



Universidad Nacional Autónoma de México
Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Transfección transitoria de cisticercos de *Taenia crassiceps* utilizando siRNA

TESIS MONOGRÁFICA

Que para optar por el grado de Doctor en Ciencias
presenta:

Julio Israel Guerrero Hernández

TUTOR DE TESIS:

Dr. Juan Pedro Laclette San Román, Instituto de Investigaciones
Biomédicas, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dr. Raúl José Bobes Ruiz, Instituto de Investigaciones
Biomédicas, UNAM

Dr. Luis Herrera Estrella, Institute of Genomics for Crop Abiotic
Stress Tolerance, Texas Tech University

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. SEPTIEMBRE, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional Autónoma de México
Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Transfección transitoria de cisticercos de *Taenia crassiceps* utilizando siRNA

TESIS MONOGRÁFICA

Que para optar por el grado de Doctor en Ciencias
presenta:

Julio Israel Guerrero Hernández

TUTOR DE TESIS:

Dr. Juan Pedro Laclette San Román, Instituto de Investigaciones
Biomédicas, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dr. Raúl José Bobes Ruiz, Instituto de Investigaciones
Biomédicas, UNAM

Dr. Luis Herrera Estrella, Institute of Genomics for Crop Abiotic
Stress Tolerance, Texas Tech University

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. SEPTIEMBRE, 2023

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
OFICIO: CGEP/CPCB/IIBM/0602/2023
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria de Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **22 de mayo de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **GUERRERO HERNÁNDEZ JULIO ISRAEL** con número de cuenta **512026910** con la tesis titulada **“Transfección transitoria de cisticercos de *Taenia crassiceps* utilizando siRNA”**, realizada bajo la dirección del **DR. JUAN PEDRO LACLETTE SAN ROMÁN**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidenta: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
Vocal: DR. ALEJANDRO CASTELLANOS GONZÁLEZ
Vocal: DRA. FELA MENDLOVIC PASOL
Vocal: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
Secretario: DR. RAÚL JOSÉ BOBES RUÍZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 07 de agosto de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA

c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/JMB/EARR/jmb



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES:

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al CONACyT por otorgarme la beca para estudios de doctorado con número CVU 440780.

A PAPIIT-UNAM por otorgar el financiamiento IN-205820.

A CONACyT por otorgar el financiamiento A1-5-11306.

A mi Tutor Principal, Dr. Juan Pedro Laclette San Román por otorgarme su apoyo y creer en mí.

A los miembros de mi comité tutorial:

Al Dr. Raul José Bobes Ruiz, por siempre estar pendiente y otorgarme su ayuda.

Al Dr. Luis Herrera Estrella por aportar sus conocimientos al proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

M. en C. Patricia de la Torre por su ayuda en técnicas moleculares.

Dr. Alejandro Castellanos por darme la oportunidad de compartir su laboratorio, su conocimiento y su entusiasmo.

A mis compañeros de laboratorio Janette, Adriana, César y Christian por su ayuda en los experimentos, por su amistad y por hacer mejor la vida de laboratorio.

A mis compañeras del laboratorio del Dr. Alejandro Castellanos en Galveston Texas Sammy y Grisselle y a Thom Shelite por su apoyo y amistad.

DEDICATORIA

A mi esposa Bárbara

Por siempre creer en mi, impulsarme a seguir con este reto hasta terminar y por siempre ser un ejemplo a seguir para mi y para todo quien la rodea

A mis hijas Matilde y Amelia

Por ser mi inspiración y mi esperanza

A mi madre Margarita

Por darme fuerza y no quitar el dedo del renglón

A mi padre Oscar

Por su apoyo en momentos difíciles y estar siempre cerca

A mis tíos Toni, Conso y Aquilino

Por siempre estar a mi lado

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	7
2.1 <i>Taenia solium</i>	7
2.2 <i>Taenia crassiceps</i>	10
2.3 Transfección génica en ténidos	11
2.4 Silenciamiento génico	13
2.5 Silenciamiento génico en ténidos	14
2.6 Enolasa	15
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo general	18
3.2 Objetivos específicos	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1 Mantenimiento de los cisticercos y obtención de muestras	19
4.2 Análisis genómico y filogenético de Ago2 y Dcr2	19
4.3 Detección de la maquinaria molecular de procesamiento de siRNA	20
4.4 Diseño de siRNA para el silenciamiento de Eno A de <i>T. crassiceps</i> .	22
4.5 Transfección de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> : Electroporación	23
4.6 Evaluación del silenciamiento de TcEnoA por RT-PCR	23
4.7 Análisis de la expresión génica de otras enzimas metabólicas después del silenciamiento de TcEnoA	24
5. Resultados	25
5.1 Optimización del método para transfección con siRNA	25
5.2 Expresión de la maquinaria para el procesamiento de los siRNA en <i>T. crassiceps</i>	25
5.3 Análisis filogenético de los genes Ago2 y Dcr2	26
5.4 Evaluación del silenciamiento de TcEnoA	27
5.5 Evaluación de la expresión de genes de la Vía Glicolítica	31
5.5.1 Expresión basal de los genes de la Vía Glicolítica	31
5.5.2 Expresión post-silenciamiento de los genes de la Vía Glicolítica	32
5.6 Evaluación de la expresión de genes del Ciclo de Krebs	32
5.6.1 Expresión basal de los genes del Ciclo de Krebs	32
5.6.2 Expresión post-silenciamiento de los genes del Ciclo de Krebs	33
6. DISCUSIÓN	35
7. CONCLUSIONES	42
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
9. ANEXOS	55
9.1 Anexo 1 Secuencias utilizada para el análisis filogenético de TcAgo2 y Dcr2	55
9.2 Anexo 2 Oligonucleótidos diseñados para los experimentos de RT-PCR	59

9.3 Anexo 3 Artículo de revisión como actividad académica complementaria	63
9.4 Anexo 4 Artículo requisito	83

RESUMEN

Taenia crassiceps, es el modelo animal más ampliamente utilizado para el estudio de la cisticercosis. Sin embargo, no se ha reportado el uso de la técnica molecular de silenciamiento génico en esta especie de platelminto. El silenciamiento génico consiste en la reducción de la expresión de un gen de forma postranscripcional o traduccional mediante la introducción de RNA de interferencia y es una técnica ampliamente utilizada para conocer la función de genes. En este trabajo se reporta por primera vez un procedimiento de silenciamiento génico en el céstodo *T. crassiceps* utilizando RNA pequeño de interferencia (siRNA). Se realizaron búsquedas en bases de datos genómicas para conocer si los genes relevantes en el proceso de silenciamiento génico y procesamiento de RNA no codificante, están presentes en *T. crassiceps* [Argonauta (Ago) y Dicer (Dcr)]. Se identificaron tres genes para Ago y dos genes para Dcr, designados como TcAgo1, TcAgo2 y TcAgo3, y TcDcr1 y TcDcr2, respectivamente. Además, para determinar las relaciones evolutivas de los genes TcAgo2 y TcDcr2 se llevaron a cabo análisis filogenéticos para cada uno de ellos, para el análisis se incluyeron a otras 20 especies de platelmintos. Los resultados mostraron relaciones filogenéticas cercanas de TcAgo y TcDcr con los mismos genes descritos en *Taenia asiatica*, *Taenia solium*, *Hymenolepis microstoma* y *Echinococcus multilocularis*. Mediante RT-PCR se demostró la expresión de todos los ortólogos de TcAgo y TcDcr y que la maquinaria de silenciamiento se encuentra activa en *T. crassiceps*. Para los experimentos de silenciamiento se diseñaron dos siRNAs de diferentes regiones del RNA de la enolasa A, siendo uno de ellos el más efectivo. Se obtuvo una reducción de hasta un 90% en la expresión de TcEnoA a las 24 horas post transfección. La enolasa es una enzima que forma parte de la vía metabólica de la glucólisis y que presenta 4 variantes conocidas en *T. crassiceps*: TcEnoA, TcEnoB, TcEnoC y TcEno4. No se observó que la reducción en la expresión de TcEnoA tuviera un efecto relevante en la expresión de las demás enzimas implicadas en la glucólisis, pero si causó variación en la expresión de sus variantes, lo que sugiere un efecto compensatorio como respuesta al silenciamiento de TcEnoA. Estos resultados en conjunto muestran sin lugar a dudas que la maquinaria del silenciamiento es funcionalmente activa en los cisticercos de *T. crassiceps* y que el silenciamiento de genes mediante el uso de siRNA puede ser utilizado como una herramienta molecular para el estudio de la función de genes en céstodos ténidos.

ABSTRACT

Taenia crassiceps is the most extensively used animal model for the study of cysticercosis. However, the use of the molecular technique of gene silencing in this species of platyhelminthes has not been reported. Gene silencing consists of reducing the expression of a gene post-transcriptionally or translationally by introducing RNA interference and it is a widely used technique to determine gene function. In this work, a gene silencing procedure in the *T. crassiceps* cestode using small interfering RNA (siRNA) is reported for the first time. Genomic databases were searched to find out if the relevant genes in the process of gene silencing and non-coding RNA processing [Argonaute (Ago) and Dicer (Dcr)] are present in *T. crassiceps*. Three genes for Ago and two genes for Dcr were identified, designated TcAgo1, TcAgo2, and TcAgo3, and TcDcr1 and TcDcr2, respectively. In addition, to determine the evolutionary relationships of the TcAgo2 and TcDcr2 genes, phylogenetic analyzes were carried out for both genes compared to Ago2 and Dcr2 sequences of 20 species of plathelminths. The results showed close phylogenetic relationships of TcAgo and TcDcr with the same genes described in *Taenia asiatica*, *Taenia solium*, *Hymenolepis* and *Echinococcus*. RT-PCR demonstrated the expression of all TcAgo genes and that the silencing machinery is active in *T. crassiceps*. For the silencing experiments, two siRNAs from different regions of enolase A RNA were designed, one of them being the most effective. A reduction of up to 90% in the expression of TcEnoA was obtained at 24 hours post-transfection. Enolase is an enzyme that is part of the glycolysis metabolic pathway and has 4 known variants in *T. crassiceps*: TcEnoA, TcEnoB, TcEnoC, and TcEno4. The reduction in TcEnoA had no relevant effect on the expression of the other enzymes involved in glycolysis, but it did cause variation in the expression of its variants (TcEnoB, TcEnoC, and TcEno4), suggesting a compensatory effect in response to TcEnoA silencing. These results show without a doubt that the silencing machinery is functionally active in *T. crassiceps* cysticerci and that gene silencing using siRNA can be used as a molecular tool for the study of gene function in tapeworm cestodes.

1. INTRODUCCIÓN

Los platelmintos son un grupo de animales bilaterales, trofoestomados, triblásticos, sin cavidad corporal (acelomados), que incluye mayoritariamente especies de vida libre pero también gusanos parásitos. Los platelmintos parásitos más estudiados son los pertenecientes al clado Neodermata, que incluye los taxos Monogenea, Trematoda, y Cestoda (Campos *et al.*, 1998). Dentro de estos, los céstodos son una clase altamente diversificada que incluye especies con impacto médico significativo (Jin *et al.*, 2013, Schmidt and Roberts, 2008) y son agentes causales de infecciones incluidas en las llamadas “enfermedades tropicales desatendidas” (NTDs, por sus siglas en inglés), frecuentemente relacionadas con la pobreza y falta de higiene, asociadas a una pobre calidad de vida del ser humano que las padece (WHO, 2012; Andrea, 2015; CDC - Cysticercosis - Resources for Health Professionals, revisado en marzo del 2023). Las enfermedades más importantes causadas por estos parásitos platelmintos incluyen: la esquistosomiasis, causada por los trematodos *Schistosoma mansoni* y *S. japonicum*, que afecta a 240 millones de personas alrededor del mundo (Berkowitz *et al.*, 2015); así como otras enfermedades causadas por gusanos planos como la equinococosis, causada por el *Echinococcus granulosus*, que afecta a alrededor de un millón de personas en el mundo y amenaza a cerca de 270 millones de personas en Asia Central (Berkowitz *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015).

El cestodo *Taenia solium* es el agente causal de la teniasis/cisticercosis, una enfermedad en la que el humano es el único portador del gusano adulto y responsable de su transmisión al cerdo y a otros humanos por vía fecal (Huerta *et al.*, 1992). El término teniasis se utiliza para nombrar a la enfermedad humana provocada por el gusano adulto, mientras que cisticercosis se refiere a la enfermedad causada por el estadio larvario que habita una variedad de tejidos, incluyendo el músculo esquelético, el tejido subcutáneo y el tejido nervioso (Baker *et al.*, 2013). Cuando la forma larvaria se instala en el sistema nervioso central ocasiona la neurocisticercosis (NC), enfermedad asociada con la pobreza, la falta de higiene, las deficiencias en la vigilancia epidemiológica y otros aspectos socioculturales (Willingham & Engels, 2006). La NC es una enfermedad altamente debilitante que puede ocasionar la muerte del paciente (Navarrete-Perea *et al.*, 2014; Sciutto *et al.*, 2000; Willingham & Engels, 2006). La cisticercosis es una de las zoonosis más frecuentes, encontrándose incluida dentro del grupo de las 17 NTDs

con mayor prevalencia en el mundo (Berkowitz *et al.*, 2015). La presencia de anticuerpos séricos específicos demuestra el contacto de los humanos con la *T. solium* en cerca del 22.4% de la población en ciertas regiones de América Latina, 50% de Asia y 22% del África Subsahariana (Andrea, 2015; CDC - Cysticercosis - Resources for Health Professionals, revisado en marzo del 2023; Gripper & Welburn, 2017).

El ciclo de vida de este parásito puede iniciar con la teniasis, que se adquiere cuando el humano consume carne de cerdo infestada por larvas (cisticercos), cruda o insuficientemente cocida (Sciutto *et al.*, 2000; Dorny *et al.*, 2009). Bajo la acción de las enzimas gástricas e intestinales, se activan los cisticercos que se fijan al epitelio intestinal en una región del duodeno, y se desarrolla hasta convertirse en un gusano adulto productor de segmentos grávidos (llenos de huevos) que son liberados al ambiente vía heces. A su vez, la cisticercosis se adquiere cuando el cerdo ingiere heces contaminadas con huevos de *T. solium*. El ser humano también puede actuar como huésped intermediario accidental cuando se ingieren agua o alimentos contaminados con restos fecales de individuos teniásicos. Nuevamente, la acción de las enzimas gástricas e intestinales, así como la acción de las sales biliares, produce la liberación de las oncosferas que penetran el epitelio intestinal y alcanzan la circulación linfática o sanguínea hasta que se establecen en diversos órganos como ojos, músculo esquelético, corazón y/o tejido subcutáneo; las larvas que se alojan en el sistema nervioso central (SNC) son el agente causal de la NC, la parasitosis más común del SNC, una enfermedad altamente debilitante y asociada a un decremento importante en la calidad de vida (Sciutto *et al.*, 2000; Dorny *et al.*, 2009; Utzinger *et al.*, 2012; Andrea, 2015). La neurocisticercosis se ha relacionado al 32.3% de los pacientes epilépticos en América Latina, 16.4% en China, 34% en India y del 2-10% en Tanzania, Uganda y Malawi. De la misma forma, 50% de los casos de ataques epilépticos en Sudáfrica y Zambia se ha relacionado con la NC (Andrea, 2015).

En México, en los últimos años, se ha reducido considerablemente la incidencia de la teniasis/cisticercosis (Fleury *et al.*, 2010). Algunos autores han sugerido que la teniasis/cisticercosis ya no constituye un problema de salud pública en nuestro país

(Flisser y Correa, 2010). Sin embargo, se mantiene la transmisión activa en zonas rurales en varios estados de la república, sin que esto implique un aumento en el número total de casos. En países como Guatemala la teniasis/cisticercosis todavía puede ser considerada como un problema de salud pública (Hernández-Chea *et al.*, 2023). Por otro lado, en países centroamericanos y del caribe como Colombia, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Venezuela la teniasis porcina es elevada, por lo que se considera que existe mayor prevalencia de teniasis/cisticercosis humana que la reportada en dichos países (Braae *et al.*, 2017). En Estados Unidos y otros países no endémicos, la migración continua de personas portadoras provenientes de países endémicos ha producido que la teniasis/cisticercosis sea considerada una enfermedad emergente (Sorvillo *et al.*, 2011). También se ha reportado que viajeros que regresan a países no endémicos, después de estancias largas en países endémicos, pueden ser portadores importantes de la enfermedad (Del Brutto, 2012). En 14 países de Europa del Este se han reportado casos de teniasis y en 15 países, de cisticercosis humana, además Estonia, la antigua República Yugoslava de Macedonia, Lituania, Moldavia, Polonia, Rumania, Serbia, y Eslovaquia reportaron casos de cisticercosis porcina (Trevisan *et al.*, 2018). A pesar de que no existe información completa acerca de estos parásitos en la región, en un estudio reciente se sugiere iniciar medidas de vigilancia y prevención para evitar las posibles implicaciones negativas en el comercio y la economía de Europa del Este (Trevisan *et al.*, 2018). Los casos reportados en Europa Occidental han sido adquiridos fuera del área, y ha habido algunos reportes de cisticercosis porcina en países como Alemania, España y Eslovenia, aunque no se realizó la identificación específica de la especie de *Taenia* involucrada; sin embargo, la vigilancia de la enfermedad debe ser mejorada, especialmente los métodos de diagnóstico molecular para tener datos claros acerca de su prevalencia en Europa Occidental (Laranjo-González *et al.*, 2017). Además, diversos grupos europeos organizaron una red europea de teniasis/cisticercosis, CYSTINET (<http://www.cystinet.org/>), para enfrentar los retos y desarrollar guías para el manejo, diagnóstico y prevención de la teniasis y NCC (Symeonidou *et al.*, 2018).

Durante varias décadas se ha utilizado un modelo murino basado en una especie cercana a la *T. solium*, llamada *Taenia crassiceps*. Este modelo animal de cisticercosis es ampliamente usado debido a que sus metacéstodos o cisticercos pueden ser mantenidos en condiciones de laboratorio gracias a su capacidad de

reproducción por gemación. Esta capacidad de reproducción asexual permite el pase de cisticercos desde el peritoneo de un ratón infectado al peritoneo de un ratón no infectado (Toledo *et al.*, 1997; Willms & Zurabian, 2010). Esta importante característica ha permitido profundizar en la comprensión de diversos procesos biológicos de este tipo de parásitos, incluyendo los mecanismos de evasión de la respuesta inmune (Zurabian *et al.*, 2008; Laclette *et al.*, 1992; Alvarez, Rivera, & Teale, 2008; Navarrete-Perea *et al.*, 2014), del establecimiento en los tejidos del huésped (Ayón- Núñez *et al.*, 2018), así como algunas características sorprendentes como la feminización del huésped inducida por los cisticercos (Larralde *et al.*, 1995), entre otros.

A pesar de ser un método ampliamente utilizado en otros parásitos, incluso en parásitos que carecen de los componentes de procesamiento de RNAs de interferencia (Castellanos-Gonzalez *et al.*, 2016), el uso de siRNA ha sido limitado en platelmintos. Esta situación está cambiando gracias a la secuenciación de los genomas de este grupo de parásitos (Tsai *et al.*, 2013; Vasconcelos *et al.*, 2017; Young *et al.*, 2012; Bobes *et al.*, 2022). El silenciamiento en platelmintos ha sido posible en *S. mansoni*, *E. multilocularis* y *M. expansa*, abriendo el camino a la aplicación de la genómica funcional en estos parásitos (Allan *et al.*, 2017; Boyle *et al.*, 2003; Brehm and Koziol, 2014; Mizukami *et al.*, 2010; Štefanic *et al.*, 2010). Los esfuerzos más importantes relacionados al silenciamiento se han dirigido a la búsqueda de blancos terapéuticos y moleculares relacionados con la relación huésped-parásito. Por otro lado, Moguel *et al.* en 2015 reportaron la transfección transitoria exitosa del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) en cisticercos de *T. crassiceps* en nuestro grupo de investigación. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en la presente tesis doctoral decidimos desarrollar un procedimiento para el silenciamiento génico del gen de Enolasa A en *T. crassiceps* (TcEnoA), mediante la transfección de RNAs pequeños de interferencia (siRNA), lo que no se había reportado previamente en este cestodo. Disponer de un método de silenciamiento génico permitirá investigar la función de múltiples genes como blancos terapéuticos, en la relación huésped parásito o en la fisiología del parásito. Baste mencionar que una cuarta parte de los genes descritos en los proyectos de caracterización de genomas de especies de céstodos, no encuentran homología con los genes reportados en las bases de datos públicas (Tsai *et al.*, 2013, Bobes *et al.*, 2022).

