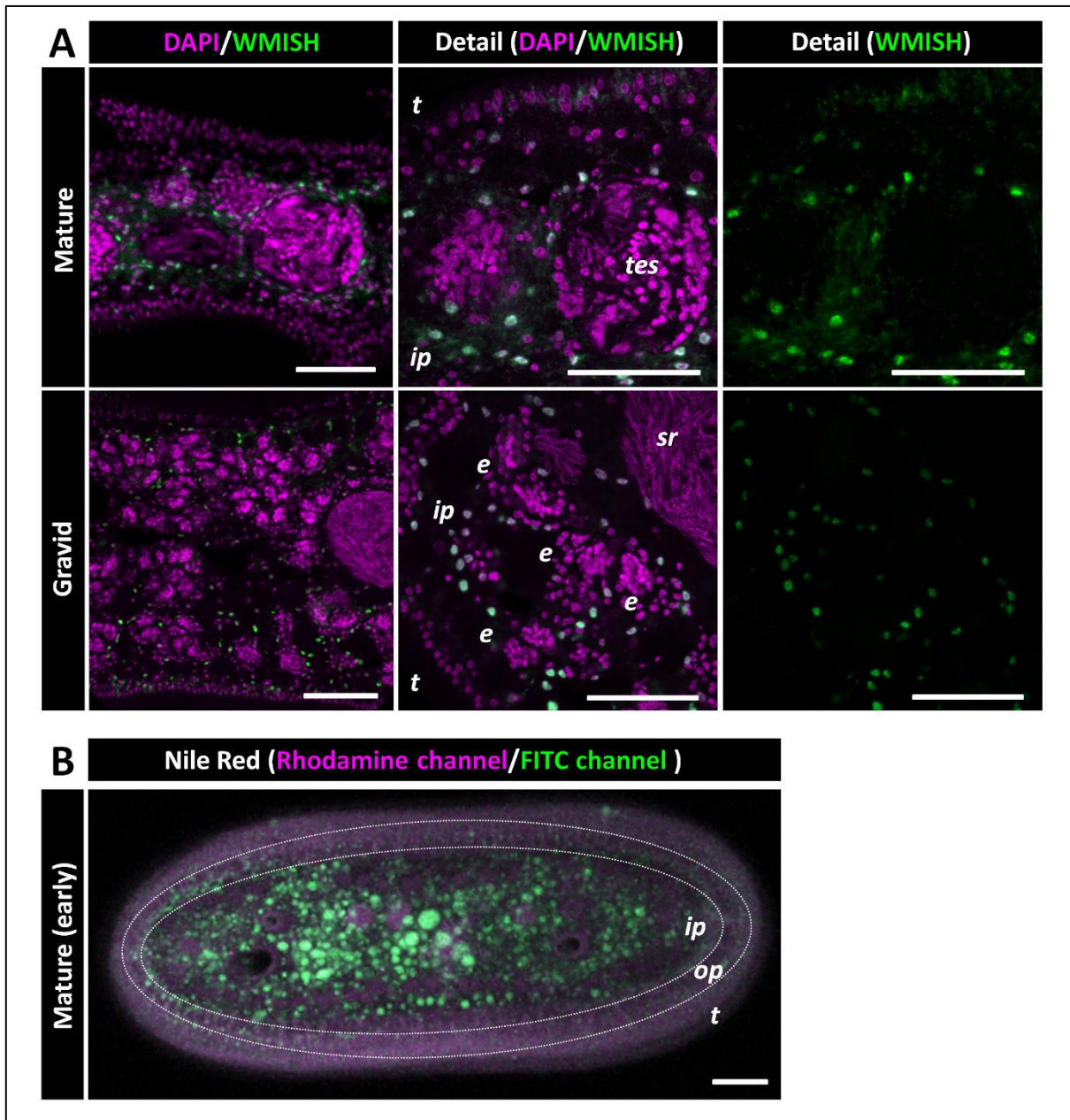


Figure 1. "Volcano plot" of adjusted statistical significance (FDR) against log2 fold change between analyzed

**stages.** The top 5% of highly expressed genes of each stage are indicated in color: Cysticeroids (red), Adults (blue), and Eggs (green). Thresholds of significance ( $< 0.05$  FDR) and  $\log_2$  fold change ( $> 2$ ) are indicated with dashed lines. These plots were generated with the EnhancedVolcano package in R. To the right photos of the main life-stages of *H. microstoma* studied in this work. The scale bars represent 25  $\mu\text{m}$  in Egg and 50  $\mu\text{m}$  in Cysticeroid and Adult.



**Figure 2. Expression of HLBP genes in the life cycle of *H. microstoma*.** A. Heatmap showing the expression of HLBP genes in individual RNA-seq replicates of *H. microstoma* adults (A1-A4), cysticeroids (C1-C4) and eggs with infective oncospheres (O1-O4). B. Heatmap showing the relative expression of HLBP genes in adults (A1-A3), cysticeroids (C1-C3) and eggs with infective oncospheres (O1-O3), as determined by qRT-PCR (normalized with the housekeeping gene eIF4E-1A). C. Diagram of the syntenic clusters of HLBP genes in the genomes of *E. multilocularis* and *H. microstoma*. Orthologous genes in these syntenic regions are indicated below. HLBP genes are indicated in red.



**Figure 3. Cellular expression of the adult-specific HLBP gene HmN\_000056300.** A. In situ hybridization with an antisense probe for HmN\_000056300 in mature and gravid segments of *H. microstoma*. The hybridization signal is shown in green, and nuclear staining with DAPI is shown in magenta. B. Distribution of neutral lipids in the segments of *H. microstoma*. Frontal view of a dissected segment stained with Nile Red (the rhodamine channel, showing the distribution of polar lipids, is shown in magenta, and the FITC channel, showing the distribution of neutral lipids, is shown in green). Abbreviations: *e*, eggs; *ip*, inner parenchyma; *op*, outer parenchyma; *sr*, seminal receptacle; *t*, tegument; *tes*, testes.





### **3.3 Metabolic shifts in the life cycle of *H. microstoma*.**

Parasitic flatworms have an unusual catabolic metabolism, using carbohydrates as the major or only energy substrate, and undergoing fermentative processes even in the presence of oxygen, leading to the excretion of reduced end products [252,266]. Two main pathways are prevalent in tapeworms, branching in glycolysis at the level of phosphoenolpyruvate (PEP): lactic fermentation, leading to the excretion of lactate, and malate dismutation, resulting in the production of succinate and acetate [252,266] (Figure 5A). For *Hymenolepis* adults, malate dismutation is thought to be the main catabolic pathway, although lactic fermentation has also been described, especially in infections with a high parasitic burden [269,270].

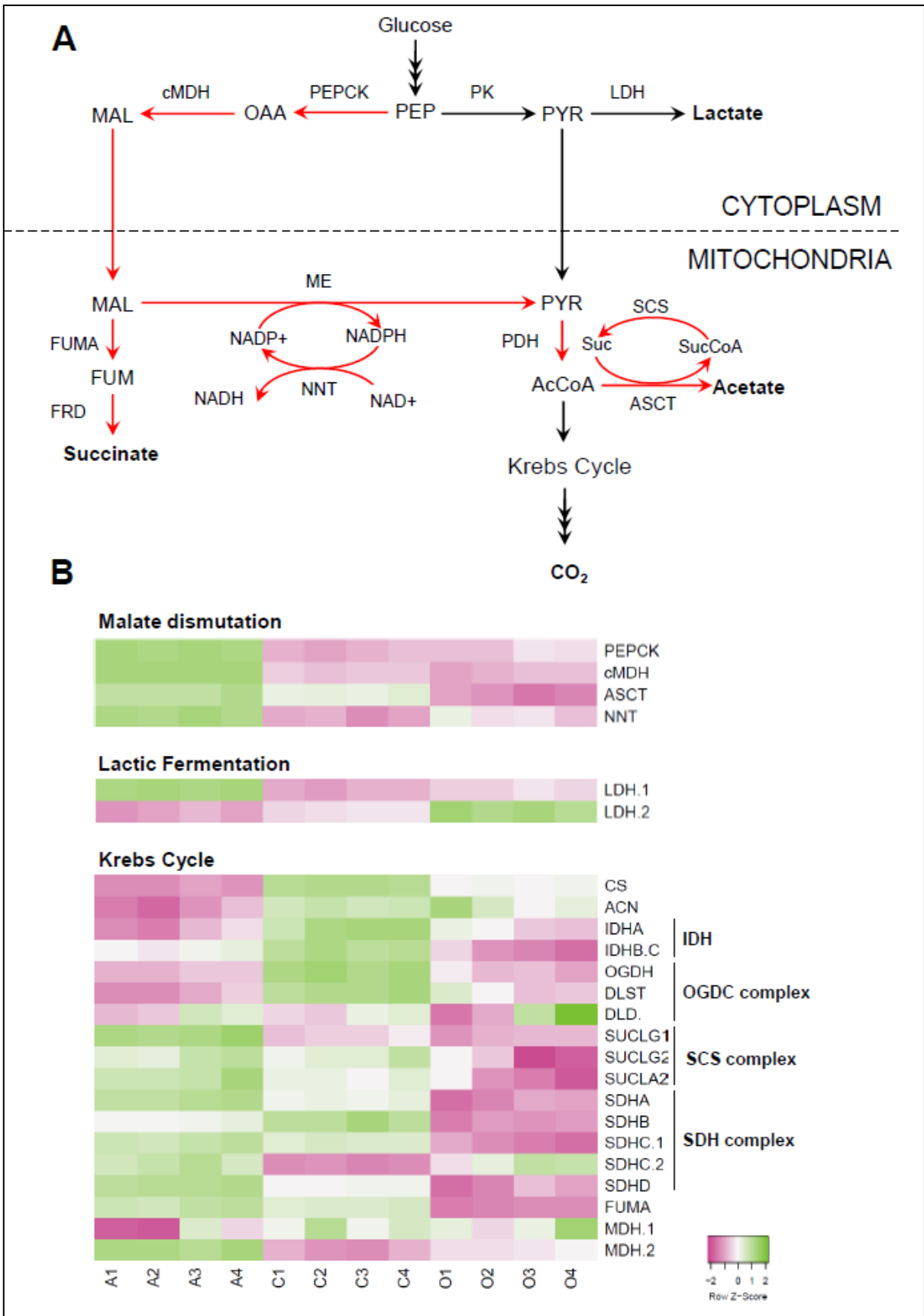
It has been shown for *H. diminuta* that a major metabolic shift occurs in the transition from cysticeroid to adult worm, in which the enzymatic activities required for malate dismutation are strongly up-regulated [271]. We have found in *H. microstoma* a parallel increase in the relative transcriptomic abundances of genes coding for two key enzymes involved in malate dismutation, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK, HmN\_000176500, 34-fold up-regulation) and cytosolic malate dehydrogenase (cMDH, HmN\_000258300, 29-fold up-regulation) (Figure 5B top panel, Supplementary Table 6). Both genes are among the 20 most highly expressed in the adult worm. Furthermore, there are two enzymatic activities that are involved in malate dismutation, but for which no specific gene or protein has been identified in tapeworms: fumarate reductase (FRD) catalyzing the reduction of fumarate to succinate, *i.e.* the inverse reaction to succinate dehydrogenase (SDH) in the tricarboxylic acid cycle (TCA); and acetate:succinate CoA-transferase (ASCT), required for the production of acetate. We observed the expression of succinate dehydrogenase subunits in the adult worm (higher than for other TCA cycle genes) (Figure 5B bottom panel, Supplementary Table 6). This suggests that some subunits may be shared between SDH and FRD, as described for other helminths [272,273]. In particular, there are two paralogs of SDHC in *H. microstoma* [274], one that is highly expressed in adults and in cysticeroids (HmN\_003036360), and another paralog of moderate expression levels but which is up-regulated 37-fold in adult worms with respect to cysticeroids (HmN\_003036350). On the other hand, an ASCT protein has been identified *in vitro* in the trematode *Fasciola hepatica* [275], and its ortholog in *H. microstoma* (HmN\_003032760) is upregulated 2.4-fold in adult worms relative to cysticeroids (Figure 5B top panel, Supplementary Table 6). Finally, a mitochondrial NAD(P) transhydrogenase activity has been proposed to be important for malate dismutation in *H. diminuta*, connecting NADPH generation via mitochondrial NADP<sup>+</sup>-specific malic enzyme, with NADH formation required for electron transport and fumarate reduction [276]. We observed a 10-fold up-regulation of mitochondrial NAD(P) transhydrogenase (NNT, HmN\_000240800) in

adult worms relative to cysticercoids (Figure 5B top panel, Supplementary Table 6). Altogether, our transcriptomic results in *H. microstoma* are highly concordant with the previously described metabolic transition between cysticercoids and adults in *H. diminuta*, and indicates that a major regulatory rearrangement at the transcriptomic level is at the base of this process. Furthermore, the low levels of transcripts for key enzymes of malate dismutation that are present in the infective eggs of *H. microstoma* indicate that this pathway is unlikely to be a major catabolic pathway for this life stage.

Lactic fermentation requires the enzyme lactate dehydrogenase (LDH), and two paralogs of LDH are found in the genome of *H. microstoma*. Interestingly, these paralogs show strong expression biases between life stages, being maximally expressed either in adult worms (HmN\_000705800), for which lactate excretion is well documented, or in eggs (HmN\_000478500), suggesting that lactic fermentation may be an important catabolic pathway for this life stage. (Figure 5B middle panel, Supplementary Table 6).

Flow through the direct tricarboxylic acid (TCA) cycle is thought to be very low in most adult cestodes (including *Hymenolepis* spp.), with very low enzymatic activities reported for the first enzymes of the cycle [277,278]. We see concordant patterns in our transcriptomic data, with very low gene transcript levels for citrate synthase, aconitase and isocitrate dehydrogenase in adult worms (Figure 5B bottom panel, Supplementary Table 6). Interestingly, much higher levels of transcripts are found for these genes in cysticercoids, indicating that the TCA cycle may have a more prominent catabolic role in this life stage. Among genes involved in the TCA cycle, high expression levels are only seen in adults for subunits of SDH and of Succinyl-CoA ligase, and for fumarase, all of which are also involved in malate dismutation.

Finally, we noticed very high expression levels of two genes related to amino acid metabolism in adult worms. One is HmN\_003043640, an isoform of Glutamate Dehydrogenase (GDH) that is up-regulated *ca.* 400-fold in adults in comparison to other life stages. This enzyme has been proposed to be involved in the excretion of alanine, a minor fermentative end-product described in adults of *H. diminuta* [279]. The other is aspartate aminotransferase (HmN\_000529700), which has been proposed to be involved in the ability of *H. diminuta* to catabolize aspartate (one of the few amino acids that have been proposed to be catabolized in any tapeworm, [280]).



**Figure 5. Differential gene expression of genes involved in central catabolic pathways in the life cycle of *H. microstoma*.** A. Diagram of the main known catabolic pathways for glucose in tapeworms. Reactions related to malate dismutation are shown in red. B. Heatmap of the expression of candidate genes related to malate dismutation, lactic fermentation and the Krebs cycle in individual RNA-seq replicates of *H. microstoma* adults (A1-A4), cysticercoids (C1-C4) and eggs with infective oncospheres (O1-O4). Note that some proteins from the second half of the Krebs cycle also participate in malate dismutation. Abbreviations: AcCoA, Acetyl Coenzyme A; ACN, aconitase; ASCT, Acetate:succinate CoA-transferase; cMDH, cytosolic Malate dehydrogenase; CS, citrate synthase; FUM, Fumarate; FUMA, Fumarase; FRD, Fumarate reductase; IDH, Isocitrate dehydrogenase; LDH, Lactate dehydrogenase; MAL, malate; MDH, Mitochondrial malate dehydrogenase ME, Malic enzyme; NNT, NAD(P) transhydrogenase; OAA, Oxalacetic acid; OGDC, Oxoglutarate dehydrogenase complex; PDH, Pyruvate dehydrogenase; PEP, Phosphoenolpyruvate; PEPCK, Phosphoenolpyruvate carboxykinase; PK, Pyruvate kinase; SCS, Succinyl-CoA synthetase; SDH, Succinate dehydrogenase; Suc, Succinate; SucCoA, Succinyl Coenzyme A.

#### 4. Conclusions

In this study, we used RNA-seq to characterize the transcriptomic profile of all of the main life stages of *Hymenolepis microstoma*, a model species of cestode physiology and biochemistry. Approximately 36% of the annotated genes, which represent 46% of expressed genes (see above), change expression significantly among stages, thus as described in other cestodes and parasitic flatworms, major transcriptomic changes characterize the transit through the life cycle of *H. microstoma*.

Among the most expressed genes we identified expanded multigene family members that showed a significantly differential expression or even expression restricted to a unique stage. That is, paralogous genes are expressed at different times during the live cycle suggesting some grade of functional divergence. Our results showed that there are highly expressed HLBP genes for each stage, but interestingly homologs identified in the *E. multilocularis* genome do not share the same expression patterns among life stages, suggesting that different cestode species have evolved to express different HLBP genes in homologous life stages. Similar results were found for the VAL and the Kunitz-type inhibitors families, where orthologous genes are not expressed in homologous stages. These results may be explained in terms of selection driving the functional divergence of new copies, however, other possible explanations such as relaxed selection could not be completely discarded. Two novel highly-expressed, highly-enriched protein families were identified, here named SOAPs and ASAPs. In both cases all paralogs showed similar stage-specific expression.

Our results also support the idea of a major metabolic shift in the transition from the cysticercoid to the adult stage as two main enzymes in the malate dismutation pathway are significantly up-regulated in this stage. Importantly, based on homology searches and differential expression between adults and cysticercoids, we identified candidate genes coding for previously described enzymatic activities related to malate dismutation. Experimental characterization of these genes could bridge the gap between classical biochemical studies of tapeworm metabolism and the identification of specific molecular components. More generally, the transcriptomic data generated in this work represent a significant contribution to the future study of changes of gene expression during the life cycles of flatworm parasites.

## Acknowledgements

This work was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay [FCE\_3\_2016\_1\_125297] and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Uruguay. M.P. is a recipient of a scholarship from Comisión Académica de Posgrado (CAP), Universidad de la República, Uruguay, and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay. J.C., and M.L. are recipients of scholarships funded by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay. E.C., U.K., and A.I. are members of Sistema Nacional de Investigadores, Uruguay.

## Supplementary Material

**Supplementary Table 1.** Primers used for qPCR.

**Supplementary Table 2.** Results of differentially expression analysis for all expressed genes.

**Supplementary Table 3.** Enriched functional GO terms identified among Differentially Expressed Genes (DEGs) in each comparison between stages.

**Supplementary Table 4.** Summary of results of identified genes required for the synthesis, vesicular transport, reuptake and reception of different neurotransmitters that contributed to the enrichment of GO:0005887 in different comparisons.

**Supplementary Table 5.** Summary of results of highly-expressed, highly-enriched (HE-HE) gene families HLBP, VAL, and Kunitz-type inhibitors, SOAP, and ASAP.

**Supplementary Table 6.** Summary of results of expression analysis on metabolism-related genes identified in the present work.

**Supplementary Figure 1.** A. Multidimensional scaling (MDS) plot showing the relative similarities in the transcriptomic profile between samples. The four transcriptomic replicates of each stage, Cysticercoids (red), Adults (blue), and Eggs (green), are indicated. B. Pairwise correlation plots and Pearson correlation values among replicates of the three stages.

**Supplementary Figure 2.** Heatmap of differentially expressed genes (DEGs) across the four replicates of each *H. microstoma* stage (A = Adult, C = Cysticercoids, O = Eggs). A hierarchical clustering based on the expression profile is shown for DEGs and replicates. DEGs were identified in at least one pairwise comparison between stages.

**Supplementary Figure 3.** Comparative expression patterns and maximum-likelihood phylogenetic tree of members of the HLBP gene family in *H. microstoma* (HmN), *E. granulosus* (EG), and *E. multilocularis* (EmuJ). The numbers of interior branches in the tree represent estimated bootstrap support. The expression data from *E. granulosus* were taken from Zheng et al. 2013, while data from *E. multilocularis* were taken from [20] (A) and [246] (B). Expression values are shown as the average  $\log(\text{TPM}+1)$  value among replicates, when available. A = Adult, O = Oncosphere, C = Cysticercoid; PSC = Protoscolesces, Mc = Metacestode Cyst; P = Pre-gravid adult, G = Gravid adult, M = Metacestode; NO = Non-activated oncosphere, AO = Activated oncosphere, 4WM = 4-week metacestodes miniature vesicles, CM = Metacestodes small vesicles cultivated in vitro. Gray boxes represent non-available data.

**Supplementary Figure 4.** Comparative expression patterns and maximum-likelihood phylogenetic tree of members of the VAL gene family in *H. microstoma* (HmN), *E. granulosus* (EG), and *E. multilocularis* (EmuJ). The numbers of interior branches in the tree represent estimated bootstrap support. The expression data from *E. granulosus* were taken from Zheng et al. 2013 [217], while data from *E. multilocularis* were taken from [20] (A) and [246] (B). Expression values are shown as the average  $\log(\text{TPM}+1)$  value among replicates, when available. A = Adult, O = Oncosphere, C = Cysticercoid; PSC = Protoscolesces, Mc = Metacestode Cyst; P = Pre-gravid adult, G = Gravid adult, M = Metacestode; NO = Non-activated oncosphere, AO = Activated oncosphere, 4WM = 4-week metacestodes miniature vesicles, CM = Metacestodes small vesicles cultivated in vitro. Gray boxes represent non-available data.

**Supplementary Figure 5.** Comparative expression patterns and maximum-likelihood phylogenetic tree of members of the Kunitz-type inhibitors gene family

in *H. microstoma* (HmN), *E. granulosus* (EG), and *E. multilocularis* (EmuJ). The numbers of interior branches in the tree represent estimated bootstrap support. The expression data from *E. granulosus* were taken from Zheng et al. 2013, while data from *E. multilocularis* were taken from [20] (A) and [246] (B). Expression values are shown as the average  $\log(\text{TPM}+1)$  value among replicates, when available. A = Adult, O = Oncosphere, C = Cysticercoid; PSC = Protoscolexes, Mc = Metacestode Cyst; P = Pre-gravid adult, G = Gravid adult, M = Metacestode; NO = Non-activated oncosphere, AO = Activated oncosphere, 4WM = 4-week metacestodes miniature vesicles, CM = Metacestodes small vesicles cultivated in vitro. Gray boxes represent non-available data.

**Supplementary Figure 6.** Maximum Likelihood phylogeny of members of the ASAP gene family in *H. microstoma* (HmN), *E. granulosus* (EG), and *E. multilocularis* (EmuJ). The numbers of interior branches represent estimated bootstrap support. Scaffold, position, signal peptide presence/absence, and gene name were also indicated for each gene.

## **Capítulo 3. Estudio de la expresión de genes implicados en las diferentes vías de neurotransmisión en el ciclo de vida de *H. microstoma*.**

Se investigaron las diferencias de expresión génica de los genes involucrados en mecanismos de neurotransmisión, identificados previamente, en las tres etapas principales del ciclo de vida de *H. microstoma*. Se procedió analizando los datos transcriptómicos obtenidos mediante RNAseq, y se analizaron las diferencias de expresión mediante RT-PCR semicuantitativas para algunos de los genes implicados. El análisis se realizó principalmente utilizando la versión 1 del genoma de *H. microstoma* [20] por ser la utilizada en la detección de los genes de neuropéptidos en 2016 por Koziol et al. [79] y en el hallazgo de los diferentes componentes moleculares involucrados en la comunicación nerviosa que se describen en el Capítulo 1.

Al observar los resultados de esta sección en los diferentes estadíos, es importante tener algunas consideraciones para el caso de cisticercoides. Los cisticercoides son larvas que tienen una gran cantidad de tejidos larvarios, entre los cuales se encuentra enquistado al escólex, el cual es la parte de esta larva que continuará con el ciclo de vida, siendo liberada al entrar en el hospedero definitivo y la cuál se desarrollará como adulto. El escólex comprende aproximadamente el 10 % de los tejidos de estos cisticercoides (evidenciado en *H. diminuta* por comparación de extracciones proteicas de larvas enquistadas y activadas [281], y también por análisis de imágenes en este trabajo de cisticercoides enquistados de *H. microstoma*). Por lo tanto, al trabajar con ARN total de cisticercoides sin activar, existe representación de los genes expresados en el escólex, que podrían ser similares a los expresados en el adulto es su parte anterior. De todas formas, se esperaría que los valores de expresión génica estén principalmente influidos por la expresión en la cápsula y cercómero, tejidos de la larva que rodean y protegen al escólex y que son descartados durante la infección.

### **3.1 Análisis de las diferencias de expresión de los genes implicados en las diferentes vías de neurotransmisión.**

#### **3.1.1 Análisis de datos de RNAseq para los componentes moleculares involucrados en las vías de neurotransmisión.**

Se analizaron los niveles de expresión, medidos en TPM, de los genes involucrados en las vías de neurotransmisión clásica y de las enzimas clave del proceso de síntesis de neuropéptidos, detectados en el Capítulo 1, utilizando los datos de RNAseq descritos en el



Capítulo 2. Los niveles de expresión y el resultado del análisis de expresión diferencial para cada uno de estos genes se muestran en la **Tabla 3.1**. A continuación, se detalla lo que se observa de estos análisis para cada caso:

**Acetilcolina:** lo primero que se observa es que la enzima implicada en la síntesis de este neurotransmisor, así como el transportador vesicular se expresan casi exclusivamente en el estadio adulto. Una gran cantidad de receptores no son expresados en el estadio de oncósfera, con la excepción de dos receptores que se encuentran más expresados en oncósferas en términos de TPMs, pero que no presentan diferencias significativas con el estadio adulto. El gen de *chat* (acetiltransferasa de colina), es el que fue utilizado para su detección por WMISH (ver Capítulo 2, Preza et al 2018 [94]) y por PCR semi cuantitativa como se muestra más adelante.

**Serotonina:** como en el caso anterior, la gran mayoría de los genes se expresa más en el estadio adulto con respecto a los otros dos estadios de estudio. El único gen que se expresa más en cisticercoide y en oncósfera en conjunto, y que prácticamente es el único de esta vía expresado en oncósfera, es el gen de *L-aminoácido aromático descarboxilasa*, perteneciente a la vía de síntesis de serotonina, pero también a otros procesos independientes a esta vía de neurotransmisión. En el caso de cisticercoides también se destaca un receptor 5-HT-7 que tiene mayor expresión en este que cualquiera de los otros dos estadios, aunque también se expresa en adulto en menor medida. El gen de *triptófano hidroxilasa (tph)*, el cual fue utilizado en las WMISH y en las RT-PCRs semicuantitativas se expresa casi exclusivamente en adultos.

**Glutamato:** para esta vía de neurotransmisión no hay una diferencia tan clara de preferencia de uso por parte de un estadio en particular como en las dos anteriores. El gen del *transportador vesicular de glutamato (vglut)* se expresa en los tres estadios, aunque significativamente más en adultos al comparar con cisticercoides. El transportador EAAT se expresa fuertemente en oncósferas y adulto, también es expresado en cisticercoides, aunque significativamente menos que en los dos primeros. De los seis receptores de glutamato asociados a canales de cloro dos de ellos se expresan diferencialmente más en adultos que en los otros dos estadios y uno de ellos más en oncósferas que en cisticercoides. Los receptores ionotrópicos se expresan en líneas generales más en el estadio adulto y los receptores acoplados a proteínas G tienen a un integrante expresado de forma prácticamente exclusiva en adulto y otro en oncósferas. El gen de *vglut* es el que fue utilizado en las WMISH que se muestran en el Capítulo 1 y también en las RT-PCRs semicuantitativas.

**Comunicación purinérgica:** en estos sistemas el *transportador vesicular de nucleótidos (vnut)* se expresa en los tres estadios sin diferencias significativas. De los tres receptores P2X detectados en el genoma de *H. microstoma* uno de ellos tiene baja expresión en los tres estadios y los otros dos tienen una alta expresión en la oncósfera, seguidos por una expresión moderada en adulto y prácticamente nula en cisticercoide.

**Comunicación peptidérgica:** se analizaron 3 genes implicados en la vía de síntesis de neuropéptidos. Tanto *pc2* como la *Carboxipeptidasa E* se expresan menos en cisticercoides que en los otros dos estadios. Encontramos que de las enzimas involucradas en la amidación C terminal de neuropéptidos en animales, únicamente la peptidilglicina-alfa amidante monooxigenasa (PAM) está presente en *H. microstoma* (y en cestodos en general), la misma es expresada en los tres estadios sin diferencias significativas. Cabe destacar que más allá de las diferencias de expresión, estos 3 genes se expresan en todos los estadios. El gen de *pc2* fue el utilizado para las WMISH que se muestran en el Capítulo 1 y RT-PCR semicuantitativa, como marcador general de estos sistemas de comunicación.

Acetilcolina							
Geneids	On-TPM	Cc-TPM	Ad-TPM	GeneName	ED-AdVsCc	ED-AdVsEgg	ED-CcVsEgg
HmN_000095900	0,20	0,53	3,27	Chat	Si	Si	No
HmN_000096000	0,35	0,45	3,18	VAChaT	Si	Si	No
HmN_000393300	0,08	3,78	5,70	nAChR (LGIC) inhibitorio	No	Si	Si
HmN_000241200	0,14	1,54	4,27	nAChR (LGIC) inhibitorio	No	Si	Si
HmN_000410700	0,19	1,18	2,14	nAChR (LGIC) inhibitorio	No	Si	Si
HmN_000122500	2,34	1,25	11,09	nAChR (LGIC)	Si	No	No
HmN_000344500	15,16	2,14	8,70	nAChR (LGIC) inhibitorio	Si	No	Si
HmN_000527900	1,03	0,18	1,43	nAChR (LGIC)	Si	No	Si
HmN_000074400	0,03	1,27	2,22	mAChR (GPCR)	No	Si	Si
HmN_000890400	2,64	1,54	1,34	mAChR (GPCR)	No	No	No
Serotonina							
Geneids	On-TPM	Cc-TPM	Ad-TPM	GeneName	ED-AdVsCc	ED-AdVsEgg	ED-CcVsEgg
HmN_000994100	1,00	0,78	19,36	TPH	Si	Si	No
HmN_000591900	26,59	82,37	2,44	L-AADC	Si	Si	No
HmN_000074400	0,03	1,27	2,22	VMAT	No	Si	Si
HmN_000596500	0,08	0,31	1,81	SERT	Si	Si	No
HmN_000156500	0,27	24,33	4,41	5-HT-7 (GPCR)	Si	Si	Si
HmN_000156300*	0,11	0,44	1,78	5-HT-7 (GPCR)	Si	Si	No
HmN_000578900	0,95	0,32	1,56	5-HT-1/5 (GPCR)	Si	No	Si
HmN_000665300	0,63	0,13	1,37	5-HT-1/5 (GPCR)	Si	No	Si
Glutamato							
Geneids	On-TPM	Cc-TPM	Ad-TPM	GeneName	ED-AdVsCc	ED-AdVsEgg	ED-CcVsEgg
HmN_000748900	7,53	2,37	5,22	VGLUT	No	No	Si
HmN_000367500	124,61	12,81	70,28	EAAT	Si	No	Si
HmN_000508400	8,63	8,13	18,15	Non-NMDA-iGluR	No	No	No

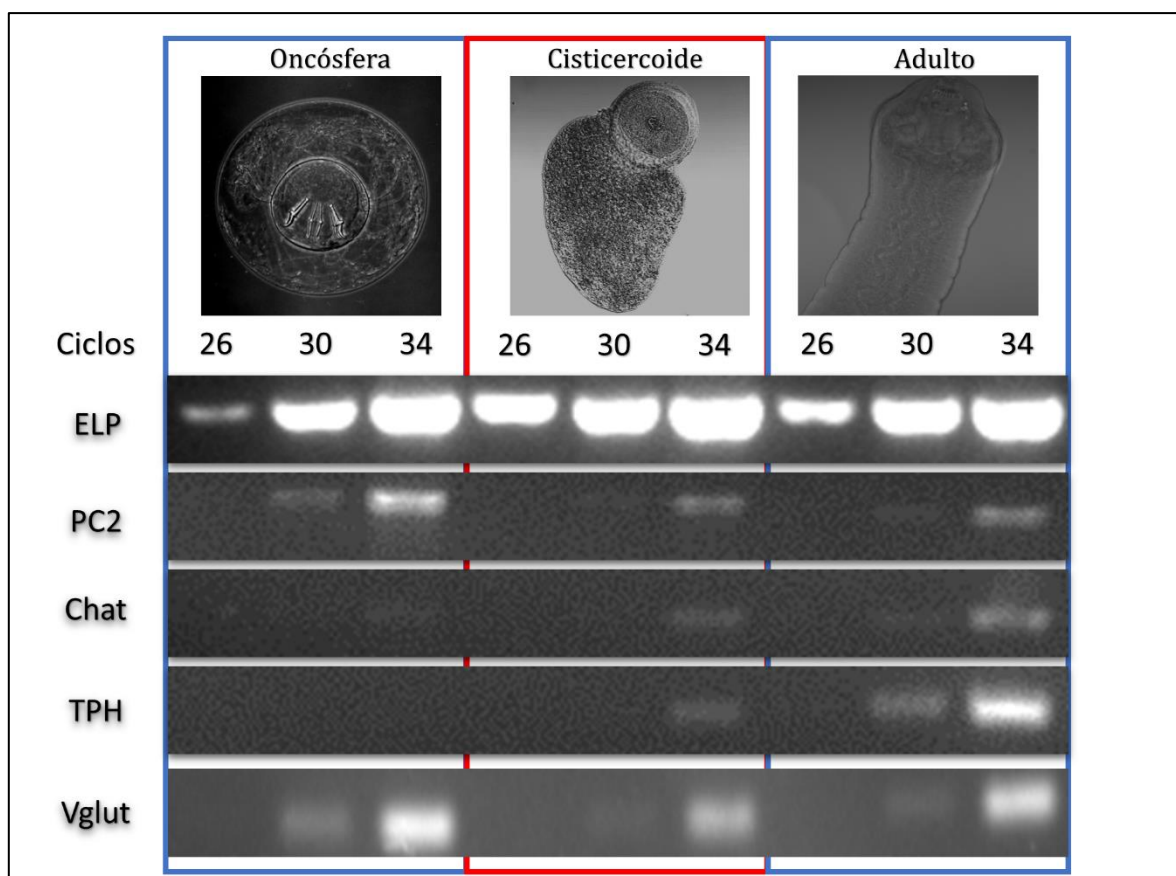
HmN_000841800	1,12	1,42	22,26	Non-NMDA-iGluR	Si	Si	No
HmN_000483600	0,03	1,82	18,68	Non-NMDA-iGluR	Si	Si	Si
HmN_000483700	2,75	13,48	17,06	Non-NMDA-iGluR	No	Si	No
HmN_000679100	1,91	1,11	7,67	Non-NMDA-iGluR	Si	No	No
HmN_000679300	1,15	1,33	6,08	Non-NMDA-iGluR	Si	No	No
HmN_000815700	9,05	22,74	32,33	Non-NMDA-iGluR	No	No	No
HmN_000296700	0,00	0,42	1,92	Non-NMDA-iGluR	Si	Si	Si
HmN_000238600	0,43	0,40	1,20	Non-NMDA-iGluR	No	No	No
HmN_000127100	0,18	0,09	0,52	Non-NMDA-iGluR	Si	No	No
HmN_000380800	0,51	3,47	10,32	NMDA-iGluR	No	Si	Si
HmN_000380500	0,66	2,89	6,71	NMDA-iGluR	No	Si	No
HmN_000250200	0,60	1,73	3,35	NMDA-iGluR	No	No	No
HmN_000439000	0,07	0,62	8,57	GluCl LGIC	Si	Si	Si
HmN_000451500	2,17	0,27	0,87	GluCl LGIC	No	No	Si
HmN_000776500	1,99	1,46	1,96	GluCl LGIC	No	No	No
HmN_000318600	1,16	0,41	35,91	GluCl LGIC	Si	Si	Si
HmN_000250400	3,77	4,28	1,81	GluCl LGIC	No	No	No
HmN_000286800	8,90	12,39	7,94	GluCl LGIC	No	No	No
HmN_000520300	3,42	0,15	0,36	Glutamate GPCR	No	Si	Si
HmN_000241100	0,05	0,29	2,39	Glutamate GPCR	Si	Si	No
<b>Purinergico</b>							
Geneids	On-TPM	Cc-TPM	Ad-TPM	GeneName	ED-AdVsCc	ED-AdVsEgg	ED-CcVsEgg
HmN_000721600	6,20	33,11	14,36	VNUT	No	No	No
HmN_000691000	0,03	0,41	0,64	Receptor P2x			
HmN_000740700*	40,92	0,52	2,48	Receptor P2x	Si	Si	Si
HmN_000740800*	26,42	0,51	6,12	Receptor P2x	Si	Si	Si
<b>Peptidérgico</b>							
Geneids	On-TPM	Cc-TPM	Ad-TPM	GeneName	ED-AdVsCc	ED-AdVsEgg	ED-CcVsEgg
HmN_000583100	13,76	3,54	20,88	PC2	Si	No	Si
HmN_002148000*	23,70	12,54	24,00	Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase (PAM)	No	No	No
HmN_000091700*	42,0	4,2	19,6	Carboxypeptidase E	Si	Si	No

**Tabla 3.1. Análisis de los niveles de expresión medidos en TPM de los genes implicados en las diferentes vías de neurotransmisión de *H. microstoma*.** En la primera columna se muestran los GeneIDs de cada gen. Los genes están agrupados dependiendo de la vía de señalización en la que están implicados. Se muestran los niveles de expresión de cada gen medidos en TPM, con un formato de color condicional, en el que el rojo es el valor más bajo (0) y en azul los valores más altos de expresión, con valores intermedios en blanco. Finalmente se indica si se encontraron diferencias de expresión significativas entre los estadios. Los genes subrayados en gris no fueron considerados en los análisis de expresión diferencial por tener muy pocos conteos durante el análisis. ED: Expresión diferencial; Egg: huevo/oncósfera; Cc: cisticercoide; Ad: adulto. Los GeneIDs marcados con "\*" son tomados de la versión 3 del genoma de *H. microstoma* (WBPS 14), ya que no

se encontraban en la versión 1 del mismo (WBPS 1). Non-NMDA iGR: Receptor ionotrópico de glutamato no NMDA; NMDA iGR: Receptores ionotrópicos NMDA.

### 3.1.2 PCRs semicuantitativa de marcadores de las diferentes vías de neurotransmisión.

Se procedió a confirmar las diferencias de expresión génica de marcadores de las vías de neurotransmisión mediante RT-PCR semicuantitativa. Se utilizó *chat* como marcador de la vía de acetilcolina, triptófano hidroxilasa (*tph*) como marcador de la vía de serotonina, *vglut* como marcador de la vía glutamatérgica y *pc2* como marcador general de las vías peptidérgicas. Los resultados de esta parte del trabajo se muestran en la **Figura 3.1**. Se observa que los marcadores de las vías de síntesis de acetilcolina y serotonina están prácticamente ausentes en oncósfera, con un nivel intermedio de expresión en cisticercoide y mayormente expresados en adulto. Por otro lado, los marcadores de las vías de glutamato y de señalización peptidérgica se encuentran expresados de forma similar en los tres estadios. Estos resultados se correlacionan de buena manera con los datos obtenidos mediante los análisis transcriptómicos.



**Figura 3.1.** RT-PCRs semicuantitativas para genes implicados en las diferentes vías de neurotransmisión. Se muestran los resultados de gel de agarosa a los 26, 30 y 34 ciclos de ciclado de la RT-PCR para los tres estadios

principales del ciclo de vida de *H. microstoma*. ELP: Ezrin-radixin-Moesin-like protein (gen normalizador). PC2: Prohormona convertasa; Chat: Acetil transferasa de colina; TPH: Triptófano hidroxilasa; Vglut: transportador vesicular de glutamato. Este experimento fue repetido 3 veces con resultados similares.

En suma, estos resultados sugieren que la neurotransmisión por acetilcolina y serotonina no son empleados en el estadio de oncósfera (aunque la expresión de receptores colinérgicos es llamativa), y son utilizados casi de forma exclusiva por adultos. La vía de glutamato y los sistemas peptidérgicos son utilizados en los tres estadios, aunque con algunas diferencias de los niveles de expresión. Finalmente, las vías purinérgicas parecen utilizarse en los tres estadios (si se observa la expresión del transportador vesicular), aunque los receptores encontrados tienen una expresión que sobresale en el estadio de oncósfera.

## 3.2 Análisis de las diferencias de expresión de los genes precursores de neuropéptidos.

### 3.2.1 Análisis de los datos de RNAseq de los genes de precursores neuropéptidos.

En esta parte se analizan a los genes de precursores de neuropéptidos (“npps” desde ahora, por su nombre en inglés, *neuropeptide precursors*). Estos genes analizados son los descritos en Koziol et al. en 2016 [79] junto a un gen que fue detectado por peptidómica (*npp-49.1*) y sus parálogos que fueron detectados bioinformáticamente (*npp-49.2*, *npp-49.3* y *npp-49.4*), como se describirá posteriormente en la sección 3.4. Los datos de este análisis se muestran en la **Tabla 3.2**. A modo general, se detectó que muchos genes de neuropéptidos son expresados en cada uno de los estadios del ciclo de vida de *H. microstoma*. Se observa que en el estadio de cisticercoide es en el que se expresan menos genes de neuropéptidos en comparación a los otros estadios, lo que sugiere una baja cantidad de los mismos en la cápsula y cercómero de estas larvas. Por otro lado, muchos genes son expresados en la oncósfera, lo cual es sorprendente dado su reducido tamaño y cantidad de células totales (alrededor de 30). Algunos de los genes parecen ser especialmente expresados (> 10 *fold change*) en cada estadio: seis en el estadio adulto (*npp-4*, *npp-6*, *npp-15.2*, *npp-20.1*, *npp-31/32.1*, *npp-31/32.3*), uno el estadio de oncósfera (*npp-46*), y sólo un gen parece ser especialmente expresado en el estadio de cisticercoide (*npp-44.2*) aunque su valor de TPM es relativamente bajo.

En los adultos es en donde se detectó el mayor número de npps expresados y diferencialmente expresados en comparación con los otros dos estadios, lo cual es razonable por la variedad de tejidos y funciones que están presentes en esta parte del ciclo de vida. En mayor detalle, se vio que en el adulto, nueve genes son expresados significativamente más que en los otros dos estadios: *npp-4*, *npp-6*, *15.2*, *20.1*, *27.1*, *npp-*

31/32.1, *npp-31/32.3*, *npp-44.1*, *npp-49.1*; además, se identifican dos genes con expresión exclusiva en adulto, *npp-20.2* y *npp-38*, que no fueron considerados en estos análisis de expresión diferencial por no tener suficientes *reads* en los datos transcriptómicos para más de tres muestras, sin embargo estos genes parecen ser específicos de adultos, mostrando un valor de TPM diferente a 0 sólo en este estadio. Todos estos genes de *npps* específicos o de elevada expresión en adultos son interesantes genes candidatos a tener un rol en el desarrollo de segmentos y/o en la regulación del sistema reproductor, funciones específicas de este estadio.

Nueve genes son expresados mayormente en oncósferas de forma significativa: *npp-20.3.1*, *npp-27.2*, *npp-28*, *npp-29.2*, *npp-36*, *npp-37*, *npp-43*, *npp-46* y *npp-49.2*; siendo *npp-20.3.1* el gen con mayor valor de TPM en este estadio. Este mismo gen es el único expresado significativamente más, tanto en oncósfera como en cisticercoide en comparación al adulto. El gen de *npp* más expresado en cisticercoides y en adultos es el *npp-49.3*, aunque también es fuertemente expresado en oncósferas (cabe destacar que este gen es el de mayor valor de TPM por estadio de todos los *npps* aquí presentados).

GeneIDs	Npps (Detalles)	Egg-TPM	Cc-TPM	Ad-TPM	ED-AdVsCc	ED-AdVsEgg	ED-CcVsEgg
HmN_000556000	<i>npp-1</i>	1,33	44,45	55,26	No	Si	Si
HmN_000050100	<i>npp-2</i>	125,76	14,40	55,71	Si	No	Si
HmN_000166500	<i>npp-4</i>	4,21	0,79	44,48	Si	Si	Si
HmN_000072750	<i>npp-5</i>	69,93	5,01	27,79	Si	No	Si
HmN_000648800	<i>npp-6 (Miomodulina)</i>	2,17	3,78	47,44	Si	Si	No
HmN_000787500	<i>npp-14</i>	108,66	6,39	131,71	Si	No	Si
HmN_000592500	<i>npp-15.1</i>	169,07	16,26	72,17	Si	No	Si
HmN_000592400	<i>npp-15.2</i>	0,22	2,04	79,59	Si	Si	No
HmN_000462100	<i>npp-20.1 (NPF)</i>	0,85	1,97	25,67	Si	Si	No
HmN_000295600	<i>npp-20.2 (NPF)</i>	0,00	0,69	6,44			
HmN_000069000	<i>npp-20.3.1 (NPF)</i>	959,88	140,68	5,22	Si	Si	Si
HmN_000069100	<i>npp-20.3.2 (NPF)</i>	1,14	19,37	9,00	No	Si	Si
HmN_000206600	<i>npp-20.4 (NPF)</i>	4,67	0,99	5,35	Si	No	Si
HmN_000096800	<i>npp-20.5 (NPF)</i>	35,61	1,90	20,91	Si	No	Si
HmN_000377100	<i>npp-24</i>	0,85	6,15	21,12	No	Si	Si
HmN_000165500	<i>npp-26</i>	0,10	33,22	202,97	Si	Si	Si
HmN_000326200	<i>npp-27.1</i>	0,22	6,23	46,61	Si	Si	Si
HmN_000326100	<i>npp-27.2</i>	104,37	1,01	14,10	Si	Si	Si
HmN_000234350	<i>npp-28</i>	269,24	1,94	56,52	Si	Si	Si
HmN_000212550	<i>npp-29.1</i>	18,38	0,81	8,33	Si	No	Si
HmN_000212650	<i>npp-29.2</i>	109,27	6,77	37,36	Si	Si	Si
HmN_000183900	<i>npp-30</i>	80,16	10,61	66,50	Si	No	Si
HmN_000223650	<i>npp-31/32.1</i>	0,30	3,25	71,50	Si	Si	Si

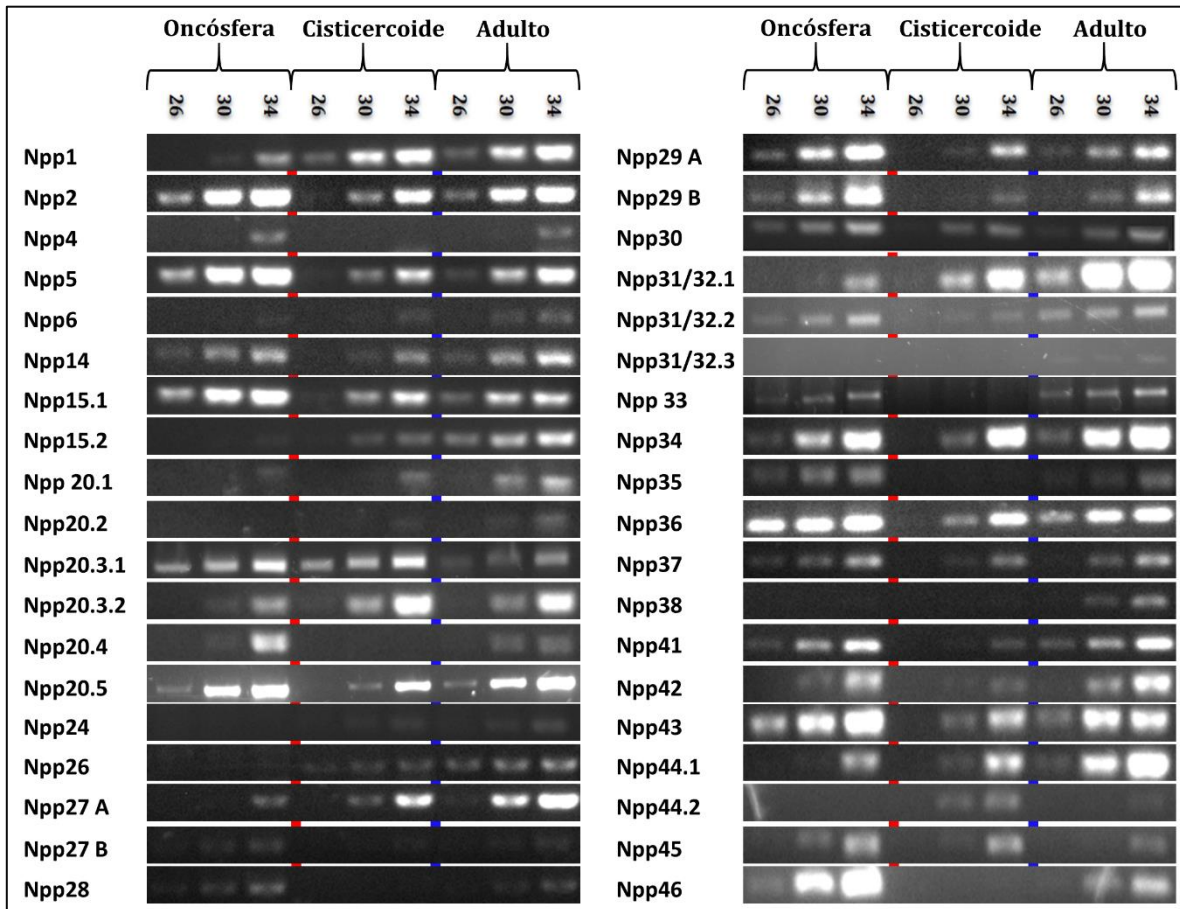
HmN_000205400	<i>npp-31/32.2</i>	7,91	1,51	9,42	Si	No	Si
HmN_000142950*	<i>npp-31/32.3</i>	0,00	0,62	11,32	Si	Si	No
HmN_000514300	<i>npp-33 (SIFamida)</i>	11,84	1,17	18,59	Si	No	Si
HmN_000315550	<i>npp-34 (Luqin)</i>	26,80	2,08	31,12	Si	No	Si
HmN_000148600	<i>npp-35 (Pirokinina)</i>	51,54	1,25	23,77	Si	No	Si
HmN_000511300	<i>npp-36</i>	628,70	4,91	118,69	Si	Si	Si
HmN_000695950*	<i>npp-37</i>	259,36	8,66	51,29	Si	Si	Si
HmN_000382900	<i>npp-38</i>	0,00	0,00	4,32			
HmN_000430600	<i>npp-40</i>	45,19	1,48	33,78	Si	No	Si
HmN_000866400	<i>npp-41 (CCAP)</i>	27,90	0,78	106,77	Si	No	Si
HmN_000876950*	<i>npp-42</i>	10,15	0,52	45,42	Si	No	Si
HmN_000508100	<i>npp-43</i>	76,74	2,19	24,61	Si	Si	Si
HmN_000197700	<i>npp-44.1</i>	1,00	0,63	22,32	Si	Si	No
HmN_000827150*	<i>npp-44.2</i>	0,00	8,32	0,33	Si	No	Si
HmN_000540950*	<i>npp-45</i>	20,43	3,01	17,63	Si	No	Si
HmN_000088450*	<i>npp-46</i>	184,96	0,29	9,29	Si	Si	Si
HmN_000255600	<i>npp-49.1</i>	6,94	15,16	928,38	Si	Si	No
HmN_000255700	<i>npp-49.2</i>	147,19	0,27	20,06	Si	Si	Si
HmN_000255800	<i>npp-49.3</i>	419,38	3060,66	1385,89	No	No	Si
HmN_000593200	<i>npp-49.4</i>	0,13	28,06	67,44	No	Si	Si

**Tabla 3.2. Análisis de los niveles de expresión medidos en TPM de los genes de neuropéptidos detectados en el genoma de *H. microstoma*.** En la primera columna se muestran los GeneIDs de cada gen. Segunda columna los nombres de cada gen de neuropéptido junto a su nombre común si es que son de los conservados entre otros organismos bilaterales. Se muestran los niveles de expresión de cada gen medidos en TPM, con un formato de color condicional, en el que el rojo es el valor más bajo (0) y en azul los valores más altos de expresión, con valores intermedios en blanco. Finalmente, se indica si se encontraron diferencias de expresión significativas entre los estadios. Los genes subrayados en gris no fueron considerados en los análisis de expresión diferencial por tener muy pocos conteos durante el análisis. Los genes marcados con “\*” no se encuentran en la versión original del genoma y fueron añadidos manualmente para este análisis, colocándoles un número con un “50” terminal ubicándolos entre los dos genes predichos más próximos entre sí. ED: Expresión diferencial; Egg: huevo/oncosfera; Cc: cisticercoide; Ad: adulto; npps: precursor de neuropéptido.

### 3.2.2 RT-PCRs semicuantitativas para los genes de precursores de neuropéptidos.

Se llevó a cabo el estudio de los niveles de expresión de los diferentes genes de npps mediante RT-PCR semicuantitativa. Se realizó esta técnica para todos los npps, excepto para: *npp-40* por problemas de amplificación, y para los 4 genes *npp-49.x*, ya que fueron identificados posteriormente en los análisis peptidómicos. Los resultados obtenidos en esta parte se muestran en la **Figura 3.2**. Se logró detectar la expresión de estos genes en los tres estadios principales del ciclo de vida de *H. microstoma*, encontrando diferencias de expresión entre varios de ellos. Es de resaltar la buena correlación que se encuentra entre los niveles de expresión detectados en esta parte y los que se muestran en la **Tabla 3.2** de

este capítulo, en el análisis de los datos de RNAseq para estos mismos genes. Cabe destacar que a diferencia de los análisis de RNAseq, en estos experimentos los adultos no estaban depletados de huevos.



**Figura 3.2.** RT-PCRs semicuantitativas de los genes de neuropéptidos detectados en Koziol et al., 2016 [79]. Se muestran los resultados de gel de agarosa a los 26, 30 y 34 ciclos de ciclado de la PCR para los tres estadios principales del ciclo de vida de *H. microstoma*.

### 3.3 Análisis de las diferencias de expresión de los receptores de neuropéptidos.

Se analizaron los GPCRs asociados a la comunicación neuropeptidérgica obtenidos de los trabajos anteriores de Koziol et al., 2016 y de Tsai et al., 2013 [20,79]. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3.3**. Se puede apreciar que los niveles de expresión de estos genes se encuentran, en términos generales, al menos un orden de magnitud por debajo de los niveles de expresión de los genes de npps en términos del valor de TPM. Se



destaca de estos resultados que los receptores de CCAP-R, el de Miomodulina MyMo-R3 y un receptor de ligando no identificado (HmN\_000504200), se expresan significativamente más en oncósferas que en los otros dos estadios. El resto de los receptores tienen expresión compartida entre dos estadios, aunque no parece haber genes específicos de adultos o cisticercoides. Muchos genes aparecen con una muy baja expresión en todos los estadios.

Geneid	Posible ligando predicho	On-TPM	Cc-TPM	Ad-TPM	ED-AdVsCc	ED-AdVsOn	ED-CcVsOn
HmN_000225600	No identificado por filogenias	0,88	0,44	1,70	Si	No	No
HmN_000322900	No identificado por filogenias	0,38	0,19	0,61			
HmN_000345000	No identificado por filogenias	4,18	0,39	1,41	No	No	Si
HmN_000379200	No identificado por filogenias	1,44	0,85	1,85	No	No	No
HmN_000419200	No identificado por filogenias	0,58	0,39	1,13	No	No	No
HmN_000504200	No identificado por filogenias	7,06	0,25	0,45	No	Si	Si
HmN_000585200	No identificado por filogenias	7,09	1,05	2,84	No	No	Si
HmN_000619200	No identificado por filogenias	28,46	11,49	6,84	No	Si	No
HmN_000674000	No identificado por filogenias	1,40	0,62	3,41	Si	No	No
HmN_000741700	No identificado por filogenias	25,72	12,97	23,39	No	No	No
HmN_000752300	No identificado por filogenias	1,53	0,51	0,78			
HmN_000779700	CCAP-R	25,31	0,92	5,19	Si	Si	Si
HmN_000085600	Luq-R	0,00	0,25	1,17			
HmN_000276100	Myomodulin-R1	14,26	6,15	2,46	No	Si	No
HmN_000292400	Myomodulin-R2	2,18	1,81	4,62	No	No	No
HmN_000454700	Myomodulin-R3	4,75	0,13	0,34	No	Si	Si
HmN_001010400	Myomodulin-R4	0,00	0,00	0,16			
HmN_000426400	NKY-R	0,39	0,10	0,41			
HmN_000147700	NPY-R1	0,19	1,89	0,44	No	No	Si
HmN_000399200	NPY-R2	4,58	24,93	7,63	No	No	No
HmN_000480300	NPY-R3	3,87	1,24	1,79	No	No	Si
HmN_000640600	NPY-R4	0,00	0,31	0,46			
HmN_000699100	NPY-R5	0,89	0,72	1,91	No	No	No
HmN_000695400	PK-NMU-R	0,29	0,09	0,54			
HmN_000334100	SIFa-R	6,81	0,26	3,83	Si	No	Si
HmN_000224700	TK-R	0,00	0,03	0,82			
HmN_000875700	TRH-R	0,23	0,05	0,87			

**Tabla 3.3. Análisis de los niveles de expresión medidos en TPM de los GPCRs de neuropéptidos detectados en el genoma de *H. microstoma*.** En la primera columna se muestran los GeneIDs de cada gen. En la segunda columna se muestra a los posibles ligandos de estos receptores para aquellos que fueron identificados por análisis filogenéticos, en Koziol et al., 2016 [79]. Se muestran los niveles de expresión de cada gen medidos

en TPM por estadio, con un formato de color condicional, en el que el rojo es el valor más bajo (0) y en azul los valores más altos de expresión, con valores intermedios en blanco. Finalmente, se indica si se encontraron diferencias de expresión significativas entre los estadios. Los genes subrayados en gris no fueron considerados en los análisis de expresión diferencial por tener muy pocos conteos durante el análisis. ED: Expresión diferencial; Egg: huevo/oncosfera; Cc: cisticercoide; Ad: adulto.

### 3.4 Análisis peptidómico de los genes de neuropéptidos identificados previamente *in silico*.

A través de la colaboración con el laboratorio de la Dra. Liesbet Temmerman, de la Universidad Católica de Leuven, Bélgica, se confirmó mediante peptidómica la presencia varios de los neuropéptidos que habían sido detectados *in silico*. Se utilizaron adultos de *H. microstoma* para las extracciones proteicas, se eligió a este estadio por la facilidad de obtención de grandes cantidades de tejido en comparación a los otros estadios, y porque es el estadio con mayor cantidad de neuropéptidos expresados, lo cual es ideal para validar los npp putativos predichos *in silico*. Se identificaron a través de estos análisis peptidómicos a 30 de los 39 npps predichos. Los resultados obtenidos de esta parte del trabajo se muestran en la **Tabla 3.4**. Básicamente, se realizaron 5 experimentos con las siguientes muestras: utilizando gusanos enteros con segmentos grávidos, sin segmentos grávidos, únicamente escólecex y un experimento con un gran *pool* de todas las partes de los gusanos adultos (similar al de adultos con segmentos grávidos, pero con mayor cantidad de tejido total). Teniendo en cuenta a los neuropéptidos detectados *in silico* previamente se detectó al menos un neuropéptido maduro para 22 precursores, esto quiere decir que directamente fue detectada la secuencia de al menos uno de los neuropéptidos conservados predichos que tendría la actividad biológica luego del procesamiento post-traduccional. Para otros ocho neuropéptidos predichos *in silico*, sólo fueron detectada la región flanqueante a los sitios de corte de prohormona convertasas, siendo esta región más grande que el neuropéptido maduro, facilitando su detección mediante esta técnica. El neuropéptido *npp-15.2* fue encontrado con una glicina en el extremo carboxilo terminal, lo que sugiere que se detectó al péptido aún sin terminar su procesamiento (para dejar un extremo amida en esta posición en lugar de la glicina), de modo similar *npp-6* y *npp-43* se detectaron sin la finalización de su procesamiento predicho, con una lisina en el extremo carboxilo terminal (*npp-6* incluso con la secuencia C terminal glicina-lisina), lo que sugiere que aún no sufrieron al procesamiento de la Carboxipeptidasa E. Una explicación de hallar a los neuropéptidos con estas secuencias terminales, es que su tamaño es mayor debido a que aún tiene a estos aminoácidos sin procesar, favoreciendo su detección por espectrometría de masa, perdiéndose con mayor probabilidad los completamente procesados, que son más pequeños [282]. Otra diferencia encontrada con las secuencias predichas es que el neuropéptido *npp-31/32.3* fue encontrado sin la metionina inicial predicha en su secuencia del péptido maduro, en las vías de secreción no suelen encontrarse metionina-aminopeptidasas (MAPs) pero tal vez esto pueda ser un artefacto del procesamiento en el

cual estas proteínas citoplasmáticas actuaron sobre estos péptidos. Junto a la validación experimental de estos neuropéptidos como tales, se encontraron adicionalmente algunos fragmentos peptídicos que podrían llegar a ser nuevos neuropéptidos. Más específicamente se detectaron 8 péptidos, que corresponden a los productos de genes con algunas características similares a los genes de npps que no habían sido detectados previamente. De estos 8 genes de npps putativos, uno de ellos tiene características claras que corresponden a un gen de npp, tanto a nivel de posibles sitios de procesamiento, como de conservación diferencial entre péptidos maduros y regiones flanqueantes, el *npp-49.1*, (HmN\_000255600). Mediante posterior análisis bioinformático se detectó que el gen de *npp-49.1* tiene 3 parálogos en el genoma de *H. microstoma*: HmN\_000255700, HmN\_000255800 y HmN\_000593200. Tanto *npp49.1* como sus parálogos fueron añadidos a todos los análisis de expresión génica que se mostraron previamente (*npp-49.1* (HmN\_000255600), *npp-49.2* (HmN\_000255700), *npp-49.3* (HmN\_000255800) y *npp-49.4* (HmN\_000593200)). Finalmente, no fueron detectados los péptidos maduros ni las regiones flanqueantes de los siguientes neuropéptidos: *npp-2*, *npp-20.2*, *npp-20.3.1*, *npp-20.3.2*, *npp-20.4*, *npp-20.5*, *npp-38*, *npp-42*, *npp-44.2*. La falta de detección de estos neuropéptidos puede estar dada por diversos factores como su baja expresión, su pequeño tamaño, o por limitaciones de la técnica de detección (se amplía en la discusión).

Cabe destacar que el neuropéptido *Npp-46*, previamente mostrado en los análisis transcriptómicos como expresado principalmente en oncósferas, sólo pudo ser detectado en las muestras de este análisis que tenían segmentos grávidos.

Precursor	Región del péptido	Con Segmentos Grávidos 1	Con Segmentos Grávidos 2	Sin Segmentos Grávidos	Escólices muestra 1	Escólices muestra 2	Total de muestras en donde fue detectado
npp-1** (HmN_000556000)	maduro						0
	flanqueante			Presente			1
npp-4 (HmN_000166500)	maduro						0
	flanqueante	Presente					1
npp-5 (HmN_000072750, HmN_000072700 en v3 incorrectamente fusionado )	maduro						0
	flanqueante	Presente					1
npp-6 (HmN_000648800)	maduro	Presente (con GK terminal)					1
	flanqueante			Presente			1
npp-14 (HmN_000787500; HmN_003013690 en v3)	maduro	Presente					1
	flanqueante	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	5

npp-15.1 (HmN_000592500)	maduro						0
	flanqueante			Presente			1
npp-15.2 (HmN_000592400)	maduro	Presente (con G terminal)					1
	flanqueante	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	5
npp-20.1 (HmN_000487300)	maduro	Presente					1
	flanqueante			Presente			1
npp-24 (HmN_000377100)	maduro	Presente					1
	flanqueante	Presente		Presente			2
npp-26 (HmN_000165500)	maduro	Presente	Presente	Presente	Presente		4
	flanqueante	Presente	Presente	Presente	Presente		4
npp-27.1 (HmN_000326200)	maduro	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	5
	flanqueante			Presente			1
npp-27.2 (HmN_000326100)	maduro	Presente	Presente	Presente			3
	flanqueante	Presente					1
npp-28 (HmN_000234350 en v3)	maduro	Presente					1
	flanqueante						0
npp-29.1 (HmN_000212550 en v3)	maduro						0
	flanqueante	Presente		Presente			2
npp-29.2 (HmN_000212650 en v3)	maduro						0
	flanqueante	Presente		Presente			2
npp-30 (HmN_000183900; HmN_003021340 and 003021330 en v3)	maduro	Presente	Presente	Presente	Presente		4
	flanqueante	Presente	Presente	Presente	Presente		4
npp-31/32.1** (HmN_000223650)	maduro	Presente		Presente	Presente	Presente	4
	flanqueante						0
npp-31/32.2** (HmN_000205400)	maduro	Presente			Presente		2
	flanqueante	Presente					1
npp-31/32.3 (HmN_000142950*)	maduro	Presente (sin M inicial)					1
	flanqueante	Presente					1
npp-33 (HmN_000514300)	maduro	Presente					1
	flanqueante						0
npp-34** (HmN_000315550)	maduro	Presente					1
	flanqueante	Presente	Presente	Presente			3
npp-35 (HmN_000148600)	maduro	Presente		Presente			2

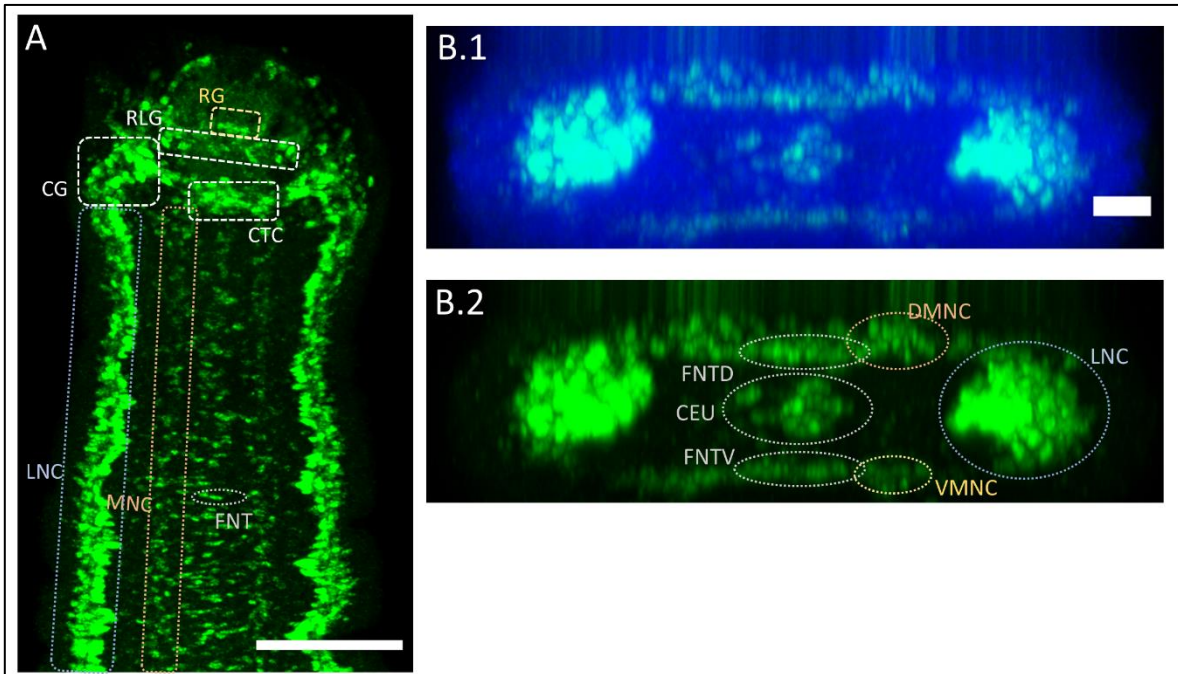
	flanqueante	Presente		Presente			2
npp-36 (HmN_000511300)	maduro	Presente	Presente	Presente			3
	flanqueante	Presente	Presente	Presente			3
npp-37 (HmN_000695950*)	maduro						0
	flanqueante	Presente		Presente			2
npp-40 (HmN_000430600)	maduro	Presente					1
	flanqueante			Presente			1
npp-41 (HmN_000866400)	maduro						0
	flanqueante	Presente					1
npp-43 (HmN_000508100)	maduro	Presente (con K terminal)					1
	flanqueante	Presente					1
npp-44.1 (HmN_000197700)	maduro	Presente					1
	flanqueante						0
npp-45 (HmN_002017200 v3)	maduro	Presente					1
	flanqueante	Presente					1
npp-46 (HmN_000088450*)	maduro	Presente	Presente				2
	flanqueante						0
Npp 49.1 (HmN_000255600)	maduro	Presente		Presente			2
	flanqueante	Presente					1

**Tabla 3.4. Detección de neuropéptidos en *H. microstoma* mediante análisis peptidómico.** Se muestran los diferentes neuropéptidos detectados en los análisis peptidómicos, para algunos de ellos se detectó directamente al neuropéptido maduro y para otros se detectaron regiones del propéptidos que no contribuyen al neuropéptido maduro final, sino a la región flanqueante del neuropéptido maduro en el propéptido. Se indica si se encontró alguna diferencia con la secuencia predicha *in silico* en cada recuadro. Los neuropéptidos marcados con “\*” no se encuentran en la versión original del genoma y fueron añadidos manualmente para este análisis, colocándoles un número de GeneID con un “50” terminal ubicándolos entre los dos genes predichos más próximos entre sí de la versión 1 del genoma [20]. Con “\*\*\*” se marcaron a los neuropéptidos que se perdieron en versiones 3 (v3) del genoma de *H. microstoma*. La muestra “Con segmentos grávidos 1” es la que fue realizada con mayor cantidad de material de adultos, lo que facilitó la detección de varios neuropéptidos.

## **Capítulo 4. El estadio adulto: expresión de los sistemas de comunicación neuropeptidérgicos en este estadio y su cultivo *in vitro*.**

### **4.1 Detección de genes implicados en la comunicación neuropeptidérgica mediante WMISH.**

En este capítulo se mostrarán diferentes resultados de WMISH en adultos de *H. microstoma*. En el Capítulo 1 de resultados, se mostraron resultados de WMISH para *pc2*, y se discute que este gen es expresado en prácticamente todas las estructuras del SN de este estadio. En este capítulo se mostrará la distribución de la expresión de genes de precursores de neuropéptidos y de receptores de neuropéptidos a través de esta misma técnica. Para muchos neuropéptidos el patrón de expresión se mostrará mediante proyecciones en Z de las WMISH y también en proyecciones transversales de la zona del cuello generadas por el análisis de las imágenes obtenidas del microscopio de barrido laser confocal. Para poder comparar mejor los resultados de las WMISH de los neuropéptidos con los resultados obtenidos para *pc2*, en la **Figura 4.1** se muestra una proyección en Z (serie A) y proyecciones transversales, mostrando los diferentes componentes del sistema nervioso marcados con esta prohormona convertasa necesaria *a priori* para el procesamiento de la mayoría de los neuropéptidos. Para las diferentes proyecciones que se mostrarán en este capítulo se nombrarán como cordones nerviosos laterales (LNC, *lateral nerve cords*) a los cordones nerviosos laterales principales junto a los dorsales y ventrales accesorios, mientras que a los cordones nerviosos mediales ventrales (VMNC, *ventro-medial nerve cords*) y dorsales (DMNC, *dorso-medial nerve cords*) serán mencionados en conjunto como cordones nerviosos mediales (MNC, *medial nerve cords*).



**Figura 4.1. WMISH de *pc2*.** Se muestran resultados de WMISH para *pc2* en *H. microstoma*. En verde se muestran los resultados de la WMISH y en azul se muestra la señal nuclear por tinción con DAPI. **A**, se muestra una proyección en Z sólo para la señal de WMISH en donde se señalan las diferentes estructuras que expresan a este gen. **B**, proyecciones transversales de la zona del cuello de la imagen mostrada en A. CEU: células endócrinas unicelulares putativas; CG: ganglio cerebral; CTC: comisura cerebral transversal; DMNC: cordones nerviosos mediales dorsales; FNT: fibras nerviosas transversales; FNTD: fibras nerviosas transversales dorsales; FNTV: fibras nerviosas transversales ventrales; LNC: cordones nerviosos laterales; MNC: cordones nerviosos mediales; RG: ganglio rostral; RLG: ganglio rostral; VMNC: cordones nerviosos mediales ventrales. Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$  en A, y 20  $\mu\text{m}$  en B.1.

#### 4.1.1 Detección por WMISH de genes de precursores de neuropéptidos (npps)

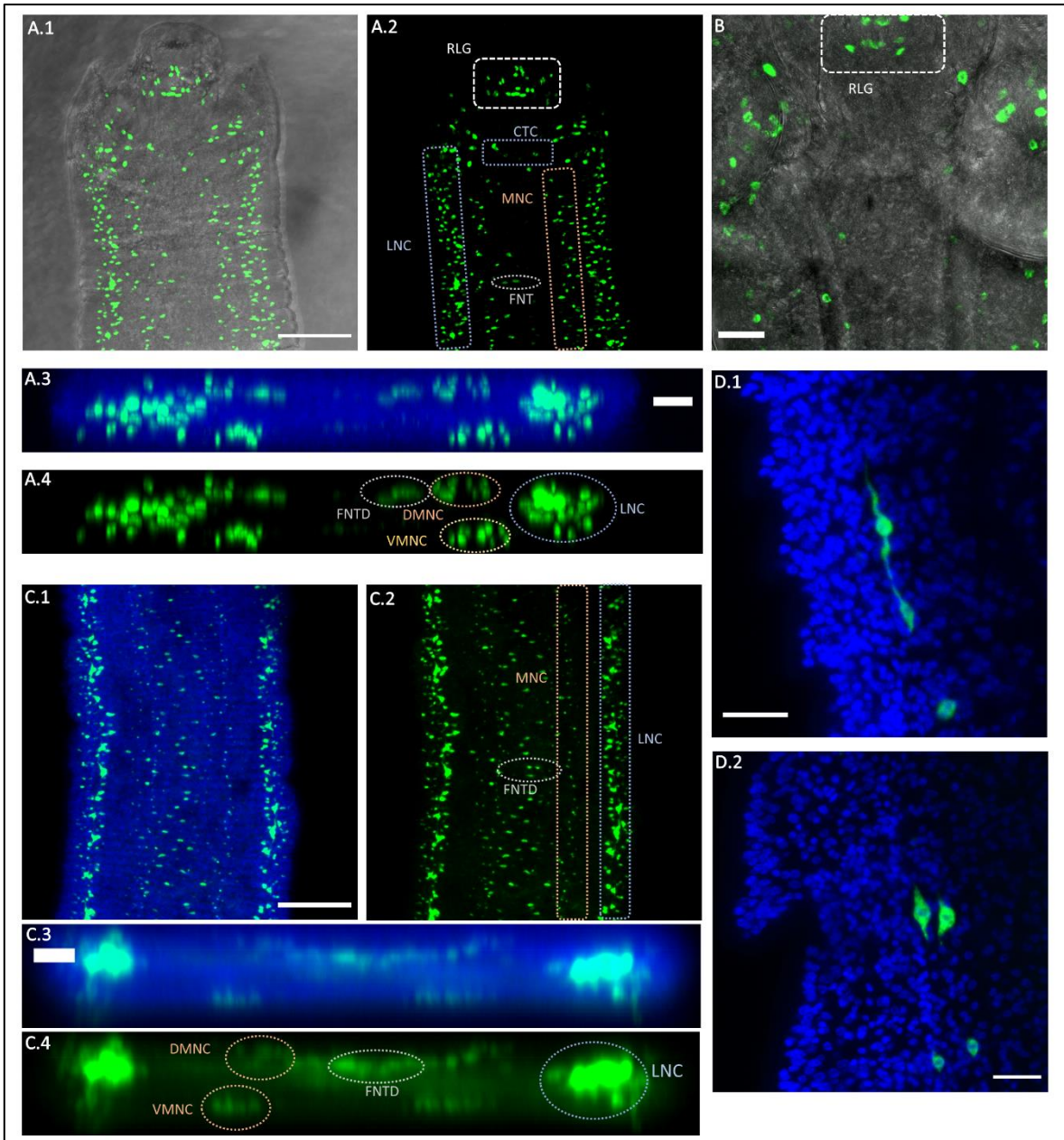
A partir de los resultados previos obtenidos en los análisis de expresión génica de diferentes neuropéptidos, se seleccionaron algunos de estos genes que los codifican para analizar la distribución de su expresión mediante WMISH. Se seleccionaron genes por sus niveles de expresión, su especificidad de estadio, por ser npp conservados en otros animales bilaterales y/o por tener un efecto descrito previamente en cestodos (como en el caso de *npp-2*, por mostrar que induce proliferación celular en *E. multilocularis* [283]). Se detectaron 12 genes de npps en el estadio adulto de *H. microstoma* mediante WMISH: *npp-2*, *npp-6*, *npp-15.2*, *npp-20.1*, *npp-20.4*, *npp-29.1*, *npp-29.2*, *npp-33*, *npp-38*, *npp-41*, *npp-49.1*, *npp-49.3*. Se realizaron además WMISH para otros cuatro genes de npps (*npp-20.3.1*, *npp-46*, *npp-49.2* y *npp-49.4*), pero sin detectar señal fluorescente en los tejidos del adulto para ninguno de ellos.

A modo general se detectó la expresión de muchos npps principalmente en el SN, encontrando diferentes patrones de expresión dependiendo del npp analizado. Los

patrones de expresión fueron por lo general no segmentarios y se evidenció por primera vez una expresión asimétrica de genes en el sistema nervioso de cestodos. La técnica de WMISH no es una buena técnica para evidenciar prolongaciones celulares, porque el ARNm no es abundante en estas extensiones, aunque en algunos casos la señal fluorescente permitió evidenciar el inicio de estas proyecciones. La mayor parte de los npps analizados aquí se corresponden con los dominios de expresión detectados para *pc2*, lo cual era esperable porque *a priori* esta enzima sería necesaria para el procesamiento de los neuropéptidos aquí detectados. En el final de esta sección se muestran esquematizados los resultados obtenidos para cada npp. A continuación, se pasan a detallar los resultados obtenidos para cada uno de los neuropéptidos detectados mediante esta técnica.