2. ANTECEDENTES

2.1. *Taenia solium*

La familia *Taenidae* es la única dentro de los eucéstodos que requiere dos huéspedes mamíferos obligatorios para completar su ciclo de vida. Como se mencionó antes, las especies de *Taenia* se encuentran dentro de los ténidos que infectan con mayor frecuencia al ser humano y lo utilizan como huésped definitivo (Hoberg, 2006). Sin embargo, aunque estos gusanos tienen adaptaciones tanto estructurales como moleculares al parasitismo (Tsai *et al.*, 2013), su especiación se debió a que diferentes especies de carnívoros en una misma región biogeográfica se alimentaban de una misma especie portadora de la enfermedad, no tanto por una co-evolución directa de la *T. solium* con su huésped intermediario (Hoberg *et al.*, 2000). Es muy probable que el ser humano adquirió a la teniasis ocasionada por *T. solium* y por *T. saginata* como resultado de una conducta carroñera de nuestros ancestros humanos hace un par de millones de años, ya que aprovechaban las matanzas de leones y hienas en las praderas africanas (Hoberg *et al.*, 2000; Hoberg, 2006).

El metacéstodo o cisticerco es la forma larvaria del parásito *T. solium*, que se desarrolla como consecuencia de la ingesta de huevos del parásito adulto. El humano es el único huésped definitivo natural de la *T. solium*, por lo tanto, la prevalencia de la teniasis/cisticercosis depende exclusivamente del vínculo que el hombre establece con los animales y en particular con el cerdo (Willms *et al.*, 2009).

El ciclo de vida de la *T. solium* incluye tres estadios de desarrollo y dos huéspedes mamíferos, el cerdo y el ser humano. Los estadios del desarrollo de la *T. solium* son: 1) huevo, que consta de una oncosfera o embrión hexacanto, llamado así por poseer seis ganchos; una capa protectora denominada embrióforo, hecha de bloques de proteína unidos por una sustancia cementante. 2) Larva también llamada cisticerco o metacéstodo que se observa como una vesícula ovalada y translúcida llena de líquido, con un escólex invaginado (Slais, 1966). El escólex del cisticerco posee cuatro ventosas, un rostelo y dos hileras de ganchos. La superficie externa de la vesícula larvaria es un tegumento similar a una membrana citoplásmica, continuo con prolongaciones citoplásmicas llamadas microtricas, que aumentan su superficie de absorción, necesarias para permitir la nutrición del metacéstodo ya que carece

de sistema digestivo (Slais, 1966; Willms *et al.*, 2009). El tejido del cisticerco es un sincicio que cuenta con elementos celulares distribuidos en forma poco organizada en medio de un abundante tejido conectivo parasitario. Presenta varias capas de tejido muscular liso y células llamadas citones subtegumentales que sintetizan activamente proteínas y otros componentes que posteriormente son transportados hacia el tegumento a través de puentes citoplásmicos. Más profundamente se encuentra el sistema protonefridial, que incluye una serie de conductos que terminan en estructuras celulares ciliadas, llamadas células flama. Es en el sistema protonefridial que se producen los corpúsculos calcáreos, que se forman en la luz de los ductos, y que probablemente participan en procesos de desintoxicación (Vargas-Parada *et al.*, 1999; Valverde-Islas *et al.*, 2011) y en el desecho de proteínas del huésped que el cisticerco absorbe, incluyendo inmunoglobulinas, una de las posibles formas de evasión inmune (Flores-Bautista *et al.*, 2018) (Figura 1).

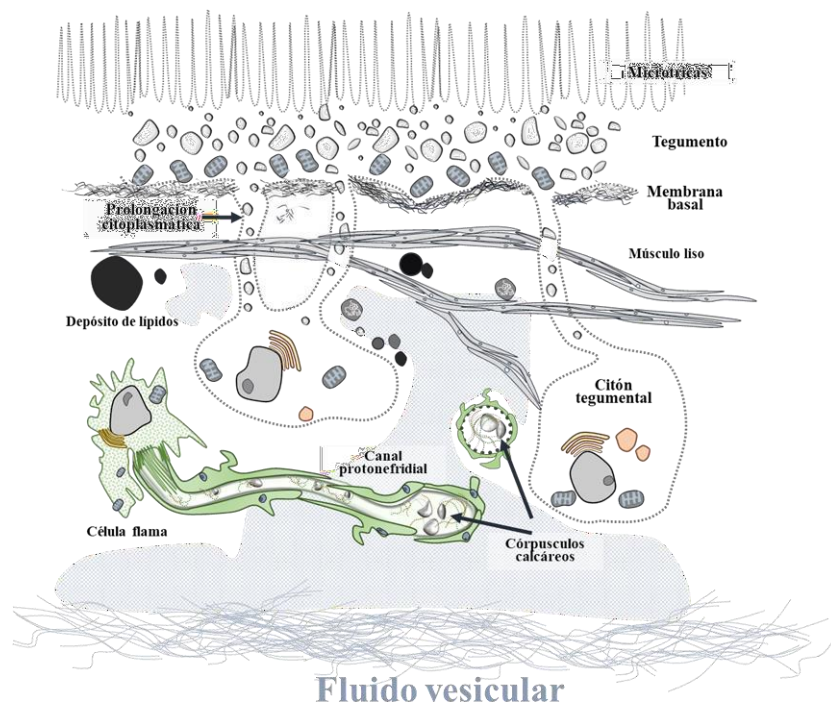


Fig. 1. Estructura interna del cisticerco (Ilustración tomada de la tesis doctoral de Jeanette Flores Bautista, 2019).

El cisticerco puede presentar dos formas: racemosa o monovesicular (Lino *et al.*, 2007). La forma racemosa es grande, multilobulada con forma de racimo de uvas y se observa neurocisticercosis humana. La forma celulosa es pequeña, esférica u ovalada, con una vesícula translúcida a través de la cual se puede observar el escólex (Lino *et al.*, 2007; Willms *et al.*, 2009).

El gusano adulto o solitaria, presenta un extremo globular llamado escolex, que en su región más distal posee un rostelo con dos filas de 10 a 14 ganchos. Por debajo de los ganchos se observan 4 ventosas y una zona proliferativa que da origen a los segmentos del cuerpo (estróbilo) llamados proglótidos. Cada proglótido posee tanto gónadas femeninas como masculinas, lo que permite el proceso de autofecundación. Al final del gusano adulto se encuentran proglótidos repletos de huevos (50,000 a 60,000 huevos por segmento) por lo que se les conoce como proglótidos grávidos. El gusano vive en el intestino delgado del ser humano, donde los proglótidos más distales se desprenden del estróbilo para ser expulsados en las heces (Sciutto *et al.*, 2000; Willingham & Engels, 2006; Willms *et al.*, 2009).

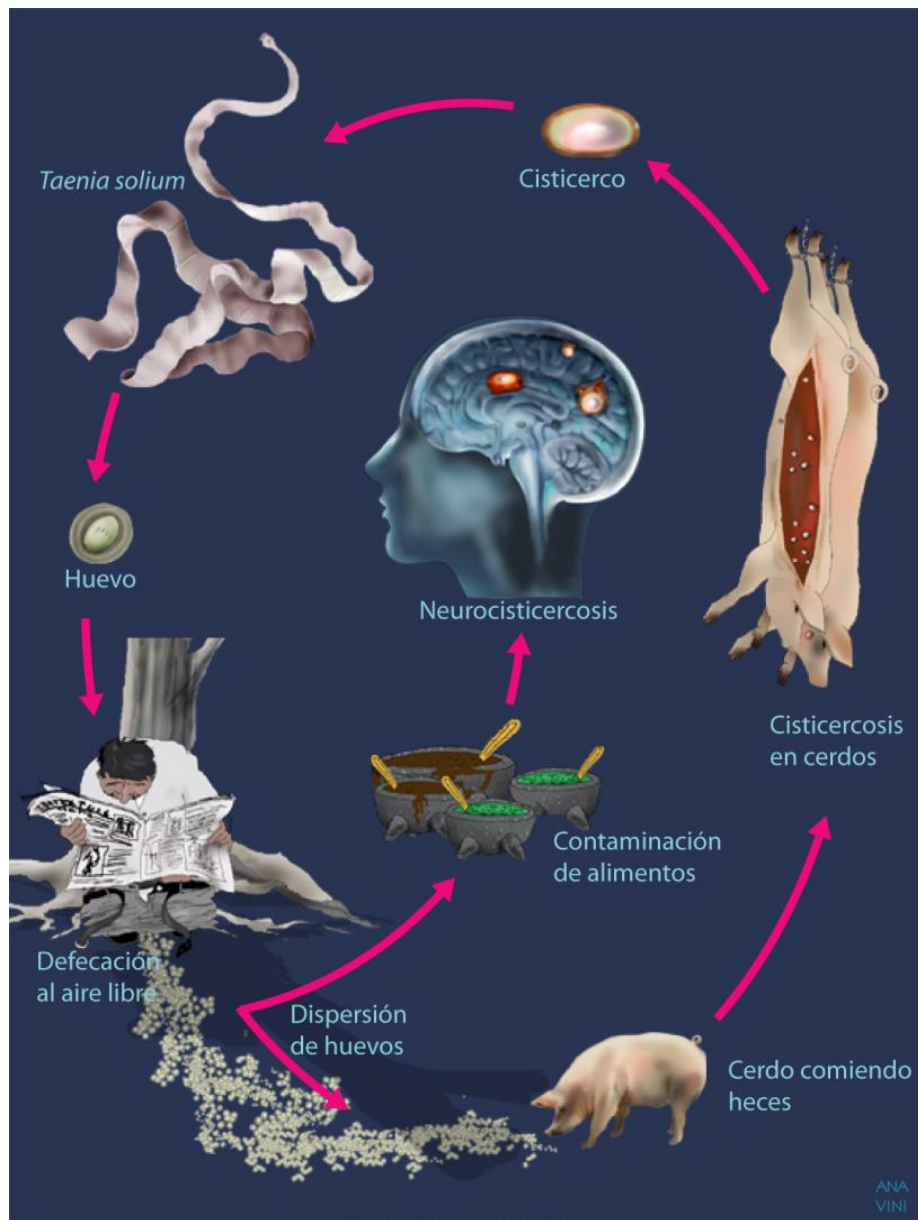


Fig.2. Ciclo de vida de la *T. solium*. En su estado adulto, el platelminto habita en el intestino humano. La tenia, o solitaria, produce miles de huevos, que se expulsan con la excreta. El cerdo se infecta al

ingerir heces donde hay huevos o segmentos del parásito adulto. Cada huevo puede convertirse en un cisticerco, forma larvaria del parásito. El ciclo culmina cuando el hombre consume carne de cerdo infectada o no bien cocida con cisticercos, lo que permite su supervivencia. (Ilustración por: Ana Viniegra).

2.2. *Taenia crassiceps*

T. crassiceps es el modelo animal más utilizado en el estudio de la cisticercosis. A diferencia de la *T. solium*, es posible mantener en el laboratorio a los metacestodos o cisticercos de *T. crassiceps*, gracias a su capacidad de reproducción por gemación, lo cual permite el pase de cisticercos desde el peritoneo de un ratón infectado al peritoneo de un ratón no infectado (Toledo *et al.*, 1997; Willms y Zurabian, 2010). Gracias a este modelo se han estudiado diversos procesos biológicos del parásito, tales como la relación neuro-inmuno endócrina que establece con su huésped (Escobedo *et al.*, 2005; Fragoso *et al.*, 2008; Castellanos-Sánchez *et al.*, 2009), la susceptibilidad genética del huésped (Fragoso *et al.*, 1996; Hill & Zarlenga, 1996; Bobes *et al.*, 2017), los mecanismos de respuesta y protección inmunológica del huésped (Gevorkian *et al.*, 1996; Toledo *et al.*, 1999; Vázquez-Talavera *et al.*, 2001; Willms & Zurabian, 2010), los mecanismos de evasión inmune e internalización de proteínas (Laclette *et al.*, 1992; Ambrosio *et al.*, 1994; Vázquez-Talavera *et al.*, 2001; Navarrete-Perea *et al.*, 2014; Bobes *et al.*, 2017; Flores-Bautista *et al.*, 2018). Se ha logrado aislar y mantener en condiciones de laboratorio a cuatro cepas de *T. crassiceps*: WFU, ORF, HYG y KBS. La cepa ORF, cuya característica principal es la ausencia de escólex, es la más utilizada debido a su alta tasa de reproducción, a pesar de no alcanzar el estadio adulto (Dorais & Esch, 1969; Smith, Esch & Kuhn, 1972; Everhart *et al.*, 2004).

En la naturaleza, los huéspedes definitivos de la *T. crassiceps* son los zorros, lobos y perros, mientras que roedores pequeños, incluyendo ratones, fungen como huéspedes intermediarios (Willms & Zurabian, 2010). El ciclo de vida de la *T. crassiceps* y su expansión intraperitoneal se ilustran en la figura 3.



Figura 3. Ciclo de vida y mantenimiento de *T. crassiceps* en laboratorio. En su estado adulto, el platelminto habita en el intestino del zorro u otros cánidos. Los huevos son liberados al ambiente a través de las excretas. Ratones u otros roedores son infectados al ingerir heces del huésped definitivo, donde hay huevos o segmentos del parásito adulto. El círculo se cierra cuando el zorro consume roedores infectados con cisticercos, lo que permite su evolución al estadio adulto. En el laboratorio se utilizan cisticercos de *T. crassiceps* que son inyectados en el peritoneo de un ratón, posteriormente, se toman algunos cisticercos para realizar el pase a otro ratón sano. Ilustración tomada de la tesis doctoral de Jeanette Flores Bautista, 2019.

2.3. Transfección génica en ténidos

La transfección o transgénesis, consiste en la introducción y expresión de material genético ajeno en un organismo (Davis *et al.*, 1999). Esta transfección puede ser transitoria y utilizar la maquinaria transcripcional del organismo receptor de manera episomal, o ser estable e integrarse a los cromosomas. La transgénesis es una herramienta esencial para evaluar la función de genes en cualquier organismo, y sería de gran utilidad en parásitos, ya que también permitiría validar blancos moleculares para el desarrollo de nuevas drogas y vacunas (Kalinna & Brindley, 2007; Shao *et al.*, 2012). En el caso de parásitos protozoos se han reportado desde hace ya varias décadas, grandes avances en transfecciones funcionales o estables (Darocho, Otsu, Teixeira, & Donelson, 2004). En nematodos se ha utilizado como modelo a *C. elegans*, reportando avances tanto en transfecciones estables como en

silenciamiento de varios genes de interés (Ward, 2015; Zhao *et al.*, 2010) y en platelmintos los avances en transfección transitoria y transfección estable se han reportado principalmente en *Schistosoma* (Brindley & Pearce, 2007; Kalinna & Brindley, 2007). Sin embargo, en el caso de los céstodos, solo se han reportado transfecciones transitorias para lograr el silenciamiento por RNA de interferencia (iRNA) para *Echinococcus multilocularis*, *Hymenolepis microstoma* y *Moniezia expansa* (Mizukami *et al.*, 2010; Pierson *et al.*, 2010; Spiliotis *et al.*, 2008), que se suman al reporte de nuestro grupo de 2015 (Moguel *et al.*, 2015), por lo que se trata de un grupo de organismos parásitos que claramente requiere de mayor experimentación.

El primer reporte de clonación y caracterización del primer gen de un ténido ocurrió en 1990 (Campos *et al.*, 1990); este avance temprano en la biología molecular de los céstodos llevó a la descripción de los primeros cuatro genomas de céstodos: *T. solium*, *E. multilocularis*, *E. granulosus* e *H. microstoma* (Tsai *et al.*, 2013). En ambos avances nuestro grupo de investigación jugó un papel fundamental. Cabe mencionar que recientemente hemos publicado el genoma de dos cepas de *T. crassiceps* (Bobes *et al.*, 2022); el armado que se logró construir supera en resolución los armados de otros genomas de céstodos actualmente disponibles. Disponer de los genomas completos para estos organismos parásitos, inició una nueva etapa que nos ha permitido entender al parásito como una “máquina biológica”, ya que se han identificado múltiples genes, algunos de ellos codifican proteínas hasta ahora desconocidas. Sin embargo, para que esta información sea realmente útil es necesario sentar las bases y continuar con el desarrollo de la genómica funcional en estos parásitos. Esto permitirá no solo responder preguntas básicas sobre la biología de estos organismos, por ejemplo, conocer la función de genes asociados a la respuesta inmune del huésped, dilucidar cascadas de señalización, evaluar procesos de regeneración y reproducción asexual al identificar genes involucrados, etc., sino también abrir una oportunidad de manipulación genética con usos prácticos. En años recientes la genómica funcional ha tenido gran empuje gracias a los reportes exitosos de silenciamiento génico en especies como *S. mansoni* (Kundrát, 2009) y *E. multilocularis* (Mizukami *et al.*, 2010), en los cuales se ha utilizado iRNA para reducir la expresión de diversos genes y en el 2015 nuestro grupo realizó el primer reporte de transgénesis transitoria en *T. crassiceps* (Moguel *et al.*, 2015).

2.4. Silenciamiento génico

El silenciamiento génico consiste en la inhibición parcial o knock-down de la expresión de un gen, hasta en un 90% (Elbashir *et al.*, 2001; Fire *et al.*, 1998; Hood, 2004; Mocellin & Provenzano, 2004). Para lograr el silenciamiento de genes es necesario interferir la traducción de RNA mensajero, la cual se logra mediante la introducción de un RNA de doble cadena (dsRNA) llamado RNA de interferencia (iRNA), cuya secuencia es complementaria a la secuencia del RNA mensajero (mRNA) de interés (Elbashir *et al.*, 2001; Hood, 2004).

La vía de iRNA es un mecanismo presente en la mayoría de los eucariontes (Shabalina & Koonin, 2008) y constituye el mecanismo de defensa del genoma contra secuencias repetidas como transposones y contra virus de RNA (Paddison *et al.*, 2002).

La interferencia por RNA utiliza microRNAs (miRNA) o RNA pequeños de interferencia (siRNA), que son secuencias cortas de RNA derivados de dsRNA endógenos o exógenos, respectivamente (Ataoğlu *et al.*, 2002; Evans, 2007; Großhans & Filipowicz, 2008; Paddison *et al.*, 2002; Shi, 2003). Plantas como *Arabidopsis thaliana* y algunos invertebrados como *C. elegans* poseen siRNAs endógenos provenientes del mismo locus que su blanco, por lo que son complementarios perfectos a ellos y utilizan la vía de los siRNA (Conte & Mello, 2003).

El paso más importante para la interferencia de la traducción es la formación de siRNA, a partir del procesamiento de dsRNA, los cuales al final forman parte del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) (Shi, 2003).

Dos de las proteínas más importantes en las vías de RNAi son Dicer (Dcr) y Argonauta (Ago). Dcr es una helicasa con actividad de endonucleasa de la familia RNasa III (clase 3), que se caracteriza por poseer un dominio de RNasa III, un C-terminal de unión a dsRBP y un dominio PAZ N-terminal (llamado así por estar compuesto por las proteínas PIWI, Argonauta y Zwiille). La familia de proteínas Ago se caracteriza en general por poseer seis dominios: N-terminal, linker-1, PAZ, linker-2, dominio intermedio (MID) y C-terminal (Wilson & Doudna, 2013).