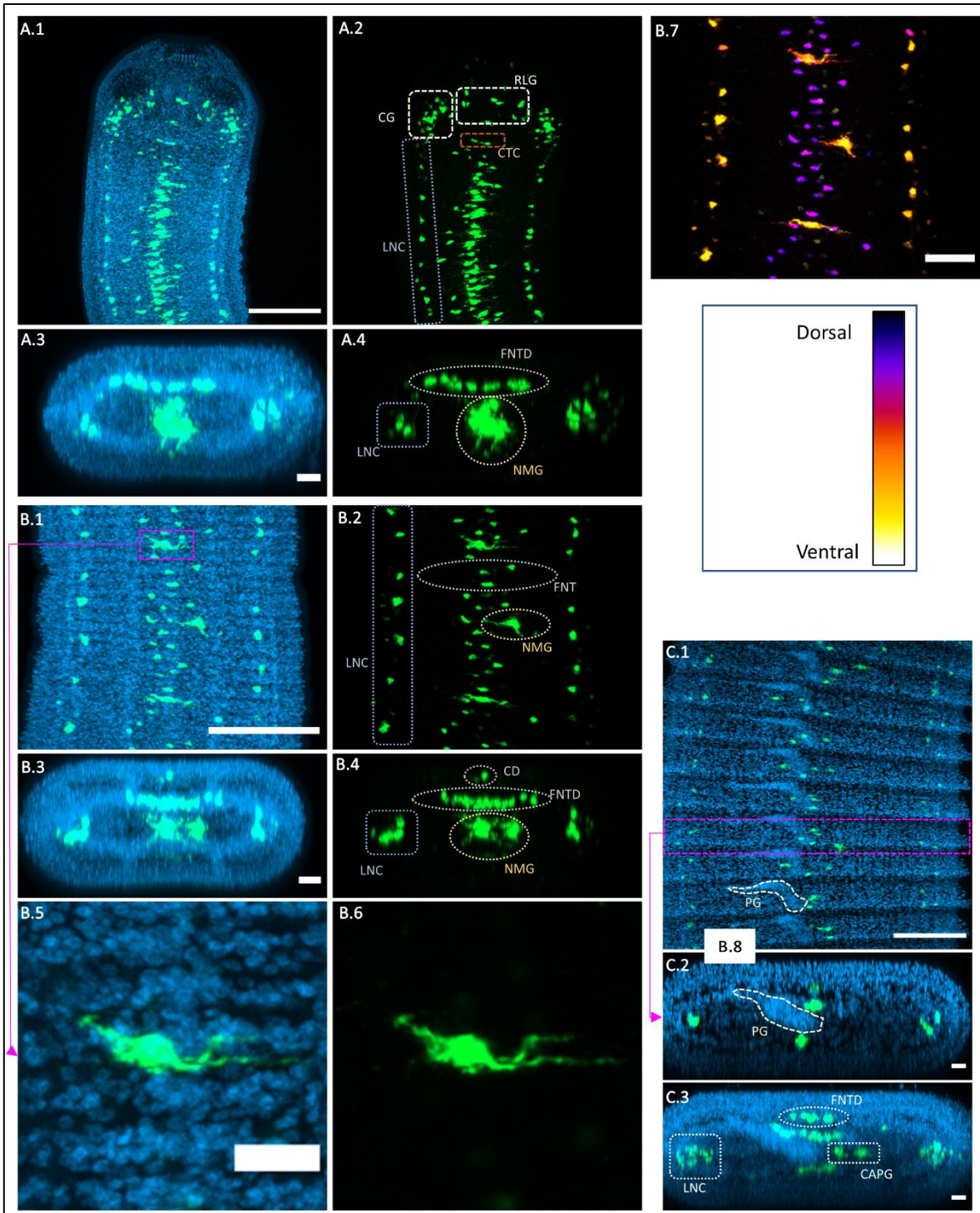
**Detección de *npp-2*:** Los resultados para este npp se muestran en la **Figura 4.2** Este npp presenta una amplia expresión en el sistema nervioso del adulto. Se puede observar una alta expresión en el ganglio rostellar (RLG, por su nombre en inglés, *rostellar ganglia*), en los ganglios cerebrales en la base de los cordones (CG, por su nombre en inglés, *cerebral ganglia*), en algunas células de la comisura cerebral transversal (CTC, por su nombre en inglés, *cerebral transversal commissure*), en los cordones nerviosos laterales (LNC, por su nombre en inglés, *lateral nerve cords*), en los cordones nerviosos mediales (MNC, por su nombre en inglés, *medial nerve cords*) y en las células que generan las fibras nerviosas transversales Dorsales (FNTD). Se puede apreciar que este gen presenta diferencias de expresión en el eje dorsoventral, mostrando una expresión en células dorsales que no está presente en el lado ventral, evidenciado por las FNTD en las proyecciones transversales de la zona del cuello (**Figura 4.2: A.3 y A.4**), y más claramente en las proyecciones transversales de regiones más avanzadas del desarrollo de la estróbila (**Figura 4.2: B.3 y B.4**). En el caso de las células en los LNC, estas tienen una clara morfología neuronal, al poderse distinguir el inicio de sus proyecciones (**Figura 4.2: D.1 y D.2**), se pueden distinguir diferentes tamaños y morfologías, sugiriendo diferentes poblaciones de neuronas expresando este npp. La distribución de la expresión de este neuropéptido no parece ser segmentaria en los cordones nerviosos, pero si en las FNTD en la estróbila (**Figura 4.2: C.1, C.2**).





**Figura 4.2. Detección por WMISH del gen *npp-2* en el estadio adulto.** Se muestran los resultados de la WMISH en verde, DIC en tonalidades de grises y DAPI en azul. **A**, En las imágenes A.1 y A.2 se muestran proyecciones en Z de la distribución de la expresión en el escólex y en el cuello, A.3 y A.4 son proyecciones en el eje y de la zona del cuello de la misma imagen mostrando la distribución en el eje Z de la señal de WMISH. **B**, se muestra en detalle la señal de la zona media de un escólex. **C**, se muestra una proyección en Z parcial en C.1 y C.2, donde se ven LNC y las FNTD con claridad en segmentos aún inmaduros (inicio de formación del sistema reproductor), se aprecia claramente la diferencia dorsoventral de expresión dada por las FNTD en las proyecciones transversales de C.3 y C.4. **D**, se muestran en detalle la morfología neuronal de células de los cordones nerviosos laterales en segmentos más maduros. CG: ganglio cerebral; CTC: comisura cerebral transversal; DMNC: cordones nerviosos mediales dorsales; FNT: fibras nerviosas transversales; FNTD: fibras nerviosas transversales dorsales; LNC: cordones nerviosos laterales; MNC: cordones nerviosos mediales; RLG: ganglio rostral; VMNC: cordones nerviosos mediales ventrales. Barras de escala: A.1 y C.1: 100  $\mu$ m; B, A.3, C.3, D.1 y D.2: 20  $\mu$ m.

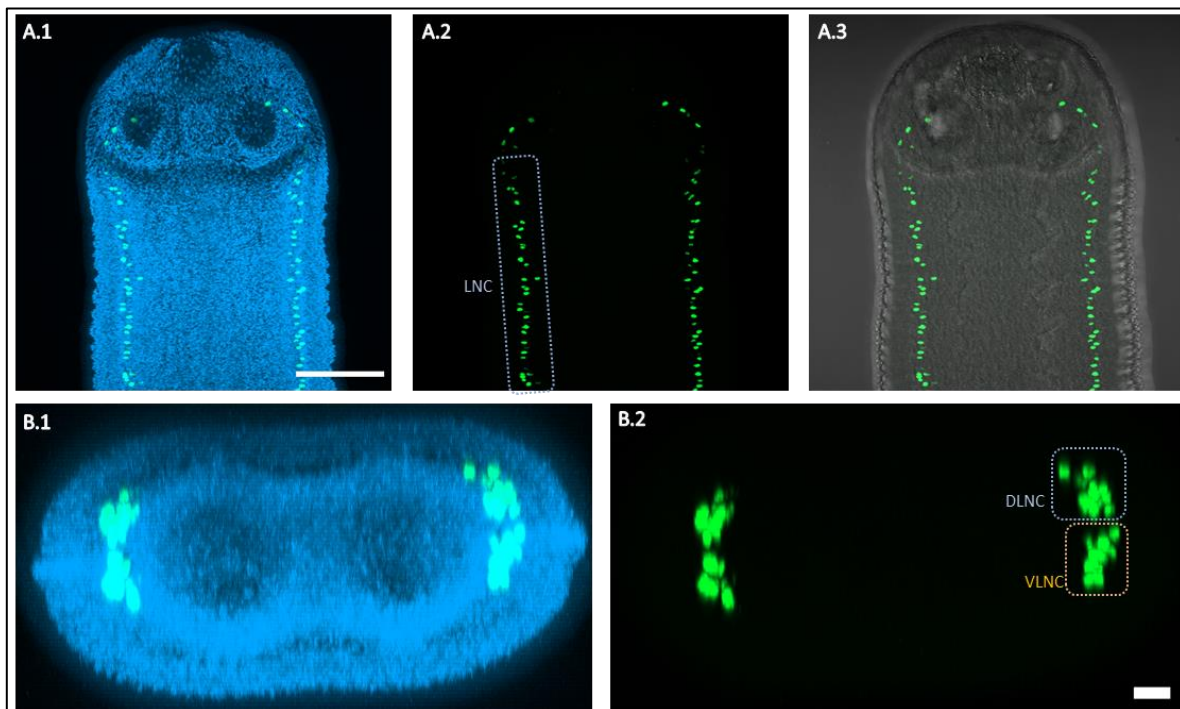
**Detección de *npp-6*:** Los resultados para este npp se muestran en la **Figura 4.3**. Este es uno de los npps conservados en otros organismos bilaterales (homólogo de miomodulina). Presenta una expresión en los LNC, en FNTD, en el RLG y en los ganglios cerebral (CG, por sus siglas en inglés, *cerebral ganglia*). A su vez presenta expresión en células con morfología de neuronas grandes que se encuentran en la región medular central del adulto, llamamos a estas células Neuronas Medulares Gigantes (NMG), es probable que estas células medulares se correspondan con las células que también expresan *pc2* en esta posición, a las que llamamos previamente CEU (células endócrinas unicelulares), descritas previamente por Specian y Lumsden [37], aunque la morfología de estas células parece considerablemente diferente al observar los resultados de WMISH para *npp-6* (**Figura 4.3**) y para *pc2* (**Figura 4.1**). Puede apreciarse una de estas NMG en detalle en la **Figura C.5**. Se observan además células con expresión de *npp-6* cercanas a los primordios genitales (**Figura 4.3, B.1, B.2 y B.3**). Este npp presenta expresión diferencial en el eje dorso-ventral, con células positivas para el mismo en la región dorsal pertenecientes a las FNTD, y a unas pocas células que están presentes en una posición incluso más dorsal que estas últimas por fuera del anillo medular (**Figura 4.3: C.3 y C.4**).



**Figura 4.3. Detección por WMISH del gen *npp-6* en el estadio adulto.** Se muestran los resultados de la WMISH en verde, DIC en tonalidades de grises y DAPI en azul/cian. **A**, Se muestran resultados para la zona del escólex, con proyecciones en Z en A.1 y A.2 y con proyecciones transversales en A.3 y A.4 de la zona del cuello, nótese la señal intensa de las NMG en el centro del eje a lo largo del cuello y en los ganglios del escólex. **B**, se muestran segmentos en desarrollo aún inmaduros sexualmente, en estos segmentos se evidencia claramente la expresión de *npp-6* en neuronas medulares gigantes, se muestra una proyección en Z en B.1 y en B.2, proyección transversal en B.3 y B.4, detalle de la neurona marcada con magenta en B.1 mostrada en B.5 y B.6,

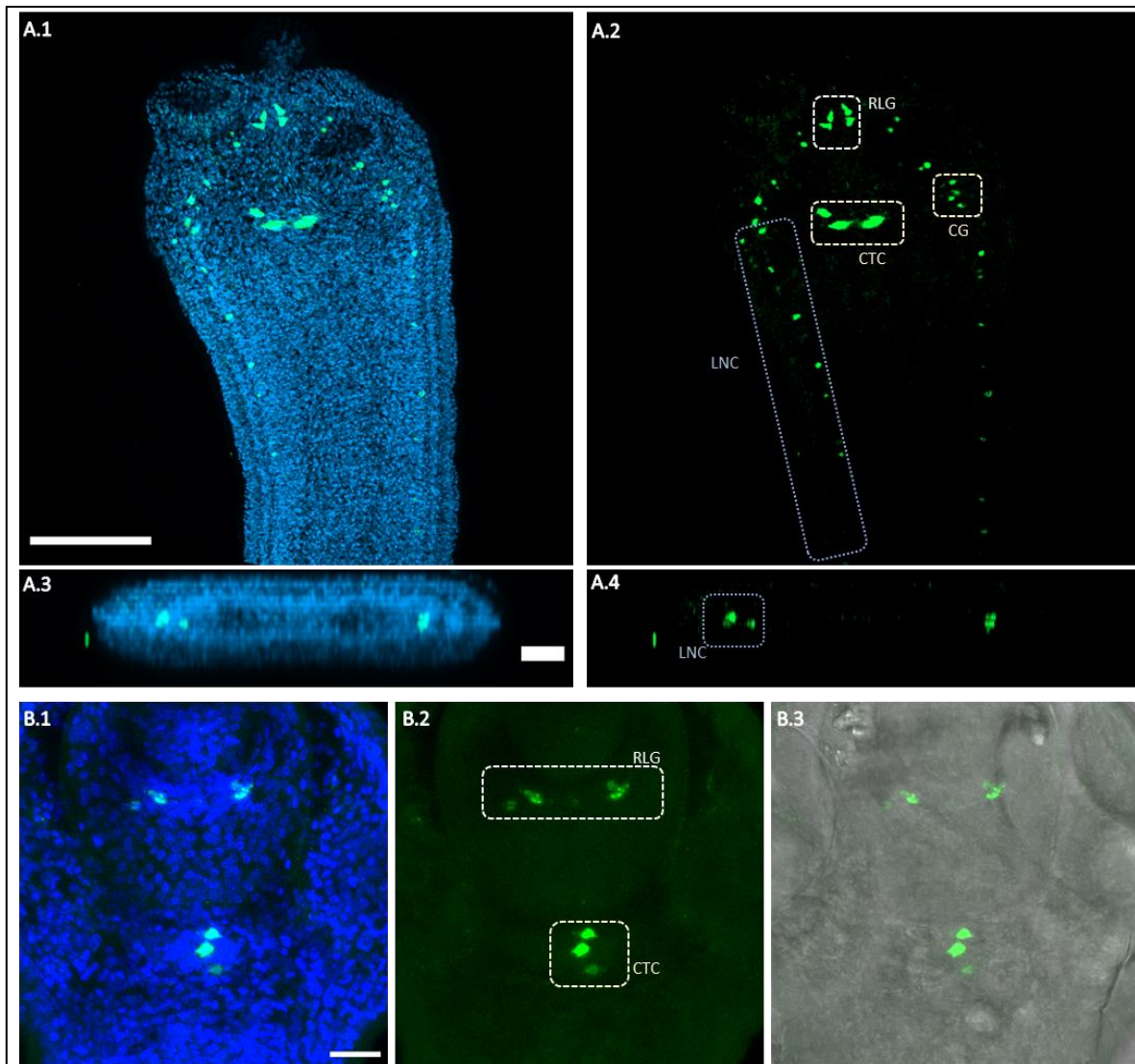
proyección en Z con código de colores con rango de profundidad dorso-ventral en B.7, código de colores utilizado en B.7 mostrado en B.8 llamado "Fire" en FIJI. **C**, se muestran segmentos en el estado de desarrollo del primordio sexual, proyección en Z en C.1, proyección transversal de un único segmento en C.2 (del que está marcado en magenta en C.1), y proyección transversal de todos los segmentos que se muestran en C.1 mostrados en C.3. CAPG: células asociadas al primordio genital; CD: células dorsales; CG: ganglio cerebral; CTC: comisura cerebral transversal; FNT: fibras nerviosas transversales; FNTD: fibras nerviosas transversales dorsales; LNC: cordón nervioso lateral; NMG: neuronas medulares gigantes; PG: primordio genital; RLG: ganglio rostral; Barras de escala: 100  $\mu$ m en A.1, B.1, B.7, C.1; 20  $\mu$ m en A.3, B.3, B.5, C.2, C.3.

**Detección de *npp-15.2*:** Los resultados obtenidos para este npp se muestran en la **Figura 4.4**. Se detectaron células que expresan a este npp únicamente en los LNC, se distingue claramente expresión asociada a los cordones nerviosos laterales dorsales (DLNC, por su nombre en inglés, *dorsal longitudinal nerve cords*) y a los cordones nerviosos laterales ventrales (VLNC, por su nombre en inglés, *ventral longitudinal nerve cords*) en las Proyecciones transversales (**Figura 4.4, serie B**).



**Figura 4.4. Detección por WMISH del gen *npp-15.2* en el estadio adulto.** Se muestran los resultados de la WMISH en verde, DIC en tonalidades de grises y DAPI en azul/cian. Se muestran resultados de este experimento para la zona del escólex en la serie A, con proyecciones en Z en A.1, A.2 y A.3. En B se muestran proyecciones transversales de la zona del cuello. DLNC: Cordón Nervioso Lateral Dorsal; LNC: Cordones Nerviosos Laterales; VLNC: Cordón Nervioso Lateral Ventral. Barra de Escala: 100  $\mu$ m en serie A y 20  $\mu$ m en serie B.

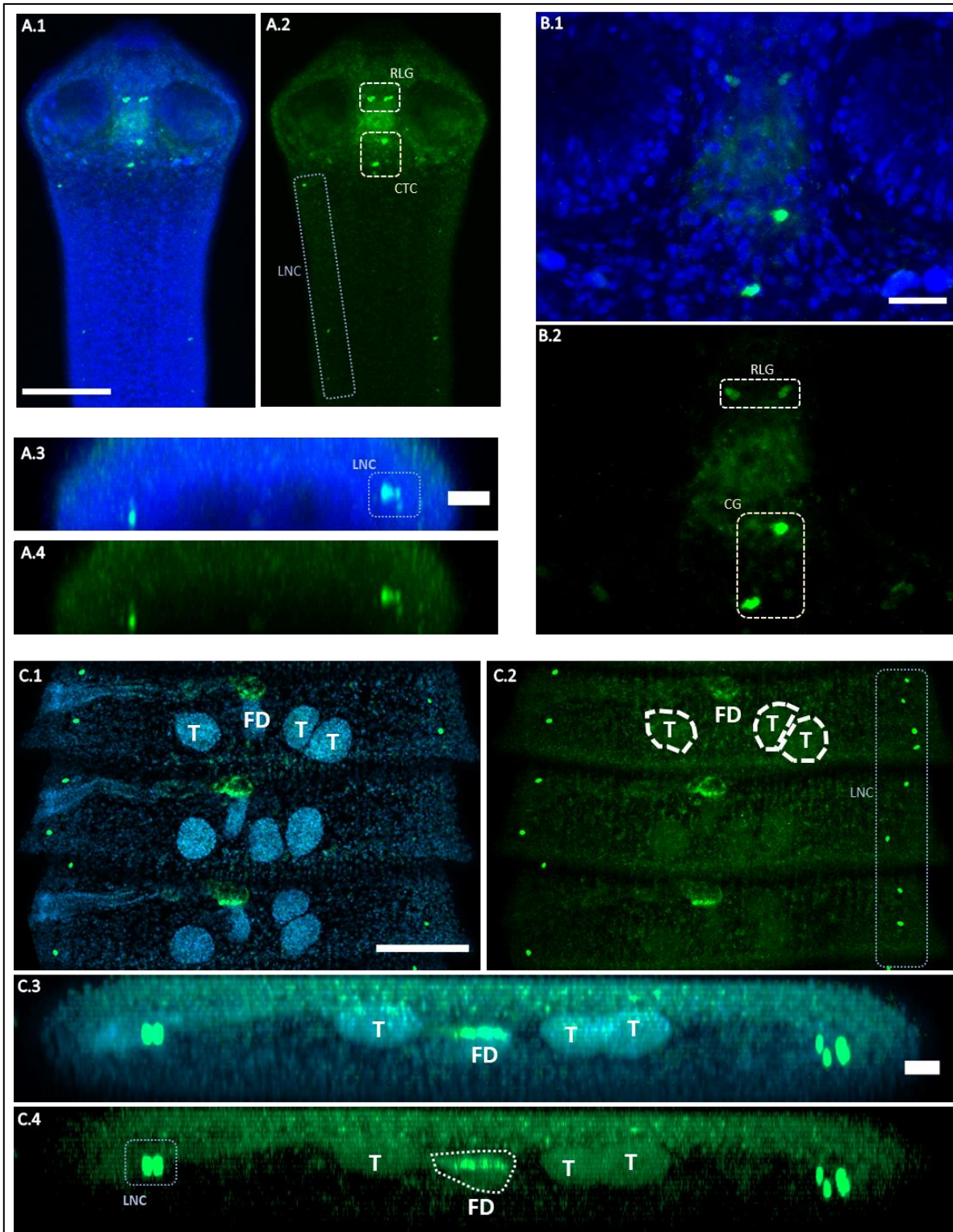
**Detección de *npp-20.1*:** Los resultados obtenidos para este npp se muestran en la **Figura 4.5**, como así también en la Figura 1.3 del capítulo 1 de resultados. Este es uno de los 6 parálogos de NPF presentes en el genoma de *H. microstoma*. Se detectaron células que expresan a este npp en los LNC, en el RLG, los CG y en la comisura cerebral transversal que los une (CTC). Es interesante notar que en el CTC este gen se expresa únicamente en tres células, dos grandes y una más pequeña, de forma similar en el RLG parece expresarse en unas 6 células (esto se vio por análisis plano a plano de las imágenes utilizadas para generar las proyecciones en Z que se muestran en la figura).



**Figura 4.5. Detección por WMISH del gen *npp-20.1* en el estadio adulto.** Se muestran los resultados de la WMISH en verde, DIC en tonalidades de grises y DAPI en azul (B.1) y azul/cian (A.1, A.3). Se muestra a las células que expresan a este npp en el escólex y en las regiones del cuello. **A**, proyección en Z de escólex y cuello en A.1 y A.2, proyección transversal únicamente de la zona del cuello en A.3 y A.4. **B**, se muestra a mayor aumento la zona del escólex de otro gusano, se muestran tres células con señal de WMISH en el CG y

a un grupo de células positivas en el RLG. CG: ganglio cerebral; CTC: comisura cerebral transversal; LNC: cordón nervioso lateral; RLG: ganglio rostral. Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$  en A.1; 20  $\mu\text{m}$  en A.3 y B.1.

**Detección de *npp-20.4*:** Los resultados obtenidos para este npp se muestran en la **Figura 4.6**. Este es uno de los 6 parálogos de NPF presentes en el genoma de *H. microstoma*. Se detectó la expresión de este npp en dos células de la CTC y en otras células del RLG, cómo así también en los LNC. Se destaca que además de estos sitios antes mencionados se detectó la expresión de este gen en el aparato reproductor femenino en desarrollo (**Figura 4.6, serie C**), más específicamente en la región inicial de los ductos reproductores femeninos.



**Figura 4.6. Detección por WMISH del gen *npp-20.4* en el estadio adulto.** Se muestran los resultados de la WMISH en verde y DAPI en azul (Serie A y B) y azul/cian (Serie C). En la serie A se muestra a las células que expresan a este *npp* en el escólex y en las regiones del cuello, Proyección en Z de escólex y cuello en A.1 y A.2, proyección transversal únicamente de la zona del cuello en A.3 y A.4. Se muestra a mayor aumento la zona del escólex en la serie B, se observan dos células con señal de WMISH en el CG y a otras dos células positivas

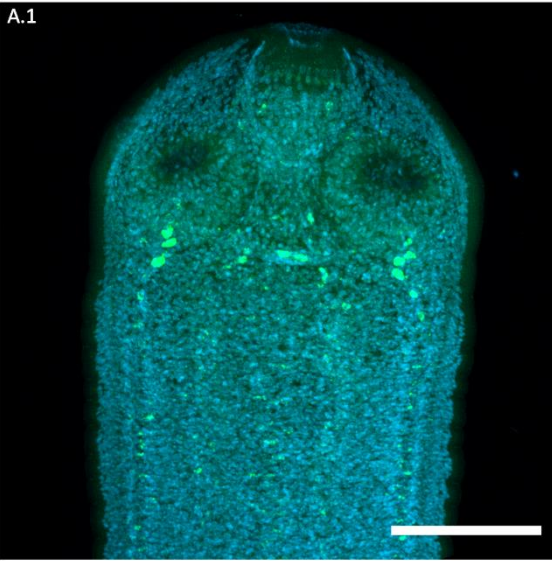
en el RLG. En la serie C se muestran segmentos más avanzados en el desarrollo del aparato reproductor, en donde pueden identificarse testes y órganos reproductivos femeninos en desarrollo, se observa señal positiva para la WMISH en el ducto femenino en desarrollo, se muestran proyecciones en Z en C.1 y C.2 y proyecciones transversales en C.3 y C.3. CTC: comisura cerebral transversal; FD: aparato reproductor femenino en desarrollo; LNC: cordón nervioso lateral; RLG: ganglio rostral T: testes. Barras de escala: 100  $\mu$ m en A.1 y C.1; 20  $\mu$ m en A.3, B.1 y C3.

**Detección de *npp-29.1* y *npp-29.2*:** Los resultados obtenidos para estos npps se muestran en la **Figura 4.7**, *npp-29.1* en la serie A y *npp-29.2* en la serie B. Ambos neuropéptidos muestran una amplia expresión en el sistema nervioso del adulto, en los LNC, en los DMNC, en los VMNC, en FNTD, en células que generan las fibras nerviosas transversales ventrales (FNTV) y en algunas células de los RLG y CG. Si bien los patrones de expresión son similares, el gen de *npp-29.2* parece expresarse en un mayor número de células que el de *npp-29.1*. Estos dos genes tienen expresión asociada tanto a las FNTV como las FNTD. El gen *npp29.1* muestra una expresión asimétrica en los LNC teniendo expresión en la región ventral, pero no en la dorsal, mientras que *npp29.2* parecería mostrar más expresión en la parte dorsal de estos cordones, aunque esta diferencia es sutil y debería ser cuantificada mediante conteo de células, y lamentablemente no se obtuvo un número de muestras suficiente de WMISH para este gen para poder confirmarlo.

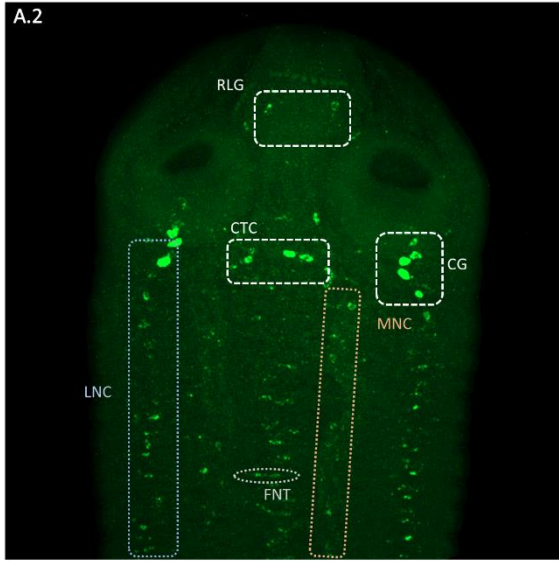


*npp-29.1*

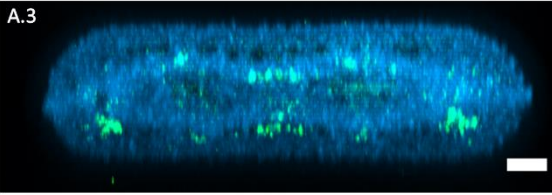
A.1



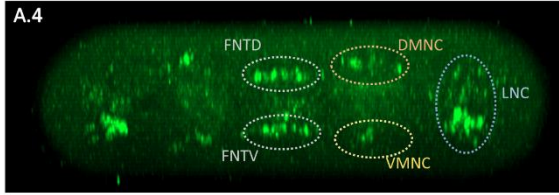
A.2



A.3

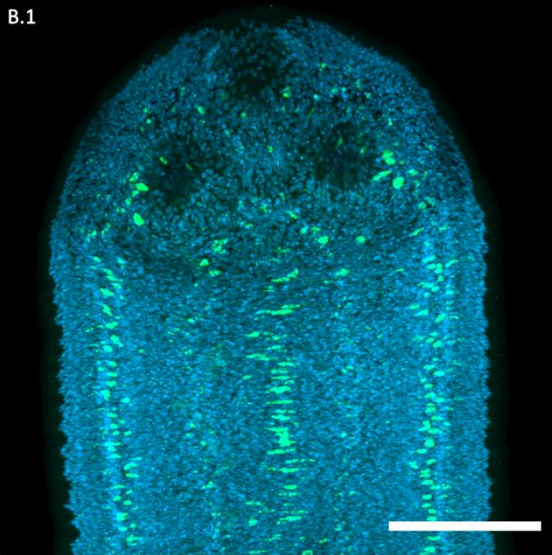


A.4

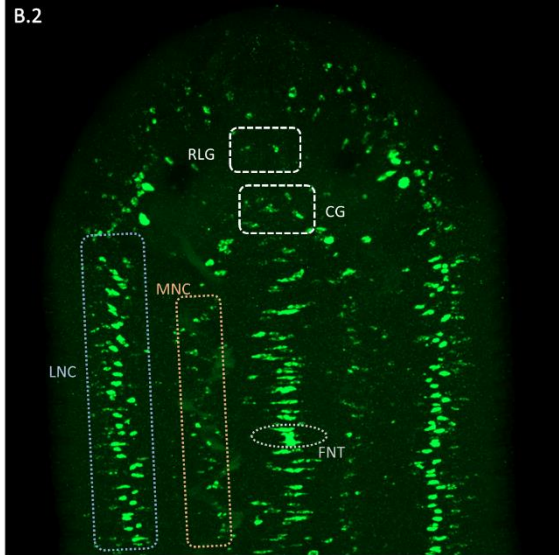


*npp-29.2*

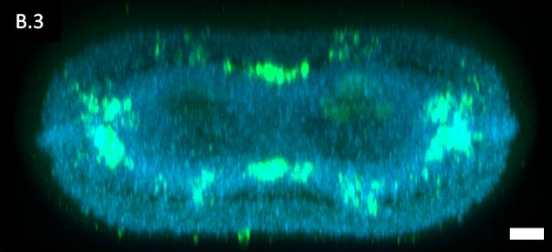
B.1



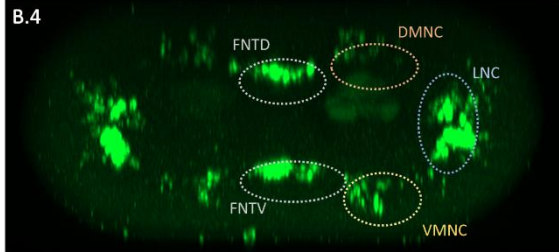
B.2



B.3



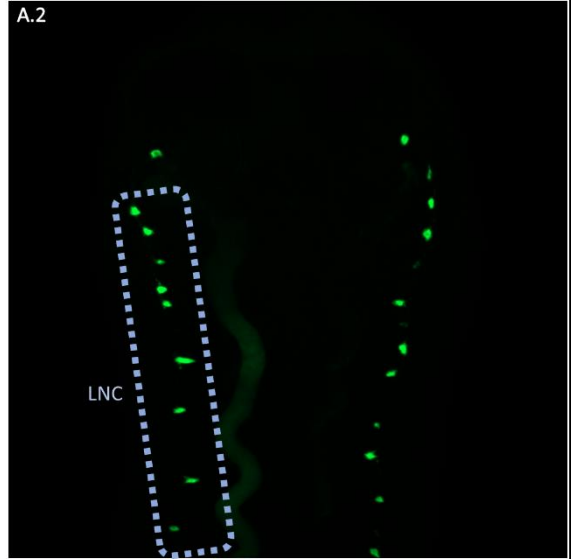
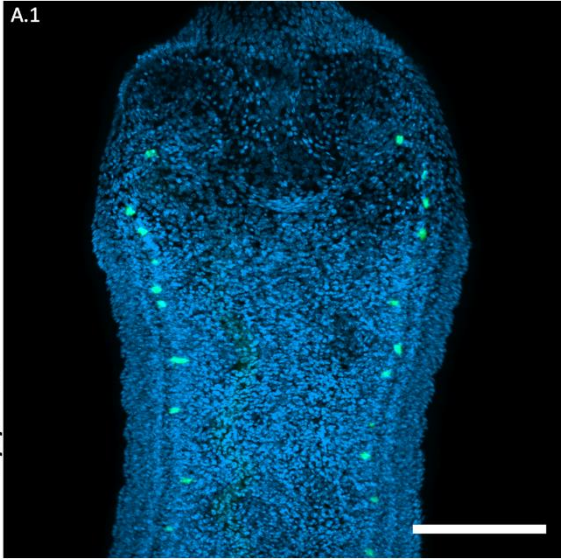
B.4



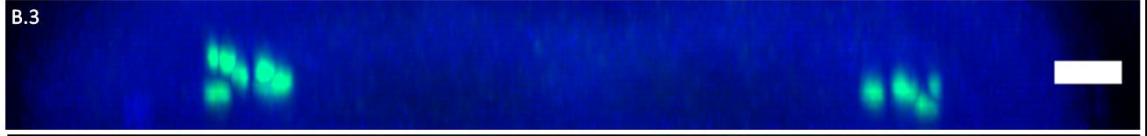
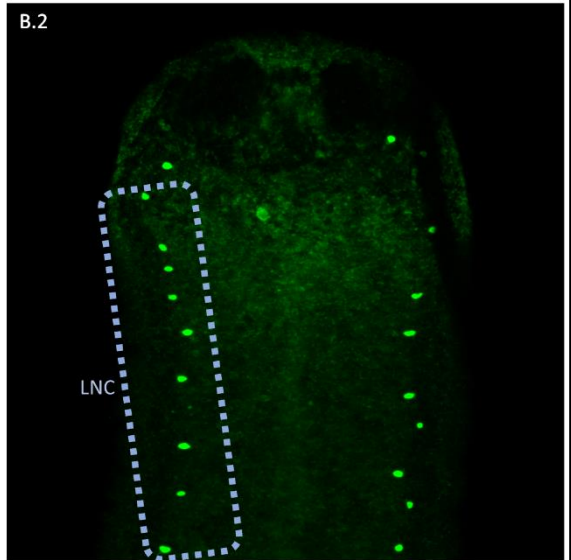
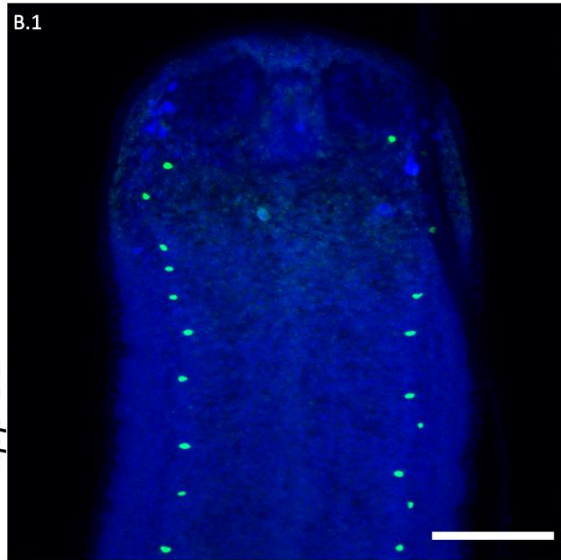
**Figura 4.7. Detección por WMISH de los genes *npp-29.1* y *npp-29.2* en el estadio adulto.** Se muestran los resultados de la WMISH en verde, DAPI en azul/cian. Resultados de las WMISH en el escólex y cuello de adultos para *npp-29.1* en la serie A y de *npp-29.2* en la serie B. Proyecciones en Z en A.1, A.2, B.1 y B.2; proyecciones transversales en A.3, A.4, B.3 y B.4. CG: ganglio cerebral; CTC: comisura cerebral transversal; DMNC: cordones nerviosos mediales dorsales; FNT: fibras nerviosas transversales; FNTD: fibras nerviosas transversales dorsales; FNTV: fibras nerviosas transversales ventrales; LNC: cordones nerviosos laterales; MNC: cordones nerviosos mediales; RG: ganglio rostral; RLG: ganglio rostral; VMNC: cordones nerviosos mediales ventrales. Barras de escala: 100  $\mu$ m en A.1 y B.1; 20  $\mu$ m en A.3, y B.3.

**Detección de *npp-33* y *npp-38*:** Los resultados obtenidos para estos npps se muestran en la **Figura 4.8**, *npp-33* en la serie A y *npp-38* en la serie B. El gen de *npp-33* es uno de los que es conservado en otros organismos bilaterales (homólogo de *SIFamida* en animales bilaterales). Para ambos genes se detectó su expresión únicamente en los LNC del adulto como se puede observar en las imágenes.

*npp-33*



*npp-38*



**Figura 4.8. Detección por WMISH de los genes *npp-33* y *npp-38* en el estadio adulto.** Se muestran los resultados de la WMISH en verde y DAPI en azul/cian (serie A) y en azul (serie B). Resultados de las WMISH en el escólex y cuello de adultos para *npp-33* en la serie A y de *npp-38* en la serie B. Proyecciones en Z en A.1, A.2, B.1 y B.2; proyecciones transversales en A.3, A.4, B.3 y B.4. LNC: cordón nervioso lateral. Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$  en A.1 y B.1; 20  $\mu\text{m}$  en A.3, y B.3.

**Detección de *npp-41*:** Los resultados obtenidos para este npp se muestran en la **Figura 4.9**. Este es uno de los neuropéptidos que es conservado con otros animales bilaterales, denominado en estos *CCAP* (por su nombre en inglés, *crustacean cardioactive peptide*). Se observa una expresión altamente extendida en los componentes del SNC del adulto, con expresión en: LNC, MNC, CG, FNTD y FNTV en la región del escólex y cuello. También se observa expresión en células individuales alrededor de las ventosas, y en células individuales en la zona proliferativa del cuello, probablemente las mismas que describimos previamente con expresión de *pc2* que llamamos CEU (células endócrinas unicelulares) en esta región. Las CEU que se observan en el cuello no se observan en segmentos más desarrollados (**Figura 4.9, series B y C**), donde en cambio, se pueden observar abundantes células periféricas (CP) positivas, por fuera del SNC, las cuales por su posición y morfología podrían ser células sensoriales, y que por su posición no corresponderían con células que expresen *pc2* (**Figura 4.9, serie D**).

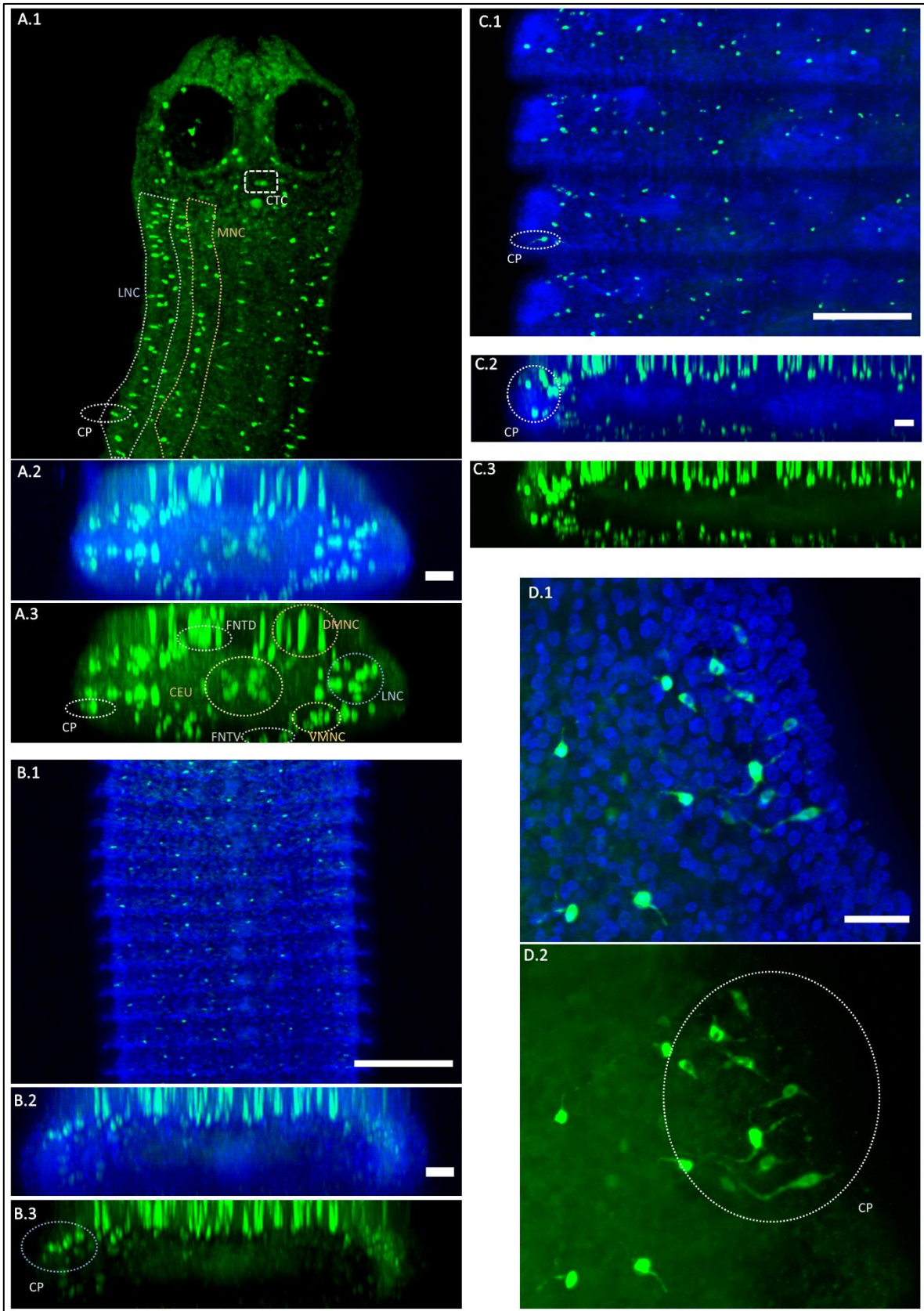
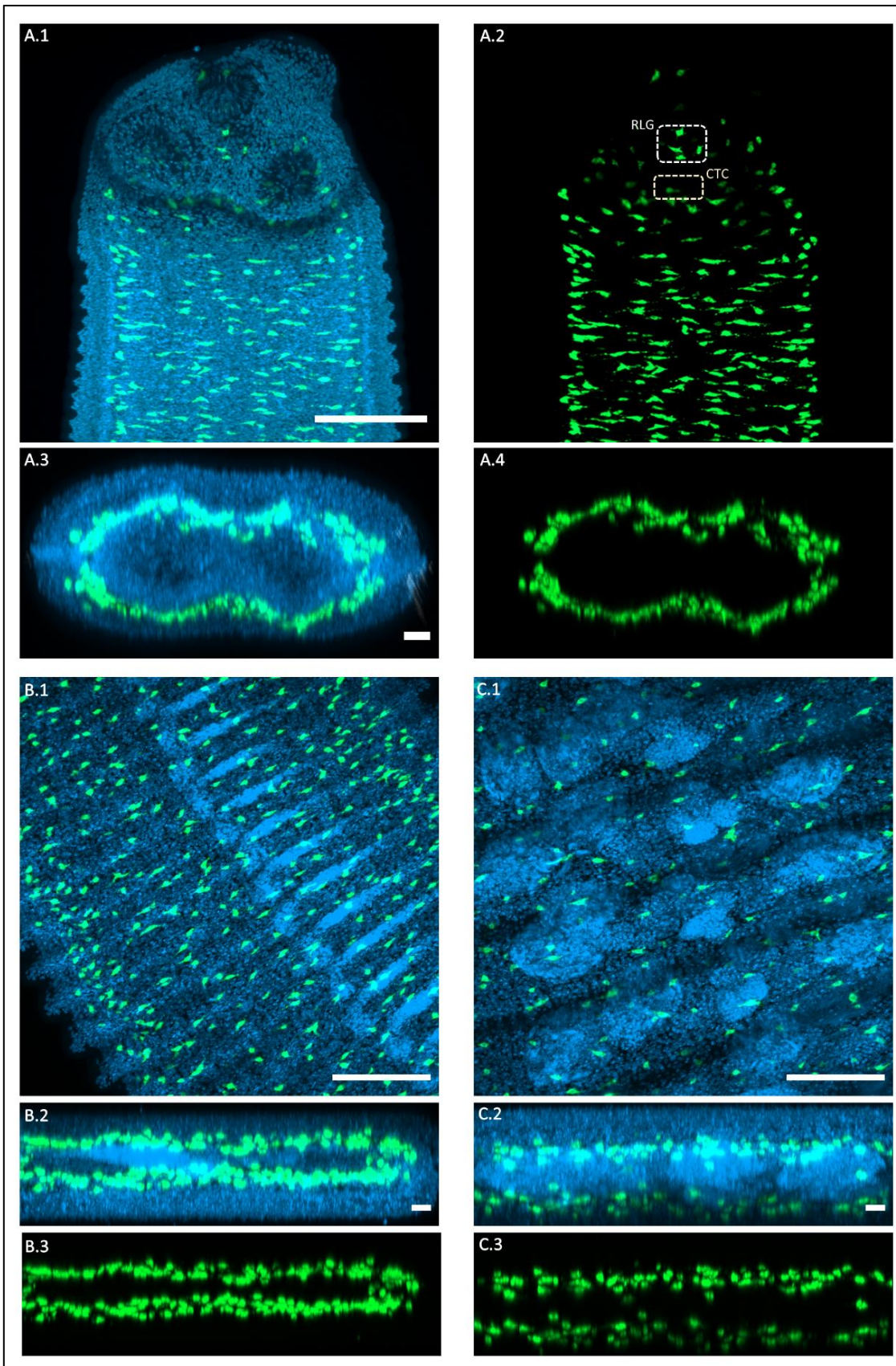


Figura 4.9. Detección por WISH del gen *npp-41* en el estadio adulto. Se muestran los resultados de la

WMISH en verde y DAPI en azul. **A**, resultados de las WMISH en el escólex y cuello de adultos. **B**, estróbila con comienzos de formación de primordio sexual. **C**, segmentos sexualmente maduros. **D**, detalles de morfología celular de las células que expresan este gen en el límite de la pared corporal. Proyecciones en Z en A.1, B.1, C.1, D.1 y D.2; proyecciones transversales en A.2, A.3, B.2, B.3, C.2 y C.3. CTC: comisura cerebral transversal; CEU: células endócrinas unicelulares; FNTD: fibras nerviosas transversales dorsales; FNTV: fibras nerviosas transversales ventrales; LNC: cordón nervioso lateral; VMNC: cordón nervioso medial ventral; DMNC: cordón nervioso medial dorsal; CP: células periféricas. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$  en A.1, B.1 y C.1; 20  $\mu\text{m}$  en A.2, A.3, B.2, B.3, C.2 y D.1.

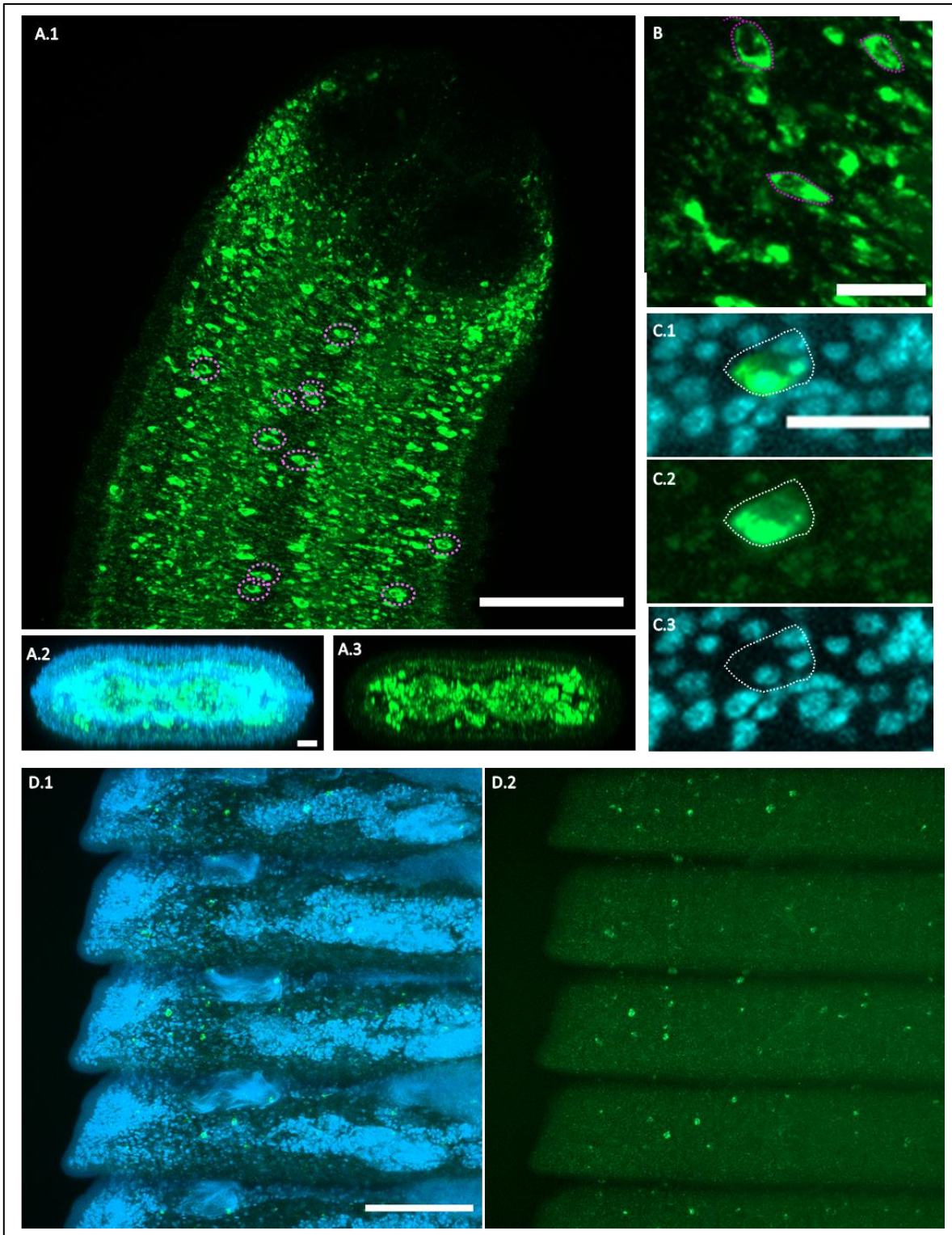
**Detección de *npp-49.1*:** Este neuropéptido no fue predicho *in silico* por nuestro método bioinformático, sino que fue detectado por los análisis peptidómicos realizados. Los resultados obtenidos para este npp se muestran en la **Figura 4.10**. Este npp tiene una expresión que, al ver las proyecciones transversales, puede distinguirse como las células que lo expresan están en los bordes del parénquima medular (**Figura 4.10, serie A**), este cilindro de células positivas del parénquima medular continúa en segmentos en los que el desarrollo se encuentra más avanzado (**Figura 4.10, series B y C**). Se observa expresión en el CTC y en el RLG. Por otro lado, aunque algunas células poseen prolongaciones celulares a lo largo del cuerpo, su localización (la cual no parece corresponder con células que expresen *pc2*), así como su morfología general, sugieren fuertemente que este *npp* es expresado en células que no pertenecen al SNC, sino que parecen ser musculares.



**Figura 4.10. Detección por WMISH del gen *npp-49.1* en el estadio adulto.** Se muestran los resultados de la WMISH en verde y DAPI en azul/cian. Resultados de las WMISH en: escólex y cuello (serie **A**), estróbila con primordio sexual desarrollado (serie **B**), segmentos con sistema reproductor maduro (serie **C**). Proyecciones en Z en A.1, A.2, B.1 y C.1; proyecciones transversales en A.3, A.4, B.2, B.3, C.2 y C.3. CTC: comisura cerebral transversal; RLG: ganglio rostral. Barra de escala: 100  $\mu$ m en A.1, B.1 y C.1; 20  $\mu$ m en A.3, B.2 y C.2.

**Detección de *npp-49.3*:** Este npp no fue detectado *in silico* con nuestro método de detección bioinformático, ni en los análisis peptidómicos, sino que su detección se basó en que es uno de los 3 parálogos que tiene *npp-49.1*. Los resultados obtenidos para este npp se muestran en la **Figura 4.11**, donde se observa que se expresa en una gran cantidad de células dentro del parénquima medular y en algunas por fuera de este. Lejos de únicamente expresarse en los límites del parénquima medular, como en el caso de *npp-49.1*, se pueden observar a una gran cantidad de células positivas para este gen internamente (**Figura 4.11, A.2 y A.3**). Se observa una morfología particular de algunas de las células que expresan a este gen, células con aspecto redondeado, con una región central que carece de señal de WMISH, que no corresponde al lugar que ocupa el núcleo (en la **Figura 4.11, A.1**, se marcan varias de estas células y se ven algunas en mayor detalle en la **serie B**). La identidad de estas células no es clara, no parecerían ser células nerviosas, y a su vez no hay células que expresen *pc2* con estas características. Una posibilidad es que se trate de células secretorias y que por esto aparezca esa zona carente de señal de WMISH en una gran región de la célula, en donde estarían las vesículas de secreción. En segmentos más desarrollados las células detectadas por WMISH para este gen se encuentran más dispersas (**Figura 4.11, serie C**).

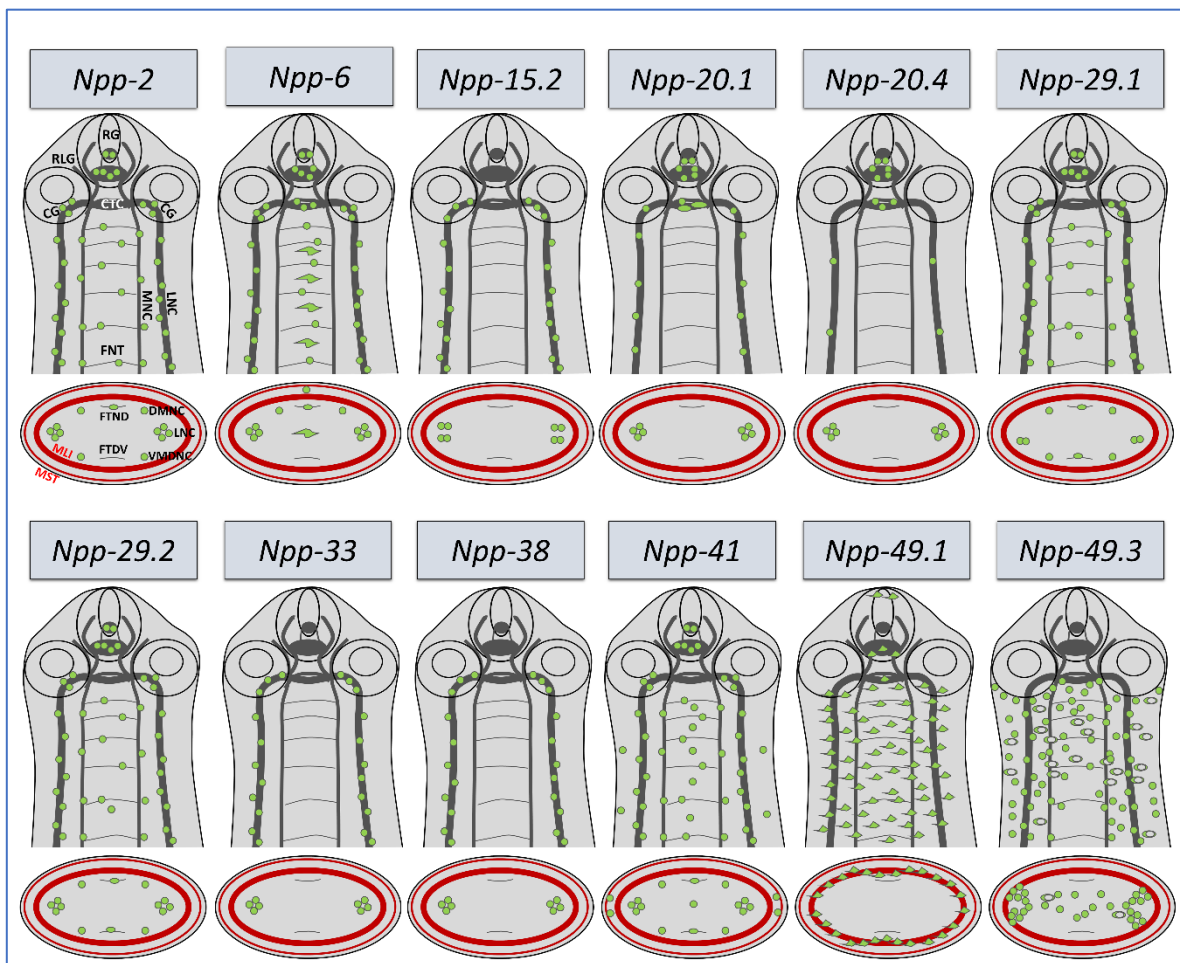




**Figura 4.11. Detección por WMISH del gen *npp-49.3* en el estadio adulto.** Se muestran los resultados de la WMISH en verde y DAPI en azul/cian. **A**, resultados de las WMISH en el escólex y cuello, nótese las células redondeadas con una zona sin señal de WMISH, algunas de ellas marcadas con líneas punteadas en magenta. **B**, imagen a mayor aumento de una región de la imagen A en donde se pueden apreciar a las células sin señal de WMISH en un scon mayor claridad, los contornos de las células están marcados con líneas punteadas en

magenta. **C**, detalle de célula que expresa *npp-49.3*, donde se observa que la falta de señal de la WMISH no corresponde a la región donde se encuentra el núcleo (teñido con DAPI). **D**, distribución de las células positivas para este gen en segmentos con el sistema reproductor maduro. Proyecciones en Z en A.1, serie B y serie C; proyecciones transversales en A.2, A.3. Barra de escala: 100  $\mu$ m en A.1 y D.1; 20  $\mu$ m en A.2, B y C.1.

En la **Figura 4.12** se muestran esquematizados todos los resultados obtenidos para cada WMISH de *npps* en la región del escólex y cuello de adultos. Como se puede observar algunas señales no corresponden con el patrón observado para *pc2*, lo que sugiere que existen vías alternativas de síntesis para estos *npps* en estas regiones.



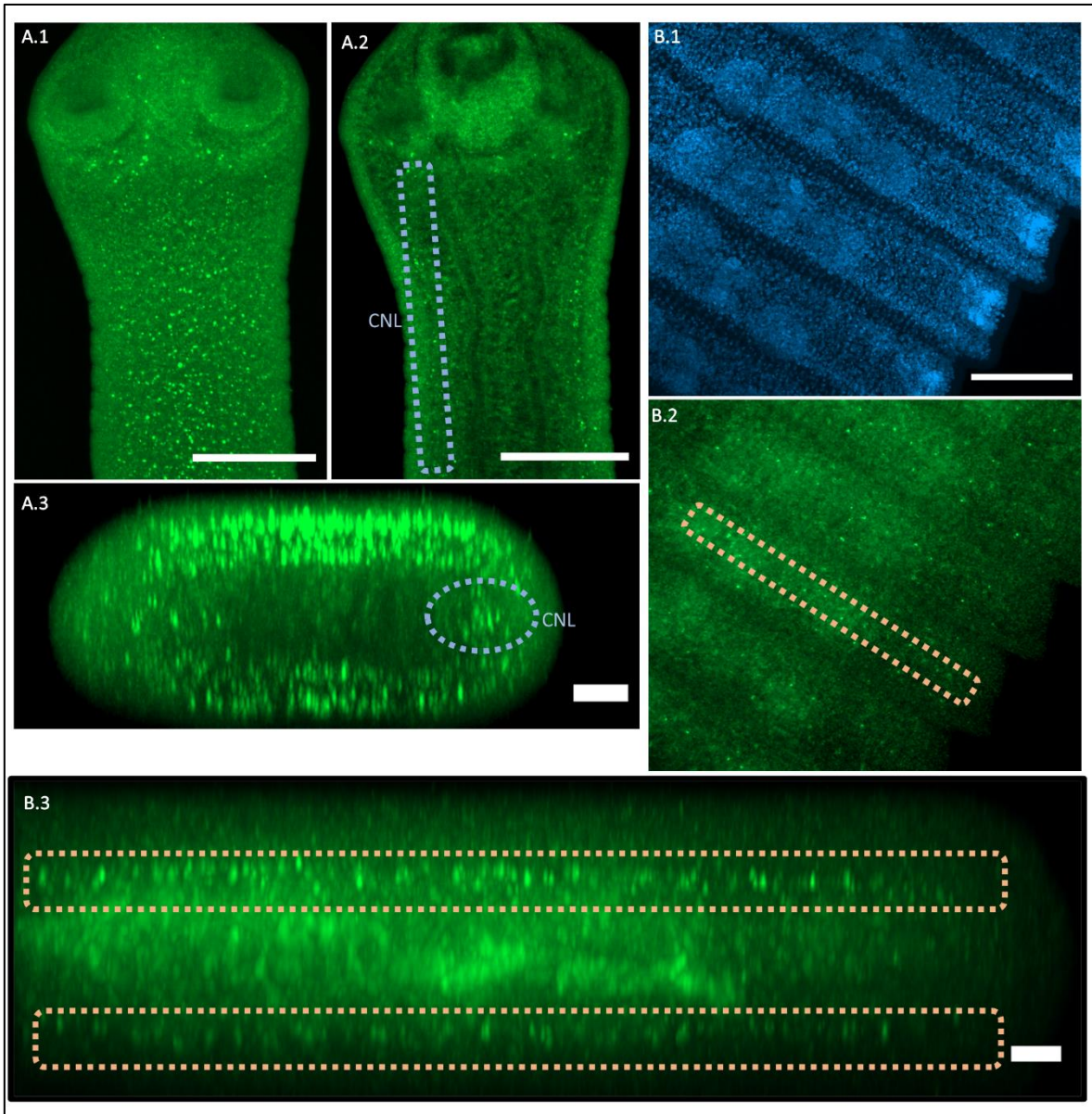
**Figura 4.12. Esquema representativo de los patrones de expresión de los genes de *npps* encontrados.** Se muestran esquemas de proyecciones en Z de escólex y cuello junto a un esquema de proyecciones transversales de la zona del cuello para cada *npp*. Las células con señal para la WMISH de cada gen se muestran en círculos verdes representando a las células encontradas. Algunas particularidades de las señales obtenidas también se muestran como: las NMG de *npp-6*, las dos células grandes del CTC de *npp-20.1*, la diferencia de expresión dorso-ventral de los LNC de *npp-29.1*, la forma particular de las células y su distribución en *npp-49.1*, y finalmente las células con espacios internos sin señal que aparecen en las WMISH de *npp-49.3*. RG: ganglio rostral; RLG: ganglio rostelar; CTC: comisura cerebral transversal; CG: ganglio cerebral; LNC: cordones

nerviosos laterales; MNC: cordones nerviosos mediales; FNT: fibras nerviosas transversales; FNTD: fibras nerviosas transversales dorsales; FNTV: fibras nerviosas transversales ventrales; VMDNC: cordones nerviosos mediales ventrales; DMNC: cordones nerviosos mediales dorsales; MLI: musculatura longitudinal interna; MST: musculatura subtegumental.

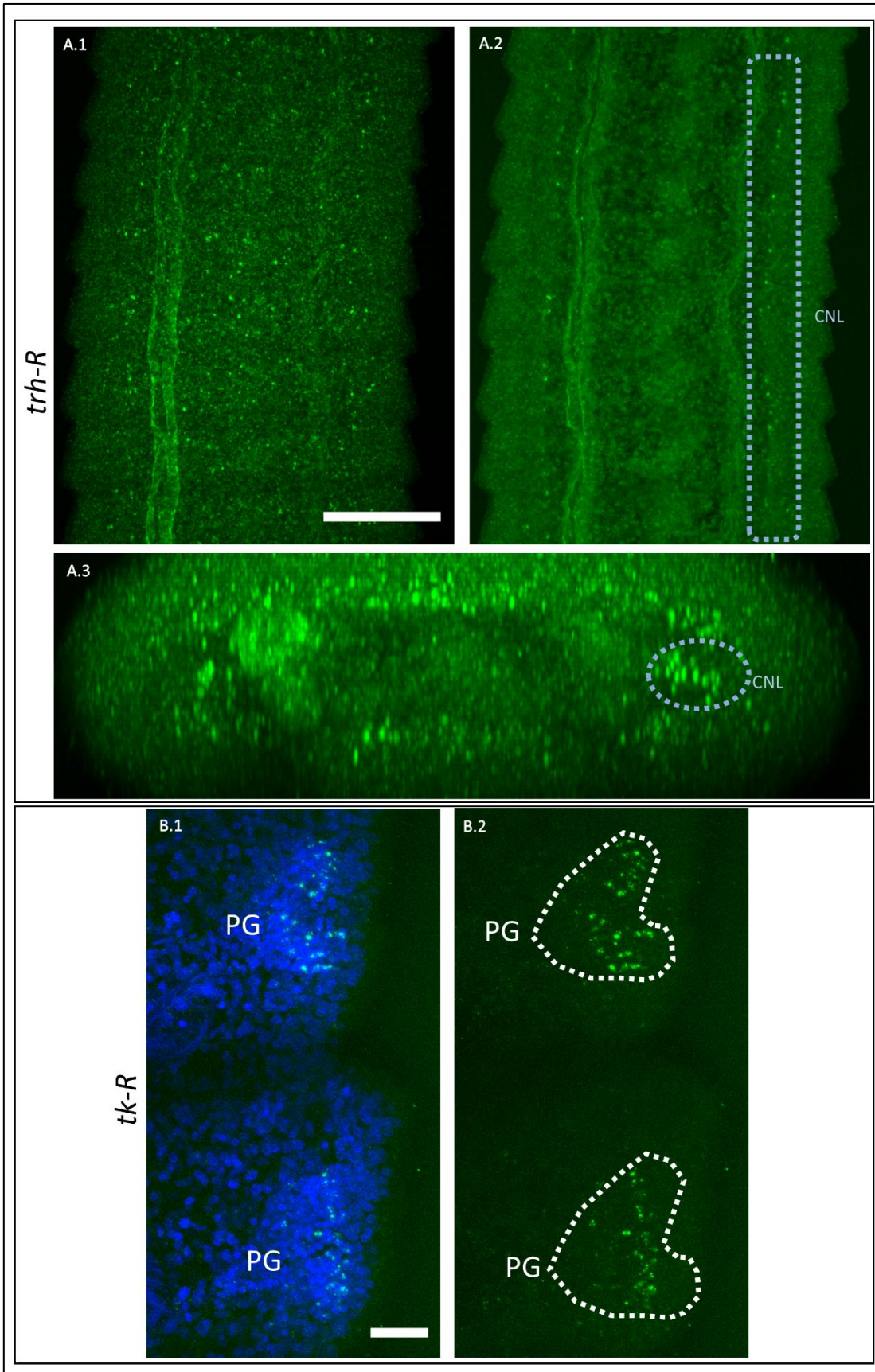
#### 4.1.2 Detección de receptores de neuropéptidos en adultos mediante WMISH.

Se realizaron WMISH en adultos de *H. microstoma* para genes de GPCRs que son homólogos de los receptores de neuropéptidos conservados en otros animales bilaterales [79]. Se obtuvieron resultados para los receptores de SIFamida (*npp-33*), taquicinina (TK) y TRH (Hormona liberadora de tirotrópina). Los resultados de las WMISH para estos genes presentan una menor intensidad de señal que las realizadas para los npps, lo cual es razonable porque los npps están entre los genes con mayores niveles de expresión en las células que los expresan [284–286]. Los resultados de estos experimentos se muestran en las **Figuras 4.13** y **Figura 4.14**. El homólogo del receptor de SIFamida (*sifamida-R*) tiene una expresión en el escólex que rodea a las ventosas, a su vez presenta expresión en el LNC y en dos capas de células continuas que aparecen tanto ventral como dorsalmente (**Figura 4.13, A.1 y A.3**). Estas capas internas parecen ser musculatura longitudinal interna, esto se infiere mediante comparación con experimentos de IHF y WMISH para tropomiosina realizados por nuestro grupo (que no se muestran), también se observa expresión en la estróbila en bandas transversales, conformando anillos, que tienen distribución segmentaria, lo cual se corresponde con la expresión de tropomiosina en la musculatura longitudinal interna (**Figura 4.13, serie B**).

El homólogo del receptor de TRH (*trh-R*) presenta expresión en los LNC y también en algunas células que delimitan el parénquima medular del adulto (**Figura 4.14, serie A**), aunque no se observan las dos capas de células bien marcadas que se observan para el *sifamida-R*. Para el homólogo del receptor de taquicinina (*tk-R*) se detectaron células positivas por WMISH en el poro genital, estructura en la que se ha descrito una gran innervación por fibras nerviosas asociadas a la musculatura compleja de la bolsa del cirro y los ductos [73,189,287] (**Figura 4.14, serie B**). Se realizaron además WMISH para los receptores homólogos de NKY, CCAP, Luqina y Pirokinina, de estos receptores sólo se obtuvieron WMISH con señal débil para el receptor de CCAP, aunque la señal obtenida se perdió rápidamente en los experimentos debido a fotoblanqueo, por lo que no fue posible registrar la señal observada en el momento, la cual parecía tener un patrón similar al observado para *sifamida-R* en la **Figura 4.13, B.2** (al mirar inmediatamente los experimentos al microscopio de epifluorescencia).



**Figura 4.13. Detección por WMISH de la expresión del *SIFamida-R* en el estadio adulto.** Se muestran los resultados de la WMISH en verde y DAPI en azul/cian. Proyecciones en Z en: A.1, A.2, B.1 y B.2; Proyecciones transversales en A.3 y B.3. Se observan los resultados para la región del escólex y el cuello en la serie A y para segmentos sexualmente maduros en la serie B. En A.1 se realizó una proyección en Z de la totalidad de las imágenes obtenidas en ese eje, en A.2 sólo de la región que permite observar con mayor claridad los LNC. En B.2 y B.3 se marcan a células que expresan este gen en forma segmentaria. LNC: cordones nerviosos laterales. Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$  en A.1, A.2 y B.1; 20  $\mu\text{m}$  en A.3 y B.3.



**Figura 4.14. Detección por WMISH de la expresión de *trh-R* (A) y *tk-R* (B).** Se muestran los resultados de la WMISH en verde y DAPI en azul. Proyecciones en Z en: A.1, A.2, B.1 y B.2; Proyecciones transversales en A.3. Se observan los resultados obtenidos para segmentos con el primordio sexual en desarrollo en **A**, y segmentos más avanzados en desarrollo en **B**. En A.1 se realizó una proyección en Z de la totalidad de las imágenes obtenidas en ese eje, en A.2 sólo de la región que permite observar con mayor claridad los LNC alineados en el eje antero-posterior. LNC: cordones nerviosos laterales, PG: poro genital. Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$  en A.1; 20  $\mu\text{m}$  en B.1.

#### **4.2 Cultivo *in vitro* de adultos de *H. microstoma* y experimentos de pulso y caza con análogos de timidina.**

Se optimizó el cultivo *in vitro* de adultos de *H. microstoma* con el fin de estudiar al efecto de los neuropéptidos en el desarrollo de los segmentos y en la fisiología reproductiva. Se utilizaron diferentes metodologías de cultivo con este fin, finalmente se utilizó para el cultivo de adultos al medio que tuvo mejores resultados en el crecimiento de cisticercoides que se describirán en detallan en detalle en el Capítulo 6 (véase la **Tabla 6.1**, Condición 3: medio RPMI, 30% Suero, 1% AntiAnti, Hemina 0,15  $\mu\text{M}$ , 0,1% Taurocolato, con Base de Agar Triptona + 5% Sangre Ovina). Utilizando estas condiciones se realizaron experimentos de pulso y caza con el análogo de timidina EdU en adultos, con el fin de analizar la proliferación y diferenciación somática y germinal bajo nuestras condiciones de cultivo *in vitro*. Se incubaron adultos con EdU al comenzar el cultivo para posteriormente identificar el destino de las células con señal fluorescente para este marcador metabólico. Con este fin, se cultivaron adultos durante 2 horas iniciales con 10  $\mu\text{M}$  de EdU (pulso), manteniéndolos posteriormente sin EdU en el medio durante: 24, 48 y 96 horas (caza). Bajo estas condiciones el EdU incorporado por células proliferantes en fase S puede ser detectado en las células hijas de estas células marcadas. Las células que continúen proliferando activamente irán disminuyendo la cantidad de marca de EdU hasta que el mismo no sea detectable, mientras que las células que incorporaron EdU y pasaron a un estado diferenciado terminal mantendrán la marca de EdU. Bajo estas condiciones se estudió el desarrollo de los órganos reproductores a lo largo de los días de los cultivos *in vitro*, identificando a las células marcadas con EdU mediante su localización y su morfología, utilizando para este fin el co-marcado de los adultos con DAPI para la tinción nuclear de las células y adicionalmente la detección mediante WMISH de *sycp-1*, como marcador de células en meiosis. El gen *sycp-1* codifica para uno de los componentes más importantes de la profase meiótica, utilizado en la formación del complejo sinaptonémico, por lo que es un gen clave en el desarrollo de los gametos, en mamíferos [288,289], pero también en planarias [290] y en cnidarios [291], lo que muestra su conservación evolutiva ancestral. La expresión de *sycp-1* se asocia con el ingreso a la profase meiótica, y cuando este deja de expresarse con el comienzo del diploteno, aunque cabe aclarar que se está observando ARNm y no a la proteína mediante esta técnica, por lo que pueden existir diferencias sutiles con estos tiempos mencionados. Se identificó la diferenciación celular tanto en células

somáticas como en la gametogénesis de las células proliferantes marcadas con EdU en el comienzo de los cultivos. Los diferentes tipos celulares y regiones en donde se localizó la marca de EdU con el paso de los días de cultivo *in vitro* se muestran resumidos en la **Tabla 4.1**. A continuación se describirán los resultados obtenidos de esta parte del trabajo.

El proceso de diferenciación celular en el escólex bajo estas condiciones de cultivo se muestra en la **Figura 4.15**. En *H. diminuta* y otros cestodos se ha descrito a la localización de las células proliferativas del adulto, las cuales se encuentran en la zona medular del cuerpo y en el cuello, en donde se dividen activamente para luego migrar hacia regiones más corticales [11,14,292]. Se identificó que, bajo estas condiciones de cultivo *in vitro*, las células que incorporaron EdU de los adultos de *H. microstoma*, dejan el cilindro proliferativo del parénquima medular y se localizan en diferentes tejidos diferenciados. Se encontró que inmediatamente tras el pulso de EdU de 2 horas (tiempo 0), los adultos presentan una gran cantidad de células proliferativas en el cuello alrededor del parénquima medular, sin células periféricas marcadas. Con el paso de los días en cultivo, se identificó que la marca de EdU es detectada alrededor de todo el escólex y en la superficie del cuello tanto a las 24 como a las 48 horas de cultivo. Finalmente, a las 96 horas se ve una gran disminución de la cantidad de células EdU positivas, con muchas células en la zona del escólex y menos en el cuello (**Figura 4.15**). Estos resultados sugieren que las células proliferantes en fase S marcadas a tiempo 0, con el paso del tiempo se diferencian en células que migrarán ocupando un lugar más periférico y/o en el escólex. A su vez, probablemente haya una gran renovación celular, y por este motivo se pierde gran cantidad de la marca de EdU a las 96 horas. Este patrón de diferenciación desde la zona de la periferia medular hacia una zona más cortical es observado a lo largo de toda la estróbila. También se identificó diferenciación somática en diferentes órganos del aparato reproductivo, estos resultados se muestran en la **Figura 4.16**. Se identificaron células EdU positivas en el primordio genital alargado, al momento de formar al primordio de ducto (PD), que se elongará desde el centro del segmento hacia una de las paredes laterales, en donde se formará el poro genital (PG). A tiempo 0 se encontraron células EdU positivas en la base del PD, y en las paredes del mismo, mientras que a las 24 horas se mantenía la señal, pero concentrada en el extremo del PD más cercano a la pared corporal; a las 48 horas se comprueba la presencia de células EdU positivas en el PG, y se evidencia que esta señal se va perdiendo a lo largo de los días analizando los resultados de las 96 horas de cultivo en donde la señal de EdU persiste en el PG, pero con menos células marcadas.

En las gónadas, se identificó que las células marcadas con EdU a tiempo 0 podían diferenciarse en gametos, tanto masculinos como femeninos. Se observó en detalle el desarrollo de los gametos masculinos, mostrando los principales resultados obtenidos en la **Figura 4.17**. El comienzo del desarrollo del sistema reproductor masculino comienza con la formación de tres testes característicos en cada segmento en los adultos. En cada uno de estos testes se formarán espermatogonias que serán las encargadas de la espermatogénesis, en un proceso típico en donde las espermatogonias se dividen

manteniendo la conexión citoplasmática, generando estructuras sinciciales denominadas rosetas, produciendo eventualmente cada espermatogonia 64 espermatozoides. En *H. diminuta* esto ha sido bien caracterizado, viendo que las espermatogonias localizadas en la periferia de cada teste sufren tres divisiones mitóticas, lo que lleva a la formación de rosetas con 8 células denominadas espermatogonias B, la siguiente división que da lugar a 16 núcleos también es mitótica y forma espermatoцитos primarios, los cuales comenzarán con la meiosis. En este proceso hay dos etapas bien marcadas, con la producción primero de 32 células pertenecientes a espermatoцитos secundarios y posteriormente, en la segunda división meiótica 64 espermátidas. [293,294]. Posteriormente, las espermátidas comienzan a elongar su núcleo y a diferenciarse a espermatozoides con el paso del tiempo, luego pasan al conducto seminal para transitar por las vesículas seminales externa e interna y finalmente inseminar al receptáculo seminal de otro segmento (del mismo u otro gusano). En el caso del desarrollo reproductor masculino encontramos que a tiempo 0 en los testes se pueden encontrar células EdU positivas en forma de rosetas, que se corresponden con espermatogonias (hasta 8 núcleos) de estos órganos, y en grupos más desarrollados conformados por espermatoцитos primarios (hasta 16 células). A las 24 horas de cultivo ya son detectables células EdU positivas en rosetas con mayor cantidad de núcleos los cuales son espermatoцитos secundarios (32 núcleos) y espermátidas tempranas (64), también detectables a las 48 horas, aunque en este tiempo también es evidente la presencia de espermátidas en maduración con su típico núcleo alargado. A las 96 horas se logran identificar una gran cantidad de espermátidas en maduración y la presencia espermatozoides en los ductos seminales (DS) y en las vesículas seminales externa (VSE) e interna (VSI), como así también en el receptáculo seminal, demostrando la inseminación con espermatozoides recientemente generados *in vitro*. En la **Figura 4.18** se muestran testes con rosetas de estos cultivos realizados, co-marcados con el gen marcador de meiosis *sycp-1*. Se puede apreciar que los testes son *sycp-1* positivos en conjunto a la formación de rosetas, y que este gen continúa siendo detectable al transcurrir los días de cultivo.