El procesamiento de los dsRNA luego de su ingreso al citoplasma inicia con su reconocimiento y corte por Dcr, que corta la doble hebra para producir cadenas de

21-25 pares de bases con el extremo 3' conformado por dos nucleótidos repetidos que sobresalen estéricamente y un grupo fosfato en 5' (Wilson & Doudna, 2013). Dcr junto con la proteína de unión a dsRNA (dsRBP) llevan el dsRNA a la proteína de corte Argonauta (Ago) que, junto con Dcr y dsRBP, conforma el llamado complejo de carga de RISC (RLC) (Shi, 2003; Unniyampurath, Pilankatta, & Krishnan, 2016; Wilson & Doudna, 2013). Una vez en el RLC, una hebra del dsRNA designada como "hebra*" es liberada, para quedar una hebra guía, complementaria al mRNA blanco, unida por el extremo 3' al dominio PAZ y por el grupo fosfato 5' al dominio MID de Ago (Wilson & Doudna, 2013).

Los siRNA derivados de cadenas de complementariedad perfecta, son procesados por Ago2, que representa la única variante de Ago capaz de realizar un corte al mRNA entre el nucleótido 10 y 11 (Haley & Zamore, 2004; Humphreys *et al.*, 2005; Wilson & Doudna, 2013; Zhu *et al.*, 2017).

Por otro lado, los miRNAs provienen principalmente de intrones que son transcritos a fragmentos largos de dsRNA. Estos fragmentos, llamados pri-miRNA, son procesados por el llamado complejo microprocesador, formado principalmente por las proteínas Drosha y Pasha (DGCR8). Este complejo corta los pri-miRNAs a fragmentos más pequeños, denominados pre-miRNAs, que salen del núcleo para ser procesados por Dcr. Este es el punto en el que la vía de los miRNA y la vía de los siRNA coinciden para seguir los mismos pasos. Los miRNA, al tener complementariedad imperfecta, son procesados por Ago1 principalmente, causando no un corte, si no un arresto de la traducción (Humphreys *et al.*, 2005; Wilson & Doudna, 2013). La figura 4 muestra una visión general de las vías de silenciamiento génico.

2.5. Silenciamiento génico en ténidos

En céstodos se han reportado diversas estrategias de transfección de ácidos nucleicos, entre los métodos más utilizados se encuentra el soaking o impregnación con RNAi, el cual se ha utilizado en diversas especies y células derivadas céstodos, como células aisladas (Spiliotis *et al.*, 2008) y protoescólices de *E. multilocularis* (Mizukami *et al.*, 2010); así como en el gusano de *Hymenolepis microstoma* (Pouchkina-stantcheva, Olson, Cunningham, & Hrc, 2013) y *Moniezia expansa* (Pierson *et al.*, 2010). Otras estrategias que utilizan vectores lentivirales que

contienen un promotor de citomegalovirus (CMV) y un gen codificante de un RNA pequeño en horquilla (shRNA), se han explorado en *S. mansoni*, logrando un silenciamiento más prolongado y eficaz (Hagen, Scheerlinck, & Gasser, 2015). En trabajos más recientes la función de la tetraspanina 1 de *E. granulosus* (EgTSP1) fue investigada mediante el silenciamiento con dsRNA de cadena larga, resultando en inhibición de la evaginación de protoescoléxes y defectos en el desarrollo del tegumento (Mousavi et al., 2020).

2.6. Enolasa

La superfamilia de las enolasas comprende 16 enzimas que catalizan 11 reacciones diferentes; sin embargo, todas son capaces de catalizar la conversión de 2-fosfo-D-glicerato (PGA) a fosfoenolpiruvato (PEP) (Babbitt et al., 1996). La enolasa (2-fosfo-D-glicerato hidrolasa) es una metaloenzima dependiente de magnesio que cataliza la deshidratación del PGA, paso clave de la glucólisis (Pancholi, 2001; Wold, 1971). El uso de fármacos como la mefloquina ha demostrado la importancia de la enolasa en la esquistosómula de *S. mansoni*, en la que provoca su inhibición, interfiriendo con la glucólisis y llevando a la muerte de la esquistosómula (Maneck, Keiser & Müller, 2012). Cuando el consumo de glucosa es bloqueado en el cisticerco de *T. crassiceps*, el ciclo de Krebs es activado por un aumento en la producción de alfa-cetoglutarato, oxaloacetato, entre otras moléculas que participan en dicha vía metabólica (Fraga et al., 2012).

Nuestro grupo recientemente reportó la existencia de 4 genes codificantes para enolasa en *T. solium* y *T. crassiceps*: EnoA, EnoB, EnoC and Eno4 (Ayón-Núñez et al., 2018). La enolasa parece trabajar no sólo como parte de la vía de la glucólisis, sino también, como una enzima capaz de modular la actividad del sistema fibrinolítico a través de la activación del plasminógeno (Plg), como se ha demostrado previamente en *Fasciola hepatica* (Bernal et al., 2004) y *S. mansoni* (Figueiredo, Da'dara, Oliveira, & Skelly, 2015).

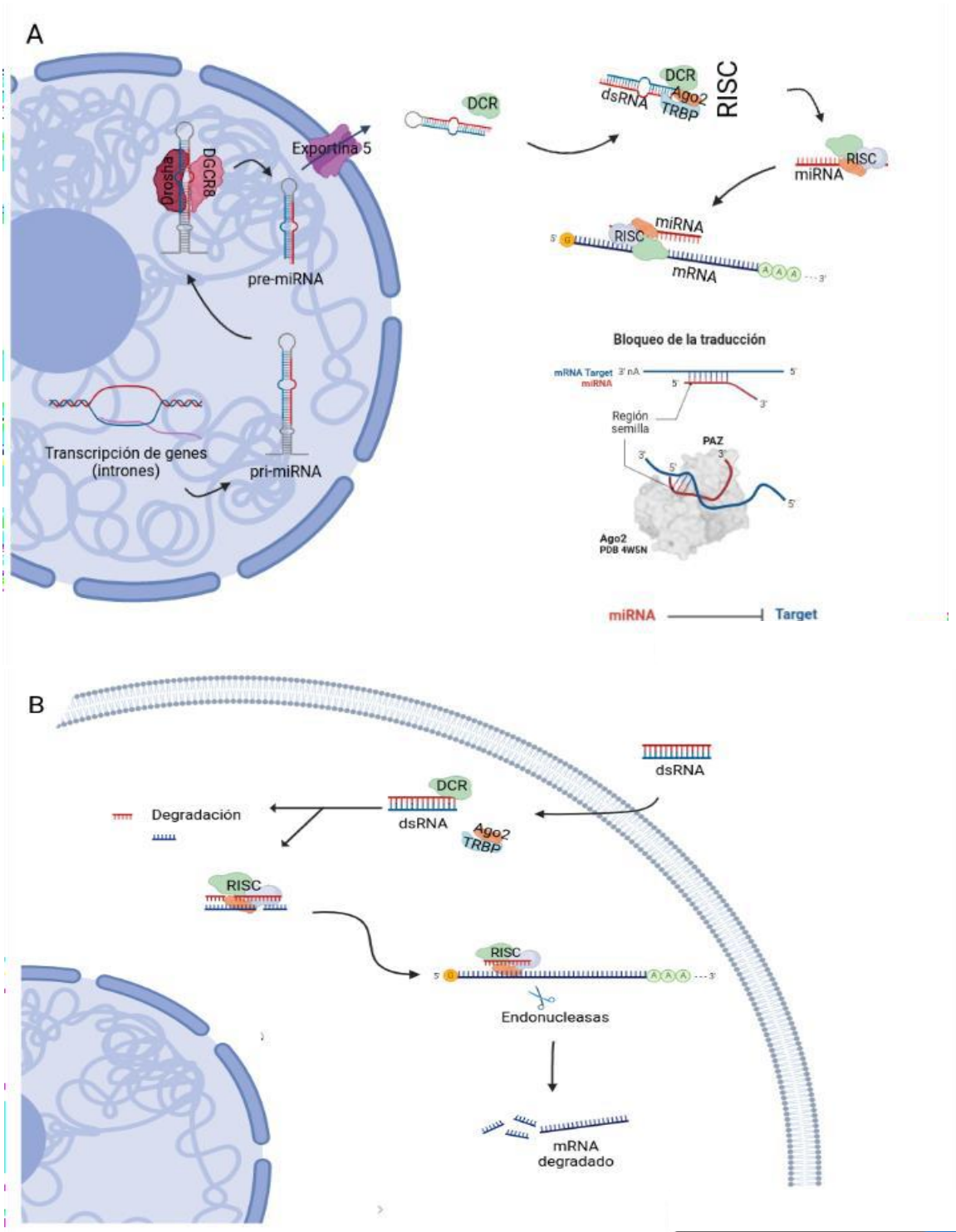


Figura 4. Esquemización de las vías de los miRNA y siRNA. Reconocimiento y corte de dsRNA por Dcr. Dcr corta la doble hebra para producir cadenas de 21-25 pares de bases. Dcr junto con la proteína de unión a dsRNA (dsRBP) llevan el dsRNA a la proteína Ago para formar el complejo de carga de RISC (RLC). Una vez en el RLC la hebra* es liberada, quedando la hebra guía, complementaria al mRNA blanco. A) Mecanismo de acción de los miRNAs. Los pri-miRNAs, son procesados por el complejo microprocesador, formado por las proteínas Drosha y Pasha (DGCR8). Este complejo corta los pre-miRNAs formando pre-miRNAs, que serán procesados por Dcr. Los miRNA son procesados por Ago1 un arresto de la traducción; B) Mecanismo de acción de los siRNAs. Los siRNA Ago2, que realiza un corte en el mRNA entre el nucleótido 10 y 11.

La Eno4 de *T. solium* y *T. crassiceps* carece del dominio de unión a Plg (Ayón-Núñez et al., 2018). La activación de Plg puede ser una de las posibles vías utilizadas por diversos patógenos (Bernal et al., 2004; Ghosh & Jacobs-Lorena, 2011; González-Miguel, Morchón, Carretón, Montoya-Alonso, & Simón, 2013), incluyendo *T. solium*, para establecerse en los tejidos del huésped (Ayón-Núñez et al., 2018). La enolasa es una enzima importante para nuestro grupo de investigación ya que es una de las proteínas que se están estudiando tanto en *T. crassiceps* como en *T. solium*, el silenciamiento de TcEnoA sería uno de los métodos para poder entender las funciones de sus diferentes variantes y como primer acercamiento, para el desarrollo de una metodología de uso general para el silenciamiento génico en *T. crassiceps*, algo que no había sido logrado anteriormente.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Desarrollar un método reproducible de silenciamiento génico de cisticercos de *Taenia crassiceps* para el gen de Enolasa A (TcEnoA).

3.2. Objetivos específicos

- Identificar en el genoma de *T. solium* y de *T. crassiceps* los genes involucrados en el silenciamiento de genes.
- Estudiar la filogenia de genes que participan en el silenciamiento de genes identificados en el genoma de *T. crassiceps*.
- Establecer una técnica de silenciamiento génico contra el gen Enolasa A del cisticerco de *T. crassiceps*.
- Demostrar el silenciamiento del gen EnoA de *T. crassiceps*.
- Determinar las repercusiones del silenciamiento de TcEnoA en la vía metabólica de la glucólisis y ciclo de Krebs a nivel de expresión génica.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Mantenimiento de los cisticercos y obtención de muestras

Los experimentos se llevaron a cabo usando cisticercos de la cepa ORF de *T. crassiceps*. Los cisticercos se mantuvieron en la Unidad de Modelos Biológicos del IBO, mediante pases intraperitoneales de ratones infectados a ratones hembra no infectadas de la cepa BALB/cAN de 6 semanas (Sciutto *et.al.*, 2011). Después de 6 semanas de infección, se procedió al sacrificio humanitario y los cisticercos se colectaron de la cavidad peritoneal, posteriormente fueron lavados varias veces con solución estéril de fosfatos (PBS) a pH 7.4, antes de mantenerlos en cultivo *in vitro*. Los procedimientos llevados a cabo en ratones se realizaron de acuerdo con los lineamientos institucionales de cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL), este proyecto cuenta con la autorización No. ID199. Para el cultivo *in vitro*, los cisticercos se mantuvieron en medio RPMI (Gibco) suplementado con 10% de medio fetal bovino (FBS, Gibco) y 1µg/ml de penicilina/estreptomicina a 37°C, a 5% CO₂ hasta su uso (Vázquez-Talavera *et al.*, 2001).

4.2. Análisis genómico y filogenético de Ago2 y Dcr2

Se llevó a cabo un análisis genómico para identificar los elementos más importantes de la vía de los siRNA. Utilizando la base de datos del genoma de *T. crassiceps* de nuestro grupo se realizaron búsquedas de las secuencias de Ago1, 2 y 3 y Dcr1 y 2. Dentro de las familias Argonauta y Dicer, Ago2 y Dcr2 son descritos como los genes más activos en el silenciamiento mediado por siRNA (Lee *et al.*, 2004), por lo tanto, aunque se realizó el análisis para todas las secuencias encontradas, en este trabajo mostramos el análisis filogenético de *T. crassiceps* únicamente para estos 2 genes. Otras secuencias de Ago2 y Dcr2 de diversos organismos fueron obtenidas de las bases de datos de GenBank y WormBase Parasite (<https://parasite.wormbase.org/index.html>). Los números de acceso para todas las secuencias utilizadas en el análisis filogenético se muestran en la tabla 1; las secuencias de *T. crassiceps* utilizadas para el análisis filogenético de Ago2 y Dcr2 se encuentran en el Anexo 1 y 2, respectivamente. Todas las secuencias de Ago2 y Dcr2 fueron alineadas utilizando el software SeaView v.4 (Gouy *et al.*, 2010) y ajustadas con el programa Mesquite (Maddison & Maddison, 2011).

El alineamiento de Ago2 incluyó la secuencia de *T. crassiceps*, además de 23 secuencias más de Ago2 de otras especies. La secuencia de Dcr2 fue alineada con

otras 14 secuencias de Dcr2 de otras especies de helmintos, además, de otros organismos invertebrados y vertebrados, utilizados como grupos externos (ver tabla 1). Se utilizaron los métodos de análisis de máxima verosimilitud (MV) e inferencia Bayesiana (IB) para realizar el análisis filogenético. El análisis de MV se llevó a cabo con RAxML versión 7.0.4 (Silvestro & Michalak, 2011), y la IB con MrBayes versión 3.2.7 (Ronquist et al., 2012) utilizando la interfase en línea Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research (CIPRES) Science Gateway v3.3 (Miller et al., 2010). El mejor modelo fue estimado con el criterio de información Akaike (AIC) mediante jModel Test versión 0.1.1 program (Posada, 2008). Los análisis de MV fueron inferidos con modelos previamente estimados para cada marcador molecular.

Para soportar cada nodo se corrieron 10,000 réplicas en el bootstrap. Los análisis de IB incluyeron búsquedas de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) de dos corridas simultáneas para 10 millones de generaciones muestreando cada 1000 generaciones, usando un parámetro de 0.2 y un “burn-in” de 25%. Los árboles se dibujaron usando el programa FigTree v.1.3.1 (Rambaut, 2012).

4.3. Detección de la maquinaria molecular de procesamiento de siRNA

Se diseñaron oligonucleótidos para Ago1, 2 y 3 y Dcr1 y 2 a partir de las secuencias obtenidas de nuestra base de datos del genoma de *T. crassiceps* utilizando la herramienta para diseño de oligonucleótidos de PrimerQest (Integrated DNA Technologies, IDT). Todas las secuencias de los oligonucleótidos diseñados y sintetizados se presentan en el Anexo 3.

El RNA de los cisticercos se extrajo con el método de fenol-cloroformo utilizando Trizol (Invitrogen), y se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop 2000 spectrophotometer, Thermo-Scientific). La detección de los transcritos de Ago1, 2, 3, Dcr1 y 2 fue llevada a cabo con RT-PCR de punto final. Se utilizaron 500 ng de RNA total como templado para la síntesis de cDNA con el kit SuperScript III First- Strand Synthesis SuperMix (Life Technologies) y HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen), con el termociclador T100 Thermal cycler, BioRad, para la reacción de PCR. La RT-PCR tiempo final se corrió bajo las siguientes condiciones: 50°C por 15 minutos, 95°C por 5 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 65°C por 1 minuto y 72°C por un minuto, con una extensión final de 72°C por 5 minutos. Los productos de la reacción corridos en geles de agarosa al 1%, fueron visualizados

Tabla 1. Números de acceso de las secuencias utilizadas en el análisis filogenético.

Especie	Argonauta 2	Dicer 2
<i>T. crassiceps</i> *	XXXTcr_000782900.t1	XXXTcr_000557900.t1
<i>T. asiatica</i> *	TASK_0001000801:TASK_0001000801-mRNA-1	
<i>T. solium</i> *	TsM_000876200:TsM_000876200	TsM_000756400
		TsM_000048100
<i>E. granulosus</i> *	EgrG_000911700:EgrG_000911700	EgrG_000181800
<i>E. multilocularis</i> *		EmuJ_000180900.1
<i>H. taeniaeformis</i> *	TTAC_0000196901:TTAC_0000196901-mRNA-1	
<i>H. diminuta</i> *	HDID_0001112401	HDID_0000877001
<i>H. microstoma</i> *	HmN_000950000:HmN_000950000.1	
<i>H. nana</i> *	HNAJ_0001087201:HNAJ_0001087201-mRNA-1	
<i>S. haematobium</i> *	MS3_08447:MS3_08447.1	MS3_09247.1
<i>S. japonicum</i> *	Sjp_0045200	Sjp_0043700
<i>S. mansoni</i> *	Smp_179320:Smp_179320.1	Smp_033600.1
<i>F. hepatica</i> *	D915_07567:D915_07567	
<i>M. corti</i> *	MCOS_0000946601-mRNA-1	MCOS_0000877401
<i>S. solidus</i> *	SSLN_0002026201:SSLN_0002026201-mRNA-1	SSLN_0000784801
		SSLN_0000784601
		SSLN_0002022701
<i>O. viverrini</i> *	T265_07377:T265_07377	T265_11263
<i>C. sinensis</i> *	csin100735:csin100735	csin105018
<i>M. lignano</i> *	maker-uti_cns_0016590-snap-gene-0.1-mRNA-1	
<i>D. melanogaster</i> **	NM_001274953.1	NM_001299611.1
<i>B. mori</i> **	NM_001043530.2	
<i>C. elegans</i> **	NM_061436.3	

<i>X. tropicalis</i> **	NM_001004877.1	
<i>M. musculus</i> **	NM_153178.4	
<i>H. sapiens</i> **	NM_012154.4	
<i>D. latum</i> *	DILT_0000068601:DILT_0000068601-mRNA-1	DILT_0000572601
		DILT_0001206301
<i>T. castaneum</i> **		NM_001114368.1

*Secuencias obtenidas de WormBase Parasite.

**Secuencias obtenidas de GeneBank.

después de la electroforesis, en un transiluminador con luz UV. El gen de actina fue utilizado como referencia.

4.4. Diseño de siRNA para el silenciamiento de Eno A de *T. crassiceps*.

Para el diseño de los siRNA se utilizaron secuencias de nucleótidos de *T. solium* EnoA. Estas secuencias se obtuvieron de GeneBank (Ayón-Nuñez *et al.*, 2018); las secuencias ortólogas se obtuvieron de nuestra base de datos genómica de *T. crassiceps*. Las similitudes entre la secuencias de ambas especies de ténidos fue mayor al 98%. Diseñamos dos siRNA de doble cadena (ds-siRNA), que nombramos EnoA-1 y EnoA- 2, para el silenciamiento de EnoA de *T. crassiceps* mediante el software BLOCK-iT™ RNAi Designer (Thermo-Fisher). Se descartaron otros siRNA cuando presentaban baja probabilidad de unión o una estructura secundaria con impedimentos de accesibilidad a la secuencia blanco. Para confirmar la probabilidad de unión y la accesibilidad del siRNA al mRNA, se condujo un análisis mediante el software RNAfold web server. Las secuencias de los siRNA seleccionados se encuentran en la Tabla 2, incluyendo sus regiones en la secuencia del mRNA de EnoA.

Tabla 2. Secuencias de siRNA utilizadas para el silenciamiento de *T. crassiceps*.

siRNA Duplex	Secuencia	No. de Acceso	Posición de la secuencia
siRNA EnoA-1	5'AGAACGUCAAUGAAGUCAUUGCUC	TsM_000595600	200-224
	3'GGAGCAAUGACUUCACGUUCUUG		
siRNA EnoA-2	5'CCACUGUUGAGGUUGAUCUAACCAC		53-77
	3'GUGGUUAGAUAACCUCAACAGUGGGA	TsM_000595600	

4.5. Transfección de cisticercos de *T. crassiceps*: Electroporación

Se seleccionaron grupos de 12 cisticercos de *T. crassiceps* de aproximadamente 5mm de diámetro; se colectaron y mantuvieron *in vitro* en cajas de 24 pozos como se describió arriba. Para los experimentos de electroporación, seguimos el protocolo descrito para *Moniezia expansa* (Pierson et al., 2010). Para determinar cuál de los siRNA diseñados era más eficiente para el silenciamiento de la TcEnoA, los cisticercos seleccionados fueron pre-sumergidos con los siRNA EnoA-1 o EnoA-2 a concentraciones de 15 a 45 μ moles en 2 ml de buffer de lavado (medio RPMI/HEPES 10 mM y 1 μ g/ml de penicilina/estreptomicina) preparado como se ha reportado previamente (Correnti et al., 2007). Los cisticercos se mantuvieron por 2hrs a 37°C y 5% de CO₂. Los cisticercos se transfirieron a cubetas de electroporación con ranura de 2 mm (Sigma-Aldrich) y se transfectaron por electroporación a temperatura ambiente en el BTX 600 (Electro Cell Manipulator), utilizando 125 volts por 20 milisegundos. Posteriormente, los cisticercos se dejaron en recuperación por 1h. Los parásitos fueron lavados con PBS y cultivados en medio RPMI/10%FBS y 1 mg/ml de penicilina/estreptomicina a 37°C y 4% de CO₂. Los cisticercos se colectaron a las 0, 3, 12 y 24 horas después de la electroporación, se lavaron con PBS y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

4.6. Evaluación del silenciamiento de TcEnoA por RT-PCR

Después de ser electroporados, se realizó la extracción de RNA total de los cisticercos como se describió anteriormente. La eficiencia de los dos siRNA diseñados (Eno-1 o Eno-2) fue evaluada por RT-PCR punto final utilizando las condiciones ya mencionadas a 32 ciclos. Se realizó una semi-cuantificación por densitometría de las bandas obtenidas en geles de agarosa mediante el analizador Image J. Los resultados óptimos fueron obtenidos al utilizar 30 μ mol de siRNA de EnoA-2, por lo que los experimentos subsecuentes y los ensayos con RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR) se llevaron a cabo utilizando solamente el siRNA EnoA-2. Para evaluar la eficiencia del silenciamiento, se analizó en mRNA de parásitos tratados y no tratados mediante qRT-PCR. Se utilizaron 100 ng de RNA total como templado, para el kit qScript One-Step SYBR Green RT-qPCR (QuantaBio), la reacción se analizó con el sistema AB7500 Fast RT-PCR System (Life Technologies). Las condiciones para la reacción de qRT-PCR fueron: 50° C por 15 minutos, 95° C por 5 minutos y 40 ciclos a 95° C por 15 segundos, 65° C por 1

minuto y 72°C por un minuto, con una extensión final de 72°C por 5 minutos. El cambio de expresión relativo fue evaluado por el método delta-delta Ct ($\Delta\Delta$ -CT).

La expresión génica fue evaluada en 2 experimentos diferentes usando duplicados por cada reacción de PCR, el gen de actina 1 fue utilizado como gen de referencia. Para algunos experimentos los cisticercos fueron electroporados únicamente con medio de transfección.

4.7. Análisis de la expresión génica de otras enzimas metabólicas después del silenciamiento de TcEnoA

Para evaluar la expresión de los genes de otras enzimas metabólicas, realizamos una búsqueda detallada en nuestra base de datos de *T. crassiceps* para encontrar las secuencias génicas que corresponden a enzimas de la vía glicolítica y el ciclo de Krebs. Las enzimas glicolíticas seleccionadas fueron: Enolasa A (TcEnoA), Hexocinasa (HK), glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI), fosfofructocinasa (PFK), aldolasa (Aldo), triosafosfato isomerasa (TPI), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), fosfoglicerato cinasa (PGK), fosfoglicerato mutasa (PGM), piruvatocinasa (PYRK) y piruvato deshidrogenasa (PDH). Las enzimas del ciclo de Krebs seleccionadas fueron: Citrato sintasa (CS), alfa-cetoglutarato deshidrogenasa (AKGDH), fumarasa (FM) y succinato deshidrogenasa (SDH). Para determinar si todos estos genes se expresan en los cisticercos de *T. crassiceps* llevamos a cabo RT-PCR tiempo final utilizando las condiciones descritas previamente. Diseñamos oligonucleótidos con la herramienta de diseño de PrimerQest (Integrated DNA Technologies, IDT); todas las secuencias de oligonucleótidos se encuentran en el Anexo 3. Para identificar diferencias entre cisticercos silenciados y no silenciados, realizamos tests de qRT-PCR bajo las condiciones descritas anteriormente después de 3 horas de silenciamiento con EnoA-2 siRNA.

5. Resultados

Para el desarrollo de este proyecto se decidió evaluar el silenciamiento con el gen de la TcEnoA por varias razones: 1) Se trata del miembro principal de una familia génica que ha sido estudiada extensamente en nuestro grupo de trabajo; 2) La TcEnoA se expresa constitutivamente en la etapa larvaria (cisticerco) de *T. crassiceps*; 3) evidencias provenientes de estudios previos en nuestro grupo sugieren que TcEnoA juega un papel en el establecimiento de los cisticercos en el tejido del huésped intermediario.

Para realizar los ensayos de silenciamiento utilizamos la electroporación, una técnica reportada en estudios previos en céstodos (Pouchkina-Stantcheva et al., 2013).

Además, se decidió explorar si los cisticercos de *T. crassiceps* expresaban la maquinaria necesaria para llevar a cabo el silenciamiento. Esto se realizó con base en antecedentes de parásitos protozoarios que carecen de dicha maquinaria.

5.1. Optimización del método para transfección con siRNA

El protocolo de electroporación elegido está basado en el descrito para *Moniezia expansa* en Pierson et al., 2010. Para ello utilizamos el electroporador BTX 600 (Electro Cell Manipulator), con un voltaje de 125 volts con pulsos de 20 milisegundos, encontrando que todos los cisticercos así electroporados sobrevivieron y unos pocos resultaron dañados.

5.2. Expresión de la maquinaria para el procesamiento de los siRNA en *T. crassiceps*

Se decidió identificar en el genoma de *T. crassiceps* y estudiar la participación de Argonauta (Ago) y Dicer (Dcr) en el silenciamiento génico, principales efectores de dicho proceso. Para determinar si dichas moléculas se expresan en cisticercos de *T. crassiceps*, se diseñaron oligonucleótidos a partir de las secuencias de Ago1, 2 y 3 y Dcr1 y 2 (Tabla 1) para llevar a cabo ensayos de RT-PCR en RNA total aislado de cisticercos. Estos experimentos demostraron la expresión de los genes de TcAgo y TcDcr (Figura 5). Los fragmentos obtenidos fueron purificados y secuenciados para confirmar su identidad (Anexo 1). La expresión de TcAgo y TcDcr sugiere que estas enzimas están activas constitutivamente para el procesamiento de los RNAs de doble cadena.

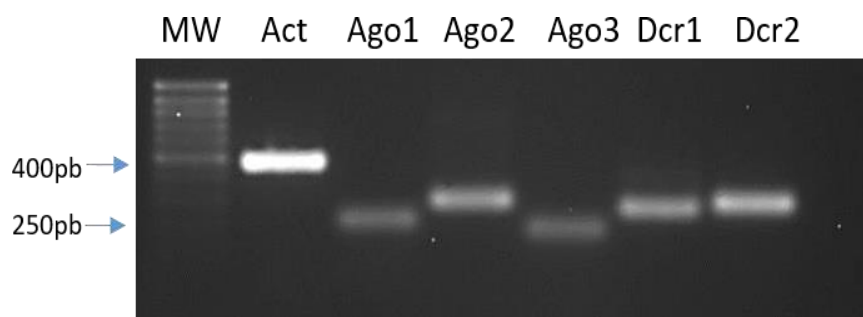


Figura 5. Expresión basal de Argonautas y Dicer en cisticercos de *T. crassiceps*. Act (actina); Ago1 (argonauta 1); Ago2 (argonauta 2); Ago3 (argonauta 3); Dcr1 (dicer 1); Dcr2 (dicer 2).

5.3. Análisis filogenético de los genes Ago2 y Dcr2

TcAgo2 y TcDcr2 están íntimamente relacionados a ortólogos de otras especies de céstodos. Para identificar su presencia realizamos una búsqueda detallada, dentro de la base de datos de *T. crassiceps*, de los genes de Ago y Dcr. Se identificaron 3 genes Ago: TcAgo1 (2961 bp; 987 aa), TcAgo2 (1659 bp; 553 aa), TcAgo3 (2880 bp; 960 aa)] y dos genes Dcr: TcDcr1 (5658 bp; 1886 aa), TcDcr2 (2469 bp; 823 aa). De estos, TcAgo2 y TcDcr2 son los involucrados del silenciamiento mediado por siRNA (Lee et al., 2004). Utilizamos las secuencias de TcAgo2 y TcDcr2 para los experimentos subsecuentes (Anexos 1 y 2).

El conjunto de datos de TcAgo2 incluye 2,547 caracteres. Para su análisis filogenético el mejor modelo evolutivo obtenido fue TVM + I + G. El alineamiento incluyó 18 secuencias provenientes de diversas taxas del phylum Platelminos; tres especies de ecdysozoa, además de tres taxas de vertebrados utilizados como grupo externo. El árbol filogenético, inferido con los métodos ML y BI y sustentado por un fuerte apoyo de bootstrap (93%) y una alta probabilidad posterior Bayesiana (1.0), muestra que las especies del phylum Platelminos, incluyendo *T. crassiceps*, forman un grupo monofilético.

Los árboles filogenéticos mostraron que *T. crassiceps* es una especie hermana del clado formado por *T. asiatica* y *T. solium* (Fig. 6). Los datos para el análisis filogenético de Dcr2 incluyeron 2,962 caracteres con 15 terminales y el modelo mejor seleccionado para ambos conjuntos de datos fue el modelo de transversión (TVM), + distribución Gamma (G) + proporción de sitios invariables (I) (TVM + I + G). El alineamiento incluyó 13 secuencias representando diversas taxas del género

Platelmintos, además de dos especies de ecdysozoa utilizados como grupo externo. El árbol filogenético inferido con los métodos ML y BI también soportaron la monofilia del phylum Platelmintos, con apoyo de bootstrap del 100% y alta probabilidad posterior Bayesiana (0.9). Puesto que se carece de una secuencia publicada para Dcr2 para *T. asiática* en nuestra filogenia *T. crassiceps* aparece como un taxón hermano de *T. solium* (Fig. 6). Los números de acceso de las secuencias incluidas se presentan en la Tabla 1. En resumen, los árboles filogenéticos mostraron claramente que *T. crassiceps* TcAgo2 y TcDcr2 están cercanamente relacionados a ortólogos de Ago2 y Dcr2 de otros céstodos (Fig. 6). Nuestros resultados caracterizan por primera vez a los dos componentes más importantes de la maquinaria para el procesamiento de siRNA en *T. crassiceps*, lo que demuestra la factibilidad del silenciamiento de genes en este parásito, y, por ende, su capacidad de regular postranscripcionalmente la expresión de mRNA mediante RNA pequeños no codificantes (sncRNA).

5.4. Evaluación del silenciamiento de TcEnoA

Para evaluar el silenciamiento con los siRNA diseñados, se realizaron ensayos de RT-PCR utilizando RNA total extraído de cisticercos tratados con alguno de los siRNA (Tabla 2: EnoA-1 o EnoA-2). Al llevar a cabo evaluaciones después de 28, 30 y 32 ciclos en los ensayos de PCR, y posteriormente evaluar las bandas obtenidas por densitometría en geles de agarosa, pudimos concluir que el siRNA EnoA-2 fue el más eficiente de los siRNA diseñados (Figura 7). Los experimentos subsecuentes fueron llevados a cabo con el siRNA EnoA-2.

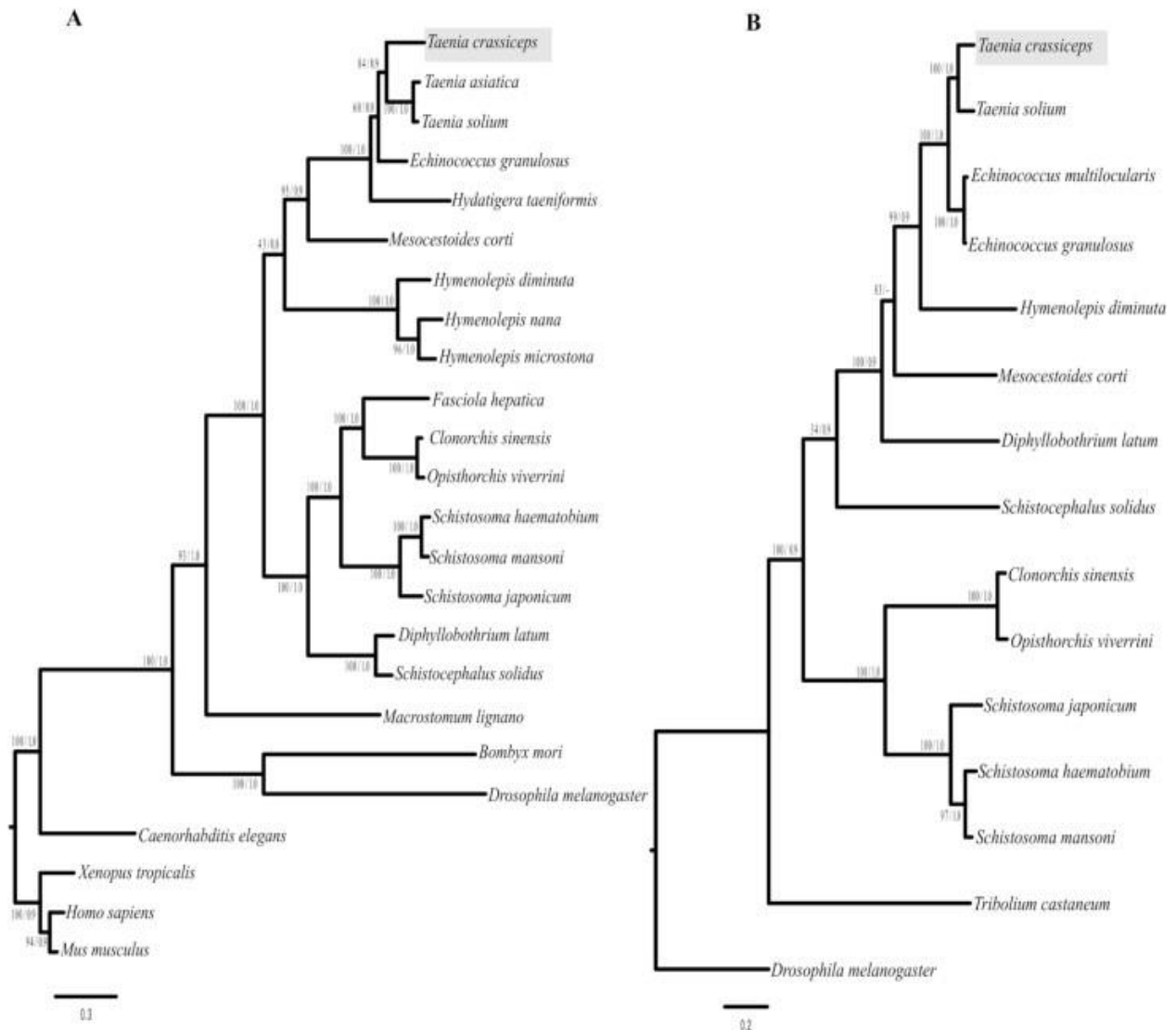


Figura 6. Árboles filogenéticos de TcAgo2 y TcDcr2. A) Análisis filogenético de TcAgo2; B) Análisis filogenético de TcDcr2. Los números en los nodos internos muestran los ML bootstrap, frecuencias de clado y probabilidades posteriores (BI). Todas las secuencias de TcAgo2 y Dcr2 fueron alineadas utilizando el software SeaView v.4 y ajustadas con el programa Mesquite.

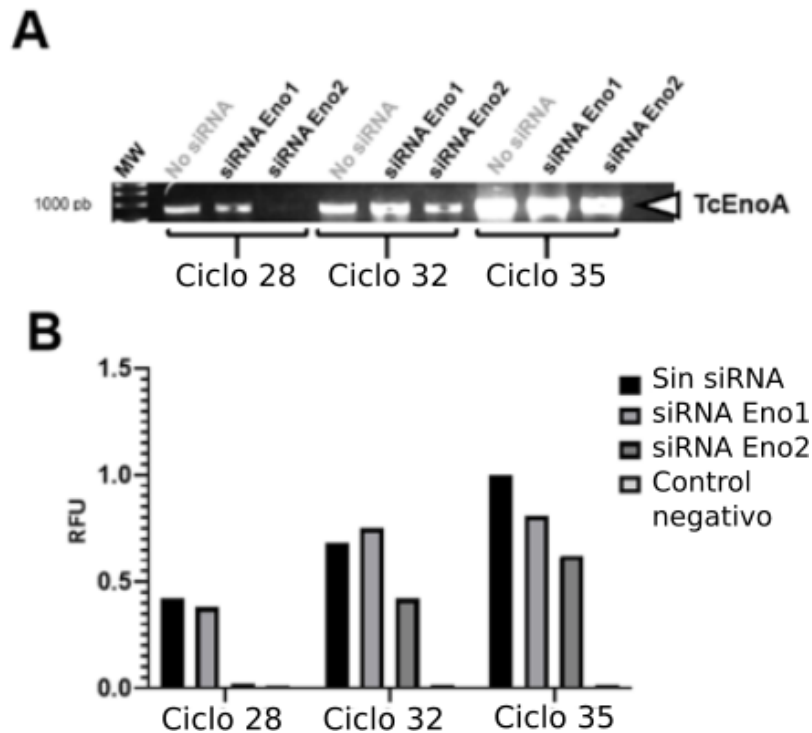


Figura 7. Silenciamiento de TcEnoA con los siRNA Eno1 y Eno2. A) Productos de amplificación por RT-PCR tiempo final evaluados a los ciclos 28, 32 y 35. B) Análisis densitométrico de los productos de RT-PCR cuantificados por unidades de intensidad relativa utilizando el software de análisis de imágenes Image J.

El efecto de la incubación con el siRNA EnoA-2 se evaluó a diferentes tiempos: 0, 3, 12 y 24 hrs mediante qRT-PCR. La expresión de TcEnoA fue calculada relativa a la expresión de Actina1 de *T. crassiceps*. Se observó silenciamiento significativo (alrededor de 40%) a partir de las 3 hrs después de la electroporación, alcanzando su máximo a las 24 hrs en que se lograba un silenciamiento cercano al 90%; sin embargo, el silenciamiento logrado a las 12 hrs era muy similar, por lo que no se observó diferencia significativa entre los resultados a 12 y a 24 hrs (Figura 8). Puesto que desde las tres horas ya se obtenía un silenciamiento significativo, los experimentos subsecuentes se llevaron a cabo a este tiempo después de la electroporación, por dos razones principales: 1. Para no afectar la viabilidad de los cisticercos en el cultivo *in vitro* posterior y 2. Para facilitar la realización de los numerosos experimentos subsecuentes en los que se evaluó el efecto del silenciamiento de siRNA EnoA-2 sobre las enzimas de la glicólisis y del ciclo de Krebs, ya que nuestros resultados demostraron claramente la factibilidad y reproducibilidad del silenciamiento.