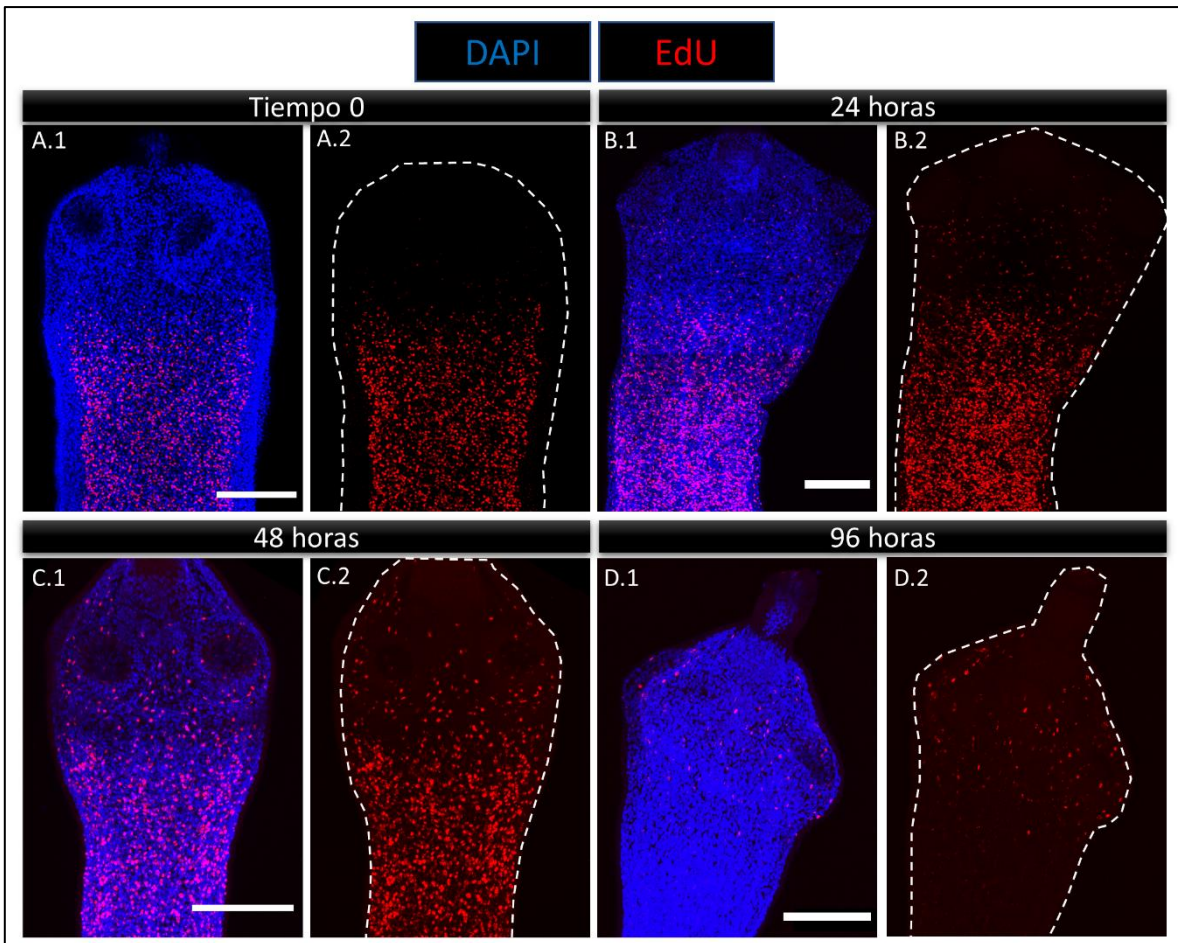
Bajo estas condiciones de cultivo *in vitro* también estudiamos el desarrollo del sistema reproductor femenino, para el que se muestran los principales resultados en la **Figura 4.18**. El sistema reproductor femenino se desarrolla posteriormente al masculino: tras la aparición de testes con rosetas de espermatogonias, pasa a distinguirse una acumulación de células EdU positivas correspondientes al primordio del ovario y a la glándula vitelina en desarrollo en cada segmento. Luego de una abundante proliferación de las ovogonias, las células del ovario expresan *sycp-1* en forma casi sincrónica durante un período relativamente breve del desarrollo, y posteriormente esta señal deja de estar presente al continuar la maduración. Este gen es un marcador de la profase de la meiosis I, por lo que su expresión estaría evidenciando la entrada a meiosis de los ovocitos I. A tiempo 0 los ovarios que presentan señal de EdU no expresan *sycp-1* (**Figura 4.18, serie A**) mientras que los ovocitos I en profase I (*sycp-1+*) no presentan marcado por EdU. A las 24 horas los ovocitos I (*sycp-1+*) tienen señal de EdU (**Figura 4.18, serie B**), mientras que a las 48,



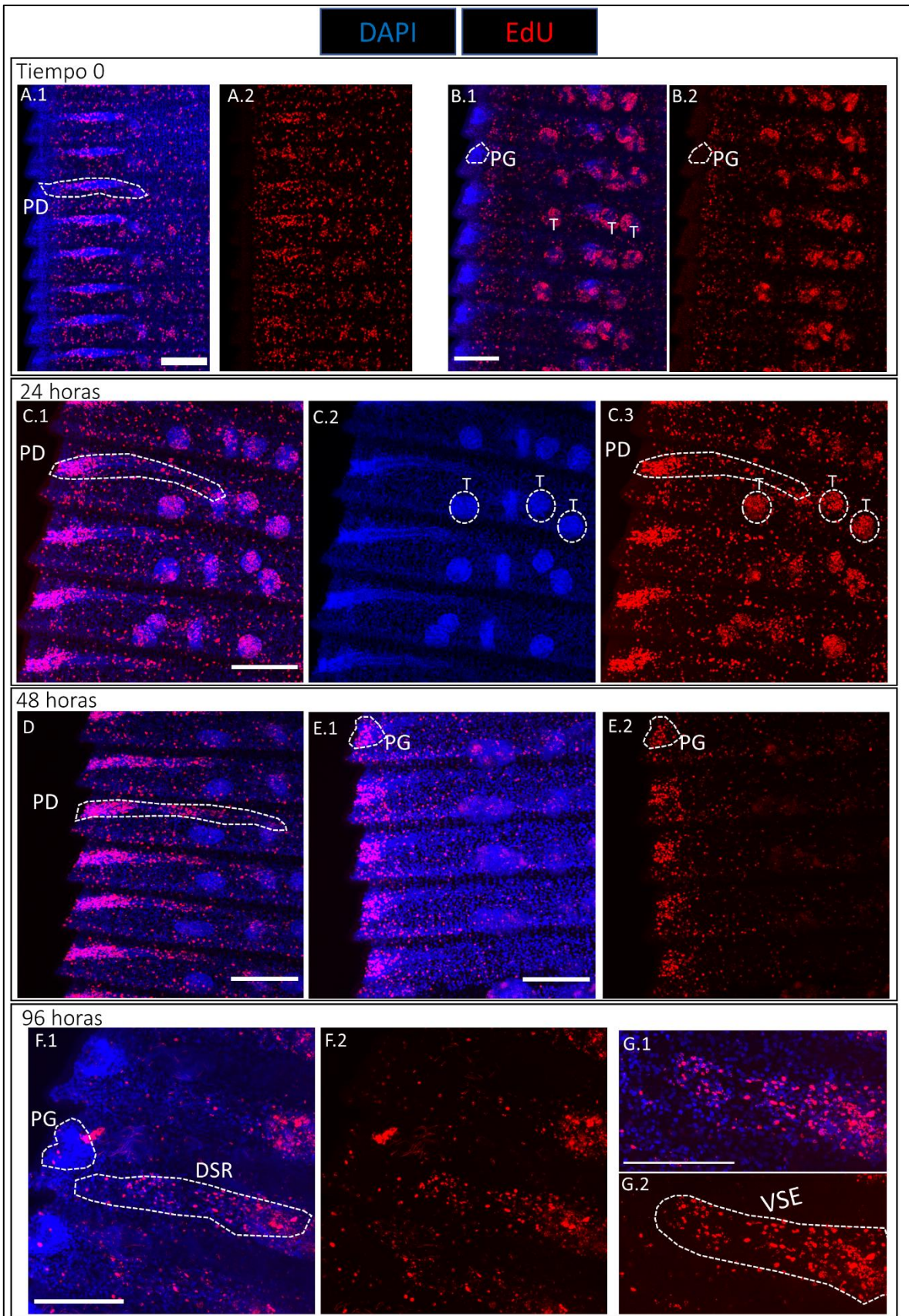
comienzan a aparecer ovarios *sycp-1+* sin señal de EdU. Estos resultados estarían indicando la entrada a la meiosis de los ovocitos I durante las primeras 24 horas del cultivo (algunos de los ovarios *sycp-1* positivos pierden la señal de EdU tras 48 horas, tal vez por la dilución del EdU durante divisiones sucesivas de las ovogonias) (**Figura 4.18, serie D**). Por otro lado, a las 48 y las 96 horas, se observa señal de EdU en los ovarios caudales a la señal de *sycp-1*, lo que estaría indicando que las células marcadas ya pasaron por las primeras etapas meióticas en las que *sycp-1* está presente y pasarían a estar en etapas posteriores al diploteno de la meiosis I. En este momento la señal de EdU puede encontrarse en células con un núcleo muy grande, estas son los ovocitos en dictioteno (etapa prolongada de pausa y desarrollo de los ovocitos I, previa a la metafase I de la meiosis, que en cestodos solo ocurre tras la fertilización). Es destacable que el gen de *sycp-1* se logró detectar pasados los cuatro días de cultivo *in vitro* en los órganos reproductores femeninos y masculinos, esto es importante ya que sugiere que las condiciones de cultivo permiten el mantenimiento de la gametogénesis tras al menos cuatro días.

Tipo celular	Tiempo de incubación <i>in vitro</i>			
	Tiempo 0	24 horas	48 horas	96 horas
<b>Células somáticas</b>				
Células periféricas		X	X	X
Base y medio del ducto genital	X	X	X	
Final del ducto genital		X	X	
Poros genitales			X(muchos)	X(pocos)
Conductos y vesículas seminales			X	X
<b>Sistema Reproductor Masculino</b>	Tiempo 0	24 horas	48 horas	96 horas
Espermatogonias	X	X		
Espermatocitos primarios	X	X	X	
Espermatocitos secundarios		X	X	
Espermátidas tempranas			X	X
Espermátidas tardías			X	X
Espermatozoides en ductos				X
<b>Sistema Reproductor Femenino</b>	Tiempo 0	24 horas	48 horas	96 horas
Ovogonias / ovocitos I en interfase (previo a expresión de <i>sycp-1</i> )	X	X	X(pocas)	
Ovocitos I en profase I ( <i>sycp-1+</i> )		X	X	
Ovocitos I en dictioteno (posterior a la expresión de <i>sycp-1</i> )			X	X

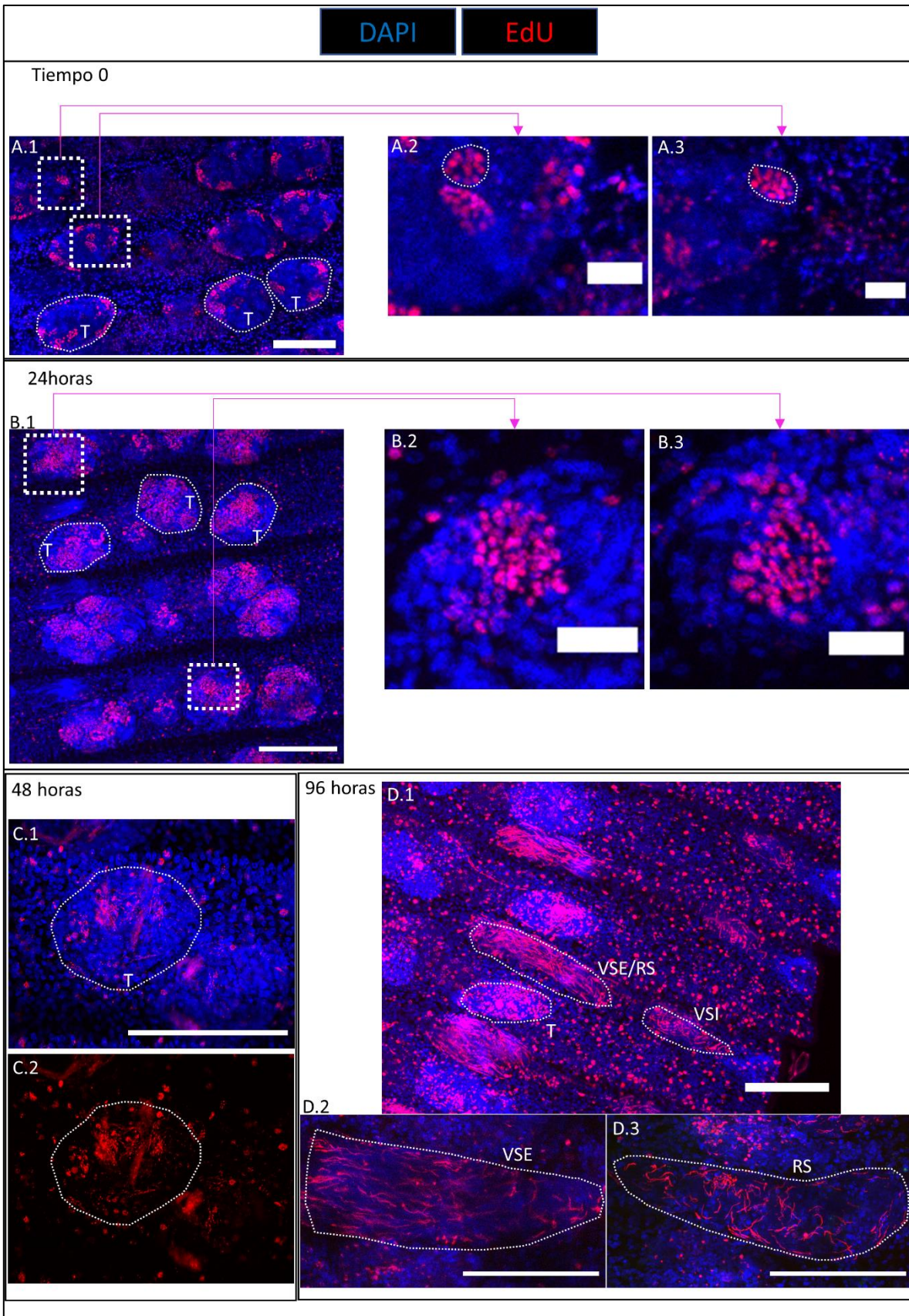
**Tabla 4.1. Detección de EdU en diferentes estructuras de adultos de *H. microstoma* en diferentes tiempos de cultivos *in vitro*.** Para el poro genital se distingue entre cuantos de estos presentaban células EdU positivas. Para las Ovogonias con EdU previo a *sycp-1* se distingue entre la cantidad de células positivas a 48 horas por no ser tantas como en los tiempos anteriores.



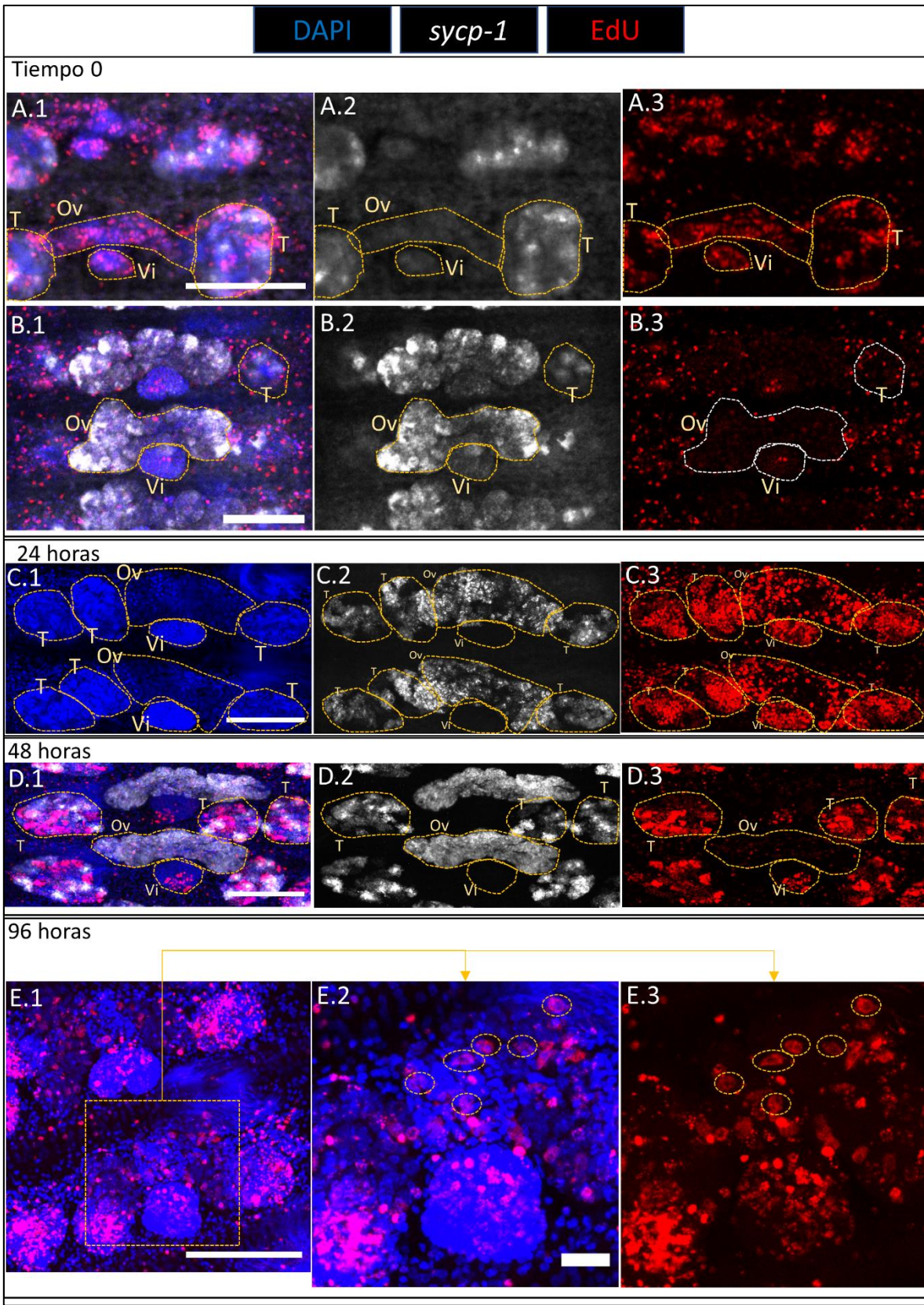
**Figura 4.15. Experimentos de pulso y caza en adultos de *H. microstoma*: escólex y cuello a lo largo de los días.** Se muestran los resultados obtenidos tras cultivar adultos de *H. microstoma* durante 2 h con EdU (tiempo 0, **A**) y mantener a los adultos en cultivo (en la Condición 3 de la **Tabla 6.**) durante 24 (**B**), 48 (**C**) y 96 horas (**D**). Se muestran DAPI y EdU con el código de colores señalado en la parte superior, azul y rojo respectivamente. En líneas punteadas se marca la zona con presencia de núcleos marcados con DAPI en las imágenes donde sólo se muestra la señal de EdU, nótese la distancia entre el límite de la señal de DAPI y la de EdU a tiempo 0 y como esta zona sin señal desaparece notoriamente en los otros tiempos analizados. Barras de escala 100  $\mu$ m. Imágenes de la Serie A cedidas amablemente por la Mag. Jimena Montagne.



**Figura 4.16. Diferenciación de células somáticas de los órganos reproductores en cultivos *in vitro* de adultos.** Resultados de experimentos de pulso y caza de adultos de *H. microstoma*. Se muestran resultados a diferentes tiempos de cultivo. Se utiliza el código de colores que se muestra en la parte superior, con la señal de DAPI en azul y la de EdU en rojo. **A**, tiempo 0 de cultivo (inmediatamente post pulso de EdU por 2 horas), se observa señal de EdU a lo largo del PD. **B**, se muestra como a tiempo 0 el PG no tiene señal de EdU. **C**, 24 horas de cultivo, el PD tiene señal principalmente en el extremo que contacta con la región lateral, nótese como el límite hasta donde llegan las células EdU positivas es el mismo que el delimitado por la marca fluorescente de DAPI (a diferencia de lo que se observa en A.1). **D**, señal de EdU al final del PD a las 48 horas. **E**, se muestra la señal de EdU en el PG a las 48 horas. **F**, se muestra señal de EdU en el PG a las 96 horas, aunque menos que en E (hay otros poros a este tiempo más marcados, pero son menos que a 96 horas), también se observan células EdU positivas conformando a los DSR. **G**, se muestran células EdU positivas conformando a la VSE. DSR: ductos del sistema reproductor; PD: primordio de ducto; PG: poro genital; T: testes; VSE: vesícula seminal externa. Barras de escala: 100  $\mu$ m.



**Figura 4.17. Desarrollo de gametos masculinos en cultivos *in vitro* de adultos de *H. microstoma*.** Resultados de experimentos de pulso y caza de adultos de *H. microstoma*. Se muestran resultados a diferentes tiempos de cultivo. Se utiliza el código de colores que se muestra en la parte superior, con la señal de DAPI en azul y la de EdU en rojo. **A**, tiempo 0 de cultivo (inmediatamente post pulso de EdU por 2 horas), se observa señal de EdU en rosetas dentro de los testes de hasta 16 células (espermatogonias). **B**, 24 horas de cultivo *in vitro*, se observa señal de EdU en rosetas dentro de los testes de 32 y 64 células (espermatoцитos primarios y secundarios, respectivamente). **C**, 48 horas de cultivo *in vitro*, se muestra un teste en detalle, en donde pueden apreciarse espermátidas tempranas (con una estructura que comienza a ser elongada) con señal de EdU. **D**, 96 horas de cultivo *in vitro*, se pueden apreciar espermatozoides marcados en VSI, VSE y R, estos últimos se superponen uno sobre otro en organismos montados enteros, aunque se pueden distinguir por estar en diferentes planos del eje Z, mostrándolos en D.2 y D.3, evidenciando espermatozoides marcados en el receptáculo y, por lo tanto, inseminación dada a lo largo de los días en cultivo. RS: receptáculo seminal; T: testes; VSE: vesícula seminal externa; VSI: vesícula seminal interna. Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$  en A.1, B.1, C.1 y D.1, D.2 y D.3; 20  $\mu\text{m}$  en A.2, A.3, B.2 y B.3.



**Figura 4.18 – Desarrollo de gametos femenino en cultivos *in vitro* de adultos de *H. microstoma*.** Resultados de experimentos de pulso y caza de adultos de *H. microstoma*. Se muestran resultados a diferentes tiempos de cultivo. Se utiliza el código de colores que se muestra en la parte superior, con la señal de DAPI en azul, la de EdU en rojo y WMISH de *sycp-1* en tonalidades de gris. **A**, tiempo 0 de cultivo (inmediatamente post pulso de EdU por 2 horas), se observa proliferación celular en el ovario sin señal de *sycp-1*, proliferación previa a la meiosis. **B**, tiempo 0, ovario con células *sycp-1+* sin señal de EdU. **C**, 24 horas de cultivo, ovario con células *sycp-1+* EdU positivas. **D**, 48 horas de cultivo, se comienzan a observar nuevamente ovarios *sycp-1+* sin señal de EdU (otros ovarios *sycp-1+* aún tienen señal de EdU). **E**, 96 horas de cultivo, se muestran células con señal de EdU de núcleo grande correspondientes a ovocitos en dictioteno en el ovario, en detalle en E.2 y E.3. Ov: ovario; T: teste; Vi: vitelina Barra de escala: 100 µm en A.1, B.1, C.1, D.1 y E.1; 20 µm en E.2.

En suma, se identificó y caracterizó la diferenciación celular somática y germinativa *in vitro* bajo estas condiciones de cultivo para adultos. Se identificó la producción de espermatozoides y de ovocitos a lo largo de cuatro días de cultivo en las condiciones optimizadas en este trabajo. Sin embargo, cabe destacar que más allá de que se encontraron patrones similares de diferenciación celular en las réplicas de estos experimentos, en todos los casos existieron variaciones en cuanto a la señal de EdU y *sycp-1* detectadas en conjunto, mostrando variabilidad entre los gusanos cultivados en cada caso. En cada réplica de estos experimentos se utilizaron dos gusanos por condición (de cada tiempo), los cuales fueron procesados en conjunto, y en algunos casos incluso uno de los dos gusanos que se cultivó en las mismas condiciones (misma botella, medio, exposición a EdU, y posterior revelado de EdU y WMISH) mostró marca de EdU únicamente en algunas regiones aisladas, o en algunos segmentos y no en otros, mientras que el otro tenía marca de EdU a lo largo de todos los segmentos. Estas variaciones pueden estar dadas por múltiples motivos, incluyendo su estado de partida, pudiendo estar influenciado por ejemplo por la manipulación durante el traspaso desde el ratón a las botellas de cultivo. Teniendo esto en cuenta, los experimentos necesarios para poder identificar efectos de diferentes neuropéptidos o drogas sobre los procesos aquí observados requerirían de una gran cantidad de adultos por condición y un análisis exhaustivo de los resultados obtenidos en cada gusano, lo cual excedía los tiempos aquí contemplados. Bajo estas condiciones, por ejemplo, se intentó realizar pruebas bajo la presencia del inhibidor de PKA H-89, sin obtener resultados concluyentes por los motivos recién mencionados. De todas formas, se logró estandarizar la metodología de cultivo para esta etapa del ciclo de vida, lo que abre las puertas a nuevas aproximaciones experimentales sobre este organismo en su etapa de vida adulta.



## Capítulo 5. La oncósfera, primer estadio larval: expresión de neuropéptidos en este estadio reducido y ensayos de motilidad.

### 5.1 Expresión génica de genes involucrados en la comunicación peptidérgica en el estadio de oncósfera.

Los análisis de expresión génica que se muestran en capítulos previos sorprendentemente evidencian la expresión de muchos genes de neuropéptidos en el estadio de oncósfera de *H. microstoma*, lo que sugiere que los neuropéptidos podrían tener un rol en el sistema nervioso reducido de este primer estadio larval. Con el fin de estudiar y caracterizar a los sistemas neuropeptidérgicos en este estadio, se realizaron WMISH de diferentes neuropéptidos seleccionados por su alta expresión en oncósferas, como así también de *pc2*, utilizándolo nuevamente como marcador global de estos sistemas de comunicación. Las WMISH se realizaron sobre segmentos grávidos de adultos, disecando y montando posteriormente a las oncósferas en etapas sucesivas de desarrollo presentes en el útero en estos segmentos.

Las oncósferas completamente desarrolladas están rodeadas por la cáscara y un conjunto de membranas de protección, las cuales no permiten la detección de la expresión génica mediante WMISH bajo nuestros protocolos (ya que imposibilitan el ingreso de las sondas en el tejido). Por lo tanto, los resultados obtenidos por WMISH son de oncósferas en etapas tempranas de desarrollo, que llegan hasta la formación de los ganchos y del sistema muscular y nervioso (etapa de pre-oncósfera tardía [294]).

**Detección de *pc2*:** El gen de *pc2* se detectó en la etapa de diferenciación de pre-oncósfera, encontrando señal de WMISH para al menos 3 células agrupadas de este estadio, como puede apreciarse en la **Figura 5.1**. La expresión es cercana a la zona donde se encuentran los ganchos.

**Detección de *npp-46*:** El gen de *npp-46* fue detectado mediante WMISH en dos células de oncósferas en desarrollo. Se extrajeron oncósferas a diferentes alturas de los segmentos grávidos, y por lo tanto a diferentes grados de desarrollo, observando la expresión de este gen incluso antes de la formación de los ganchos de estas larvas (**Figura 5.2, serie A**). Las dos células detectadas positivas para *npp-46* parecerían coincidir en posición con las detectadas para *pc2*, y durante el desarrollo extienden prolongaciones hacia la región de los ganchos (**Figura 5.2, serie C**). Finalmente, se realizaron IHF con anticuerpos anti- IIDPLMYSAKFSNF (secuencia del neuropéptido maduro de *npp-46*, generados por el servidor comercial Genescript) sobre oncósferas activadas, esto permitió, gracias a la remoción de las membranas protectoras, observar a oncósferas completamente

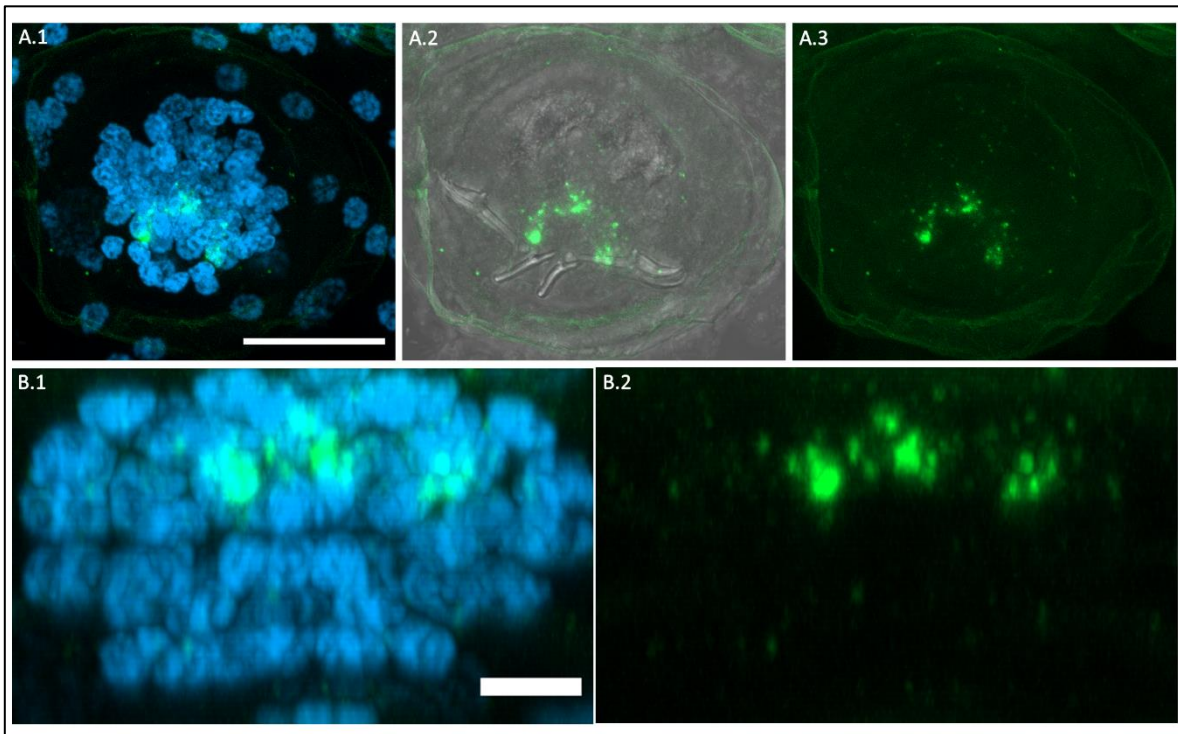
desarrolladas y la distribución de este neuropéptido en ellas. Las IHF sobre oncósferas activadas con anti-IIDPLMYSAKFSNF se co-marcaron con anti-Sinapsina, componente molecular de los sitios de sinapsis. Se encontró una clara distribución de este neuropéptido con proyecciones en forma de M en las oncósferas, con las terminaciones de la señal de los brazos largos de esta M, en donde fue detectada también la señal de marcado de la sinapsina (**Figura 5.3**).

**Detección de péptidos con motivo RFamida:** El motivo RFamida es muy común en una gran variedad de neuropéptidos. Con el fin de detectar la expresión de neuropéptidos con este motivo, se realizaron IHF con un anticuerpo anti-FMRFamida, el cual logra detectar a neuropéptidos con el motivo terminal RFamida [145,210,295]. Los neuropéptidos con este motivo terminal según nuestros análisis bioinformáticos son *npp-4* y los 6 parálogos del *npp-20* (*npp-20.1*, *npp-20.2*, *npp-20.3.1*, *npp-20.3.2*, *npp-20.4* y *npp-20.5*). Para varios de estos npps se detectó expresión en oncósferas en nuestros datos transcriptómicos, destacándose la alta expresión del gen *npp-20.3.1*, siendo el npp de mayor expresión en oncósferas. Se realizaron IHF en criocortes de oncósferas en desarrollo, en donde se encontró la presencia de hasta 3 células expresando neuropéptidos RFamida, con un patrón de señal similar al encontrado en las WMISH de *npp-46*. Este patrón similar de señal, nos motivó a realizar co-tinciones mediante IHF para detectar neuropéptidos con el motivo terminal RFamida, sobre criocortes de oncósferas que habían pasado por el proceso de WMISH para *npp-46*, encontrando que las células que expresan *npp-46* son también RFamida positivas (**Figura 5.4, serie B**). Estos resultados indicarían que estas células expresarían al menos 2 neuropéptidos.

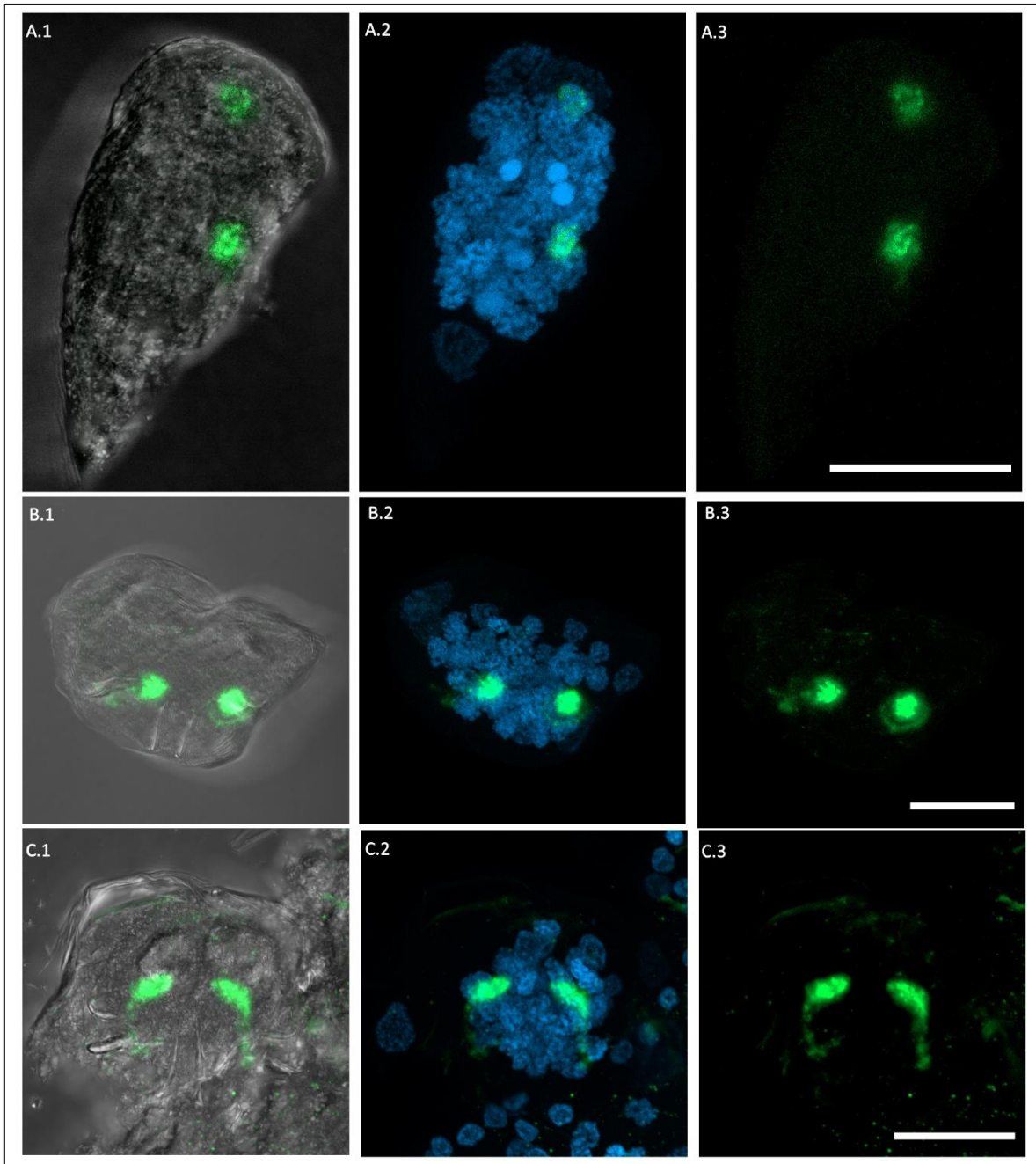
**Detección de *npp-2*:** Se detectó la expresión del gen de *npp-2* alrededor de 2 núcleos muy próximos entre sí en preoncósferas tempranas y tardías, estos resultados se muestran en la **Figura 5.5**. Al observar la señal obtenida, inferimos que esta señal corresponde a la célula binucleada tegumentaria presente en oncósferas de cestodos, la cual ha sido bien descrita en otras especies como *E. multilocularis* [30] y en *Mosgovoyia ctenoides* [9], esto se observa en detalle en la **Figura 5.5, A.3**. *npp-2* es el único neuropéptido que se detectó mediante WMISH tanto en oncósferas en desarrollo como en el estadio de adulto. A diferencia de lo que ocurre en el adulto, en el caso de las oncósferas en desarrollo, es claro que la señal detectada para *npp-2* no coincide con la detectada por WMISH para *pc2*, para confirmar esto se podría realizar una co-detección mediante una doble WMISH con ambos genes.

En conjunto estos resultados evidencian por primera vez que las oncósferas presentan células neuropeptidérgicas. Las células neuropeptidérgicas fueron detectadas tanto por el marcador general de estos sistemas neuropeptidérgicos como lo es *pc2*, como así también por dos sondas generadas para *npp-2* y *npp-46*. En el caso de este último detectamos su expresión mediante WMISH e IHF pareciendo ser específico de oncósferas. También encontramos que estos dos neuropéptidos se expresan en células diferentes, en

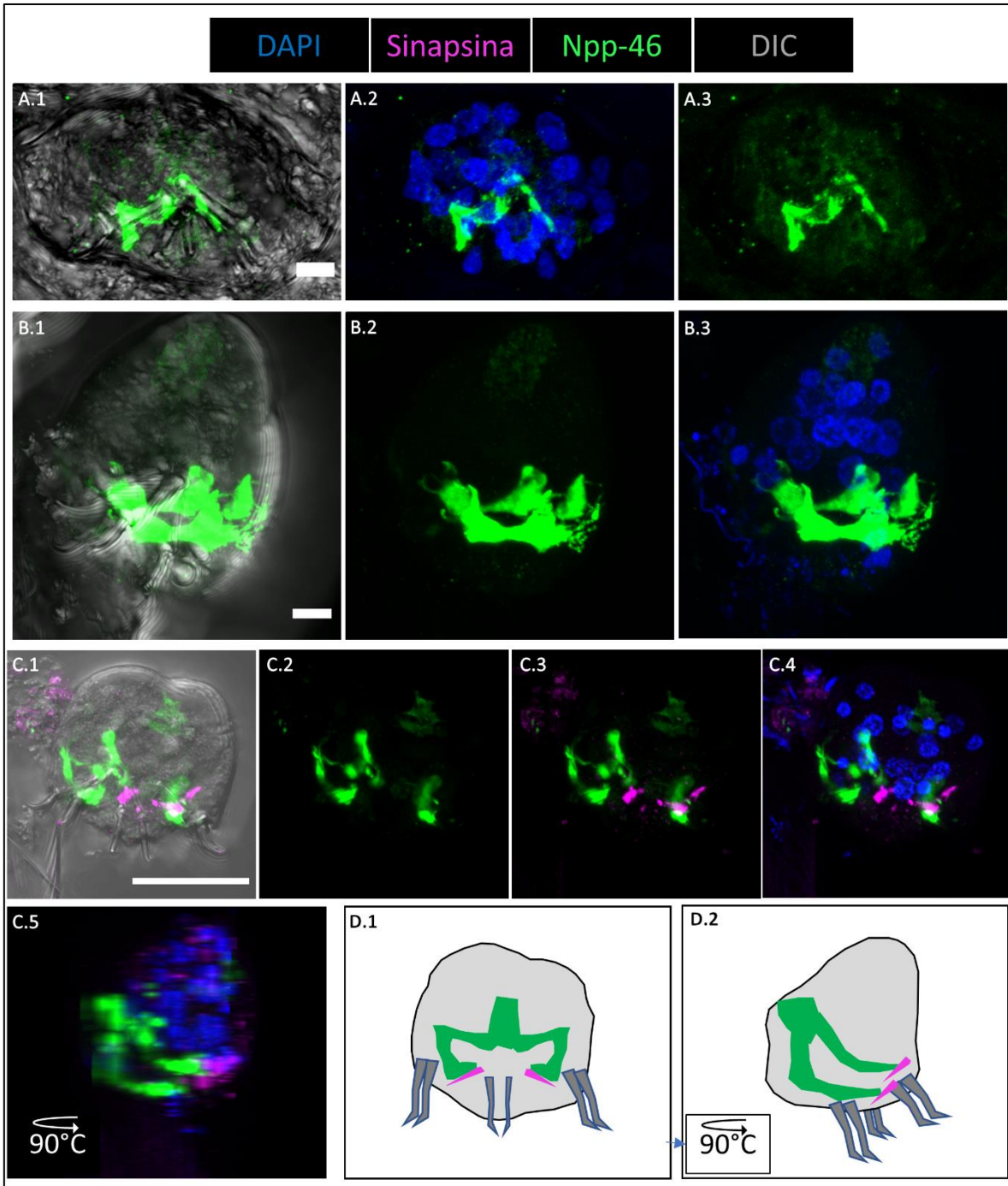
dos células con prolongaciones hacia los ganchos (*npp-46*) o en la célula binucleada que da origen al tegumento de la oncósfera (*npp-2*), lo que sugiere diferentes funciones para estos neuropéptidos. Finalmente, se detectó la expresión de neuropéptidos con motivo terminal RFamida en oncósferas, los cuales son expresados por las mismas células que expresan *npp-46* lo que muestra que una misma célula expresa más de un neuropéptido, generando un complejo sistema de comunicación en un sistema nervioso reducido.



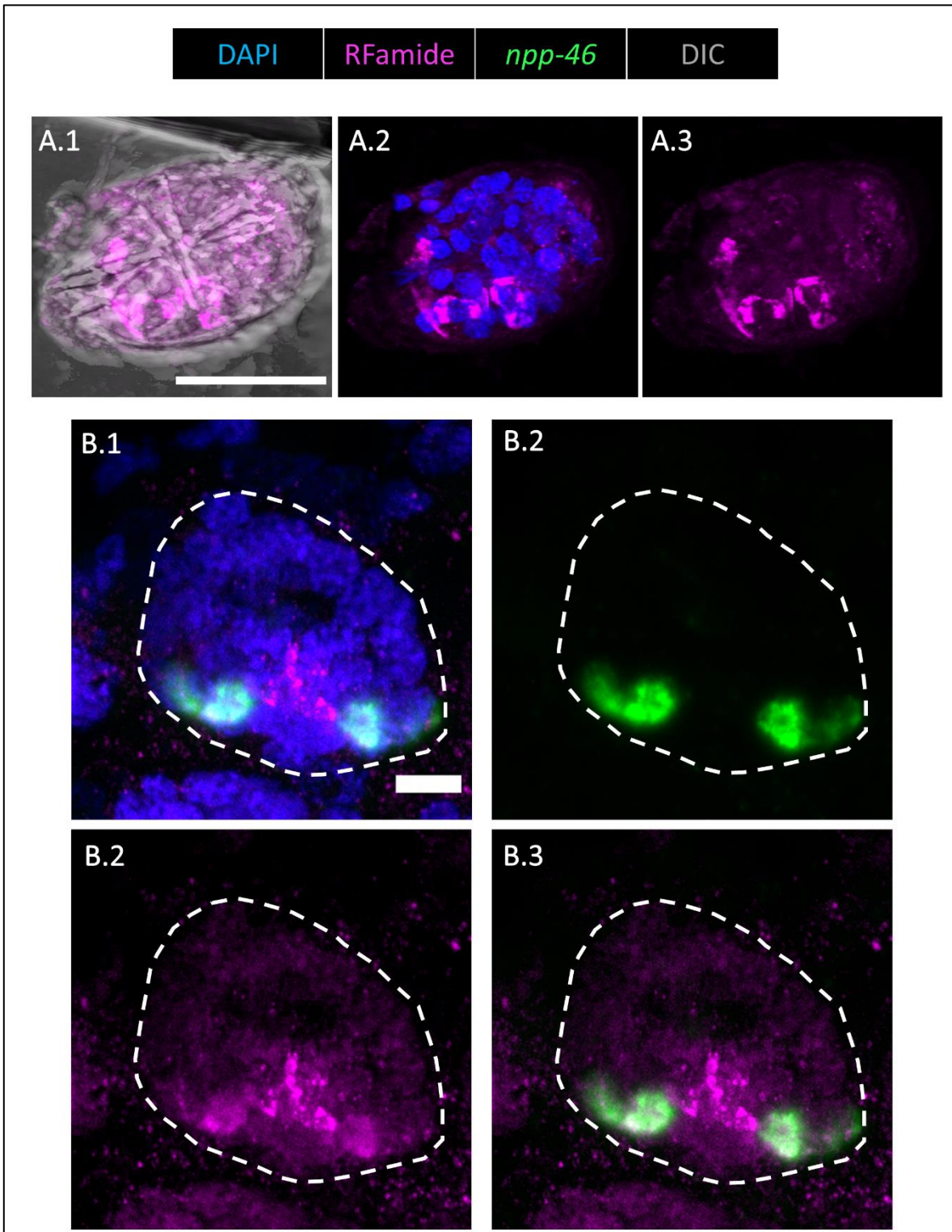
**Figura 5.1. Detección de la expresión de *pc2* en oncósferas en desarrollo de *H. microstoma* mediante WMISH.** Se observan los resultados de la WMISH en verde y a los núcleos teñidos con DAPI en azul/cian. En la serie A se muestran proyecciones en Z, en la serie B se muestran proyecciones transversales, todas de las mismas imágenes obtenidas por Microscopio de Barrido Laser Confocal. Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$  en A.1 y 5  $\mu\text{m}$  en B.1.



**Figura 5.2. Detección por WMISH del gen de *npp-46* en oncósferas en desarrollo de *H. microstoma*.** Se observan a los resultados de la WMISH en verde, DIC en tonalidades de gris y a los núcleos teñidos con DAPI en azul/cian. Todas las imágenes son proyecciones en Z. **A**, se muestra una preoncósfera temprana en desarrollo aún sin ganchos. **B**, se muestra una oncósfera con el comienzo del desarrollo de los ganchos (preoncósfera temprana). **C** se muestra una oncósfera ya en etapas avanzadas del desarrollo, nótese las prolongaciones de las células con señal para *npp-46* en C.3 que finalizan en la región cercana a los ganchos que ya están más avanzados en su desarrollo (preoncósfera tardía). Barras de escala: 20  $\mu$ m.

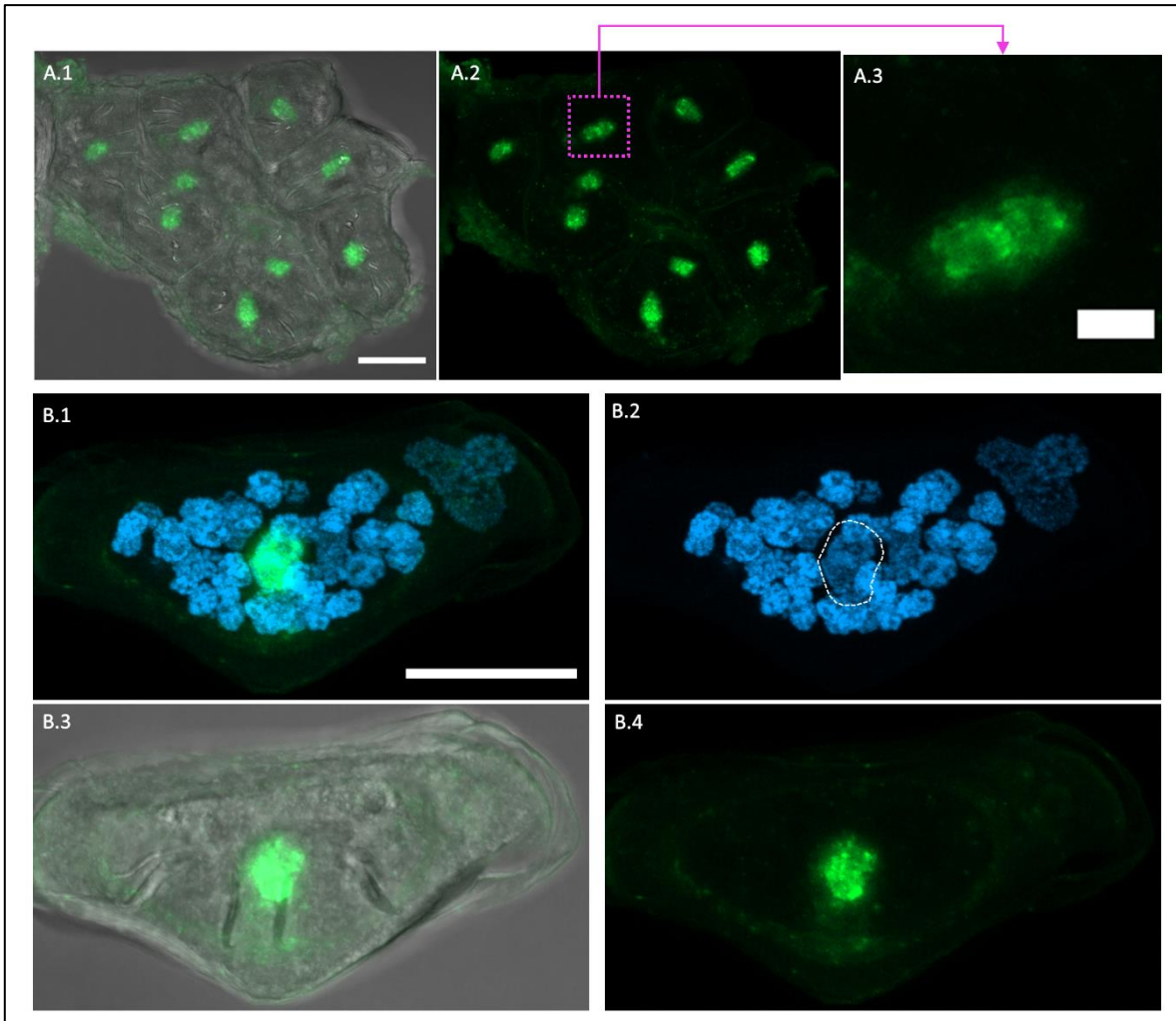


**Figura 5.3. Detección por IHF de Npp-46 y Sinapsina.** Se muestran los resultados de IHF, en inmunodetecciones sobre criocortes de oncósferas en A y para oncósferas activadas en B y C. Se muestra un esquema de los patrones de señal obtenidos en las IHF en la serie D. Se utilizan los códigos de colores que se muestra en la parte superior de la figura: núcleos teñidos con DAPI en azul, IHF para Sinapsina en magenta, IHF para Npp-46 en verde y DIC en tonalidades de grises. En C.5 se muestra una proyección rotada 90° con respecto a C.4. En D.2 se muestra el esquema rotado de 90°C de D.1. Barras de escala: 5  $\mu\text{m}$  A.1 y B.1; 20  $\mu\text{m}$  en C.1.



**Figura 5.4. Detección por WMISH del gen de *npp-46* e IHF para RFamida en oncósferas en desarrollo de *H. microstoma*.** Se muestran resultado utilizando el código de colores que se muestra en la parte superior de la imagen: magenta para las IHF de RFamida, verde para la señal de WMISH de *npp-46*, DIC en tonalidades de gris y núcleos en azul. **A**, se muestra una IHF en cortes de oncósferas detectando al motivo terminal de

neuropéptidos RFamida. **B**, IHF para la detección de RFamida sobre criocortes de oncósferas para las que previamente fue detectada la expresión de *npp-46* mediante WMISH, nótese la correlación de ambas señales en las mismas células. Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$  en A1; 5  $\mu\text{m}$  en B1.



**Figura 5.5. Detección de la expresión de *npp-2* en oncósferas en desarrollo de *H. microstoma* mediante WMISH.** Se observan a los resultados de la WMISH en verde, DIC en tonalidades de gris y a los núcleos teñidos con DAPI en azul/cian. Todas las imágenes son proyecciones en Z. **A**, se muestra a un grupo de preoncósferas tempranas, cada una con el mismo patrón de señal para *npp-46*, en A.3 se muestra en detalle la señal de la oncósfera marcada con magenta en B.2. **B**, se muestra a una única preoncósfera algo más tardía, en B.2 se marca la región en dónde se evidencia la señal de la WMISH para *npp-2*, que puede apreciarse en las otras imágenes de esta serie. Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$  en B.1 y A.1; 5  $\mu\text{m}$  en A.3.

## 5.2 Ensayos funcionales en oncósferas: optimización del protocolo de activación y ensayos de motilidad.

En esta parte del trabajo, se optimizó el protocolo de activación de las oncósferas luego de probar diferentes combinaciones de métodos previamente descritos en la bibliografía, y posteriormente se realizaron ensayos de motilidad en oncósferas activadas. En esta sección la mayor parte de los resultados se mostrarán en gráficas de puntos, en los ensayos de motilidad cada punto representa a una oncósfera y a la cantidad de ciclos por minuto (cpm) que esta generó durante el análisis. Los ciclos por minuto representan al ciclo de extensión y retracción de ganchos que estas larvas generan al activarse. Los resultados que se muestran son la combinación de las oncósferas de al menos 3 réplicas de cada experimento, mostrados en conjunto en un solo gráfico.

### 5.2.1 Optimización del protocolo de activación de oncósferas.

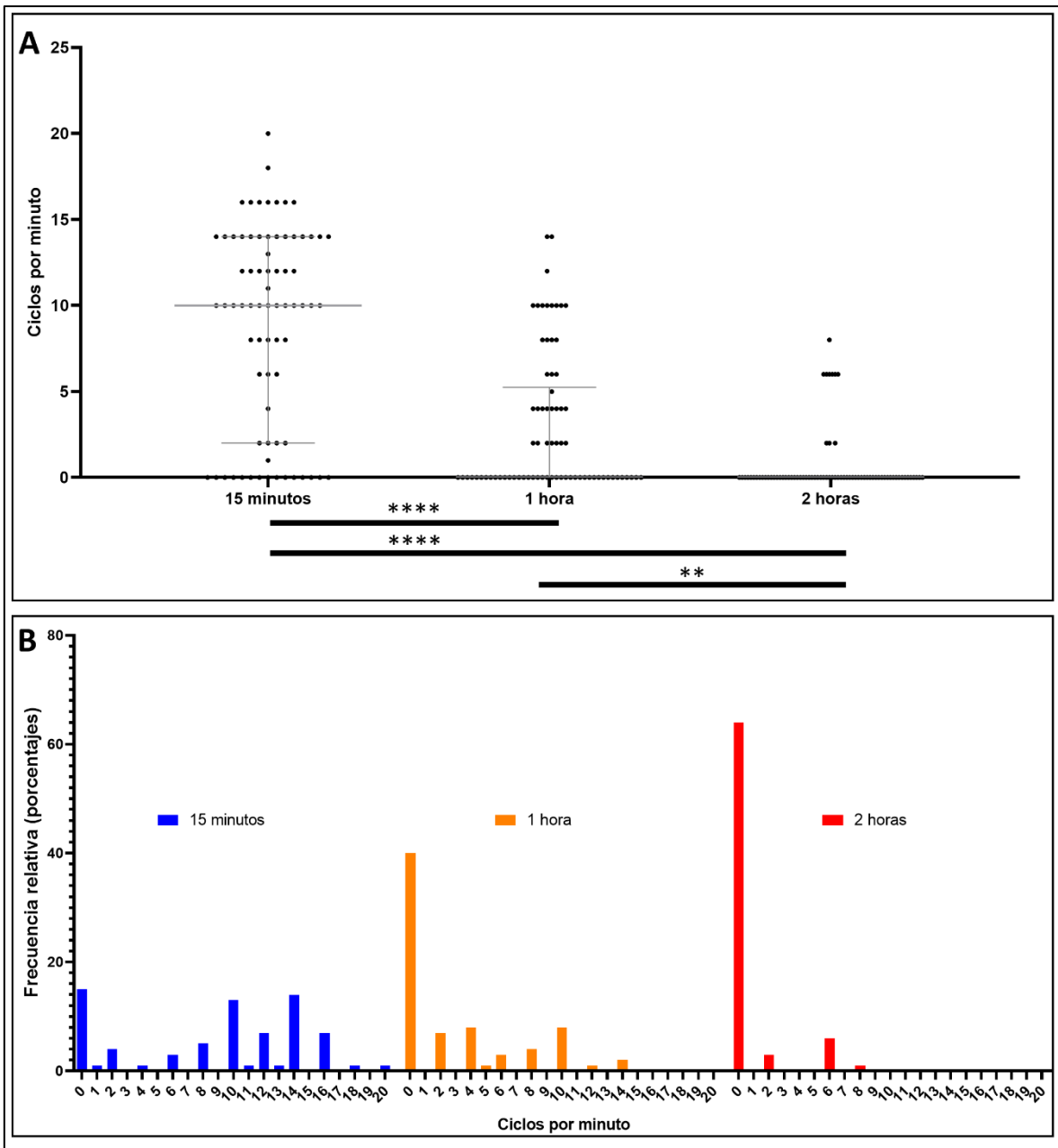
Para los ensayos funcionales con oncósferas el primer paso fue optimizar el protocolo de activación, ya que las mismas se encuentran en un estado quiescente dentro de una serie de membranas y de la cáscara al ser aisladas. El método imita la ingestión por el hospedador intermediario, incluyendo la ruptura mecánica de cáscara del huevo, y la ruptura de las envolturas interna y externa de la oncosfera (este proceso probablemente es en parte activo por la oncósfera, tanto por secreciones como movimientos de la misma). Al activarse, las oncósferas eclosionan, saliendo de las membranas y la cáscara y comienzan a realizar movimientos cíclicos de extensión y retracción de sus ganchos. Comenzamos a activar oncósferas utilizando un agitador magnético y bolitas de vidrio para triturar la cáscara de cada oncósfera con un método descrito en 1965 por Berntzen y Voge [26], este protocolo también requiere un paso de tripsina y el burbujeo con una mezcla de gases de 95% de N<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. En los primeros experimentos, comprobamos que la tripsina y burbujeo no producían cambios en el porcentaje de activación de las oncósferas, por lo que dejamos de utilizarlos. El protocolo de activación generó resultados muy variables cada vez que fue utilizado cambiando drásticamente los porcentajes de activación de entre un 15% en el mejor de los casos a un 1% de activación en otros. La cantidad de oncósferas obtenida y la variabilidad de resultados generaron dificultades al intentar realizar experimentos funcionales sobre su motilidad con este protocolo. Se optó por probar otros métodos alternativos para activar oncósferas, y se encontró que utilizando un émbolo de vidrio, como fue descrito para *H. diminuta* en 1991 por Pappas y Durka [296], se generaba un mayor porcentaje de oncósferas activadas, proporcionando una buena cantidad con las cuales trabajar. Una gran cantidad de oncósferas se pierden durante el proceso de activación en ambos protocolos, aunque muchas menos cuando se utiliza el protocolo de activación con el homogeneizador de vidrio. En un mismo experimento, realizado para comparar ambos protocolos en paralelo, encontramos las diferencias que se detallan a



continuación. Con las bolitas de vidrio, nos quedaban en las placas un 6% del total de oncósferas iniciales con las que comenzábamos la activación, y sólo el 1% de las que estaban en la placa se activaron. Utilizando el mismo aislamiento de huevos, pero con el protocolo de activación del homogeneizador, nos quedaron en las placas el 15,7% de las oncósferas con las que iniciamos el protocolo, y un 15,6% de las oncósferas presentes en la placa activadas. Dado estos resultados el protocolo de activación con el homogeneizador es el que se utilizó para las pruebas funcionales que se describirán más adelante, logrando con esto que se pierdan menos oncósferas y que se active un mayor porcentaje. Con los resultados alentadores obtenidos para el protocolo con homogeneizador, nos preguntamos si combinándolo con tripsina y burbujeo el porcentaje de activación aumentaría aún más, ya que en la bibliografía se reportaban mejores resultados. Combinando al homogeneizador del protocolo de Pappas y Durka, con la incubación en presencia de tripsina y burbujeo con la mezcla de gases presente en el protocolo original de Berntzen y Voge, encontramos, en promedio, un porcentaje de activación de oncósferas de 29,5 %, mientras que al utilizar sólo el homogeneizador sin la mezcla de gases y tripsina, obtuvimos un 20,0 % de oncósferas activadas. Aunque la diferencia entre estos dos protocolos es apreciable, el protocolo que incluye la tripsina y el burbujeo con la mezcla de gases es más largo y laborioso, por lo que no fue utilizado para las pruebas funcionales de motilidad, ya que encontramos que la motilidad de las oncósferas activadas decae rápidamente en el tiempo luego de su activación (a las 2 horas prácticamente ya no se mueven), como se muestra a continuación.

### 5.2.2 Dinámica de activación de oncósferas a diferentes tiempos de activación.

Se estudió la motilidad de las oncósferas activadas a lo largo del tiempo post activación. Se observó la cantidad de ciclos por minuto (cpm) que éstas realizaron a los 15 minutos, una y dos horas post activación. En la **Figura 5.6** se muestran los resultados obtenidos en conjunto de 6 experimentos independientes, encontrando que la cantidad de cpm que realizan las oncósferas decae rápidamente luego de ser activadas. El porcentaje de oncósferas que realizan movimientos cíclicos disminuye a la hora y aún más a las dos horas post-activación. Por estos motivos, los experimentos de motilidad que mostraremos posteriormente se realizaron solo teniendo en cuenta a la cantidad de cpm a los 15 minutos y a la hora de activación, sin tener en cuenta las 2 horas ya que en este tiempo sólo un pequeño porcentaje presentaba los movimientos cíclicos característicos de esta larva al momento de activarse.



**Figura 5.6. Motilidad de las oncósferas activadas a diferentes tiempos post activación.** Se muestran los resultados de varios experimentos independientes en conjunto, midiendo los cpm (ciclos por minuto) generados por las oncósferas a los 15 minutos, una y dos horas post activación. **A**, gráfica de puntos con cada uno representando a una oncósfera y la cantidad de cpm que esta realizó en ese tiempo. Se muestran las medianas y los intercuartiles con barras. **B**, Frecuencia relativa de la cantidad de cpm encontrados en los experimentos analizados. Test estadístico Kruskal-Wallis con test de comparaciones múltiples de Dunn: \*\*\*\* = P value < 0,0001; \*\* = P value < 0,01.

### 5.2.3 Dinámica de activación de oncósferas a diferentes tiempos de recolección.

Se llevaron a cabo experimentos de activación de oncósferas, luego de ser aisladas a partir de segmentos grávidos de adultos, para determinar por cuánto tiempo podían ser

utilizadas. Se evaluó la motilidad de las oncósferas al momento de ser aisladas, y luego de una noche, una semana o dos semanas en la heladera a 8°C, ya que está reportado que estas bajas temperaturas pueden aumentar la activación de oncósferas de *H. microstoma* [228], evitan que oncósferas de otros cestodos se degeneren rápidamente [297] y a su vez se evita (al menos por más tiempo) la contaminación de las muestras. Esto se evaluó midiendo la cantidad de ciclos por minuto (cpm) que realizaban al activarse y el porcentaje de oncósferas activadas en cada caso (**Figura 5.7**). Se encontró que bajo estas condiciones la cantidad de cpm que producen las oncósferas activadas, se mantiene constante a lo largo del paso de los días, hasta un tiempo de una semana. A las 2 semanas, la cantidad de cpm que realizan las oncósferas cae abruptamente, como se puede observar en las gráficas, mostrando diferencias significativas con cualquiera de los otros tiempos. En el caso del porcentaje de activación, se encontraron diferencias significativas entre el tiempo 0 y a las 24 h, mostrando que luego de una noche a 8°C aumenta el porcentaje de oncósferas activadas bajo estas condiciones. Para los tiempos de activación de 1 y 2 semanas se necesitarían más réplicas para poder realizar los análisis estadísticos correspondientes, aunque se observa que el porcentaje de activación se mantiene medianamente constante a la semana post-recolección, y se evidencia una caída de este porcentaje a las 2 semanas que parece bastante clara.

En resumen, se encontró que las oncósferas presentan una mayor activación luego de permanecer una noche a 8°C luego de ser aisladas. Por otra parte, es claro que para experimentos funcionales de motilidad es mejor utilizar a los huevos dentro de la primera semana post recolección.

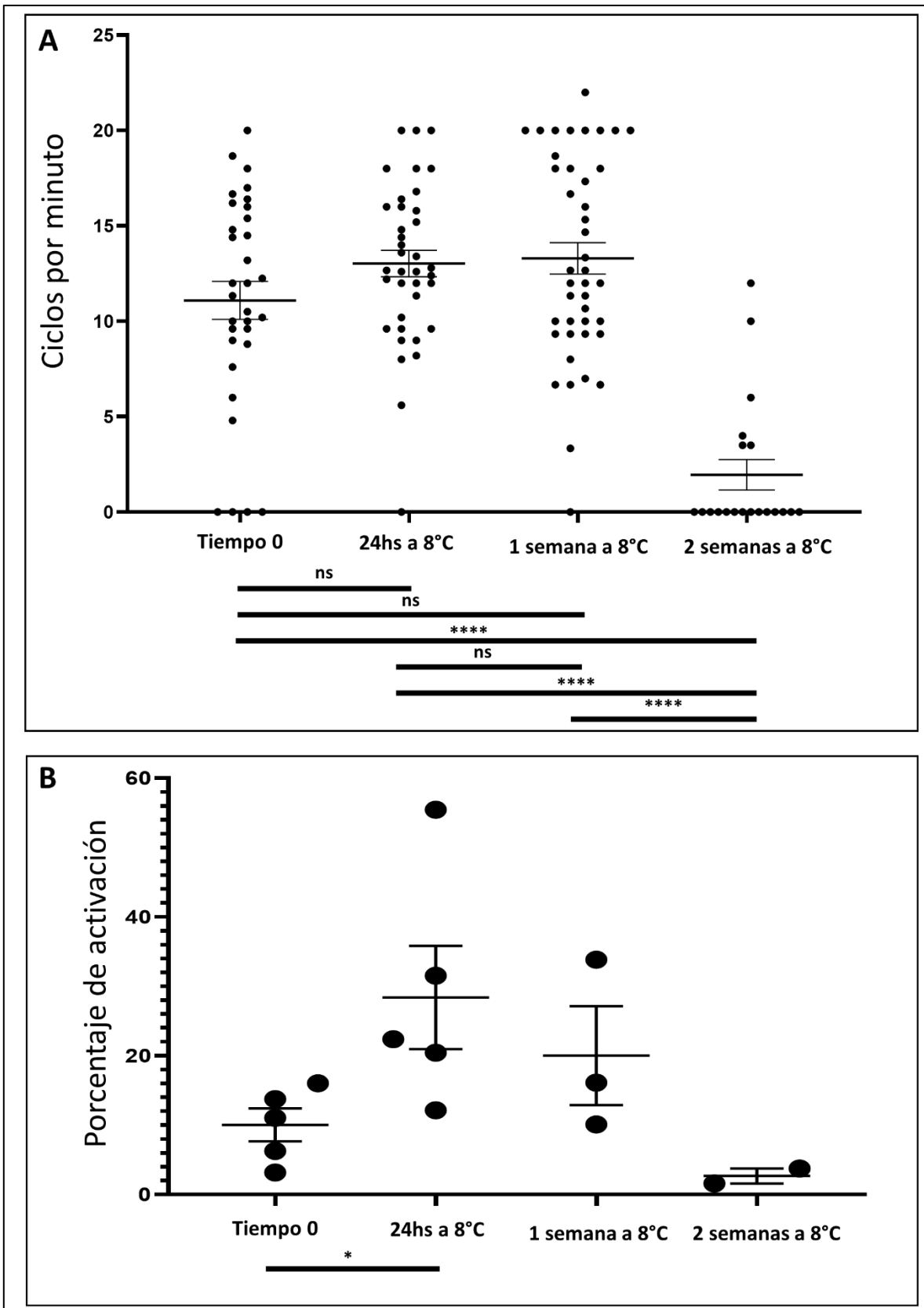


Figura 5.7. Dinámica de la activación de oncósferas al permanecer a 8°C a diferentes tiempos. Resultados

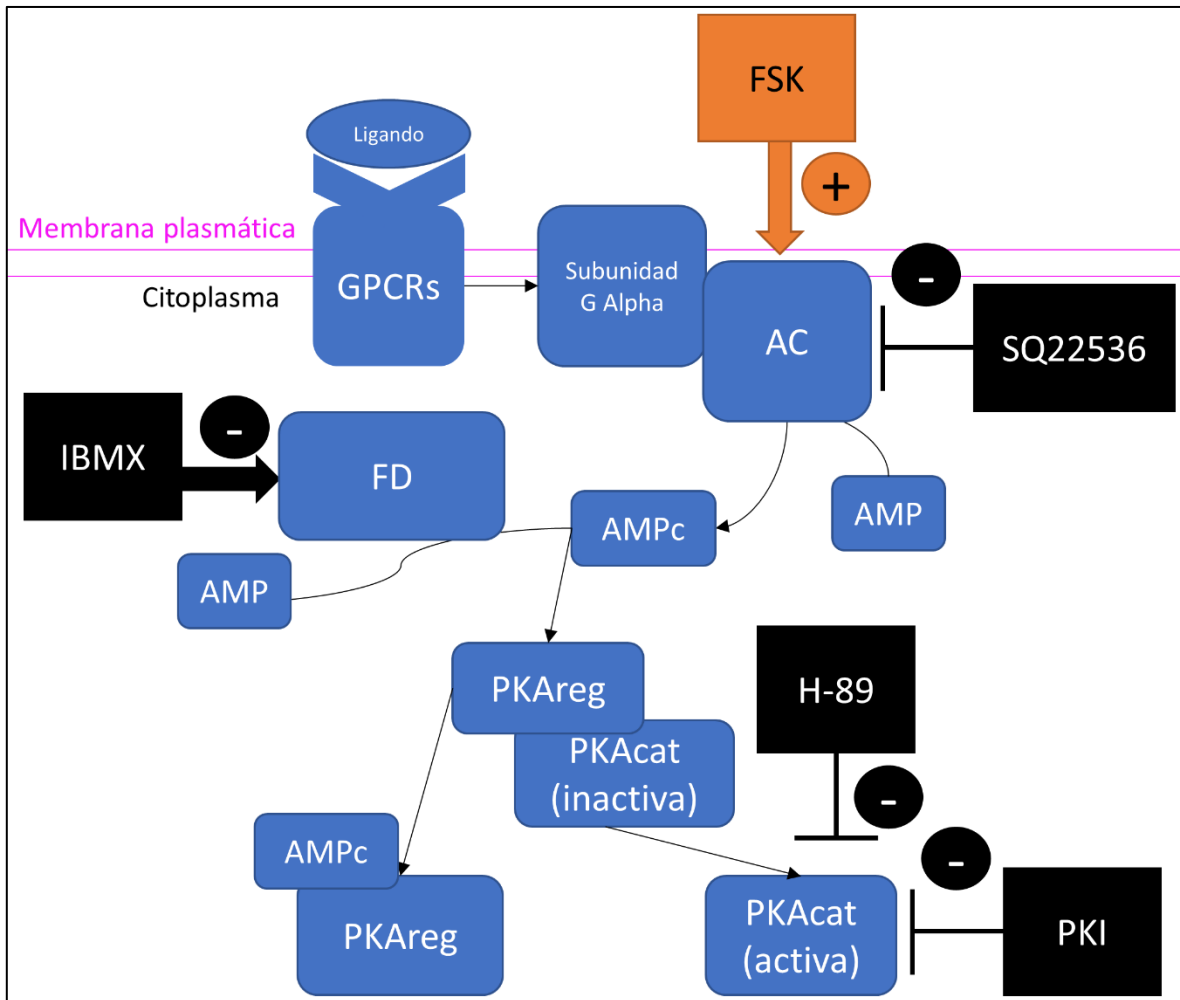
obtenidos de estudiar la motilidad de las oncósferas el día de su aislamiento, y a las 24 horas, una y dos semanas, estando estos últimos 3 tiempos a 8°C. Ciclos por minuto realizados (A) y porcentajes de activación (B) de oncósferas a los 15 minutos post activación en cada tiempo de post-recolección antes mencionados. Se muestran las medianas y los intercuartiles con barras en cada figura. En A Test estadístico Kruskal-Wallis con test de comparaciones múltiples de Dunn y en B Test Mann-Whitney two-tailed: \* = P value < 0,05; \*\*\*\* = P value <0,0001; ns = no significativo.

### **5.3 Efectos de drogas para diferentes vías de comunicación y de neuropéptidos sobre la motilidad de oncósferas.**

Se desarrollaron ensayos de motilidad de oncósferas activadas para analizar los efectos de diferentes drogas y neuropéptidos. La estrategia utilizada fue analizar el efecto de estos compuestos aplicándolos exógenamente, como se ha realizado en otros invertebrados [85,298–301] e incluso en otros estadios de platelmintos parásitos [75,76,302,303]. La primera aproximación fue analizar las principales vías de segundos mensajeros moduladas por neuropéptidos (PKA y PKC) evaluando el efecto de diferentes inhibidores y activadores farmacológicos para estas vías. Los experimentos muestran la actividad de las oncósferas (medida en cpm) frente a estos compuestos a los 15 minutos del protocolo de activación, y luego de una hora, ya que luego de este tiempo, la motilidad de las mismas en estas condiciones cae abruptamente. Los resultados obtenidos se detallan a continuación.

#### **5.3.1 Ensayos de motilidad en oncósferas frente a diferentes drogas que afectan la vía de segundos mensajeros de PKA.**

Se realizaron ensayos de motilidad de oncósferas analizando el efecto de los inhibidores de la vía de PKA. Los inhibidores utilizados y un esquema de los componentes principales de esta vía se muestran en la **Figura 5.8**. Los inhibidores utilizados en esta parte fueron: H-89, PKI (péptido inhibidor de proteína quinasa) y SQ22536. Tanto H-89 como PKI son inhibidores de la proteína quinasa A propiamente dicha, evitando que esta fosforile a sus sustratos específicos, mientras que SQ22536 es un inhibidor de la adenilato ciclasa (AC), encargada de la producción de AMPc, el segundo mensajero responsable de la activación de PKA. Por otro lado, se analizó el efecto de dos activadores de la vía de PKA actuando en conjunto: Forskolina (FSK) e 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX). FSK activa a la AC, mientras que IBMX inhibe a la fosfodiesterasa (FD) por lo que la actividad en conjunto de estas drogas aumenta la cantidad de AMPc presente en el citoplasma celular, generando mayor activación de PKA.



**Figura 5.8. Esquema de la vía de PKA y del efecto de las drogas utilizadas en este trabajo.** Los componentes de esta vía se muestran en azul, las drogas que inhiben uno de los componentes de la vía se encuentran en negro y las que activan componentes en naranja. AC: adenilato ciclasa; FD: fosfodiesterasa; PKAreg: subunidad reguladora de PKA; PKAcat subunidad catalítica de PKA.

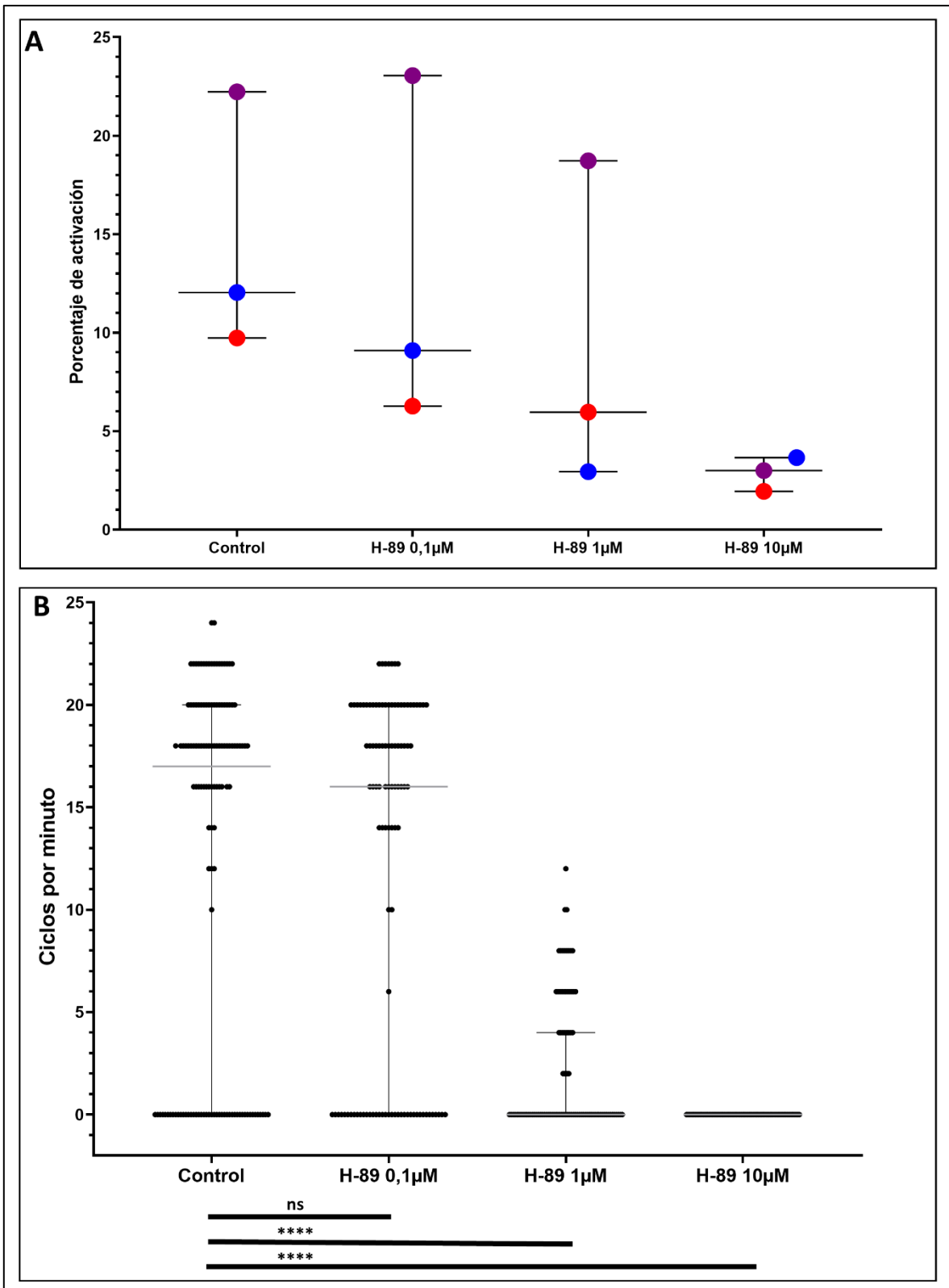
**Ensayos con H-89:** se observó un efecto muy claro sobre la motilidad de las oncósferas al exponerlas a este compuesto, reduciendo abruptamente la cantidad de cpm que estas realizan al activarse, e incluso inmovilizándolas completamente. Se analizó el efecto en un rango de concentraciones, 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ , observando una disminución tanto en el porcentaje de activación como en la frecuencia de ciclos de extensión y retracción de ganchos (cpm) al aumentar la concentración de este compuesto (**Figura 5.9**). Desde una concentración de 1  $\mu\text{M}$  el efecto fue estadísticamente significativo. Con una concentración de 10  $\mu\text{M}$  de este compuesto todas las oncósferas dejaron de realizar movimientos cíclicos a los quince minutos tras la activación. Las oncósferas al verse afectadas por este compuesto pasan a presentar una postura particular con los ganchos extendidos (visualizados a bajo aumento como cruzados) y el cuerpo generalmente

alargado (**Figura 5.10**). Las oncósferas bajo el efecto de H-89, más allá de no presentar movimientos cíclicos, tienen movimientos pequeños y descoordinados de los ganchos, observados muy bien a grandes aumentos, lo que sugiere que al menos a corto plazo, no estarían muertas sino inmobilizadas.

**Ensayos con PKI:** No se detectaron efectos de este inhibidor sobre la motilidad de las oncósferas al ser expuestas al mismo a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , los resultados se muestran en la **Figura 5.11 A**. Se realizaron experimentos piloto a concentraciones mayores que tampoco reflejaron efectos sobre la motilidad (no se muestran estos resultados).

**Ensayos con SQ22536:** No se detectaron efectos sobre la motilidad de las oncósferas al ser expuestas a este inhibidor a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , los resultados se muestran en la **Figura 5.11 B**. Se realizaron experimentos piloto a concentraciones mayores, los cuales tampoco reflejaron efectos sobre la motilidad (no se muestran estos resultados).

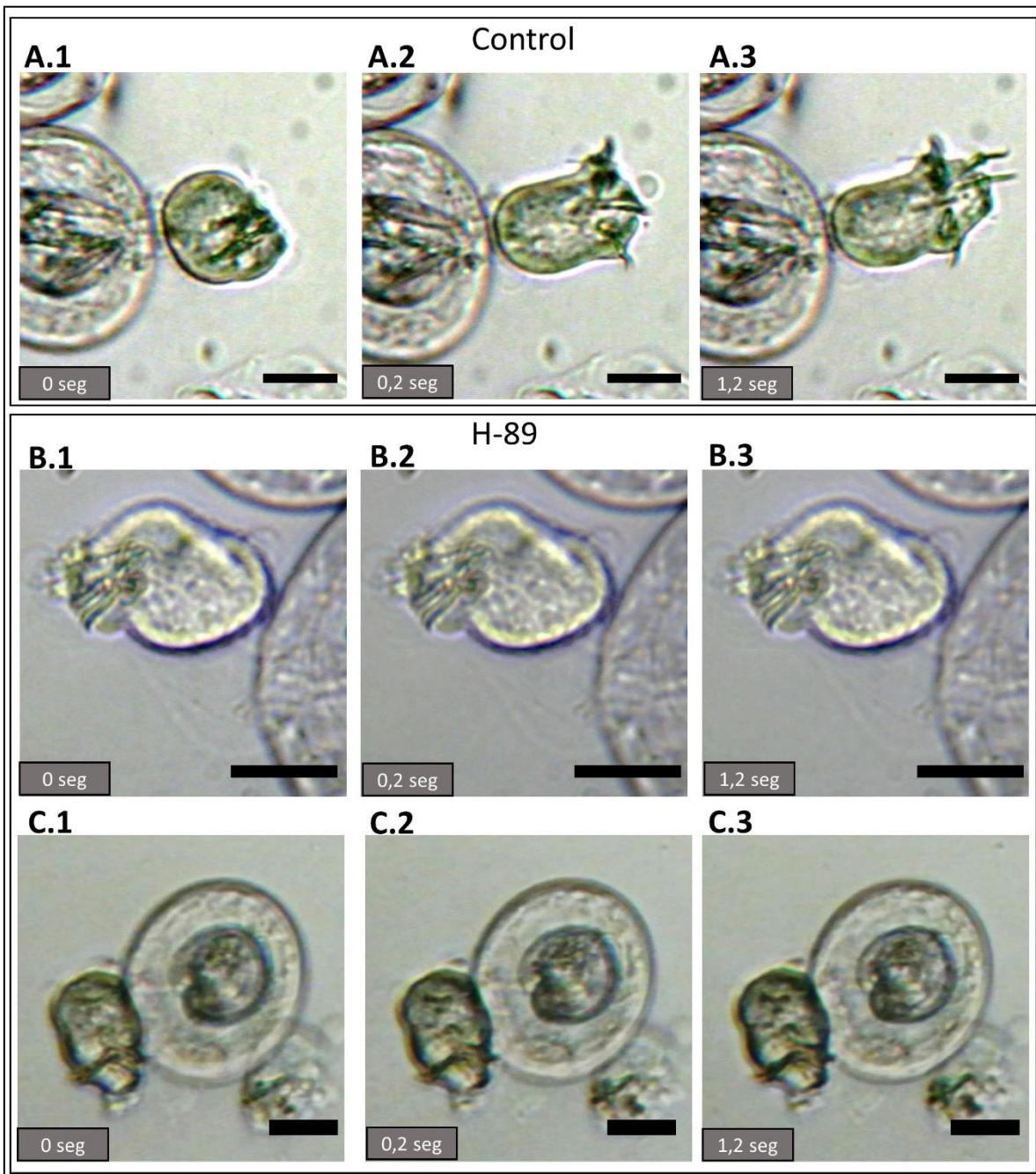
**Ensayos con FSK+IBM:** Se encontró un efecto leve de inhibición del ciclado de oncósferas al utilizar estos dos activadores en conjunto a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  luego de una hora de activación de las oncósferas, no así en los primeros 15 minutos (**Figura 5.11 C**). Incluso a la hora de activación, donde se ve el efecto de estos compuestos, el efecto es sutil, comparado con el efecto de H-89.