Silenciamiento de EnoA

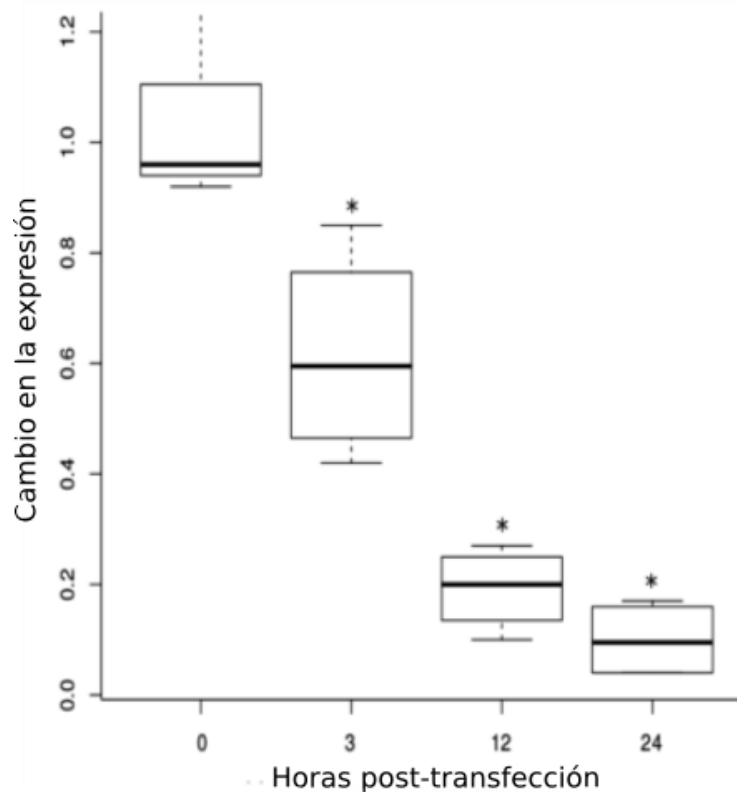


Figura 8. Silenciamiento de la expresión de TcEnoA en cisticercos de *T. crassiceps*. El silenciamiento de TcEnoA se evaluó a las 0 hr, 3 hr, 12 hr y 24 hr después de la electroporación del siRNA EnoA. Se llevó a cabo q-PCR y su análisis se realizó mediante el método $\Delta\Delta$ -CT. Se llevó a cabo el método de ANOVA a una vía y el análisis post-hoc de Tukey utilizando Jupyter notebook y R statistics versión 3.6.2. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el control y los experimentos a 3hr (*) ($p = 0.0044$), control y experimentos a 12 h ($p = 0.0000066$), y control y experimentos a 24 h ($p = 0.0000022$). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre las 12 h y las 24 h ($p = 0.7579$).

Para determinar si el silenciamiento induce la expresión de sus moléculas efectoras TcAgo 1, 2 y 3, y de TcDcr 1 y 2, comparamos su expresión basal antes del silenciamiento (0 hrs) y después del silenciamiento (3 hrs) (Fig. 9). A pesar de que se observa un incremento en la expresión de TcAgo2 y TcDcr2, no se encontraron diferencias significativas en relación a su expresión en los cisticercos no tratados (Figura 9), esto sugiere que la expresión basal de estos genes es constitutiva y suficiente para procesar el siRNA introducido a las concentraciones exploradas en este trabajo.

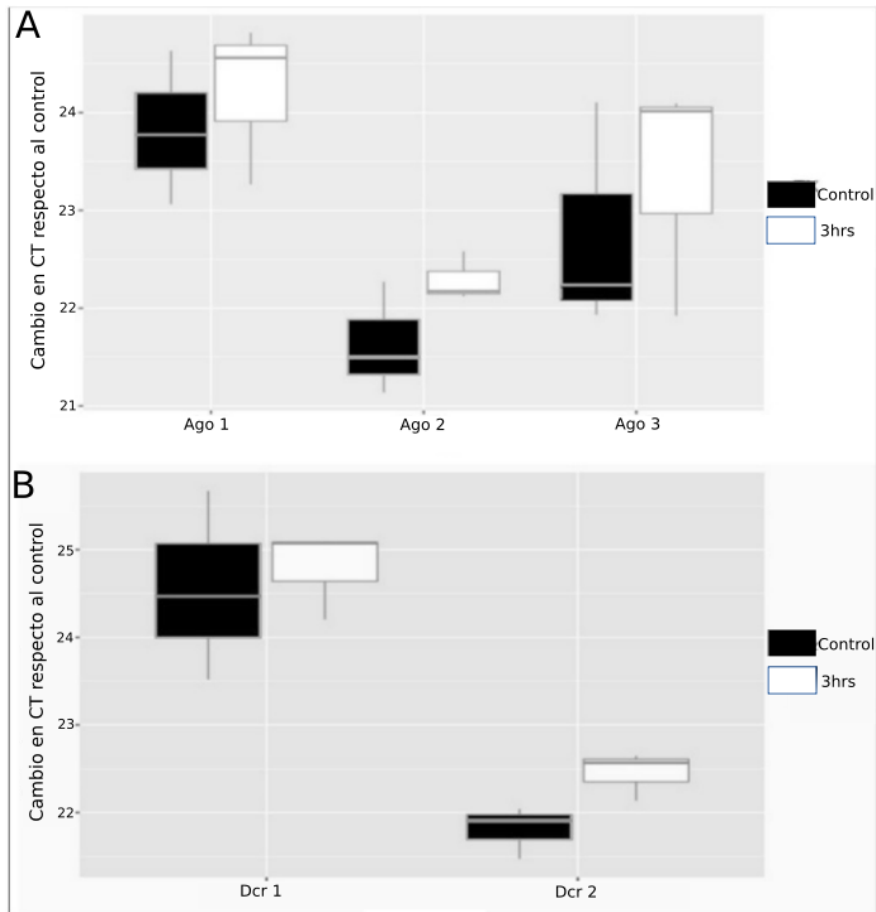


Figura 9. Expresión de Argonautas y Dicers de *T. crassiceps* por q-RTPCR. A) Evaluación de TcAgo1, 2 y 3 a las 0 hrs (negro) y las 3 hrs (blanco) después del silenciamiento. B) TcDcr 1 y 2 a las 0 hrs (negro) y las 3 hrs (blanco) después del silenciamiento.

5.5. Evaluación de la expresión de genes de la Vía Glicolítica

5.5.1. Expresión basal de los genes de la Vía Glicolítica

Para determinar si el silenciamiento de TcEnoA afecta la expresión de otras enzimas glicolíticas, buscamos y seleccionamos mediante nuestra base de datos de *T. crassiceps*, doce enzimas que participan en la vía de la glucólisis. Posteriormente diseñamos oligonucleótidos para evaluar su expresión en cisticercos de *T. crassiceps* silenciados y no silenciados. Inicialmente se llevó a cabo RT-PCR para todos los genes seleccionados en cisticercos no silenciados para determinar su expresión basal (Figura 10).

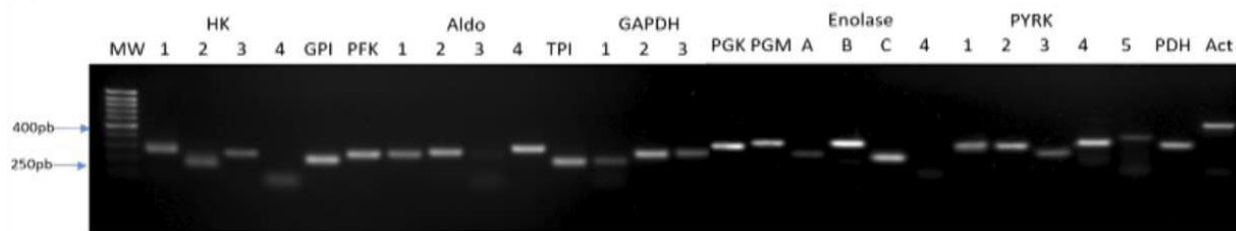


Figura 10. Expresión basal de los genes de las enzimas glicolíticas. RT-PCR tiempo final de enzimas que participan en la vía glicolítica y sus isoformas. Hexocinasa (HK1, 2, 3, 4), glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI), fosfofructocinasa (PFK), aldolasa (Aldo 1, 2, 3, 4), triosafosfato isomerasa (TPI), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH1, 2, 3), fosfoglicerato cinasa (PGK), fosfoglicerato mutasa (PGM), enolasa A, B, C, 4, piruvatocinasa (PYRK1, 2, 3, 4, 5), piruvato deshidrogenasa (PDH) y actina (Act).

5.5.2. Expresión post-silenciamiento de los genes de la Vía Glicolítica

De la misma forma se realizaron pruebas de qRT-PCR en cisticercos después de 3hrs de silenciamiento para determinar el cambio en los niveles de expresión de las mismas enzimas glicolíticas. Nuestros resultados demostraron una pequeña sobreexpresión de los genes de las enzimas río abajo de TcEnoA, incluyendo TcEnoB, C y 4, con la excepción de la piruvato cinasa 2 y 5 (~10% y ~60% respectivamente). En contraste, las enzimas río arriba fueron subexpresadas, a excepción de la fosfoglicerato quinasa y fosfoglicerato mutasa (Fig. 11).

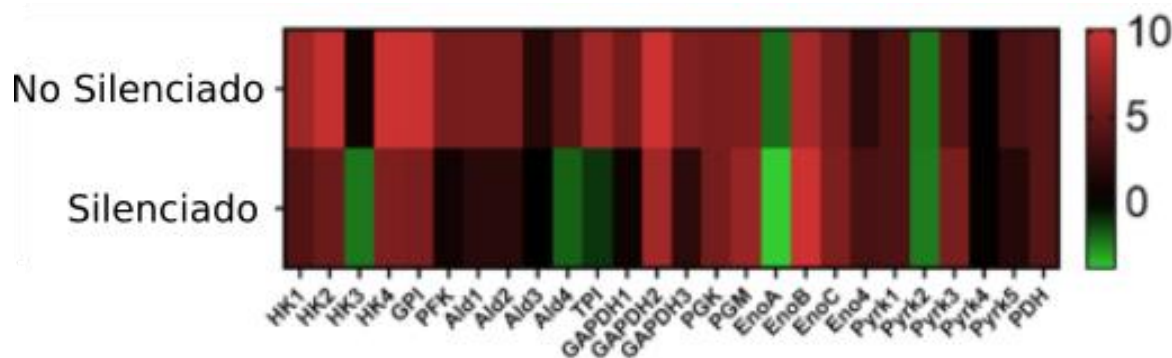


Figura 11. Expresión de enzimas glucolíticas en cisticercos de *T. crassiceps* después de 3 hrs de silenciamiento de TcEnoA. Heat map obtenido con el software Prisma graph pad software que muestra los niveles de expresión entre los cisticercos silenciados para TcEnoA y no silenciados. 0, 5 y 10 indican el cambio en los niveles de expresión de los genes de las enzimas.

5.6. Evaluación de la expresión de genes del Ciclo de Krebs

5.6.1. Expresión basal de los genes del Ciclo de Krebs

El ciclo de Krebs es un importante destino de productos de oxidación provenientes de la glucólisis. Por lo tanto, decidimos explorar esta relación funcional entre ambas vías metabólicas, para determinar si el silenciamiento de TcEnoA repercutió en la

expresión de los genes de las enzimas del ciclo de Krebs. Por ello, a partir de búsquedas en la base de datos de *T. crassiceps*, seleccionamos 4 enzimas del ciclo de Krebs: citrato sintasa, alfa-cetoglutarato deshidrogenasa, fumarasa y succinato deshidrogenasa. De forma similar a lo descrito para las enzimas glicolíticas, se diseñaron oligonucleótidos para evaluar su expresión en cisticercos de *T. crassiceps* silenciados y no silenciados. Inicialmente se llevó a cabo RT-PCR para todos los genes de las enzimas mencionadas en cisticercos no tratados para determinar su expresión basal (Fig. 12).

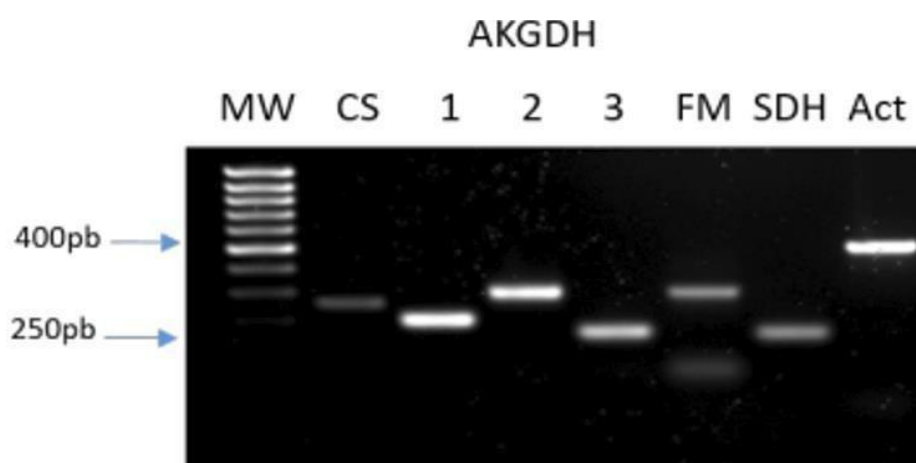


Figura 12. Expresión basal de los genes de las enzimas del ciclo de Krebs. RT-PCR tiempo final de enzimas que participan en el ciclo de Krebs y sus isoformas. Citrato sintasa (CS), alfa-cetoglutarato deshidrogenasa (AKGDH1, 2, 3), fumarasa (FM), succinato deshidrogenasa (SDH).

5.6.2. Expresión post-silenciamiento de los genes del Ciclo de Krebs

Al analizar los niveles de expresión de los genes del ciclo de Krebs seleccionados, nuestros resultados muestran que, contrario al efecto en enzimas glicolíticas, la expresión de los genes de las enzimas del ciclo de Krebs resultó menos afectada después del silenciamiento de TcEnoA que las enzimas de la glucólisis; sin embargo, alfa-cetoglutarato deshidrogenasa 2, fue claramente sobre-expresada, mientras que la succinato deshidrogenasa y fumarasa fueron levemente sobre-expresadas (Fig. 13). Es decir que el efecto del silenciamiento de TcAgoA sobre las enzimas del ciclo de Krebs parece bastante moderado.

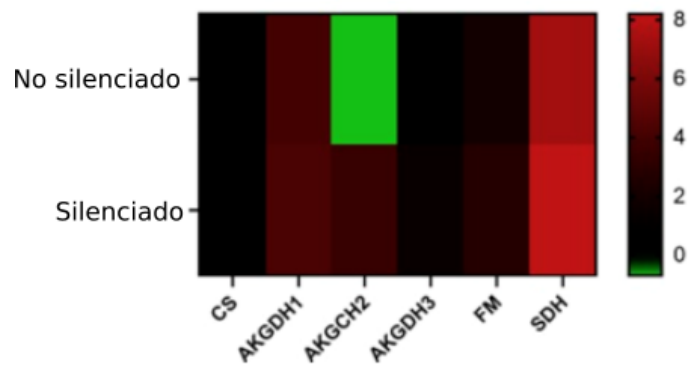


Figura 13. Expresión de genes de las enzimas del ciclo de Krebs en cisticercos de *T. crassiceps* después de 3 hrs de silenciamiento de TcEnoA. Heat map obtenido con el software Prisma graph pad software que muestra los niveles de expresión entre los cisticercos silenciados para TcEnoA y no silenciados. 0, 2, 4, 6 y 8 indican el cambio en los niveles de expresión de los genes de las enzimas.

6. DISCUSIÓN

El silenciamiento de genes empleando siRNA, es una metodología molecular que ha sido ampliamente utilizada para estudiar la función de genes en diversos organismos. En este proyecto logramos identificar los genes de las proteínas Argonauta (TcTcAgo1, TcTcAgo2 y TcTcAgo3) y Dicer (TcDcr1 y TcDcr2), que son dos de las moléculas más importantes involucradas en la regulación transcripcional y post- transcripcional de los RNAm mediante silenciamiento génico (Rivas, *et al* 2005), en el taenido *T. crassiceps*. De la misma forma, demostramos la funcionalidad de TcTcAgo2 y TcDcr2 al inducir el silenciamiento del gen TcEnoA en *T. crassiceps*.

Cuando los siRNAs entran en la célula, el silenciamiento de genes es activado mediante el complejo RISC (complejo de silenciamiento por RNA de interferencia). Se ha demostrado que Ago y Dcr son componentes indispensables de RISC y que son esenciales para regular la expresión génica (Rivas, *et al* 2005). A pesar de esto, algunos componentes de RISC, incluyendo Ago y Dcr, se encuentran ausentes, o no son funcionales en ciertos parásitos (Castellanos-Gonzalez, 2020). Por ello, nuestro primer objetivo fue determinar si Ago y Dcr se expresan en *T. crassiceps*, utilizando oligonucleótidos iniciadores diseñados para regiones conservadas de Ago1, 2 y 3, así como para Dcr1 y 2, por medio de RT-PCR. Mediante esta amplificación obtuvimos los fragmentos de DNA que fueron secuenciados para posteriormente realizar un análisis BLAST y confirmar su identidad. Nuestros resultados demostraron que Ago y Dcr se expresan en *T. crassiceps*.

Al realizar el análisis filogenético incluyendo secuencias de Ago y Dcr de platelmintos, otros invertebrados y mamíferos como especies no relacionadas, se demuestra claramente que las secuencias de TcAgo y TcDcr pertenecen a las familias Argonauta y Dicer, respectivamente. Como se esperaba, los genes más cercanos a TcAgo y TcDcr corresponden a *T. asiatica* y *T. solium*. Las secuencias obtenidas mediante RT-PCR, mostraron que la maquinaria para el procesamiento de los siRNA está presente y activa en *T. crassiceps*. Aunque existen trabajos que confirman la existencia de miRNAs en platelmintos (Fontenla *et al.*, 2017; Jin *et al.*, 2013; Macchiaroli *et al.*, 2015), incluyendo *T. solium* (Pérez *et al.*, 2017), hasta donde sabemos, este es el primer reporte que describe la presencia y funcionalidad del aparato de silenciamiento génico en *Taenidos* (Guerrero *et al.*, 2021).

Para validar que la maquinaria de silenciamiento en cisticercos de *T. crassiceps*, no solo se expresa, sino que es funcional, se decidió intentar el silenciamiento del gen para la enolasa A (TcEnoA) de la *T. crassiceps*, una enzima que forma parte de la glucólisis, que es la vía para el metabolismo (degradación y síntesis) de la glucosa. La TcEnoA ha sido recientemente caracterizada en nuestro grupo de trabajo (Ayón-Núñez et al., 2018). Nuestros resultados (Fig. 6) demostraron que el siRNA TcEno2 induce un silenciamiento temprano y significativo de 40% a las 3 hrs y de 90% a las 24 hrs post-transfección. La viabilidad de los parásitos transfectados con los siRNA fue evaluada, observando la motilidad de los cisticercos, la cual no se vio afectada después del silenciamiento. Por lo tanto, la reducción en la expresión es claramente debida a la adición del siRNA específico (TcEno2). Los niveles de silenciamiento de TcEnoA concuerdan con los niveles observados para diversos genes en otros platelmintos como los genes Hox Post-2 en *Hymenolepis microstoma* (Pouchkina-stantcheva et al., 2013).