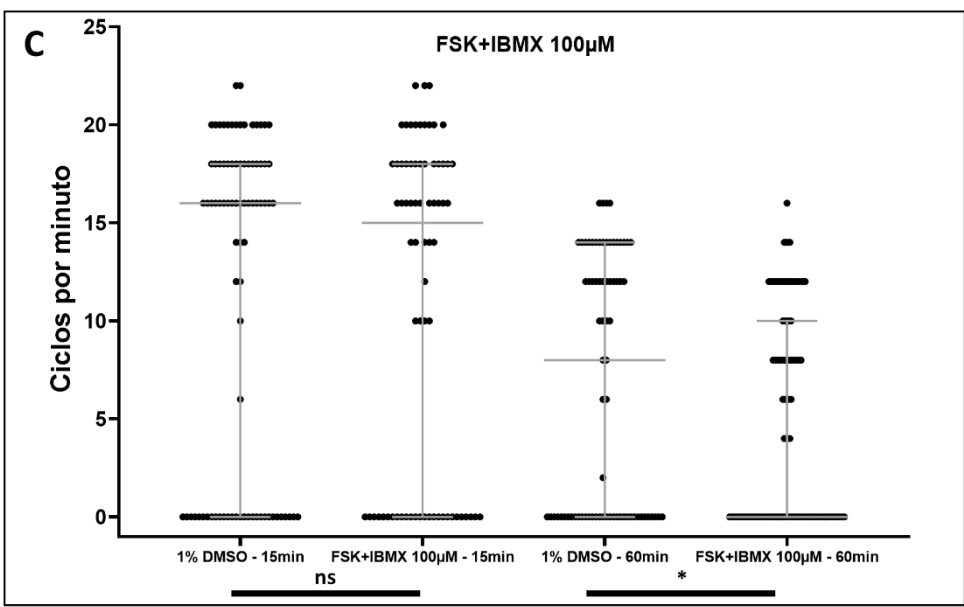
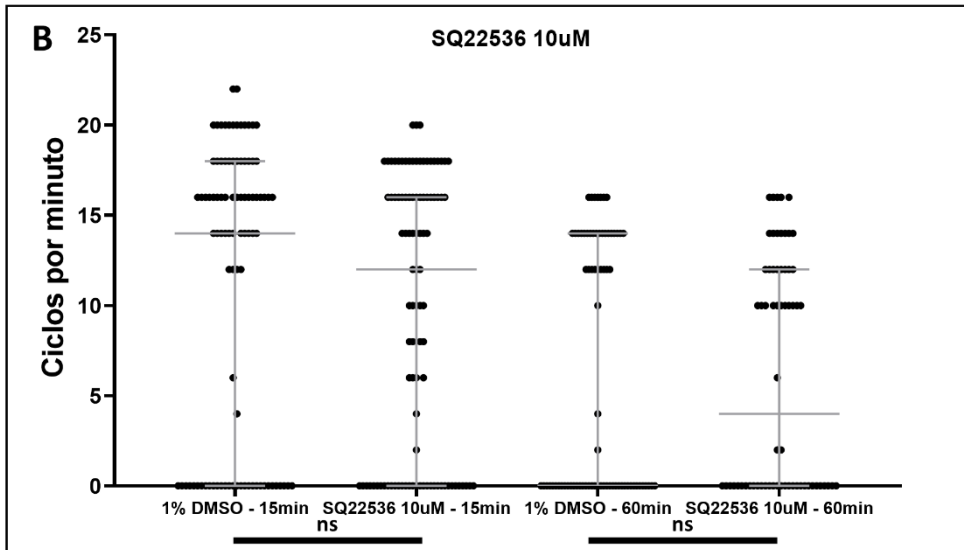
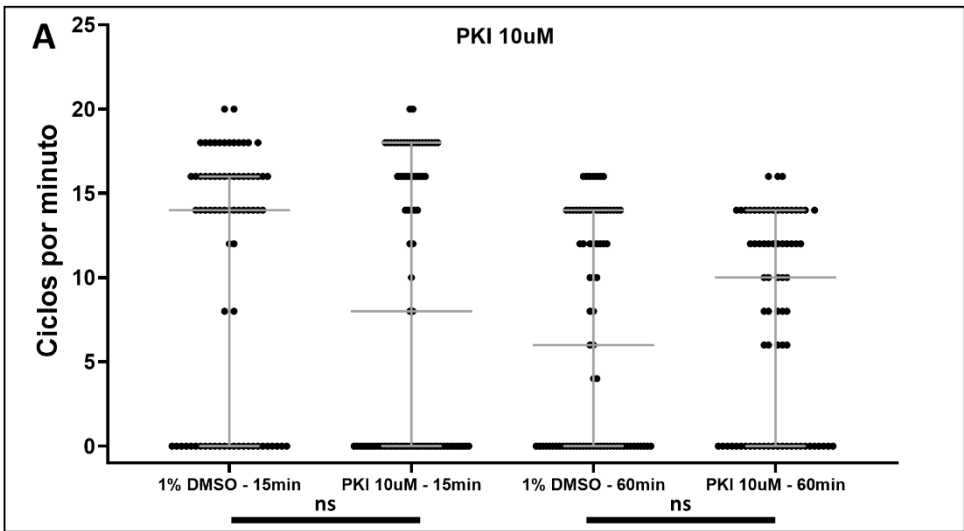
**Figura 5.9.** Efecto del inhibidor de PKA H-89 sobre la motilidad de oncóferas activadas. **A**, porcentajes de oncóferas activadas en 3 muestras bajo diferentes concentraciones de H-89 (cada réplica representada con un color). **B**, cpm para cada oncóferas a tiempo 15 minutos frente a diferentes concentraciones de H-89. Se



muestran las medianas y los intercuartiles en cada imagen. Test estadístico Mann-Whitney two-tailed test: \*\*\*\* = P value < 0,0001; ns = no significativo.



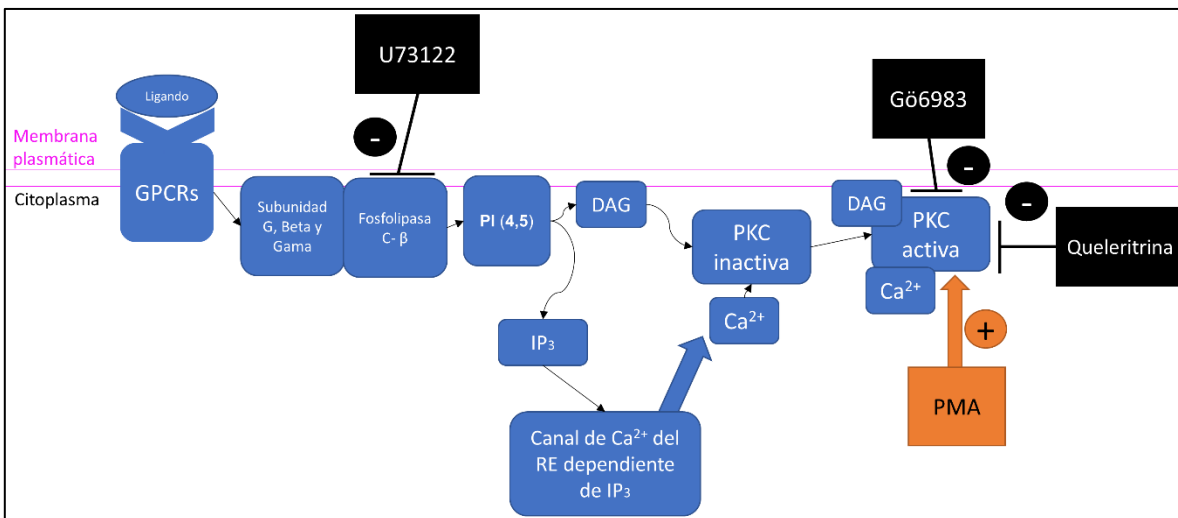
**Figura 5.10. Efecto sobre la motilidad de las oncósferas activadas del inhibidor de PKA H-89. A,** se muestra una oncósfera activada con método estándar de activación, pueden observarse las diferentes posiciones de los ganchos característicos del movimiento cíclico de esta larva al activarse. **B y C,** se muestran oncósferas bajo el efecto de H-89, sus movimientos cíclicos se encuentran paralizados, y su postura cambia, se encuentran con los ganchos extendidos y generalmente con forma alargada. Los intervalos de tiempo se muestran en cada imagen empezando en tiempo 0 segundos en la primera imagen de cada serie. Barras de escala 20  $\mu$ m.



**Figura 5.11. Efecto sobre la motilidad de oncósferas activadas con PKI, SQ22536, FSK e IBMX sobre la motilidad de oncósferas activadas.** Conteos de la cantidad de cpm para cada oncósferas a tiempo 15 minutos y a la hora de activación **A:** oncósferas control y con PKI 10  $\mu$ m. **B:** oncósferas control y con SQ22536 10  $\mu$ m. **C:** oncósferas control y con FSK+IBMX 100  $\mu$ m. Se muestran las medianas y los intercuartiles en cada caso. Test estadístico Mann-Whitney two-tailed test: \* = P value < 0,05; ns = no significativo.

5.3.2 Ensayos de motilidad en oncósferas frente a diferentes drogas que afectan la vía de segundos mensajeros de PKC.

Se realizaron ensayos de motilidad de oncósferas con diferentes drogas que afectan la vía de señalización de PKC. Los componentes principales de esta vía de segundos mensajeros, así como las drogas utilizadas y sus puntos de influencia en la misma están esquematizadas en la **Figura 5.12**. Se utilizaron los inhibidores de la vía de PKC: Gö6983, Queleritrina y U73122. Gö6983 y Queleritrina son inhibidores de la PKC en sí misma, evitando la fosforilación que produce esta enzima sobre sus sustratos específicos, mientras que U73122 es un inhibidor de la fosfolipasa C (FC), el cual evita la acción de esta enzima sobre Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PI(4,5)P), evitando la cascada de segundos mensajeros que activará PKC posteriormente. Por otro lado, se utilizó al activador de esta vía Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), el cual activa a PKC promoviendo que fosforile a sus sustratos.



**Figura 5.12. Esquema de la vía de PKC y del efecto de las drogas utilizadas en este trabajo.** Los componentes de esta vía se muestran en azul, las drogas que inhiben uno de los componentes de la vía se encuentran en negro y las que activan componentes en naranja. PI (4,5): fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; DAG: diacilglicerol; IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato;

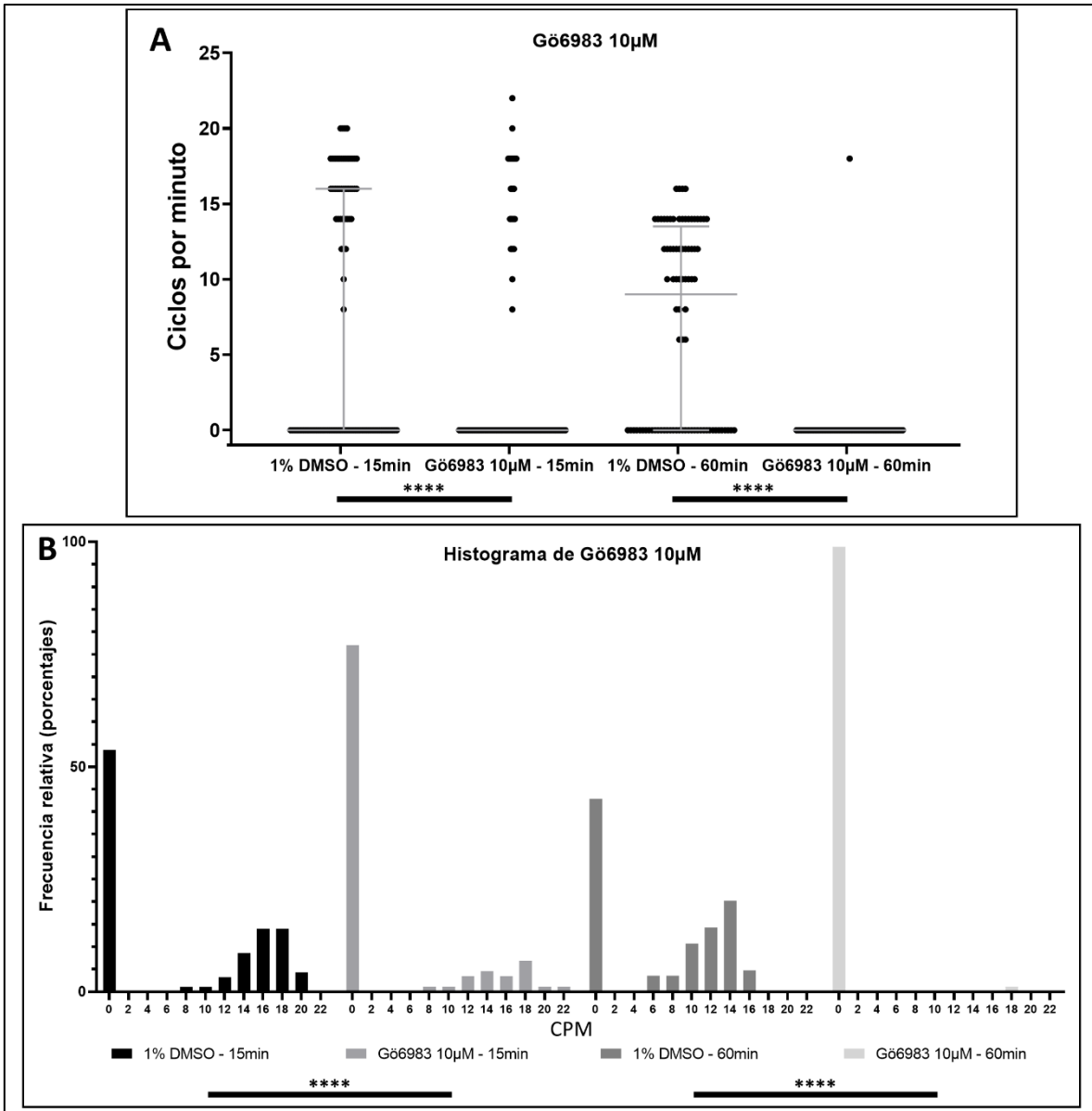
**Ensayos con Gö6983:** Se encontró que esta droga afecta considerablemente la motilidad de las oncósferas, reduciendo bruscamente la cantidad de cpm que éstas generan

al activarse, tanto a los 15 minutos como a la hora de activación, al utilizar una concentración en el medio de 10  $\mu\text{M}$  (**Figura 5.13**).

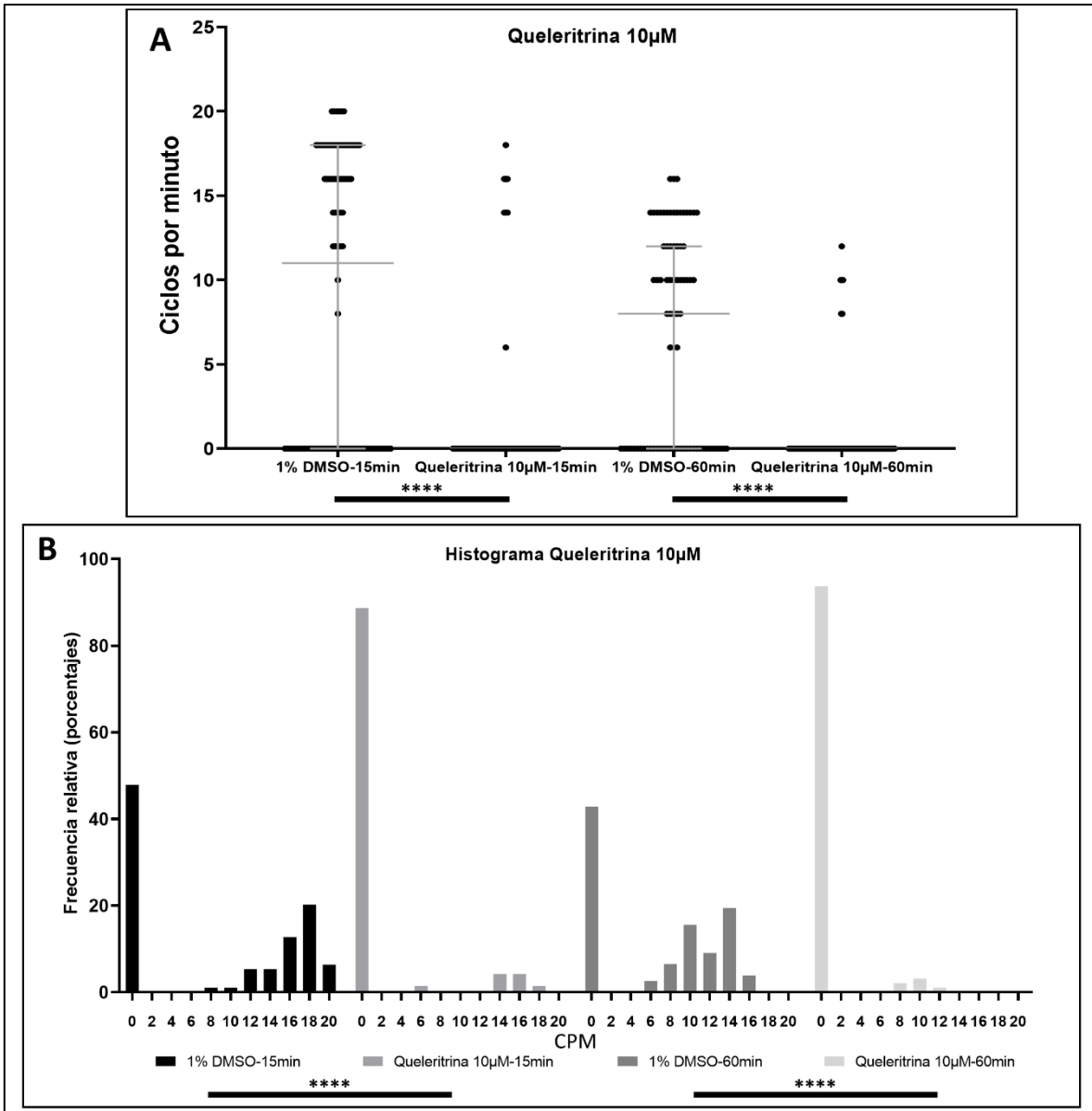
**Ensayos con Queleritrina:** Como en el caso anterior, se encontró que este inhibidor afecta la motilidad de las oncósferas, reduciendo notoriamente la cantidad de cpm que estas generan al estar en presencia de este compuesto a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , tanto a los 15 minutos como a la hora de activación (**Figura 5.14**).

**Ensayos con U73122:** Este inhibidor presentó una inhibición en el movimiento cíclico de las oncósferas a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , aunque más leve (**Figura 5.15**).

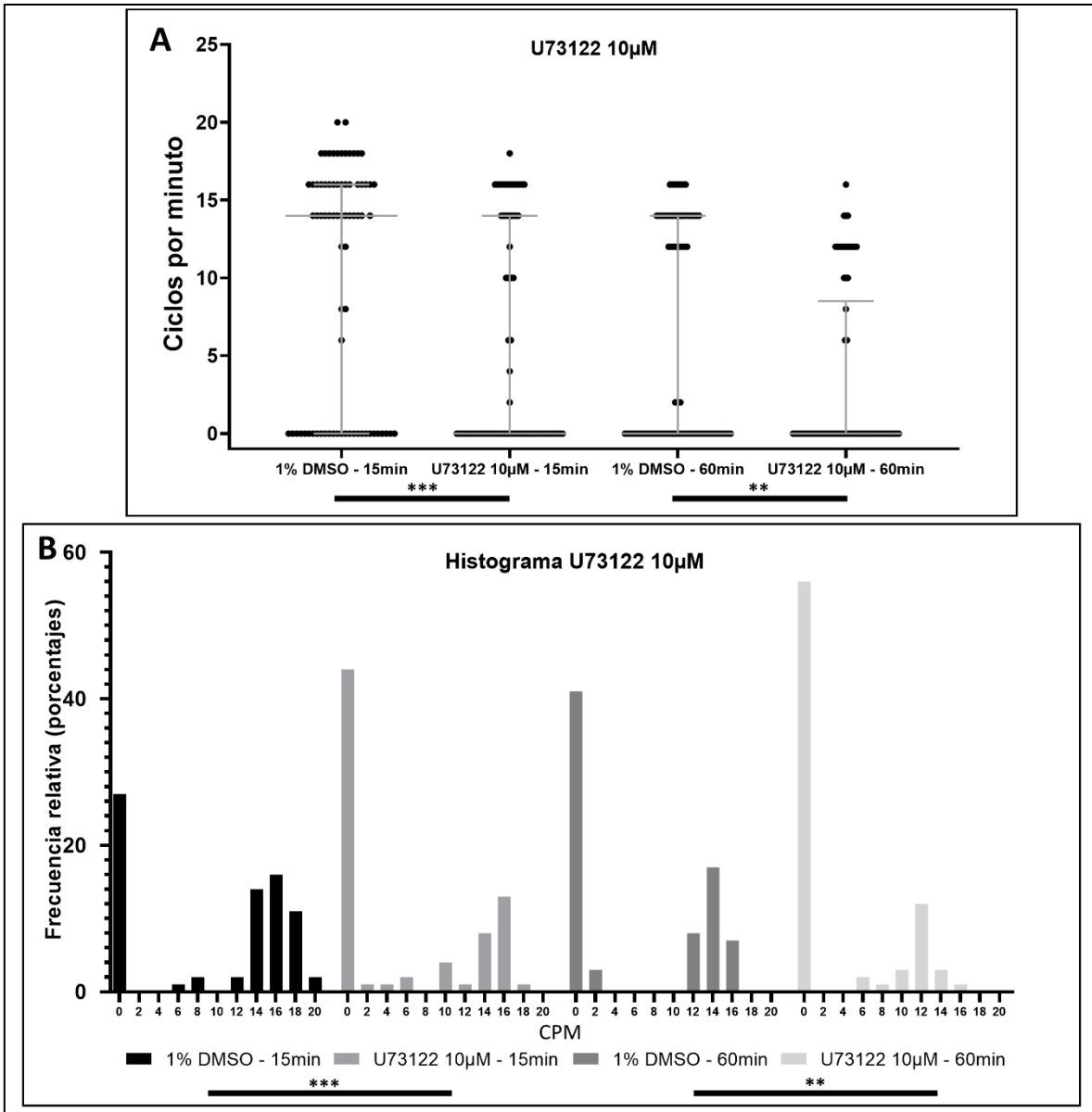
**Ensayos con PMA:** esta droga, activadora de la vía de PKC, no mostró efectos sobre la motilidad de las oncósferas a los 15 minutos posteriores a su activación, aunque si a la hora de activación, donde mostró una reducción de la cantidad de los cpm significativa (**Figura 5.16**), aunque no tan evidente como en los experimentos anteriores para esta vía de segundos mensajeros.



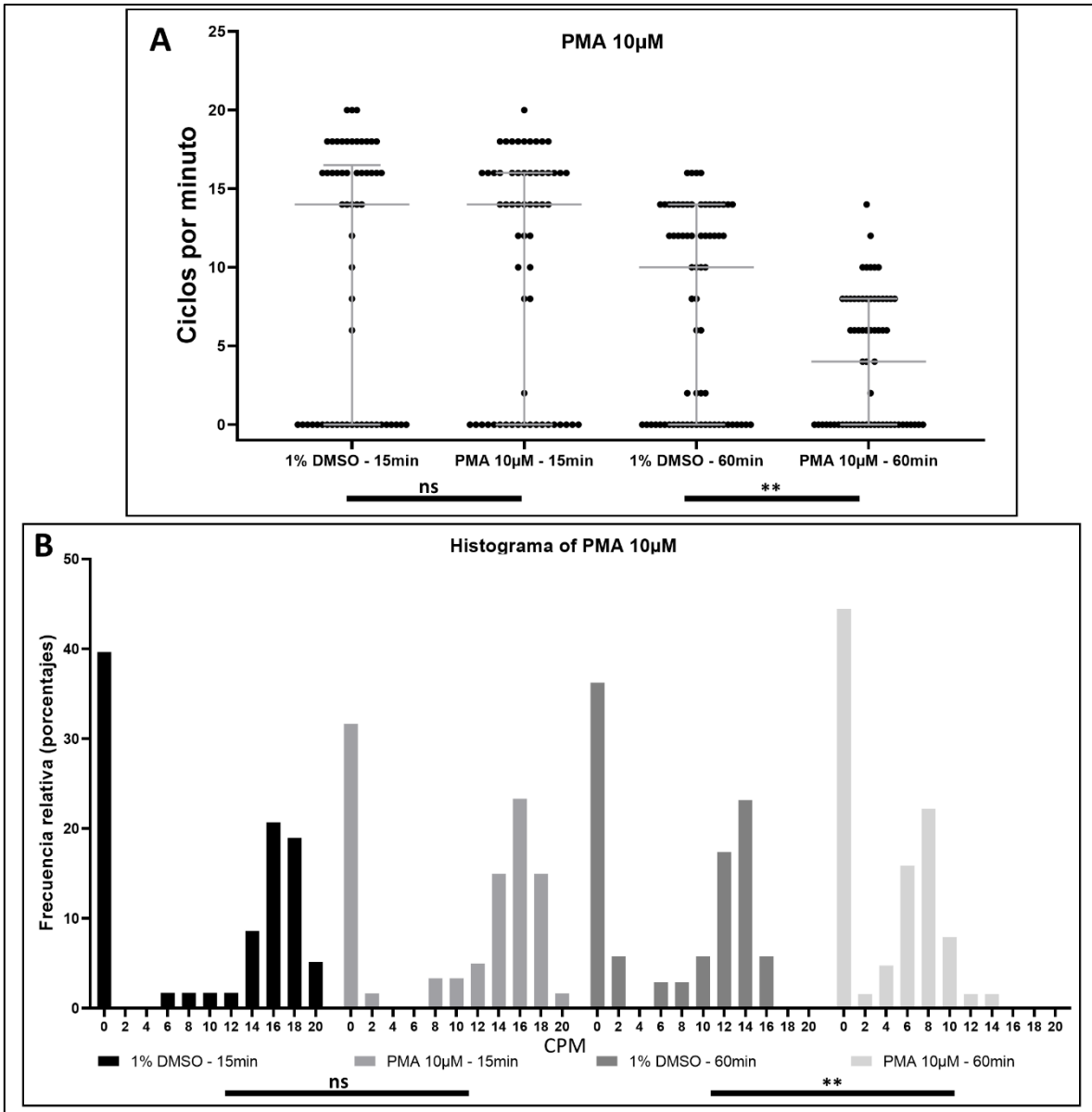
**Figura 5.13. Efecto del inhibidor de PKC Gö6983 sobre la motilidad de oncóferas activadas.** Se muestra una gráfica de puntos en **A** y la frecuencia relativa en **B**, de la cantidad de cpm detectados en cada condición, a los 15 minutos y a la hora de activación, para oncóferas control con DMSO, y con 10 µM de Gö6983. Se muestran las medianas y los intercuartiles representados con barras en **A**. Test estadístico Mann-Whitney two-tailed test: \*\*\*\* = P value < 0,0001.



**Figura 5.14. Efecto del inhibidor de PKC Quercetrina sobre la motilidad de oncóferas activadas.** Se muestra una gráfica de puntos en **A** y la frecuencia relativa en **B**, de la cantidad de cpm detectados en cada condición, a los 15 minutos y a la hora de activación, para oncóferas control con DMSO, y con 10 µM de Quercetrina. Se muestran las medianas y los intercuartiles representados con barras en **A**. Test estadístico Mann-Whitney two-tailed test: \*\*\*\* = P value < 0,0001.



**Figura 5.15. Efecto del inhibidor de PKC U73122 sobre la motilidad de oncósferas activadas.** Se muestra una gráfica de puntos en **A** y la frecuencia relativa en **B**, de la cantidad de cpm detectados en cada condición, a los 15 minutos y a la hora de activación, para oncósferas control con DMSO, y con 10 µM de U73122. Se muestran las medianas y los intercuartiles representados con barras en **A**. Test estadístico Mann-Whitney two-tailed test: \*\*\* = P value < 0,001; \*\* = P value < 0,01.

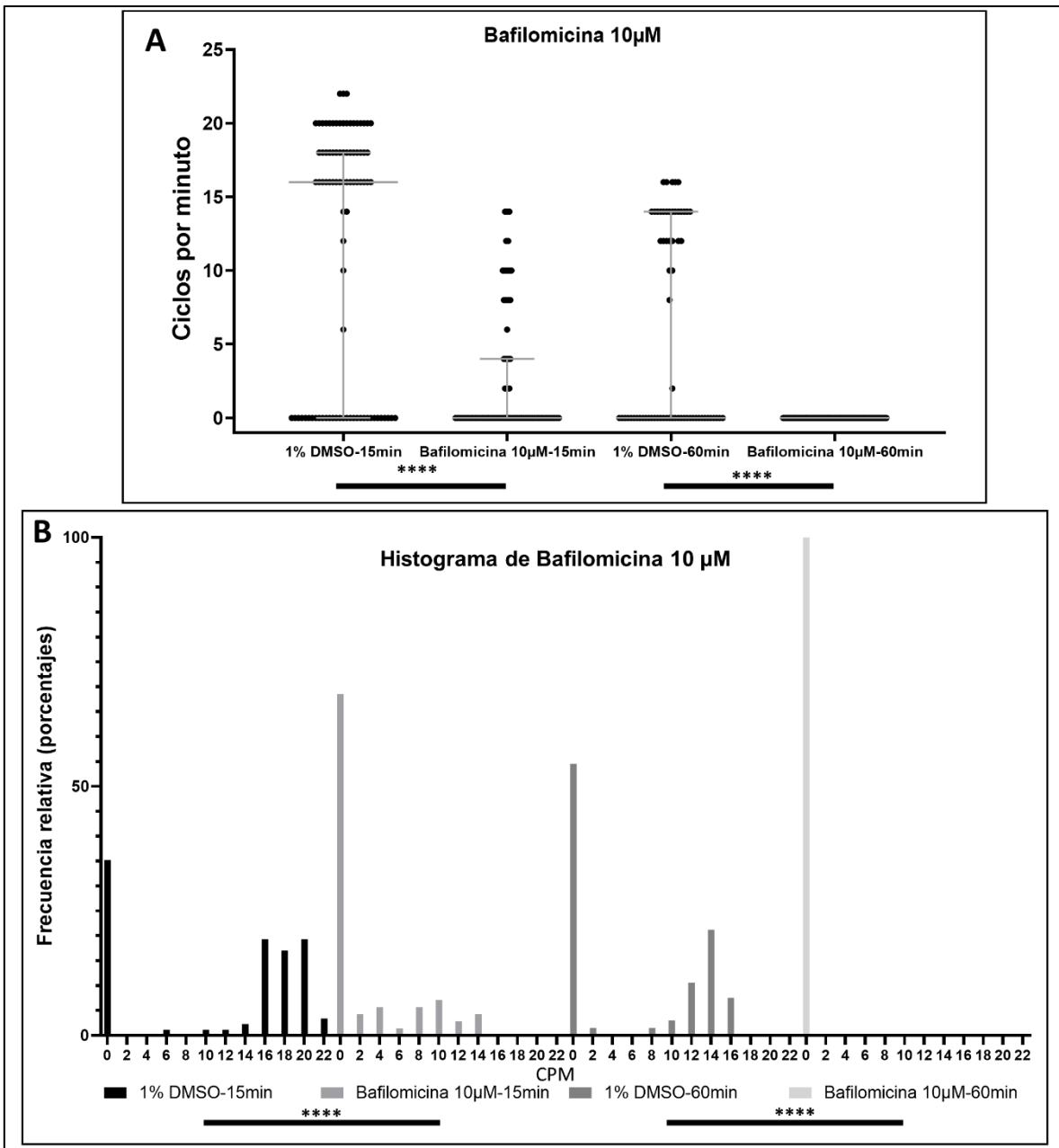


**Figura 5.16. Efecto del activador de PKC PMA sobre la motilidad de oncóferas activadas.** Se muestra una gráfica de puntos en **A** y la frecuencia relativa en **B**, de la cantidad de cpm detectados en cada condición, a los 15 minutos y a la hora de activación, para oncóferas control con DMSO, y con 10 µM de PMA. Se muestran las medianas y los intercuartiles representados con barras en **A**. Test estadístico Mann-Whitney two-tailed test: \*\* = P value < 0,01; ns = no significativo.



### 5.3.3 Efectos del inhibidor de H<sup>+</sup>-ATPasa vacuolar Bafilomicina sobre la motilidad de las oncósferas.

Los neurotransmisores clásicos se acumulan en vesículas de secreción en las terminales sinápticas utilizando transportadores vesiculares (como *vglut*) que utilizan un gradiente de protones entre el interior de las vesículas y el citoplasma para cargar a las vesículas con el neurotransmisor correspondiente. Este gradiente es generado por ATPasas, que bombean protones al interior de las vesículas. Con el fin de estudiar si estas vías cumplen un rol en el movimiento cíclico de las oncósferas, se realizaron pruebas sobre la motilidad de oncósferas utilizando Bafilomicina a una concentración de 10  $\mu$ M. Esta droga inhibe a las bombas de protones ATPasas necesarias para el llenado de las vesículas sinápticas con el neurotransmisor correspondiente, por lo que se evitará que se generen nuevas vesículas cargadas de neurotransmisores. Como se muestra en la **Figura 5.17**, se detectó un efecto inhibitorio de este compuesto sobre la cantidad de cpm que generan las oncósferas al activarlas, tanto a los 15 minutos como a la hora post-activación.



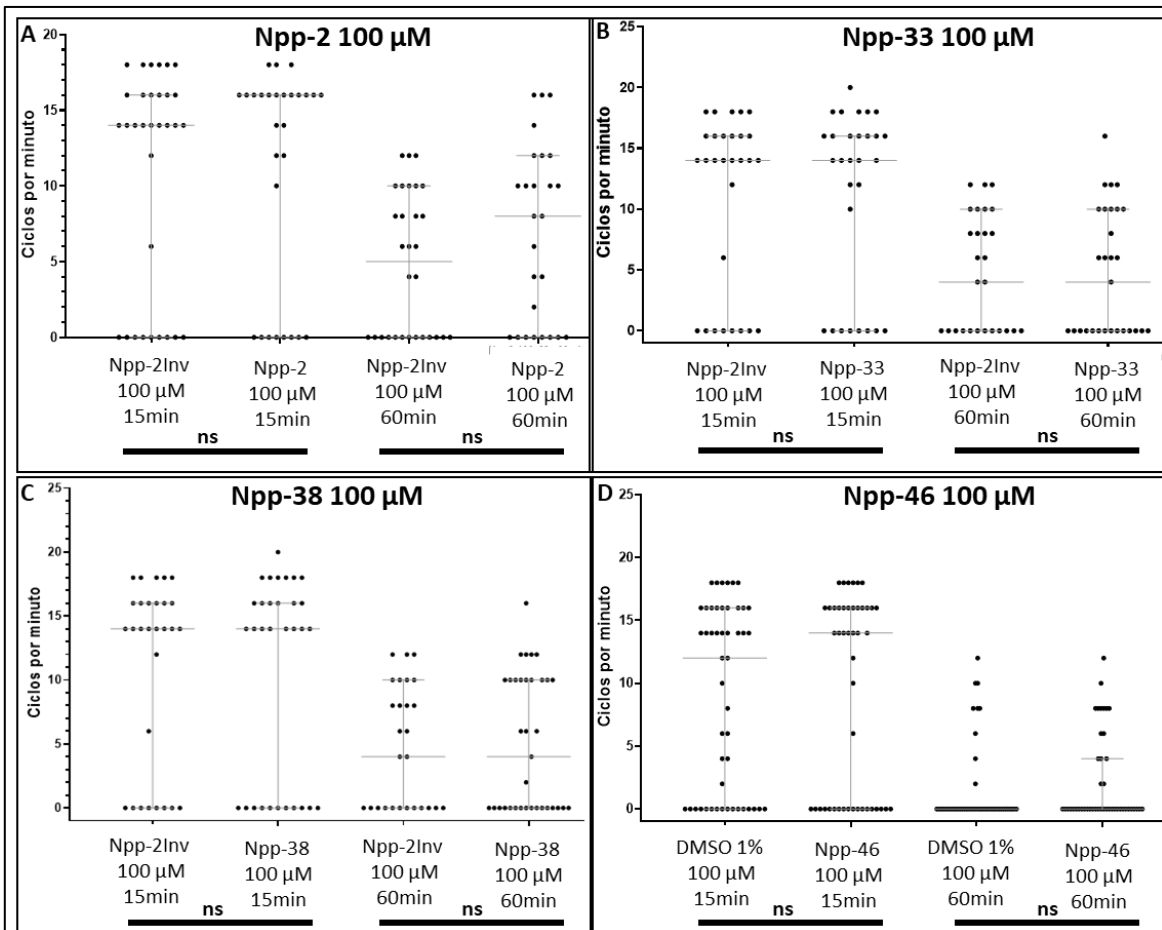
**Figura 5.17. Efecto del inhibidor de H<sup>+</sup>-ATPasa vacuolar Bafilomicina sobre la motilidad de oncóferas activadas.** Se muestra una gráfica de puntos en A y la frecuencia relativa en B, de la cantidad de cpm detectados en cada condición, a los 15 minutos y a la hora de activación, para oncóferas control con 1% de DMSO, y con 10 µM de Bafilomicina. Se muestran las medianas y los intercuartiles representados con barras en A. Test estadístico Mann-Whitney two-tailed test: \*\*\*\* = P value < 0,0001.

### 5.3.4 Ensayos con neuropéptidos sobre la motilidad de las oncóferas.

Se realizaron ensayos con diferentes neuropéptidos para evaluar su efecto sobre la motilidad de oncóferas. Se evaluó el efecto de neuropéptidos maduros de los genes de

neuropéptidos predichos para *H. microstoma*: *npp-2*, *npp-33*, *npp-38* y *npp-46*; en el caso de *npp-2* sólo se analizó uno de los péptidos maduros que produce este gen. Las secuencias aminoacídicas para cada neuropéptido utilizadas se encuentran en la sección Materiales y Métodos **Tabla M.3**. Npp-2 y Npp-46 mostraron ser expresados en diferentes células de las oncósferas (como se muestra en la sección 5.1 de este capítulo), mientras que Npp-33 (homólogo del neuropéptido SIF-amida de otros organismos bilaterales) tiene a su receptor putativo expresado más en oncósfera (TPM:6,81) que en los otros dos estadios según nuestros datos transcriptómicos, finalmente Npp-38 parecería ser específico de adulto, por lo que no esperábamos tener un efecto *a priori* en este estadio. Para la mayoría de los neuropéptidos se utilizó como control un neuropéptido denominado Npp-2Inv el cual tiene los mismos aminoácidos que el *npp-2* pero en diferente orden y sin amidación en el extremo C-terminal. Para *npp-46* sin embargo se utilizó DMSO como control ya que la solución stock del mismo se encuentra en este solvente.

Estos neuropéptidos fueron probados a una concentración de 100  $\mu$ M. Esta concentración es alta comparada con las utilizadas en ensayos neurofisiológicos, pero es utilizada comunmente al aplicar los neuropéptidos exógenamente sobre pequeños invertebrados para evaluar sus efectos, de forma de permitir que al menos parte de estos interacciones con sus receptores específicos en el interior de los organismo [75,76]. No se encontraron diferencias significativas sobre la motilidad de las oncósferas al utilizar estos neuropéptidos, ni a los 15 minutos ni a la hora post-activación, como se muestra en la **Figura 5.18**. También se realizaron pruebas piloto con los otros neuropéptidos maduros de los cuales se disponía, Npp-29 y Npp-41, y en estas pruebas tampoco se obtuvieron efectos apreciables sobre la motilidad de las oncósferas.



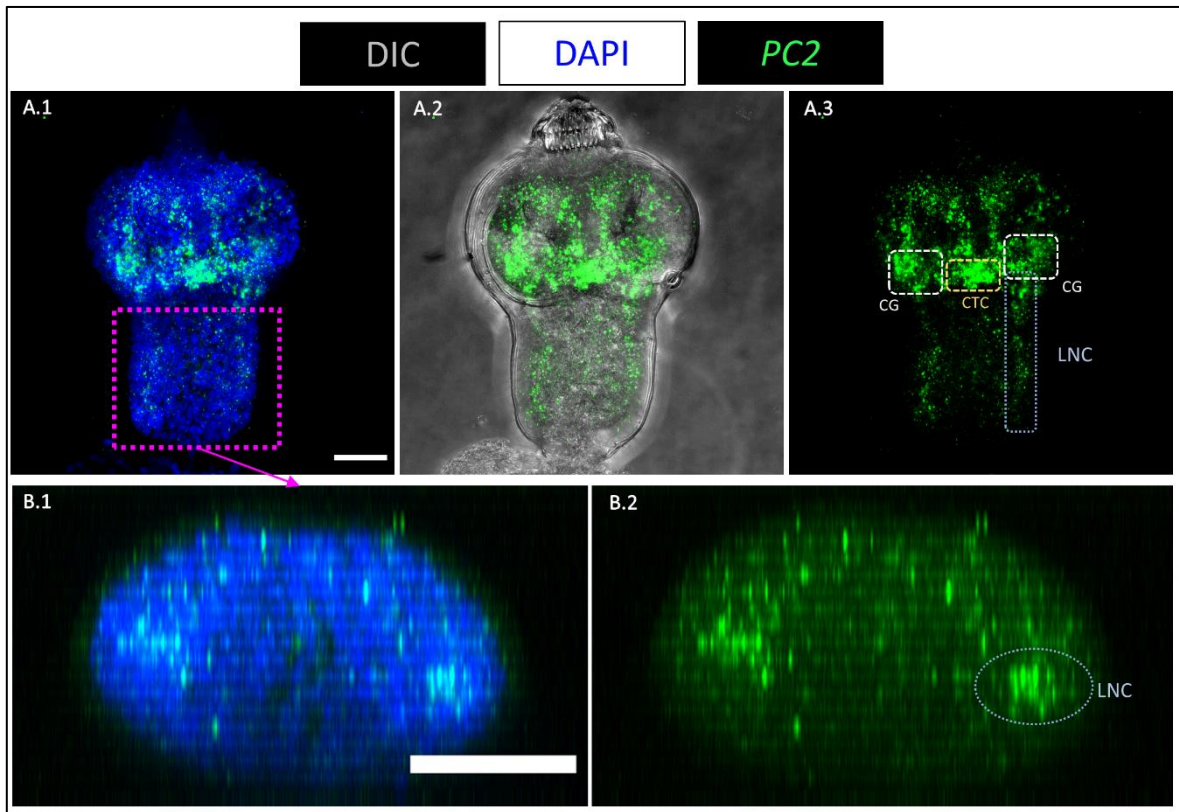
**Figura 5.18. Ensayos con neuropéptidos sobre la motilidad de oncóferas activadas.** gráficas de puntos con la cantidad de cpm tomadas para: **A**, Npp-2Inv vs Npp-2 ambos a una concentración de 100  $\mu$ M; **B**, Npp-2Inv vs Npp-33 ambos a una concentración de 100  $\mu$ M; **C**, Npp-2Inv vs Npp-38 ambos a una concentración de 100  $\mu$ M; **D**, DMSO 1% vs Npp-46 a una concentración de 100  $\mu$ M. Se muestran las medianas y los intercuartiles representados con barras en A. Test estadístico Mann-Whitney two-tailed test: ns = no significativo.

En definitiva, se logró poner a punto un método estandarizado de activación de oncóferas, que permite estudiar su motilidad mediante los movimientos cíclicos que estas generan. Gracias a estos métodos estandarizados, se logró detectar por primera vez efectos sobre la motilidad de oncóferas por parte de drogas que afectan vías de segundos mensajeros, las cuales son las vías que utilizan mayoritariamente los neuropéptidos para ejercer cambios sobre sus células blanco. Los resultados obtenidos para PKA no son del todo concluyentes, teniendo únicamente un efecto fuerte con el inhibidor de PKA H-89 y un efecto leve con la combinación de los activadores de la vía FSK e IBMX. Para la vía de PKC los resultados fueron más coherentes, encontrando un efecto inhibitorio de la motilidad con todas las drogas probadas para esta vía, aunque se observó un efecto inhibitorio también para el activador de la vía, PMA, lo cual podría deberse a un efecto tóxico del mismo. También se observó un efecto al utilizar Bafilomicina, lo que podría indicar un rol de neurotransmisores clásicos en este movimiento cíclico de las oncóferas activadas. Se amplía la interpretación de estos resultados en la sección de discusión del trabajo.

## **Capítulo 6. Resultados obtenidos para metacestodos: cisticercoides de *Hymenolepis microstoma* y tetratiridios de *Mesocestoides corti*.**

### **6.1 Expresión de *pc2* en cisticercoides activados de *H. microstoma*.**

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos a partir del trabajo con cisticercoides, buscando la presencia de sistemas neuropeptidérgicos en este estadio como se mostró previamente para adultos y oncósferas. Se utilizó nuevamente al marcador general de estos sistemas neuropeptidérgicos, *pc2*. Se activó a los cisticercoides (con una metodología optimizada en este trabajo, y que se comentará posteriormente), permitiendo que salgan de la cápsula en la que se encuentran enquistados y liberen al escólex. Sobre estos escólices desenquistados se procedió a realizar WMISH, ya que esta técnica sería imposible de realizar *in toto* en el organismo enquistado. En la **Figura 6.1** se muestran los resultados de WMISH para *pc2* en un cisticercoide activado, en donde se ve claramente señal para este gen alrededor de las ventosas, en los LNC en los CG y en la CTC. Este patrón recuerda al observado en el adulto, aunque no se evidencia la presencia de células endócrinas unicelulares (CEU) por debajo del CTC, tal vez porque estas aparecen posteriormente en el desarrollo de la estróbila.



**Figura 6.1. Detección de la expresión de *pc2* en cisticercoides activados de *H. microstoma* mediante WMISH.** Se observan a los resultados de la WMISH en verde, DIC en escala de grises y a los núcleos teñidos con DAPI en azul. **A:** proyecciones en Z de los resultados de la WMISH sobre un cisticercoides activado; **B:** proyecciones transversales de la zona marcada en magenta en A.1. CG: ganglio cerebral; LNC: Cordón Nervioso Lateral. Barras de escala: 20  $\mu\text{m}$ .

## 6.2 Optimización del cultivo *in vitro* de cisticercoides de *H. microstoma*.

### 6.2.1 Optimización del protocolo de activación de cisticercoides.

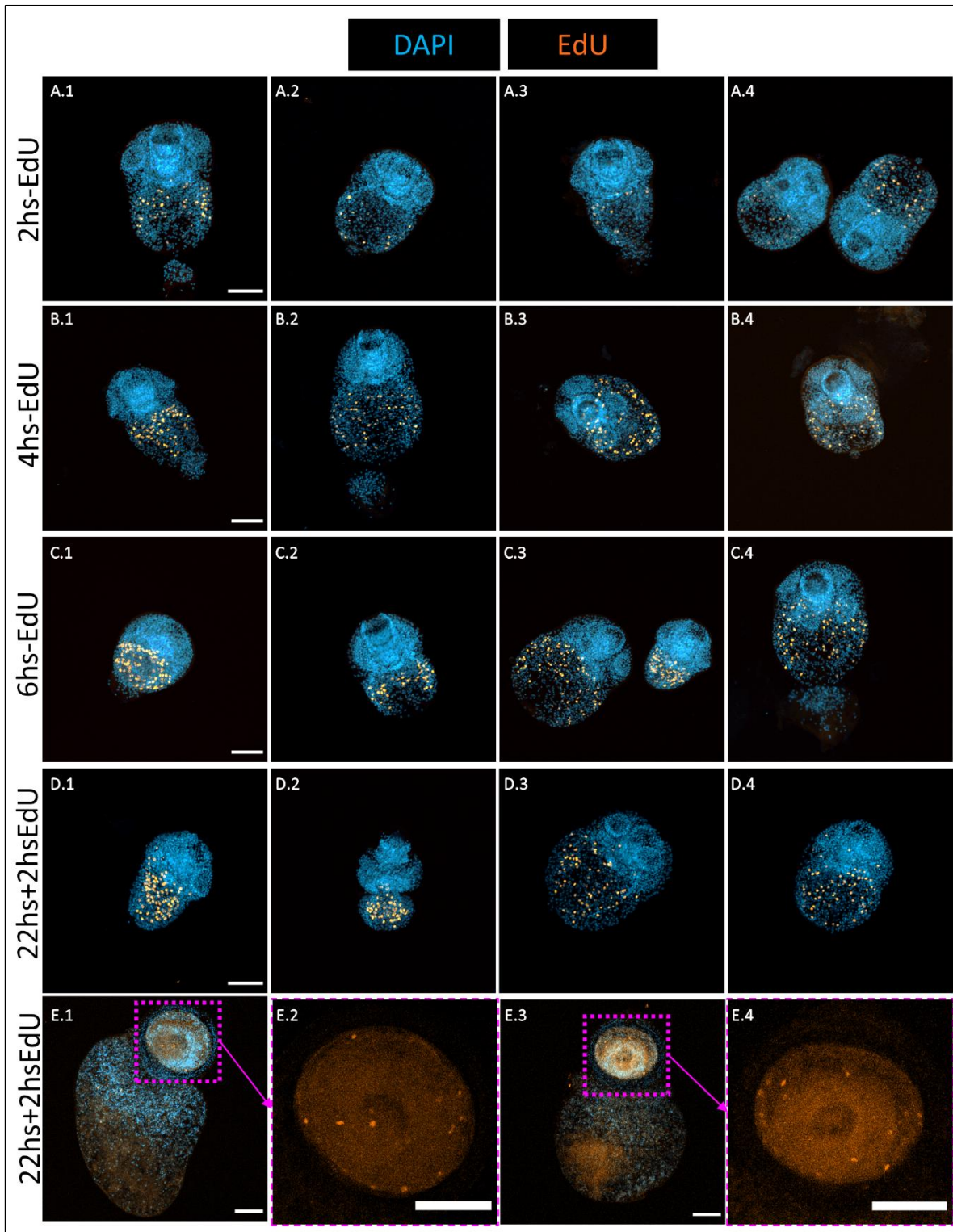
El primer paso para el cultivo de cisticercoides es su activación, para esto es necesario la imitación de las condiciones a las que es expuesta la larva enquistada al ser ingerida en el hospedero definitivo, teniendo como resultado la liberación del escólex y el inicio de motilidad en el mismo. Por esta razón el primer paso de esta parte del trabajo fue la puesta a punto de un protocolo eficaz para su activación. En este sentido optimizamos un protocolo de activación, basándonos en lo descrito previamente en la bibliografía [304]. Logramos la activación de hasta el 100% en algunos casos. Los cisticercoides son obtenidos por disección de escarabajos con más de 2 semanas de infección. Como se muestra en materiales y métodos (y más en detalle en los apéndices finales de este trabajo), se utilizó un protocolo que consiste en el uso de pepsina y pH ácido en primera instancia, seguido por un paso de incubación en presencia de tripsina y sales biliares. A partir de la estandarización

de este protocolo, se procedió a optimizar a la metodología de cultivo *in vitro* para estas larvas activadas.

### 6.2.2 Optimización de la metodología de cultivo de cisticercoides

En primera instancia se indagó si los cisticercoides presentaban proliferación celular tras ser activados, bajo condiciones estándar de cultivo celular para células de mamífero, utilizando medio RPMI, junto a 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibiótico/antimicótico 1%, a 37°C y con una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Para responder a esto lo que se hizo fue marcar a los cisticercoides activados con el análogo de timidina EdU, con el objetivo de marcar a las células que estuvieran en fase S. Los resultados obtenidos de los experimentos de cultivos de estos cisticercoides con EdU se muestran en la **Figura 6.2**, también se contó la cantidad de células EdU presentes en cada condición analizada, resultados que se muestran en la **Figura 6.3**.

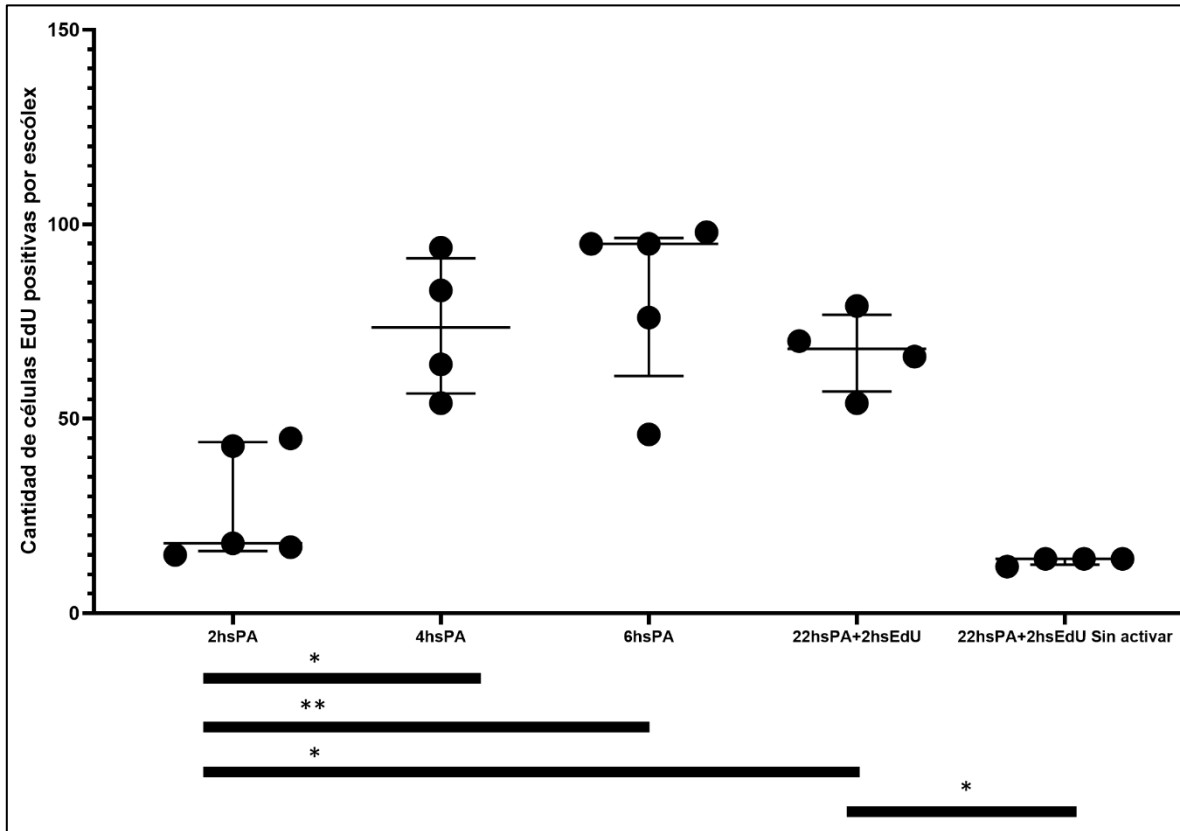
Los cisticercoides fueron cultivados durante 2, 4 y 6 horas con EdU luego de la activación, con el fin de evidenciar si en estos tiempos los mismos comenzaban a tener células proliferantes bajo estas condiciones. Encontramos que la proliferación celular comienza rápidamente bajo estas condiciones, ya que a las dos horas de cultivo los cisticercoides activados incorporan EdU. A su vez, los cisticercoides incubados con EdU durante 4 y 6 horas evidenciaron la presencia de más células EdU positivas, por lo que los cisticercoides activados van aumentando la cantidad de células proliferantes que pasan por fase S a lo largo del cultivo. Por otro lado, se cultivaron cisticercoides activados durante 22 horas bajo estas condiciones de cultivo celular sin EdU, para luego cultivarlos 2 horas más en presencia de EdU, para evidenciar si luego de este tiempo en cultivo los mismos seguían manteniendo células proliferantes, y en paralelo se cultivaron cisticercoides sin activar, para observar su patrón de proliferación en la región del escólex y determinar si la proliferación observada en cultivo era dependiente del proceso de activación. Observamos que los cisticercoides activados que estuvieron en cultivo durante un día en estas condiciones presentaban mayor cantidad de células EdU positivas que los cisticercoides inmediatamente activados. Los cisticercoides sin activar que estuvieron un día en cultivo, sin embargo, mostraron niveles muy bajos de proliferación celular, lo que sugiere que el aumento de la cantidad de células proliferantes con el paso del tiempo es un proceso dependiente de la activación. Como control negativo se cultivaron cisticercoides activados y sin activar a los que no se les añadió EdU al medio de cultivo en ningún momento. Estos controles no presentaron ninguna marca fluorescente asociada al pasar por el protocolo de revelado de este marcador metabólico.



**Figura 6.2. Incorporación de EdU en cistercoides bajo condiciones estándar de cultivo celular.** Se muestran proyecciones en Z de cistercoides en cultivo, con la señal de EdU en Naranja y la tinción nuclear con DAPI en azul/cian. Cultivos de cistercoides con medio RPMI, 10% SFB y 1% antibiótico-antimicótico, a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. **A:** cistercoides activados, incubados con EdU 10 μM en el medio de cultivo durante 2 horas. **B:** cistercoides activados, incubados con EdU 10 μM en el medio de cultivo durante 4 horas. **C:** cistercoides



activados, incubados con EdU 10  $\mu\text{M}$  en el medio de cultivo durante 6 horas. **D:** cisticercoides activados, incubados con EdU 10  $\mu\text{M}$  en el medio de cultivo durante 2 horas, luego de estar 22 horas en cultivo. **E:** cisticercoides sin activar con EdU 10  $\mu\text{M}$  en el medio de cultivo durante 2 horas, luego de estar 22 horas en cultivo, en E.2 y E.4 se muestran aumentadas las regiones marcadas con magenta en E.1 y E.3 respectivamente, para evidenciar mejor a las células EdU positivas en el escólex. Barras de escala 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 6.3. Cuantificación de células EdU+ en cisticercoides bajo condiciones estándar de cultivo celular.** Se muestran gráficas de puntos con cada punto representando la cantidad de células EdU positivas detectadas en cada escólex activado en cada condición. Las primeras 3 condiciones se mantuvieron con EdU durante el transcurso de ese tiempo, esto quiere decir que estuvieron expuestos a EdU durante 2, 4 y 6 horas postactivación (PA), mostrando que a las 2 horas PA ya existen células proliferantes en fase S en los cisticercoides activados, al pasar el tiempo más células pasarán por fase S, o las células que incorporaron poco EdU (insuficiente por ejemplo como para ser detectado a las 2 horas) continuaron incrementando la cantidad de EdU incorporado y ahora son detectables. En las últimas dos condiciones, los cisticercoides tanto activados como sin activar, fueron expuestos a EdU durante 2 horas luego de estar 22 horas en cultivo. Se ve un aumento de la cantidad de células en fase S luego de estar este tiempo en cultivo en comparación con los cisticercoides recién activados, y este aumento de células EdU positivas parece ser dependiente de la activación. Se muestran las medianas y los intercuartiles representados con barras. Test estadístico Mann-Whitney two-tailed test: \* = P value < 0,05; \*\* = P value < 0,01.

Luego de comprobar que los cisticercoides presentan proliferación celular en condiciones estándar de cultivo, se buscó el mejor método de cultivo para que estos crecieran y se desarrollaran como adultos *in vitro*. Con este objetivo se probaron diferentes

medios bifásicos de cultivo, ya que se ha visto que esto puede favorecer el desarrollo hacia el estadio adulto desde el metacestodo activado en *Hymenolepis spp* [11,25] y en otros cestodos como en *E. granulosus* [305,306]. Sin embargo, intentos recientes por replicar estas condiciones clásicas de cultivo de cestodos no han sido exitosas, por ejemplo en el caso de *H. microstoma*, en donde los cisticercoides activados no crecieron tanto como en la bibliografía clásica y tampoco generaron segmentos [22]. Los medios testeados en este trabajo se muestran en la **Tabla 6.1**. En la **Figura 6.4** se muestran los resultados de estos experimentos, estimando el crecimiento de los cisticercoides midiendo su largo (**Figura 6.4, A**) junto a fotografías representativas de los cisticercoides a lo largo de los días (tiempo 0, 4 y 11 días, **Figura 6.4, B-D**). En estos experimentos, se determinó que la condición de cultivo que permitió el mayor crecimiento, sin alteraciones morfológicas, y con menor mortalidad, fue la condición 3. Si bien el último punto de la Figura 6.4 A marca que en la condición 2 los cisticercoides son un poco más largos, en este experimento en particular sólo un cisticercoide en esta condición sobrevivió a esta cantidad de días y el mismo tenía serias aberraciones morfológicas (**Figura 6.4, C.3**). Es llamativo que en la bibliografía se reporta a los 12 días un crecimiento de 11 mm, lo cual es 20 veces más que lo que aquí logramos bajo condiciones similares [25]. A partir de los resultados aquí obtenidos, definimos que tener una base de Agar Triptona fue sumamente importante para el crecimiento de los cisticercoides, ya que la condición 1 no tiene base de agar y no se observó crecimiento a lo largo de los días. A su vez, la presencia de sangre en la base de agar parece evitar aberraciones morfológicas y mortalidad de las larvas en cultivo. Realizamos la exposición a EdU en las 2 horas previas a finalizar el cultivo, y detectamos que los cisticercoides bajo la Condición 3 mantienen células que continúan proliferando luego de 11 días en cultivo *in vitro* (**Figura 6.5**). Definimos entonces, a la “Condición 3” como el método de cultivo estándar para los siguientes experimentos que se describen en esta sección.

Más allá de que los cisticercoides crecieron y se mantuvieron proliferando, no se logró detectar que los mismos comenzaran a segmentar. Se buscó que los cisticercoides segmentaran utilizando otras alternativas de cultivo. Se utilizó un mayor porcentaje de sangre en la base de agar en algunos casos y se co-cultivó con células Caco-2. Se llegó a tener cultivos de hasta 24 días, alcanzando tamaños cercanos a 600  $\mu\text{m}$ , pero sin observar segmentación en ninguno de ellos. En definitiva, no se obtuvieron mejores resultados que con la condición 3 que se describe en la **Tabla 6.1**.

	<b>Medio</b>	<b>Base</b>
<b>Condición 1</b>	RPMI, 30% SFB, 1% AntiAnti, Hemina 0,15 $\mu$ m, 0,1% Taurocolato.	Sin base.
<b>Condición 2</b>	RPMI, 30% SFB, 1% AntiAnti, Hemina 0,15 $\mu$ m, 0,1% Taurocolato.	Base de Agar Triptona
<b>Condición 3</b>	RPMI, 30% SFB, 1% AntiAnti, Hemina 0,15 $\mu$ m, 0,1% Taurocolato.	Base de Agar Triptona + 5% Sangre Ovina

**Tabla 6.1. Medios bifásicos de cultivo que se probaron en cultivos de cisticercoides activados.** Todas las condiciones fueron probadas a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%.

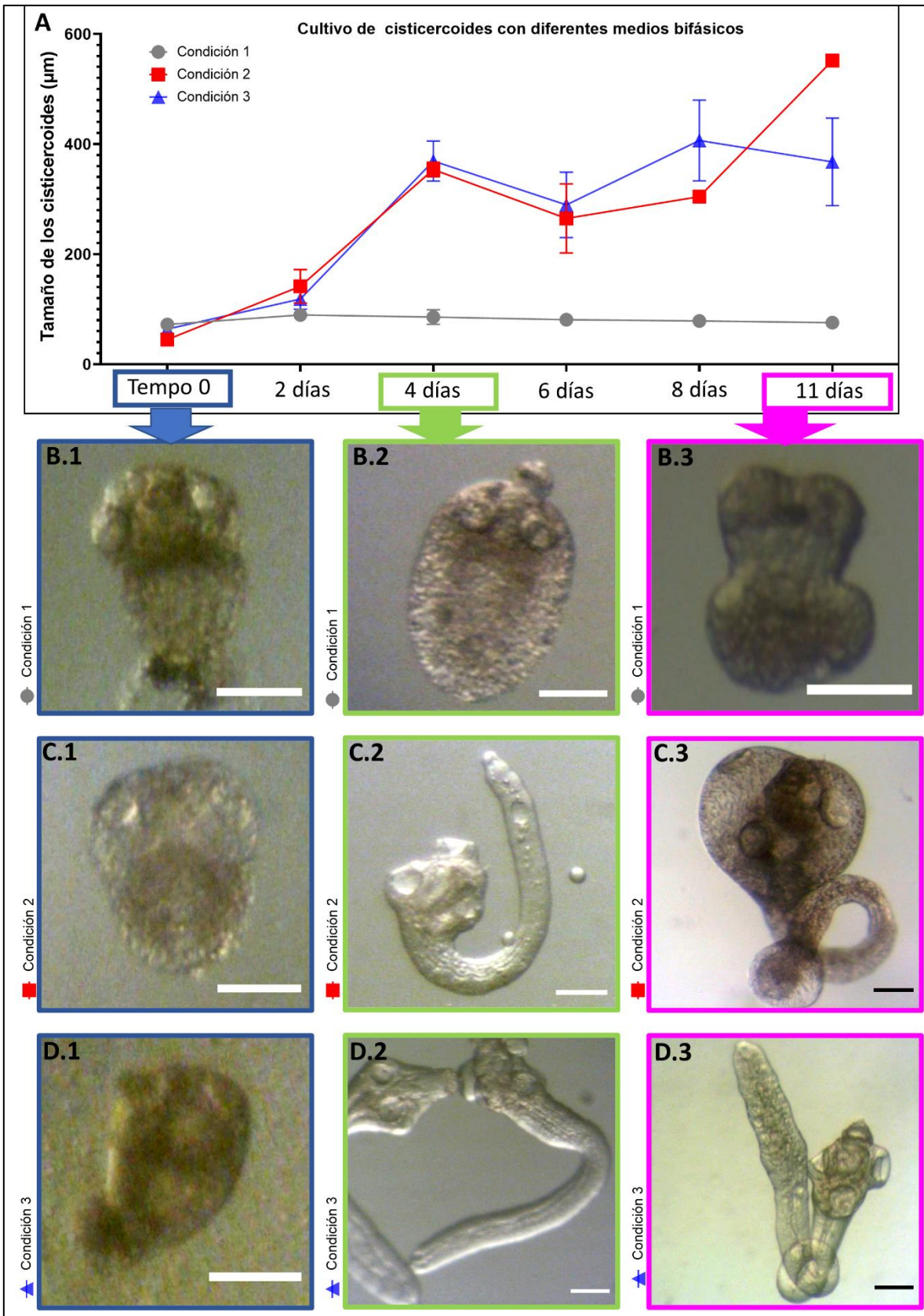
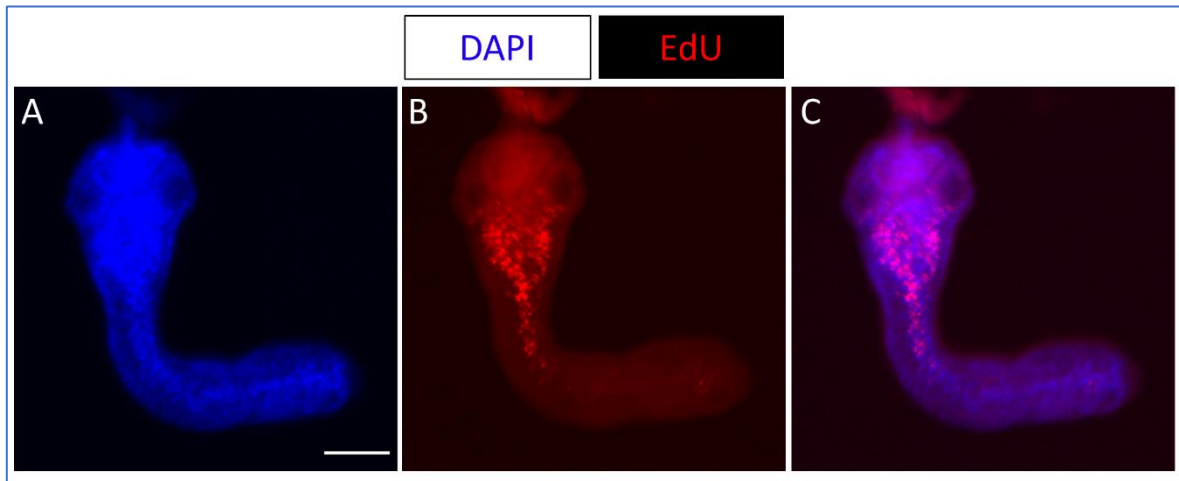


Figura 6.4. Crecimiento de cisticercoides activados con diferentes medios de cultivo bifásicos. Se utilizaron

tres condiciones de cultivo diferentes, descritas en la **Tabla 6.1**. **A**: largo de los cisticercoides en cultivo a lo largo de los días para las diferentes condiciones. De **B-D** se muestran micrografías de microscopía de campo claro representativas del estado general de los cisticercoides a tiempo 0 (B.1, C.1 y D.1), 4 días (B.2, C.2 y D.2) y 11 días (B.3, C.3 y D.3) de cultivo *in vitro* bajo las condiciones: 1 (B), 2(C) y 3(D). Nótese el poco crecimiento observado en la condición 1 y las aberraciones morfológicas a los 11 días en la condición 2. En la gráfica (A) las barras de error son de SEM. Barras de escala de las fotografías: 50  $\mu$ m.



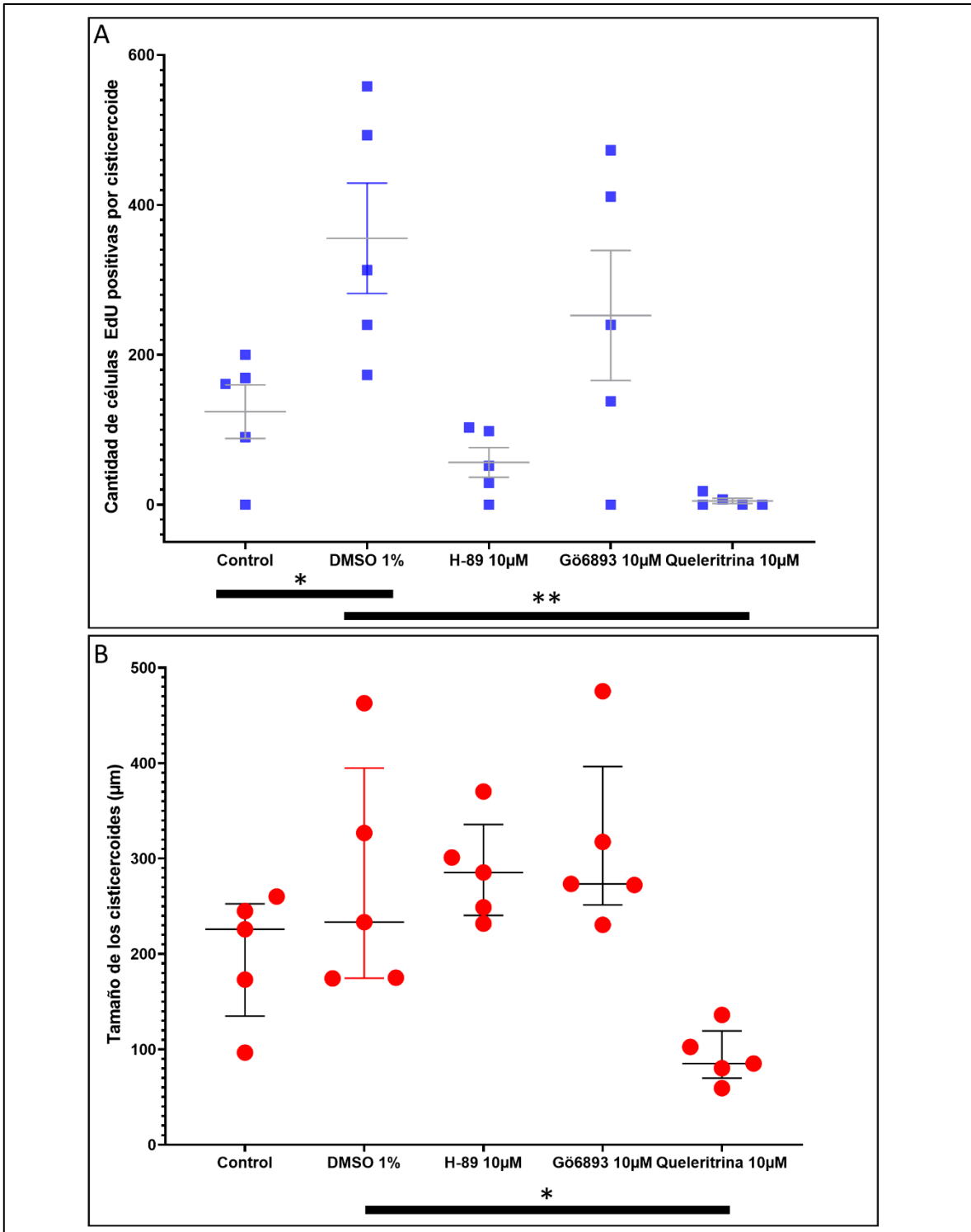
**Figura 6.5. Incorporación de EdU tras 11 días de cultivo.** Se muestra un cisticercoide que fue cultivado durante 11 días en la Condición 3 de la **Tabla 6.1**, el EdU fue añadido al medio de cultivo 2 horas antes de fijar al cisticercoide, a una concentración de 10  $\mu$ M. Se observa una fuerte señal de EdU en la zona proliferativa del cuello. Barra de escala 50  $\mu$ m.

### 6.3 Efecto de drogas para vías de segundos mensajeros sobre cisticercoides cultivados *in vitro*.

#### 6.3.1 Efecto de drogas que afectan las vías de activación de PKA y PKC sobre la proliferación celular y el crecimiento de cisticercoides cultivados *in vitro*.

Se cultivaron cisticercoides *in vitro* bajo la presencia de inhibidores de las vías de segundos mensajeros, para inferir su efecto sobre el crecimiento y la proliferación celular. Esto se llevó a cabo en un único experimento, por lo que estos son resultados preliminares. Utilizamos tres inhibidores que se mostraron previamente: H-89 (inhibidor de PKA, disuelto en agua, control sin solvente), Gö6983 y Queleritina (inhibidores de PKC, disueltos en DMSO, control con DMSO). Se cultivaron a los cisticercoides activados bajo la condición 3 de la **Tabla 6.1** durante 5 días, y se los marcó con EdU dos horas antes de fijarlos. Una vez finalizado el revelado del EdU se tomaron fotografías a lo largo del eje Z por escaneo en Microscopio Laser Confocal y se contaron la cantidad de células proliferantes y el largo de los cisticercoides. Estos resultados se muestran en la **Figura 6.6**. A partir de estos resultados queda claro que la Queleritina inhibe tanto el crecimiento como la proliferación celular de

los cisticercoides bajo estas condiciones, y que el DMSO parece estimular ambos. Que el DMSO tenga este efecto, es bastante llamativo, pero no es el primer efecto observado en cestodos por parte de este solvente orgánico, en *E. multilocularis* por ejemplo se ha visto que este compuesto en diferentes concentraciones afecta la evaginación y la motilidad de protoescólices de este organismo [307]. Finalmente, en la **Figura 6.6** se observa una buena correlación entre la cantidad de células EdU positivas y el crecimiento de los cisticercoides en todos los casos, aunque se puede ver con atención el caso de H-89, que más allá de no mostrar diferencias significativas con el control parece tener una tendencia a un bajo número de células proliferantes y a un aumento de tamaño similar al de DMSO.



**Figura 6.6. Cisticercoides en cultivo *in vitro* durante 5 días en presencia de inhibidores de PKA y PKC.** Se muestran los resultados del cultivo de cisticercoides activados bajo la presencia de H-89, Gö6983 y Queleritrina (inhibidor de PKA el primero y de PKC los otros dos) todos a una concentración de 10 µM en el medio de cultivo durante 5 días. **A:** cantidad de células EdU positivas detectadas en cada cisticercoide. **B:** tamaño de los cisticercoides. Se muestran las medianas y los intercuartiles representados con barras. Sólo se

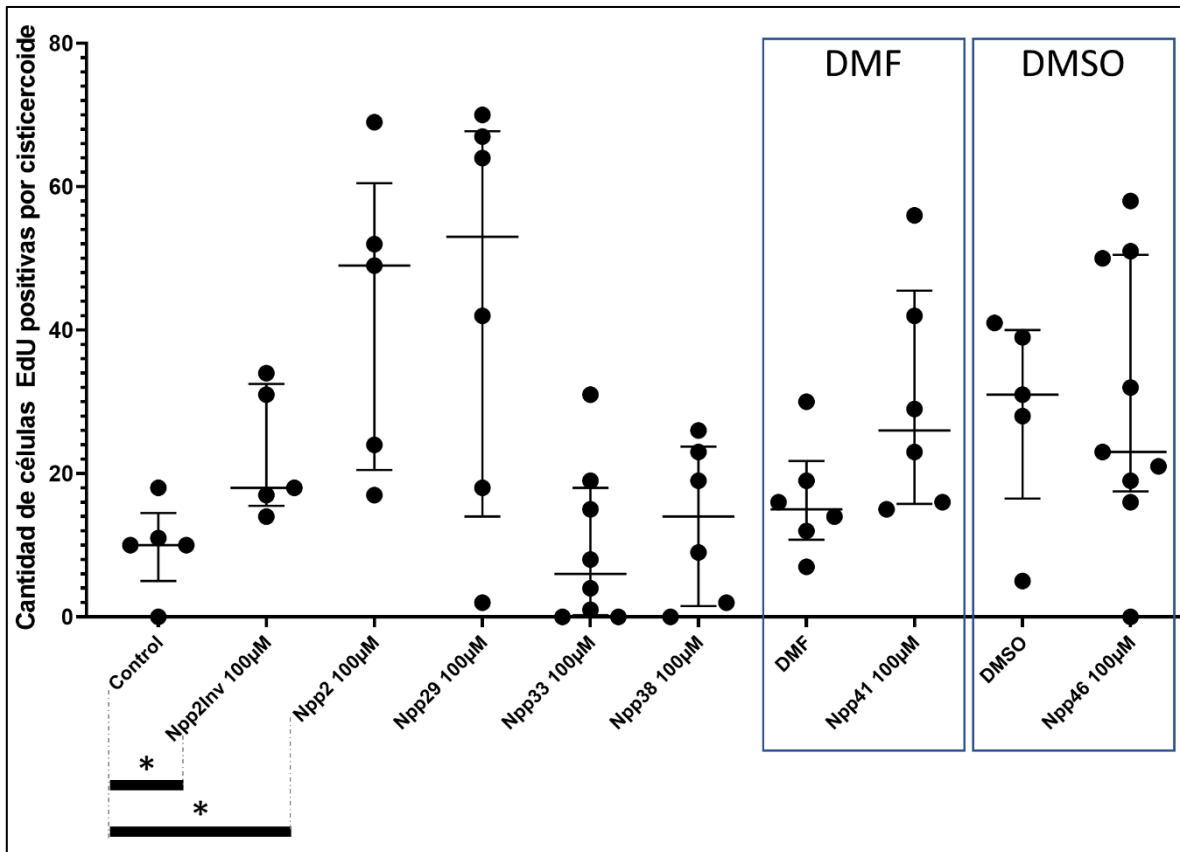
muestran los resultados de las comparaciones que mostraron diferencias significativas entre ellas, utilizando el test estadístico Mann-Whitney two-tailed test: \* = P value < 0,05; \*\* = P value < 0,01.

### 6.3.2 Efecto de neuropéptidos sobre la proliferación celular y el crecimiento de cisticercoides cultivados in vitro.

Se realizaron diferentes tipos de experimentos para evaluar el efecto de los neuropéptidos sobre la proliferación celular y el crecimiento de los cisticercoides cultivados *in vitro*. Básicamente se desarrollaron dos tipos de experimentos: a corto plazo (4 horas post activación) y a largo plazo (7 días de cultivo).

**Efecto de neuropéptidos en cultivos de 4 horas:** se testeó el efecto de neuropéptidos sobre cultivos de cisticercoides a corto plazo. Esto se llevó a cabo en un único experimento, por lo que se trata de resultados preliminares. Se llevó a cabo el protocolo de activación, con la presencia de neuropéptidos en todo momento en el medio a una concentración de 100  $\mu$ M (secuencias de los neuropéptidos en Materiales y Métodos, **Tabla M.3**). Se realizó la activación y posteriormente se dejó a los cisticercoides en medio RPMI con 10% SFB a 37°C con la presencia de cada neuropéptido durante 4 horas, agregándoles EdU al medio durante la última hora. Posteriormente se fijó a los cisticercoides y se reveló el EdU, y se cuantificó la cantidad de células marcadas en cada caso; los resultados se muestran en la **Figura 6.7**. Se puede observar que la condición control (sin el añadido de péptidos, ni solventes) reflejó diferencias significativas contra Npp-2Inv y Npp-2. La condición Npp-2Inv sólo mostró diferencias significativas contra la condición control. Si bien no reflejó diferencias significativas, es llamativo también el caso de Npp-29, que presenta a tres de los cisticercoides con más cantidad de células EdU positivas en este experimento. En los experimentos de incubación con Npp-41 y Npp-46 hay que tener en cuenta que Npp-41 está disuelto en DMF y Npp-46 en DMSO, y ninguno de estos neuropéptidos dio resultados significativos al compararlos con el solvente orgánico en el que están disueltos.

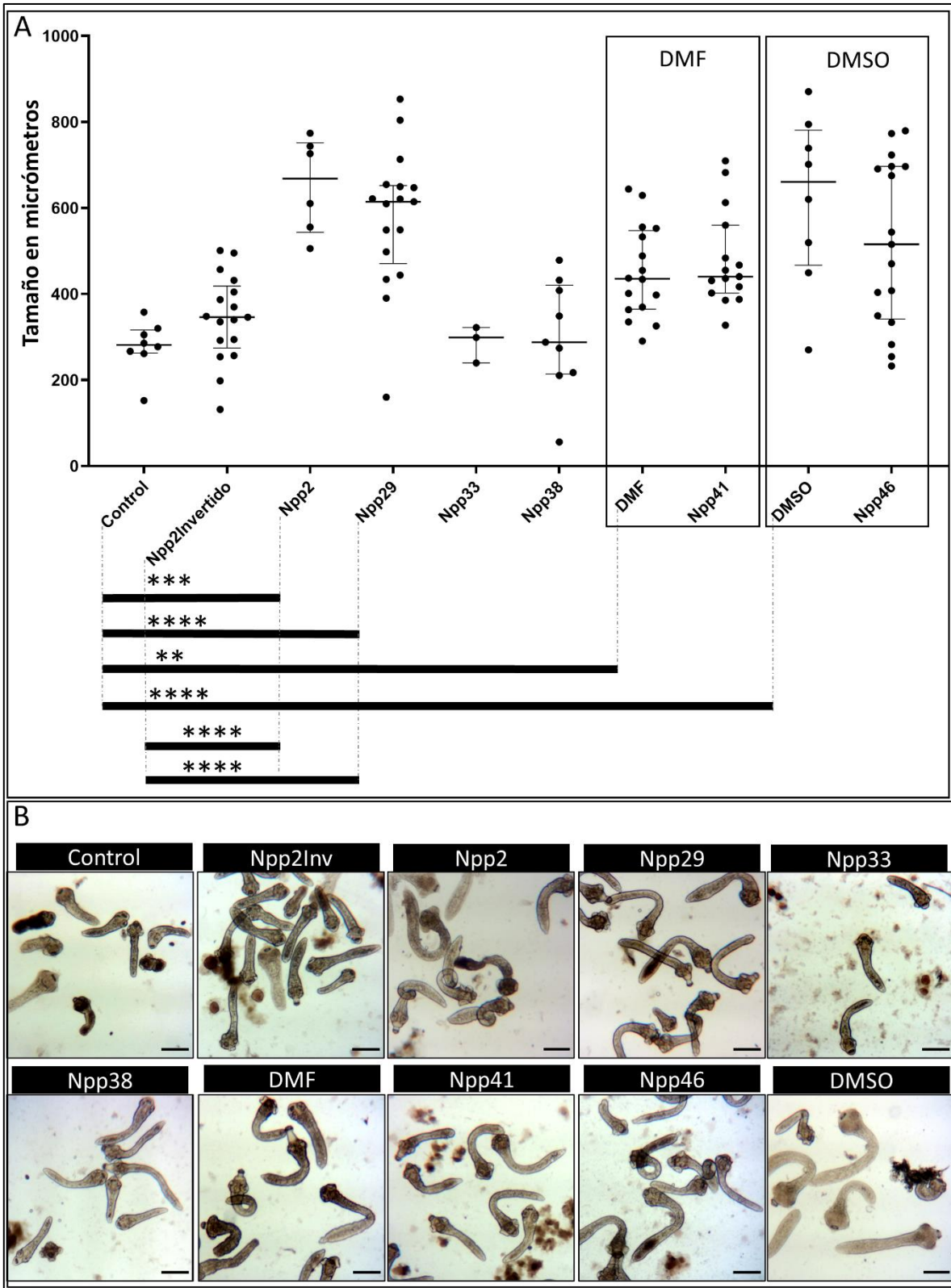




**Figura 6.7 Efecto de neuropéptidos sobre la proliferación de cisticercoides en cultivos *in vitro* de 4 horas.** Se cultivó a los cisticercoides durante 4 horas, incluyendo 1 hora final de exposición a EdU. Se muestra la cantidad de células EdU positivas, para cada cisticercoides, de un único experimento. Se realizaron comparaciones del Control contra todos los Neuropéptidos incluyendo el NPP-2Inv (no se comparó al control con los neuropéptidos Npp-41 y Npp-46, ya que están en solventes orgánicos y serían dos variables a comparar, se comparó a estos neuropéptidos contra los controles con solventes orgánicos únicamente, sin arrojar estos análisis diferencias significativas). Por otro lado, se realizaron comparaciones de los resultados entre: Npp-2Inv contra: Npp-2, Npp-29, Npp-33 y Npp-38; DMF contra Npp-41; DMSO contra Npp-46. Se muestran las medianas y los intercuartiles representados con barras en cada condición. Sólo se muestran los resultados de las comparaciones que mostraron diferencias significativas entre condiciones (“Control vs Npp-2Inv” y “Control vs Npp-2”). Se utilizó el test estadístico Mann-Whitney two-tailed test: \* = P value < 0,05.

**Efecto de neuropéptidos en cultivos de 7 días:** Se cultivaron cisticercoides activados en las condiciones de cultivo descritas previamente (**Condición 3, Tabla 6.1**) durante 7 días, en presencia de diferentes neuropéptidos a una concentración de 100 µM. Esto se llevó a cabo en un único experimento, por lo que se trata de resultados preliminares. Al finalizar el cultivo se midió a los cisticercoides en cada condición; los resultados se muestran en la **Figura 6.8**. En este experimento, se encuentran diferencias significativas para la situación control contra Npp-2 y contra Npp-29, así como contra los solventes orgánicos DMF y DMSO. No se encontraron diferencias significativas entre Npp-41 y Npp-46 con su correspondiente control de solvente orgánico (DMF y DMSO respectivamente). Por otro,

lado también se encontraron diferencias significativas entre el péptido control Npp-2Inv y los neuropéptidos Npp-2 y Npp-29. Si se observan los resultados obtenidos aquí y los obtenidos en el experimento a corto plazo de 4 horas (**Figura 6.7**) parece mantenerse una tendencia: Npp-2 y Npp-29 estimulando el crecimiento y la proliferación, Npp-33 y Npp-38 sin generar cambios, y Npp-41 junto a Npp-46 mostrando cambios en el crecimiento y en la proliferación pero que no parecen ser diferentes a los cambios generados por los solventes orgánicos en los que están disueltos estos dos neuropéptidos. Cabe destacar que bajo ninguna de estas condiciones se detectó que los cisticercoides comenzaran a segmentar.



**Figura 6.8. Efectos de neuropéptidos sobre el crecimiento de cisticercos cultivados por 7 días.** A: Se muestra el tamaño de cisticercos bajo la presencia de diferentes neuropéptidos, todos ellos utilizados a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  a lo largo de todo el cultivo, durante 7 días. Se realizaron comparaciones del

Control (sin péptido ni solvente) contra todos los Neuropeptidos incluyendo el NPP2Inv (no se comparó al control con los neuropeptidos Npp-41 y Npp-46, ya que están en solventes orgánicos y serían dos variables a comparar; se comparó contra los solventes orgánicos sin neuropeptidos, arrojando estos análisis diferencias significativas). Por otro lado, se realizaron comparaciones de los resultados entre: Npp-2Inv contra Npp-2, Npp-29, Npp-33 y Npp-38; DMF contra Npp-41; DMSO contra Npp-46. Se muestran las medianas y los intercuartiles representados con barras. Sólo se muestran los resultados de las comparaciones que mostraron diferencias significativas entre condiciones, utilizando el test estadístico Mann-Whitney two-tailed test: \* = P value < 0,05; \*\*\* < 0,001; P value \*\*\*\* = P value < 0,0001. **B:** Imágenes de los cisticercoides a los 7 días de cultivo bajo las diferentes condiciones. Barra de escala: 200  $\mu$ m.

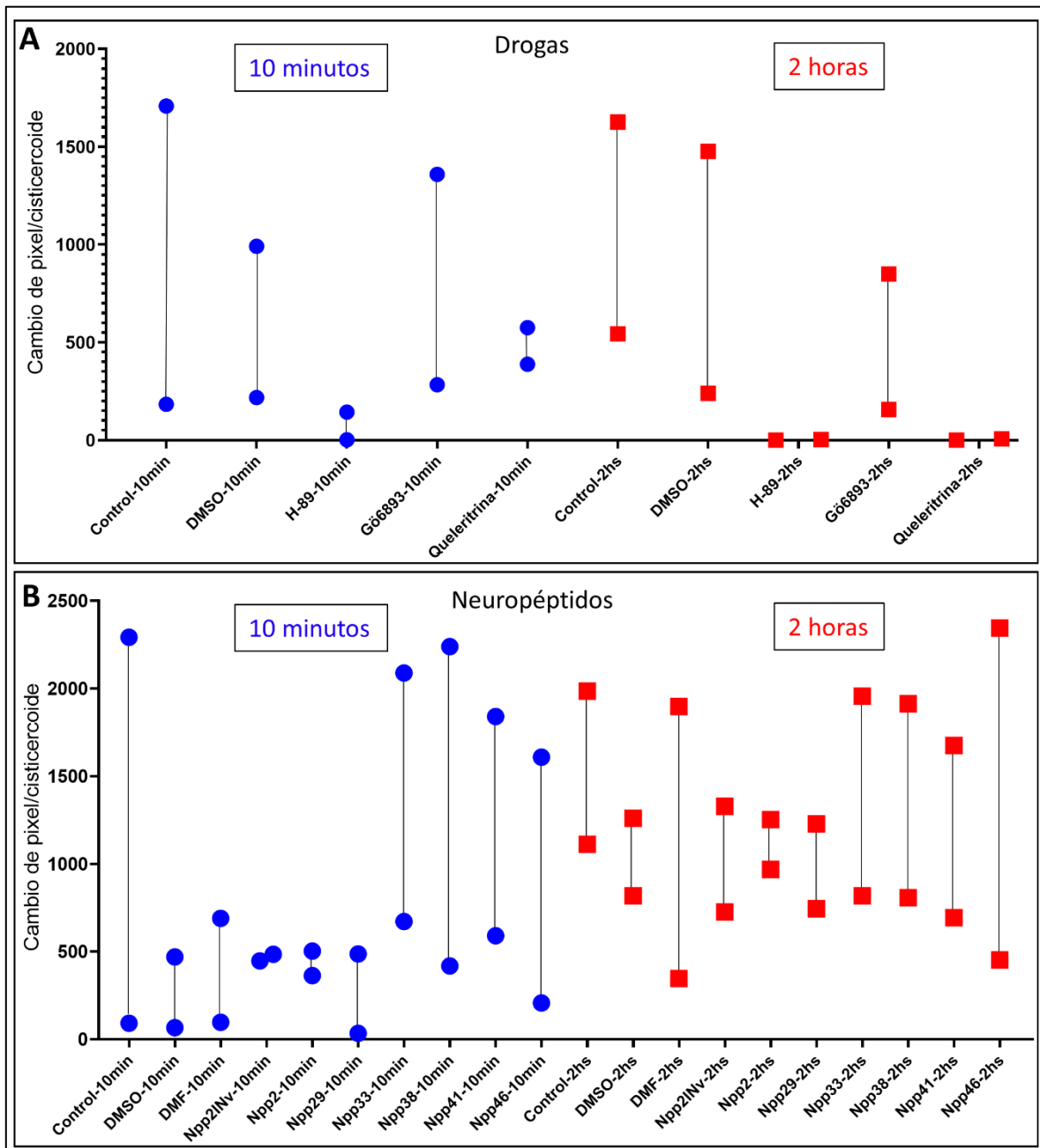
Estos resultados preliminares sugieren que Npp-2 y Npp-29 podrían estimular la proliferación celular y el crecimiento de los cisticercoides en condiciones de cultivo *in vitro*. Estos dos posibles efectos encontrados son claramente coherentes como parte de un mismo proceso global que podría ser la estimulación del crecimiento por medio del aumento de la proliferación celular. Sin embargo, estos resultados son preliminares, y se necesita un mayor número de réplicas para poder confirmar estos efectos observados.

#### **6.4 Ensayos de motilidad de cisticercoides de *H. microstoma*.**

Se realizaron ensayos de motilidad utilizando cisticercoides activados, mediante una metodología optimizada para protoescólices de *E. multilocularis* [307]. El movimiento se cuantificó a través de videos cortos, los cuales contenían varios cisticercoides activados en presencia de diferentes compuestos. La cantidad de movimiento se detectó en base a las diferencias entre un tiempo 0 y de 10 segundos, midiendo la cantidad de píxeles que cambiaban entre un tiempo y el otro, cuantos más píxeles cambiaran entre un tiempo y el otro, más movimiento detectado en esa condición (ver Materiales y Métodos y Apéndice 9 para más detalles). Se evaluó si la motilidad era afectada por la adición de neuropeptidos y de drogas para las vías de segundos mensajeros mediante esta metodología. No se encontraron diferencias estadísticas significativas por la gran variación y el número limitado de réplicas entre los experimentos, de todas formas, se puede observar algunas tendencias de cómo se ve afectada la motilidad frente a los diferentes compuestos como se muestra a continuación.

**Ensayos de motilidad de cisticercoides utilizando drogas:** se utilizaron los tres inhibidores que se mostraron previamente: H-89 (inhibidor PKA), Gö6983 y Queleritrina (inhibidores PKC). En la **Figura 6.9 A** se muestran los resultados para estos experimentos. Se puede observar una gran variabilidad entre las dos réplicas de estos experimentos, de todas formas, se visualiza un claro efecto inhibitor del movimiento producido tanto por H-89 como por Queleritrina tras 2 horas de incubación. Cabe destacar que el efecto inhibitor del movimiento de estos dos compuestos era fácilmente detectable al visualizar a los cisticercoides en el microscopio.

**Ensayos de motilidad de cisticercoides utilizando neuropéptidos:** se realizaron ensayos de motilidad con todos los neuropéptidos con los que contábamos utilizando cisticercoides activados (**Figura 6.9, B**). En las dos réplicas que se realizaron para estos experimentos no se detectaron grandes diferencias en la motilidad, al estar presentes los neuropéptidos a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  en el medio, sin embargo, está claro que se necesitarían más réplicas para poder afirmarlo con certeza.



**Figura 6.9. Ensayos de Motilidad de Cisticercoides frente a Drogas y Neuropéptidos.** Se observan los resultados de los ensayos de motilidad expresados en cambio de pixeles por cisticercoides utilizando videos

cortos de 10 segundos, con 2 réplicas por experimento, y cada una con 15 a 27 cisticercoides por condición. Se muestran los resultados para drogas en **A** y para neuropéptidos en **B**. En cada caso se muestran los resultados a los 10 minutos de agregado el compuesto (círculos Azules) y luego de 2 horas (cuadrados Rojos).

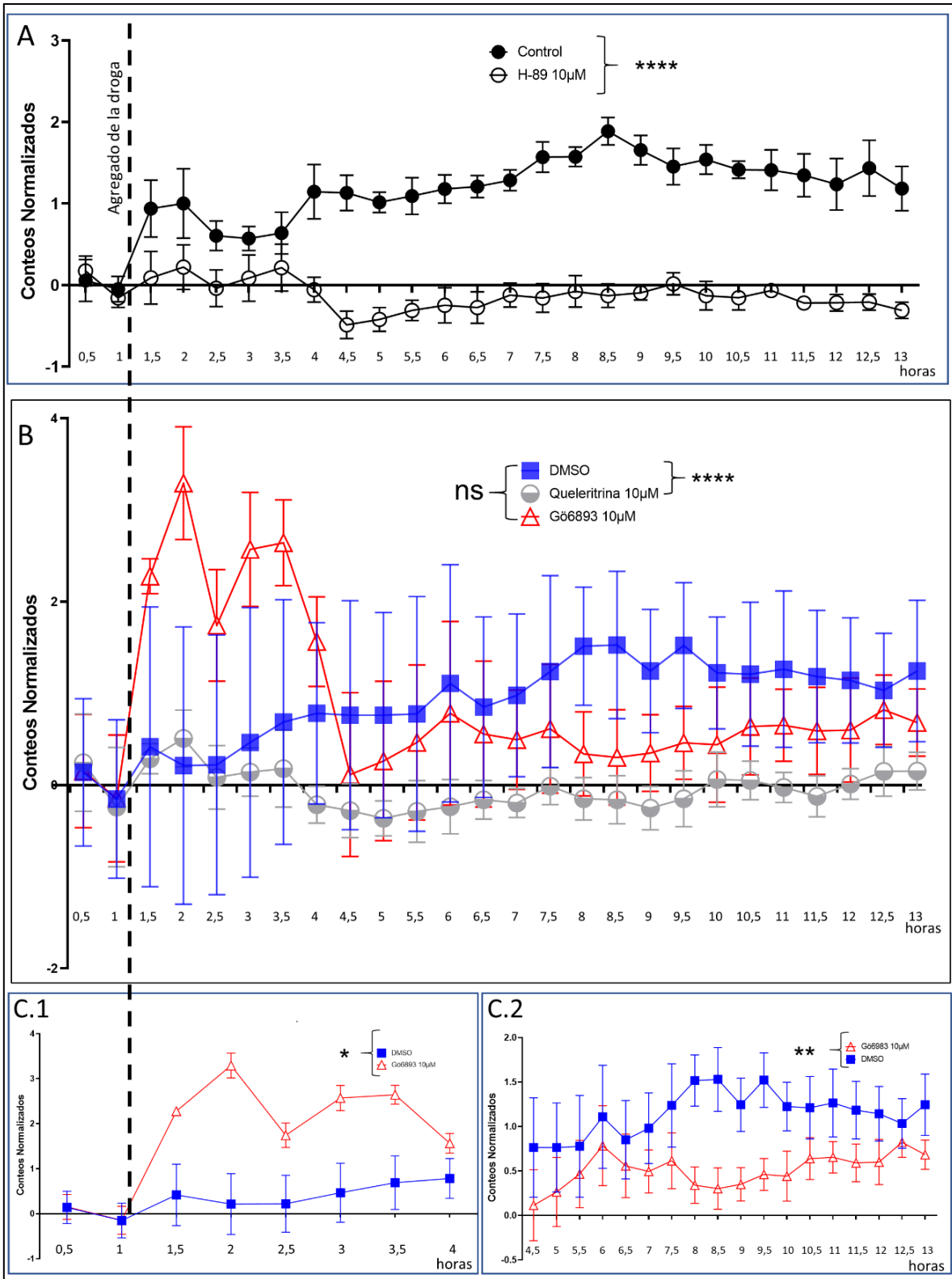
### 6.5 Ensayos de motilidad en tetratiridios de *Mesocestoides corti*.

Dada la gran variabilidad encontrada con los ensayos de cisticercoides, decidimos realizar adicionalmente ensayos con larvas tetratiridios de otra especie de cestodo, *Mesocestoides corti*, la cual ya ha sido utilizado para este tipo de experimentos [76,128,308]. Los tetratiridios de *M. corti* son fáciles de obtener en grandes cantidades, por lo que son ideales para realizar pruebas que requieran varias condiciones y una serie de réplicas biológicas como los que se emplearon en esta parte del trabajo. Se realizaron ensayos con drogas y con neuropéptidos sobre tetratiridios de *M. corti*, utilizando WMICROTRACKER ONE™, para inferir el efecto de los mismos sobre su motilidad a partir de los conteos (“counts”) que genera este dispositivo. Los experimentos se basan en el armado de pocillos en placas de 96, en las cuales se coloca la misma cantidad de tetratiridios y de medio. Estas placas son colocadas en el WMICROTRACKER ONE™ el cual genera conteos a partir de interrupciones que detecte en dos láseres que tiene por pocillo de la placa. En primera instancia se pone a los gusanos sin ningún compuesto a modo de habituación, los conteos generados en esta parte se utilizan para normalizar los datos, como se muestra posteriormente. Luego de este tiempo de habituación, se colocan los compuestos de interés y se observa la dinámica de los conteos a partir del agregado de los mismos. Los diferentes resultados obtenidos con esta metodología se muestran a continuación.

**Ensayos de motilidad tetratiridios utilizando drogas:** se utilizaron tres drogas que se mostraron previamente: H-89 (inhibidor de PKA), Gö6983 y Queleritina (inhibidores de PKC). Este experimento fue realizado una única vez, por cual los resultados mostrados son resultados preliminares. Los resultados para estos experimentos se muestran en la **Figura 6.10**, se muestra la dinámica de los conteos normalizados que genera el dispositivo para las diferentes condiciones, durante las primeras 13 horas (con la primera hora de habituación, previa al agregado de los compuestos). Las medidas se realizan cada media hora. Se puede observar que las diferentes condiciones se comportan de forma aproximadamente similar antes del agregado de las diferentes drogas (línea punteada en las gráficas), punto en el cual empiezan a verse diferencias. Se observa un claro efecto inhibitorio del movimiento dado por H-89 y Queleritina (al igual que fue observado en cisticercoides de *H. microstoma*), sin embargo, al realizar test estadísticos contra Gö6983 el test no dio significativo más allá de que la gráfica parece ser bastante diferente a la del control de DMSO para esta droga. Se evaluó si esto fue dado porque Gö6983 tiene una etapa en la que parece aumentar el movimiento (hasta las 4 horas) y otra que parece estar inhibido (de 4 a

las 13hs), con este objetivo se separaron estas etapas, encontrando que por separado se ven diferencias significativas de Gö6983 contra el control de DMSO (**Figura 6.11, C.1 y C.2**). Estos resultados sugieren un rol de las vías de segundos mensajeros de PKA y PKC en la motilidad de tetratiridios de *M. corti*.

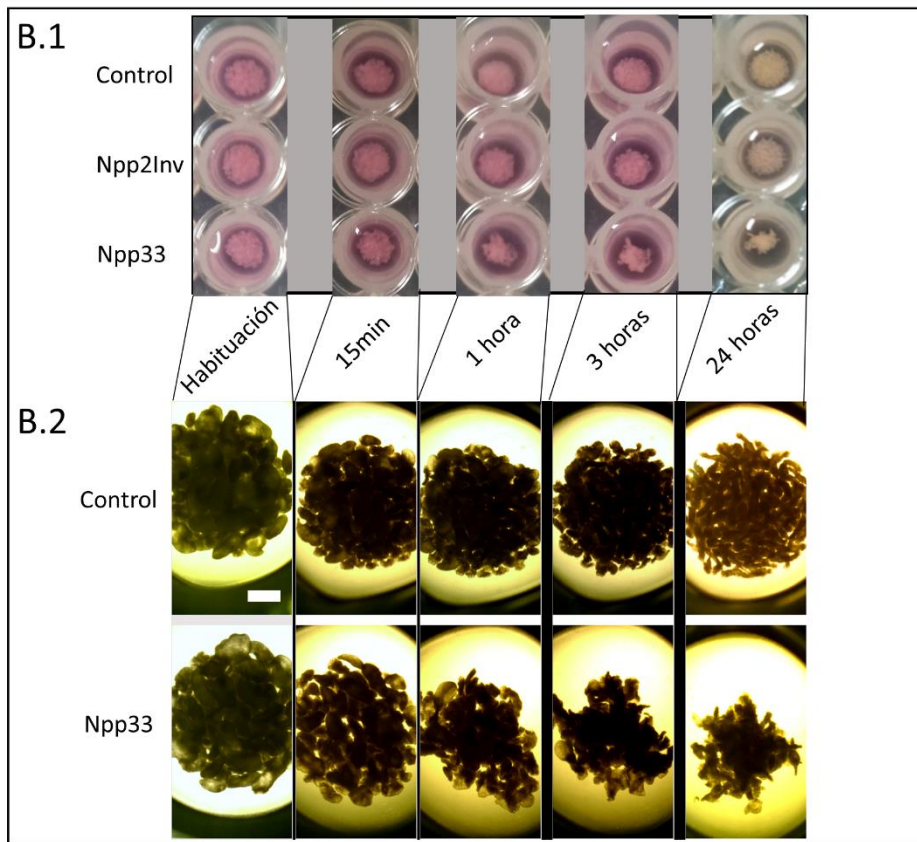
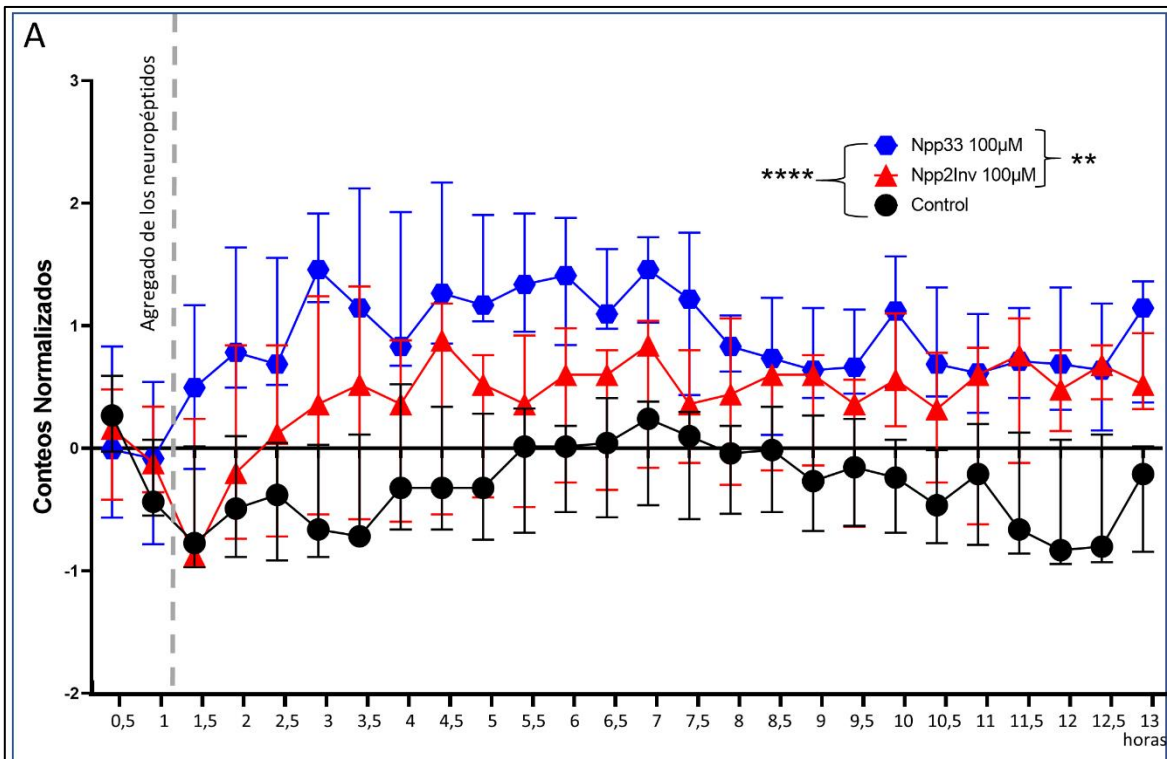
**Ensayos de motilidad de tetratiridios utilizando neuropéptidos:** se realizaron ensayos de motilidad utilizando al dispositivo WMICROTRACKER ONE™ con tetratiridios de *M. corti* utilizando a los neuropéptidos Npp-2, Npp-29 y Npp-33, junto al neuropéptido control Npp-2Inv, todos a una concentración de 100 µM. Estos neuropéptidos tienen la secuencia aminoacídica predicha *in silico* y/o detectada mediante peptidómica para *H. microstoma*, teniendo los mismos pequeñas variaciones de secuencia con los predichos para *M. corti* (por ejemplo, las dos secuencias predichas para Npp-33 entre estos dos organismos, varían únicamente por una metionina N terminal presente en *M. corti* (MTPYSSGGIFG) que no está presente en *H. microstoma* (TPYSSGGIFG)). Estos experimentos fueron realizados dos veces, por lo que se necesitaría repetirlos para confirmar los resultados. De todas formas, algunos resultados parecen ser bastante claros como veremos a continuación. De las pruebas realizadas sólo Npp-33 reflejó resultados robustos a través de estas pruebas, mientras que Npp-2 y Npp-29 tuvieron efectos menores, no replicables ni significativos en las diferentes réplicas de los experimentos. Los resultados para Npp-33 se muestran en la **Figura 6.11**, en la parte A de esta figura se muestran los resultados del dispositivo donde se ve un claro incremento de los conteos a partir del agregado de este neuropéptido, tanto si comparamos contra el control (sin agregado de péptido) como contra el Npp-2Inv, en otra repetición de este experimento se observó la misma tendencia de las gráficas aunque sin diferencias significativas entre Npp-33 y el control, pero si entre Npp-33 y Npp-2Inv, por lo que se necesitarían más réplicas para confirmar estos resultados de forma más robusta a partir de este método. Al finalizar los experimentos en el WMICROTRACKER ONE™ se observaron efectos macroscópicos en los pocillos donde fue agregado Npp-33 (**Figura 6.11, B.1**), encontrando a los tetratiridios de estos pocillos agrupados en el centro de la placa, y en algunos casos con un claro cambio de coloración del indicador de pH del medio entre los que tenían a este neuropéptido y las condiciones control, siendo más ácidos los pocillos en los que se agregó Npp-33. A partir de estas observaciones, se realizaron varias pruebas con tetratiridios agregándoles en el medio Npp-33 encontrando este efecto de agrupamiento en el centro de la placa en todas las repeticiones realizadas. En la parte **B** de la **Figura 6.11** se muestran estos resultados. Posteriormente, se realizaron pruebas con Npp-33 junto a H-89 (PKA), Gö6983 (PKC) y FSK+IBMX (PKA), intentando inferir a través de que vías de segundos mensajeros está actuando Npp-33 para producir este efecto de agrupamiento. Sin embargo, no tuvimos alteraciones al utilizar estas drogas, viéndose en todos los casos el efecto antes mencionado para Npp-33.



**Figura 6.10. Efectos de inhibidores de PKA y PKC sobre la motilidad de tetratiridios de *M. corti*.** Se muestran resultados obtenidos utilizando WMICROTRACKER ONE™. Cada punto corresponde a la mediana de 5 pocillos analizados en paralelo por el dispositivo, estas pruebas con drogas se realizaron una única vez. Todas las drogas se utilizaron a 10  $\mu$ m de concentración, las mismas se agregaron luego de la segunda medida que se



observa en las Figuras (luego de la primer hora), marcando el momento del agregado con línea punteada. **A:** resultados observados para H-89. **B:** Resultados obtenidos para Gö6983 y Queleritrina, contra DMSO como control. **C:** división de la dinámica observada para Gö6983 en las primeras 4 horas (C.1) y desde las 4,5 horas hasta las 13 horas (C.2). Se muestran las medianas y los intercuartiles representados con barras. Test estadístico Friedman-Dunn's multiple comparisons: \* = P value < 0,05; \*\* = P value < 0,01; \*\*\*\* = P value < 0,0001; ns = no significativo.



**Figura 6.11. Efectos de Npp-33 (homólogo de SIFamida de otros bilaterales) sobre tetratiridios de *M. corti*.** Se muestran resultados obtenidos utilizando WMICROTRACKER ONE™. Cada punto corresponde a la mediana de 5 pocillos analizados en paralelo por el dispositivo, estas pruebas se realizaron dos veces, obteniendo

resultados similares, mostrando aquí a uno de estos experimentos. El neuropéptido siempre se utilizó a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . **A:** resultados obtenidos por WMICROTRACKER ONE <sup>TM</sup>, se muestra la dinámica de la motilidad de los tetratiridios en una condición control con agua, Npp-2Inv (también a 100  $\mu\text{M}$ ) y Npp-33; el neuropéptido fue agregado al medio en donde se marca con la línea punteada, luego de la segunda medida (luego de la primera hora). Se muestran las medianas y los intercuartiles representados con barras. Test estadístico de Friedman-Dunn's multiple comparisons: \*\* = P value < 0,01; \*\*\*\* = P value < 0,0001. **B:** Se muestran fotos representativas tomadas a diferentes tiempos de los pocillos controles y con Npp-33 100  $\mu\text{m}$ , tomadas con una cámara sin aumento (**B.1**) y en lupa a bajo aumento (**B.2**), se muestra una de las réplicas que evidencia el efecto de agrupamiento en el centro del pocillo producido por Npp-33, barra de escala 1 mm.

## **Discusión y Perspectivas.**

### **- Identificación de componentes moleculares involucrados en la neurotransmisión en el genoma de *H. microstoma* y cestodos en general.**

El primer paso al inicio de este trabajo fue la identificación *in silico* de diferentes sistemas de comunicación nerviosa en el genoma de los cestodos, con especial énfasis en *H. microstoma*. Mediante análisis bioinformáticos realizamos la búsqueda e identificación de componentes moleculares que son utilizados para diferentes vías de neurotransmisión en otros organismos. Se identificó que muchos sistemas de neurotransmisión fueron perdidos en cestodos, estando presentes sólo algunos de los sistemas denominados clásicos y las vías de señalización peptidérgica. La pérdida de genes como adaptación al parasitismo no es sorprendente y ha sido reportada como una característica general de muchos genomas de platelmintos parásitos [20,134]. Algo a destacar es que las vías de neurotransmisión que parecen haberse perdido evolutivamente en cestodos perdieron a los componentes moleculares involucrados en todos los pasos del proceso de comunicación celular: proteínas de síntesis, transportadores vesiculares, receptores y recaptadores. La pérdida de todos los componentes moleculares, y no sólo de alguno de ellos, es una de las evidencias más fuertes de que estas vías están realmente ausentes en estos organismos.

Las vías de comunicación nerviosa que encontramos presentes en cestodos son las vías acetilcolinérgica, serotoninérgica, glutamatérgica y purinérgica, como así también las vías de señalización peptidérgica (las cuales son el foco de este trabajo). La identificación de los genes de neuropéptidos presentes es esencial para el estudio de las vías de comunicación peptidérgicas. Previamente, nuestro grupo detectó 39 genes de neuropéptidos por análisis *in silico* en el genoma de *H. microstoma* [79], los cuales se buscó validar en el presente trabajo mediante peptidómica, en colaboración con el laboratorio de la Dra. Temmerman. Gracias a los análisis peptidómicos realizados, se detectaron varios neuropéptidos que habían sido predichos *in silico* para *H. microstoma*. Más específicamente, 30 de los 39 precursores de neuropéptidos predichos fueron detectados en forma procesada en los análisis peptidómicos (77%), un porcentaje un poco por encima al obtenido por el grupo de la Dra. Temmerman para *C. elegans* con esta misma técnica en comparación a las predicciones *in silico* para este organismo [309]. Estos análisis en conjunto validan a los genes de neuropéptidos predichos *in silico* por nuestro grupo como tales. Por otro lado, la falta de detección de los 9 neuropéptidos restantes, no descarta a estos como verdaderos neuropéptidos ya que presentan algunas características que podrían explicar el por qué no fueron detectados. Muchos de estos neuropéptidos están entre los genes que tienen más baja expresión en adulto (*npp-20.2*, *npp-20.3.1*, *npp-20.3.2*, *npp-20.4*, *npp-38* y *npp-44.2*). Como se muestra en los resultados, dos de las muestras

utilizadas para estos análisis tenían segmentos grávidos con oncósferas en diferentes grados de desarrollo, y la mayoría de los genes no detectados, con baja expresión en adultos, también tienen baja expresión en oncósferas, a excepción de *npp-20.3.1* (aunque se sabe que no siempre se correlacionan exactamente la cantidad de ARNm expresado con la cantidad de proteína sintetizada [310]). Una explicación posible para la ausencia de detección por espectrometría de masa en el caso de *npp-20.3.1* se basa en que los valores obtenidos de los datos transcriptómicos son obtenidos de ARN de oncósferas en las últimas etapas de desarrollo, las cuales serán sólo una parte de las oncósferas presentes en los segmentos grávidos utilizados en los análisis peptidómicos, por lo que tal vez la cantidad de este neuropéptido no fue suficiente como para ser detectado en estos estudios. Dos de los *npp* no detectados tienen neuropéptidos maduros muy pequeños (*npp-2* y *npp-38*), lo cual típicamente impide su detección en métodos peptidómicos [282]. Esto probablemente también dificultó la detección de algunos neuropéptidos maduros que sí pudieron ser identificados por la detección de las regiones flanqueantes a los sitios dibásicos de corte. Las limitaciones de detección que genera el tamaño de estos péptidos son sugeridas por la detección, únicamente en algunos casos, de fragmentos aún con la glicina terminal sin procesar a un grupo amida terminal, o sin la remoción de los aminoácidos básicos carboxilo-terminales (*npp-6*, *npp-15.2*, *npp-43*). Otra posible explicación para la falta de detección de varios de estos neuropéptidos es la presencia de cisteínas en la cadena de aminoácidos, lo cual se ha reportado que genera inconvenientes para su detección por este tipo de técnicas [282]; *npp-41* y *npp-42* por ejemplo tienen cisteínas en la secuencia del neuropéptido maduro y ninguno de ellos fue detectado como tal, como así también la región flanqueante de *npp-2* (tampoco detectado). Por otro lado, los análisis peptidómicos permitieron encontrar posibles nuevos péptidos secretados. A partir de los genes que codifican para estos posibles nuevos péptidos, identificamos dos nuevos patrones de expresión por WMISH sumamente interesantes (*npp-49.1* y *npp-49.3*). Esto muestra la importante complementariedad de los análisis peptidómicos y las predicciones por bioinformática, ya que los análisis *in silico*, nos permiten detectar una gran cantidad de genes de neuropéptidos, aunque estas detecciones se encuentran limitadas a nuestro conocimiento acumulado de sus características comunes, como las de su procesamiento. En cambio, los análisis peptidómicos no dependen de nuestro conocimiento previo sobre el procesamiento de los neuropéptidos, permitiendo identificar genes de *npps* nuevos, no predichos *in silico*. Aunque los análisis peptidómicos también tienen sus limitaciones, por depender de las muestras analizadas, los solventes utilizados, el equipo de detección y las diferentes limitaciones que tienen las técnicas de espectrometría de masa en sí mismas para estas aproximaciones.

## - Expresión de vías de neurotransmisión clásicas y peptidérgicas en el ciclo de vida de *H. microstoma*.

En este trabajo evidenciamos el uso de diversas vías de neurotransmisión en el ciclo de vida de cestodos, utilizando a los tres estadios principales del ciclo de vida de *H. microstoma*, encontrando que son diferencialmente expresadas entre estadios. Esto lo demostramos mediante los datos transcriptómicos obtenidos por RNAseq, y por PCR semicuantitativa para las que fueron seleccionados genes clave de cada una de estas vías.

### *Adultos*

El estadio adulto es el que utilizaría la mayor cantidad de vías de neurotransmisión clásica presentes en el genoma, de acuerdo a la expresión de sus componentes. Esto no es sorprendente ya que este estadio es el que posee una mayor complejidad de tejidos diferenciados, y en particular del sistema neuromuscular, con una gran variedad de funciones. De nuestros datos se destaca que el adulto es el estadio en donde se utilizan las vías de serotonina y acetilcolina preferencialmente, con respecto a los otros estadios analizados. Para todas las vías de neurotransmisión clásica presentes en *H. microstoma* detectamos la expresión en adultos de: proteínas de síntesis, receptores, recaptadores y transportadores vesiculares. Realizamos WMISH en adultos a partir de marcadores moleculares seleccionados para cada vía, con el fin de detectar los tejidos en donde son utilizadas. Los resultados muestran una clara expresión de estos genes marcadores en el SNC de los adultos, lo cual era previsible. Las WMISH presentaron diferentes patrones de expresión dependiendo de la vía analizada, sugiriendo diversificación de sus funciones. Llamativamente, también se detectó la expresión de estos marcadores en células periféricas como células *vglut+* asociadas al primordio sexual en desarrollo, y expresión de *chat* y *tph* en células asociadas al poro genital, lo que sugiere funciones de estos sistemas de comunicación en órganos utilizados en la reproducción. En conjunto estos datos evidencian el amplio uso de estas vías de neurotransmisión clásica en el SN del adulto, y sugieren otros roles, en el desarrollo y/o regulación de los órganos asociados a la reproducción.

Por otro lado, indagamos en los sistemas de señalización neuropeptidérgicos. Los genes que se encuentran implicados comunmente en el procesamiento de neuropéptidos son expresados en los tres estadios principales del ciclo de vida de *H. microstoma*, poniendo en evidencia la importancia de los sistemas peptidérgicos en el ciclo de vida de los cestodos. Como marcador general de estos sistemas se utilizó a *pc2*. Las WMISH de *pc2* aquí realizadas muestran a este gen como el que mejor recapitula todos los componentes descritos del SNC de cestodos adultos. En forma similar, esta proteína también es un marcador general del SNC en la planaria *Dugesia japonica* [187], pero aquí es la primera vez que *pc2* es

utilizado como marcador general del sistema nervioso en cestodos. Detectamos la expresión de este gen en cisticercoides activados lo que demuestra la expresión temprana de estos sistemas de comunicación peptidérgica en el desarrollo del adulto. A su vez, detectamos células *pc2+* en otras regiones del adulto, como células individuales del cuello (a las que llamamos células endócrinas unicelulares) y en los órganos reproductores masculinos (fuerte expresión en la vesícula seminal externa) y femenino (dos o tres células cercanas a la glándula vitelina y al ovario), sugiriendo que los sistemas neuropeptidérgicos tienen otros roles por fuera del SNC en este estadio. La expresión de *pc2* en órganos sexuales no es algo exclusivo de cestodos, en la planaria *S. mediterranea* se ha descrito la expresión de esta enzima en órgano copulador y testes, junto a deficiencias en la producción de espermatozoides cuando la expresión de *pc2* es depletada [67]. La importancia de los sistemas peptidérgicos en órganos sexuales no es restringida a platelmintos ya que también se encuentra expresión de *pc2* en gónadas de otros lofotrocozoos [311] y también de vertebrados [312–314]. Luego de la detección de *pc2* por WMISH como marcador general de estos sistemas neuropeptidérgicos, analizamos a varios genes de neuropéptidos mediante esta técnica en adultos de *H. microstoma* con el fin de caracterizar su expresión en este estadio.

Detectamos por WMISH los patrones de expresión de 12 npps en adultos, encontrando diferentes patrones de expresión. En otros platelmintos parásitos como *Schistosoma mansoni* se han observado patrones muy diferentes de señal para neuropéptidos en su estadio adulto por medio de inmunodetección. Los patrones observados en *S. mansoni* van desde la expresión por parte de únicamente dos neuronas cerebrales para Npp-1, la expresión específica en el SN periférico por parte de Npp-5 inervando a la musculatura, o la expresión extendida en SNC y SN periférico por parte de un homólogo de NPF [77]. Todos los npps que detectamos por WMISH y que se habían encontrado previamente *in silico*, mostraron su expresión en el SNC de los adultos, como se esquematiza en la **Figura 4.12**. Un aspecto novedoso es que evidenciamos por primera vez diferencias de expresión génica en el SNC dorsal y ventral en cestodos, demostrando complejidad y heterogeneidad en términos de expresión génica, y evidenciando que los cordones nerviosos no son idénticos. A continuación, pasamos a discutir los resultados obtenidos para cada uno de los genes de npp.

El gen de *npp-2* es expresado ampliamente en el SN del adulto, en los ganglios cerebrales, la comisura cerebral transversal, el ganglio rostral, los cordones nerviosos laterales, los cordones nerviosos mediales dorsales y ventrales, y en las fibras nerviosas transversales dorsales. Es llamativo que el patrón observado para este neuropéptido en adultos de *H. microstoma*, difiere fuertemente al observado para su ortólogo en protoescólices de *E. multilocularis*, en donde su expresión estaba localizada en células del

anillo nervioso de las ventosas, y en una célula en cada comisura que une los ganglios rostrales del escólex, sin expresión en los cordones nerviosos laterales [79]. Esto puede deberse a que la comparación de estos patrones de señal no está dada entre exactamente los mismos estadios del ciclo de vida. El estadio homólogo de los protoescólices de *E. multilocularis*, serían los cisticercoides activados de *H. microstoma*, en los que no se realizó WMISH en este trabajo para este gen. Sería muy interesante determinar si se repite el mismo patrón de expresión en cisticercoides o si cambia en el desarrollo, sugiriendo un cambio en la función de estos sistemas entre estas etapas. Otro punto de interés de este npp, es que muestra una expresión desigual en el sistema nervioso en el eje dorso-ventral, expresándose en las células de las fibras nerviosas transversales dorsales, pero no en las ventrales, mostrando una asimetría en el uso de este sistema de comunicación en el adulto, y a modo más general, en el SNC de este estadio.

El gen de *npp-6* (homólogo de miomodulina de otros animales bilaterales), es uno de los genes más interesantes para el estudio en adultos, por su diferencia de expresión con cisticercoides y oncósferas, siendo especialmente expresado (Fold change > 10) en adultos. Para este neuropéptido se detectaron 4 receptores putativos, 2 de ellos expresados en adultos, los cuales, a diferencia de lo que se observa para el npp, tienen valores de expresión similares en los tres estadios. Las WMISH del *npp-6* muestran una amplia expresión de este neuropéptido en el SN del adulto, en donde se destacan las que aquí llamamos neuronas medulares gigantes en el cuello y en segmentos tempranos. Estas células podrían coincidir, teniendo en cuenta su localización, con las células endócrinas unicelulares detectadas por WMISH para *pc2*, a pesar de que su morfología no es idéntica al analizar la expresión de estos genes (es importante tener en cuenta que la distribución de los ARNm no tiene por qué ser idéntica entre los diferentes genes, y no todos estarán necesariamente presentes en las prolongaciones celulares). Simultáneamente, también detectamos señal en células que se encuentran cercanas al primordio sexual en desarrollo, con un patrón similar al detectado para el marcador de las vías glutamatérgicas *vglut*. Previamente se han descrito asociaciones de este neuropéptido en la reproducción en moluscos, siendo expresado fuertemente en *Haliothis asinina* justo antes de la liberación de gametos, tanto en hembras como machos [315], y en neuronas de *Lymnaea stagnalis* que inervan al pene. Este neuropéptido es un buen candidato para realizar estudios funcionales en cultivo de cisticercoides activados, y observar si se promueve con su adición el desarrollo de los órganos reproductivos. Además, sería interesante observar efectos en la proliferación celular y desarrollo del cuello en estos estadios. Por otro lado, este es otro de los neuropéptidos con diferencias de expresión en el eje dorso-ventral, con expresión en las células asociadas a las fibras nerviosas transversales dorsales, pero no en las ventrales, como menciono en el párrafo anterior para *npp-2*.



El gen de *npp-15.2* fue considerado como un buen candidato para tener un rol específico en el adulto, como por ejemplo en la reproducción, en base a que su expresión es casi exclusiva en este estadio. La expresión detectada por WMISH para este gen se restringe a únicamente los cordones nerviosos laterales, sin señal asociada a los órganos reproductivos. Sin embargo, no se descarta que este neuropéptido tenga un rol en la reproducción, ya que lo que observamos mediante esta técnica son los cuerpos neuronales y el comienzo de las prolongaciones celulares, pero no los órganos asociados a las terminaciones de las mismas.

Los neuropéptidos homólogos a NPF/NPY de otros animales bilaterales presentan 6 parálogos en *H. microstoma*, con diferentes valores de expresión entre estadios. Todos ellos parecen ser expresados en adultos, aunque se destaca la alta expresión de *npp-20.1* con respecto a los otros estadios. Se realizó WMISH para dos de estos genes (*npp-20.1* y *npp-20.4*), encontrando para ambos la expresión en unas pocas células del escólex y en los cordones nerviosos laterales. Por otro lado, se destaca que se detectó la expresión de *npp-20.4* en el conducto femenino en desarrollo, lo que sugiere un rol de este neuropéptido en estos tejidos. Previamente se ha reportado inmunorreactividad de NPF en proyecciones hacia la musculatura de los conductos del sistema reproductor de cestodos [316], lo que correlaciona muy bien con esta señal particular encontrada para *npp-20.4*, de todas formas, la señal aquí encontrada también se podría asociar al desarrollo de estos órganos reproductivos. De los 5 receptores putativos para estos neuropéptidos, dos parecen expresarse claramente en adultos, para los cuales sería interesante conocer su expresión mediante WMISH, ya que se ha reportado que estos neuropéptidos pueden influenciar en la proliferación celular de planarias [317,318], y se ha encontrado que son importantes en la regulación de células madre de insectos [319], como así también de mamíferos [320,321].

Un caso llamativo es el de *npp-29.1* y *npp-29.2*, estos genes parálogos codifican para un propéptido que al madurar generará a un péptido pequeño con la misma secuencia, MIYW. Sus niveles de expresión muestran diferencias entre sí en los datos de RNAseq, con dos detalles interesantes: ambos genes se expresan en adultos (pero menos que en oncosferas y con baja o nula expresión en cisticercoides) y en los tres estadios el *npp-29.2* se expresa entre 4 y 6 veces más que el *npp-29.1*. Por otro lado, los patrones observados por WMISH en adultos, para estos dos genes, muestran ser similares entre sí, marcando a todos los grandes conjuntos de fibras longitudinales y transversales presentes en esta etapa del ciclo de vida, aunque con una mayor cantidad de células detectadas para *npp-29.2* que para *npp-29.1*. Esta diferencia, se correlaciona muy bien con los valores de TPMs comentados previamente para estos dos genes en adultos. También se destaca que encontramos una expresión asimétrica en los LNC para *npp-29.1* mostrando expresión en los cordones nerviosos ventrales, pero no en los dorsales, en cambio *npp-29.2* parece tener

también mayor expresión en los cordones laterales ventrales, aunque no exclusivamente, de todas formas, se necesitarían más experimentos para confirmar esto último.

El *npp-33* (homólogo de SIFamida de otros animales bilaterales) es el único neuropéptido de este trabajo para el cual obtuvimos patrones de WMISH para el neuropéptido y su posible GPCR asociado (*sifamida-R*), identificado previamente por análisis filogenéticos [79]. Se destaca la expresión para ambos genes en los cordones nerviosos laterales. Para el *sifamida-R* detectamos a su vez, un grupo de células ordenadas en bandas segmentarias transversales que no fueron detectadas para las WMISH de *npp-33*, esto no es sorprendente, ya que como se menciona previamente esta técnica marca los cuerpos celulares, pero no es adecuada para marcar las prolongaciones celulares en su totalidad, por lo que esta separación espacial de células positivas para neuropéptido y receptor no es extraordinaria. El *sifamida-R* parece expresarse en el músculo del adulto, esto lo inferimos comparando con WMISH de genes de tropomiosina realizados en nuestro grupo de investigación (no se muestran), aunque se necesitarían WMISH con ambos genes para comprobar esta conjetura. Sin embargo, los resultados obtenidos para este gen en el aumento de la motilidad de tetratiridios, que se discutirán más adelante, son otro punto a favor de un rol en la regulación de la musculatura de este neuropéptido. En otros grupos de animales, este gen tiene roles muy variados, promoviendo el sueño en *D. melanogaster* [84] y su comportamiento sexual [322], y en cangrejos modulando la actividad cardíaca [323].

El gen de *npp-38* es expresado únicamente en adultos, con un TPM relativamente bajo (4,32). Este gen fue seleccionado para su análisis para evidenciar mediante WMISH si tenía expresión en el sistema reproductor, lo cual era una posibilidad por su ausencia de expresión en los otros estadios del ciclo de vida. Aunque su detección sólo fue localizada en los cordones nerviosos laterales, de todas formas, las prolongaciones de estas células que expresan a este péptido podrían inervar a los órganos reproductores, o estimular su formación.

El gen de *npp-41* (homólogo de CCAP de otros animales bilaterales) se expresa no sólo en el SN sino también en células individuales del cuello, que aquí llamamos CEU, ya que probablemente coinciden con las glándulas unicelulares descritas por Specian en esta región [37]. Se ha identificado que los sistemas neuropeptidérgicos están implicados en la regulación de las transiciones del ciclo de vida de diferentes animales [324], y CCAP en particular es uno de los “genes de ecdisis”, se ha evidenciado que estos genes son altamente expresados en momentos clave la vida de los animales en donde los mismos sufren los cambios morfológicos más grandes, tanto en protostomados como deuterostomados, en la metamorfosis en los animales que presentan desarrollo indirecto y la eclosión en los de desarrollo directo [62]. Teniendo esto último en cuenta, la expresión de este gen en la zona

del cuello en las CEU podría estar relacionada al desarrollo de la estructura del cuello y la formación de segmentos, lo cual es la principal diferencia morfológica entre los cisticercoides activados y los adultos. Por otro lado, detectamos células *npp-41+* con proyecciones hacia la superficie del cuerpo, lo que sugeriría un rol sensorial de estas células. Células peptidérgicas con características similares fueron descritas mediante estudios de inmunocitoquímica en el cestodo *Diphyllobothrium dendriticum* [325].

El producto del gen *npp-49.1* fue detectado mediante los análisis peptidómicos discutidos previamente. Realizamos WMISH de este gen y sus 3 parálogos en adultos de *H. microstoma*. Los genes *npp-49.1* y *npp-49.3* tienen patrones de expresión en las WMISH muy particulares, los cuales parecerían no pertenecer al SN del adulto. Las células positivas para *npp-49.1* (el segundo gen *npp* más expresado en adulto), rodean al parénquima medular, un patrón similar al de las células musculares de la capa muscular longitudinal interna, y tienen una morfología alargada compatible con células neuronales o musculares. Experimentos de co-tinción de este *npp-49.1* con un marcador de células proliferantes como EdU (ya que las células proliferantes también se encuentran en esta región [14]), o con una doble *in situ* con un marcador de células musculares como tropomiosina permitirían obtener resultados interesantes para continuar con la caracterización de la expresión de este neuropéptido y sus posibles funciones. Por otro lado, *npp-49.3* (el *npp* con mayor nivel de expresión en adulto), presenta expresión en células cuya identidad no es evidente, de morfología redondeada con una región central sin señal para la WMISH, que no corresponde a la región del núcleo, las cuales podrían ser células secretoras. No se logró detectar mediante WMISH a los otros dos genes parálogos, *npp-49.2* y *npp-49.4*, quizás debido a que estos genes son de expresión mucho más baja en adultos que *npp-49.1* y *npp-49.3*.

### *Oncósferas*

Según los datos transcriptómicos obtenidos en este trabajo, parece bastante claro que las oncósferas utilizan para su comunicación nerviosa a las vías glutamatérgicas, purinérgicas y peptidérgicas, dada la alta expresión de componentes moleculares en todos los pasos de comunicación aquí estudiados para estas vías. La vía de serotonina parece no tener expresión de ninguno de sus componentes en este estadio, a excepción de L-AADC, aunque este gen tiene diversas funciones celulares y no sólo la síntesis de serotonina, (encontrándose incluso expresión de esta enzima en tejidos no neurales) [326], por lo que su expresión podría estar asociada a otros procesos. Sin embargo, al analizar a la expresión de los componentes moleculares de la vía de acetilcolina en oncósferas los resultados son más llamativos, para esta vía de neurotransmisión clásica las proteínas encargadas de la

síntesis y transporte vesicular prácticamente no son expresados en oncósferas, sin embargo, detectamos la expresión de tres posibles receptores de acetilcolina, dos de tipo LGIC y un GPCR. La presencia de estos receptores en oncósferas puede estar dada por diferentes motivos, uno de ellos es que los mismos sean utilizados durante el desarrollo de las oncósferas dentro de los adultos (estadio en el cual sí están presentes todos los componentes moleculares de esta vía), otra opción, no excluyente con la anterior, es que estos receptores se utilicen como sensores en la infección al hospedero intermediario, en donde podrían detectar la presencia de este neurotransmisor al momento de la infección y de esta forma avanzar en su desarrollo. Una aproximación sencilla para evidenciar la expresión de estos genes en oncósferas en desarrollo y en oncósferas completamente desarrolladas sería tomar oncósferas de segmentos grávidos con diferentes estadios de desarrollo y comparar los niveles de expresión de estos receptores mediante PCR semicuantitativa o qPCR. Complementariamente, WMISH de estos receptores podrían sugerir sus posibles roles dependiendo del estadio de las oncósferas y de las células en donde se expresen.

Mediante los análisis de WMISH en las oncósferas en desarrollo presentes *in utero* en los adultos, no se detectó señal de *chat* ni de *tph*, los marcadores utilizados para las vías de acetilcolina y serotonina respectivamente, lo que era previsible por los datos de expresión génica. Por otro lado, a pesar de encontrar un nivel de expresión relativamente alto en los datos transcriptómicos en oncósferas para *vglut* (marcador seleccionado para la vía glutamatérgica), no se detectó señal de este gen mediante WMISH. El caso de *vglut* también fue observado en otros genes, que presentaban expresión relativamente alta en este estadio, pero que no se logró detectar su expresión por medio de WMISH, como los neuropéptidos: *npp-20.3.1*, *npp-29.1*, *npp-29.2*, *npp-33*, *npp-34*, *npp-41* y *npp-49.3*. La ausencia de señal detectable por WMISH puede deberse a diferentes factores, uno de ellos es que las oncósferas comiencen a expresar este gen en una etapa tardía del desarrollo, en la cual las diferentes envolturas que las recubren hayan madurado lo suficiente como para no permitir la entrada de las sondas de ARN marcadas con digoxigenina utilizadas en esta técnica, haciendo imposible su detección. Para corroborar si este es el caso, se podrían realizar para estos genes RT-PCR semicuantitativas o qPCRs, con oncósferas en diferente estado de desarrollo lo que permitiría conocer si existen diferencias de expresión a lo largo de su maduración. Otra alternativa complementaria, sería realizar inmunodetecciones o hibridaciones *in situ* para de estos genes en criocortes de oncósferas o en oncósferas activadas, aunque para el caso de las inmunodetecciones se necesitaría generar anticuerpos específicos (como el generado en este trabajo para Npp-46). Un inconveniente es que para realizar WMISH en oncósferas activadas, se necesitaría una gran cantidad de material de partida, ya que esta técnica consiste de muchos cambios de diferentes soluciones, con lo

que inevitablemente se perderá gran parte de la muestra a lo largo del protocolo debido al pequeño tamaño de estas larvas.

En cuanto a los genes de npps detectados en oncósferas mediante los datos transcriptómicos aquí obtenidos, se destaca la cantidad de estos que son expresado en los huevos (27/43; algunos de ellos con valores de TPM considerablemente altos), junto con una gran cantidad de los identificados como receptores putativos de neuropéptidos (12/27). Esto es muy sorprendente, sobre todo por la pequeña cantidad de células que tiene este estadio y más aún por la poca cantidad de células nerviosas descritas en el mismo. Por otro lado, es esperable que, dado el bajo número de células en la oncósfera, si alguna célula expresa algún gen de npp, esto se vea reflejado en un valor alto de TPM para este estadio. Además, en el caso de los neuropéptidos se trata de genes que generalmente son de alta expresión génica [284–286], lo que se refleja en los valores altos de TPM aquí encontrados. Es importante tener en cuenta que cuando recolectamos a las oncósferas para las extracciones de ARN, tomamos oncósferas en estadios finales del desarrollo, pero no necesariamente todas estaban completamente desarrolladas. Por lo tanto, tal vez algunos de los genes de npp sólo se expresen durante las últimas etapas de maduración de las mismas y no en el estadio infectivo final. En este sentido, la forma de indagar esta posibilidad, es tomar únicamente oncósferas completamente desarrolladas, y a partir de éstas analizar su expresión génica, por ejemplo, tomando las oncósferas a analizar a partir de las heces de los ratones, lo que daría una complicación extra al hecho de que de por si es difícil obtener buenas extracciones de ARN de este estadio, el cual fue el que presentó más dificultades para ser utilizado durante el desarrollo de este trabajo.

El descubrimiento de la expresión del gen *npp-46*, que parece ser específica en el estadio de oncósfera es sumamente interesante. Si bien observamos evidencia de expresión de este gen en el estadio adulto por transcriptómica, los valores de expresión son relativamente bajos, y a su vez no detectamos señal por WMISH en este estadio. En los estudios peptidómicos, este gen fue detectado únicamente en las muestras de adulto que poseían segmentos grávidos, y no en las otras muestras que carecían de los mismos. Las células que expresan a *npp-46* detectadas por WMISH en la oncósfera tienen prolongaciones que finalizan en una zona cercana a la de los ganchos, lo que podría sugerir un rol de este neuropéptido en la regulación del movimiento de los mismos, si bien en los ensayos de motilidad no detectamos alteraciones del movimiento cíclico al agregar este neuropéptido en el medio, como será discutido más adelante. La señal obtenida para *npp-46* por WMISH se co-localiza con la señal obtenida con el anticuerpo FMRF-amida. El anticuerpo FMRF-amida detecta al motivo común de neuropéptidos RFamida, que por medio de los estudios *in silico* en *H. microstoma* fue predicho para los genes *npp-4* y los seis parálogos *npp-20*. Entre estos genes, se destaca la alta expresión del *npp-20.3.1* en

oncósferas, con el cual se realizaron WMISH, pero sin detectar señal en las oncósferas en desarrollo ni en adulto. El anticuerpo anti-Npp-46 obtenido para este trabajo mediante el proveedor comercial Genescript, tiene una señal muy característica en las oncósferas activadas con proyecciones en forma de “M”. Un experimento complementario que claramente sería bueno realizar, ya que contamos con este anticuerpo, es el de co-localización de la señal del anticuerpo generado con la WMISH de este gen. Por otro lado, realizamos una búsqueda del ortólogo de *npp-46* de *E. multilocularis* para el que existen datos transcriptómicos disponibles del estadio de oncósfera, y encontramos que en esta especie este gen también es expresado fuertemente en la oncósfera [327]. Realizamos la misma búsqueda en los datos transcriptómicos disponibles de oncósferas de *E. granulosus* [217], aunque en este caso no fue posible comprobar la expresión de este neuropéptido en este estadio, ya que en los datos transcriptómicos de este trabajo el gen de *npp-46* no se encuentra entre los genes predichos para las tablas de expresión génica disponibles. Una aproximación interesante sería utilizar el anticuerpo desarrollado para Npp-46 de *H. microstoma* de este trabajo contra oncósferas de otros cestodos, como los del género *Echinococcus* spp., de forma de confirmar la expresión de este neuropéptido en oncósferas como una característica general en los cestodos.

El gen de *npp-2* fue el único detectado tanto en oncósferas como en adultos por WMISH. En oncósferas el patrón de expresión se ve claramente alrededor de dos núcleos muy próximos, los cuales interpretamos que pertenecen la célula tegumental binucleada de la oncósfera [30]. En *H. diminuta* fue reportado mediante MET que esta célula posee un retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi bien desarrollados, junto a una gran cantidad de vesículas de núcleo denso [328], lo que apoya la hipótesis de que esta célula tenga características peptidérgicas y sean las que detectamos mediante las WMISH en este trabajo. Una de las formas de evidenciar que la señal de *npp-2* pertenece a esta célula binucleada sería mediante el co-marcado por WMISH junto al marcado del tegumento de estas larvas, ya que sería la única célula que forma este tegumento, y esta estructura puede ser marcada específicamente. Una forma de marcar específicamente al tegumento de platelmintos parásitos es mediante *shock* osmótico con dextrano [329], técnica que también se ha realizado en nuestro laboratorio para adultos de *H. microstoma* [330], y para oncósferas activadas (datos no publicados). Sin embargo, este método no es fácilmente aplicable para oncósferas en desarrollo *in útero*, por complicaciones metodológicas de aislamiento y de las membranas en formación de los huevos en desarrollo. Teniendo estas consideraciones, probablemente se debería recurrir a la visualización por microscopía electrónica para corroborar la identidad de esta célula binucleada como la que expresa *npp-2* en oncósferas. La función de este neuropéptido no parece ser clara, aunque es interesante notar que estaría por fuera de lo que se considera células nerviosas de este estadio,

sugiriendo un rol no nervioso, a diferencia de lo que sucede en adulto, en donde es fuertemente expresado en SNC.

En resumen, se detectaron al menos dos tipos de células neuropeptidérgicas diferentes en oncósferas, que corresponden a las que mostraron señal de WMISH para *npp-2* por un lado y para *npp-46* por otro (que a su vez coincide con la señal detectada para *pc2*), lo cual es singular para un estadio larval tan reducido. En este estadio larval las vías de comunicación nerviosa que detectamos pueden tener diferentes roles. Las oncósferas producen movimientos cíclicos coordinados al activarse, para los que se ha postulado la necesidad de una regulación nerviosa desde que se describió la primera evidencia ultraestructural de células nerviosas en este estadio de *Hymenolepis* spp. [29]. Las vías de comunicación detectadas por diferentes métodos en la oncósfera podrían estar activando a estos movimientos y/o regulando su frecuencia.

### *Cisticercoides*

En cisticercoides, al menos 24 de los 43 genes de neuropéptidos analizados muestran expresión según nuestros datos transcriptómicos. La gran mayoría de los neuropéptidos expresados en cisticercoides, también se expresan en alguno de los otros estadios, a excepción del gen *npp-44.2* (el cual, de todas formas, presenta una expresión moderada en este estadio (8,32 TPM)). Es posible que la expresión observada de muchos de estos genes esté siendo detectada por su expresión en la pequeña porción del escólex enquistado de esta larva, el cual posteriormente dará origen al adulto. De los receptores putativos de neuropéptidos, sólo cuatro se expresan claramente (TPM>2) en esta etapa del ciclo de vida. En el estadio enquistado es prácticamente imposible realizar WMISH para la detección de expresión de diferentes genes, por lo que para estudiar estos sistemas de comunicación en trabajos futuros se debería trabajar sobre etapas tempranas de la metamorfosis larval oncósfera-cisticercoide, o en cisticercoides activados representantes de la transición cisticercoide-adulto, en los que en este trabajo se detectó la expresión de *pc2*, lo que evidenciaría el uso de los sistemas peptidérgicos en esta transición del ciclo de vida de forma temprana. Otra alternativa es la realizar inmunodetecciones o WMISH en criocortes de cisticercoides para la detección de la expresión de estos sistemas.

### *Comparación de los patrones de expresión de pc2 y de genes de npp*

Si PC2 está implicada en el procesamiento de todos los neuropéptidos, se esperaría que la señal obtenida para este gen por WMISH ocurriese en un patrón que se solape con los patrones de expresión de todos los neuropéptidos. Esta correspondencia se cumple para gran parte de los neuropéptidos analizados, pero no para todos. Como se puede observar

en la sección de Resultados *npp-20.4*, *npp-41*, *npp-49.1* y *npp-49.3* de adultos y *npp-2* de oncósferas muestran patrones de expresión que no se corresponden completamente con los detectados por WMISH para *pc2*. El gen de *npp-20.4* fue detectado por WMISH en el conducto femenino en desarrollo, algo que no fue observado para *pc2*. Las WMISH de *npp-41* muestran señal por fuera de las estructuras principales del SNC, localizándose señal de WMISH en células que por morfología y ubicación podrían ser células sensoriales periféricas con proyecciones sobre la superficie corporal. En el caso de *npp-49.1*, este gen mostró un patrón de expresión que parece ser muscular y *npp-49.3* tiene una expresión en células redondeadas que podría tratarse de células secretoras. Finalmente, *npp-2* en oncósferas mostró expresión en lo que posiblemente sea la célula binucleada tegumental de este estadio. En ninguno de estos tipos celulares fue identificada la expresión de *pc2* mediante WMISH. Estas diferencias de expresión entre *pc2* y estos npp tienen varias explicaciones posibles, por ejemplo, podrían estar dados por un nivel bajo de expresión de esta prohormona convertasa no detectable por WMISH. Otra explicación es que estos npps, en estas células, no estén siendo procesados por clivaje en los sitios de clivaje conservados, aunque esto no parece tan probable, porque los análisis peptidómicos reflejan la detección de neuropéptidos maduros (*npp-6*, *npp-49-1*) y las zonas flanqueantes (*npp-41*, *npp-49.1*) limitadas por estos sitios dibásicos conservados para el corte enzimático. Alternativamente, estos npps podrían no estar siendo procesados por PC2 sino por otras prohormonas convertasas presentes en el genoma de *H. microstoma*, o por otras proteasas no relacionadas, que estén realizando los clivajes necesarios para la maduración de los neuropéptidos en estas células [331]. Para comprobar esta hipótesis se podrían realizar WMISH para las otras prohormonas convertasas detectadas y observar cuidadosamente sus patrones de expresión en búsqueda de correlación de señal con la señal detectada para estos neuropéptidos. En nuestros análisis filogenéticos del Capítulo 1 de resultados, encontramos otras tres prohormonas convertasas en el genoma de *H. microstoma*, dos de ellas en un grupo que parece específico de platelmintos sin una clara correlación a las presentes en otros bilaterales (HmN\_000991500.1 y HmN\_000991600.1) y otra más relacionada a las Furinas (HmN\_000029900.1). Se ha reportado que otras enzimas pueden ser las responsables del procesamiento proteolítico de neuropéptidos, como el caso de la Catepsina L que se ha demostrado es importante en el procesamiento de NPY en ratones [42,332], neuropéptidos de la misma familia que *npp-20.4*. Esto último podría explicar la falta de señal para *pc2* en los ductos femeninos en desarrollo, si es que el procesamiento de este neuropéptido está siendo dado por esta otra proteína. Se ha reportado por datos transcriptómicos de célula única (*single cell*) que en platelmintos parásitos se pueden encontrar diferentes poblaciones neuronales con o sin expresión de *pc2*, en particular para el primer estadio en mamíferos de *S. mansoni* en donde se describieron cuatro grandes poblaciones neuronales, una de ellas sin la expresión de este gen en particular [333]. Esto



en conjunto da cuenta de la complejidad de estos sistemas de comunicación peptidérgicos, que además de tener varios pasos para su maduración utilizan diferentes enzimas en sus vías de síntesis. Por otro lado, deja claro que *pc2* es un muy buen marcador general del sistema nervioso en estos organismos, pero que no marcaría a todas las células peptidérgicas.

Los neuropéptidos analizados en este trabajo por WMISH en adultos no mostraron expresión en la vesícula seminal externa ni en células asociadas a la glándula vitelina o el ovario, por lo que, si la expresión de *pc2* en estas regiones se debe a la comunicación neuropeptidérgica, parecería no estar dada por medio de los genes analizados. Sin embargo, se detectó la expresión de *npp-20.4* en el conducto femenino en desarrollo, lo que sugiere que este neuropéptido podría tener alguna implicancia en esta parte del sistema reproductor. Si la señal de la vesícula seminal externa de *pc2* se relaciona al procesamiento de algún péptido, podría tratarse de péptidos liberados junto con los espermatozoides que interactuarán luego del evento copulatorio con receptores de los órganos femeninos para generar una respuesta celular relacionada a la fecundación. Uno de los ejemplos más claros de este tipo de interacciones es el péptido sexual de *D. melanogaster*, el cual causa que las hembras que son fecundadas cambien su comportamiento, buscando aparearse menos y depositando más cantidad de huevos por algunos días [334]. El cambio de comportamiento en cestodos sería algo más difícil de estandarizar para medir en detalle; siendo más factible estudiar la influencia de estos neuropéptidos sobre la producción y desarrollo de los ovocitos. Otra posibilidad, no excluyente con la anterior, es que los neuropéptidos estén siendo liberados en la VSE para generar efectos locales en este órgano. En el trematodo *S. mansoni* se ha encontrado actividad *in situ* de PKA en la vesícula seminal de los adultos [335] lo cual podría ser un efecto resultante de la interacción de neuropéptidos con sus GPCRs. Se requiere de la caracterización de más neuropéptidos y receptores para acercarnos a las respuestas de estas preguntas que surgen. Otro tipo de estrategia sería mediante silenciamiento génico, por ejemplo, mediante RNAi de PC2 en cabezas sin segmentos o cisticercoides activados, en medios que permitan la generación de segmentos *in vitro*, para observar diferentes alteraciones que pudiera producir la falta de esta prohormona convertasa, lo cual sería un efecto a nivel más general de la producción de neuropéptidos.

La búsqueda de aquellos neuropéptidos que tengan un rol en la reproducción se puede basar en los genes de *npp* que, como *npp-6*, *npp-15.2* y *npp-38*, sean expresados especialmente en adultos, con expresión baja o nula en los otros estadios. Los neuropéptidos que cumplen estas características de expresión en adulto y que no fueron estudiados en detalle en este trabajo son: *npp-4*, *npp-27.1*, *npp-31/32.1*, *npp-31/32.3* y *npp-44.1*). Buscamos a estos genes en datos transcriptómicos generados para las diferentes

regiones del adulto (anterior, medio y final) [219], por lo que si un neuropéptido tiene una estricta función en los órganos reproductores se esperaría ver su expresión en las regiones media y final pero no en la región anterior (escólex, cuello y segmentos iniciales de la estróbila). Sin embargo, ninguno de estos genes mostró una expresión más alta en las regiones media y final del adulto en comparación a la región anterior [219], lo cual podría estar dado por otras funciones además de su rol en el sistema reproductor, o que sencillamente no estén implicados en estos sistemas. De todas formas, sería muy interesante realizar WMISH para estos genes mencionados. Algo que se podría realizar de forma adicional, sería microdissección por láser de la vesícula seminal externa de los adultos para posteriormente analizar cuáles son específicamente los genes que se expresan en esta región mediante RT-PCR semicuantitativa o qPCR.

En suma, identificamos la presencia de varias vías de neurotransmisión, tanto clásica como peptidérgica, en las diferentes etapas del ciclo de vida de *H. microstoma*. La investigación que realizamos llevó a su vez al descubrimiento de que una gran cantidad de vías de neurotransmisión clásicas fueron perdidas en la evolución de parásitos cestodos. Identificamos patrones de expresión para genes marcadores de las vías de neurotransmisión clásica y de diferentes neuropéptidos mediante WMISH. Se destaca la expresión de dos de estos neuropéptidos en oncósferas, con uno de ellos específico de este enigmático estadio, Npp-46, el cual fue confirmado a su vez por los estudios de peptidómica aquí realizados. Claramente para seguir avanzando en la caracterización de estos sistemas se necesita conocer con detalle a sus receptores. Como se puede apreciar en las tablas de resultados de los GPCRs de neuropéptidos, de 11 receptores no es posible hipotetizar la identidad de su(s) ligando(s), y de los otros 16 GPCRs, estos son inferidos por correlación evolutiva por tener ortólogos en otros animales bilaterales, lo cual tiene limitaciones. Para poder entender mejor a estos sistemas de comunicación se necesita “desorfarnizar” a estos receptores con este propósito, se han utilizado diversos sistemas de expresión heteróloga de GPCRs junto a reporteros, como luciferasa [336,337], para evidenciar a los ligandos correspondientes a estos receptores. Más recientemente se han implementado sistemas diseñados para análisis a gran escala como el de doble híbrido de levadura de MALAR (por su nombre en inglés, *Membrane-Anchored Ligand And Receptor*), siendo utilizado con este propósito para *S. mansoni* [338] y que también se podría aplicar para los GPCRs y neuropéptidos de *H. microstoma* y otros cestodos.

### - Cultivo in vitro de adultos y cisticercoides

Para poder estudiar mejor la biología de los cestodos se han desarrollado diferentes metodologías de cultivo *in vitro*, con el incitante desafío de que los gusanos maduren y

continúen con su ciclo de vida en condiciones más simples a las que se encuentran en su hospedador natural. Las metodologías de cultivo *in vitro* eficientes para la maduración de los cestodos pueden demorar años en ser establecidas y muchas veces requieren de pequeños detalles clave para su eficacia, más allá de las condiciones básicas que pueden utilizarse en un cultivo celular estándar, difíciles de inferir *a priori* [339]. Ejemplos de esto son la necesidad de un medio bifásico para el desarrollo de cultivos de *E. granulosus* para que estos maduren hacia adultos, lo cual se cree es en parte por la necesidad de la sujeción al sustrato [305,340] o el cultivo de adultos de *Schistocephalus solidus* en donde se encontró que es necesario un soporte físico similar a un intestino para que se dé la fecundación *in vitro* y se produzcan embriones viables [341]. En este trabajo estandarizamos metodologías de cultivo, a corto y largo plazo, para adultos y cisticercoides de *H. microstoma*. El cultivo de adultos fue optimizado correctamente, y en estos cultivos, bajo las condiciones utilizadas, logramos detectar diferenciación somática y gametogénesis. Más allá de que se optimizaron estas condiciones de cultivo, existe una gran variabilidad en los resultados de los cultivos realizados bajo estas condiciones. Esto llevó a que las pruebas funcionales con drogas y neuropéptidos originalmente planteados para este trabajo no se pudieran realizar, por la necesidad de gran cantidad de repeticiones para tener resultados robustos. Otro tipo de experimento adicional que sería interesante explorar sería el cultivo de regiones anteriores (escólices y cuello) bajo estas condiciones para evaluar la generación de nuevos segmentos *in vitro*, como se ha desarrollado con eficacia en *H. diminuta* [11], y los efectos que pudieran tener los neuropéptidos sobre el proceso de segmentación.

En cuanto al protocolo de cultivo de cisticercoides, el optimizado por nosotros permitió que estos crecieran y se mantuvieran vivos hasta por 24 días. Sin embargo, no logramos observar que bajo estas condiciones los cisticercoides segmentaran o formaran órganos reproductores, lo cual está reportado en la bibliografía previa como algo que es posible *in vitro* [24,25]. Estas condiciones de cultivo reportadas como exitosas en la bibliografía presentan problemas en su replicación en la actualidad, y no sólo por nuestro grupo. Por ejemplo, el grupo de Peter Olson probó diferentes medios de cultivo obteniendo solamente un crecimiento de unas 2,5 veces del tamaño inicial de los cisticercoides activados, no observando más crecimiento luego del octavo día, y sin segmentación o desarrollo de órganos reproductores [22]. En este sentido parece ser que el medio bifásico y/o la adición de sangre utilizados en nuestros experimentos favorece un poco más el crecimiento de los cisticercoides, llegando a crecer hasta más de 6 veces su tamaño inicial. Las metodologías de cultivo *in vitro* utilizadas en la actualidad tienen algunas diferencias con las descritas en la bibliografía previa, que reporta la segmentación y maduración de los cisticercoides en gusanos con segmentos desarrollados. Las diferencias entre las metodologías de cultivo empleadas en este trabajo, por Pouchkina-Stantcheva et al. en 2013 y originalmente por Seidel en 1971 [25] se muestran en la **Tabla D.1**, en donde se observan

las principales diferencias entre las metodologías. Se destaca el uso de suero de caballo al 20% en Seidel 1971, en lugar del SFB al 30% utilizado en este trabajo y 20% por Olson et al. en 2013. El uso de sangre humana en lugar de la sangre ovina aquí utilizada, y que no se menciona la modificación de la fase gaseosa en los experimentos de Seidel de 1971. Estos son algunos factores a tener en cuenta si se quiere mejorar más el protocolo de cultivo aquí descrito para cisticercoides. Considero que sería además una buena opción utilizar sangre de ratones como suplemento, por ser su hospedero final en el ciclo de vida natural.

	Seidel 1971	Pouchkina-Stantcheva 2013	Este trabajo
<b>Medio</b>	Triple Eagle's medium	CMRL-1066	RPMI (R5886, Sigma-Aldrich)
<b>Hemina</b>	0,15 $\mu$ M	1,5 mM	0,15 $\mu$ M
<b>Suero</b>	30% Suero de Caballo	20% SFB	30 % SFB
<b>Base de Agar</b>	Placas de Agar con 5% sangre humana	Sin Base	Agar-Base Triptona con 5% sangre oveja
<b>Temperatura</b>	37°C	39°C	37°C
<b>Sangre</b>	5% - Humana	Sin sangre	5%-Ovina
<b>Fase gaseosa</b>	Sin mezcla de gases añadida	95% N <sub>2</sub> y 5% CO <sub>2</sub>	5% CO <sub>2</sub>

**Tabla D.1. Características de medios utilizados para cultivar cisticercoides activados *in vitro*.**

- Efecto de drogas y neuropéptidos en el crecimiento y proliferación de cisticercoides.