Estudios previos habían reportado que la expresión de Ago2 y 3 y Dcr2 aumenta en respuesta a la transfección de siRNA en *Drosophila* (Lee et al., 2004) y otros insectos (Garbutt y Reynolds, 2012); lo que permite concluir que dichos genes son cruciales en el silenciamiento mediado por siRNA. En este trabajo obtuvimos resultados similares, después de 3 hrs de silenciamiento, se observó un aumento de la expresión de Ago2, 3 y Dcr2, lo que también sugiere que la maquinaria de silenciamiento es funcional (Figura 7).

En contraste, Ago1 y Dcr1 parecen estar implicados en el procesamiento de miRNA (Garbutt and Reynolds 2012; Fontenla et al., 2017). Sin embargo, esto no fue explorado en la presente tesis. La disponibilidad de los transcriptomas de *T. crassiceps* y de *T. solium* fue fundamental para anticipar que nuestra metodología de silenciamiento podría funcionar, como fue comprobado mediante nuestros resultados. Ello permite concluir que esta técnica puede ser aplicable para el silenciamiento de otros genes.

Un resultado de nuestros experimentos iniciales que vale la pena resaltar, son las diferencias en el silenciamiento cuando se utilizan diferentes siRNAs (Fig. 5); el TcEno 2 inhibió >90%, en contraste con el TcEno 1 que inhibió menos del 20%, estas diferencias se relacionan con la posición del gen contra la que se dirige la

secuencia del siRNA, por lo que el silenciamiento debe ser optimizado probando varios siRNA dirigidos hacia diferentes regiones del gen.

Los resultados obtenidos proveen evidencia de la habilidad de los céstodos para procesar RNA no codificante, a pesar de la falta de proteínas tan importantes como PIWI (Fontenla *et al.*, 2017; Tsai *et al.*, 2013; Zheng, 2013). PIWI es un componente crucial en la protección de la línea germinal contra transposones, lo que se ha demostrado en *Drosophila*, planarias de vida libre y vertebrados (Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 1994; Sheth *et al.*, 2010). La presencia de Ago3, una característica única de los platelmintos (Skinner *et al.*, 2015) y la existencia de 3 genes PL10 en *T. crassiceps* (datos no publicados) pueden representar una adaptación a la ausencia de PIWI y actuar en el procesamiento de transposones en células germinativas de taenidos.

El uso de RNAseq permitió la identificación de más genes ortólogos de TcDicer y TcAgo en el genoma de *T. crassiceps* (Bobes *et al.*, 2022). Estos descubrimientos sugieren que el parásito podría involucrar otros genes de la misma familia en el proceso de silenciamiento. Por ejemplo, nosotros detectamos la participación de otros componentes como Ago1, Ago3 y Dcr1, lo que sugiere que la participación de estos otros elementos en el procesamiento de los siRNA amerita investigación adicional.

En resumen, se requieren estudios futuros que confirmen el rol de cada una de estas moléculas en el proceso de silenciamiento de genes de *T. crassiceps*.

Por lo que se refiere al gene seleccionado para establecer el método de silenciamiento, es decir, la enolasa A, conviene recordar que la familia de enolasas en *T. crassiceps* incluye TcEnoA, TcEnoB, TcEnoC, TcEno4 (Ayón-Núñez *et al.*, 2018). En este estudio analizamos la hipótesis que el silenciamiento de TcEnoA modularía la expresión de otros genes TcEno. Evaluamos la expresión de TcEnoB y C al inducir un silenciamiento moderado (evaluado a las 3 hrs). Después del silenciamiento de TcEnoA, se encontró un incremento en la expresión de TcEnoB, TcEnoC, lo que sugiere un mecanismo compensatorio, es decir, que el silenciamiento de TcEnoA induce el aumento en la expresión de las otras dos isoformas. Un reporte reciente en *Toxoplasma gondii*, un protozoario parásito intracelular que presenta dos variantes de enolasa, coincide con nuestros resultados mostrando un aumento en la expresión de Eno 2 después de silenciar Eno1

(Holmes *et al.*, 2010), evidenciando una homeostasis exquisita entre las variantes de enolasa posterior al silenciamiento. A diferencia de lo mostrado en estudios en *Clonorchis sinensis* y *Ascaris suum*, en los que el silenciamiento de Eno1 resultó fatal para los parásitos (Wang *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2011).

Para comprender mejor las consecuencias metabólicas posteriores al silenciamiento de TcEnoA en *T. crassiceps*, la expresión de todas las enzimas glucolíticas fue estudiada en cisticercos silenciados y no silenciados mediante qRT-PCR. Los resultados mostraron que los genes de las enzimas que participan en la glucólisis, río abajo de la enolasa, especialmente la piruvato cinasa 5 sufren una ligera reducción. En contraste, las enzimas río arriba, resultaron sub-expresadas, excepto por la fosfoglicerato cinasa y fosfoglicerato mutasa. Es decir, Al existir un bloqueo a nivel de TcEnoA, se observa un ligero aumento en TcEnoB y 4, lo cual podría compensar la función de la variante silenciada. Sin embargo, se produce una reducción en la actividad de las enzimas río abajo y, por lo tanto, en la formación de piruvato, necesario para la producción de acetil coenzima A y el mantenimiento de la actividad del ciclo de Krebs. Además, las enzimas río arriba de TcEnoA presentan una ligera reducción en su expresión, probablemente debido a una disminución en la eficiencia de la glucólisis en respuesta a la reducción en la formación de piruvato causada por el silenciamiento de la enolasa, como se ha reportado en estudios de bloqueo farmacológico de la misma. (Fraga *et al.*, 2012).

Para conocer si el silenciamiento de TcEnoA también tenía algún efecto sobre la expresión de enzimas que participan en el ciclo de Krebs, llevamos a cabo ensayos de qRT-PCR para RNA de 4 de dichas enzimas. Los resultados mostraron cambios en la expresión de AKGDH 2, FM y SDH, pudiendo existir el uso de vías alternas para el mantenimiento del ciclo de Krebs. Estos resultados pueden reflejar que una compensación funcional mediada por el incremento de la actividad de otros genes TcEno, puede ser suficiente para mantener la función metabólica del cisticerco de *T. crassiceps*. Es importante realizar ensayos funcionales para corroborar estos posibles mecanismos compensatorios; en este sentido, la evaluación de los niveles de piruvato permitiría una mejor comprensión de los mecanismos compensatorios al silenciamiento. En *S. mansoni* fué provada la efectividad de la droga antimalarica mefloquina, que demostró ser efectiva contra esquistosómulas inhibiendo la actividad de una de las variantes de enolasa de dicho parásito, lo que llevó a la reducción de la eficacia de la glucólisis (Maneck, Keiser & Müller, 2012). Otros estudios de

silenciamiento de genes de enzimas glicolíticas han mostrado resultados de interés, por ejemplo, el silenciamiento de la fosfoglicerato mutasa (Singh *et al.*, 2013) y de la trealosa-6-fosfato sintasa (Kushwaha *et al.*, 2012), mostraron efecto sobre el ciclo de vida del nemátodo *Brugia malayi*, disminuyendo la motilidad del adulto y la liberación de microfilarias *in vitro*, así como una disminución de la supervivencia del parásito. El silenciamiento del gen de enolasa en larvas infectivas del nemátodo *Ascaris suum* provocó una reducción en el tamaño de la larva, causada por un retraso en su desarrollo (Chen *et al.*, 2011). Otro reporte acerca de silenciamiento de enolasa es realizado en *Clonorchis sinensis* (CsEno), en el que se observa la muerte de los parásitos después de 120 hrs de incubación con CsEno siRNA (Wang, 2014). En resumen, nuestros resultados demuestran que el silenciamiento de EnoA afectó la expresión de diversas enzimas glucolíticas, sin alcanzar a notarse efecto sobre el ciclo de Krebs, lo que evidencia claramente los mecanismos homeostáticos de la forma larvaria de la *T. crassiceps*.

En este punto, conviene enfatizar que la estandarización de un método de silenciamiento para la enolasas de *T. crassiceps* permitirá un análisis a profundidad de su función, no sólo dentro de la vía glucolítica, sino también sobre otras funciones que se han propuesto para esta enzima (conocidas en inglés como moonlighting proteins; Pancholi, 2001), tales como su participación en el establecimiento y permanencia de la larva en los tejidos del huésped. Estas implicaciones son de especial interés en el caso del parásito humano *T. solium* (Ayón-Núñez *et al.*, 2018). Estudios funcionales adicionales de la vía de la glucólisis y sus enzimas podrían revelar también los roles de otros genes parálogos encontrados en el genoma de *T. crassiceps*. Por ejemplo, la hexocinasa (HK) tiene 4 isoformas en mamíferos que promueven la eficiencia de la glucólisis; uno de ellos, HK-2 se sobre-expresa en células cancerosas y su inhibición se correlaciona con una reducción de la actividad del Ciclo de Krebs (Yamamoto *et al.*, 2017). La inhibición de otras enzimas glucolíticas como la HK-2 podría resultar en una inhibición importante del metabolismo intermediario de *T. crassiceps*, incluyendo otras respuestas homeostáticas como el efecto Warburg.

Las enzimas de la vía de la glucólisis han sido también propuestas como blancos en el desarrollo de drogas para tratar enfermedades parasitarias (Timson, 2016). La HK de *Trypanosoma brucei* presenta dos isoformas (TbHK1 and TbHK2), el silenciamiento de TbHK1 conduce su reducción en un 60%, provocando la muerte

del parásito, sugiriendo que TbHK1 es esencial para la supervivencia del parásito (Chambers *et al.*, 2008). Estudios *in vitro* demostraron que la enzima TPI de *T. solium* puede ser reconocida por anticuerpos específicos que afectan su actividad catalítica, y se han utilizado para diseñar drogas que inhiben a dicha enzima (Sanabria-Ayala *et al.*, 2013).

Por otro lado, evidencia en líneas celulares tumorales muestra que el paso de fosfoenol piruvato a fosfoglicerato es independiente de la acción de la enolasa bajo condiciones de anaerobiosis, lo cual demuestra que en ausencia de enolasa la producción de piruvato continúa (Vander Heiden *et al.*, 2010). Se requieren estudios adicionales para determinar si esta puede ser una vía alterna activa en céstodos. Otras evidencias muestran que bajo condiciones anaeróbicas utilizando células humanas, la alfa-enolasa es inhibida y la beta-enolasa es activada (Discher *et al.*, 1998). Una activación similar de las variantes de la enolasa podría explicar la supervivencia de los cisticercos después del silenciamiento de TcEnoA y merece también mayor investigación.

Nuestros resultados muestran que el silenciamiento de TcEnoA, incluso a las 24 hrs, en que se alcanza una reducción cercana al 90% en la reducción de la expresión de la Enolasa A, no afectó la viabilidad de los parásitos. Esta observación va de acuerdo con otros trabajos de silenciamiento; por ejemplo, el realizado por knock-down con dsRNA de la GADPH en esporocistos de *S. mansoni* (Boyle *et al.*, 2003), o el bloqueo de la acetilcolinesterasa de *Nippostrongylus brasiliensis* (Hussein *et al.*, 2002), entre otros. Estos resultados paradójicos se pueden atribuir a una posible plasticidad metabólica en *S. mansoni*, la que le permite cambiar sus necesidades metabólicas entre estadios de desarrollo (Tielens *et al.*, 1992) y que involucra la redundancia de algunos genes (Boyle *et al.*, 2003). En este sentido, los cisticercos utilizan tanto rutas metabólicas aeróbicas como anaeróbicas dependiendo de la disponibilidad de oxígeno en el medio y obtienen sus nutrientes por difusión facilitada a través de la pared vesicular. Se han identificado dos transportadores de glucosa (TGTP1 y TGTP2), el segundo se localiza en la superficie tegumentaria del cisticerco, mientras que el primero es abundante en estructuras de la pared vesicular en el cisticerco, así como en el parásito adulto (Rodríguez-Contreras *et al.*, 1998), lo que demuestra también cierta plasticidad metabólica, tanto para responder a las demandas de su entorno, como por las demandas metabólicas en diferentes etapas del desarrollo.

Nuestros resultados muestran que la maquinaria de silenciamiento génico en *T. crassiceps* se encuentra funcionalmente activa. También demostramos claramente que el silenciamiento de genes utilizando siRNA puede utilizarse como una metodología molecular poderosa para caracterizar la función de diversos genes en ténidos.

7. CONCLUSIONES

- Los cisticercos de *T. crassiceps* tienen los genes que participan en la maquinaria de silenciamiento génico.
- La maquinaria de silenciamiento de genes es activa y funcional.
- Los genes Ago2 y Dcr2 se encuentran filogenéticamente cercanos a los mismos genes de especies de *taenidos* como *T. solium*, *T. asiática* y otras especies cercanas de céstodos como *E. granulosus*.
- Se logró una reducción del 90% de la expresión de TcEnoA a las 24 hrs de silenciamiento con el siRNA-2 EnoA.
- La inhibición de TcEnoA indujo un ligero aumento en la expresión de TcEnoB, TcEnoC y TcEno4.
- El silenciamiento de la TcEnoA indujo una disminución en la expresión de todas las enzimas en la glucólisis, localizadas río arriba de la enolasa, a excepción de la fosfoglicerato cinasa, como lo demuestran los resultados de ensayos de RT-PCR.
- El silenciamiento de TcEnoA causó el efecto contrario de todas las enzimas río abajo de la enolasa, que resultaron ligeramente sobre-expresadas, con excepción de la piruvato cinasa 4 y 5. Ambos efectos demuestran una exquisita regulación metabólica funcional sobre la glucólisis, en respuesta al silenciamiento.
- El silenciamiento de TcEnoA no indujo cambios detectables en los niveles de expresión de las enzimas del ciclo de Krebs.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez, J. I., Rivera, J., & Teale, J. M. (2008). Differential release and phagocytosis of tegument glycoconjugates in neurocysticercosis: Implications for immune evasion strategies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000218>
- Ambrosio J, Landa A, Merchant MT, Laclette JP. Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Arch Med Res*. 1994 Autumn;25(3):325-30. PMID: 7803983
- Andrea, W. (2015) 'Landscape analysis: management of neurocysticercosis with an emphasis on low- and middle-income countries', p. 65
- Ataoğlu, T., Üngör, M., Serpek, B., Haliloğlu, S., Ataoğlu, H., & Ari, H. (2002). Interleukin-1 β and tumour necrosis factor- α levels in periapical exudates. *International Endodontic Journal*, 35(2), 181–185. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2002.00467.x>
- Ayón-Núñez, D. A., Fragoso, G., Espitia, C., García-Varela, M., Soberón, X., Rosas, G., Bobes, R. J. (2018). Identification and characterization of *Taenia solium* enolase as a plasminogen-binding protein. *Acta Tropica*, 182, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.02.020>
- Babbitt, P. C., Hasson, M. S., Wedekind, J. E., Palmer, D. R. J., Barrett, W. C., Reed, G. H., Gerlt, J. A. (1996). The enolase superfamily: A general strategy for enzyme-catalyzed abstraction of the α -protons of carboxylic acids. *Biochemistry*, 35(51), 16489–16501. <https://doi.org/10.1021/bi9616413>
- Baker, J. R., Heiden, M. G. Vander, Locasale, J. W., Swanson, K. D., Heffron, G. J., Amador-noguez, D., Landa, A. (2013). Identification and characterization of *Taenia solium* enolase as a plasminogen-binding protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 23(1), 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.02.020>
- Berkowitz, A. L. et al. (2015) 'Neurologic manifestations of the neglected tropical diseases', *Journal of the Neurological Sciences*. Elsevier B.V., 349(1–2), pp. 20–32. doi: 10.1016/j.jns.2015.01.001.
- Bernal, D., De La Rubia, J. E., Carrasco-Abad, A. M., Toledo, R., Mas-Coma, S., & Marcilla, A. (2004). Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. *FEBS Letters*, 563(1–3), 203–206. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00306-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00306-0)

Bobes, R. J. *et al.* (2017) 'Experimental and Theoretical approaches to Investigate the Immunogenicity of *Taenia solium*-Derived KE7 Antigen', 85(12), pp. 1–13. doi: 10.1128/IAI.00395-1.

Bobes, R. J., Estrada, K., Rios-Valencia, D. G., Calderón-Gallegos, A., de la Torre, P., Carrero, J. C., Lacleste, J. P. (2022). The Genomes of Two Strains of *Taenia crassiceps* the Animal Model for the Study of Human Cysticercosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12(May), 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.876839>

Braae, U. C., Devleeschauwer, B., Sithole, F., Wang, Z., & Willingham, A. L. (2017). Mapping occurrence of *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis and areas at risk of porcine cysticercosis in Central America and the Caribbean basin. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2362-7>

Brindley, P. J., & Pearce, E. J. (2007). Genetic manipulation of schistosomes. *International Journal for Parasitology*, 37(5), 465–473. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.12.012>

Del Brutto, O. H. (2012) 'Neurocysticercosis among international travelers to disease- endemic areas', *Journal of Travel Medicine*, 19(2), pp. 112–117. doi: 10.1111/j.1708- 8305.2011.00592.x.

Campos, A., Bernard, P., Fauconnier, A., Landa, A., Gómez, E., Hernández, R., Lacleste, J. P. (1990). Cloning and sequencing of two actin genes from *Taenia solium* (Cestoda). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 40(1), 87–93. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(90\)90082-W](https://doi.org/10.1016/0166-6851(90)90082-W)

Campos, A. *et al.* (1998) 'Phylogenetic relationships of platyhelminthes based on 18S ribosomal gene sequences', *Mol.Phylogenet.Evol.*, 10(1), pp. 1–10. doi: 10.1006/mpev.1997.0483.

Castellanos-Sánchez, V. O. *et al.* (2009) 'Chorionic gonadotropin hormone receptors on *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci in culture.', *The Journal of parasitology*, 95(6), pp. 1287–1294. doi: 10.1645/GE-2087.1.