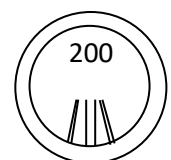
Aunque no logramos obtener cisticercoides de *H. microstoma* que comenzaran a formar segmentos, el protocolo aquí optimizado para el cultivo de cisticercoides permitió el testeo de neuropéptidos y de diferentes drogas para evaluar su efecto sobre el crecimiento y la proliferación celular de los cisticercoides. Para el caso de las drogas, sólo observamos diferencias significativas en la cantidad de células proliferantes detectadas para el caso de Queleritrina, una droga con un amplio espectro de blancos moleculares (como se discutirá más en detalle en la próxima sección), afectando varias proteínas y procesos celulares, por lo que estos resultados necesitan ser corroborados con otros inhibidores asociados para confirmar que este efecto está dado por la inhibición de PKC, y

no por interacción con estos otros componentes. Si bien se trata de experimentos preliminares, los resultados para Npp-2 y Npp-29 parecen prometedores como estimuladores del crecimiento y de la proliferación celular. Los experimentos a largo plazo son laboriosos y costosos por la cantidad de neuropéptido utilizado en ellos a lo largo de los días, por estas razones es alentador que los experimentos a corto plazo también muestran resultados con la misma tendencia a un aumento de la proliferación celular detectada en pocas horas en cultivo. Todos estos resultados deben ser confirmados en experimentos futuros. Para el caso de Npp-2, estos no serían los primeros resultados que muestran que este neuropéptido promueve la proliferación celular en cestodos, porque ya se ha evidenciado previamente en *E. multilocularis* que promueve la proliferación celular [283]. Por lo tanto, si se confirma que esto también es así en *H. microstoma*, estaríamos probablemente frente a un interesante control neuropeptidérgico de la proliferación celular como vía conservada en parásitos cestodos, o tal vez en platelmintos, ya que *npp-2* también fue detectado en el genoma de tremátodos y planarias [79]. Los resultados aquí obtenidos de cultivos a largo plazo muestran diferencias significativas claras en el aumento del tamaño de los cisticercoides en cultivo y muestran una tendencia al aumento en la cantidad de células proliferantes detectadas por EdU para Npp-2 y Npp-29, lo que sugeriría su rol de control neuropeptidérgico de las poblaciones de células madre de *H. microstoma*. El rol de los neuropéptidos como factores de importancia en la regulación de la proliferación celular no sería algo nuevo en animales, ya que se ha descrito por ejemplo que diferentes neuropéptidos como NPY, Taquicinina, entre otros, son importantes en el nicho de células madre hematopoyéticas de ratón [321]. Por otro lado también se ha estudiado el efecto de neuropéptidos en células madre embrionarias, en donde algunos de estos, como el péptido vasoactivo intestinal y el polipéptido pituitario activado por adenilato ciclasa son capaces de inducir la diferenciación de estas células madre a neuronas [342]. En platelmintos de vida libre, se han encontrado evidencias que sugieren un control neural de la proliferación de neoblastos. En estudios de MET se observó la cercanía de células positivas para marcadores neurales como RFamida con los neoblastos del platelminto de vida libre *Macrostomum lignano* [343]. En otros estudios se ha encontrado que el sistema nervioso serotoninérgico y peptidérgico estaría relacionado a la regulación de la reproducción asexual de estos animales, un mecanismo reproductivo bastante atípico en el conjunto de bilaterales, en donde estarían involucradas las vías de señalización por aminas biogénicas y neuropéptidos [318,344,345]. Por lo tanto, nuestros datos preliminares, una vez que se comprueben, mostrarían nueva evidencia de la regulación nerviosa de las células madre de cestodos, mediante mecanismos neuropeptidérgicos de comunicación celular.

## - Ensayos funcionales: Estudio del efecto sobre la motilidad de oncósferas.

El estadio de oncósfera es el más intrigante del ciclo de vida de cestodos, siendo el estadio infectivo en las especies de cestodos que producen las infecciones más graves en humanos pero, por otro lado, es también el estadio del que sabemos menos, por una serie de dificultades que presenta a la hora de trabajar con el mismo. Uno de los principales problemas para trabajar con oncósferas, en especies infectivas para humanos, es el de bioseguridad, por lo que el modelo utilizado en nuestro trabajo, *H. microstoma*, nos brinda una gran posibilidad de investigar y conocer más sobre la biología de este estadio. Sin embargo, existen otras dificultades a la hora de trabajar con estas larvas. Estas dificultades radican en que para su obtención en grandes cantidades se necesita una minuciosa disección de segmentos grávidos de gusanos adultos (obtenidos a su vez por la disección de un ratón infectado) de los que son seleccionados sólo aquellos con oncósferas completamente desarrolladas. Las oncósferas presentan un tamaño pequeño (60  $\mu\text{m}$  con cáscara y 30  $\mu\text{m}$  luego de eclosionar), por lo que para seleccionar adecuadamente a las que se encuentran en un estado desarrollado terminal se necesita visualizarlas al microscopio cuidadosamente, para a través de la observación de su tamaño, forma, sus envolturas y la disposición de los ganchos, sean aisladas correctamente mediante pipeteo en las placas. Otra forma de obtener oncósferas, es mediante aislamiento de materia fecal de ratones infectados, más allá de que logramos optimizar un protocolo para un aislamiento de este tipo, no se obtienen tanta cantidad de las mismas como por disección de los segmentos grávidos de adultos. Además de la menor cantidad de oncósferas obtenidas, trabajar con materia fecal agrega una serie de problemáticas, por contaminación de microorganismos, presencia en grandes cantidades de inhibidores de reacciones enzimáticas, entre otros. Estos factores, en conjunto con el pequeño tamaño de este estadio larval provocan que las muestras de oncósferas obtenidas a lo largo de este trabajo tuvieran cierta variabilidad producida por los diferentes pasos que se requieren para su obtención, reflejado en variaciones de su comportamiento frente a los mismos protocolos. Por estos motivos, la estandarización de protocolos de activación de este estadio que produjeran resultados reproducibles, para posteriormente realizar análisis funcionales, insumió bastante tiempo de este trabajo. Sin embargo, se lograron realizar una gran diversidad de ensayos satisfactoriamente, obteniendo resultados muy interesantes para este estadio en el ciclo de vida de los cestodos.

Uno de nuestros principales objetivos luego de detectar la expresión de *npp-46* en oncósferas fue determinar si la presencia del mismo podía modular a los movimientos cíclicos que estas producen al activarse. Sin embargo, ni *Npp-46* ni ninguno de los neuropéptidos testeados en las pruebas de motilidad de las oncósferas mostró una alteración de su motilidad cuando comparamos con los controles, lo cual puede deberse a



diferentes motivos. Uno de los motivos de esta falta de efecto aparente es, obviamente, que estos compuestos no estén involucrados sobre la motilidad de las oncósferas. Pero si tienen un efecto podríamos no estar observándolo por otros motivos, como por ejemplo que los neuropéptidos no lleguen en una concentración significativa desde el medio hasta el sitio de unión de sus receptores correspondientes dentro de la oncósfera. Otra posibilidad es que, estos neuropéptidos puedan activar la vía, pero que la activación de la misma sea de todo o nada, por lo que una vez que comienzan los movimientos cíclicos tienen un límite máximo ya alcanzado en los controles, por lo que el movimiento no sufre modificaciones adicionales por la presencia de neuropéptidos adicionales en el medio circundante. La forma de probar realmente la implicancia de estos neuropéptidos en la motilidad de las oncósferas, sería mediante manipulación genética, siendo el RNAi la técnica de este tipo más utilizada en cestodos [22,346,347], pero que no sería útil en este caso, porque el efecto de esta técnica es para ensayos a más largo plazo, y las oncósferas presentan movimiento por un corto período de tiempo luego de su activación (aproximadamente una hora). Cabe destacar que no se probaron a todos los neuropéptidos presentes en oncósferas según nuestros datos transcriptómicos. En particular sería interesante conocer el efecto del neuropéptido *npp-20.3.1*, homólogo de NPF de otros organismos bilaterales, ya que es el de mayor expresión en oncósferas. Una familia de neuropéptidos que han mostrado tener un efecto activador de la motilidad en cestodos es la de los NPFs. En estudios en *M. corti* con homólogos de NPF se encontró un efecto de este neuropéptido de forma independiente a la estimulación neuronal, sugiriendo que los receptores estarían en otras células (probablemente las musculares) [76]. Por otro lado, neuropéptidos de esta familia han mostrado actuar mediante la inhibición de AMPc en *Schistosoma mansoni* [348], y por los resultados obtenidos con inhibidores, se puede inferir que esta vía tendría un rol en la regulación del movimiento cíclico de oncósferas.

Entre las drogas utilizadas para los ensayos de motilidad de oncósferas se destaca al inhibidor de PKA H-89. Este inhibidor produjo una parálisis de los movimientos cíclicos de oncósferas desde una concentración de 1  $\mu$ M, generando una disposición particular de los ganchos. Con H-89, existen reportes previos en el tremátodo *S. mansoni* que sugieren que PKA es sumamente importante para la sobrevivencia de estos gusanos adultos *in vitro*, encontrando una mayor mortalidad de estos organismos desde una concentración de 10  $\mu$ M y que se vuelve más severo a mayores concentraciones. En este mismo estudio de *S. mansoni*, también observan un efecto sobre la sobrevivencia utilizando PKI, a partir de concentraciones de 250  $\mu$ M [302]. En otros estudios se utilizó a H-89 para el estudio de la movilidad en el nado en la etapa de miracidio, el primer estadio larval de estos parásitos tremátodos [303]. El efecto sobre el miracidio de esta droga es muy interesante porque este sería el estadio análogo a la oncósfera de cestodos, que es donde describimos aquí el efecto inhibitorio del movimiento de esta misma droga, lo que sugeriría la posibilidad de estar

frente a un mecanismo compartido de control de la motilidad en las primaras etapas larvales entre estos grupos de parásitos.

Llamativamente los otros inhibidores de la vía de PKA que probamos en este trabajo (SQ22536 y PKI) no tuvieron el mismo efecto que el visto para H-89, pudiéndose deber esto a diferentes factores. SQ22536 no es un inhibidor directo de la PKA, sino que inhibe la adenilato ciclasa encargada de la generación de AMPc, por lo que el blanco molecular no es el mismo que H-89, pudiendo ser este el factor determinante de la ausencia de efecto aparente sobre la motilidad de las oncósferas. PKI es un péptido que ejerce su acción al interaccionar con PKA inhibiendo a esta enzima, y para esto es necesario que este péptido ingrese a la célula. En este trabajo utilizamos un péptido comercial miristilado para facilitar este ingreso, pero no podemos determinar si esto es suficiente para atravesar el tegumento de la oncósfera y la membrana plasmática de las células blanco. En definitiva, en el caso de PKI su baja permeabilidad podría ser la causa de la falta de efecto de este compuesto sobre la motilidad de las oncósferas activadas. En particular, las oncósferas son impermeables incluso a colorantes vitales (por ejemplo intentamos teñir a oncósferas activadas con Hoechst 33342 el cuál no logró ingresas en oncósferas que presentaban movimiento (vivas), algo que sí se logra en otros invertebrados pequeños [349]).

Es importante tener en consideración que la interacción de H-89 con PKA es sobre una región altamente conservada, y que su acción inhibitoria es sobre la subunidad catalítica de PKA (PKAcat) en sí misma [350], lo que puede explicar la falta de efecto fuerte de las otras drogas que afectan estimulando (FSK, IBMX) o inhibiendo (SQ22536) la producción de AMPc por AC, una enzima no tan conservada. Esto cobra aún más fuerza si se tiene en cuenta de que existen mecanismos de activación de PKA independientes de AMPc [351] [352], lo que abre la posibilidad de que vías de activación independientes de AMPc estén implicadas en la generación de los movimientos cíclicos inhibidos por H-89. Por otro lado, se ha reportado que H-89 inhibe a otros 8 tipos de quinastas, entre ellas a la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG), a la proteína quinasa D, una isoforma atípica de la PKC [350], e incluso a otras proteínas como las quinastas Rho [353], las cuales incluso en algunos casos tienen efectos contrarios a los producidos por PKA [350]. Por lo tanto, no es posible afirmar que el efecto inhibitorio observado a partir de este compuesto en las oncósferas esté dado por la inhibición específica de PKA.

Los activadores de la vía de PKA, FSK e IBMX, tuvieron un leve efecto inhibitorio de la motilidad en oncósferas luego de la hora de activación, lo que podría deberse a un efecto tóxico de estos compuestos por afectar estas vías a modo global en todas las células. Parecería que no es posible sobre-activar la motilidad (frecuencia de movimientos) que realizan las oncósferas, y que sólo es posible inhibirlo, esto podría ser explicado al menos en parte por una activación de “todo o nada” de este sistema de movimiento rítmico por parte de estas larvas al eclosionar, no pudiendo activarse más de un máximo que sería el que se visualiza en los controles. Como se discute previamente, más allá de que aquí nos enfocamos en las vías de señalización neuropeptidérgicas, las vías afectadas por estas drogas también son utilizadas por ejemplo por neurotransmisores clásicos al unirse a sus



GPCRs. Esto último es un punto a tener en cuenta, en especial dada la posible presencia de las vías de glutamato en oncósferas, incluyendo un GPCR para glutamato, ya que se ha visto previamente que en adultos de *H. diminuta* la adición de glutamato puede incrementar los niveles de AMPc intracelular [354]. En otros estudios en *H. diminuta* también se observó un incremento de AMPc mediado por la adición de serotonina [355], sin embargo, nuestros resultados sugieren que los receptores de serotonina no se expresan en oncósferas. Incluso a modo más general, estos efectos no necesitan estar dados por procesos netamente neurales, ya que estos inhibidores utilizados son de amplio espectro afectando a diferentes procesos y tipos celulares.

Todas las drogas que afectan a las vías de PKC que fueron testeadas en este trabajo sobre oncósferas activadas tuvieron efecto sobre su motilidad, inhibiendo la frecuencia de movimientos cíclicos, y en algunos casos bloqueando completamente su motilidad. Las drogas Gö6983 y Queleritrina tuvieron el efecto más fuerte, mientras que U73122 y el activador de la vía PMA tuvieron un efecto más leve. El activador de la vía PMA mostró un efecto inhibitorio de los cpm únicamente tras la hora de incubación con este compuesto (al igual que para los activadores de PKA), y podría tratarse de un efecto tóxico de este compuesto sobre las oncósferas que se manifiesta con el paso del tiempo. Gö6983 y Queleritrina inmovilizaron a las oncósferas, no permitiendo que la gran mayoría de ellas realizara ciclos de movimiento a la hora de activación, en forma similar a lo que se vio para H-89. Estos resultados sugieren fuertemente que el movimiento cíclico de las oncósferas está siendo regulado al menos en parte por PKC, y permite considerar que el efecto de H-89 podría ser una inhibición de esta vía de forma inespecífica. Previamente ya se ha detectado que para otros platelmintos parásitos como *S. mansoni*, existen diferentes PKC, con diferentes isoformas y funciones a lo largo del ciclo de vida, incluyendo la motilidad de estos organismos [356]. En otros organismos protostomados como *D. melanogaster* se ha identificado una forma de regulación muscular mediada por PKC, en donde la fosforilación de la cadena regulatoria de la miosina es indispensable para la maduración y función de los músculos de las alas [357]. Hay que tener en cuenta que si bien la Queleritrina es un inhibidor de la PKC, también se ha reportado que tiene inhibición de múltiples procesos celulares mediante la inhibición de otras proteínas como: fosfodiesterasas [358], cyclooxygenasa-2 (importante en procesos inflamatorios) [359], topoisomerasas de ADN [360], entre otros. Teniendo en cuenta el amplio espectro inhibitorio de la Queleritrina, los resultados obtenidos para esta droga aquí y en los otros experimentos en los que fue utilizada deben ser tomados con cuidado y complementados con otros inhibidores para la vía de PKC, ya que el efecto podría estar siendo dado por el efecto sobre otros componentes moleculares. La identificación de las vías de segundos mensajeros puede ser una tarea bastante compleja, dado por la reactividad cruzada de estas drogas, en las cuales se ven afectadas diferentes vías y procesos celulares. A esto se le suma que estas vías interactúan entre sí, por ejemplo las calmodulinas dependientes de calcio pueden regular

la actividad de adenilato ciclasas para la producción de AMPc, y a su vez las mismas adenilato ciclasas pueden ser inhibida por acción de quinasas dependientes de calmodulinas, generando una intrincada red de activaciones e inhibiciones de adenilato ciclasas en las células, en donde se forman microdominios de activación de PKA por la presencia o ausencia localizada de AMPc [361].

En otros experimentos nos enfocamos en la inhibición de la liberación de neurotransmisores clásicos. Con este objetivo utilizamos al inhibidor de las bombas de protones ATPasas, Bafilomicina [362]. Al inhibir a estas bombas, la bafilomicina evita que se forme el gradiente de protones que es necesario para la acumulación de neurotransmisores en las vesículas sinápticas. Esta droga produjo una inhibición de la motilidad de las oncósferas tanto a los 15 minutos como a la hora de activación de las mismas. Viendo los resultados de los análisis de expresión génica, esto podría estar dado por la inhibición de la liberación de glutamato o de ATP desde la presinapsis, ya que las otras vías de neurotransmisión clásica no estarían presentes en oncósferas. Algo interesante es que se ha visto que los receptores P2X (utilizados por las vías purinérgicas), son altamente regulados por PKC [363]. Para determinar la implicancia de estas vías de comunicación en el movimiento cíclico de las oncósferas se podría realizar la incubación con bafilomicina junto a glutamato y/o ATP concentrados en el medio extracelular, para observar si alguno de estos compuestos revierte el efecto inhibitorio de la bafilomicina y así determinar si alguno de ellos u ambos pueden reiniciar a los movimientos cíclicos de las oncósferas. Si fuera el caso que las vías purinérgicas están implicadas en este movimiento cíclico de oncósferas de *H. microstoma*, sería interesante indagar si es así también en cestodos de la familia *Taeniidae*, ya que como se menciona en el Capítulo 1 no fueron encontrados homólogos del transportador vesicular de nucleótidos VNUT en sus genomas analizados [94]. Aunque el movimiento de las oncósferas esté siendo activado por estas vías glutamatérgicas y/o purinérgicas, esto no descartaría un rol de los sistemas neuropeptidérgicos, ya que los mismos generalmente actúan como moduladores, despolarizando o hiperpolarizando a las células para facilitar o restringir que las mismas disparen un potencial de acción, por lo que podrían estar actuando en conjunto.

Los movimientos cíclicos estereotipados de la oncósfera indican que estaríamos frente a un sistema sumamente simplificado de un generador central de patrones (CPGs, por su nombre en inglés, *central pattern generators*). La investigación de los CPGs es un campo grande de la neurociencia en el que se estudia la activación sincronizada de circuitos neurales, que generan movimientos preestablecidos coordinados con independencia de regulación central o de las vías sensitivas [364,365]. Un punto a favor de esta teoría es que muchos de los genes que son importantes en la función neuronal de descargas rítmicas, clave para los CPGs, se encuentran expresados diferencialmente más en oncósferas que en

cisticercoides y/o en adultos según nuestros datos transcriptómicos. Dentro de los genes expresados diferencialmente hay varios canales de potasio, y canales catiónicos activados en hiperpolarización dependientes de nucleótidos cíclicos (como AMPc), llamados HCN (por su nombre en inglés, *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-sensitive*), estos componentes moleculares tienen gran importancia para la generación de potenciales de acción rítmicos en circuitos neuronales que regulan el latido del corazón [366] y en el SNC en general [367]. Por otro lado, en los CPGs es importante tanto la actividad de PKA [51,368] como de PKC [369], y como fue discutido, al afectar proteínas relacionadas a la actividad de estas quinasas, o al afectarlas directamente a estas con drogas, se vieron alterados los movimientos rítmicos de las oncósferas. Es entusiasmante proponer que este estadio tan particular podría ser un modelo de CPGs, porque de ser así sería uno de los más simples que se hayan descrito.

#### - Ensayos funcionales: estudios sobre la motilidad en cisticercoides y tetratiridios.

Una de las funciones del sistema nervioso de los animales es el control de los movimientos, estos movimientos son importantes en parásitos intestinales para establecer y mantener la infección en sus hospederos [192]. En este trabajo realizamos ensayos para analizar la importancia de neuropéptidos y de las vías de PKA y PKC sobre la motilidad larvaria en cestodos utilizando dos modelos: cisticercoides de *H. microstoma* y tetratiridios de *M. corti*.

En el caso de *H. microstoma*, seleccionamos a los cisticercoides para estos ensayos, ya que los adultos son extremadamente grandes y dificultan el registro de las variaciones sobre su movimiento que puedan producir diferentes compuestos. Los resultados de motilidad en cisticercoides son preliminares, dado el bajo número de réplicas y la gran variación obtenida en los ensayos, por lo que para confirmar los efectos observados se requieren mayor cantidad de repeticiones. Para el desarrollo de los ensayos de motilidad de cisticercoides optimizamos el uso de un protocolo establecido para el análisis mediante imágenes en protoescolices de *Echinococcus multilocularis* [307]. Más allá de requerir más réplicas, algunos efectos observados en estos experimentos sobre el movimiento parecen bastante claros. H-89 y Queleritrina, inhibidores de PKA y PKC respectivamente, parecen inhibir el movimiento de los cisticercoides activados, llegando a valores de cambio de pixel en algunos casos de 0, lo cual es muy llamativo y refleja un claro efecto sobre estos organismos. Este es un muy buen resultado preliminar sobre la regulación de la motilidad en estas larvas, pero tiene sus limitaciones de interpretación, ya que diferentes compuestos pueden utilizar estas vías, por lo que la inhibición observada sólo evidencia una parte del

proceso. Otra de las limitaciones de la interpretación de estos resultados, es que, como se mencionó previamente en oncósferas, el efecto observado tanto para H-89 como para Queleritrina también pueden estar dados por reactividad cruzada de inhibición de otros componentes moleculares, por lo que sería necesario verificar este efecto con otras drogas para las vías de PKA y PKC. El escenario ideal para el estudio de estas vías de segundos mensajeros, es mediante la adición de compuestos que afecten la vía como ligando de las GPCRs y a partir de estos efectos utilizar las drogas antes y después de la adición de los mismos, para inferir cuáles son los componentes moleculares que utilizan corriente abajo. De esta manera, por ejemplo, se realizaron muy buenas aproximaciones en trabajos previos estudiando el efecto de NPF sobre tetratiridios de *M. corti* [76]. Sin embargo, los neuropéptidos utilizados en los ensayos no mostraron efectos claros sobre la motilidad de cisticercoides activados. Más allá de la gran variabilidad, en el caso de los cisticercoides es posible que no se observe un efecto robusto para varios neuropéptidos porque no se expresan en este estadio los receptores específicos. De acuerdo a los datos transcriptómicos obtenidos, los receptores putativos de SIFamida y de CCAP no son prácticamente expresados en cisticercoides, pero sí en adultos, por lo que si hay un efecto de estos neuropéptidos sobre la motilidad tal vez podría estar dado posteriormente en esta transición del ciclo de vida, para lo que sería interesante diseñar este tipo de aproximaciones sobre cisticercoides luego de unos días en cultivo, o sobre segmentos de adultos (se discute más adelante). Otro punto a destacar, es que las medidas de motilidad siempre se realizaron a temperatura ambiente, y se encuentra reportado en *M. corti* que los efectos encontrados sobre la motilidad para algunos neuropéptidos a 36 °C no son observables a 23°C [308], por lo que sería interesante repetir estos experimentos a mayor temperatura. Otra posibilidad claramente, es que estos neuropéptidos aquí testeados no tengan un efecto sobre la motilidad, sin embargo, también se necesitan más evidencias para afirmar esto. La regulación de la motilidad podría estar dada por otros compuestos del sistema nerviosos, como serotonina o glutamato, los cuales se sabe aumentan los niveles de AMPc en adultos de *H. diminuta* [354,355], lo que podría explicar a su vez el efecto inhibitorio de H-89. Además ya es conocido que los neurotransmisores clásicos tienen efectos sobre la motilidad de larvas de cestodos, como la serotonina sobre tetratiridios de *M. corti* [308]. El protocolo aquí estandarizado, permite analizar todas estas posibilidades, abriendo la puerta a nuevas aproximaciones para estudiar los efectos farmacológicos sobre la motilidad de cestodos, en un nuevo modelo para estos estudios en Uruguay, simple de efectuar, con bajos costos de reactivos y que no requiere de equipos especializados.

El otro modelo de estudio utilizado para ensayos de motilidad fueron tetratiridios de *M. corti*, mediante el uso de un equipo WMICROTRACKER ONE™. Los experimentos en general deberían repetirse para tener un mayor número de muestras biológicas independientes, sin embargo, algunos de los resultados fueron bastante claros y con

diferencias significativas encontradas al analizar las 5 réplicas realizadas para cada condición en cada experimento. Dentro de los resultados más claros de estas condiciones, se encuentran los obtenidos para las mismas drogas que parecen tener un efecto sobre cisticercoides de *H. microstoma*: H-89 y Queleritrina. Tanto H-89 como Queleritrina mostraron una fuerte inhibición sobre el movimiento de los tetratiridios medidos en estos experimentos. Por otro lado, Gö6983 (inhibidor de PKC) tiene un efecto dual, de activación y posterior inhibición en los análisis, aunque la repetición de este patrón en la dinámica de motilidad debe ser confirmado en futuros experimentos. Si se confirma el efecto de Gö6983, se podría interpretar que la inhibición de PKC genera un aumento de movimiento de forma inicial, que posteriormente empieza a tener el efecto contrario, pudiéndose deber esto al efecto a diversas razones, como el efecto sobre múltiples blancos, que el efecto comience a ser tóxico, entre otros.

El resultado más apreciable de estos experimentos para este trabajo es sin duda la detección de un efecto de activación del movimiento en los tetratiridios al agregar Npp-33 (homólogo de SIFamida en otros organismos bilaterales) en el medio. Además de observar el efecto de una mayor motilidad detectada por el WMICROTRACKER ONE™, este efecto es claramente visible si se sigue a los cultivos bajo lupa junto a una condición control, en donde se observa la gran movilidad de los tetratiridios en presencia de este neuropéptido, por lo que su efecto también ha sido registrado mediante videos, en diferentes tiempos post-adición de Npp-33 al medio. En forma adicional a la estimulación de la movilidad, el neuropéptido parece generar un efecto de agrupamiento en el centro de las placas, con los parásitos asociados entre ellos en algunas ocasiones por sus ventosas. En otros platelmintos parásitos ya se han descrito a neuropéptidos como FMRFamida en la regulación de la musculatura y en la adhesión por parte de los órganos de anclaje [370], por lo que los resultados aquí obtenidos mostrarían que otros neuropéptidos también tendrían implicancia sobre estas funciones. La agrupación mediada por Npp-33 en tetratiridios de *M. corti* es apreciable a los pocos minutos de la adición de este neuropéptido en el medio, y este efecto podría ser producto del aumento de la motilidad de los mismos generada inicialmente. Esta forma de agrupamiento ya había sido descrito previamente para estos organismos [13,371], donde se observó como efecto de la adición de sales biliares, y se determinó que puede ser inhibido por drogas antiparasitarias como praziquantel y albendazol. Hay que tener en cuenta que este neuropéptido es el Npp-33 de *H. microstoma*, el cual difiere con el Npp-33 de *M. corti* únicamente por una metionina extra en el extremo N-terminal en *M. corti* [79]. El efecto sobre la motilidad de *M. corti* de este Npp-33 genera la interrogante de por qué no se vio el mismo efecto en cisticercoides activados de *H. microstoma*. En nuestros datos transcriptómicos, el receptor predicho para SIFamida prácticamente no es expresado en las larvas enquistadas de cisticercoides de *H. microstoma*. En *M. corti* el gen correspondiente al receptor homólogo de SIFamida [79] se

expresa tanto en tetratiridios como en adulto, sin diferencias significativas entre ellos, y con valores de FPKM de aproximadamente 141 y 220, respectivamente, observado en los datos transcriptómicos publicados en 2020 para este organismo [218]. Por lo tanto, una opción de esta falta de efecto sobre la motilidad aparente es que los cisticercoides de *H. microstoma* al activarse no expresen receptores para este neuropéptido y por esto no se aprecie un aumento de la motilidad ni agrupamiento como en el caso de *M. corti*. Algunas opciones experimentales para testear si existe un efecto sobre el movimiento en *H. microstoma* por parte de este neuropéptido incluyen utilizarlo en cisticercoides con algunos días de cultivo (con lo que tal vez comiencen a expresar este receptor), o utilizar adultos. Es de destacar que este efecto sobre la motilidad es compatible con la presencia del receptor putativo de este neuropéptido en lo que parece ser la musculatura del adulto en las WMISH para adultos de *H. microstoma*.

Otro resultado de los ensayos con Npp-33 en tetratiridios, fue la observación del cambio de coloración del indicador de pH en los medios de cultivo utilizados pasado el tiempo de análisis, estando más ácidos (amarillos) los medios que contenían la presencia de este neuropéptido. La acidificación del medio podría estar dada por una alteración en el metabolismo de los tetratiridios independiente de la motilidad, o ser una consecuencia del aumento de la motilidad, ya que, al moverse más, estos probablemente consumirán más glucosa, cambiando las condiciones del medio. En este sentido, sería interesante estudiar el efecto de Npp-33 en larvas inmóviles de cestodos, como los metacestodos de *Echinococcus spp.* Sin embargo, los datos transcriptómicos de *E. multilocularis* [327] y *E. granulosus* [217] que se encuentran disponibles muestran una expresión casi nula del receptor putativo de SIFamida en estos metacestodo inmóviles, al igual que para el cisticercoide enquistado de *H. microstoma* [214].

Los sistemas de comunicación por SIFamida, fueron descritos inicialmente por su rol miotrópico en artrópodos [82] por lo que la observación de efectos sobre la motilidad en el presente trabajo no son sorprendentes, y podrían ser parte de uno de los roles generales de este neuropéptido en diferentes animales. Por otro lado, se ha reportado que este neuropéptido tiene múltiples funciones como un rol en el comportamiento de alimentación [372] y en la inducción del sueño [84] en *D. melanogaster*, en la regulación de las glándulas salivales [373] y contracción del intestino [374] de garrapatas *Ixodes scapularis*, entre otros efectos [83]. Por lo tanto, no se descarta que este neuropéptido tenga otros efectos además de los observados sobre la motilidad en este trabajo.

En definitiva, más allá de que quedan varios puntos por confirmar por réplicas adicionales, se logró establecer metodologías para el testeo de diferentes compuestos sobre la motilidad de metacestodos de *H. microstoma* y *M. corti*, identificando un péptido

e inhibidores farmacológicos que modulan la motilidad en esta última especie. Esto significa un importante avance en el estudio de los diferentes roles que tienen los neuropéptidos y deja establecido un protocolo experimental para el testeo de estos y otros componentes. Para completar estos estudios de motilidad sería interesante estandarizar protocolos que permitan evidenciar efectos sobre la motilidad en adultos, y de esta forma poder estudiar la motilidad de los tres principales estadios del ciclo de vida de cestodos con un único modelo. En el caso de adultos enteros se podrían utilizar concentraciones de neuropéptidos que rondan los 100  $\mu\text{M}$  como se utilizó en este trabajo, las cuales son muy superiores a las fisiológicas, para asegurar que estos péptidos interactúen con sus receptores desde el medio externo, como se ha realizado en estudios previos con tetratiridios [76], aunque existen otras opciones. En adultos de *H. diminuta* se han realizado estudios sobre la motilidad, midiendo la generación de tensión en preparaciones de fragmentos de la estróbila, junto a la evidencia de diferentes contracciones de estos fragmentos, algo que se utilizó por ejemplo en esta especie para demostrar la inhibición del movimiento por parte de acetilcolina [375,376]. Con esta metodología el sistema muscular y nervioso quedan expuestos al medio de cultivo, en donde se tiene la ventaja de poder trabajar a concentraciones fisiológicas de neuropéptidos, teniendo efectos más directos. Establecer este tipo de ensayos de motilidad para fragmentos de adultos de *H. microstoma* sería muy interesante para estudiar el efecto de los neuropéptidos y drogas analizados en este trabajo, y también para aumentar aún más la cantidad de ensayos funcionales que se pueden realizar con este modelo de estudio, lo cual sería muy útil para esta y otras líneas de investigación en cestodos.

### - Síntesis

Los cestodos son animales con una biología fascinante, teniendo cambios morfológicos muy grandes en las diferentes etapas de su ciclo de vida. El sistema nervioso de las diferentes etapas del ciclo de vida de *H. microstoma* fue investigado en detalle en este trabajo, desde un punto de vista de Biología Molecular y Celular. Los sistemas neuropeptidérgicos aparecen como sistemas muy importantes en el ciclo de vida de este organismo, con una gran variabilidad de posibles funciones, reflejada por sus niveles de expresión génica, y por los sitios en donde son expresados. Se destaca el uso de estos sistemas neuropeptidérgicos en el sistema nervioso central, y lo que parecerían ser otros roles, como en el desarrollo y en la reproducción, aunque se requieren más experimentos funcionales para confirmar cuáles son exactamente todos los roles que cumplen.

En este trabajo confirmamos que nuestro método bioinformático para la detección de genes de npps es fiable, a través de nuestros estudios peptidómicos y los patrones

observados por WMISH. Es de destacar que esto abre la puerta al estudio de los sistemas neuropeptidérgicos en otros grupos de animales *in silico* con esta misma metodología.

Quisiera destacar que los datos transcriptómicos que obtuvimos y mostramos en este trabajo representan al primer conjunto de datos de RNAseq de buena calidad para todos los estadios del ciclo de vida de una especie de cestodo. Estos datos aquí fueron descritos de manera general y posteriormente enfocados en el estudio de los sistemas neuropeptidérgicos, pero la utilidad de los mismos es importante para diversos enfoques de estudio de nuestro grupo y de otros grupos de investigación en el mundo. Esta información transcriptómica, fortalece aún más a nuestro modelo de estudio para la investigación de la biología de platelmintos parásitos.

El conocimiento biológico en general, y en particular nuestro conocimiento del sistema nervioso, se basa en una gran cantidad de información de unas pocas especies de organismos modelo. Sin embargo, esto tiene sus limitaciones, ya que basarnos en unas pocas especies lleva a generalizaciones que pueden ser erróneas. En este sentido es importante agregar especies nuevas para el estudio de su biología básica. En esta tesis se refleja la gran cantidad de información que puede obtenerse del sistema nervioso de un organismo del que no se sabe tanto como de *D. melanogaster* o *C. elegans*, pero que muestra ser un buen pilar para aumentar nuestro conocimiento sobre los Lofotrocozoos, en particular de los platelmintos parásitos cestodos, pertenecientes a este gran grupo de bilaterales protostomados.

Más allá del aporte del conocimiento de la biología a modo general de los diferentes grupos de animales del árbol evolutivo, el estudio de los cestodos tiene una funcionalidad más directa por ser algunas especies causantes de enfermedades. El trabajo con oncósferas que describimos en este trabajo es muy importante en este sentido, ya que encontramos a modo general cuales son los sistemas de comunicación nerviosa presentes en este reducido estadio larvario. Además de esto, describimos diferentes grupos de células que expresan neuropéptidos en oncósferas en desarrollo, y encontramos una serie de receptores GPCRs expresados en este estadio, de los cuáles sería muy interesante conocer su importancia en el desarrollo de la infección en el hospedero intermediario.

El conjunto los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis son una contribución para el conocimiento general de la biología de cestodos, y de los sistemas de neurotransmisión de estos organismos, abriendo un abanico de nuevas preguntas por responder sobre estos sistemas. Durante el desarrollo de la tesis y la realización de las aproximaciones experimentales para obtener resultados, se estandarizaron varios protocolos para la resolución de esta y otras temáticas relacionadas a los cestodos, con un modelo novedoso para su estudio en Uruguay, *Hymenolepis microstoma*.



## **Materiales y métodos.**

Se describe la metodología utilizada en este trabajo, los detalles de algunos de los protocolos estandarizados están presentados en la sección de Apéndices al final de la tesis.

### **1- Obtención y mantenimiento del material parasitario.**

#### **- Mantenimiento del ciclo de vida de *Hymenolepis microstoma*.**

El ciclo de vida de *H. microstoma* fue mantenido en conjunto entre nuestro laboratorio y el Laboratorio de Experimentación Animal de la Facultad de Química. El protocolo fue aprobado por la CHEA con el Título: “Mantenimiento del ciclo vital completa del cestodo *Hymenolepis microstoma* utilizando los hospedadores naturales *Mus musculus* (ratón) y *Tribolium confusum* (escarabajo de la harina)”; número de protocolo: 10190000025215. En nuestro laboratorio se mantuvieron a los parásitos en el hospedero intermediario (escarabajo de la harina) mientras que en la Facultad de Química realizaron el mantenimiento en el estadio adulto en el hospedero definitivo (ratón). Los cisticercoides fueron obtenidos por disección de escarabajos infectados utilizando pinzas bajo lupa estereoscópica, luego de dos semanas post infección, para obtener larvas completamente desarrolladas. Los ratones fueron infectados con diez cisticercoides cada uno, utilizando una sonda gástrica, colocando a estas larvas en el estómago de los ratones permitiendo que los parásitos se activen y posteriormente se desarrollen como adultos. Al cabo de unas semanas se procedió a sacrificar los ratones y recolectar a los gusanos adultos, mediante disección del intestino y conducto biliar de estos animales. Para completar el ciclo se les cortó a los gusanos adultos los segmentos más posteriores de su cuerpo en donde se encuentran los huevos con oncósferas infectivas. Los escarabajos, previamente ayunados durante una semana, fueron expuestos a los huevos infectivos de dos maneras diferentes: aislando y concentrando a los huevos (dejando la menor cantidad de los tejidos de los adultos posible, como se describe en el siguiente ítem de esta sección) o simplemente alimentándolos con una preparación macerada mediante bisturí de los segmentos posteriores. Ambos métodos fueron eficientes para infectar a los escarabajos, aunque por observación de nuestro grupo se obtuvieron mayores intensidades de infección utilizando huevos aislados. En cada paso de recolección y disección se utilizó buffer PBS.

#### **- Aislamiento de huevos (con oncósferas).**

Para aislar a los huevos se colocaron segmentos grávidos bajo lupa estereoscópica en buffer PBS y se procedió a romperlos con pinzas. Se toman los huevos con pipeta sin tomar los restos de tejido de adulto circundantes. Luego de recolectadas se lava a los

huevos 2 veces en PBS, centrifugando en cada paso durante 5 minutos a 1000 g. Se deja a los huevos en un tubo de 15 ml, a 8 °C en un volumen total de 1 ml para permitir el intercambio gaseoso. Los huevos así obtenidos fueron utilizados para infectar escarabajos o para ensayos de motilidad de oncósferas, por un período de 2 semanas como máximo, observando una buena conservación de los huevos durante la primer semana post recolección.

### **- Obtención de cisticercoides y adultos.**

Los cisticercoides fueron obtenidos por disección de escarabajos infectados, bajo lupa estereoscópica en buffer PBS. Las infecciones fueron de al menos 2 semanas.

Los adultos se obtuvieron de infecciones en ratón de al menos 2 meses, e inmediatamente colocados en PBS.

El protocolo estándar de fijación para ambos fue el siguiente: lavarlos extensamente con PBS, dejarlos en un volumen pequeño de PBS a 4°C durante 5 minutos y fijarlos con PFA 4% precalentado a 80°C (para que mueran por el calor y no por el PFA, lo que evita que se contraigan), y dejarlos a 4°C 5 minutos. Desde este punto generalmente se los dejó toda la noche a 4°C, aunque en algunas ocasiones se los fijó durante 4 horas a RT. Finalmente se pasaron a los gusanos fijados a metanol para guardarlos a -20°C por largo plazo (para WMISH siempre se hizo este paso), o a PBS dejándolos a 4°C para ser utilizados esa misma semana.

## **2- Técnicas de Biología Celular y Molecular**

### **- Consideraciones generales para el trabajo con ARN.**

Para el trabajo con ARN se tomaron los cuidados necesarios para evitar la exposición de las muestras a ARNasas. Se utilizaron guantes en todo momento en estos protocolos y se limpiaron exhaustivamente todas las superficies utilizadas con alcohol 70%. Todas las soluciones fueron tratadas con Dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% y posteriormente autoclavados 40 minutos. Para las soluciones que no es posible tratar con DEPC (soluciones con Tris, por ejemplo) se prepararon las soluciones utilizando agua ultrapura tratada con DEPC, trabajando con reactivos libres de ARNasas.

## **- Extracción de ARN**

La extracción de ARN se realizó mediante TRIzol™ Reagent (Invitrogen), poniendo a las muestras en este reactivo, con una relación de volumen de 10 a 1 (reactivo vs. muestra). Las primeras extracciones en este trabajo, se realizaron con el protocolo clásico utilizando este reactivo, mediante el uso de extracción con cloroformo y precipitación del ARN. Posteriormente, comenzamos a utilizar el reactivo TRIzol™ Reagent en combinación con el kit comercial DirectZol (Zymo Research). Con este kit obtuvimos mejores resultados de extracción de ARN que con el método tradicional. Esto fue importante para la extracción de ARN de los huevos de *H. microstoma*, el cual es el más laborioso de conseguir, y para el que no obtuvimos buenas cantidades de ARN con el método convencional de extracción. El ARN fue cuantificado mediante Qubit RNA Broad Range Assay Kit™ (ThermoFisher) y mediante Nanodrop.

Para los adultos se obtuvieron dos tipos de extracciones de ARN, adultos totales y adultos libres de huevos. Para los adultos libres de huevos, se les removieron los segmentos grávidos que contienen a las oncósferas. El ARN de adulto total, se utilizó para amplificar los genes de neuropéptidos en general, testear que los cebadores diseñados funcionaran bien para cada gen y generar productos de PCR para posteriormente producir sondas para WMISH. Los ARNs de adultos libres de huevos fueron utilizados para la secuenciación por RNAseq y para los experimentos de qPCR.

El ARN de cisticercoides fue obtenido de larvas completamente desarrolladas mediante disección de escarabajos bajo lupa. Se tomaron a los cisticercoides sin tomar tejidos circundantes de escarabajo y posteriormente se lavó repetidas veces a las larvas con PBS.

El ARN de huevos se obtuvo a partir de la disección de segmentos grávidos de adultos bajo lupa. Se tomaron los huevos maduros con cuidado de no tomar restos de adulto circundantes. Se los lavó repetidas veces con PBS y se los dejó una noche a 8°C en un tubo de 15 ml, con 1 ml de PBS para permitir el intercambio gaseoso. Posteriormente se trató a los huevos con una solución de PBS + 0,5% tripsina durante 30 minutos, para remover cualquier resto presente de tejido adulto, se los lavó con abundante PBS utilizando un filtro de 27 µm y luego se recolectaron los huevos que permanecieron remanentes sin pasar por este filtro. Algunas de estas muestras así obtenidas, fueron teñidas con Hoechst 33342 e inspeccionadas bajo microscopio de epifluorescencia, para corroborar que no estuviesen contaminadas por células de adultos

### - Diseño de cebadores.

En el caso de los genes de neuropéptidos, nos interesaba tener la mayor parte del CDS amplificado como producto de PCR, ya que uno de los objetivos era usar este producto como molde para la generación de sondas de ARN para WMISH. Las WMISH pueden no funcionar correctamente con sondas demasiado pequeñas, y como ya fue comentado previamente, los genes de neuropéptidos son genes cortos. Por estas razones los cebadores de PCR para todos los neuropéptidos se obtuvieron manualmente por el análisis de las secuencias y generación de las bases complementarias a los extremos. Se tomaron las secuencias presentes en los extremos, intentando obtener secuencias de nucleótidos que tuvieran Tm cercanas y que finalizaran con una guanina o una citosina en el extremo 3'. Se analizaron los cebadores así generados mediante OligoAnalyzer™ Tool [377] para evaluar diferentes problemas como la generación de dímeros, autocomplementeridad, etc. Cuando se detectaron problemas se redujo el tamaño del amplicón hasta tener condiciones favorables para la amplificación de los genes de neuropéptidos. Estos cebadores fueron utilizados para PCR a tiempo final y para los ensayos de RT-PCR semicuantitativa.

En el caso de los otros genes con los que se trabajó, los cebadores fueron obtenidos por predicción automática de los mejores cebadores posibles de determinadas regiones que, cuando fue posible, flanquearan a una región intrónica de tamaño apreciable. Para esta parte del trabajo, se utilizaron los programas Bioedit [378] y GeneRunner [379].

Los cebadores, así como los experimentos en los que fueron utilizados, se muestran en la **Tabla M.1**. Para algunos genes se desarrolló más de un juego de cebadores, unos por ejemplo que tienen un producto de un largo de unas 600pb aproximadamente (“*Sm*” en la tabla M.1, de *Small*) y otro juego de cebadores con productos de un largo mayor, para de esta forma generar sondas para WMISH más grandes (de las que se espera mayor señal fluorescente, denominados “*Long*”). Esto se realizó utilizando la primera versión publicada del genoma de *H. microstoma* de Tsai 2013 [20], la cual se encuentra disponible en WormBase ParaSite, como la versión 1 (*H. microstoma*, *WBPS1*).

GeneID*	Nombre	Secuencia	Ensayos
HmN_000056300.1	AntígenosB-56300-Fw	TTTGCCCTTGATTCCCTTGC	PCRfin - PCRsem -WMISH
HmN_000056300.1	AntígenosB-56300-Rv	CCCAGCCTTTGTCTTAGTCG	PCRfin - PCRsem -WMISH
HmN_000056400.1	AntígenosB-56400-Fw	TGCGTTCCTTGTTGTTCTTC	<b>PCRfin</b>
HmN_000056400.1	AntígenosB-56400-Rv	TTGAGCTTCTGCCTTAGCTCT	<b>PCRfin</b>
HmN_000779700.1	CCAP-Receptor-Fw	GCAAGGAACGTCAATTTACGC	WMISH
HmN_000779700.1	CCAP-Receptor-Rv	GCTTTGGCATATTCGATTTTCG	WMISH
HmN_000095900.1	Chat.Long-Fw	TACCAGTGCCAGAGCTTCGAAC	WMISH

HmN_000095900.1	Chat.Long-Rv	ACCTTGCTGGAAGCGTCTTG	WMISH
HmN_000095900.1	Chat.Sm-Fw	GCTCAAGATGCCATTGTATCG	PCRfin - PCRsem
HmN_000095900.1	Chat.Sm-Rv	GAAGTCCCAACGTTTAACTCTTG	PCRfin - PCRsem
HmN_000608600.1	ELP-Fw	TCAACAGATGAAGATTCAGGC	PCRfin - PCRsem
HmN_000608600.1	ELP-Rv	TGACACGAGACTCCTCAATTC	PCRfin - PCRsem
HmN_000085600.1	Luq-Receptor-Fw	TTTCAACGATTCGATTGGG	WMISH
HmN_000085600.1	Luq-Receptor-Rv	TCATCCAGGCGTAAATGAAAGG	WMISH
HmN_000276100.1	MyMo-Receptor1-Fw	GCACCAACGTCCAATTGCTC	WMISH
HmN_000276100.1	MyMo-Receptor1-Rv	AGAACGAAATTACCGCAGTTGC	WMISH
HmN_000292400.1	MyMo-Receptor2-Fw	TGTCTCACGGCAGACTGATGAC	WMISH
HmN_000292400.1	MyMo-Receptor2-Rv	TGCGCCATGAACTGGTTTG	WMISH
HmN_000454700.1	MyMo-Receptor3-Fw	TGCAATATCAGACGGAATGGTC	WMISH
HmN_000454700.1	MyMo-Receptor3-Rv	GGTGTGATGAAATGGGAGGAC	WMISH
HmN_001010400.1	MyMo-Receptor4-Fw	TCTTGATCCCGACCTCTCAGG	WMISH
HmN_001010400.1	MyMo-Receptor4-Rv	GATGGACAAGAACCGTCTCTGC	WMISH
HmN_000426400.1	NKY-Receptor-Fw	TTTCCCAACTCGGATGATTGAC	WMISH
HmN_000426400.1	NKY-Receptor-Rv	ATAGGCGTTGGGTGAATGACTG	WMISH
HmN_000787500	npp-14-Fw	ATGTGCGTAATTTGTGTCTTCTG	PCRfin - PCRsem
HmN_000787500	npp-14-Rv	TTAACCATTGCGATTCTGCG	PCRfin - PCRsem
HmN_000592500	npp-15.1-Fw	ATGAAATCGTTGTAACCTCCGC	PCRfin - PCRsem
HmN_000592500	npp-15.1-Rv	TCAACGACCAAGTCGCAAGAATTG	PCRfin - PCRsem
HmN_000592400	npp-15.2-Fw	ATGTGCGCCTCCGTTATCTAG	PCRfin - PCRsem
HmN_000592400	npp-15.2-Rv	TTAGCCGATTCTCAAGAACTGGG	PCRfin - PCRsem
HmN_000556000	npp-1-Fw	AGTCAACTTCTGATGGATTGC	PCRfin - PCRsem
HmN_000556000	npp-1-Rv	TCAGCCAAGACGCACAAAAC	PCRfin - PCRsem
HmN_000462100	npp-20.1-Fw	ATGTTTCTCTGTCTACACATTTTC	PCRfin - PCRsem -WMISH
HmN_000462100	npp-20.1-Rv	TTAGCCAAATCTTGGTCGTCC	PCRfin - PCRsem -WMISH
HmN_000295600	npp-20.2-Fw	ATGATATCCGCGTTATTGACCTC	PCRfin - PCRsem
HmN_000295600	npp-20.2-Rv	TTAGCCAAATCTCGCTCGTCC	PCRfin - PCRsem
HmN_000069000	npp-20.3.1-Fw	ATGACCAAACTGGATTATCGGAG	PCRfin - PCRsem
HmN_000069000	npp-20.3.1-Rv	TCATCCAAACCTGGGCCTTC	PCRfin - PCRsem
HmN_000069100	npp-20.3.2-Fw	ATGACGACTTTGGTGTAGGAACG	PCRfin - PCRsem
HmN_000069100	npp-20.3.2-Rv	TCATCCGAATCTTGGTCTACCTG	PCRfin - PCRsem
HmN_000206600	npp-20.4-Fw	ATGTCTCCACTATCGTTGGCATC	PCRfin - PCRsem -WMISH
HmN_000206600	npp-20.4-Rv	CTAACCAATCTCGGTCGTCCAAAG	PCRfin - PCRsem -WMISH
HmN_000096800	npp-20.5-Fw	TCCACATTCACGTCTGTCTG	PCRfin - PCRsem -WMISH
HmN_000096800	npp-20.5-Rv	TAGATAATAAGCCTTCATTTGAGCC	PCRfin - PCRsem -WMISH
HmN_000377100	npp-24-Fw	ATGATCGTCGCACTTCTAGTTTTG	PCRfin - PCRsem
HmN_000377100	npp-24-Rv	TTAACGTTTACCCAAAAGACCGTG	PCRfin - PCRsem
HmN_000165500	npp-26-Fw	ATGCGTCTCTTCTCAGTGTTT	PCRfin - PCRsem
HmN_000165500	npp-26-Rv	TTACAATGTTGGATTGGAGAAAAG	PCRfin - PCRsem

HmN_000326200	npp-27.1-Fw	ATGGTCTATGCTAATAGTTGTGAAAG	PCRfin - PCRsem
HmN_000326200	npp-27.1-Rv	CTACACACCACGGCGCTTACGATAC	PCRfin - PCRsem
HmN_000326100	npp-27.2-Fw	ATGATATATGCAAATATTAATAGAAAAGCC	PCRfin - PCRsem
HmN_000326100	npp-27.2-Rv	TTACATAAGACCTCGTTTGC GG TATC	PCRfin - PCRsem
HmN_000234350	npp-28-Fw	ATGAAGTGTATATTCTTCTCATCTG	PCRfin - PCRsem
HmN_000234350	npp-28-Rv	TTATTTTTTATTCTGAAATCCATAATTCTCC	PCRfin - PCRsem
HmN_000212550	npp-29.1-Fw	TTCACAACCTCATCGTCGATTC	PCRfin - PCRsem - WMISH
HmN_000212550	npp-29.1-Rv	TTACCAGTATATCAT TCGCTTCTATG	PCRfin - PCRsem - WMISH
HmN_000212650	npp-29.2-Fw	ATGAAGACGATATTCGTGGTTTTTAC	PCRfin - PCRsem - WMISH
HmN_000212650	npp-29.2-Rv	TTACCAATAAATCATTCTTTTTGTAAATATG	PCRfin - PCRsem - WMISH
HmN_000050100	npp-2-Fw	ATGCTACAAACGATATTCCTTGC	PCRfin - PCRsem - WMISH
HmN_000050100	npp-2-Rv	TTAGCCTATGAATCCACGTCG	PCRfin - PCRsem - WMISH
HmN_000183900	npp-30-Fw	ATGAACTCTCCCGTTTACTTG	PCRfin - PCRsem
HmN_000183900	npp-30-Rv	TCAGCGTCTAGTCGACCAG	PCRfin - PCRsem
HmN_000223650	npp-31/32.1-Fw	ATGATCAACAGACTTCTCTGCTTATC	PCRfin - PCRsem
HmN_000223650	npp-31/32.1-Rv	TGGGGCACGTTTCTTCGTAGTAG	PCRfin - PCRsem
HmN_000205400	npp-31/32.2-Fw	ATT GTC TTC TGA TTC TTT TTG C	PCRfin - PCRsem
HmN_000205400	npp-31/32.2-Rv	TTAAGCCTCCATGAAGGAATG	PCRfin - PCRsem
HmN_000142950	npp-31/32.3-Fw	ATGTTGATACTAAGTTCTTATCTTCG	PCRfin - PCRsem
HmN_000142950	npp-31/32.3-Rv	TTACTCAACCTCAAATAATACCTCG	PCRfin - PCRsem
HmN_000514300	npp-33-Fw	ATGGCATTTTCCAAAATTTTGTTC	PCRfin - PCRsem - WMISH
HmN_000514300	npp-33-Rv	TTAACGACCAAATATTCCTCC	PCRfin - PCRsem - WMISH
HmN_000315550	npp-34-Fw	ATGCACAGTCTCATATATCTCTGCTG	PCRfin - PCRsem
HmN_000315550	npp-34-Rv	TCATCGACGTCCATATCTAGAATGGG	PCRfin - PCRsem
HmN_000148600	npp-35-Fw	ATGAAAGACTTTTCTTCTCTCC	PCRfin - PCRsem
HmN_000148600	npp-35-Rv	TCAACCGAGACGTGAATGGAAG	PCRfin - PCRsem
HmN_000511300	npp-36-Fw	ATGAGAATGAGTGCTAATCTCCAAG	PCRfin - PCRsem
HmN_000511300	npp-36-Rv	TTAAACTTCAAGTAGTCCACCTC	PCRfin - PCRsem
HmN_000695950	npp-37-Fw	ATGCTCTATTCAAACCTCTATTTTTC	PCRfin - PCRsem
HmN_000695950	npp-37-Rv	CTAGTAACTCTTTTAAAGTCAGTCCAC	PCRfin - PCRsem
HmN_000382900	npp-38-Fw	ATGGATATCTTCATCCTCATCAC	PCRfin - PCRsem - WMISH
HmN_000382900	npp-38-Rv	TCAGTAATCCGCAATATGCGTC	PCRfin - PCRsem - WMISH
HmN_000430600	npp-40-Fw	ATGCGATCTCTCAGTCCAC	PCRfin - PCRsem
HmN_000430600	npp-40-Rv	TTATTGTCGTTTGTGTGTTTTTC	PCRfin - PCRsem
HmN_000866400	npp-41-Fw	ATGACCATGTTGGCTCTGCTTAC	PCRfin - PCRsem - WMISH
HmN_000866400	npp-41-Rv	TCAGGATTGCACACAGCCCC	PCRfin - PCRsem - WMISH
HmN_000876950	npp-42-Fw	ATGGAACTGATAGATTACCACTTTTG	PCRfin - PCRsem
HmN_000876950	npp-42-Rv	TTAACCAATGTCGTAACCTTATAACAG	PCRfin - PCRsem
HmN_000508100	npp-43-Fw	ATGTCAACTATTGAAAGAATTTTC	PCRfin - PCRsem
HmN_000508100	npp-43-Rv	TTAAGGATATGCCATGTTTCC	PCRfin - PCRsem
HmN_000197700	npp-44.1-Fw	ATGTGGTACCTGAATTACTTGC	PCRfin - PCRsem

HmN_000197700	npp-44.1-Rv	TCAGCCAACCCGAATGGCTG	PCRfin - PCRsem
HmN_000827150	npp-44.2-Fw	ATGGAAAACCTTACATAATTTAAAATTG	PCRfin - PCRsem
HmN_000827150	npp-44.2-Rv	TTATCTACTCTGATAGCAGGTTTG	PCRfin - PCRsem
HmN_000540950	npp-45-Fw	ATGAGAGGTCATATTCCTCAG	PCRfin - PCRsem
HmN_000540950	npp-45-Rv	TTAACCGAAGTGGTAGGGCATG	PCRfin - PCRsem
HmN_000088450	npp-46-Fw	ATGTCATCTCATCGGCTC	PCRfin - PCRsem -WMISH
HmN_000088450	npp-46-Rv	GAAGTTAGAGAATTTGGCTGAATACATC	PCRfin - PCRsem -WMISH
HmN_000255600	npp-49.1-Fw	TTAAGCTCTTCTTCTTCTCGG	PCRfin - PCRsem -WMISH
HmN_000255600	npp-49.1-Rv	TTACATGAGCCCAGCAAGTTC	PCRfin - PCRsem -WMISH
HmN_000255700	npp-49.2-Fw	ATTTGCTGCAAATTCTACAACC	PCRfin - PCRsem -WMISH
HmN_000255700	npp-49.2-Rv	ATGAAAGATCAGCAAGCTCTCG	PCRfin - PCRsem -WMISH
HmN_000255800	npp-49.3-Fw	CCTTGTGGCACAATCTTTG	PCRfin - PCRsem -WMISH
HmN_000255800	npp-49.3-Rv	CAGCTAATCTCTGAGTCCCTG	PCRfin - PCRsem -WMISH
HmN_000593200	npp-49.4-Fw	TATGCCTACTGTTCTTGCCTC	PCRfin - PCRsem -WMISH
HmN_000593200	npp-49.4-Rv	ACATAAGGCCAGCTAATCTTG	PCRfin - PCRsem -WMISH
HmN_000166500	npp-4-Fw	ATGATAAGGATTTTCATGTTGTGTTT	PCRfin - PCRsem
HmN_000166500	npp-4-Rv	TTAATGCCACTTTTGAATTAACG	PCRfin - PCRsem
HmN_000072750	npp-5-Fw	ATGTGCCAAGATTCGGCCTTC	PCRfin - PCRsem
HmN_000072750	npp-5-Rv	TTAGCCCCAAGGGAGGTCAAG	PCRfin - PCRsem
HmN_000648800	npp-6-Fw	ATGCTCACCAATTCTTAACATG	PCRfin - PCRsem -WMISH
HmN_000648800	npp-6-Rv	CTACTTTCCAAGTCGAAGAAGTC	PCRfin - PCRsem -WMISH
HmN_000147700.1	NPY-Receptor1-Fw	TGCCTTTGCTCACGAAATCTC	WMISH
HmN_000147700.1	NPY-Receptor1-Rv	TAGCGAATTTCTGGTCTCCAGC	WMISH
HmN_000399200.1	NPY-Receptor2-Fw	GCCCTTGTATTTCCAGTGTCG	WMISH
HmN_000399200.1	NPY-Receptor2-Rv	GGGTGATAGGTTGAATGTTGCG	WMISH
HmN_000480300.1	NPY-Receptor3-Fw	ATAGTATTGAGCCGTGCGTG	WMISH
HmN_000480300.1	NPY-Receptor3-Rv	CTGGCAAGGAGGATACTGGTTC	WMISH
HmN_000640600.1	NPY-Receptor4-Fw	GACATGGAAGTGAGGCGAATG	WMISH
HmN_000640600.1	NPY-Receptor4-Rv	TTAACAGCTGATCGACTCGG	WMISH
HmN_000699100.1	NPY-Receptor5-Fw	AATCAACCGACTAAGGCCTCTG	WMISH
HmN_000699100.1	NPY-Receptor5-Rv	AGACGCTTCCCTACTCCTGG	WMISH
HmN_000583100	PC2.Long-Fw	CTCTTTCGTAAGAATGGTACATCCAC	WMISH
HmN_000583100	PC2.Long-Rv	CCTAATGCAGGATCTGGACCTTC	WMISH
HmN_000583100	PC2.Sm-Fw	TCTCAAGTAATGACGCTCATCC	PCRfin - PCRsem
HmN_000583100	PC2.Sm-Rv	ATTGTCCACATTGATGCAGC	PCRfin - PCRsem
HmN_000695400.1	PK-NMU-Receptor-Fw	TCATCAACATTCGTGGTCTTCG	WMISH
HmN_000695400.1	PK-NMU-Receptor-Rv	AGGTCCGTAGCAGGAATTCG	WMISH
HmN_000056300	qPCR-AgB056300-Fw	GCTAATGTTGCGCTCAGAACGAC	qPCR
HmN_000056300	qPCR-AgB056300-Rv	TCGGAGCTCTGTAATTGTTGGCTG	qPCR
HmN_000056400	qPCR-AgB056400-Fw	GACCGATTCTTGTGCTGAAGATCCG	qPCR
HmN_000056400	qPCR-AgB056400-Rv	CACCTGCTTCTTCTTCTGCG	qPCR

HmN_000056500	qPCR-AgB056500-Fw	GGGAACGATTCTACGACGAAGATCC	qPCR
HmN_000056500	qPCR-AgB056500-Rv	TCTCTCAAGCGTCCACGCACTTC	qPCR
HmN_000804500	qPCR-AgB804500-Fw	GCAGCAAAGAAGGTGATGAAAGGC	qPCR
HmN_000804500	qPCR-AgB804500-Rv	AATGTTTGGCCAGTTGGATCTTCG	qPCR
HmN_000893100	qPCR-AgB893100-Fw	CTGATGACAACCAAGCCCGTGTG	qPCR
HmN_000893100	qPCR-AgB893100-Rv	CGCACATGTCTCCTGGGCAATATC	qPCR
HmN_000893200	qPCR-AgB893200-Fw	TCTGTCTTATCGATTGACTGTCCTCG	qPCR
HmN_000893200	qPCR-AgB893200-Rv	TTGCTTCATTTAGCGAATTTTCATCAG	qPCR
HmN_000893300	qPCR-AgB893300-Fw	AACTCTTTAGCCTTCCTTGCTGTAC	qPCR
HmN_000893300	qPCR-AgB893300-Rv	TTCAGTTCACGAAACCGCTTCAAC	qPCR
HmN_000334100.1	SIFa-Receptor-Fw	CTTACGCCACAATCTTCATTGC	WMISH
HmN_000334100.1	SIFa-Receptor-Rv	TCAAAGTGTGCCGAGGCAG	WMISH
HmN_000994100.1	TH.Long-Fw	ATCGGTGACTTTGTCAACCTGC	WMISH
HmN_000994100.1	TH.Long-Rv	CATCTGGGCTTTGATATCTCC	WMISH
HmN_000994100.1	TH.Sm-Fw	GGATGCTGAAGTTCAAGACAATGG	PCRfin - PCRsem
HmN_000994100.1	TH.Sm-Rv	CTAATTGTGGCAAATCGTCTCAC	PCRfin - PCRsem
Hm_TKR_ModeloMP_WBP10	TK-Receptor-Fw	TTCTCCTCCTCTCCCACTTCC	WMISH
Hm_TKR_ModeloMP_WBP10	TK-Receptor-Rv	TCCACGATCTGACCACAATTTG	WMISH
HmN_000337500	TransIniFact4E-1A-Fw	AACGATAGTAAAGGCGAAGGTGATTGAG	qPCR
HmN_000337500	TransIniFact4E-1A-Rv	GCATTCTTTGAGTCCAATCAGTACCAAC	qPCR
HmN_000875700.1	TRH-Receptor-Fw	ATGAATGCCAACATGTCCACTG	WMISH
HmN_000875700.1	TRH-Receptor-Rv	AACGAACTTGACGACTTCTGTC	WMISH
HmN_000748900.1	Vglut.Long-Fw	GGTGAACCTCCTGACACGCATC	WMISH
HmN_000748900.1	Vglut.Long-Rv	TTTCATCTGCGCATCTTCAGC	WMISH
HmN_000748900.1	Vglut.Sm-Fw	TCACGTCCATGCCGTCTATG	PCRfin - PCRsem
HmN_000748900.1	Vglut.Sm-Rv	CCTCTGCCCACTGCTGTTTCTC	PCRfin - PCRsem

**Tabla M.1. Cebadores de los genes de interés de *H. microstoma* para este trabajo.** Se especifica los ensayos en los que fueron utilizados. PCRfin: PCR a tiempo final; PCRsem: RT-PCR semicuantitativa; qPCR: PCR cuantitativa; WMISH: *Whole mount in situ hybridization*.

### **- RT-PCR semicuantitativa.**

Se realizaron ensayos de RT-PCR semicuantitativas con el fin de visualizar diferencias grandes en los niveles de expresión entre estadios para los genes de interés. Se generó ADN copia (ADNc) a partir de 750 ng de ARN de cada estadio, utilizando la retrotranscriptasa SuperScript II (Invitrogen). Se utilizó MangoTaq™ DNA Polymerase (Bioline), utilizando el protocolo estándar brindado para esta polimerasa, procediendo de la siguiente manera: se realizaron 26 ciclos, de estos tubos se tomaron 5 µl de muestra, se dejó ciclando 4 ciclos más el resto del tubo de PCR (30 ciclos en total en total) y se tomaron 5 µl nuevamente, finalmente se dejó a los tubos de PCR por 4 ciclos más (34 en total). De esta forma se obtuvieron amplificaciones con diferentes rondas de ciclado: 26, 30 y 34 ciclos. Los



resultados en cada valor de ciclado fueron analizados mediante gel de agarosa. Los ciclados consistieron en: 3 minutos iniciales a 93°C, para luego ciclar con los siguientes valores, 30 segundos a 93°C, 30 segundos a la T<sub>m</sub> de los cebadores y 1 minuto a 72°C (para genes más largos se utilizó un tiempo de 1 minuto y medio en esta última parte del ciclado).

En el desarrollo de estos ensayos era importante saber que el ADNc de huevos no estaba contaminado con ADNc de adultos, para lo cual se utilizó la amplificación del gen específico y altamente expresado en adultos de Antígeno B (HmN\_000056300). Se utilizó como gen housekeeping al gen ELP (por su nombre en inglés, *Ezrin-radixin-Moesin-like protein*) seleccionado a partir de los datos transcriptómicos de Tsai et al., 2013 [20], y de resultados de que mostraban expresión constante de este gen en *E. multilocularis* [380], ya que cuando se realizaron estos experimentos aún no disponíamos los datos de RNAseq obtenidos en este trabajo. A partir de la obtención de los datos de RNAseq y utilizando el coeficiente de variación génica entre estadios, se identificó a un factor de inicio de la traducción 4E-1A (HmN\_000337500) como un buen gen housekeeping, el cual fue utilizado en los experimentos de qPCR, descritos en el artículo del capítulo 2 de resultados: “Stage-specific transcriptomic analysis of the model cestode *Hymenolepis microstoma*” [214].

#### **- Generación de sondas de ARN marcadas con digoxigenina para hibridación *in situ***

Las sondas de ARN se generaron a partir de los productos de PCR de los diferentes genes de interés. Se insertó a estos productos de PCR en plásmidos pGEM<sup>®</sup>-T (Promega), para posteriormente con ellos transformar bacterias *Escherichia coli* competentes, generadas por nuestro laboratorio bajo protocolos previamente establecidos [381]. Las colonias con inserto fueron identificadas mediante PCR “de colonia” (utilizando a las bacterias de los clones analizados directamente como molde de la PCR), utilizando cebadores para los promotores T7 y SP6 (T7 (5'- TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG G -3'), SP6 (5'- ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT -3')). Luego de confirmar la presencia de un inserto del tamaño esperado de esta manera, se procedió a amplificar estos clones por cultivo estándar, y purificar a su ADN plasmídico (utilizando al kit GeneJET (ThermoFisher, K0502), o en algunos casos mediante protocolos estándar de laboratorio de lisis alcalina [382]). Los insertos fueron secuenciados mediante el método de Sanger por la empresa Macrogen, Corea. Luego de confirmar la identidad y la orientación de los insertos, se realizaron sondas de ARN utilizando enzimas polimerasas T7 y SP6 (ThermoFisher). Se amplificaron moldes para la generación de las sondas a partir de PCR de los insertos de ADN de interés confirmados por secuenciación. Utilizando estos moldes se produjeron las sondas por transcripción *in vitro* (IVT, *in vitro transcription*), utilizando cebadores T7 y SP6. Mediante el análisis de secuenciación se determinó la orientación de los insertos, de esta forma se

puede evidenciar si al realizar la IVT con polimerasa T7 o SP6, se tiene una sonda Sentido (S) o Anti Sentido (AS). Las sondas AS son las complementarias al ARNm para cada gen, por lo que serán las sondas producidas para la detección por WMISH, mientras que las sondas S son las que utilizamos como control negativo. Las reacciones de IVT consistieron en la mezcla de: buffer de transcripción 1x, mezcla de rNTPs con DIG-UTP (concentraciones finales 1 mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM GTP, 0.65 mM UTP, 0,35 mM DIG-UTP (Sigma)), inhibidor de ARNasa RNaseOUT (0,5 µl por reacción de 20 µl, Invitrogen), ADN molde (2 µg) y ARN polimerasa SP6 o T7 (1,5 µl por reacción de 20 µl, Invitrogen). Las reacciones se incubaron durante 2 horas a 37°C, siendo luego tratadas con ADNasa (TURBO™ DNase, ThermoFisher) durante 15 minutos a 37 °. Las sondas generadas se purificaron con RNA Clean & Concentrator (Zymo, R1015). La integridad de las mismas fue comprobada mediante gel de agarosa y se cuantificó la cantidad de marca de las mismas mediante Dot Blot, comparando con una sonda marcada con DIG-UTP de concentración conocida comercial (Sigma-Aldrich). Las sondas fueron guardadas a -80°C hasta su uso.

#### **- Hibridación *in situ* fluorescente *in toto* (WMISH).**

Se realizaron WMISH para los tres estadios del ciclo de vida de *H. microstoma*. El protocolo utilizado fue el descrito por Koziol y colaboradores en 2014 [144]. Los detalles de los diferentes pasos de esta técnica se describen en el Apéndice 2 de este trabajo. Brevemente, se utilizaron sondas de ARN complementarias a los genes de interés marcadas con digoxigenina. Tras la hibridación, las sondas fueron detectadas mediante un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a peroxidasa, utilizando como reactivo tiramida conjugada a FITC (produciendo que el FITC con el grupo tiramida se una covalentemente a las regiones en donde está presente esta enzima y de esta forma evidenciar la detección de células que expresen a estos genes). Esta técnica también permitió que en algunos casos los ejemplares utilizados, luego de la detección por WMISH, fueran incluidos en bloques para criocortes y de esta forma conseguir cortes histológicos para la inspección de estructuras en detalle.

#### **- Tinciones nucleares.**

La tinción nuclear se realizó con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, 1 µg/ml) o Verde de Metilo (2%, [383]). El tiempo de exposición a estos compuestos dependió del tamaño de la muestra, para criocortes se tiñó durante 10 minutos, mientras que para adultos o larvas de *H. microstoma* enteras se dejó a los tejidos toda la noche tiñendo a 4°C y con agitación.

### **- Detección por Inmunohistofluorescencia (IHF).**

Se realizaron ensayos de IHF tanto *in toto* como sobre criocortes (siguiendo la metodología utilizada por Koziol y colaboradores en 2013 [144]). Las metodologías utilizadas se describen en detalle en los Apéndices 4 y 5. El protocolo es muy similar en ambos casos, aunque con lavados, tiempos de bloqueo y de incubación de anticuerpos más largos y exhaustivos en la versión *in toto* de la técnica.

Para la detección del motivo RFamida, común de varios neuropéptidos, se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo anti-FMRFamida (Immunostar, dilución 1/250).

Para la detección del neuropéptido Npp-46 se utilizó un anticuerpo policlonal generado por Genescript contra el péptido sintético IIDPLMYSAKFSNF. Se utilizó un péptido con una cisteína adicional en el extremo N-terminal (“CIIDPLMYSAKFSNF”) para conjugar a la hemocianina KLH y realizar inmunizaciones en tres conejos. Se sacrificó a los animales, se combinaron los sueros y se purificó a los anticuerpos por afinidad. Los anticuerpos se utilizaron a una concentración final de 1/500 para las inmunodetecciones.

### **- Detección de EdU.**

Se detectaron a las células proliferantes que se encontraban en fase S del ciclo celular utilizando al kit comercial Click-iT® Plus EdU Alexa Fluor® 555 Imaging Kit (Thermofisher). Se añadió en el medio de cultivo al análogo de timidina EdU (por su nombre en inglés, 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine) [384] a una concentración de 10  $\mu$ M, con un tiempo variable dependiendo de cada experimento (por ejemplo, durante 2 horas para los experimentos de pulso y caza en adultos). Se siguieron los pasos establecidos en el protocolo de detección de este kit.

### **- Obtención y Análisis de imágenes de microscopía.**

Las imágenes de microscopía de fluorescencia se obtuvieron principalmente mediante Microscopía de Barrido Laser Confocal, utilizando al servicio de Microscopía del Instituto Pasteur de Montevideo. Las imágenes de este trabajo fueron tomadas en los Microscopios de Barrido Láser Confocal Zeiss LSM 800CyAn y Zeiss LSM 880. Otros experimentos fueron registrados mediante el uso de un Microscopio de Epifluorescencia Nikon Microphot-FXA de la Sección Biología Celular de Facultad de Ciencias.

Las imágenes de los parásitos en cultivo fueron obtenidas mediante el Microscopio Invertido Leitz Labovert FS, utilizando una cámara USB CamLabLite de Bresser, de la Sección Biología Celular de la Facultad de Ciencias.

Para el análisis de todas las imágenes de microscopía, obtenidas a partir de los diferentes protocolos descritos, se utilizó al programa libre FIJI (fiji is just imagej) [385].

#### **- Detección por peptidómica de neuropéptidos.**

Para esta parte se trabajó en colaboración con el laboratorio de la Dra. Liesbet Temmerman, de la Universidad Católica de Leuven en Bélgica (Katholieke Universiteit Leuven), quienes tienen una gran experiencia en el estudio peptidómico mediante espectrometría de masa [309,386,387]. Para esta parte del trabajo nosotros realizamos el colectado y enviado de las muestras, junto al posterior análisis de los resultados, mientras que en el laboratorio de la Dra. Temmerman se hicieron las extracciones y los experimentos correspondientes a partir de las muestras que nosotros les enviamos. Se extrajeron las muestras a ser analizadas en nuestro laboratorio de Facultad de Ciencias, todas ellas de adultos de *H. microstoma*: dos muestras de adultos completos con segmentos grávidos (una de ellas con una gran cantidad de tejidos, lo que permitió la detección de mayor cantidad de neuropéptidos), una de un adulto con segmentos en desarrollo, pero sin los segmentos grávidos (sin oncóferas en desarrollo) y dos muestras de únicamente la región más anterior (escólex y cuello). Se lavaron en PBS con material de plástico no autoclavado, se congelaron con Nitrógeno líquido y se enviaron al laboratorio de la Dra. Temmerman con hielo seco. El protocolo de extracción usado por este laboratorio se encuentra publicado previamente [309,386], brevemente: se realiza una homogenización mecánica y por sonicación en Metanol/Acético en frío, se concentra por speed-vac, se diluye en Agua/Ácido fórmico, se delipida con n-hexano (Filtrado con Amicon Ultra-4-10 kDa) se vuelve a concentrar por speed-vac. Para la obtención de los datos peptidómicos se utilizó Quadrupole-Orbitrap LC-MS/MS. Se analizaron los datos obtenidos, comparando el alineamiento de los péptidos detectados contra las proteínas predichas a partir del genoma de *H. microstoma* (versión 1 [20] y versión 3 [21] del genoma, utilizando a los npps predichos en 2016 por Koziol et al. [79]), buscando manualmente a partir de los *hits* la presencia tanto de los neuropéptidos maduros como de las regiones flanqueantes de los propéptidos procesados.

### 3- Métodos de cultivo de parásitos.

#### **- Activación de cisticercoides.**

Se optimizó este protocolo de activación basándonos en lo previamente reportado en la bibliografía [304]. El protocolo paso a paso de esta activación se describe en el Apéndice 6 de este trabajo. La metodología se basa en imitar *in vitro* a las condiciones del sistema digestivo por las que pasan los cisticercoides en el hospedero definitivo. Se recolecta la cantidad necesaria de cisticercoides completamente desarrollados (con al menos dos semanas post infección), mediante disección de escarabajos en lupa estereoscópica, y se los coloca en PBS, lavándolos varias veces en este mismo buffer. Se incuban en una solución de PBS, 0,17% HCl y 1% Pepsina (Sigma) durante 30 minutos con agitación. Se los lava dos veces con PBS, y luego se pasa a una solución precalentada de Hanks estéril (Sigma, pH 7,5), 0,1% Taurocolato de Sodio y 0,5% Tripsina (Sigma), se los deja en esta solución a 37°C agitándolos ocasionalmente. Se puede seguir el proceso bajo lupa para ver a los cisticercoides que salen de la cápsula y comienzan a moverse (típicamente comenzando a los 20 minutos). Si se está trabajando en esterilidad se dejan en el tubo estéril en la estufa a 37°C durante 40 minutos para asegurar que todos se activen. En algunos casos en los que era importante no perder cisticercoides, se realizó el protocolo en placas de Petri de 5 cm, y se siguió con el protocolo bajo lupa.

Para los experimentos en los que se pasó a trabajar en condiciones de cultivo, se tuvieron en cuenta algunos aspectos para evitar la contaminación de las larvas. En estos casos se trabajó con tubos de centrifuga estériles, con la solución de Hanks-Taurocolato-Tripsina filtrada en el momento con filtros de 0,22 µm (Sigma, F8148), y con lavados iniciales adicionales utilizando buffer PBS autoclavado, centrifugando en cada paso durante 1 minuto a 2000g.

#### **- Cultivo de cisticercoides.**

Se probaron diferentes formas de cultivo de cisticercoides basándonos en los métodos descritos previamente en la literatura [24,25,27]. Todas las metodologías aquí empleadas tienen en común que comienzan con la activación de los cisticercoides, con el método descrito en el apartado anterior, trabajando en condiciones que eviten la contaminación de las muestras. A partir de los lavados de PBS del protocolo de activación posteriores al paso con Pepsina y HCl, se utilizaron únicamente soluciones estériles y se trabajó en flujo laminar. No se visualizó a los cisticercoides durante este proceso de activación, sino que se los mantuvo en un tubo de centrifuga cerrado que se centrifugó a 1000-2000 g durante 1 minuto entre cada lavado. Se incubaron a los cisticercoides en la

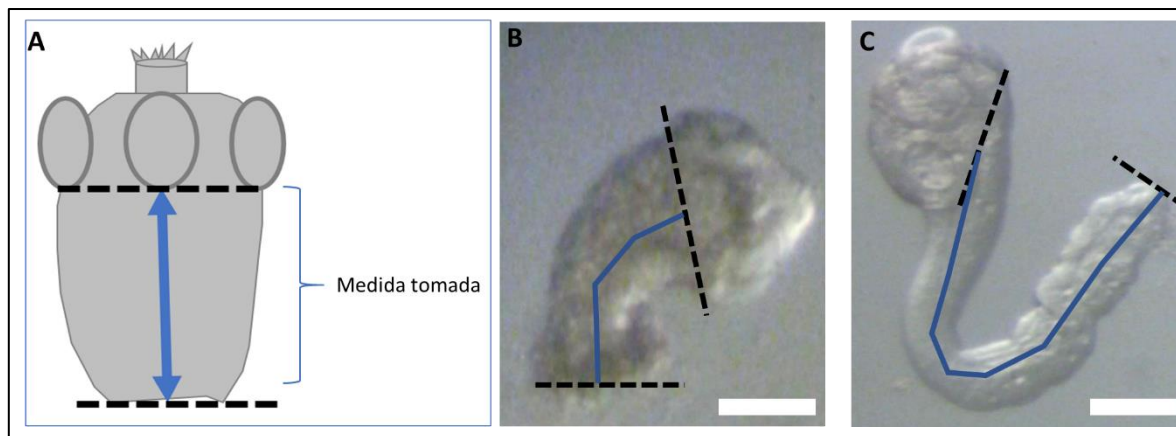
solución de tripsina y taurocolato de sodio filtrada en el momento con un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Sigma, F8148). Se dejan a los cisticercoides en la estufa en el tubo durante 40 minutos, invirtiendo el tubo ocasionalmente (aproximadamente cada 5 minutos). Posteriormente se realiza un lavado de esta solución con PBS + 5% suero para inactivar la tripsina y evitar que los cisticercoides se peguen al tubo. Se separan los cisticercoides en las placas a utilizar de manera equitativa mezclando muy bien en cada porción de volumen que se va retirando. Por ejemplo, si vamos a tener un experimento para el que necesitamos 6 pocillos y tenemos 1200 ml se pondrán 200  $\mu\text{l}$  en cada pocillo y en cada paso se mezcló con la pipeta repetidas veces dentro del tubo antes de tomar y colocar en la placa, se recomienda realizar esto lo más cerca del fondo del tubo posible para tener cantidades similares de cisticercoides en cada pocillo.

Luego del proceso de activación en esterilidad de cisticercoides que se describe previamente, se pasó a probar diferentes medios para cultivarlos. Se utilizó como medio base al RPMI, modificado por el añadido de HEPES como amortiguador adicional (Sigma, R5886). A este medio se le añadieron diferentes suplementos: suero fetal bovino (SFB, Capricorn), hemina y taurocolato de sodio, utilizando siempre 1% de antibiótico y antimicótico (antianti, Gibco). Adicionalmente se combinó a estos medios con una base sólida de Agar-Base Triptona (Biokey), con o sin el agregado adicional en esta base de sangre ovina (5%). De esta forma se determinaron las condiciones ideales de cultivo de los cisticercoides activados a partir de su crecimiento en las diferentes condiciones (por la medida de su longitud a lo largo de los días,) y por su morfología (ya que en algunas condiciones con el paso de los días se pueden observar aberraciones morfológicas). Como se muestra en la sección de resultados, los mejores resultados fueron obtenidos con el siguiente medio bifásico: RPMI, 30% de suero fetal bovino, 1% antianti, 0,15  $\mu\text{m}$  de hemina, 0,1% de taurocolato de sodio, con una base sólida de Agar-Base Triptona con 5% de sangre ovina. Este medio bifásico de cultivo fue el utilizado en los experimentos descriptos posteriormente que utilizan cisticercoides activados en cultivo *in vitro* a largo plazo (días), y también en los experimentos de pulso y caza en adultos.

La frecuencia del cambio de medio fue variable dependiendo del experimento. Para los experimentos realizados para optimizar la metodología de cultivo, se cambió el medio cada 2-3 días, cambiando la mitad del medio cuidadosamente, para no perder cisticercoides en estos pasos. Por otro lado, para las pruebas de cultivo con drogas o neuropéptidos, el medio fue cambiado 2 veces por día, para asegurarnos de mantener la presencia de estos compuestos en la concentración deseada.

La medida de la longitud de los cisticercoides se tomó en estos, y en los siguientes experimentos, como la longitud abarcada entre el borde posterior de las ventosas hasta el

borde posterior del cuerpo, de esta forma se logra que la extensión y retracción del escólex influyera lo menos posible las medidas (**Figura M.1**).



**Figura M.1. Medidas de cisticercoides en cultivo.** **A**, esquema de las zonas consideradas para las medidas, desde el borde posterior de las ventosas, hasta el final del cuerpo. **B**, cisticercoides activado a tiempo 0, y **C**, cisticercoides cultivado y alargado luego de 9 días en cultivo, la línea azul marca la distancia considerada para las medidas en estos experimentos.

### **- Drogas Utilizadas en los ensayos *in vitro*.**

Las drogas utilizadas en los ensayos *in vitro* se muestran en la **Tabla M.2**

Nombre	Acción sobre la vía.	Mecanismo de acción	Vía/s Afectada/s	Solvente
H-89 (LC Labs)	Inhibidor	Inhibe PKAcat	PKA (PKG y PKC en menor medida)	Agua
PKI (Sigma)	Inhibidor	Inhibe PKAcat	PKA	DMSO
SQ22536 (Sigma)	Inhibidor	Inhibe AC	PKA	DMSO
FSK (LC Labs)	Activador	Activa AC	PKA	DMSO
IBMX (Sigma)	Activador	Inhibe FD	PKA	DMSO
Gö6983 (Sigma)	Inhibidor	Inhibe PKC	PKC	DMSO

Quelerritrina (Sigma)	Inhibidor	Inhibe PKC	PKC (y otros blancos)	DMSO
U73122 (Sigma)	Inhibidor	Inhibe Fosfolipasa C	PKC	DMSO
PMA (LC Labs)	Activador	Activa PKC	PKC	DMSO
Bafilomicina (LC Labs)	Inhibidor	Bombas de protones de vesículas sinápticas	Neurotransmisores clásicos.	DMSO

**Tabla M.2. Drogas Utilizadas en los ensayos *in vitro*, vía afectada y sus respectivos solventes.** AC: adenilato ciclasa; FD: fosfodiesterasa; PKA: proteína quinasa dependiente de AMPc; PKAcat: subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de AMPc; PKC: proteína quinasa dependiente de calcio.

**- Análisis del efecto de drogas sobre la proliferación celular en cisticercoides.**

Se realizaron cultivos de cisticercoides durante 5 días, cultivándolos como se describe anteriormente, se cambió la mitad del medio de cultivo 2 veces por día incorporando diferentes drogas inhibitoras de las vías de PKA y PKC. Se utilizaron concentraciones de drogas de 10  $\mu$ M para: H-89, Gö6983 y Quelerritrina. Junto a estos experimentos se cultivaron cisticercoides control con el agregado de agua estéril (control para H-89) y con el agregado de DMSO a concentración de 1% (control para Gö6983 y Quelerritrina). Luego de los 5 días de cultivo se colocó en cada condición EdU a una concentración de 10  $\mu$ M durante 1 hora para que fuera incorporado por las células proliferantes en fase S. Posteriormente se retiró a los cisticercoides de cultivo, se los lavó con PBS y se los fijó con Etanol 100%. Se reveló el marcado con EdU, se montó a los ejemplares utilizando Glicerol 80% + 50 mM de Tris pH 7,5 bajo lupa estereoscópica. Se contaron la cantidad de núcleos positivos para la marca de EdU de cada cisticercoide, detectando los núcleos positivos en planos en el eje z distantes 8  $\mu$ m.

**- Neuropéptidos utilizados en ensayos *in vitro*.**

Los neuropéptidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados *in vitro* con calidad para biología celular (>90% pureza) (LifeTein LLC). Estos neuropéptidos se muestran en la **Tabla M.3**. En el caso de *npp-2* el gen codifica para 2 neuropéptidos maduros diferentes “RGFlamida” y “RSFGLamida” se seleccionó al primero de estos, por ser el que mostraba mayor conservación de secuencia entre diferentes especies de cestodos. En el caso de los



genes *npp-29.1* y *npp-29.2* ambos tienen en su secuencia aminoacídica 2 neuropéptidos, todos estos con la misma secuencia de aminoácidos de neuropéptido maduro que es la utilizada aquí.

Nombre	Secuencia	Solvente
Npp-2	RGFlamida	Agua
Npp-29	MIYW	Agua
Npp-33	TPYSGGIFamida	Agua
Npp-38	ILADY	Agua
Npp-41	FFCNPWGCVQS (con puente disulfuro entre C <sub>3</sub> y C <sub>8</sub> )	N, N-dimetilformamida (DMF)
Npp-46	IIDPLMYSKFSNF	Dimetilsulfóxido (DMSO)
Npp-2Inv	IFGR	Agua

Tabla M.3. Neuropéptidos utilizados en los ensayos *in vitro*, y los solventes utilizados para su reconstitución.

**- Análisis del efecto de neuropéptidos sobre la proliferación de cisticercoides tras la activación.**

Se realizó el testeo del efecto de neuropéptidos sobre los patrones de proliferación celular presentes en cisticercoides con cultivos a corto plazo. Se utilizaron los neuropéptidos: Npp-2, Npp-29, Npp-33, Npp-38, Npp-41 y Npp-46. También se utilizó un péptido control con los mismos aminoácidos del neuropéptido Npp-2, pero en diferente orden y sin amidación N-terminal a modo de control (llamado, Npp-2Inv). El neuropéptido Npp-41 se encuentra disuelto en dimetilformamida (DMF) por lo que se agregó un control de DMF. El neuropéptido *Npp-46* se encuentra disuelto en DMSO por lo que se agregó un control de DMSO. A su vez, se agregó un control de agua estéril, para los demás péptidos.

Estas pruebas se realizaron comenzando con la activación de los cisticercoides, como se menciona anteriormente, salvo que a través de todo el proceso los ejemplares se vieron en presencia de los neuropéptidos a una concentración de 100  $\mu$ M. Luego de finalizada la activación, se pasó a los cisticercoides a una estufa de 37°C en medio RPMI con SFB 10% durante 3 horas en presencia de los neuropéptidos. Luego de transcurrido este tiempo se colocó EdU en cada condición a una concentración de 10  $\mu$ M durante una hora. Posteriormente, se retiró a los cisticercoides de cultivo, se los lavó con PBS y se los fijó con Etanol 100%. Se reveló el marcado con EdU, se montó a los ejemplares utilizando Glicerol

80% + 50mM de Tris pH 7,5 bajo lupa estereoscópica. Se contaron la cantidad de núcleos positivos para la marca de EdU de cada cisticercoide, en planos en el eje Z, distantes 2  $\mu\text{m}$ .

#### **- Efectos de Neuropéptidos sobre el crecimiento de cisticercoides en cultivo.**

Se cultivaron cisticercoides durante 7 días en medio bifásico, como se describe previamente, pero bajo la presencia de neuropéptidos en el medio de cultivo a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  (junto a los controles de agua, DMF y DMSO). Se realizó el cultivo cambiando la mitad del medio de cultivo 2 veces por día. Finalizado este tiempo se tomaron medidas de la misma forma mostrada para la comparación de los diferentes medios. Las medidas se tomaron antes de ser fijados con los cisticercoides en los medios de cultivo.

#### **- Cultivo de adultos y experimentos de pulso y caza con EdU.**

Se utilizó el medio de cultivo que funcionó mejor en cultivos de cisticercoides (descrito previamente). Los adultos se cultivaron en frascos de cultivo T-25. Se realizaron 2 cambios de medio por día, lavando 3 veces con PBS precalentado a 37°C y cambiando de botella de cultivo en cada lavado, para evitar la contaminación de los cultivos. Con esta metodología de cultivo se desarrollaron experimentos de pulso y caza de la siguiente manera: se utilizaron 2 adultos por botella para ser cultivados manteniéndose juntos a lo largo del cultivo, y se prepararon 4 botellas de esta forma (con 2 adultos cada una); se incubaron a todos los grupos con EdU 10  $\mu\text{M}$  durante 2 horas sin la base de agar, esto fue considerado el tiempo 0 (“Pulso”). Luego de las 2 horas de EdU, se fijaron a los adultos del grupo de tiempo 0, continuando el cultivo con el resto de los ejemplares en medio de cultivo sin EdU en botellas con base de agar, y fijándolos a los tiempos de: 24, 48 y 96 horas (“Caza”). Luego de fijados en PFA 4% a 4°C ON, se pasaron a Metanol 100% y se guardaron a -20°C. En estos ejemplares se procedió a realizar WMISH para el gen *sycp-1*, para posteriormente revelar el EdU. Finalmente se montó a los ejemplares utilizando Glicerol 80% + 50 mM de Tris pH 7,5 bajo lupa.

#### **- Activación de oncósferas.**

Para la activación de oncósferas se utilizaron 2 protocolos a lo largo de este trabajo basándonos en la bibliografía previa, uno de ellos con bolitas de vidrio [26] y el otro con un homogeneizador de vidrio [296].

Activación con bolitas de vidrio: se transfirieron a los huevos aislados a una solución de NaCl 0.8% (generalmente 100  $\mu$ l de huevos en 900  $\mu$ l de solución). Se agito durante 10 minutos en un vaso de bohemia (3 cm de diámetro) con un agitador magnético de 8x12 mm a 1 ml de la suspensión de huevos junto a bolitas de vidrio de 3 mm de diámetro. Este paso provoca la ruptura mecánica de la cascara de los huevos, lo que en el ciclo natural es provocado por la acción de las mandíbulas del escarabajo. Posteriormente se colectan las oncósferas mediante pipeteo y se añade 1 ml de una solución de NaCl 0.8% y 5 mg/ml de Bicarbonato de sodio (pH 7,2-7,4). Se centrifuga a 1200 g por 2 minutos, se retira líquido hasta dejar 300  $\mu$ l en el tubo, y se añade nuevamente el volumen requerido de la solución que contiene bicarbonato de sodio (calculando 200  $\mu$ l de suspensión final a utilizar por pocillo, ejemplo: para 5 pocillos en el experimento, se requiere 1 ml de volumen final, por lo que se agregan 700  $\mu$ l de solución a los 300  $\mu$ l que dejamos en el tubo). Se reparten las oncósferas mediante pipeteo (mezclando muy bien) entre los pocillos que se utilicen (generalmente de una placa de 96) y se dejan agitando a las oncósferas a una velocidad moderada (aproximadamente 170 rpm) en un agitador orbital durante 15 minutos para que puedan eclosionar de las envolturas de la oncósfera.

Activación con homogeneizador: Se tomaron huevos aislados y se colocaron en un homogeneizador de vidrio, luego se le agregó solución de NaCl 0,8% con 5 mg/ml de Bicarbonato de Sodio (pH 7,2-7,4), utilizando generalmente 50  $\mu$ l de suspensión de huevos en 950  $\mu$ l de solución. Se procedió a utilizar un émbolo que deja un espacio de unos 200  $\mu$ m con las paredes del homogeneizador de vidrio efectuando 60 ciclos. Posteriormente, se pasa a tubo de 1,5 ml y se centrifuga a 1200 g durante 2 minutos. Se resuspende el pellet de oncósferas en el volumen que se necesite para el experimento que se esté realizando (generalmente 200  $\mu$ l por cada condición (cada pocillo) de placas de 96). Se dejan 15 minutos en agitador orbital girando a potencia moderada (aproximadamente 170 rpm), para dejarlas eclosionar.

#### **- Ensayos de motilidad de oncósferas.**

Los ensayos de motilidad de oncósferas se realizaron para diferentes drogas de vías de segundos mensajeros (PKA y PKC), neuropéptidos y pruebas a lo largo del tiempo. Para la realización de estas pruebas se armaron placas de 96 pocillos con los diferentes compuestos de interés en paralelo a la realización de los protocolos de activación de oncósferas mencionados anteriormente. Los pocillos se armaron con 50  $\mu$ l de los compuestos concentrados 4 veces más que la solución final a la que serán testeados, en

cada uno de estos pocillos se agregan 150  $\mu\text{l}$  de la suspensión de oncósferas activadas, y se resuspende con pipeta para mezclar bien. En este paso es que las oncósferas se dejan 15 minutos en el agitador (ver protocolo anterior, paso final de ambos métodos de activación). La motilidad de las oncósferas se midió en base a sus movimientos cíclicos de extensión y retracción de los 6 ganchos posteriores que presenta este estadio. Se realizaron videos de 30 segundos de duración con los que se calculó la cantidad de ciclos por minuto (cpm) que realizaron estas larvas en las diferentes condiciones. Se contaron como válidas únicamente a las oncósferas que estaban fuera de la cáscara y de las envolturas.

#### **- Ensayos de motilidad de cisticercoides.**

Los ensayos de motilidad de cisticercoides se realizaron para drogas de vías de segundos mensajeros PKA (H-89) y PKC (Gö6983 y Queleritrina), y para neuropéptidos. Los ensayos con drogas se realizaron a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y los de neuropéptidos a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . La concentración de las drogas se determinó a partir de la bibliografía previa para otros organismos y de nuestros primeros ensayos, en los cuales se logró evidenciar un efecto de H-89 a 10  $\mu\text{M}$ , por lo que tomamos esta concentración como viable para nuestras réplicas. La concentración de neuropéptidos fue determinada por la bibliografía previa tanto en cestodos como en otros invertebrados pequeños, aplicando grandes concentraciones para facilitar su ingreso e interacción con los receptores. Se activó a los cisticercoides mediante los métodos descritos previamente y luego se los colocó a temperatura ambiente frente a las drogas o los neuropéptidos en medio RPMI. Luego de 10 minutos de colocados los compuestos de interés se tomaron videos de 10 segundos (a RT), luego se dejó a los cisticercoides a 37°C en medio RPMI en presencia de esos compuestos durante 2 horas, luego se volvió a dejar a los mismos a temperatura ambiente durante 15 minutos (para que la temperatura del medio vuelva a temperatura ambiente) y se registraron nuevamente videos cortos de 10 segundos. Estos videos de 10 segundos fueron utilizados como suministro para un script desarrollado en el laboratorio de la Dra. Britta Lundström-Stadelmann [307], el cual calcula cuánto se movieron los cisticercoides en base a la diferencia de los píxeles que ocupan a tiempo 0 y a los 10 segundos.

#### **- Ensayos de motilidad utilizando *Mesocestoides corti*.**

Se utilizó al dispositivo WMICROTRACKER ONE™ para evaluar efectos de drogas y neuropéptidos en la motilidad de tetratiridios de *Mesocestoides corti*. Se cultivaron tetratiridios de *M. corti* el día anterior a los ensayos, en condiciones estándar previamente utilizadas por nuestro grupo (RPMI, 10% SFB, AntiAnti a 37°C con CO<sub>2</sub> 5%) [14]. Se lavaron

2 veces con PBS en un tubo de 15 ml y se dejan decantar. En placas de 96 pocillos con fondo en U se colocaron 80  $\mu$ l de RPMI con 1% de antianti (GIBCO) por pocillo. Se tomaron 20 $\mu$ l de tetratiridios con un tip de p20 recortado en la punta, colocando esta cantidad en cada pocillo. Se habituaron a los tetratiridios durante 1 hora en el WMICROTRACKER ONE <sup>TM</sup> (dentro del dispositivo, sin agitación y a RT), sin la adición de drogas o neuropéptidos, tomando 2 medidas, una cada 30 minutos (este valor se utilizará para normalizar los datos). Se preparó en el momento, durante la hora de habituación, al mismo medio de RPMI y antianti, pero con los neuropéptidos o las drogas a utilizar al doble de la concentración final. Después de la hora de habituación se le agrega a cada pocillo 100  $\mu$ l de estas soluciones, llegando a la concentración final deseada. Se midió la actividad en el aparato durante 24 h, tomando medidas cada 30 minutos. Se normalizan las medidas tomadas para cada pocillo en cada tiempo de la siguiente manera: se toma el promedio de la medida de movimiento de los pocillos de cada condición en la hora de habituación (promediando las dos medidas de 30 minutos tomadas durante la habituación), a esto le llamamos Mh (promedio de medidas de motilidad durante habituación). Llamamos Mt a la medida de motilidad a tiempo t (para la misma condición del Mh calculado previamente), con estos datos, realizamos la normalización de cada medida de la siguiente manera:

$$(Mt - Mh) / Mh.$$

Obteniendo de esta forma valores normalizados que representan cuantas veces más o menos se mueven los tetratiridios en las diferentes condiciones respecto a la primera hora de habituación.

## **Bibliografía:**

- [1] C.E. Laumer, R. Fernández, S. Lemer, D. Combosch, K.M. Kocot, A. Riesgo, S.C.S. Andrade, W. Sterrer, M. V. Sørensen, G. Giribet, Revisiting metazoan phylogeny with genomic sampling of all phyla, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 286 (2019). <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0831>.
- [2] C.W. Dunn, G. Giribet, G.D. Edgecombe, A. Hejnol, Animal Phylogeny and Its Evolutionary Implications, *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 45 (2014) 371–395. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-120213-091627>.
- [3] B. Egger, F. Lapraz, B. Tomiczek, S. Müller, C. Dessimoz, J. Girstmair, N. Škunca, K.A. Rawlinson, C.B. Cameron, E. Beli, M.A. Todaro, M. Gammoudi, C. Noreña, M.J. Telford, A transcriptomic-phylogenomic analysis of the evolutionary relationships of flatworms, *Curr. Biol.* 25 (2015) 1347–1353. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.034>.
- [4] R. Poulin, S. Morand, *The Parasite Biodiversity.*, Smithsonian Institution Washington, D.C, Washington, D.C, 2004.
- [5] P.R. Torgerson, C. Carmona, R. Bonifacino, Estimating the economic effects of cystic echinococcosis: Uruguay, a developing country with upper-middle income, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94 (2000) 703–713.
- [6] P.G. Fallon, M.J. Doenhoff, Drug-resistant schistosomiasis: Resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51 (1994) 83–88. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.51.83>.
- [7] J.J. Chelladurai, T. Kifleyohannes, J. Scott, M.T. Brewer, Praziquantel resistance in the zoonotic cestode *Dipylidium caninum*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 99 (2018) 1201–1205. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0533>.
- [8] D.T.J. Littlewood, R.A. Bray, *Interrelationships of the platyhelminthes*, Warren A, 2001.
- [9] D. Młocicki, Z. Świdorski, J. Miquel, C. Eira, D.B. Conn, Cellular organization of the oncosphere of *Mosgovoyia ctenoides* (Cestoda: Anoplocephalidae), *J. Parasitol.* 92 (2006) 953–961. <https://doi.org/10.1645/GE-790R1.1>.
- [10] U. Koziol, Evolutionary developmental biology (evo-devo) of cestodes, *Exp. Parasitol.* 180 (2017) 84–100. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.12.004>.
- [11] T. Rozario, E.B. Quinn, J. Wang, R.E. Davis, P.A. Newmark, Region-specific regulation of stem cell-driven regeneration in tapeworms, *Elife.* 8 (2019). <https://doi.org/10.7554/eLife.48958>.

- [12] D.W. Halton, A.G. Maule, Flatworm nerve–muscle: structural and functional analysis, *Can. J. Zool.* 82 (2004) 316–333. <https://doi.org/10.1139/z03-221>.
- [13] J. Saldaña, M. Marín, C. Fernández, L. Domínguez, In vitro taurocholate-induced segmentation and clustering of *Mesocestoides vogae* (syn. *corti*) tetrathyridia (Cestoda) - Inhibition by cestocidal drugs, *Parasitol. Res.* 87 (2001) 281–286. <https://doi.org/10.1007/PL00008579>.
- [14] U. Koziol, M.F. Domínguez, M. Marín, A. Kun, E. Castillo, Stem cell proliferation during in vitro development of the model cestode *Mesocestoides corti* from larva to adult worm, *Front. Zool.* 7 (2010) 1–12. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-7-22>.
- [15] M.F. Domínguez, U. Koziol, V. Porro, A. Costábile, S. Estrade, J. Tort, M. Bollati-Fogolin, E. Castillo, A new approach for the characterization of proliferative cells in cestodes, *Exp. Parasitol.* 138 (2014) 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.01.005>.
- [16] A. Costábile, U. Koziol, J.F. Tort, A. Iriarte, E. Castillo, Expansion of cap superfamily proteins in the genome of *Mesocestoides corti*: An extreme case of a general bilaterian trend, *Gene Reports.* 11 (2018) 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2018.03.010>.
- [17] K. Skirnisson, D. Jouet, H. Ferté, Ó.K. Nielsen, Occurrence of *Mesocestoides canislagopodis* (Rudolphi, 1810) (Krabbe, 1865) in mammals and birds in Iceland and its molecular discrimination within the *Mesocestoides* species complex, *Parasitol. Res.* 115 (2016) 2597–2607. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5006-5>.
- [18] L.J. Cunningham, P.D. Olson, Description of *Hymenolepis microstoma* (Nottingham strain): A classical tapeworm model for research in the genomic era, *Parasites and Vectors.* 3 (2010) 123. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-123>.
- [19] M.G. Macnish, U.M. Ryan, J.M. Behnke, R.C.A. Thompson, Detection of the rodent tapeworm *Rodentolepis* (= *Hymenolepis*) *microstoma* in humans. A new zoonosis?, *Int. J. Parasitol.* 33 (2003) 1079–1085. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00137-1](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00137-1).
- [20] I.J. Tsai, M. Zarowiecki, N. Holroyd, A. Garcarrubio, A. Sanchez-Flores, K.L. Brooks, A. Tracey, R.J. Bobes, G. Frago, E. Sciuotto, M. Aslett, H. Beasley, H.M. Bennett, J. Cai, F. Camicia, R. Clark, M. Cucher, N. De Silva, T.A. Day, P. Deplazes, K. Estrada, C. Fernández, P.W.H. Holland, J. Hou, S. Hu, T. Huckvale, S.S. Hung, L. Kamenetzky, J.A. Keane, F. Kiss, U. Koziol, O. Lambert, K. Liu, X. Luo, Y. Luo, N. MacChiaroli, S. Nichol, J. Paps, J. Parkinson, N. Pouchkina-Stantcheva, N. Riddiford, M. Rosenzvit, G. Salinas, J.D. Wasmuth, M. Zamanian, Y. Zheng, X. Cai, X. Soberon, P.D. Olson, J.P. Laclette, K. Brehm, M. Berriman, E. Morett, T. Portillo, M. V. Jose, J.C. Carrero, C. Larralde, J. Morales-Montor, J. Limon-Lason, M.A. Cevallos, V. Gonzalez, A. Ochoa-Leyva, A. Landa, L. Jimenez, V. Valdes, The genomes of four tapeworm species

reveal adaptations to parasitism, *Nature*. 496 (2013) 57–63.  
<https://doi.org/10.1038/nature12031>.

- [21] P. Olson, A. Tracey, A. Baillie, K. James, S. Doyle, S. Buddenborg, F. Rodgers, N. Holroyd, M. Berriman, Complete representation of a tapeworm genome reveals chromosomes capped by centromeres, necessitating a dual role in segregation and protection, *BMC Biol.* 18 (2020) 165. <https://doi.org/10.1101/2020.04.08.031872>.
- [22] N.N. Pouchkina-Stantcheva, L.J. Cunningham, G. Hrčková, P.D. Olson, RNA-mediated gene suppression and in vitro culture in *Hymenolepis microstoma*, *Int. J. Parasitol.* 43 (2013) 641–646. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.03.004>.
- [23] C.G. Goodchild, B.O. Davis, *Hymenolepis microstoma* cysticeroid activation and excystation in vitro (cestoda), *J. Parasitol.* 58 (1972) 735–741.  
<https://doi.org/10.2307/3278302>.
- [24] J.S. Seidel, The life cycle in vitro of *Hymenolepis microstoma* (cestoda), *J. Parasitol.* 61 (1975) 677–681. <https://doi.org/10.2307/3279462>.
- [25] J.S. Seidel, Hemin as a Requirement in the Development In vitro of *Hymenolepis microstoma* ( Cestoda : Cyclophyllidea ) Author ( s ): James S . Seidel Published by : Allen Press on behalf of The American Society of Parasitologists Stable URL : <https://www.jstor.org/sta>, *J. Parasitol.* 57 (1971) 566–570.
- [26] A.K. Berntzen, M. Voge, In vitro Hatching of Oncospheres of Four Hymenolepidid Cestodes, *J. Parasitol.* 47 (1961) 235–242.
- [27] P.H. De Rycke, A.K. Berntzen, Maintenance and growth of *Hymenolepis microstoma* (Cestoda: Cyclophyllidea) in vitro., *J. Parasitol.* 53 (1967) 352–354.  
<https://doi.org/10.2307/3276588>.
- [28] V. Hartenstein, M. Jones, The embryonic development of the bodywall and nervous system of the cestode flatworm *Hymenolepis diminuta*, *Cell Tissue Res.* 311 (2003) 427–435. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0687-8>.
- [29] I. Fairweather, L.T. Threadgold, *Hymenolepis nana*: The fine structure of the ‘penetration gland’ and nerve cells within the oncosphere, *Parasitology.* 82 (1981) 445–458. <https://doi.org/10.1017/S003118200006697X>.
- [30] Z. Świdorski, J. Miquel, S. Azzouz-Maache, A.F. Pétavy, *Echinococcus multilocularis* (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae): functional ultrastructure of the penetration glands and nerve cells within the oncosphere, *Parasitol. Res.* 117 (2018) 2653–2663.  
<https://doi.org/10.1007/s00436-018-5957-9>.
- [31] R.S. Freeman, Ontogeny of Cestodes and its Bearing on their Phylogeny and Systematics, *Adv. Parasitol.* 11 (1973) 481–557. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60191-8](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60191-8).



- [32] R.A. Webb, K.G. Davey, The gross anatomy and histology of the nervous system of the metacestode of *Hymenolepis microstoma*, *Can. J. Zool.* 53 (1975) 661–677. <https://doi.org/10.1139/z75-081>.
- [33] R.A. Webb, K.G. Davey, The fine structure of the nervous tissue of the metacestode of *Hymenolepis microstoma*, *Can. J. Zool.* 54 (1976) 1206–1222. <https://doi.org/10.1139/z76-137>.
- [34] R.A. Webb, Innervation of muscle in the cestode *Hymenolepis microstoma*, *Can. J. Zool.* 65 (1987) 928–935. <https://doi.org/10.1139/z87-147>.
- [35] R.A. Webb, Putative neurosecretory cells of the cestode *Hymenolepis microstoma*, *J. Parasitol.* 62 (1976) 756–760.
- [36] R.A. Webb, Evidence for neurosecretory cells in the cestode *Hymenolepis microstoma*, *Can. J. Zool.* 55 (1977) 1726–1733. <https://doi.org/10.1139/z77-223>.
- [37] R.D. Specian, R.D. Lumsden, J.E. Ubelaker, V.F. Allison, A Unicellular Endocrine Gland in Cestodes, *J. Parasitol.* 65 (1979) 569–578. <https://doi.org/10.2307/3280324>.
- [38] A. Merighi, Neuropeptides and coexistence, in: *Curated Ref. Collect. Neurosci. Biobehav. Psychol.*, Elsevier Science Ltd., 2016: pp. 843–849. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.02310-5>.
- [39] E.P. Masler, Neuropeptides, Invertebrate, in: *Encycl. Mol. Cell Biol. Mol. Med.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2006. <https://doi.org/10.1002/3527600906.mcb.200400031>.
- [40] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 6th ed., New York and Abingdon, 2015. <https://doi.org/10.3390/ijms161226074>.
- [41] D.A. Lovejoy, *Neuroendocrinology: An Integrated Approach*, 2005. <https://doi.org/10.1002/0470027878>.
- [42] L. Funkelstein, T. Toneff, S.R. Hwang, T. Reinheckel, C. Peters, V. Hook, Cathepsin L participates in the production of neuropeptide Y in secretory vesicles, demonstrated by protease gene knockout and expression, *J. Neurochem.* 106 (2008) 384–391. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05408.x>.
- [43] L. Funkelstein, V. Hook, The novel role of cathepsin L for neuropeptide production illustrated by research strategies in chemical biology with protease gene knockout and expression, *Methods Mol. Biol.* 768 (2011) 107–125. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-204-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-204-5_5).
- [44] J.D. Imig, ACE Inhibition and Bradykinin-Mediated Renal Vascular Responses: EDHF Involvement, *Hypertension.* 43 (2004) 533–535.

<https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000118054.86193.ce>.

- [45] A. Ali, R. Vijayan, Dynamics of the ACE2–SARS-CoV-2/SARS-CoV spike protein interface reveal unique mechanisms, *Sci. Rep.* 10 (2020) 14214. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71188-3>.
- [46] R.M.F. Attenborough, D.C. Hayward, M. V. Kitahara, D.J. Miller, E.E. Ball, A “Neural” Enzyme in Nonbilaterian Animals and Algae: Preneuronal Origins for Peptidylglycine - Amidating Monooxygenase, *Mol. Biol. Evol.* 29 (2012) 3095–3109. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss114>.
- [47] C. Li, K. Kim, Neuropeptides., *WormBook*. (2008) 1–36. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.142.1>.
- [48] B.S. Skalhegg, Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA, *Front. Biosci.* 5 (2000) d678. <https://doi.org/10.2741/skalhegg>.
- [49] S.S. Taylor, P. Zhang, J.M. Steichen, M.M. Keshwani, A.P. Kornev, PKA: Lessons learned after twenty years, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 1834 (2013) 1271–1278. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.03.007>.
- [50] M. Biel, Cyclic nucleotide-regulated cation channels, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 9017–9021. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800075200>.
- [51] Z. Liao, D. Lockhead, E.D. Larson, C. Proenza, Phosphorylation and modulation of hyperpolarization-activated HCN4 channels by protein kinase A in the mouse sinoatrial node, *J. Gen. Physiol.* 136 (2010) 247–258. <https://doi.org/10.1085/jgp.201010488>.
- [52] G. Kadamur, E.M. Ross, Mammalian Phospholipase C, *Annu. Rev. Physiol.* 75 (2013) 127–154. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183750>.
- [53] K. Fukami, S. Inanobe, K. Kanemaru, Y. Nakamura, Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance, *Prog. Lipid Res.* 49 (2010) 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.06.001>.
- [54] D.L. Garbers, The guanylyl cyclase receptors, *Zygote*. 8 (2000) S24–S25. <https://doi.org/10.1017/s0967199400130114>.
- [55] J.C. Chang, R.B. Yang, M.E. Adams, K.H. Lu, Receptor guanylyl cyclases in Inka cells targeted by eclosion hormone, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 13371–13376. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812593106>.
- [56] N. Airhart, Y.F. Yang, C.T. Roberts, M. Silberbach, Atrial natriuretic peptide induces natriuretic peptide receptor-cGMP-dependent protein kinase interaction, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 38693–38698. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304098200>.

- [57] L.J. Guo, A.A. Alli, D.C. Eaton, H.F. Bao, ENaC is regulated by natriuretic peptide receptor-dependent cGMP signaling, *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 304 (2013) F930. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00638.2012>.
- [58] T. Giraldez, J. Dominguez, D.A. de la Rosa, ENaC in the Brain - Future Perspectives and Pharmacological Implications, *Curr. Mol. Pharmacol.* 6 (2016) 44–49. <https://doi.org/10.2174/1874467211306010006>.
- [59] E. Lingueglia, G. Champigny, M. Lazdunski, P. Barbry, Cloning of the amiloride-sensitive FMRFamide peptide-gated sodium channel, *Nature.* 378 (1995) 730–733.
- [60] S. Gründer, M. Assmann, Peptide-gated ion channels and the simple nervous system of Hydra, *J. Exp. Biol.* 218 (2015) 551–561. <https://doi.org/10.1242/jeb.111666>.
- [61] F. Varoqueaux, D. Fasshauer, Getting Nervous: An Evolutionary Overhaul for Communication, *Annu. Rev. Genet.* 51 (2017) 455–476. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120116-024648>.
- [62] E. Zieger, N.S.M. Robert, A. Calcino, A. Wanninger, Ancestral Role of Ecdysis-Related Neuropeptides in Animal Life Cycle Transitions, *Curr. Biol.* 31 (2020) 207–213.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.10.004>.
- [63] M.R. Elphick, O. Mirabeau, D. Larhammar, Evolution of neuropeptide signalling systems, *J. Exp. Biol.* 221 (2018). <https://doi.org/10.1242/jeb.193342>.
- [64] O. Civelli, R.K. Reinscheid, Y. Zhang, Z. Wang, R. Fredriksson, H.B. Schiöth, G Protein-Coupled Receptor Deorphanizations, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53 (2013) 127–146. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134548>.
- [65] P. McVeigh, A.G. Maule, Flatworm Neurobiology in the Postgenomic Era, in: *Oxford Handb. Invertebr. Neurobiol.*, Oxford University Press, 2017: pp. 218–244. <https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780190456757.013.8>.
- [66] R.N. Johnston, C. Shaw, D.W. Halton, P. Verhaert, J. Baguna, GYIRFamide: A novel FMRFamide-related peptide (FaRP) from the triclad turbellarian, *dugesia tigrina*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209 (1995) 689–697. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1554>.
- [67] J.J. Collins, X. Hou, E. V. Romanova, B.G. Lambrus, C.M. Miller, A. Saberi, J. V. Sweedler, P.A. Newmark, Genome-wide analyses reveal a role for peptide hormones in planarian germline development, *PLoS Biol.* 8 (2010) e1000509. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000509>.
- [68] T.H. Ong, E. V. Romanova, R.H. Roberts-Galbraith, N. Yang, T.A. Zimmerman, J.J. Collins, J.E. Lee, N.L. Kelleher, P.A. Newmark, J. V. Sweedler, Mass spectrometry imaging and identification of peptides associated with cephalic ganglia regeneration

in *Schmidtea mediterranea*, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 8109–8120.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.709196>.

- [69] S. Shimoyama, T. Inoue, M. Kashima, K. Agata, Multiple Neuropeptide-Coding Genes Involved in Planarian Pharynx Extension, *Zool. Sci.* 33 (2016) 311–319.  
<https://doi.org/10.2108/zs150170>.
- [70] A. Saberi, A. Jamal, I. Beets, L. Schoofs, P.A. Newmark, GPCRs Direct Germline Development and Somatic Gonad Function in Planarians, *PLoS Biol.* 14 (2016) 1–28.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002457>.
- [71] A. Maule, C. Shaw, D. Halton, L. Thim, GNFFRFamide: A novel FMRFamide-immunoreactive peptide isolated from the sheep tapeworm, *Moniezia expansa*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193 (1993) 1054–1060.  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1732>.
- [72] D.W. Halton, A.G. Maule, G.P. Brennan, C. Shaw, C.F. Johnston, Comparative analyses of the neuropeptide F (NPF)- and FMRFamide-related peptide (FaRP)-immunoreactivities in *Fasciola hepatica* and *Schistosoma spp.*, *Parasitology*. 110 (1995) 371–381. <https://doi.org/10.1017/S0031182000064714>.
- [73] G.R. Mair, D.W. Halton, A.G. Maule, The neuromuscular system of the sheep tapeworm *Moniezia expansa*, *Invertebr. Neurosci.* 20 (2020) 1–10.  
<https://doi.org/10.1007/s10158-020-00246-2>.
- [74] K. Peymen, J. Watteyne, L. Frooninckx, L. Schoofs, I. Beets, The FMRFamide-like peptide family in nematodes, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 5 (2014) 90.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00090>.
- [75] P. McVeigh, G.R. Mair, E. Novozhilova, A. Day, M. Zamanian, N.J. Marks, M.J. Kimber, T.A. Day, A.G. Maule, Schistosome I/Lamides - A new family of bioactive helminth neuropeptides, *Int. J. Parasitol.* 41 (2011) 905–913.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.03.010>.
- [76] G. Hrkčková, S. Velebný, D.W. Halton, T.A. Day, A.G. Maule, Pharmacological characterisation of neuropeptide F (NPF)-induced effects on the motility of *Mesocestoides corti* (syn. *Mesocestoides vogae*) larvae, *Int. J. Parasitol.* 34 (2004) 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.10.007>.
- [77] P. McVeigh, G.R. Mair, L. Atkinson, P. Ladurner, M. Zamanian, E. Novozhilova, N.J. Marks, T.A. Day, A.G. Maule, Discovery of multiple neuropeptide families in the phylum Platyhelminthes, *Int. J. Parasitol.* 39 (2009) 1243–1252.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.03.005>.
- [78] F. Liu, G. Baggerman, W. D’Hertog, P. Verleyen, L. Schoofs, G. Wets, In silico identification of new secretory peptide genes in *Drosophila melanogaster*, *Mol. Cell. Proteomics*. 5 (2006) 510–522. <https://doi.org/10.1074/mcp.M400114->

MCP200.

- [79] U. Koziol, M. Koziol, M. Preza, A. Costábile, K. Brehm, E. Castillo, De novo discovery of neuropeptides in the genomes of parasitic flatworms using a novel comparative approach, *Int. J. Parasitol.* 46 (2016) 709–721. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.05.007>.
- [80] E.C. Cropper, R. Tenenbaum, M.A. Kolks, I. Kupfermann, K.R. Weiss, Myomodulin: a bioactive neuropeptide present in an identified cholinergic buccal motor neuron of *Aplysia*., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (1987) 5483–5486. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.15.5483>.
- [81] D.R. Nässel, Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: Multiple roles as neuromodulators and neurohormones, *Prog. Neurobiol.* 68 (2002) 1–84. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00057-6](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00057-6).
- [82] I. Janssen, L. Schoofs, K. Spittaels, H. Neven, J. Vanden Broeck, B. Devreese, J. Van Beeumen, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, A. De Loof, Isolation of NEB-LFamide, a novel myotropic neuropeptide from the grey fleshfly, *Mol. Cell. Endocrinol.* 117 (1996) 157–165. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(95\)03746-2](https://doi.org/10.1016/0303-7207(95)03746-2).
- [83] P. Verleyen, J. Huybrechts, G. Baggerman, A. Van Lommel, A. De Loof, L. Schoofs, SIFamide is a highly conserved neuropeptide: A comparative study in different insect species, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320 (2004) 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.173>.
- [84] S. Park, J.Y. Sonn, Y. Oh, C. Lim, J. Choe, SIFamide and SIFamide receptor define a novel neuropeptide signaling to promote sleep in *Drosophila*, *Mol. Cells.* 37 (2014) 295–301. <https://doi.org/10.14348/molcells.2014.2371>.
- [85] L.A. Yañez-Guerra, M.R. Elphick, Evolution and Comparative Physiology of Luqin-Type Neuropeptide Signaling, *Front. Neurosci.* 14 (2020) 130. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00130>.
- [86] G.M. Holman, B.J. Cook, R.J. Nachman, Primary structure and synthesis of a blocked myotropic neuropeptide isolated from the cockroach, *Leucophaea maderae*, *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Comp.* 85 (1986) 219–224. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(86\)90077-0](https://doi.org/10.1016/0742-8413(86)90077-0).
- [87] T. Yaginuma, T. Niimi, Pyrokinin, in: *Handb. Horm.*, Elsevier, 2016: pp. 401–402. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801028-0.00214-2>.
- [88] D. Žitňan, I. Daubnerová, Crustacean Cardioactive Peptide, in: *Handb. Horm.*, Elsevier, 2016: pp. 442–e69-2. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801028-0.00069-6>.
- [89] T. Van Loy, H.P. Vandersmissen, J. Poels, M.B. Van Hiel, H. Verlinden, J. Vanden

Broeck, Tachykinin-related peptides and their receptors in invertebrates: A current view, *Peptides*. 31 (2010) 520–524.

<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.09.023>.

- [90] D.R. Nässel, M. Zandawala, T. Kawada, H. Satake, Tachykinins: Neuropeptides That Are Ancient, Diverse, Widespread and Functionally Pleiotropic, *Front. Neurosci.* 13 (2019) 1–26. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01262>.
- [91] L. Frooninckx, L. Van Rompay, L. Temmerman, E. Van Sinay, I. Beets, T. Janssen, S.J. Husson, L. Schoofs, Neuropeptide GPCRs in *C. Elegans*, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 3 (2012). <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00167>.
- [92] H. Ando, Thyrotropin-Releasing Hormone, in: *Handb. Horm.*, Elsevier, 2016: pp. 34-e4-3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00004-0>.
- [93] E. Van Sinay, O. Mirabeau, G. Depuydt, M.B. Van Hiel, K. Peymen, J. Watteyne, S. Zels, L. Schoofs, I. Beets, Evolutionarily conserved TRH neuropeptide pathway regulates growth in *Caenorhabditis elegans*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) E4065–E4074. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617392114>.
- [94] M. Preza, J. Montagne, A. Costábile, A. Iriarte, E. Castillo, U. Koziol, Analysis of classical neurotransmitter markers in tapeworms: Evidence for extensive loss of neurotransmitter pathways, *Int. J. Parasitol.* 48 (2018) 979–992. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.06.004>.
- [95] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipowski, S. Kumar, MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Mol. Biol. Evol.* 30 (2013) 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- [96] M.K.S. Gustafsson, The neuroanatomy of parasitic flatworms, *Adv. Neuroimmunol.* 2 (1992) 267–286. [https://doi.org/10.1016/S0960-5428\(06\)80051-3](https://doi.org/10.1016/S0960-5428(06)80051-3).
- [97] D.W. Halton, M.K.S. Gustafsson, Functional morphology of the platyhelminth nervous system, *Parasitology*. 113 (1996) S47. <https://doi.org/10.1017/S0031182000077891>.
- [98] L. Holden-Dye, R.J. Walker, Anthelmintic drugs., *WormBook*. (2007) 1–13. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.143.1>.
- [99] L. Lecová, L. Stuchlíková, L. Prchal, L. Skálová, Monepantel: The most studied new anthelmintic drug of recent years, *Parasitology*. 141 (2014) 1686–1698. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001401>.
- [100] A.G. Maule, N.J. Marks, T.A. Day, Signalling Molecules and Nerve-Muscle Function, in: *Parasit. Flatworms. Mol. Biol. Biochem. Immunol. Physiol.*, CABI Publishing, Oxfordshire, UK., 2006.
- [101] Q.A. McKellar, F. Jackson, Veterinary anthelmintics: Old and new, *Trends Parasitol.*

- 20 (2004) 456–461. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.002>.
- [102] P. Bauknecht, G. Jékely, Ancient coexistence of norepinephrine, tyramine, and octopamine signaling in bilaterians, *BMC Biol.* 15 (2017) 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0341-7>.
- [103] P.J. Brockie, A. V. Maricq, Ionotropic glutamate receptors: genetics, behavior and electrophysiology., *WormBook.* (2006) 1–16. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.61.1>.
- [104] C.A. Martin, D.E. Krantz, *Drosophila melanogaster* as a genetic model system to study neurotransmitter transporters, *Neurochem. Int.* 73 (2014) 71–88. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.03.015>.
- [105] J.B. Rand, Acetylcholine., *WormBook.* (2007) 1–21. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.131.1>.
- [106] S. Yamamoto, E.S. Seto, Dopamine Dynamics and Signaling in *Drosophila*: An Overview of Genes, Drugs and Behavioral Paradigms, *Exp. Anim.* 63 (2014) 107–119. <https://doi.org/10.1538/expanim.63.107>.
- [107] G.J. Siegel, R.W. Albers, D. Price, S. Brady, Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects, San Diego: Academic Press, Philadelphia, 2006.
- [108] S. Caveney, W. Cladman, L.A. Verellen, C. Donly, Ancestry of neuronal monoamine transporters in the Metazoa, *J. Exp. Biol.* 209 (2006) 4858–4868. <https://doi.org/10.1242/jeb.02607>.
- [109] D.L. Chase, M.R. Koelle, Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans.*, *WormBook.* (2007) 1–15. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.132.1>.
- [110] J.A. Dent, Evidence for a diverse Cys-loop ligand-gated ion channel superfamily in early bilateria, *J. Mol. Evol.* 62 (2006) 523–535. <https://doi.org/10.1007/s00239-005-0018-2>.
- [111] D.E. Featherstone, Intercellular glutamate signaling in the nervous system and beyond, *ACS Chem. Neurosci.* 1 (2010) 4–12. <https://doi.org/10.1021/cn900006n>.
- [112] S.J. Fountain, G. Burnstock, An evolutionary history of P2X receptors, *Purinergic Signal.* 5 (2009) 269–272. <https://doi.org/10.1007/s11302-008-9127-x>.
- [113] M. Berriman, B.J. Haas, P.T. Loverde, R.A. Wilson, G.P. Dillon, G.C. Cerqueira, S.T. Mashiyama, B. Al-Lazikani, L.F. Andrade, P.D. Ashton, M.A. Aslett, D.C. Bartholomeu, G. Blandin, C.R. Caffrey, A. Coghlan, R. Coulson, T.A. Day, A. Delcher, R. Demarco, A. Djikeng, T. Eyre, J.A. Gamble, E. Ghedin, Y. Gu, C. Hertz-Fowler, H. Hirai, Y. Hirai, R. Houston, A. Ivens, D.A. Johnston, D. Lacerda, C.D. MacEdo, P. McVeigh, Z. Ning, G. Oliveira, J.P. Overington, J. Parkhill, M. Pertea, R.J. Pierce, A. V. Protasio, M.A. Quail, M.A. Rajandream, J. Rogers, M. Sajid, S.L. Salzberg, M. Stanke,

- A.R. Tivey, O. White, D.L. Williams, J. Wortman, W. Wu, M. Zamanian, A. Zerlotini, C.M. Fraser-Liggett, B.G. Barrell, N.M. El-Sayed, The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*, *Nature*. 460 (2009) 352–358.  
<https://doi.org/10.1038/nature08160>.
- [114] E.M. Jorgensen, Gaba., *WormBook*. 1 (2005) 1–13.  
<https://doi.org/10.1895/wormbook.1.14.1>.
- [115] A. Krishnan, H.B. Schiöth, The role of G protein-coupled receptors in the early evolution of neurotransmission and the nervous system, *J. Exp. Biol.* 218 (2015) 562–571. <https://doi.org/10.1242/jeb.110312>.
- [116] R.A. Webb, K.G. Davey, The gross anatomy and histology of the nervous system of the metacestode of *Hymenolepis microstoma*, *Can. J. Zool.* 53 (1975) 661–677.  
<https://doi.org/10.1139/z75-081>.
- [117] P. Ribeiro, F. El-Shehabi, N. Patocka, Classical transmitters and their receptors in flatworms, *Parasitology*. 131 (2005). <https://doi.org/10.1017/S0031182005008565>.
- [118] V. Dufour, R.N. Beech, C. Wever, J.A. Dent, T.G. Geary, Molecular Cloning and Characterization of Novel Glutamate-Gated Chloride Channel Subunits from *Schistosoma mansoni*, *PLoS Pathog.* 9 (2013) e1003586.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003586>.
- [119] F. El-Shehabi, P. Ribeiro, Histamine signalling in *Schistosoma mansoni*: Immunolocalisation and characterisation of a new histamine-responsive receptor (SmGPR-2), *Int. J. Parasitol.* 40 (2010) 1395–1406.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.04.006>.
- [120] F. El-Shehabi, A. Taman, L.S. Moali, N. El-Sakkary, P. Ribeiro, A novel g protein-coupled receptor of schistosoma mansoni (smgpr-3) is activated by dopamine and is widely expressed in the nervous system, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (2012) e1523.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001523>.
- [121] F.F. Hamdan, M. Abramovitz, A. Mousa, J. Xie, Y. Durocher, P. Ribeiro, A novel *Schistosoma mansoni* G protein-coupled receptor is responsive to histamine, *Mol. Biochem. Parasitol.* 119 (2002) 75–86. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00400-5](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00400-5).
- [122] K. MacDonald, S. Buxton, M.J. Kimber, T.A. Day, A.P. Robertson, P. Ribeiro, Functional Characterization of a Novel Family of Acetylcholine-Gated Chloride Channels in *Schistosoma mansoni*, *PLoS Pathog.* 10 (2014) e1004181.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004181>.
- [123] K. MacDonald, M.J. Kimber, T.A. Day, P. Ribeiro, A constitutively active G protein-coupled acetylcholine receptor regulates motility of larval *Schistosoma mansoni*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 202 (2015) 29–37.



<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.09.001>.

- [124] N. Patocka, P. Ribeiro, Characterization of a serotonin transporter in the parasitic flatworm, *Schistosoma mansoni*: Cloning, expression and functional analysis, *Mol. Biochem. Parasitol.* 154 (2007) 125–133.  
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.03.010>.
- [125] N. Patocka, N. Sharma, M. Rashid, P. Ribeiro, Serotonin Signaling in *Schistosoma mansoni*: A Serotonin-Activated G Protein-Coupled Receptor Controls Parasite Movement, *PLoS Pathog.* 10 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003878>.
- [126] A. Taman, P. Ribeiro, Investigation of a dopamine receptor in *Schistosoma mansoni*: Functional studies and immunolocalization, *Mol. Biochem. Parasitol.* 168 (2009) 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.06.003>.
- [127] A. Taman, P. Ribeiro, Glutamate-mediated signaling in *Schistosoma mansoni*: A novel glutamate receptor is expressed in neurons and the female reproductive tract, *Mol. Biochem. Parasitol.* 176 (2011) 42–50.  
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.12.001>.
- [128] F. Camicia, A.M. Celentano, M.E. Johns, J.D. Chan, L. Maldonado, H. Vaca, N. Di Siervi, L. Kamentzky, A.M. Gamo, S. Ortega-Gutierrez, M. Martin-Fontecha, C. Davio, J.S. Marchant, M.C. Rosenzvit, Unique pharmacological properties of serotonergic G-protein coupled receptors from cestodes, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12 (2018) e0006267. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006267>.
- [129] F.F. Hamdan, P. Ribeiro, Characterization of a stable form of tryptophan hydroxylase from the human parasite *Schistosoma mansoni*, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 21746–21754. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.31.21746>.
- [130] P. Ribeiro, N. Patocka, Neurotransmitter transporters in schistosomes: Structure, function and prospects for drug discovery, *Parasitol. Int.* 62 (2013) 629–638.  
<https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.06.003>.
- [131] M. Zamanian, M.J. Kimber, P. McVeigh, S.A. Carlson, A.G. Maule, T.A. Day, The repertoire of G protein-coupled receptors in the human parasite *Schistosoma mansoni* and the model organism *Schmidtea mediterranea*, *BMC Genomics.* 12 (2011) 596. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-596>.
- [132] Y. Huang, W. Chen, X. Wang, H. Liu, Y. Chen, L. Guo, F. Luo, J. Sun, Q. Mao, P. Liang, Z. Xie, C. Zhou, Y. Tian, X. Lv, L. Huang, J. Zhou, Y. Hu, R. Li, F. Zhang, H. Lei, W. Li, X. Hu, C. Liang, J. Xu, X. Li, X. Yu, The Carcinogenic Liver Fluke, *Clonorchis sinensis*: New Assembly, Reannotation and Analysis of the Genome and Characterization of Tissue Transcriptomes, *PLoS One.* 8 (2013) e54732.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054732>.
- [133] K. Cwiklinski, J.P. Dalton, P.J. Dufresne, J. La Course, D.J.L. Williams, J. Hodgkinson,

- S. Paterson, The *Fasciola hepatica* genome: Gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution, *Genome Biol.* 16 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0632-2>.
- [134] C. Hahn, B. Fromm, L. Bachmann, Comparative Genomics of Flatworms (Platyhelminthes) Reveals Shared Genomic Features of Ecto- and Endoparasitic Neodermata, *Genome Biol. Evol.* 6 (2014) 1105–1117. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu078>.
- [135] N.D. Young, N. Nagarajan, S.J. Lin, P.K. Korhonen, A.R. Jex, R.S. Hall, H. Safavi-Hemami, W. Kaewkong, D. Bertrand, S. Gao, Q. Seet, S. Wongkham, B.T. Teh, C. Wongkham, P.M. Intapan, W. Maleewong, X. Yang, M. Hu, Z. Wang, A. Hofmann, P.W. Sternberg, P. Tan, J. Wang, R.B. Gasser, The *Opisthorchis viverrini* genome provides insights into life in the bile duct, *Nat. Commun.* 5 (2014) 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms5378>.
- [136] Y. Zhou, H. Zheng, Y. Chen, L. Zhang, K. Wang, J. Guo, Z. Huang, B. Zhang, W. Huang, K. Jin, T. Dou, M. Hasegawa, L. Wang, Y. Zhang, J. Zhou, L. Tao, Z. Cao, Y. Li, T. Vinar, B. Brejova, D. Brown, M. Li, D.J. Miller, D. Blair, Y. Zhong, Z. Chen, F. Liu, W. Hu, Z.Q. Wang, Q.H. Zhang, H.D. Song, S. Chen, X. Xu, B. Xu, C. Ju, Y. Huang, P.J. Brindley, D.P. McManus, Z. Feng, Z.G. Han, G. Lu, S. Ren, Y. Wang, W. Gu, H. Kang, J. Chen, X. Chen, S. Chen, L. Wang, J. Yan, B. Wang, X. Lv, L. Jin, B. Wang, S. Pu, X. Zhang, W. Zhang, Q. Hu, G. Zhu, J. Wang, J. Yu, J. Wang, H. Yang, Z. Ning, M. Beriman, C.L. Wei, Y. Ruan, G. Zhao, S. Wang, The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay, *Nature.* 460 (2009) 345–351. <https://doi.org/10.1038/nature08140>.
- [137] K.L. Howe, B.J. Bolt, M. Shafie, P. Kersey, M. Berriman, WormBase ParaSite – a comprehensive resource for helminth genomics, *Mol. Biochem. Parasitol.* 215 (2017) 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.11.005>.
- [138] S.M.C. Robb, E. Ross, A.S. Alvarado, SmedGD: The *Schmidtea mediterranea* genome database, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) 599–606. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm684>.
- [139] C. Camacho, G. Coulouris, V. Avagyan, N. Ma, J. Papadopoulos, K. Bealer, T.L. Madden, BLAST+: Architecture and applications, *BMC Bioinformatics.* 10 (2009) 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>.
- [140] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T.J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J.D. Thompson, D.G. Higgins, Fast, scalable generation of high - quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol. Syst. Biol.* 7 (2011) 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
- [141] K. Katoh, D.M. Standley, MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability, *Mol. Biol. Evol.* 30 (2013) 772–780.

<https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.

- [142] S. Guindon, O. Gascuel, A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood, *Syst. Biol.* 52 (2003) 696–704.  
<https://doi.org/10.1080/10635150390235520>.
- [143] S. Guindon, J.-F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk, O. Gascuel, New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0, *Syst. Biol.* 59 (2010) 307–321.  
<https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.
- [144] U. Koziol, T. Rauschendorfer, L. Zanon Rodríguez, G. Krohne, K. Brehm, The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*, *Evodevo.* 5 (2014) 1–23. <https://doi.org/10.1186/2041-9139-5-10>.
- [145] U. Koziol, G. Krohne, K. Brehm, Anatomy and development of the larval nervous system in *Echinococcus multilocularis*, *Front. Zool.* 10 (2013) 1–17.  
<https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-24>.
- [146] H.O. Lawal, D.E. Krantz, SLC18: Vesicular neurotransmitter transporters for monoamines and acetylcholine, *Mol. Aspects Med.* 34 (2013) 360–372.  
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.005>.
- [147] J. Mallet, L. Houhou, F. Pajak, Y. Oda, R. Cervini, S. Bejanin, S. Berrard, The cholinergic locus: ChAT and VAcHT genes, in: *J. Physiol. Paris*, Elsevier Masson SAS, 1998: pp. 145–147. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(98\)80153-8](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(98)80153-8).
- [148] C. Collin, F. Hauser, E.G. De Valdivia, S. Li, J. Reisenberger, E.M.M. Carlsen, Z. Khan, N.O. Hansen, F. Puhm, L. Søndergaard, J. Niemiec, M. Heninger, G.R. Ren, C.J.P. Grimmelhuijzen, Two types of muscarinic acetylcholine receptors in *Drosophila* and other arthropods, *Cell. Mol. Life Sci.* 70 (2013) 3231–3242.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-013-1334-0>.
- [149] P. Van Nierop, A. Keramidas, S. Bertrand, J. Van Minnen, Y. Gouwenberg, D. Bertrand, A.B. Smit, Identification of molluscan nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits involved in formation of cation- and anion-selective nAChRs, *J. Neurosci.* 25 (2005) 10617–10626. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2015-05.2005>.
- [150] A. Keramidas, A.J. Moorhouse, P.R. Schofield, P.H. Barry, *Ligand-gated ion channels: Mechanisms underlying ion selectivity*, Pergamon, 2004.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.09.002>.
- [151] C.L. Greer, A. Grygoruk, D.E. Patton, B. Ley, R. Romero-Calderon, H.-Y. Chang, R. Houshyar, R.J. Bainton, A. DiAntonio, D.E. Krantz, A splice variant of the *Drosophila* vesicular monoamine transporter contains a conserved trafficking domain and functions in the storage of dopamine, serotonin, and octopamine, *J. Neurobiol.* 64

- (2005) 239–258. <https://doi.org/10.1002/neu.20146>.
- [152] K. Wimalasena, Vesicular monoamine transporters: Structure-function, pharmacology, and medicinal chemistry, *Med. Res. Rev.* 31 (2011) 483–519. <https://doi.org/10.1002/med.20187>.
- [153] L. Iversen, Neurotransmitter transporters and their impact on the development of psychopharmacology, *Br. J. Pharmacol.* 147 (2006) 82–88. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706428>.
- [154] A.B. Pramod, J. Foster, L. Carvelli, L.K. Henry, SLC6 transporters: Structure, function, regulation, disease association and therapeutics, *Mol. Aspects Med.* 34 (2013) 197–219. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.002>.
- [155] D.E. Nichols, C.D. Nichols, Serotonin receptors, *Chem. Rev.* 108 (2008) 1614–1641. <https://doi.org/10.1021/cr078224o>.
- [156] K. Nishimura, K. Unemura, J. Tsushima, Y. Yamauchi, J. Otomo, T. Taniguchi, S. Kaneko, K. Agata, Y. Kitamura, Identification of a Novel Planarian G-Protein-Coupled Receptor That Responds to Serotonin in *Xenopus laevis* Oocytes, *Biol. Pharm. Bull.* 32 (2009) 1672–1677. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.1672>.
- [157] F.F. Hamdan, P. Ribeiro, Cloning and characterization of a novel form of tyrosine hydroxylase from the human parasite, *Schistosoma mansoni*, *J. Neurochem.* 71 (1998) 1369–1380. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71041369.x>.
- [158] M.B. Larsen, A.C.K. Fontana, L.G. Magalhães, V. Rodrigues, O. V. Mortensen, A catecholamine transporter from the human parasite *Schistosoma mansoni* with low affinity for psychostimulants, *Mol. Biochem. Parasitol.* 177 (2011) 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.01.006>.
- [159] J.M. Beaulieu, R.R. Gainetdinov, The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors, *Pharmacol. Rev.* 63 (2011) 182–217. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>.
- [160] T. Farooqui, Review of octopamine in insect nervous systems, *Open Access Insect Physiol.* 2012 (2012) 1. <https://doi.org/10.2147/oaip.s20911>.
- [161] A.B. Lange, Tyramine: From octopamine precursor to neuroactive chemical in insects, *Gen. Comp. Endocrinol.* 162 (2009) 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.yggen.2008.05.021>.
- [162] A. Pryor, S. Hart, M.D. Berry, Synthesis and Neurochemistry of Trace Amines, in: *Trace Amin. Neurol. Disord. Potential Mech. Risk Factors*, Elsevier Inc., 2016: pp. 27–43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803603-7.00003-3>.
- [163] T. Malutan, H. McLean, S. Caveney, C. Donly, A high-affinity octopamine transporter cloned from the central nervous system of cabbage looper *Trichoplusia ni*, *Insect*

Biochem. Mol. Biol. 32 (2002) 343–357. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00114-X](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00114-X).

- [164] Y. xiang Qi, G. Xu, G. xiang Gu, F. Mao, G. yin Ye, W. Liu, J. Huang, A new *Drosophila* octopamine receptor responds to serotonin, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 90 (2017) 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.09.010>.
- [165] R.T. Wragg, V. Hapiak, S.B. Miller, G.P. Harris, J. Gray, P.R. Komuniecki, R.W. Komuniecki, Tyramine and octopamine independently inhibit serotonin-stimulated aversive behaviors in *Caenorhabditis elegans* through two novel amine receptors, *J. Neurosci.* 27 (2007) 13402–13412. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3495-07.2007>.
- [166] E.E. Gray, S.N. Small, M.A. McGuirl, Expression and characterization of recombinant tyramine  $\beta$ -monooxygenase from *Drosophila*: A monomeric copper-containing hydroxylase, *Protein Expr. Purif.* 47 (2006) 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.11.008>.
- [167] R.J. Reimer, SLC17: A functionally diverse family of organic anion transporters, *Mol. Aspects Med.* 34 (2013) 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.004>.
- [168] C. Grewer, A. Gameiro, T. Rauen, SLC1 glutamate transporters, *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 466 (2014) 3–24. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1397-7>.
- [169] J. Dillon, C.J. Franks, C. Murray, R.J. Edwards, F. Calahorra, T. Ishihara, I. Katsura, L. Holden-Dye, V. O'Connor, Metabotropic glutamate receptors: Modulators of context-dependent feeding behaviour in *C. elegans*, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 15052–15065. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.606608>.
- [170] C.M. Niswender, P.J. Conn, Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50 (2010) 295–322. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533>.
- [171] M.L. Parmentier, J.P. Pin, J. Bockaert, Y. Grau, Cloning and functional expression of a *Drosophila* metabotropic glutamate receptor expressed in the embryonic CNS, *J. Neurosci.* 16 (1996) 6687–6694. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-21-06687.1996>.
- [172] J. Kehoe, S. Buldakova, F. Acher, J. Dent, P. Bregestovski, J. Bradley, Aplysia cys-loop glutamate-gated chloride channels reveal convergent evolution of ligand specificity, *J. Mol. Evol.* 69 (2009) 125–141. <https://doi.org/10.1007/s00239-009-9256-z>.
- [173] A.J. Wolstenholme, Glutamate-gated chloride channels, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 40232–40238. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.406280>.
- [174] T. Lynagh, R.N. Beech, M.J. Lalande, K. Keller, B.A. Cromer, A.J. Wolstenholme, B. Laube, Molecular basis for convergent evolution of glutamate recognition by

pentameric ligand-gated ion channels, *Sci. Rep.* 5 (2015) 1–8.  
<https://doi.org/10.1038/srep08558>.

- [175] H. Manev, S. Dzitoyeva, GABA-B receptors in drosophila, in: *Adv. Pharmacol.*, Academic Press Inc., 2010: pp. 453–464. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(10\)58017-7](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(10)58017-7).
- [176] N.M. Biserova, I.A. Kuttyrev, K. Jensen, GABA in the nervous system of the cestodes *Diphyllobothrium dendriticum* (Diphyllobothriidea) and *Caryophyllaeus laticeps* (Caryophylliidea), with comparative analysis of muscle innervation, *J. Parasitol.* 100 (2014) 411–421. <https://doi.org/10.1645/13-366.1>.
- [177] K.S. Eriksson, A.G. Maule, D.W. Halton, C. Shaw, Gaba in the Nervous System of Parasitic Flatworms, *Parasitology.* 110 (1995) 339–346.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182000080926>.
- [178] D.L. Mendonça-Silva, P.F. Gardino, R.C.C. Kubrusly, F.G. De Mello, F. Noël, Characterization of a GABAergic neurotransmission in adult *Schistosoma mansoni*, *Parasitology.* 129 (2004) 137–146. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005554>.
- [179] J.I. Kim, S. Ganesan, S.X. Luo, Y.W. Wu, E. Park, E.J. Huang, L. Chen, J.B. Ding, Aldehyde dehydrogenase 1a1 mediates a GABA synthesis pathway in midbrain dopaminergic neurons, *Science* (80- ). 350 (2015) 102–106.  
<https://doi.org/10.1126/science.aac4690>.
- [180] V. Sharma, B.L. Tekwani, J.K. Saxena, S. Gupta, J.C. Katiyar, R.K. Chatterjee, S. Ghatak, O.P. Shukla, Polyamine metabolism in some helminth parasites, *Exp. Parasitol.* 72 (1991) 15–23. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(91\)90116-E](https://doi.org/10.1016/0014-4894(91)90116-E).
- [181] H.B. Schiöth, S. Roshanbin, M.G.A. Hägglund, R. Fredriksson, Evolutionary origin of amino acid transporter families SLC32, SLC36 and SLC38 and physiological, pathological and therapeutic aspects, *Mol. Aspects Med.* 34 (2013) 571–585.  
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.012>.
- [182] H.L. Haas, O.A. Sergeeva, O. Selbach, Histamine in the nervous system, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 1183–1241. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2007>.
- [183] Y. Zheng, B. Hirschberg, J. Yuan, A.P. Wang, D.C. Hunt, S.W. Ludmerer, D.M. Schmatz, D.F. Cully, Identification of two novel *Drosophila melanogaster* histamine-gated chloride channel subunits expressed in the eye, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 2000–2005. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107635200>.
- [184] Y. Moriyama, M. Hiasa, S. Sakamoto, H. Omote, M. Nomura, Vesicular nucleotide transporter (VNUT): appearance of an actress on the stage of purinergic signaling, *Purinergic Signal.* 13 (2017) 387–404. <https://doi.org/10.1007/s11302-017-9568-1>.
- [185] K.C. Agboh, T.E. Webb, R.J. Evans, S.J. Ennion, Functional characterization of a P2X

receptor from *Schistosoma mansoni*, J. Biol. Chem. 279 (2004) 41650–41657.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M408203200>.

- [186] N.G. Seidah, G. Mayer, A. Zaid, E. Rousselet, N. Nassoury, S. Poirier, R. Essalmani, A. Prat, The activation and physiological functions of the proprotein convertases, Int. J. Biochem. Cell Biol. 40 (2008) 1111–1125.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.01.030>.
- [187] K. Agata, Y. Soejima, K. Kato, C. Kobayashi, Y. Umesono, K. Watanabe, Structure of the Planarian Central Nervous System (CNS) Revealed by Neuronal Cell Markers, Zoolog. Sci. 15 (1998) 433–440. <https://doi.org/10.2108/zsj.15.433>.
- [188] D.M. McKay, I. Fairweather, D.W. Halton, C.F. Johnston, C. Shaw, Immunocytochemical and radioimmunometrical demonstration of serotonin- and neuropeptideimmunoreactivities in the adult rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta* (Cestoda, Cyclophyllidea), Parasitology. 103 (1991) 275–289.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182000059552>.
- [189] T. Rozario, P.A. Newmark, A confocal microscopy-based atlas of tissue architecture in the tapeworm *Hymenolepis diminuta*, Exp. Parasitol. 158 (2015) 31–41.  
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.05.015>.
- [190] V.C. Wilson, E.L. Schiller, The neuroanatomy of *Hymenolepis diminuta* and *H. nana*, J. Parasitol. 55 (1969) 261–270. <https://doi.org/10.2307/3277387>.
- [191] A.G. Maule, D.W. Halton, I. Fairweather, C.F. Johnston, K.D. Buchanan, C. Shaw, L. Thim, Neuropeptide F: A novel parasitic flatworm regulatory peptide from *Moniezia expansa* (Cestoda: Cyclophyllidea), Parasitology. 102 (1991) 309–316.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182000062648>.
- [192] A.G. Maule, N.J. Marks, Parasitic flatworms: Molecular biology, biochemistry, immunology and physiology, 2006. <https://doi.org/10.1079/9780851990279.0000>.
- [193] A. V. Protasio, I.J. Tsai, A. Babbage, S. Nichol, M. Hunt, M.A. Aslett, N. De Silva, G.S. Velarde, T.J.C. Anderson, R.C. Clark, C. Davidson, G.P. Dillon, N.E. Holroyd, P.T. LoVerde, C. Lloyd, J. McQuillan, G. Oliveira, T.D. Otto, S.J. Parker-Manuel, M.A. Quail, R.A. Wilson, A. Zerlotini, D.W. Dunne, M. Berriman, A Systematically Improved High Quality Genome and Transcriptome of the Human Blood Fluke *Schistosoma mansoni*, PLoS Negl. Trop. Dis. 6 (2012) e1455.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001455>.
- [194] N. Ringstad, N. Abe, H.R. Horvitz, Ligand-gated chloride channels are receptors for biogenic amines in *C. Elegans*, Science (80-. ). 325 (2009) 96–100.  
<https://doi.org/10.1126/science.1169243>.
- [195] N.X. Tritsch, A.J. Granger, B.L. Sabatini, Mechanisms and functions of GABA co-release, Nat. Rev. Neurosci. 17 (2016) 139–145.

<https://doi.org/10.1038/nrn.2015.21>.

- [196] N. Osloobi, R.A. Webb, Localization of a sodium-dependent high-affinity serotonin transporter and recruitment of exogenous serotonin by the cestode *Hymenolepis diminuta* : an autoradiographic and immunohistochemical study , *Can. J. Zool.* 77 (1999) 1265–1277. <https://doi.org/10.1139/z99-094>.
- [197] M. Hariri, Occurrence and concentration of biogenic amines in *Mesocestoides corti* (Cestoda), *J. Parasitol.* 60 (1974) 737–743. <https://doi.org/10.2307/3278891>.
- [198] P. Ribeiro, R.A. Webb, The occurrence and synthesis of octopamine and catecholamines in the cestode *Hymenolepis diminuta*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 7 (1983) 53–62. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(83\)90116-0](https://doi.org/10.1016/0166-6851(83)90116-0).
- [199] K. Eriksson, M. Gustafsson, G. Åkerlind, High-performance liquid chromatographic analysis of monoamines in the cestode *Diphyllobothrium dendriticum*, *Parasitol. Res.* 79 (1993) 699–702. <https://doi.org/10.1007/BF00932514>.
- [200] J.D. Smyth, D.P. McManus, *The Physiology and Biochemistry of Cestodes*. University Press, UK., Cambridge University Press, UK, Cambridge, 1989.
- [201] H. Fang, T.L. Vickrey, B.J. Venton, Analysis of biogenic amines in a single *Drosophila* larva brain by capillary electrophoresis with fast-scan cyclic voltammetry detection, *Anal. Chem.* 83 (2011) 2258–2264. <https://doi.org/10.1021/ac103092z>.
- [202] E. Tareke, J.F. Bowyer, D.R. Doerge, Quantification of rat brain neurotransmitters and metabolites using liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry and comparison with liquid chromatography/electrochemical detection, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 3898–3904. <https://doi.org/10.1002/rcm.3295>.
- [203] N.M. Biserova, I.A. Kutyrev, K. Jensen, GABA in the Nervous System of the Cestodes *Diphyllobothrium dendriticum* (Diphyllobothriidea) and *Caryophyllaeus laticeps* (Caryophyllidea), with Comparative Analysis of Muscle Innervation, *J. Parasitol.* 100 (2014) 411–421. <https://doi.org/10.1645/13-366.1>.
- [204] R.A. Cornish, C. Bryant, Studies of regulatory metabolism in *Moniezia expansa*: Glutamate, and the absence of the  $\gamma$ -aminobutyrate pathway, *Int. J. Parasitol.* 5 (1975) 355–362. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(75\)90084-3](https://doi.org/10.1016/0020-7519(75)90084-3).
- [205] R.A. Webb, H. Eklove, Demonstration of intense glutamate-like immunoreactivity in the longitudinal nerve cords of the cestode *Hymenolepis diminuta*, *Parasitol. Res.* 75 (1989) 545–548. <https://doi.org/10.1007/BF00931163>.
- [206] A. DiAntonio, Glutamate Receptors At The *Drosophila* Neuromuscular Junction, *Int. Rev. Neurobiol.* 75 (2006) 165–179. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(06\)75008-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(06)75008-5).



- [207] H. Keshishian, K. Broadie, A. Chiba, M. Bate, The *Drosophila* Neuromuscular Junction: A Model System for Studying Synaptic Development and Function, *Annu. Rev. Neurosci.* 19 (1996) 545–575.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ne.19.030196.002553>.
- [208] L.E. Fox, P.E. Lloyd, Glutamate is a Fast Excitatory Transmitter at Some Buccal Neuromuscular Synapses in *Aplysia*, *J. Neurophysiol.* 82 (1999) 1477–1488.  
<https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.3.1477>.
- [209] A.G. Maule, C. Shaw, D.W. Halton, G.P. Brennan, C.F. Johnston, S. Moore, Neuropeptide F (*Moniezia expansa*): localization and characterization using specific antisera, *Parasitology.* 105 (1992) 505.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182000074680>.
- [210] G.P. Brennan, D.W. Halton, A.G. Maule, C. Shaw, Electron immunogold labeling of regulatory peptide immunoreactivity in the nervous system of *Moniezia expansa* (Cestoda: Cyclophyllidea), *Parasitol. Res.* 79 (1993) 409–415.  
<https://doi.org/10.1007/BF00931831>.
- [211] M.K. Jones, Ultrastructure of the Male Accessory Glands and Sperm Ducts of *Cylindrotaenia hickmani* (Cestoda, Cyclophyllidea), *Acta Zool.* 75 (1994) 269–275.  
<https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.1994.tb01214.x>.
- [212] E. Kubli, Sex-peptides: Seminal peptides of the *Drosophila* male, *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (2003) 1689–1704. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3052>.
- [213] J. Poels, T. Van Loy, H.P. Vandersmissen, B. Van Hiel, S. Van Soest, R.J. Nachman, J. Van Den Broeck, Myoinhibiting peptides are the ancestral ligands of the promiscuous *Drosophila* sex peptide receptor, *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (2010) 3511–3522. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0393-8>.
- [214] M. Preza, J. Calvelo, M. Langleib, F. Hoffmann, E. Castillo, U. Koziol, A. Iriarte, Stage-specific transcriptomic analysis of the model cestode *Hymenolepis microstoma*, *Genomics.* 113 (2021) 620–632. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.01.005>.
- [215] Y. Liu, Z. Wang, S. Pang, W. Zhao, L. Kang, Y. Zhang, H. Zhang, J. Yang, Z. Wang, P. Lu, M. Xu, W. Wang, X. Bo, Z. Li, Evaluation of dynamic developmental processes and the molecular basis of the high body fat percentage of different proglottid types of *Moniezia expansa*, *Parasites and Vectors.* 12 (2019) 390.  
<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3650-1>.
- [216] F.O. Hébert, S. Grambauer, I. Barber, C.R. Landry, N. Aubin-Horth, Transcriptome sequences spanning key developmental states as a resource for the study of the cestode *Schistocephalus solidus*, a threespine stickleback parasite, *Gigascience.* 5 (2016) 24. <https://doi.org/10.1186/s13742-016-0128-3>.
- [217] H. Zheng, W. Zhang, L. Zhang, Z. Zhang, J. Li, G. Lu, Y. Zhu, Y. Wang, Y. Huang, J. Liu,

- H. Kang, J. Chen, L. Wang, A. Chen, S. Yu, Z. Gao, L. Jin, W. Gu, Z. Wang, L. Zhao, B. Shi, H. Wen, R. Lin, M.K. Jones, B. Brejova, T. Vinar, G. Zhao, D.P. McManus, Z. Chen, Y. Zhou, S. Wang, The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*, *Nat. Genet.* 45 (2013) 1168–1175. <https://doi.org/10.1038/ng.2757>.
- [218] T. Basika, G.P. Paludo, F.M. Araujo, A.C. Salim, F. Pais, L. Maldonado, N. Macchiaroli, J. Camargo de Lima, M. Rosenzvit, G.C. Oliveira, L. Kamenetzky, H.B. Ferreira, Transcriptomic profile of two developmental stages of the cestode parasite *Mesocestoides corti*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 229 (2019) 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2019.02.006>.
- [219] P.D. Olson, M. Zarowiecki, K. James, A. Baillie, G. Bartl, P. Burchell, A. Chellappoo, F. Jarero, L.Y. Tan, N. Holroyd, M. Berriman, Genome-wide transcriptome profiling and spatial expression analyses identify signals and switches of development in tapeworms, *Evodevo.* 9 (2018) 1–29. <https://doi.org/10.1186/s13227-018-0110-5>.
- [220] E. V Koonin, Orthologs, Paralogs, and Evolutionary Genomics, *Annu. Rev. Genet.* 39 (2005) 309–338. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.114725>.
- [221] M. Nei, A.P. Rooney, Concerted and Birth-and-Death Evolution of Multigene Families, *Annu. Rev. Genet.* 39 (2005) 121–152. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.112240>.
- [222] Susumu Ohno, *Evolution by Gene Duplication*, 1st ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, 1970. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-86659-3>.
- [223] H. Innan, F. Kondrashov, The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models, *Nat. Rev. Genet.* 11 (2010) 97–108. <https://doi.org/10.1038/nrg2689>.
- [224] F.A. Kondrashov, Gene duplication as a mechanism of genomic adaptation to a changing environment, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 279 (2012) 5048–5057. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1108>.
- [225] A. Coghlan, R. Tyagi, J.A. Cotton, N. Holroyd, B.A. Rosa, I.J. Tsai, D.R. Laetsch, R.N. Beech, T.A. Day, K. Hallsworth-Pepin, H.M. Ke, T.H. Kuo, T.J. Lee, J. Martin, R.M. Maizels, P. Mutowo, P. Ozersky, J. Parkinson, A.J. Reid, N.D. Rawlings, D.M. Ribeiro, L.S. Swapna, E. Stanley, D.W. Taylor, N.J. Wheeler, M. Zamanian, X. Zhang, F. Allan, J.E. Allen, K. Asano, S.A. Babayan, G. Bah, H. Beasley, H.M. Bennett, S.A. Bisset, E. Castillo, J. Cook, P.J. Cooper, T. Cruz-Bustos, C. Cuéllar, E. Devaney, S.R. Doyle, M.L. Eberhard, A. Emery, K.S. Eom, J.S. Gilleard, D. Gordon, Y. Harcus, B. Harsha, J.M. Hawdon, D.E. Hill, J. Hodgkinson, P. Horák, K.L. Howe, T. Huckvale, M. Kalbe, G. Kaur, T. Kikuchi, G. Koutsovoulos, S. Kumar, A.R. Leach, J. Lomax, B. Makepeace, J.B. Matthews, A. Muro, N.M. O’Boyle, P.D. Olson, A. Osuna, F. Partono, K. Pfarr, G. Rinaldi, P. Foronda, D. Rollinson, M.G. Samblas, H. Sato, M. Schnyder, T. Scholz, M. Shafie, V.N. Tanya, R. Toledo, A. Tracey, J.F. Urban, L.C. Wang, D. Zarlenga, M.L.