Conte, D., & Mello, C. C. (2003). RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Current Protocols in Molecular Biology / Edited by Frederick M. Ausubel et al.*, Chapter 26, 1–20. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2603s62>

- Darocha, W. D., Otsu, K., Teixeira, S. M. R., & Donelson, J. E. (2004). Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 133(2), 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.10.005>
- Davis, R. E., Parra, A., LoVerde, P. T., Ribeiro, E., Glorioso, G., & Hodgson, S. (1999). Transient expression of DNA and RNA in parasitic helminths by using particle bombardment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(15), 8687–8692. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=17577&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Dorais, F. J. and Esch, G. W. (1969) 'Growth rate of two *Taenia crassiceps* strains', *Experimental Parasitology*, 25(C), pp. 395–398. doi: 10.1016/0014-4894(69)90086-1.
- Dorny, P. *et al.* (2009) 'Emerging food-borne parasites', *Veterinary Parasitology*, 163(3), pp. 196–206. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.026.
- Elbashir, S. M. *et al.* (2001) 'Duplexes of 21 ± nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells', *Nature*, 411(6836), pp. 494–498. doi: 10.1038/35078107.
- Escobedo, G. *et al.* (2005) 'Parasite regulation by host hormones: An old mechanism of host exploitation?', *Trends in Parasitology*, 21(12), pp. 588–593. doi: 10.1016/j.pt.2005.09.013.
- Evans, J. a. (2007). Diaphragmatic defects and limb deficiencies - taking sides. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 143A(18), 2106–2112. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a>
- Everhart, M. E. *et al.* (2004) 'Dynamics of a wild strain of *Taenia crassiceps* (WFU) infrapopulation in BALB / cJ mice (cestoda:taenidae)', 90(1), pp. 79–84. doi: 10.1645/GE-3255
- Figueiredo, B. C., Da'dara, A. A., Oliveira, S. C., & Skelly, P. J. (2015). *Schistosomes Enhance Plasminogen Activation: The Role of Tegumental Enolase. PLoS Pathogens*, 11(12), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005335>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>

- Fleury, A. *et al.* (2010) 'Neurocysticercosis, a persisting health problem in Mexico', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(8), pp. 8–10. doi: 10.1371/journal.pntd.0000805.
- Flisser, A. and Correa, D. (2010) 'Neurocysticercosis may no longer be a public health problem in Mexico', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(12), pp. 1–5. doi: 10.1371/journal.pntd.0000831.
- Flores-Bautista, J. *et al.* (2018) Fate of uptaken host proteins in *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci, *Bioscience Reports*, 38(June), pp. 1–10. doi: 10.1042/BSR20180636.
- Fraga CM, Costa TL, Bezerra JC, de Souza Lino R Jr, Vinaud MC. (2011) *Taenia crassiceps*: host treatment alters glycolysis and tricarboxylic acid cycle in cysticerci. *Exp Parasitol.* 2012 Feb;130(2):146-51. doi: 10.1016/j.exppara.2011.11.001. Epub 2011 Nov 22. PMID: 22127328.
- Fragoso, G. *et al.* (1996) 'Genetic control of susceptibility to *Taenia crassiceps* cysticercosis', *Parasitology*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 112(1), pp. 119–124. doi: 10.1017/S003118200006515X.
- Fragoso, G. *et al.* (2008) 'Preferential growth of *Taenia crassiceps* cysticerci in female mice holds across several laboratory mice strains and parasite lines', *The Journal of parasitology*, 94(2), pp. 551–553. doi: 10.1645/GE-1287.1.
- Gevorkian, G. *et al.* (1996) 'Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis', *Immunology Letters*, 49(3), pp. 185–189. doi: 10.1016/0165-2478(96)02503-5.
- Ghosh, A. K., & Jacobs-Lorena, M. (2011). Surface-expressed enolases of *Plasmodium* and other pathogens. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(SUPPL. 1), 85–90. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000900011>
- González-Miguel, J., Morchón, R., Carretón, E., Montoya-Alonso, J. A., & Simón, F. (2013). Surface associated antigens of *Dirofilaria immitis* adult worms activate the host fibrinolytic system. *Veterinary Parasitology*, 196(1–2), 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.01.028>
- Gripper LB, Welburn SC (2017). Neurocysticercosis infection and disease—A review. *Acta Trop.* 166:218–24. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.11.015

- Großhans, H., & Filipowicz, W. (2008). Molecular biology: The expanding world of small RNAs. *Nature*, 451(7177), 414–416.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.01.009>
- Hagen, J., Scheerlinck, J. P. Y. and Gasser, R. B. (2015) 'Knocking down schistosomes - promise for lentiviral transduction in parasites', *Trends in Parasitology*. Elsevier Ltd, 31(7), pp. 324–332. doi: 10.1016/j.pt.2015.03.009.
- Haley, B. and Zamore, P. D. (2004) 'Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex', *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(7), pp. 599–606. doi: 10.1038/nsmb780.
- Hannon, G. J. (2002) 'RNA interference', *Nature*, 418(6894), pp. 244–251. doi: 10.1038/418244a [doi]\r418244a
- Hernández-Chea, R. D., Morales-Ramírez, P., Hernández, M., Toledo, A., Hun, A., Sciutto, E., & Fleury, A. (2023). *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in Guatemala: a prevalent public health problem? Pathogens and Global Health. Taylor and Francis Ltd.
- Hill, D. E. y Zarlenga, D. S. (1996) 'Immunological responses in the mouse host to a cloned antigen of *Taenia crassiceps*', *Veterinary Parasitology*, 65(3–4), pp. 247–258. doi: 10.1016/S0304-4017(96)00953-3.
- Hoberg, A. E. P. et al. (2000) 'A phylogenetic hypothesis for species of the genus *Taenia* (eucestoda:Taenidae)', *J Parasitol*, 86(1), pp. 89–98. doi: 10.1645/0022-3395(2000)086[0089:APHFSO]2.0.CO;2.
- Hoberg, E. P. (2006) 'Phylogeny of *Taenia*: Species definitions and origins of human parasites', *Parasitology International*, 55(SUPPL.), pp. 23–30. doi: 10.1016/j.parint.2005.11.049.
- Hood, E. (2004) 'RNAi: What's all the noise about gene silencing?', *Environmental Health Perspectives*, 112(4). doi: 10.1289/ehp.112-a224.
- Huerta, L., Terrazas, L. I., Sciutto, E., & Larralde, C. (1992). Experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: factors involved in susceptibility. *The Journal of Parasitology*, Vol. 78, pp. 471–476. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0024917030&partnerID=tZOtx3y1>
- Humphreys, D. T., Westman, B. J., Martin, D. I. K., & Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and

poly(A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(47), 16961–16966. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506482102>

Jin, X., Lu, L., Su, H., Lou, Z., Wang, F., Zheng, Y., & Xu, G. T. (2013). Comparative analysis of known miRNAs across platyhelminths. *FEBS Journal*, 280(16), 3944–3951. <https://doi.org/10.1111/febs.12395>

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). *A Programmable Dual-RNA – Guided*. 337(August), 816–822. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>

Kalinna, B. H., & Brindley, P. J. (2007). Manipulating the manipulators: advances in parasitic helminth transgenesis and RNAi. *Trends in Parasitology*, 23(5), 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.03.007>

Koziol, U. (2017) 'Evolutionary developmental biology (evo-devo) of cestodes', *Experimental Parasitology*. Elsevier Inc, 180, pp. 84–100. doi: 10.1016/j.exppara.2016.12.004.

Kundrát, M. (2009). Heterochronic shift between early organogenesis and migration of cephalic neural crest cells in two divergent evolutionary phenotypes of archosaurs: Crocodile and ostrich. *Evolution and Development*, 11(5), 535–546. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2009.00352.x>

Laclette, J. P. *et al.* (1992) 'Paramyosin inhibits complement C1', *Journal of Immunology*, 148(1), pp. 124–128. doi: 10.1016/j.jpain.2014.06.009.

Laclette, J. P., Shoemaker, C. B., Richter, D., Arcos, L., Pante, N., Cohen, C., Nicholson-Weller, A. (1992). Paramyosin inhibits complement C1. *Journal of Immunology*, 148(1), 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2014.06.009>

Laranjo-González, M., Devleeschauwer, B., Trevisan, C., Allepuz, A., Sotiraki, S., Abraham, A., Dermauw, V. (2017). Epidemiology of taeniosis/cysticercosis in Europe, a systematic review: Western Europe. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2280-8>

Larralde, C., Morales, J., Terrazas, I., Govezensky, T., & Romano, M. C. (1995). Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 52(6), 575–580. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(95\)00062-5](https://doi.org/10.1016/0960-0760(95)00062-5).

Lino, R. D. S. *et al.* (2007) 'Anatomopathological aspects of neurocysticercosis in autopsied patients', *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 65(1), pp. 87–91. doi: 10.1590/S0004-282X2007000100019.

Macchiaroli, N., Cucher, M., Zarowiecki, M., Maldonado, L., Kamenetzky, L., & Rosenzvit, M. C. (2015). microRNA profiling in the zoonotic parasite *Echinococcus canadensis* using a high-throughput approach. *Parasites & Vectors*, 8, 83. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0686-8>

Manneck T, Keiser J, Müller J. (2012) Mefloquine interferes with glycolysis in schistosomula of *Schistosoma mansoni* via inhibition of enolase. *Parasitology*. Apr;139(4):497-505. doi: 10.1017/S0031182011002204. Epub 2012 Feb 6. PMID: 22309769.

Mizukami, C., Spiliotis, M., Gottstein, B., Yagi, K., Katakura, K., & Oku, Y. (2010). Gene silencing in *Echinococcus multilocularis* protoscoleces using RNA interference. *Parasitology International*, 59(4), 647–652. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.08.010>

Mocellin, S. and Provenzano, M. (2004) 'RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology.', *Journal of translational medicine*, 2(1), p. 39. doi: 10.1186/1479-5876-2-39.

Moguel, B., Mendoza, N. M., Bobes, R. J., Carrero, J. C., Monroy, J. C., Hernández, M. E. D., Laclette, J. P. (2015). Transient transgenesis of the tapeworm *Taenia crassiceps*. *SpringerPlus*. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1278-y>

Murrell KD. Zoonotic foodborne parasites and their surveillance. *Rev Sci Tech*. 2013 Aug;32(2):559-69. doi: 10.20506/rst.32.2.2239. PMID: 24547659.

Mousavi, S. M., Afgar, A., Mohammadi, M. A., Mortezaei, S., Faridi, A., Sadeghi, B., & Fasihi Harandi, M. (2020). Biological and morphological consequences of dsRNA-induced suppression of tetraspanin mRNA in developmental stages of *Echinococcus granulosus*. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04052-y>

Mousavi, S. M., Afgar, A., Mohammadi, M. A., Mortezaei, S., Faridi, A., Sadeghi, B., & Fasihi Harandi, M. (2020). Biological and morphological consequences of dsRNA-induced suppression of tetraspanin mRNA in developmental stages of *Echinococcus granulosus*. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04052-y>

- Navarrete-Perea, J., Moguel, B., Mendoza-Hernandez, G., Fragoso, G., Sciutto, E., Bobes, R. J., & Laclette, J. P. (2014). Identification and quantification of host proteins in the vesicular fluid of porcine *Taenia solium* cysticerci. *Experimental Parasitology*, 143(1), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.04.011>
- Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., & Conklin, D. S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes and Development*, 16(8), 948–958. <https://doi.org/10.1101/gad.981002>
- Pancholi, V. (2001). Multifunctional α -enolase: Its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(7), 902–920. <https://doi.org/10.1007/PL00000910>
- Pérez, M. G., Macchiaroli, N., Lichtenstein, G., Conti, G., Asurmendi, S., Milone, D. H., Rosenzvit, M. C. (2017). microRNA analysis of *Taenia crassiceps* cysticerci under praziquantel treatment and genome-wide identification of *Taenia solium* miRNAs. *International Journal for Parasitology*, 47(10-11), 643–653. doi:10.1016/j.ijpara.2017.04.00210.1016/j.ijpara.2017.04.002
- Pierson, L., Mousley, A., Devine, L., Marks, N. J., Day, T. A., & Maule, A. G. (2010). RNA interference in a cestode reveals specific silencing of selected highly expressed gene transcripts. *International Journal for Parasitology*, 40(5), 605–615. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.10.012>
- Pouchkina-stantcheva, N. N., Olson, P. D., Cunningham, L. J., & Hrc, G. (2013). RNA-mediated gene suppression and in vitro culture in *Hymenolepis microstoma*. 43, 641–646. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.03.004>
- Pushparaj, P. N. et al. (2008) 'siRNA, miRNA, and shRNA: in vivo Applications', *J Dent Res*, 87(11), pp. 992–1003. doi: 10.1177/154405910808701109
- Prevention C-C for DC. CDC - Cysticercosis - Resources for Health Professionals. (2023). Available online at: https://www.cdc.gov/parasites/cysticercosis/health_professionals/index.html
- Schmidt GD, Roberts LS (2008) Foundations of Parasitology (8th Edition). Mcgraw Hill Higher Education Editorial p 701
- Sciutto, E. et al. (2000) '*Taenia solium* disease in humans and pigs: An ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions', *Microbes and Infection*, 2(15), pp. 1875–1890. doi: 10.1016/S1286-4579(00)01336-8

- Sciutto, E., Fragoso, G., & Larralde, C. (2011). *Taenia crassiceps* as a model for *Taenia solium* and the S3Pvac vaccine. *Parasite Immunology*, 33(1), 79–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01257.x>
- Shabalina, S. A. and Koonin, E. V. (2008) 'Origins and evolution of eukaryotic RNA interference Svetlana', *Trends in Ecology and Evolution*, 23(10), pp. 578–587. doi: 10.1016/j.tree.2008.06.005.Origins.
- Shao, H., Li, X., Nolan, T. J., Massey, H. C., Pearce, E. J., & Lok, J. B. (2012). Transposon-mediated Chromosomal Integration of Transgenes in the Parasitic Nematode *Strongyloides ratti* and Establishment of Stable Transgenic Lines. *PLoS Pathogens*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002871>
- Shi, Y. (2003) 'Mammalian RNAi for the masses', *Trends in Genetics*, 19(1), pp. 9–12. doi: 10.1016/S0168-9525(02)00005-7.
- Slais, J. (1966) 'The importance of the bladder for the development of the cysticercus', *Parasitology*, (56), pp. 707–713. PMID: 6008295
- Smith, J. K., Esch, G. W. and Kuhn, R. E. (1972) 'Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (cestoda)-I. Aneuploidy in the anomalous ORF strain, *International Journal for Parasitology*, 2(2), pp. 261– 263. doi: 10.1016/0014-4894(72)90034-3.
- Sorvillo, F. *et al.* (2011) 'Public health implications of cysticercosis acquired in the United States.', *Emerging infectious diseases*, pp. 1–6. doi: 10.3201/eid1701.101210.
- Spiliotis, M., Lechner, S., Tappe, D., Scheller, C., Krohne, G., & Brehm, K. (2008). Transient transfection of *Echinococcus multilocularis* primary cells and complete in vitro regeneration of metacestode vesicles. 38, 1025–1039. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.11.002>
- Štefanić, S., Dvořák, J., Horn, M., Braschi, S., Sojka, D., Ruelas, D.S., Brian, S., Lim, K.C., Hopkins, S.D., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R., 2010. RNA interference in *Schistosoma mansoni* schistosomula: Selectivity, sensitivity and operation for larger-scale screening. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000850>
- Symeonidou, I. *et al.* (2018) 'Human taeniasis/cysticercosis: A potentially emerging parasitic disease in Europe', *Annals of Gastroenterology*, 31(4), pp. 406–412. doi: 10.20524/aog.2018.0260.

Toledo, A. *et al.* (1997) 'In vitro culture of *Taenia crassiceps* larval cells and cyst regeneration after injection into mice', *J Parasitol*, 83(2), pp. 189–193. doi: 10.2307/3284437.

Toledo, A. *et al.* (1999) 'Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: An epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis', *Infection and Immunity*, 67(5), pp. 2522–2530. doi:10.1128/IAI.67.5.2522-2530.1999

Trevisan, C. *et al.* (2018) 'Maja Jurhar Pavlova 22, Marian Varady 23 , Marina Pavlak 24, Mindaugas Šarkūnas 25', *Olgica Djurković-Djaković*, 12, p. 28. doi: 10.1186/s13071-018-3153-5.

Tsai, I. J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garcarrubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K. L., Berriman, M. (2013). The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*, 496(7443), 57–63. doi: <https://doi.org/10.1038/nature12031>

Unniyampurath, U., Pilankatta, R., & Krishnan, M. N. (2016). RNA interference in the age of CRISPR: Will CRISPR interfere with RNAi? *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3). <https://doi.org/10.3390/ijms17030291>

Utzinger, J. *et al.* (2012) 'Neglected tropical diseases: Diagnosis, clinical management, treatment and control', *Swiss Medical Weekly*, 142(November), pp. 19–22. doi: 10.4414/smw.2012.13727.

Valverde-Islas, L. E. *et al.* (2011) 'Visualization and 3d reconstruction of flame cells of *Taenia solium* (Cestoda)', *PLoS ONE*, 6(3). doi: 10.1371/journal.pone.0014754.

Vargas-Parada, L. *et al.* (1999) 'Formation of calcareous corpuscles in the lumen of excretory canals of *Taenia solium* cysticerci', *Parasitology Research*, 85(2), pp. 88–92. doi: 10.1007/s004360050514.

Vazquez, F. *et al.* (2004) 'Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of arabidopsis mRNAs', *Molecular Cell*, 16(1), pp. 69–79. doi: 10.1016/j.molcel.2004.09.028.

Vázquez-Talavera, J., Solís, C. F., Medina-Escutia, E., López, Z. M., Proaño, J., Correa, D., & Lacleste, J. P. (2001). Human T and B cell epitope mapping of *Taenia solium* paramyosin. *Parasite Immunology*, 23(11), 575–579. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2001.00416.x>

- Ward, J. D. (2015). Rendering the Intractable More Tractable: Tools from *Caenorhabditis elegans* Ripe for Import into Parasitic Nematodes. *201*(December), 1279–1294. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.182717>
- World Health Organization. (2012). Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases: a roadmap for implementation: executive summary. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70809>
- Willingham, A. L. and Engels, D. (2006) 'Control of *Taenia solium* Cysticercosis/Taeniasis', *Advances in Parasitology*, 61(05), pp. 509–566. doi: 10.1016/S0065-308X (05)61012-3.
- Willms K, Vargas-Parada L, Laclette JP. Biología del parásito. En: Larralde C, De Aluja AS. Cisticercosis. Guía para profesionales de la salud. México, DF: FCE, Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Salud Pública, Fundación Mexicana para la Salud; 2006. p. 19-40
- Willms, K. and Zurabian, R. (2010) '*Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models.', *Parasitology*, (5255), pp. 335–346. doi: 10.1017/S0031182009991442.
- Wilson, R. C., & Doudna, J. A. (2013). Molecular Mechanisms of RNA Interference. *Annu. Rev. Biophys*, 42, 217–239. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130404>
- Wold, F. (1971) Enolase. *The Enzymes*. Volume 5, 1971, Pages 499-538 [https://doi.org/10.1016/S1874-6047\(08\)60101-8](https://doi.org/10.1016/S1874-6047(08)60101-8)
- Zhang, W. *et al.* (2015) 'Epidemiology and control of echinococcosis in central Asia, with particular reference to the People's Republic of China', *Acta Tropica*. Elsevier B.V., 141(Part B), pp. 235–243. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.03.014.
- Zhao, Z., Flibotte, S., Murray, J. I., Blick, D., Boyle, T. J., Gupta, B., Waterston, R. H. (2010). New tools for investigating the comparative biology of *Caenorhabditis briggsae* and *C. elegans*. *Genetics*, 184(3), 853–863. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.110270>
- Zhu, L. *et al.* (2017) 'Understanding the core of RNA interference: The dynamic aspects of Argonata-mediated processes', *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 128, pp. 39–46. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2016.09.008.