- Blaxter, M. Mitreva, M. Berriman, Comparative genomics of the major parasitic worms, *Nat. Genet.* 51 (2019) 163–174. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0262-1>.
- [226] K.F. hepatica genome: G. duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution Cwiklinski, J.P. Dalton, P.J. Dufresne, J. La Course, D.J.L. Williams, J. Hodgkinson, S. Paterson, The *Fasciola hepatica* genome: Gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution, *Genome Biol.* 16 (2015) 71. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0632-2>.
- [227] R.M. Nowak, J.P. Jastrzębski, W. Kuśmirek, R. Sałamatın, M. Rydzanicz, A. Sobczyk-Kopcioł, A. Sulima-Celińska, Ł. Paukszto, K.G. Makowczenko, R. Płoski, V. V. Tkach, K. Basałaj, D. Młocicki, Hybrid de novo whole-genome assembly and annotation of the model tapeworm *Hymenolepis diminuta*, *Sci. Data.* 6 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0311-3>.
- [228] S.B. Collings, C.P. Hutchins, Motility and Hatching of *Hymenolepis microstoma* Oncospheres in Sera, Beetle Extracts, and Salines, *Exp. Parasitol.* 16 (1965) 53–56. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(65\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0014-4894(65)90032-9).
- [229] M. Bernt, A. Donath, F. Jühling, F. Externbrink, C. Florentz, G. Fritzsich, J. Pütz, M. Middendorf, P.F. Stadler, MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation, *Mol. Phylogenet. Evol.* 69 (2013) 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.08.023>.
- [230] J.J. Almagro Armenteros, K.D. Tsirigos, C.K. Sønderby, T.N. Petersen, O. Winther, S. Brunak, G. von Heijne, H. Nielsen, SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks, *Nat. Biotechnol.* 37 (2019) 420–423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>.
- [231] W. Shen, S. Le, Y. Li, F. Hu, SeqKit: A Cross-Platform and Ultrafast Toolkit for FASTA/Q File Manipulation, *PLoS One.* 11 (2016) e0163962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163962>.
- [232] D. Kim, B. Langmead, S.L. Salzberg, HISAT : a fast spliced aligner with low memory requirements, *Nat. Methods.* 12 (2015) 357–360. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3317>.
- [233] S. Anders, P.T. Pyl, W. Huber, HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data, *Bioinformatics.* 31 (2015) 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>.
- [234] M.D. Robinson, D.J. McCarthy, G.K. Smyth, edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data, *Bioinformatics.* 26 (2009) 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.

- [235] D.J. McCarthy, Y. Chen, G.K. Smyth, Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 4288–4297. <https://doi.org/10.1093/nar/gks042>.
- [236] Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling The False Discovery Rate - A Practical And Powerful Approach To Multiple Testing, *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 57 (1995) 289–300. <https://doi.org/10.2307/2346101>.
- [237] S. Babicki, D. Arndt, A. Marcu, Y. Liang, J.R. Grant, A. Maciejewski, D.S. Wishart, Heatmapper: web-enabled heat mapping for all, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) W147–W153. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw419>.
- [238] K. Blighe, S. Rana, M. Lewis, EnhancedVolcano: Publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labeling., R Packag. Version 1.6.0. <https://github.com/kevinblighe/EnhancedVolcano>. (2020).
- [239] J. Huerta-Cepas, K. Forslund, L.P. Coelho, D. Szklarczyk, L.J. Jensen, C. Von Mering, P. Bork, Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper, *Mol. Biol. Evol.* 34 (2017) 2115–2122. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx148>.
- [240] A. Alexa, J. Rahnenfuhrer, topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology. R package version 2.36.0., (2019).
- [241] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool., *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403–10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- [242] K. Katoh, D.M. Standley, MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability, *Mol. Biol. Evol.* 30 (2013) 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
- [243] S. Kalyaanamoorthy, B.Q. Minh, T.K.F. Wong, A. Von Haeseler, L.S. Jermin, ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates, *Nat. Methods.* 14 (2017) 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>.
- [244] L.T. Nguyen, H.A. Schmidt, A. Von Haeseler, B.Q. Minh, IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies, *Mol. Biol. Evol.* 32 (2015) 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>.
- [245] D.T. Hoang, O. Chernomor, A. von Haeseler, B.Q. Minh, L.S. Vinh, UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Molecular biology and evolution.*, *Mol. Biol. Evol.* 35 (2018) 518–522. <https://doi.org/10.5281/zenodo.854445>.
- [246] F. Huang, Z. Dang, Y. Suzuki, T. Horiuchi, K. Yagi, Analysis on Gene Expression Profile in Oncospheres and Early Stage Metacestodes from *Echinococcus multilocularis*, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (2016) e0004634.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004634>.

- [247] G. Yu, D.K. Smith, H. Zhu, Y. Guan, T.T.Y. Lam, GGTREE: an R Package for Visualization and Annotation of Phylogenetic Trees With Their Covariates and Other Associated Data, *Methods Ecol. Evol.* 8 (2017) 28–36.  
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12628>.
- [248] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method., *Methods.* 25 (2001) 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [249] P. Greenspan, E.P. Mayer, S.D. Fowler, Nile Red " A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets, *J. Cell Biol.* 100 (1985) 965–973.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.100.3.965>.
- [250] Y. Liu, J. Zhou, K.P. White, RNA-seq differential expression studies: More sequence or more replication?, *Bioinformatics.* 30 (2014) 301–304.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt688>.
- [251] C. Cantacessi, J.M. Seddon, T.L. Miller, C.Y. Leow, L. Thomas, L. Mason, C. Willis, G. Walker, A. Loukas, R.B. Gasser, M.K. Jones, A. Hofmann, A genome-wide analysis of annexins from parasitic organisms and their vectors, *Sci. Rep.* 3 (2013) 2893.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1038/srep02893>.
- [252] A.G.M. Tielens, J.J. van Hellemond, Unusual aspects of metabolism in flatworm parasites., in: A.G. Maule, N.J. Marks (Eds.), *Parasit. Flatworms Mol. Biol. Biochem. Immunol. Physiol.*, First, CABI, 2006: pp. 387–407.  
<https://doi.org/10.1079/9780851990279.0387>.
- [253] A. Costábile, M. Marín, E. Castillo, Spatio-temporal expression of *Mesocestoides corti* McVAL2 during strobilar development, *Exp. Parasitol.* 181 (2017) 30–39.  
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.07.005>.
- [254] V. Silva-álvarez, A. Maite, A. Lía, F. Zamarreño, D. Costabel, E. García-zepeda, G. Salinas, B. Córscico, A. María, Prostaglandins , Leukotrienes and Essential Fatty Acids *Echinococcus granulosus* antigen B : A Hydrophobic Ligand Binding Protein at the host – parasite interface, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 93 (2014) 17–23.  
<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2014.09.008>.
- [255] M. Fló, M. Margenat, L. Pellizza, M. Graña, R. Durán, A. Báez, E. Salceda, E. Soto, B. Alvarez, C. Fernández, Functional diversity of secreted cestode Kunitz proteins: Inhibition of serine peptidases and blockade of cation channels, 2017.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006169>.
- [256] S. González, M. Fló, M. Margenat, R. Durán, G. González-Sapienza, M. Graña, J. Parkinson, R.M. Maizels, G. Salinas, B. Alvarez, C. Fernández, A family of diverse Kunitz inhibitors from *Echinococcus granulosus* potentially involved in host-parasite

- cross-talk, PLoS One. 4 (2009). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007009>.
- [257] G. Alvite, A. Esteves, Lipid binding proteins from parasitic platyhelminthes, *Front. Physiol.* 3 (2012) 363. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00363>.
- [258] J. Barrett, N. Saghir, A. Timanova, K. Clarke, P.M. Brophy, Characterisation and properties of an intracellular lipid-binding protein from the tapeworm *Moniezia expansa*, *Eur. J. Biochem.* 250 (1997) 269–275. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.0269a.x>.
- [259] N. Saghir, P.J. Conde, P.M. Brophy, J. Barrett, A new diagnostic tool for neurocysticercosis is a member of a cestode specific hydrophobic ligand binding protein family 1, *FEBS Lett.* 487 (2000) 181–184. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02191-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02191-8).
- [260] N. Saghir, P.J. Conde, P.M. Brophy, J. Barrett, Biochemical characterisation of a hydrophobic ligand binding protein from the tapeworm *Hymenolepis diminuta*, *Int. J. Parasitol.* 31 (2001) 653–660. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00135-7](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00135-7).
- [261] P.D. Olson, M. Zarowiecki, F. Kiss, K. Brehm, Cestode genomics – progress and prospects for advancing basic and applied aspects of flatworm biology, *Parasite Immunol.* (2012) 130–150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01319.x>.
- [262] R.M. Hedrick, Comparative Histochemical Studies on Cestodes: II. The Distribution of Fat Substances in *Hymenolepis diminuta* and *Raillietina cesticillus*, *J. Parasitol.* 44 (1957) 75–84. <https://doi.org/10.2307/3274833>.
- [263] N. Chowdhury, P.H. De Rycke, Qualitative distribution of neutral lipids and phospholipids in *Hymenolepis microstoma* from the cysticeroid to the egg producing adult, *Zeitschrift Für Parasitenkd.* 50 (1976) 151–160. <https://doi.org/10.1007/BF00380519>.
- [264] K. Brehm, U. Koziol, Echinococcus–Host Interactions at Cellular and Molecular Levels, in: *Adv. Parasitol.*, Elsevier Ltd, 2017: pp. 147–212. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.09.001>.
- [265] R.H.P. Wilbers, R. Schneiter, M.H.M. Holterman, C. Drurey, G. Smant, O.A. Asojo, R.M. Maizels, J.L. Lozano-Torres, Secreted venom allergen-like proteins of helminths: Conserved modulators of host responses in animals and plants, *PLoS Pathog.* 14 (2018) e1007300. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007300>.
- [266] J.D. Smyth, D.P. McManus, *The Physiology and Biochemistry of Cestodes*, Cambridge University Press, 1989. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511525841>.
- [267] F.A. Kondrashov, I.B. Rogozin, Y.I. Wolf, E. V Koonin, Selection in the evolution of gene duplications, *Genome Biol.* 3 (2002). <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-2-research0008>.

- [268] J. Parkinson, J.D. Wasmuth, G. Salinas, C. V. Bizarro, C. Sanford, M. Berriman, H.B. Ferreira, A. Zaha, M.L. Blaxter, R.M. Maizels, C. Fernández, A Transcriptomic Analysis of *Echinococcus granulosus* Larval Stages: Implications for Parasite Biology and Host Adaptation, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001897>.
- [269] E.M. Bennet, C.A. Behm, C. Bryant, The role of the host in the regulation of end-product formation in two strains of the rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta*, *Int. J. Parasitol.* 20 (1990) 841–848. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(90\)90021-E](https://doi.org/10.1016/0020-7519(90)90021-E).
- [270] M. Saidur Rahman, D.F. Mettrick, Carbohydrate intermediary metabolism in *Hymenolepis microstoma* (Cestoda), *Int. J. Parasitol.* 12 (1982) 155–162. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(82\)90011-X](https://doi.org/10.1016/0020-7519(82)90011-X).
- [271] C.F. Fioravanti, D.J. Walker, P.S. Sandhu, Metabolic transition in the development of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda), *Parasitol. Res.* 84 (1998) 777–782. <https://doi.org/10.1007/s004360050487>.
- [272] H. Amino, H. Wang, H. Hirawake, F. Saruta, D. Mizuchi, R. Mineki, N. Shindo, K. Murayama, S. Takamiya, T. Aoki, S. Kojima, K. Kita, Stage-specific isoforms of *Ascaris suum* complex II: The fumarate reductase of the parasitic adult and the succinate dehydrogenase of free-living larvae share a common iron-sulfur subunit, *Mol. Biochem. Parasitol.* 106 (2000) 63–76. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(99\)00200-5](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00200-5).
- [273] K. Kita, H. Hirawake, H. Miyadera, H. Amino, S. Takeo, Role of complex II in anaerobic respiration of the parasite mitochondria from *Ascaris suum* and *Plasmodium falciparum*, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1553 (2002) 123–139. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00237-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00237-7).
- [274] L. Otero, C. Martínez-Rosales, E. Barrera, S. Pantano, G. Salinas, Complex I and II Subunit Gene Duplications Provide Increased Fitness to Worms, *Front. Genet.* 10 (2019) 1043. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01043>.
- [275] K.W.A. van Grinsven, J.J. van Hellemond, A.G.M. Tielens, Acetate:succinate CoA-transferase in the anaerobic mitochondria of *Fasciola hepatica*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 164 (2009) 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.11.008>.
- [276] C.F. Fioravanti, K.P. Vandock, Transhydrogenase and the anaerobic mitochondrial metabolism of adult *Hymenolepis diminuta*, *Parasitology.* 137 (2010) 395–410. <https://doi.org/10.1017/S0031182009990904>.
- [277] C.W. Ward, D. Fairbairn, Enzymes of Beta-Oxidation and the Tricarboxylic Acid Cycle in Adult *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) and *Ascaris lumbricoides* (Nematoda), *J. Parasitol.* 56 (1970) 1009–1012. <https://doi.org/10.2307/3277526>.
- [278] D.P. Mc Manus, J.D. Smyth, Intermediary Carbohydrate Metabolism in

Protoscolecocytes of *Echinococcus Granulosus* (Horse and Sheep Strains) and *E. Multilocularis*, *Parasitology*. 84 (1982) 351–366.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182000044899>.

- [279] T. Mustafa, R. Komuniecki, D.F. Mettrick, Cytosolic glutamate dehydrogenase in adult *Hymenolepis diminuta* (cestoda), *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 6 (1978) 219–222. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0305-0491\(78\)90164-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0305-0491(78)90164-5).
- [280] M. Wack, R. Komuniecki, L.S. Roberts, Amino acid metabolism in the rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta*, *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 74 (1983) 399–402. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(83\)90201-8](https://doi.org/10.1016/0305-0491(83)90201-8).
- [281] R. Rosen, G.L. Uglem, Localization of facilitated diffusion and active glucose transport in cysticercooids of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda), *Int. J. Parasitol.* 18 (1988) 581–584. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(88\)90090-2](https://doi.org/10.1016/0020-7519(88)90090-2).
- [282] L.D. Fricker, Limitations of Mass Spectrometry-Based Peptidomic, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26 (2015) 1981–1991. <https://doi.org/10.1021/jasms.8b04938>.
- [283] U. Koziol, Molecular and developmental characterization of the *Echinococcus multilocularis* stem cell system, 2014.
- [284] K.A. McCulloch, K. Zhou, Y. Jin, Neuronal transcriptome analyses reveal novel neuropeptide modulators of excitation and inhibition imbalance in *C. elegans*, *PLoS One*. 15 (2020) e0233991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233991>.
- [285] S.J. Smith, U. Smbül, L.T. Graybuck, F. Collman, S. Seshamani, R. Gala, O. Gliko, L. Elabbady, J.A. Miller, T.E. Bakken, J. Rossier, Z. Yao, E. Lein, H. Zeng, B. Tasic, M. Hawrylycz, Single-cell transcriptomic evidence for dense intracortical neuropeptide networks, *Elife*. 8 (2019). <https://doi.org/10.7554/eLife.47889>.
- [286] R. Tremblay, S. Lee, B. Rudy, GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits, *Neuron*. 91 (2016) 260–292.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.033>.
- [287] M.K. Jones, Ultrastructure of the cirrus pouch of *Cylindrotaenia hickmani* (Jones, 1985) (Cestoda, Nematotaeniidae), *Int. J. Parasitol.* 19 (1989) 919–930.  
[https://doi.org/10.1016/0020-7519\(89\)90120-3](https://doi.org/10.1016/0020-7519(89)90120-3).
- [288] Y. Costa, R. Speed, R. Öllinger, M. Aisheimer, C.A. Semple, P. Gautier, K. Maratou, I. Novak, C. Höög, R. Benavente, H.J. Cooke, Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 2755–2762. <https://doi.org/10.1242/jcs.02402>.
- [289] F.A.T. De Vries, E. De Boer, M. Van Den Bosch, W.M. Baarends, M. Ooms, L. Yuan, J.G. Liu, A.A. Van Zeeland, C. Heyting, A. Pastink, Mouse Sycp1 functions in



synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation, *Genes Dev.* 19 (2005) 1376–1389. <https://doi.org/10.1101/gad.329705>.

- [290] Y. Xiang, D.E. Miller, E.J. Ross, A.S. Alvarado, R. Scott Hawley, Synaptonemal complex extension from clustered telomeres mediates full-length chromosome pairing in *schmidtea mediterranea*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) E5159–E5168. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420287111>.
- [291] J. Fraune, M. Alsheimer, J.N. Volff, K. Busch, S. Fraune, T.C.G. Bosch, R. Benavente, Hydra meiosis reveals unexpected conservation of structural synaptonemal complex proteins across metazoans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 16588–16593. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206875109>.
- [292] R.I. Bolla, L.S. Roberts, Developmental physiology of cestodes-X. The effect of crowding on carbohydrate levels and on RNA, DNA and protein synthesis in *Hymenolepis diminuta*, *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 40 (1971) 777–787. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(71\)90263-5](https://doi.org/10.1016/0300-9629(71)90263-5).
- [293] G.H. Kelsoe, J.E. Ubelaker, V.F. Allison, The fine structure of spermatogenesis in *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) with a description of the mature spermatozoon, *Zeitschrift Für Parasitenkd.* 54 (1977) 175–187. <https://doi.org/10.1007/BF00380800>.
- [294] A. Subsidiary, B. Jovanovich, *Biology of the Tapeworm Hymenolepis diminuta*, 1980. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-058980-7.x5001-5>.
- [295] L. Orrhage, M.C.M. Müller, Morphology of the nervous system of Polychaeta (Annelida), *Hydrobiologia.* 535 (2005) 79–111. <https://doi.org/10.1007/s10750-004-4375-4>.
- [296] P.W. Pappas, G.M. Durka, Purification, quantification and mechanical hatching of eggs of the tapeworm, *hymenolepis diminuta*, *Int. J. Parasitol.* 21 (1991) 727–729.
- [297] I. Bucur, S. Gabriël, I. Van Damme, P. Dorny, M. Vang Johansen, Survival of *Taenia saginata* eggs under different environmental conditions, *Vet. Parasitol.* 266 (2019) 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.12.011>.
- [298] G.Q. Artigas, P. Lapébie, L. Leclère, P. Bauknecht, J. Uveira, S. Chevalier, G. Jékely, T. Momose, E. Houlston, A G protein-coupled receptor mediates neuropeptide-induced oocyte maturation in the jellyfish *Clytia*, *PLoS Biol.* 18 (2020) 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000614>.
- [299] D. Nagy, P. Cusumano, G. Andreatta, A.M. Anduaga, C. Hermann-Luibl, N. Reinhard, J. Gesto, C. Wegener, G. Mazzotta, E. Rosato, C.P. Kyriacou, C. Helfrich-Förster, R. Costa, Peptidergic signaling from clock neurons regulates reproductive dormancy in *drosophila melanogaster*, *PLoS Genet.* 15 (2019). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008158>.

- [300] P. Bauknecht, G. Jékely, Large-scale combinatorial deorphanization of platynereis neuropeptide GPCRs, *Cell Rep.* 12 (2015) 684–693.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.052>.
- [301] S.M. Rajpara, P.D. Garcia, R. Roberts, J.C. Eliassen, D.F. Owens, D. Maltby, R.M. Myers, E. Mayeri, Identification and molecular cloning of a neuropeptide  $\gamma$  homolog that produces prolonged inhibition in *Aplysia* neurons, *Neuron.* 9 (1992) 505–513.  
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90188-J](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90188-J).
- [302] B.E. Swierczewski, S.J. Davies, A schistosome cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is essential for parasite viability, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3 (2009) 505.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000505>.
- [303] H. Matsuyama, H. Takahashi, K. Watanabe, Y. Fujimaki, Y. Aoki, The involvement of cyclic adenosine monophosphate in the control of *Schistosoma* miracidium cilia, *J. Parasitol.* 90 (2004) 8–14. <https://doi.org/10.1645/GE-52R1>.
- [304] C.G. Goodchild, B.O. Davis, *Hymenolepis microstoma* cysticeroid activation and excystation in vitro (Cestoda), *J. Parasitol.* 58 (1972) 735–741.  
<https://doi.org/10.2307/3278302>.
- [305] J.D. Smyth, Z. Davies, In vitro culture of the strobilar stage of *Echinococcus granulosus* (sheep strain): A review of basic problems and results, *Int. J. Parasitol.* 4 (1974) 631–644. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(74\)90028-9](https://doi.org/10.1016/0020-7519(74)90028-9).
- [306] T. Mohammadzadeh, S.M. Sadjjadi, H.M. Rahimi, S. Shams, Establishment of a modified in vitro cultivation of protoscoleces to adult *Echinococcus granulosus*; an important way for new investigations on hydatidosis, *Iran. J. Parasitol.* 7 (2012) 59–66.
- [307] D. Ritler, R. Rufener, H. Sager, J. Bouvier, A. Hemphill, B. Lundström-Stadelmann, Development of a movement-based in vitro screening assay for the identification of new anti-cestodal compounds, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (2017).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005618>.
- [308] G. Hrčkova, S. Velenbný, D.W. Halton, A.G. Maule, *Mesocestoides corti* (syn. *M. vogae*): Modulation of larval motility by neuropeptides, serotonin and acetylcholine, *Parasitology.* 124 (2002) 409–421.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182001001329>.
- [309] S. Van Bael, S. Zels, K. Boonen, I. Beets, L. Schoofs, L. Temmerman, A *Caenorhabditis elegans* Mass Spectrometric Resource for Neuropeptidomics, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 29 (2018) 879–889. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1856-z>.
- [310] Y. Liu, A. Beyer, R. Aebersold, On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance, *Cell.* 165 (2016) 535–550.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.014>.

- [311] M.R. Sharker, I.-S. Nou, K.H. Kho, Molecular characterization and spatiotemporal expression of prohormone convertase 2 in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*, PLoS One. 15 (2020) e0231353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231353>.
- [312] M. Li, M. Mbikay, K. Nakayama, A. Miyata, A. Arimura, Prohormone convertase PC4 processes the precursor of PACAP in the testis, in: Ann. N. Y. Acad. Sci., New York Academy of Sciences, 2000: pp. 333–339. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06988.x>.
- [313] R.H. Renegar, C.R. Owens, G. Dai, J.P. McMurtry, S.C.M. Kwok, Expression and localization of prohormone convertase 1/3 (SPC3) in porcine ovary, Mol. Reprod. Dev. 57 (2000) 361–365. [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200012\)57:4<361::AID-MRD8>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200012)57:4<361::AID-MRD8>3.0.CO;2-T).
- [314] K. Ogiwara, M. Shinohara, T. Takahashi, Expression of proprotein convertase 2 mRNA in the ovarian follicles of the medaka, *Oryzias latipes*, Gene. 337 (2004) 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.04.013>.
- [315] P.S. York, S.F. Cummins, S.M. Degnan, B.J. Woodcroft, B.M. Degnan, Marked changes in neuropeptide expression accompany broadcast spawnings in the gastropod *Haliotis asinina*, Front. Zool. 9 (2012) 1–17. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-9-9>.
- [316] M.K.S. Gustafsson, D.W. Halton, A.G. Maule, M. Reuter, C. Shaw, The gull-tapeworm, *Diphyllobothrium dendriticum* and neuropeptide F: An immunocytochemical study, Parasitology. 109 (1994) 599–609. <https://doi.org/10.1017/S0031182000076484>.
- [317] N. Kreshchenko, Functions of flatworm neuropeptides NPF, GYIRF and FMRF in course of pharyngeal regeneration of anterior body fragments of planarian, *Girardia tigrina*, Acta Biol. Hung. 59 (2008) 199–207. <https://doi.org/10.1556/ABiol.59.2008.Suppl.29>.
- [318] N.D. Kreshchenko, Z. Sedelnikov, I.M. Sheiman, M. Reuter, A.G. Maule, M.K.S. Gustafsson, Effects of neuropeptide F on regeneration in *Girardia tigrina* (Platyhelminthes), Cell Tissue Res. 331 (2008) 739–750. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0519-y>.
- [319] T. Ameku, Y. Yoshinari, M.J. Texada, S. Kondo, K. Amezawa, G. Yoshizaki, Y. Shimada-Niwa, R. Niwa, Midgut-derived neuropeptide F controls germline stem cell proliferation in a mating-dependent manner, PLoS Biol. 16 (2018) 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005004>.
- [320] B. Ulum, A. Mammadova, Ö. Özyüncü, D. Uçkan-Çetinkaya, T. Yanık, F. Aerts-Kaya, Neuropeptide Y is involved in the regulation of quiescence of hematopoietic stem cells, Neuroptides. 80 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.npep.2020.102029>.

- [321] F. Aerts-Kaya, B. Ulum, A. Mammadova, S. Köse, G. Aydin, P. Korkusuz, D. Uçkan-Çetinkaya, Neurological Regulation of the Bone Marrow Niche, in: Adv. Exp. Med. Biol., Springer, 2020: pp. 127–153. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2019\\_398](https://doi.org/10.1007/5584_2019_398).
- [322] S. Terhzaz, P. Rosay, S.F. Goodwin, J.A. Veenstra, The neuropeptide SIFamide modulates sexual behavior in *Drosophila*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 352 (2007) 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.030>.
- [323] P.S. Dickinson, H.M. Samuel, E.A. Stemmler, A.E. Christie, SIFamide peptides modulate cardiac activity differently in two species of Cancer crab, Gen. Comp. Endocrinol. 282 (2019) 113204. <https://doi.org/10.1016/j.ygcn.2019.06.008>.
- [324] M. Conzelmann, E.A. Williams, S. Tunaru, N. Randel, R. Shahidi, A. Asadulina, J. Berger, S. Offermanns, G. Jékely, Conserved MIP receptor-ligand pair regulates Platynereis larval settlement, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110 (2013) 8224–8229. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220285110>.
- [325] M.K.S. Gustafsson, M.C. Wikgren, T.J. Karhi, L.P.C. Schot, Immunocytochemical demonstration of neuropeptides and serotonin in the tapeworm *Diphyllobothrium dendriticum*, Cell Tissue Res. 240 (1985) 255–260. <https://doi.org/10.1007/BF00222332>.
- [326] M.D. Berry, A. V. Juorio, X.M. Li, A.A. Boulton, Aromatic L-amino acid decarboxylase: A neglected and misunderstood enzyme, Neurochem. Res. 21 (1996) 1075–1087. <https://doi.org/10.1007/BF02532418>.
- [327] F. Huang, Z. Dang, Y. Suzuki, T. Horiuchi, K. Yagi, H. Kouguchi, T. Irie, K. Kim, Y. Oku, Analysis on Gene Expression Profile in Oncospheres and Early Stage Metacestodes from *Echinococcus multilocularis*, PLoS Negl. Trop. Dis. 10 (2016) e0004634. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004634>.
- [328] K. Rybicka, Ultrastructure of the embryonic syncytial epithelium in a cestode *Hymenolepis diminuta*, Parasitology. 66 (1973) 9–18. <https://doi.org/10.1017/S0031182000044395>.
- [329] G.R. Wendt, J.N. Collins, J. Pei, M.S. Pearson, H.M. Bennett, A. Loukas, M. Berriman, N. V. Grishin, J.J. Collins, Flatworm-specific transcriptional regulators promote the specification of tegumental progenitors in *Schistosoma mansoni*, Elife. 7 (2018) 1–24. <https://doi.org/10.7554/eLife.33221>.
- [330] I. Guarnaschelli, Marcado del tegumento y determinación del patrón de expresión espacial de SLC5 y CntA en el cestodo modelo *Hymenolepis microstoma*, 2020.
- [331] N. Brakch, B. Rist, A.G. Beck-Sickinger, J. Goenaga, R. Wittek, E. Bürger, H.R. Brunner, E. Grouzmann, Role of prohormone convertases in pro-neuropeptide Y processing: Coexpression and in vitro kinetic investigations, Biochemistry. 36 (1997) 16309–16320. <https://doi.org/10.1021/bi9714767>.

- [332] L. Funkelstein, M. Beinfeld, A. Minokadeh, J. Zadina, V. Hook, Unique biological function of cathepsin L in secretory vesicles for biosynthesis of neuropeptides, *Neuropeptides*. 44 (2010) 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2010.08.003>.
- [333] C.L. Diaz Soria, J. Lee, T. Chong, A. Coghlan, A. Tracey, M.D. Young, T. Andrews, C. Hall, B.L. Ng, K. Rawlinson, S.R. Doyle, S. Leonard, Z. Lu, H.M. Bennett, G. Rinaldi, P.A. Newmark, M. Berriman, Single-cell atlas of the first intra-mammalian developmental stage of the human parasite *Schistosoma mansoni*, *Nat. Commun.* 11 (2020) 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20092-5>.
- [334] T. Chapman, J. Bangham, G. Vinti, B. Seifried, O. Lung, M.F. Wolfner, H.K. Smith, L. Partridge, The sex peptide of *Drosophila melanogaster*: Female post-mating responses analyzed by using RNA interference, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 9923–9928. <https://doi.org/10.1073/pnas.1631635100>.
- [335] P.S.R. de Saram, M. Ressurreição, A.J. Davies, D. Rollinson, A.M. Emery, A.J. Walker, Functional Mapping of Protein Kinase A Reveals Its Importance in Adult *Schistosoma mansoni* Motor Activity, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (2013) e1988. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001988>.
- [336] Z. Cheng, D. Garvin, A. Paguio, P. Stecha, K. Wood, F. Fan, Luciferase Reporter Assay System for Deciphering GPCR Pathways, *Curr. Chem. Genomics*. 4 (2012) 84–91. <https://doi.org/10.2174/1875397301004010084>.
- [337] T. Ngo, I. Kufareva, J.L.J. Coleman, R.M. Graham, R. Abagyan, N.J. Smith, Identifying ligands at orphan GPCRs: current status using structure-based approaches, *Br. J. Pharmacol.* 173 (2016) 2934–2951. <https://doi.org/10.1111/bph.13452>.
- [338] O. Weth, S. Haeberlein, M. Haimann, Y. Zhang, C.G. Grevelding, Towards deorphanizing G protein-coupled receptors of *Schistosoma mansoni* using the MALAR yeast two-hybrid system, *Parasitology*. 147 (2020) 865–872. <https://doi.org/10.1017/S0031182019001756>.
- [339] J.D. Smyth, Parasitological serendipity: From *Schistocephalus* to *Echinococcus*, *Int. J. Parasitol.* 20 (1990) 411–423. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(90\)90190-X](https://doi.org/10.1016/0020-7519(90)90190-X).
- [340] J.D. Smyth, H.J. Miller, A.B. Howkins, Further analysis of the factors controlling strobilization, differentiation, and maturation of *Echinococcus granulosus* in vitro, *Exp. Parasitol.* 21 (1967) 31–41. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(67\)90064-1](https://doi.org/10.1016/0014-4894(67)90064-1).
- [341] J.D. Smyth, Maturation of larval pseudophyllidean cestodes and strigeid trematodes under axenic conditions; the significance of nutritional levels in platyhelminth development, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 77 (2006) 102–125. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1959.tb36897.x>.
- [342] M. Cazillis, B.J. Gonzalez, C. Billardon, A. Lombet, A. Fraichard, J. Samarut, P. Gressens, H. Vaudry, W. Rostène, VIP and PACAP induce selective neuronal

differentiation of mouse embryonic stem cells, *Eur. J. Neurosci.* 19 (2004) 798–808. <https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03138.x>.

- [343] A. Bode, W. Salvenmoser, K. Nimeth, M. Mahlknecht, Z. Adamski, R.M. Rieger, R. Peter, P. Ladurner, Immunogold-labeled S-phase neoblasts, total neoblast number, their distribution, and evidence for arrested neoblasts in *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes, Rhabditophora), *Cell Tissue Res.* 325 (2006) 577–587. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0196-2>.
- [344] M. Reuter, M. Gustafsson, Neuronal signal substances in asexual multiplication and development in flatworms, *Cell. Mol. Neurobiol.* 16 (1996) 591–616. <https://doi.org/10.1007/BF02152059>.
- [345] J. Baguna, E. Salo, R. Romero, Effects of activators and antagonists of the neuropeptides substance P and substance K on cell proliferation in planarians, *Int. J. Dev. Biol.* 33 (1989) 261–266. <https://doi.org/10.1387/ijdb.2484287>.
- [346] L. Pierson, A. Mousley, L. Devine, N.J. Marks, T.A. Day, A.G. Maule, RNA interference in a cestode reveals specific silencing of selected highly expressed gene transcripts, *Int. J. Parasitol.* 40 (2010) 605–615. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.10.012>.
- [347] M. Spiliotis, C. Mizukami, Y. Oku, F. Kiss, K. Brehm, B. Gottstein, *Echinococcus multilocularis* primary cells: Improved isolation, small-scale cultivation and RNA interference, *Mol. Biochem. Parasitol.* 174 (2010) 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.07.001>.
- [348] J.E. Humphries, M.J. Kimber, Y.W. Barton, W. Hsu, N.J. Marks, B. Greer, P. Harriott, A.G. Maule, T.A. Day, Structure and bioactivity of neuropeptide F from the human parasites *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 39880–39885. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405624200>.
- [349] K. Flegel, D. Sun, O. Grushko, Y. Ma, L. Buttitta, Live cell cycle analysis of *Drosophila* tissues using the attune acoustic focusing cytometer and vybrant dyecycle violet DNA stain, *J. Vis. Exp.* (2013) 50239. <https://doi.org/10.3791/50239>.
- [350] A. Lochner, J.A. Moolman, The many faces of H89: A review, *Cardiovasc. Drug Rev.* 24 (2006) 261–274. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3466.2006.00261.x>.
- [351] H. Zhong, H. SuYang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, S. Ghosh, The transcriptional activity of NF- $\kappa$ B is regulated by the I $\kappa$ B- associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism, *Cell.* 89 (1997) 413–424. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80222-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80222-6).
- [352] N.O. Dulin, J. Niu, D.D. Browning, R.D. Ye, T. Voyno-Yasenetskaya, Cyclic AMP-independent Activation of Protein Kinase A by Vasoactive Peptides, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 20827–20830. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100195200>.

- [353] J.M. Dong, T. Leung, E. Manser, L. Lim, cAMP-induced morphological changes are counteracted by the activated RhoA small GTPase and the Rho kinase ROK $\alpha$ , *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 22554–22562. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.35.22554>.
- [354] H. Eklove, R.A. Webb, The effect of L-glutamate and related agents on adenylate cyclase in the cestode *Hymenolepis diminuta*, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69 (1991) 28–36. <https://doi.org/10.1139/y91-005>.
- [355] P. Ribeiro, R.A. Webb, Characterization of a serotonin transporter and an adenylate cyclase-linked serotonin receptor in the cestode *Hymenolepis diminuta*, *Life Sci.* 40 (1987) 755–768. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(87\)90303-1](https://doi.org/10.1016/0024-3205(87)90303-1).
- [356] M. Ressurreição, P. De Saram, R.S. Kirk, D. Rollinson, A.M. Emery, N.M. Page, A.J. Davies, A.J. Walker, Protein Kinase C and Extracellular Signal-Regulated Kinase Regulate Movement, Attachment, Pairing and Egg Release in *Schistosoma mansoni*, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (2014) e2924. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002924>.
- [357] P. Vaziri, D. Ryan, C.A. Johnston, R.M. Cripps, A novel mechanism for activation of myosin regulatory light chain by protein kinase C-delta in *Drosophila*, *Genetics.* 216 (2020) 177–190. <https://doi.org/10.1534/genetics.120.303540>.
- [358] A.E. Eckly-Michel, A. Le Bec, C. Lugnier, Chelerythrine, a protein kinase C inhibitor, interacts with cyclic nucleotide phosphodiesterases, *Eur. J. Pharmacol.* 324 (1997) 85–88. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)00149-0](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)00149-0).
- [359] X.F. Niu, P. Zhou, W.F. Li, H.B. Xu, Effects of chelerythrine, a specific inhibitor of cyclooxygenase-2, on acute inflammation in mice, *Fitoterapia.* 82 (2011) 620–625. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.020>.
- [360] T.L. MacDonald, M.A. Labroli, J.J. Tepe, DNA Topoisomerase Inhibitors, in: *Compr. Nat. Prod. Chem.*, Elsevier, 1999: pp. 593–614. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091283-7.00071-0>.
- [361] O. Torres-Quesada, J.E. Mayrhofer, E. Stefan, The many faces of compartmentalized PKA signalosomes, *Cell. Signal.* 37 (2017) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.05.012>.
- [362] P. Cavelier, D. Attwell, Neurotransmitter depletion by bafilomycin is promoted by vesicle turnover, *Neurosci. Lett.* 412 (2007) 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.10.040>.
- [363] D.A. Brown, D.I. Yule, Protein kinase C regulation of P2X3 receptors is unlikely to involvedirect receptor phosphorylation, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1773 (2007) 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.09.020>.
- [364] E. Marder, D. Bucher, D.J. Schulz, A.L. Taylor, Invertebrate central pattern

- generation moves along, *Curr. Biol.* 15 (2005) 685–699.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.08.022>.
- [365] A.I. Selverston, Invertebrate central pattern generator circuits, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365 (2010) 2329–2345. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0270>.
- [366] H. Peter Larsson, How is the heart rate regulated in the sinoatrial node? Another piece to the puzzle, *J. Gen. Physiol.* 136 (2010) 237–241.  
<https://doi.org/10.1085/jgp.201010506>.
- [367] H.Y. Chu, X. Zhen, Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in the regulation of midbrain dopamine systems, *Acta Pharmacol. Sin.* 31 (2010) 1036–1043. <https://doi.org/10.1038/aps.2010.105>.
- [368] A.J. Northcutt, D.J. Schulz, Molecular mechanisms of homeostatic plasticity in central pattern generator networks, *Dev. Neurobiol.* 80 (2020) 58–69.  
<https://doi.org/10.1002/dneu.22727>.
- [369] E. Marder, D. Bucher, Central pattern generators and the control of rhythmic movements, *Curr. Biol.* 11 (2001) 986–996. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00581-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00581-4).
- [370] N.B. Terenina, N.D. Kreshchenko, N.B. Mochalova, S.O. Movsesyan, Serotonin and neuropeptide FMRFamide in the attachment organs of trematodes, *Helminthol.* 55 (2018) 185–194. <https://doi.org/10.2478/helm-2018-0022>.
- [371] J. Saldaña, C. Casaravilla, M. Marín, C. Fernández, L. Domínguez, The toxicity of praziquantel against *Mesocestoides vogae* (syn. *corti*) tetrathyridia can be assessed using a novel in vitro system, *Parasitol. Res.* 89 (2003) 467–472.  
<https://doi.org/10.1007/s00436-002-0801-6>.
- [372] C. Martelli, U. Pech, S. Kobbenbring, D. Pauls, B. Bahl, M.V. Sommer, A. Pooryasin, J. Barth, C.W.P. Arias, C. Vassiliou, A.J.F. Luna, H. Poppinga, F.G. Richter, C. Wegener, A. Fiala, T. Riemensperger, SIFamide Translates Hunger Signals into Appetitive and Feeding Behavior in *Drosophila*, *Cell Rep.* 20 (2017) 464–478.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.043>.
- [373] L. Šimo, J. Koči, Y. Park, Receptors for the neuropeptides, myoinhibitory peptide and SIFamide, in control of the salivary glands of the blacklegged tick *Ixodes scapularis*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43 (2013) 376–387.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.01.002>.
- [374] L. Šimo, Y. Park, Neuropeptidergic control of the hindgut in the black-legged tick *Ixodes scapularis*, *Int. J. Parasitol.* 44 (2014) 819–826.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.06.007>.
- [375] M.V.K.K. Sukhdeo, S.C. Hsu, C.S. Thompson, D.F. Mettrick, *Hymenolepis diminuta*:



behavioral effects of 5-hydroxytryptamine, acetylcholine, histamine and somatostatin, *Int. J. Parasitol.* 70 (1984) 682–688.  
<https://doi.org/10.2307/3281750>.

- [376] C.S. Thompson, N.C. Sangster, D.F. Mettrick, Cholinergic inhibition of muscle contraction in *Hymenolepis diminuta* (Cestoda), *Can. J. Zool.* 64 (1986) 2111–2115.  
<https://doi.org/10.1139/z86-323>.
- [377] OligoAnalyzer Tool - primer analysis | IDT, (n.d.).  
<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer> (accessed January 24, 2021).
- [378] BioEdit Download - Research software utility for creating and editing biological sequences, (n.d.). <https://bioedit.software.informer.com/> (accessed January 13, 2021).
- [379] Gene Runner, (n.d.). <http://www.generunner.net/> (accessed January 13, 2021).
- [380] K. Brehm, K. Jensen, M. Frosch, mRNA trans-splicing in the human parasitic cestode *Echinococcus multilocularis*, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 38311–38318.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M006091200>.
- [381] TOP10 chemically competent cells - OpenWetWare, (n.d.).  
[https://openwetware.org/wiki/TOP10\\_chemically\\_competent\\_cells](https://openwetware.org/wiki/TOP10_chemically_competent_cells) (accessed January 14, 2021).
- [382] J. Sambrook, D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [383] D. Prieto, G. Aparicio, P.E. Morande, F.R. Zolessi, A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green, *Histochem. Cell Biol.* 142 (2014) 335–345. <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1215-0>.
- [384] P. Cappella, F. Gasparri, M. Pulici, J. Moll, A novel method based on click chemistry, which overcomes limitations of cell cycle analysis by classical determination of BrdU incorporation, allowing multiplex antibody staining, *Cytom. Part A.* 73 (2008) 626–636. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20582>.
- [385] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: An open-source platform for biological-image analysis, *Nat. Methods.* 9 (2012) 676–682.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- [386] S.J. Husson, A. Reumer, L. Temmerman, W. De Haes, L. Schoofs, I. Mertens, G. Baggerman, Worm peptidomics, *EuPA Open Proteomics.* 3 (2014) 280–290.  
<https://doi.org/10.1016/j.euprot.2014.04.005>.
- [387] M. Fadda, I. Hasakiogullari, L. Temmerman, I. Beets, S. Zels, L. Schoofs, Regulation

of feeding and metabolism by neuropeptide F and short neuropeptide F in invertebrates, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 10 (2019) 1–17. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00064>.

- [388] A.H.N. Hopman, F.C.S. Ramaekers, E.J.M. Speel, Rapid synthesis of biotin-, digoxigenin-, trinitrophenyl-, and fluorochrome-labeled tyramides and their application for in situ hybridization using CARD amplification, *J. Histochem. Cytochem.* 46 (1998) 771–777. <https://doi.org/10.1177/002215549804600611>.

## **Apéndice 1: RT-PCR semicuantitativa.**

Luego de la extracción de ARN, se realiza la RT-PCR con la misma cantidad de ARN para cada condición a estudiar.

### **Protocolo RT-PCR Superscript:**

#### Mezcla inicial:

- 1 $\mu$ l - oligo dt 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l
- 1 $\mu$ l – ARN (este volumen es de ejemplo si se usa más, reducir la cantidad de H<sub>2</sub>O)
- 1 $\mu$ l - dNTPmix 10mM
- 9,5 $\mu$ l – H<sub>2</sub>O (mezclar bien con pipeta)

#### Con esta mezcla:

- 5' a 65°C.
- 2' a 4°C.

#### Agregar:

- 4 $\mu$ l de buffer 5x
- 2 $\mu$ l de Dtt 0,1M
- 0,5 $\mu$ l de RNase out

#### Con la nueva mezcla:

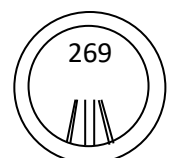
- 2' a 42°C
- Agregar 1 $\mu$ l SSII-RT (mezclar con pipeta)
- 50' a 42°C
- 15' a 70°C

Guardar ADNc a -20°C.

Luego de obtenido el ADNc se pasa a hacer la RT-PCR semicuantitativa.

### **Protocolo PCR semicuantitativa:**

- 1- Se toma para cada condición la misma cantidad de ADNc y se utiliza un control con ADNc, para evaluar que no haya ADN contaminante en los reactivos.
- 2- Se deja ciclando por 26 ciclos normales de amplificación de PCR.
- 3- Se toman 5  $\mu$ l de la amplificación y se deja ciclando por 4 ciclos más.
- 4- Se toman 5  $\mu$ l de la amplificación y se deja ciclando por 4 ciclos más.
- 5- Se finalizan los ciclados obteniendo 3 muestras, la primera muestra con 26 ciclos, la segunda con 30 ciclos y la final con 34 ciclos de PCR.



- 6- Se analiza por gel de agarosa, se recomienda correr a todas las muestras en paralelo para facilitar la comparación. Por cada condición a comparar son 3 muestras de diferentes ciclados, siempre corriendo junto al control negativo con agua y al marcador de peso molecular (MPM). Por lo que si se tienen 2 condiciones a comparar estamos hablando de 8 carriles y si son 3 condiciones a comparar, como en este trabajo, son 11 carriles del gel para comparar por cada gen a analizar (contando al MPM).

## **Apéndice 2: Hibridación *in situ in toto* (Whole-mount *in situ* hybridization, WMISH).**

Este protocolo está basado en el que se puede encontrar en los apéndices de la tesis de doctorado del Dr. Uriel Koziol [283], que a su vez está basado en el protocolo desarrollado para *H. microstoma* en el laboratorio del Dr. Peter Olson (<http://www.olsonlab.com/>).

El protocolo está optimizado para gusanos adultos de *H. microstoma*. Para otros organismos hay que ajustar algunos pasos, sobre todo los tiempos de tratamiento con Proteinasa K (ajustando tiempo y concentración).

Para el trabajo con ARN es necesario tener material libre de ARNasas: pipetas, una mesada que se use sólo para ARN, soluciones tratadas con DEPC o de esto no ser posible que sean sólo utilizadas con guantes desde su apertura, lavado de superficies y guantes con etanol 70%, etc. Todos estos cuidados en conjunto, favorecen a que los resultados de esta técnica sean los mejores posibles.

### **Fijación de los gusanos para WMISH**

Estos pasos que se describen a continuación se pueden hacer de dos maneras. Una forma es tomar a toda la muestra y fijarla en conjunto, lo que requerirá que posteriormente se separen a los gusanos para proceder con la WMISH. Otra forma de proceder que resulta en lo personal más cómoda, es separar a los gusanos mientras aún estén vivos, para posteriormente fijarlos individualizados, dado esto porque luego de fijados son más propensos a romperse y más difíciles de desenredar.

- 1- Recolectar a los gusanos y luego de lavarlos con PBS dejarlos con poco volumen de este mismo buffer en hielo durante 5 minutos.
- 2- Fijar a los gusanos con 4% de PFA/PBS (DEPC) precalentado a 85°C e invertir un par de veces el tubo donde se fije.
- 3- Dejar en la heladera ON (Over Night).
- 4- Pasar a los gusanos a 100% Metanol y dejarlos en agitador leve por 10 minutos.
- 5- Cambiar el Metanol una vez luego de esos 10 minutos y guardar a -20°C.

## Hibridación *in situ in toto*

### Día 1

#### Rehidratación:

- 1- Lavado en 100% de etanol, 5 minutos de agitación.
- 2- Lavado en 75% de etanol en Agua (DEPC), 10 minutos de agitación.
- 3- Lavado en 50% de etanol en PBS-T (DEPC), 10 minutos de agitación.
- 4- Tres lavados en PBS-T, 5 minutos de agitación c/u.

#### Tratamiento de Proteinasa K y refijación:

- 5- Añadir 7,5µl de Proteinasa K (20mg/ml, stock de 50% glicerol a -20°C) en 10ml de PBS-T.
- 6- Incubar con Proteinasa K durante 20 minutos **SIN AGITACIÓN**.
- 7- Lavar 2 veces con 0,1M de Trietanolamina (TEA), pH 7,8 por 5 minutos. Invirtiendo los tubos cada tanto, con cuidado porque están frágiles.
- 8- En el 2do lavado de TEA, agregar 2,5µl de Anhídrido acético por cada ml utilizado en los lavados de TEA. Luego de 5 minutos agregar la misma cantidad utilizada de Anhídrido acético nuevamente y esperar 5 minutos, invirtiendo de vez en cuando los tubos.
- 9- Lavar 2 veces por 5 minutos con PBS-T, invirtiendo de vez en cuando los tubos.
- 10- Refijar a los gusanos con PFA 4% en PBS-T, durante 20 minutos en agitación.
- 11- Lavar 5 veces con PBS-T durante 5 minutos c/u, en agitación.

#### Equilibrar las muestras y Pre-Hibridación:

- 12- Dejar al tubo con 1ml de PBS-T y agregar 250µl de buffer de hibridación permitiendo que se equilibre (en unos 3 minutos y un par de inversiones). Si se está trabajando con varios adultos en el mismo tubo dejar 2ml de PBS-T y agregar 500µl de buffer de hibridación, esperar que se equilibre y pasar los gusanos a tubos individuales en donde se seguirá el protocolo.
- 13- Remover el líquido y reemplazar con 500µl de buffer de hibridación, dejar a 60°C durante 10 minutos agitando en Eppendorf thermomixer a 600 RPM.
- 14- Reemplazar al buffer de hibridación con otros 500µl de este mismo buffer, dejando a 60°C con la misma agitación. En este paso se pueden tomar dos caminos, esperar 6 horas para colocar la sonda, o dejarlo toda la noche en estas condiciones.

## Día 2

### Hibridación:

**15- Sondas nuevas:** Preparar la sonda de ARN marcada con DIG dejándola 3 minutos a 80°C, centrifugar brevemente y dejar en hielo. Agregar la sonda a buffer de hibridación precalentado a 57-58°C. Remover el buffer de pre-hibridación de las muestras y agregar las sondas recientemente diluidas, las sondas deben tener una concentración final entre 0.2 y 1 ng/μl. Para las sondas realizadas en este trabajo esto se traduce en generalmente, una dilución de 5μl en 495μl de buffer de hibridación.

**Sondas reutilizadas:** para sondas que ya se utilizaron en otras WMISH y ya se encuentran disueltas en buffer de hibridación, se dejan a 80°C durante 3 minutos, luego se ponen en el thermomixer a 58°C por 5 minutos y luego se agregan a las muestras (de las que previamente se retiró el buffer de pre-hibridación, claramente).

Para las WMISH de neuropéptidos (y sondas cortas en general de hasta 250 pb) se utilizan temperaturas menores de hibridación entre 53-54°C.

Se deja hibridando de esta manera ON a la temperatura correspondiente en el Thermomixer a 600 RPM.

## Día 3

### Remover la sonda y lavar:

**16-** Retirar la sonda de cada tubo y guardarla en un nuevo tubo en hielo, para posteriormente dejarlas a -80°C, ya que pueden ser reutilizadas reiteradas veces (incluso funcionando mejor que la primera vez en las repeticiones).

**17-** Colocar 500μl de buffer de hibridación, precalentado a la temperatura en la que estaban las sondas, 53-54°C o 57-58°C.

**18-** Lavar 3 veces con solución 2x de SSC + 0,1% Tween-20 (Precalentado a la temperatura en la que estaban las sondas, 53-54°C o 57-58°C), cada lavado de 20 minutos en Thermomixer a 600 RPM.

**19-** Lavar 3 veces con solución 0,2x de SSC + 0,1% Tween-20 (Precalentado a la temperatura en la que estaban las sondas, 53-54°C o 57-58°C), cada lavado de 30 minutos en Thermomixer a 600 RPM.

**20-** Lavar 2 veces con MAB-T (MAB + 0,1% Tween-20), acá pasamos a temperatura ambiente (RT, Room Temperature), cada lavado de 15 minutos con agitación.

### Incubación con anticuerpo:

- 21- Bloquear durante 2 horas en 0,5ml de MAB-T + 1% "Blocking reagent" + 5% de suero de oveja. La solución con todos sus componentes debe ser calentada a 60°C durante 30 minutos para inactivar el suero, y posteriormente colocada en hielo antes de agregársela a las muestras.
- 22- Reemplazar la solución de bloqueo con la dilución de 1/50 de Anti-DIG conjugado a peroxidasa (POD) en MAB-T + 1% "Blocking reagent". Se deja con agitación toda la noche a 4°C, se puede en el Thermomixer si se tiene una temperatura ambiente de unos 20°C.

### Día 4

#### Lavados:

- 23- Remover el anticuerpo y lavar 3 veces con MAB-T a RT con agitación, cada lavado de 5 minutos.
- 24- Lavar 3 veces con MAB-T a RT con agitación, cada lavado de 1 hora.
- 25- Lavar con PBS + 0,1 M de Imidazole, pH 7,6 a RT con agitación, durante 3 minutos.
- 26- Lavar con PBS + 0,1 M de Imidazole, pH 7,6 a RT con agitación, durante 10 minutos.

#### Reacción con Tiramida para coloración fluorescente:

- 27- Preparar la solución de la reacción fluorescente mezclando PBS + 0,1 M Imidazol, pH 7,6 con 1/100 de Tiramida Fluorescente y 0,001% final de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (diluir del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, primero 1/300 y después 1/100). La Tiramida utilizada en este trabajo está conjugada a FITC, preparada como describe Hopman y colaboradores en 1998 [388]).
- 28- Se agrega la solución de la reacción fluorescente y se mezcla por inversión (5 a 10 veces) para posteriormente incubar en la oscuridad **SIN MOVIMIENTO**, durante 5 minutos.
- 29- Lavado rápido con PBS-T, para quitar el exceso de solución de reacción fluorescente.
- 30- Lavar 4 veces con PBS-T en oscuridad, acá ya no importa tanto trabajar bajo condiciones RNAsa free (the FISH is sold [283]). En este punto se puede proceder a la detección de EdU y/o tinción con DAPI (1µg/ml ON en PBS-T, con menos tiempo puede funcionar, pero se pueden tener problemas de tener buena señal en los órganos internos.)
- 31- Montar con glicerol 80% con 50mM de Tris pH 7 y sellar los bordes con esmalte de uñas transparente.



### ***Consideraciones extra de las WMISH en otros estadios***

- **Oncósferas:** para las WMISH de oncósferas se sigue al mismo procedimiento descrito para los adultos, utilizando segmentos grávidos que las contienen. Para ver la señal de las oncósferas, no basta con mirar los segmentos grávidos al microscopio, se necesitan extraer de los mismos. Lo más recomendable es, una vez finalizada la *in situ*, colocar a estos segmentos grávidos en portaobjetos, y utilizando una lupa binocular y pinzas cortar diferentes trozos del mismo y triturarlos con las pinzas de tal forma que se liberen a las oncósferas. Las oncósferas así liberadas se montan utilizando glicerol 80% con 50mM de Tris pH 7 y sellando con esmalte de uñas.

- **Cisticercoides:** en este trabajo se utilizaron cisticercoides activados y oncósferas en proceso de metamorfosis a cisticercoides. La diferencia principal de las WMISH con este estadio es que en cada paso de cambio de medio es necesario centrifugar (1000-2000g por 2 minutos). Si bien en este trabajo se utilizaron con el mismo tiempo de Proteinasa K que para adultos (20 minutos), en los resultados a los cisticercoides activados se los ve un poco digeridos de más por acción de esta enzima, por lo que sería bueno probar tiempos más cortos y comparar los resultados (5-10 minutos).

### ***Soluciones de "Hibridación in situ in toto":***

#### **Agua tratada con DEPC**

Agregar 0,1% DEPC a agua milliQ y mezclar durante toda la noche (deje la tapa ligeramente abierto). Autoclavar durante 40 minutos, o dos veces de 20 minutos.

#### **PBS (DEPC)**

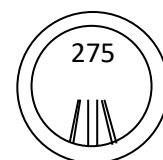
Agregar 0,1% DEPC a una botella de PBS y mezclar durante toda la noche. Autoclavar durante 40 minutos, o dos veces de 20 minutos.

#### **PFA 4% / PBS (DEPC)**

Disolver 2 g de paraformaldehído (SIGMA-P6148) en 50 ml de PBS (DEPC) a 65°C durante 1-2 horas mezclando cada tanto por inversión. Se pueden hacer alícuotas de volúmenes pequeños, congeladas a -20°C, evitar descongelarlas y volver a congelarlas.

#### **PBS-T**

PBS + 0,1% Tween-20



### **Proteinasa K (Biolabs)**

#### **Trietanolamina 0,1 M (TEA), pH de 7 a 8**

A partir de TEA stock (**SIGMA-Aldrich, 90279**), concentración 7,53 M, preparar una dilución 1/75,3 dilución (0,665 ml de TEA en 50 ml de agua tratada con DEPC). Ajustar el pH con alícuotas de HCl al 25% (normalmente se necesitan unos 200µl) y confirme el pH colocando una gota en una tira de pH (una tirita puede convertirse en 3 si se sabe usar tijeras correctamente).

Anhídrido acético (**Baker y Sigma-Aldrich**)

#### **CHAPS al 10% (Sigma-Aldrich, C3023)**

Disolver 5g de CHAPS en 50ml total de volumen con Agua tratada con DEPC

#### **10% Tween-20 (Sigma-Aldrich)**

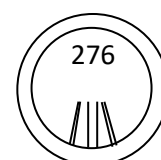
Disolver 5ml de Tween-20 en 50ml de volumen total con Agua tratada con DEPC. Stock para ir preparando las soluciones de los lavados en el momento.

#### **Heparina 100 mg/ml stock (Sigma-Aldrich, 90279)**

Disolver 0,5g de Heparina en 5ml de agua estéril milliQ (no tratada con DEPC). Guardar a -20°C en alícuotas de 0,2ml.

### **Preparación de ARN *Torula* 100 mg/ml**

- 1- Disolver ARN de *Torula* (Sigma-Aldrich, R-6625) a 10 mg/ml en agua tratada con DEPC (disolviendo a 65°C, agitando de vez en cuando durante 1 hora), iniciando con 40ml o menos.
- 2- Extraer con un volumen de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1), centrifugar 20 minutos a 10.000g a 4°C, y transferir la fase acuosa a un nuevo tubo.
- 3- Precipitar el ARN añadiendo 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M (pH 5,2 libre de ARNasas) y 2,5 volúmenes de etanol al 100%, centrifugar 20 minutos a 10.000g a 4°C.
- 4- Lavar el pellet dos veces con etanol 70% (Libre de ARNasas).
- 5- Retirar todo el volumen de Etanol con pipeta, secar el pellet, unos 5 minutos a 42°C.
- 6- Resuspender en 1ml de agua tratada con DEPC con pipeta, lo cual puede demorar un rato, se puede calentar unos 5-10 minutos a 65°C si se necesita.
- 7- Cuantificar y estimar pureza por Nanodrop.



- 8- Diluir hasta tener una concentración de 100-200 mg/ml.
- 9- Guardar stocks a -20°C.

**Formamida, desionizada (Amresco y Sigma-Aldrich)**

Alicuotar en tubos de 50ml libres de ARNasas y guardar a -20 °C.

**20x SSC (3 M NaCl + 0,3 M citrato de trisodio)**

175,3g de NaCl (Sigma-Aldrich), 88,2g de Citrato de Trisodio (Sigma-Aldrich), agregar agua milliQ hasta 800ml, ajustar pH a 7 con HCl y completar volumen a 1 litro con agua milliQ. Agregar 0,1% DEPC y mezclar durante toda la noche (deje la tapa ligeramente abierto). Autoclavar durante 40 minutos, o dos veces de 20 minutos. Esta solución stock se guarda a 4°C.

**Solución de Denhardt concentrada 50X (Sigma-Aldrich, D-2532).**

**Solución de hibridación**

Concentración final	Stock	Volumen para 50 ml
50% Formamida	100%	25ml
5x SSC	20x SSC	12,5ml
1 mg/ml ARN Torula	100-200mg/ml	250–500µl
100µg/ml Heparina	100mg/ml	50µl
1x Denhardt´s	50x Denhardt´	1ml
0,1% Tween-20	10% Tween-20	0,5ml
0,1% CHAPS	10% CHAPS	0,5ml
Agua tratada con DEPC		Enrazar en 50ml

### **SSC 2X + 0.1% Tween-20**

Preparar con agua tratada con DEPC.

### **SSC 0.2X + 0.1% Tween-20**

Preparar con agua tratada con DEPC.

### **MAB (Maleic Acid Buffer)**

100mM de Ácido Maleico (11.61 g/litro) (Sigma-Aldrich) y 150mM de NaCl (8.77 g/litro) (Sigma-Aldrich). Ajustar pH a 7,5. Autoclavar y guardar a 4°C.

### **MAB-T**

Agregar Tween-20 para una concentración final de 0,1%.

Agregar Tween-20

### **MAB-T + 1% "Blocking reagent" + 5% de suero de oveja**

La solución con todos sus componentes debe ser calentada a 60°C durante 30 minutos para inactivar el suero, y posteriormente colocada en hielo antes de agregársela a las muestras.

### **Roche anti-digoxigenin, POD conjugated (Roche)**

### **PBS + 0,1 M Imidazol, pH 7.6**

Agregar 0,1 M de imidazol (Sigma-Aldrich) a PBS estéril autoclavado. Se guarda a 4°C.

### Apéndice 3: Generación de sonda marcada con DIG-UTP y cuantificación de marca por DotBlot, para WMISH

**Transcripción *in vitro* (IVT):** Las sondas se generan por transcripción *in vitro* (IVT) a partir de los productos de PCR obtenidos por la amplificación de un inserto secuenciado y conocido dentro de un plásmido pGEM-T, por lo que los insertos se encuentran flanqueados por promotores de polimerasas de ARN "T7" y "SP6", pudiendo generar desde ellos una sonda Sense (S) o AntiSense (AS). La sonda AS es la utilizada por las WMISH, y la S como control negativo de la técnica. La PCR para molde son PCRs de 100µl y 35 ciclos. Luego del ciclado se precipita el ADN generado 0,1 volúmenes de Acetato de Sodio 3 M y 2,5 volúmenes de Etanol 100%, 1 hora a -80°C o toda la noche a -20°C, Centrifugación 20 minutos a 12000g a 4°C y resuspensión en unos 20µl de Agua tratada con DEPC, o de kit comerciales que sean libres de ARNasas, se cuantifican por nanodrop y se visualiza su integridad.

En este trabajo se utilizaron 2µg de ADN molde para la generación de cada sonda, los volúmenes utilizados en la IVT son los siguientes:

Buffer 5x	4µl
<b>NTPs mix (10 mM ATP, 10mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM UTP)</b>	2µl
3,5 mM DIG-UTP	2µl
RNAse-out	0,5µl
ARN polimerasa SP6 o T7.	1,5µl
ADN (2µg final)	Lo necesario para 2µg
H <sub>2</sub> O Libre de ARNasas	Completar los 20µl

- 1- Luego de tener los 20ul para cada reacción se incuba por 2hs a 37 °C.
- 2- Se le agrega a cada tubo 2ul de DNase y se incuba por 15 minutos a 37°C.
- 3- Se purifica la Sonda por Pure Link RNA microkit (Invitrogen), dos eluciones de 15µl al final del procedimiento estándar de este Kit, 30µl finales de sonda.
- 4- Se congelan a -80°C 25µl. Los otros 5µl se utilizan: 3µl para correr en gel de agarosa y 2µl para cuantificación de marca por DotBlot.

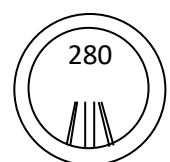
## Cuantificación de Sondas por DotBlot

- 1- “Bloteo” de diluciones seriadas de cada sonda y el control de DIG-ADN o DIG-ARN en membrana de Nylon. Colocar 1 $\mu$ l por dilución de cada muestra en la membrana (luego de preparadas todas las diluciones, se puede usar el mismo tip para cargarlas a la membrana desde la más diluida a la más concentrada de una misma muestra). Diluciones preparadas para cargar: 1; 1/10; 1/100; 1/1000.
- 2- Secado 40 minutos a 60°C. Los protocolos originales dicen 20 a 30´ entre 70°C e idealmente 80°C.
- 3- Crosslink con luz UV o Crosslinkeador, durante 1 minuto.
- 4- Lavado en Buffer1 5 minutos, con agitación.
- 5- Bloqueo 20 minutos en Buffer2, con agitación.
- 6- Incubación con Anti-DIG conjugado a Fosfatasa Alkalina (AP) 1/2000 20 minutos en Buffer1, con agitación.
- 7- Lavar 2 veces 10 minutos en Buffer1, con agitación.
- 8- Lavado breve con Buffer3, con agitación.
- 9- Revelado con 330  $\mu$ g/ml NBT (Amresco), 167  $\mu$ g/ml BCIP (Amresco) en Buffer 3. **SIN AGITACIÓN.**
- 10- Esperar a que la reacción revele color, generalmente 5-10 minutos, y cortar la reacción con H<sub>2</sub>O milliRo. Dejar secar la membrana cubierta.
- 11- Comparar concentraciones de las sondas generadas por IVT con el control marcado.

Buffer1: Tris-HCl, 100mM, NaCl 150mM, pH 7,5.

Buffer2: Buffer1 + 0,5% w/v agente de bloqueo (calentar 1 hora a 65°C).

Buffer3: Tris-HCl 100mM, NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 50mM, pH9,5.



## **Apéndice 4: Inmunohistofluorescencia sobre criocortes**

- 1- Secar criocortes durante 30 minutos a RT. (Opcionalmente después de esto se pueden incubar 15 minutos con PBS-PFA 4% durante 15 minutos)
- 2- Lavar 3 veces con PBS-T (con Tritón X-100 0,1%).
- 3- Bloquear con PBS-T + 1% de BSA (Seroalbúmina bovina, Sigma-Aldrich) + 5% de suero de oveja (Sigma-Aldrich) + 0,05% Tween-20 (Sigma-Aldrich) durante 1 hora a RT en una cámara húmeda.
- 4- Incubar con anticuerpo primario a la concentración adecuada (por ejemplo: 1/500 para el anti-Npp-46 o 1/50 para anti-sinapsina) diluido en PBS + 1% BSA durante 2 horas a RT o toda la noche en la heladera, en ambos casos en una cámara húmeda.
- 5- Lavar 4 veces con PBS-T, cada lavado de 15 minutos.
- 6- Incubar con el anticuerpo secundario conjugado a fluorocromo (generalmente 1/1000 final, o 1/500 si está diluido al 50% en PBS el stock de este secundario), diluido en PBS + 1% de BSA durante 2 horas a RT en cámara húmeda.
- 7- Lavar 4 veces con PBS-T, cada lavado de 15 minutos (si se quiere co-teñir con DAPI, Faloidina o Verde de Metilo se puede hacer en el segundo o tercer lavado de este paso con un tiempo de 30 minutos).
- 8- Montar con glicerol 80% 50mM de Tris pH 7 y sellar con esmalte de uñas incoloro.

## **Apéndice 5: Inmunohistofluorescencia *in toto*, sobre oncósferas activadas.**

Entre cada paso se centrifuga a las oncósferas activadas fijadas a 1000-2000g durante 2-3 minutos antes de retirar el líquido de la solución previa, siempre con cuidado de no llevarse oncósferas (o la menor cantidad posible).

### **Día 1**

- 1- Fijar a las oncósferas activadas con PFA 4% en PBS ON en la heladera o 4hs a RT.
  - 2- Lavar 3 veces con PBS + 0,3% Tritón (PBS-T) a RT, cada lavado de 10 minutos y en agitación.
  - 3- Permeabilización con PBS + 1% SDS a RT, durante 20 minutos con agitación.
  - 4- Lavar 3 veces con PBS-T a RT, 10 minutos cada lavado, con agitación.
  - 5- Bloquear con PBS-T + 3% BSA (SIGMA) + 5% Suero de Oveja (SIGMA) a temperatura ambiente, durante 2 horas con agitación.
  - 6- Incubar con anticuerpo primario a la concentración adecuada (Npp-46 por ejemplo 1/500) en PBS-T + 3% BSA, a 4°C, por 2 días, con agitación. Opcional: Utilizar azida de sodio 2 mM (0.02%) de concentración final en esta solución para evitar crecimiento de bacterias.
- Recordar: hacer un control sin anticuerpo primario, para poder creerle a tus resultados, y que no sean producto de pegoteos inespecíficos del secundario que vayas a usar unos días después.**

### **48hs después... Día 3**

- 7- Lavar 5 veces con PBS-T a RT, 30 minutos cada lavado, con agitación.
- 8- Incubar con anticuerpo secundario conjugado a fluorocromo a la concentración adecuada (generalmente los secundarios se utilizan 1/1000, 1/500 si está en una dilución ½ en glicerol) en PBS-T + 3% BSA, a 4°C, por 2 días, con agitación en la oscuridad. Opcional: Utilizar azida de sodio 2 mM (0.02%) de concentración final en esta solución para evitar crecimiento de bacterias.



## Otras 48hs más tarde... Día 5

9- Lavado rápido con PBS-T

10- Opcionalmente incubar con marcadores fluorescentes como DAPI (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y/o Faloidina-FITC (Sigma) dilución 1/100, y/o Verde de metilo 2%. Durante 1 hora a RT, también se puede dejar ON a 4°C, con agitación.

11- Lavar 4 veces con PBS-T a RT, durante 30 minutos cada lavado, con agitación.

12- Montar con 80% glicerol 50mM de Tris pH 7 y sellar con esmalte de uñas transparente. Lo mejor en este último paso es centrifugar luego del último lavado de PBS-T, dejar aproximadamente 50-100 $\mu\text{l}$  de volumen, llenar de la solución de glicerol dejar unos 10 minutos, volver a centrifugar y después montar. Para montar, poner en un extremo del portaobjetos y poner el cubre apoyando desde donde se puso la muestra acuosa para q al soltarlo arrastre a las oncósferas hacia el otro extremo (no hacer un solo preparado para cada experimento con oncósferas en general, siempre encuentran la forma de traicionar tu confianza en ellas).

## Apéndice 6: Activación y Cultivo de cisticercoides

### Activación:

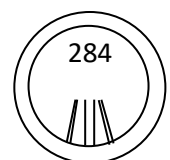
- 1- Recolectar aproximadamente 100 Cisticercoides en PBS.
- 2- Lavar 3 veces con PBS.
- 3- Pasar los Cisticercoides a Placa de Petri de 5cm de diámetro
- 4- Incubar en 10ml de Solución A. Incubar 30´a RT.
- 5- 2 lavados rápidos con PBS.
- 6- Incubar en 10ml Sol B Precaentada (37°C) .20´ (o más, en 40 minutos por ejemplo todos estarán activados generalmente) a 37°C.
- 7- Ver en la lupa y a medida que se activan recolectar de a uno y pasar a PBS.

### ***Soluciones de “activación de cisticercoides”:***

- **Solución A:** PBS+0,17% HCl “Real” (Del HCl concentrado, 34%, una dilución 1/200) + 1% Pepsina. La solución final se prepara en el momento. Importante: primero añadir HCl, luego disolver Pepsina, no se diluye muy fácil, se puede poner todo en un tubo con tiempo y dejarlo en un agitador unos minutos a máxima velocidad.
- **Solución B:** Hanks + 0,1% Taurocolato de Sodio + 0,5% Tripsina. La solución final se prepara en el momento.
- **Hanks:** Sales de Hanks: 9,8g/L, NaHCO<sub>3</sub> 350mg/L, pH 7,5. Esta solución puede prepararse una vez, alicuotarse y congelarse para futuros usos, también se puede usar en su lugar medio RPMI en casos de emergencia de no encontrar en donde se guardó y estar deseoso de realizar un experimento de activación.

### Cultivo:

- 1- Armar la base de agar de las placas, 5% de sangre ovina en AgarTryptona (Biokey), en placas de 12 wells, 50 µl de sangre 950 µl de AgarTryptona. **IMPORTANTE:** la sangre se tiene que inactivar (30 minutos a 56 °C, como el suero), el agar triptona se tiene que calentar hasta quedar líquido (microondas o baño a 90 °C).

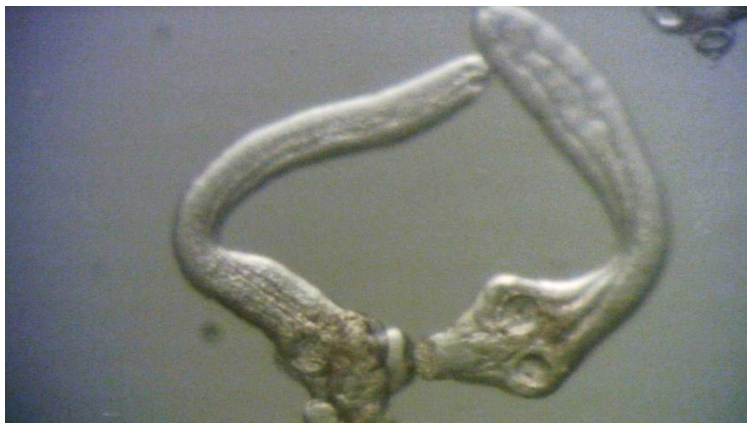


- 2- Después de que la base solidifica, dejar con 500  $\mu$ l de RPMI estéril con 1% de antianti en estufa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Puede quedar ON ahí incluso. Los Wells que no se vayan a utilizar se pueden llenar con PBS o agua estéril para evitar evaporación.
- 3- Activar los cisticercoides que se necesite, generalmente 20-30 por well, empezando a trabajar con esterilidad después del paso con HCl, haciendo los lavados con PBS estéril en sala de cultivo y con 2 lavados extra, centrifugando en cada paso 1 minuto a 2 mil g (en la microcentrífuga de cultivo). La tripsina y taurocolato se preparan en el momento y se filtran (0,22  $\mu$ m) con jeringa.
- 4- En la tripsina los cisticercoides se dejan 40 minutos invirtiendo cada 5 minutos aproximadamente, se centrifugan y se les realiza un lavado con PBS con 5 % suero.
- 5- Se retira el RPMI de los Wells que se vayan a usar.
- 6- Se resuspende a los cisticercoides en el medio de cultivo RPMI-30-H-T-antiati, resuspendiendo muy bien para cada vez que se coloca en un pocillo.
- 7- Se completa el volumen hasta 1ml con RPMI-30-H-T-antiati en placas de 12 wells (queda 1ml de base y 1ml de medio, en placas de 24 wells dividir todos los volúmenes a la mitad).
- 8- Se los deja a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Para cada cambio de medio, se cambia la mitad del medio evitando tomar desde el fondo para no perder cisticercoides (ej: en las placas de 12 wells se toman 500  $\mu$ l desde la superficie de las placas y se ponen 500  $\mu$ l nuevos de RPMI-30-H-T-antiati)

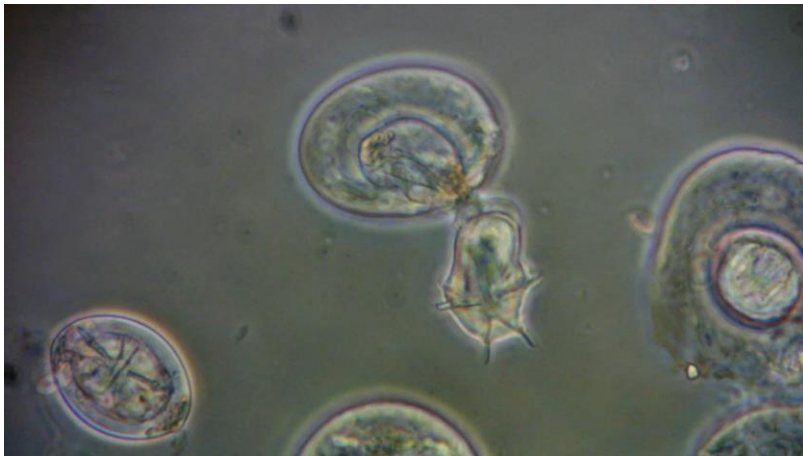
***Medio de cultivo de cisticercoides, "RPMI-30-H-T-antiati":***

RPMI, 30% SFB, 1% AntiAnti, Hemina 0,15  $\mu$ m, 0,1% Taurocolato, 1% antiati.



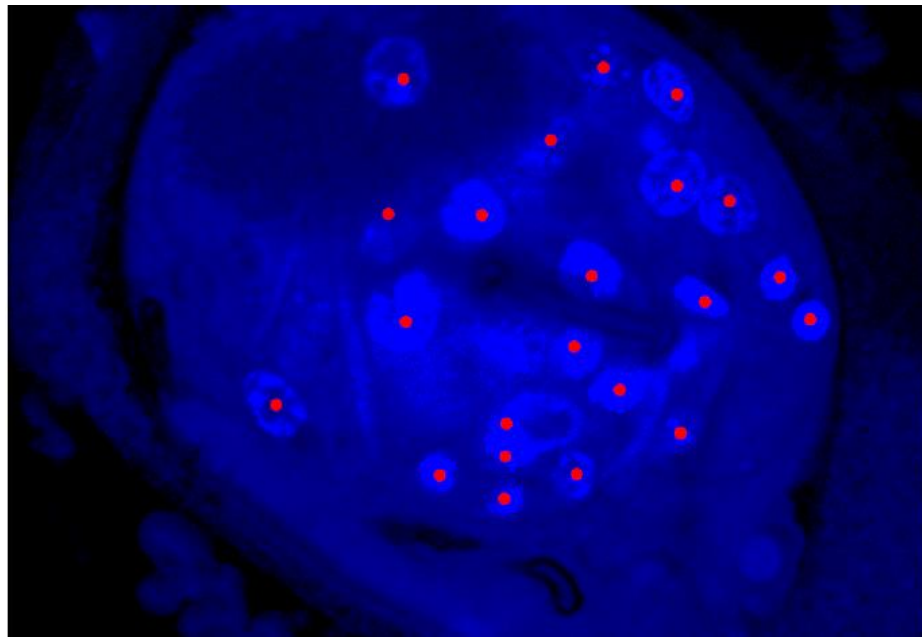
## **Apéndice 7: Activación de oncósferas con Homogeneizador**

- 1- Tomar oncósferas purificadas (entre 50 y 400 $\mu$ L) y poner en el homogeneizador.
- 2- Agregar 1ml de NaCl 0,8% + Bicarbonato de Sodio 5mg/ml (pH = 7,5) en el homogeneizador.
- 3- Efectuar 50 ciclos con el émbolo en el homogeneizador.
- 4- Pasar a eppendorff y centrifugar a 1200g durante 2 minutos.
- 5- Resuspender (Vol que quieras) en la solución del paso 2. Generalmente 200  $\mu$ l por cada condición de experimentos de screening para drogas o npps, y después a placa de 96 Wells.
- 6- Dejar 15 minutos en agitador girando a potencia moderada (1/3 del máximo, aproximadamente 170 rpm), para dejarlas salir y que queden en el medio de la placa la mayoría.



## Apéndice 8: Conteo de Núcleos Manual

- 1- Separar canales y quedarse con el de DAPI.
- 2- Modificar Brillo y contraste para q los núcleos se vean bien, asegurarse de que estén en LUT azul.
- 3- Pasar la imagen a RGB.
- 4- Seleccionar pincel y con “control+shift+k” seleccionar rojo.
- 5- Marcando con el mouse en cada núcleo, hacer un click en el mismo lugar para todos los planos donde aparece cada núcleo, pasando cada plano con las flechas del teclado.
- 6- Revisar para que todos los núcleos tengan marca (es bueno guardar en este paso).
- 7- Separar canales y en el canal con los puntos (rojo) hacer un Z-Stack de maximun intensity.
- 8- Image>Adjust>Threshold>Apply
- 9- Process > Binary > watershed (separa los puntos de conteo que puedan estar pegados).
- 10- Analyse particles, con los datos por defecto.
- 11- Listo, te da una tabla con el conteo de la cantidad de núcleos.



## **Apéndice 9: Cuantificación Movimiento cisticercoides activados por videos de corta duración.**

- 1- Tomar un video de los cisticercoides con la mayor cantidad de ellos en el mismo campo. El video tiene que ser de más de 10 segundos (es bueno tomar más de uno porque a veces queda mal grabado y da error en el FIJI).
- 2- Abrir FIJI y tirar al video para adentro. Darle Ok a las ventanas emergentes que salgan.
- 3- En el tiempo 0 (0.4s dice arriba) hacer una duplicación (ctrl+shift+D) y ponerle de nombre "0" (si te estás preguntando si dejar las comillas, no, no lo hagas, sólo lo de adentro de ellas.)
- 4- Ir 10 segundos después pasando de imagen en imagen (10.4s dice arriba) y hacer otra duplicación, llamarla "10". Los nombres son importantes porque el script reconoce a "0" y "10" como base del análisis.
- 5- En el FIJI ir a Plugins, Macro, Run y seleccionar el Script "ScriptDeBritaLevementeModificado", se detalla el Script luego de estos pasos.
- 6- Se van a ver muchos datos, el importante es el área total (Total Area).
- 7- Se recomienda para una misma condición tomar varios videos y hacer promedios del área total, al menos 3. La mejor forma de proceder es tomar un video de 10 segundos de cada condición y empezar de nuevo desde la primer condición hasta la última, para que el tiempo afecte menos los resultados.

### ScriptDeBritaLevementeModificado:

```
selectWindow("10");
run("8-bit");
selectWindow("0");
run("8-bit");
selectWindow("0");
run("Smooth", "stack");
selectWindow("10");
run("Smooth", "stack");
imageCalculator("Subtract create stack", "0", "10");
selectWindow("Result of 0");
run("Invert", "stack");
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
setThreshold(0, 230);
//setThreshold(0, 230);
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask", "method=Default background=Light");
//run("Close");
run("Analyze Particles...", "display exclude clear summarize stack");
```