Zurabian, R., Aguilar, L., Jiménez, J. a, Robert, L., & Willms, K. (2008). Evagination and infectivity of *Taenia crassiceps* cysticerci in experimental animals. *The Journal of Parasitology*, 94(1), 1–6. <https://doi.org/10.1645/GE-1239.1>

9. ANEXOS

Anexo 1: Secuencias utilizada para el análisis filogenético de TcAgo2 y Dcr2

T. crassiceps Ago2 Tcr_000782900.t1

ATGGCAGACCGAGCAAGAGGCCGTGGTGAAGAGGTGCTGCCGGTA
GATTCGCGGTGGTTACCAAGAGCGAGGTGATCGCGGAACCCGCGG
TGGCAGTTCTTACAATCGTGGAGGTCAGGGTGGACGCGGCAGAGAA
TTTCGAGGTCAAGGAGGCCGAGGTCATGCTTTCCAGAGTAGTGGGG
GTGCTTGGCAAACGAGTTCACCCACGGTTTCTCTCTCGGAGAGTTTG
GCGTCCCTAAGCTGGGCTGGCGATGATGTAGCGGTTGAACGGATTGT
CACTGTGCCGCCAAGTGATACTGGTGGCTCAGAAGTCGCTCCTGTGC
CGAGTGCTTCTACTCCTGTGGAGTCAGGGGAGCCTGATTTACCGACT
TCCAAAGGGAAGAAGAAGCAGCAGCAGCGGCAGAAGGCTGGGGTGT
CCAAAAGCCTCCAGCGTCATCGTCATTGCCATTGAGGGAGGATAGA
ATGCTGCCTTCTCGTCCTGGTATAGGAACAGTTGGGAGGAAGGTACT
GGTTGAAGTAAATTGTTGGGATTGCGCTCTGTCAGATGTGTCGGCCT
TAATGTACGACTTAACACTGACGAAAGTAATAACTGCGGACGGGAAA
GTGGTTAAAATAAAAGAAACGGATGTGAGGAAACACCTAAAGGCGAT
TGCAGAGAGGAAACGTGGTGTATTTTACGACGGCGGTCTGAATTT
TGTATTCTCTGGGACCCTTGGACGGGAAGGAGGGGAAAGTTTTAAAT
TTTAGTGAAAAAATCCCAGATCCCCGCGGAAACGACGATTTGACGATA
GAGTACACTGCGACAAAAGTGGGCAGTGTTTCTGCCAGTCTTATCAC
CGATTATCTTAATAATGTCCGTTTCGAGGACGCCAGATGTGCCACAGC
AAGCTATTAATATGCTGGATAACCTAGTGAGGTGGGCTAATAAGGCGT
CATTACCCTACTTATCAAAGTCGGCGATTTTCTTTGGAGAACCGGAAC
GGTCTGACACTGGAGGTCTGTTCTGGATTTACCGCGGATATTCGCTG
AGCTTCCGTCCGCAATGGAAGTGTCGGTTGAACGTAGATATGGCTCA
CAGGGCTTTCTTCCCTGCTGGAAACCTGGCGGATCTTTTATATGGGA
AATATGGTGACTCGATGTATAATCAACCAACGTGGAGGCGTATGGCT
GAAGATATAAAATCAATCCGCGTCGTAGCCAGTCATTACAAGAATGAG
GGAAAGGCCTACAAAAGGCAATTTACAGTGCATGGGTTATCGAAGAA
TTCGGCAGACAGGGAGATAATTGCTGATCTCAAAAAATCGGTTGCTGA
GTACTTCAATGATCGATATGGCATAAGGCTGCGATACCCAGAGCTTC
CGTGTGTGAAGACGAAGAAGGATCGAGAGGAGTACATTCCAATGGAG

TTGCTGGAAGTATTGCCATTCCAAAATGCCAAGGAGGATCCTGGAGA
GATCGCCAGCGCTATTATTCCGGTGTGCGGCAGTCGGACCGTCGGAC
CGCTTTGGGACTTTGAAAGATTTTCGTCAGAAGCATGGATAGAAGTATC
TTGATGTCTGAAGTTCGGATTAAGCTCGATGAAACCGAATCCAATGGAA
GTTAAGGCGCGGGAACTGCCCCAGCCGTGTGGCACATTTTCCACCG
GAAAGATAAACTGGCCAGGGGAAGGTGGCGCCCGCAGCACTTTTA
CCTACCCGTGGCAGGGCCGCTGAAGTGTTCCGGTCGTCACTATAGTTC
CCACCAAGATCCTCGACGTTAGGAGGTTGAAGGAACTTTGCAAAAG
GCGGCTAGGAACTTGGGCGTAAACATGCAAATTGAAGAAGGGTACCG
GAAAGCACCGATTGTTGCCCTGCCCACTTGTTTAAGCAGTTTAAGGA
GGATAAAGTGGATCTGGCCGTTTTTCATTCTAACTAGCAACACAGAGTA
TCCGTATATCAAGCGCCAAGGCGATCTGCACAACCTTCATGTTACCCA
GTGCGTAAAGGAATCCACGATAGGCAATTCGAGCGCCATGAACAATC
TAATGCTGAAGATAAACGCCAAGATGGGTGGCATTAAATTGGCTGGTA
AATGATTTGTCCGAAAAGTGGAAGGACGAATTAAGTGATGGTCGTGGG
TGCCGATGTCACCCATCCAGGTCCTGTCGGTAGTGGTCGGGGCTTTA
CCAAATCGGTTGCCGCGGTCGTTGCCTCGATTTCTCCCGACCTCATG
CGATATGTGGCTATTGTTCCGCCAGCAGGATCAAATGAAGGAGGGTCA
AAATACTCGAGAGTATATTGATGGAATGGAGGGCATCTTCTCCGACCT
CCTGAAGGTGTTTGGAAAGCACAATAGAGACGCTCTTCCTAGAAAGG
TGATTGTTTACCGGGACGGTGTTCAGAGGGACAGTTTGACACTGTC
CTAAGGAGTGAGCTCGCAGCTATGCAGCGTGCTTGTTATGGTCTCAG
GCCTAATTATGAGCCGGGAATAACGTTTATTGTGGTACAGAAACGTCA
CCACATCCGATTCAATCCGTCGGGGAGGGAGGGGAGAAACGTTTTAC
CGGGCACTGTTGTTGACACGGAAGTCACACATCACCGTGAATTTGAC
TTCTACCTTTGCTCGCATGAGGGGATACAGGGTACCTCCAAGCCTGC
CCACTACCACGTTCTCTACGATGACAACGATTTTTCCGCGGACGACCT
GCAGCAATTTACGTATTGTCTGTGCCACGCGTACATGCGATGCTGTC
GCAGTGTGTCGTACCCGGCACCGACGTACTACTCGCATTTAGCGGCC
TTCCGCGCACGCGATTGGCTGAAAGGCTCGGAGAATGAGTGCATCAT
GGTGAATAATCGCTTCACCATCAATCCGGGACAGCAAGACCAAATGT
TCTTTCTG

T. crassiceps Dicer2. Tcr_000002400.t1 Dcr2

ATGGTCTTCGACGAGGAAGCCTCTCGCGCTCTGGTGCGTTGGGCAG
AAGAGAGGGACTTTTACGTGAATCAGAGAGAGCAGAAAACCTCCGTCA
CCGCCATCGCCTCTGCCACCGCGTAATCAGCCCCTGCTAGAGAGTG
GCATTTGCGCCCGCTATGGCGTTCAACTGTCCACCATACCCACCACT
CAGTGGTTCGGGTCTTCTTGTGCGTCCAATTGATCTGCCGCCCCGAGGA
CCCGGGTAGCTACGCAGTCGTGGGGCCCAACTCCAGTGGCCTTTGT
GCCTCCAGCCCTGTTCCAGATTACATGGCCGAGCAGTTGCCCGCGG
AGCTGCATCAACGGGGCGCTACCTCCTACCTTGATTACGCCAAGTTT
AAGCATGGTACTCGCCTCCGCCTGGTGGAGGAGACGCGGGGTCTGG
ATCCCTCCACCCCTCTTGTGCTCTCACGCGCATTTCACGACATCGGA
ACGCCGCCAATGTGACGTCTGGTGTGAGTGGCAAGGAGGT
GATTAAGGAGAACAGGATTCCCAACTTTGCATCGTGCACCCGCTGA
ACACATGGCTGTGGCTCATTCTGTCTCACTCCCCTGTCCCTTACC
AAGTCTATCGATGTCTATCGATTGGGGAGCTAGCGAACCGTCTGCAC
GAGATGCTCTACTCTGACCACCCTGTCCAGTCTGCGCATTCTCCATCT
TCTTCTGTTGCTGCTGCTGCTGCTCCTCCTCCTCCTCCTCCCCCT
CTCGACCTCCCCACCGGTAACCTTCTTATGCCCGACCGCCACTCCGT
ACATCCCGTCTGCATTCCCTCGATTGAAAGCACCTCACTCAGGATC
GGAACGGTTCGTGGCAATTCAAAGGTCCTGTTGTCGTCTGCTCTCTC
GACTCGGAGACTTCCCTAGATCGCATTGTTGAGGAAAATTGTACCTCC
GAGGCGTCAGCAGAGGTGCCCCCTGCGGTGGGTTTGTATGAGGCCT
TCACGTCAGTAAACGCCTTTGAGGCAGTAAATTTGGAGCGACTTGAG
CTGTTGGGTGACTCCTTCTGAAGTTTGTGCTGCCAGCCTCCTTCTCTAT
GCCACTTCGCCAGCCTCCATGGATGAGGGTCAGCTTACATACGCTCG
CATCGCGCACGTCTCCAATTCGAACCTGCATCGCATCTCTGTGGAATT

CGGACTCTTCTGTTACTTTTGT TTTTCCAGCTTTAAACCTGAGGCCAAA
TATCTTCCACCTTACTACGCCATGGCTGATCCAGAAAGGGCCTGTCAA
CGTCACGACATGCGTATGTTTGTGAAGCTGTATGACAAATCGATAGCC
GATGCTATGGAGTCCCTTCTGGGTCTGTGTCTCCTGAGTCTGGAGGC
CCCGAGGGTTGCGCGCCTCTTGCATCTCTTCAAGCTTTCCGAAGAGC
CGGACTCGCTGAGTGCCTAGTACAGGCAGGGTCGGGGGAGAGGGT
GTCCATCCCTCTTGGGTGCCGCTACTTCTCATGCCCGAGCACCGTG
GCATTGACCCTAGTTTTGTGGGGGAAGACGATGCATTGATGGCCATG
CGTCAGGCCGAGGCGGAGCCAATGCTTCAGGCCAGTATGCAATCCC
TTTACAAGGCTTTGGGTTCTAGCGAAGCTGCGACGGCCGTGAAATCG
ACGCCCATAGATATTTATGAGGTATTGGAGAAGAGGGCGCCTGGAATT
GCAGCCACTAGAGGATATTATTGGCTATAGGTTCAAGCCGGATCAAGA
TTCTCCTCCAAGCCATAACCCATCCCTCCTCACATCTGGCTTTTATTT
GGGGCTGTTATCAAAGATTGGAATTTCTAGGTGACGCTATTCTGGACT
TTGTGGTCACTCAGCGCATCTACAGGGATCACCCCAATATGGACCCA
GGCGAATTAACGGATCTGCGAATCGCTCTGGTCTCCAACATCAATTTG
GCTGTTGTAGCCGTTGCTTGGGCATTCAAAATTTCTGGAATATACG
GATCCCAATCTGTGGTGCTTCATCAACAATTTCTCCGACGCCGTGAC
CAAGGGAGTCAGCAACATTTGGAATTGGAGCATGACTTCAATGAGC
GGAAGGAGATGCTCTCCTACAAGGTGCTGGGAGACATGCTTGAGGC
CATAATCGGGGCCATCTTTGTGGACTCTGGTGGTGCCACTTCAATTGT
TACAGGTGTCATCTATCATCTGTTGGAACGTGAATTTGAGGCCTACGG
TAAAAGTTTGCCCATGGACCCAGTACGAATGATGCACGAGCTGTACC
CGGACCTGGAGATCGCGGTGGCGGAGTGCTTGCAGGTGAATAGTGC
AGCCGGCAAATCGGTAAGGGCTAAGGCGGAGGTGACTGGTCAGCGT
CGTCAATGCGTTCGTGTGACGGCCAAGTACAAGGGCTGCCGACTCA
GTGGGGAGGGCTTCAATCTCCGCACCGCCAAGATGAAAGTCGCTCA
GCAGTTGGGCATTGGATTCACT

Anexo 2: Oligonucleótidos diseñados para los experimentos de RT-PCR

Gen	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto pb	Posición en el gen
Hexocinasa 1			
Sentido	TCTCGGTGGTACGAATTTCC	256	228-483
Antisentido	CCGAACATGGAAGGAAGTGT		
Hexocinasa 2			
Sentido	ATGGAACGTGGGCTTAAGTG	160	109-268
Antisentido	CGCCAGCAAGTGTTACAAGA		
Hexocinasa 3			
Sentido	GATTGCGCTGCTTCCTTTAC	248	112-359
Antisentido	AAGTTTTCGCCGCTAACAAA		
Hexocinasa 4			
Sentido	GGTGTGGTTCCTGAACGTCT	256	79-334
Antisentido	CTGTCGTACGAGGTCGATCA		
Gluosa-6-fosfatoisomerasa			
Sentido	GTCTGTATGCGGACGAAT	203	404-606
Antisentido	CTCCAAGAGCCACTCCTTTG		
Fosfofructocinasa			
Sentido	TAATGACTTCTGCGGCACTG	249	612-860
Antisentido	CTCCGAACCTTCGAACAGAG		
Aldolasa 1			
Sentido	TCTCCTCGCATAATCCATCC	256	461-716
Antisentido	CTTTGACCGCAGGTTACCAT		
Aldolasa 2			
Sentido	ATGGTAACGGCTGGTCAAAG	272	700-971
Antisentido	GCCATAACGTTGTCGGAGTT		
Aldolasa 3			
Sentido	CACTGTGCAAGCTCTTCAGC	281	738-1018
Antisentido	CTCCACTGAATGTCCCCAGT		
Aldolasa 4			

Sentido	AAACCAACTGTTGCCAGTCC	209	743-951
Antisentido	GTGCATAGCTCTCCCAAAGC		
Triosa fosfatoisomerasa			
Sentido	CGTAATTGGTGTCCCTGCTT	202	114-315
Antisentido	GTTGGACTCGCCAAAAATGT		
Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa 1			
Sentido	CACCATCCAAAGATGCTCCT	210	371-580
Antisentido	GATTTGGACCATCCACCAAC		
Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa 2			
Sentido	CTCCGCTTGCTAAGGTCATC	264	470-733
Antisentido	TCAGGTCGACAACAGAGACG		
Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa 3			
Sentido	CCCGTGA ACTGGCAGATATT	266	806-1071
Antisentido	CAGCGTTGTC ACTTCTTGA		
Fosfoglicerato cinase			
Sentido	GAAAGATGGCAAGTGCACAA	242	84-325
Antisentido	GGTTCTTACAGGCTGCTTCG		
Fosfoglicerato mutasa			
Sentido	GCGGGAAAAATGATCAAAGA	275	124-398
Antisentido	CGCTTATCCGAGACTTCCAG		
Enolasa A			
Sentido	GATCCCTTTGATCAGGACGA	154	1663-1816
Antisentido	CTAGAGCCTCCGTGAAGGTG		

Enolasa B			
Sentido	GGTCATCGCTCCTGCTCTAC	280	213-492
Antisentido	GGCCAGTTTGTTACCAGCAT		
Enolasa C			
Sentido	GATCCCTTTGATCAGGACGA	165	880-1044
Antisentido	GCCGATTTGGTTCACCTTTA		
Enolasa 4			

Sentido	GTTGAAATCTGCGCCTCTTC	246	865-1110
Antisentido	TTGCCTGTATTTACCCACA		
Piruvato cinasa 1			
Sentido	TGATTGAGGAAGCTCGGAGT	226	659-884
Antisentido	CCCGTCACAAAGACAGGTTT		
Piruvato cinasa 2			
Sentido	GGCCTATCAGCCACATCAAT	250	913-1162
Antisentido	TAGCCACAGAACCCGTTACC		
Piruvato cinasa 3			
Sentido	CCCTCAATGTCGGAAAAAGA	181	673-853
Antisentido	TTTTTACGCCCTGATGGTTC		
Piruvato cinasa 4			
Sentido	GGTGTTTCAAGAGGGCGATA	239	402-640
Antisentido	CCCGTTGATAACCAGCAACT		
Piruvato cinasa 5			
Sentido	GGTGTTTCAAGAGGGCGATA	239	402-640
Antisentido	CCCGTTGATAACCAGCAACT		
Piruvato deshidrogenasa			
Sentido	GCGTTATTGAGAACGGTGGT	249	170-418
Antisentido	CCACACCCTGCTGATTTTCT		
Fosfofructocinasa			
Sentido	TAATGACTTCTGCGGCACTG	249	612-860
Antisentido	CTCCGAACCTTCGAACAGAG		
Citrato sintasa			

Sentido	TTTCCCCGTTTTTATTTCC	255	3726-3980
Antisentido	TGCATTTCTGTTTCGAGCAC		
Alfa-cetoglutarato deshidrogenasa 1			
Sentido	GGGTATACGCGCTTGACATT	195	118-312
Antisentido	CTGAGAAGGAAGCCATGGAG		
Alfa-cetoglutarato deshidrogenasa 2			

Sentido	GGGTTTCGGACTTGGGTATT	295	248-542
Antisentido	CTTTCCTCAATTCCGTGCAT		
Alfa-cetoglutarato deshidrogenasa 3			
Sentido	GCCAAAAGACGTTGGATGTT	158	374-531
Antisentido	ACCACCGCAGTACCGAATAC		
Fumarasa			
Sentido	CTCATCTCTTGGCACCCTTC	289	245-533
Antisentido	AACATGTCCAAGGGAGCAAC		
Succinato deshidrogenasa			
Sentido	TTTCTGCTGCCGTTTCTCTT	152	254-405
Antisentido	GTAGGTGAAGCCAGCGAATC		
Argonauta 1			
Sentido	CATCATCCAGCTGCAGAAAA	213	1794-2006
Antisentido	CCGAACATGATATCCCCAAC		
Argonauta 2			
Sentido	GATAAGATGCTGCCCTCTCG	178	742-919
Antisentido	TCCCCATGGTCTCTTCTTTG		
Argonauta 3			
Sentido	GTAGCGGTTGAACGGATTGT	294	259-552
Antisentido	CACATCTGACAGAGCGCAAT		
Dicer 1			
Sentido	CGATCAGGAGGTCGATGATT	261	1419-1679
Antisentido	GAAGAGCGCGTTTTATGAGG		
Dicer 2			
Sentido	CCCCTGTCCTTACCCAAGT	279	592-870

Antisentido	ACCTTTGAATTGCCACGAAC		
Actina 2			
Sentido	GCTATCCTGCGTCTCGATTT	437	522-938
Antisentido	GAGGTGATCTCCTTCTGCATAC		

9.1. Anexo 3: Artículo de revisión como actividad académica complementaria

RNAi IN PLATYHELMINTHS

Platyhelminths, also known as flatworms, are a group of flattened worms (bilateral animals without body cavity) that includes free life forms and parasitic worms. The most studied are those belonging to the clade of obligate parasites Neodermata (Kozioł, 2017), which encompasses the taxas of parasitic worms Monogenea, Trematoda, and Cestoda (Campos *et al.*, 1998).

These genera comprise the most important pathogenic parasites that are causal agents of diseases called neglected tropical diseases; these are diseases often related to areas of poverty and are associated with a significant decrease in the quality of life of infected hosts (Andrea, 2015; WHO, 2012). The most important diseases caused by these parasites include: schistosomiasis, caused by the trematode *Schistosoma mansoni*, which currently affects 207 million people worldwide (Utzinger *et al.*, 2012); and diseases caused by tapeworms such as echinococcosis, which jeopardizes about 270 million people in Central Asia and is caused by *Echinococcus multilocularis* (Zhang *et al.*, 2015) . The most common food-borne parasitic infections, in which humans become infected by eating raw or undercooked meat infested by the larval stage of the parasite is taeniasis/cysticercosis caused by *Taenia solium* (Dorny *et al.*, 2009). Human infections affecting the central nervous system are known as neurocysticercosis. Presence of specific antibodies in the sera, indicative of human contact with the parasite, varies between regions reaching up to 22.4% in areas of Latin America, 50% in Asia and 22% in Sub-Saharan Africa (Andrea, 2015). Neurocysticercosis has been related to 32.3% of epileptic patients in Latin America, 16.4% in China, 34% in India and between 2-10% in Tanzania, Uganda and, Malawi. The prevalence of epileptic seizures due to neurocysticercosis has been reported to be as high as 50% in South Africa and Zambia (Andrea, 2015). Both taeniasis/cysticercosis and echinococcosis greatly affect the productivity, quality of life and overall future of the affected populations (Andrea, 2015; Campos *et al.*, 1998).

9.2. Gene silencing mediated by iRNA Interference RNA

RNAi is a conserved pathway found in the majority of eukaryote species (Shabalina and Koonin, 2008). RNAi was discovered in 1998 by introducing double-stranded RNA (RNAs) in *Caenorhabditis elegans*, this proved to be much more effective in producing highly specific interference compared with the typical antisense blocking classically used to diminish gene expression (Fire *et al.*, 1998). Physiologically, RNA-mediated interference is responsible for the defense of the eukaryotic genome against repetitive sequences such as transposons and RNA viruses (Hannon, 2002; Shi, 2003). By definition, RNA interference (RNAi) is the process of sequence-specific, post-transcriptional gene silencing in animals and plants, initiated by double-stranded RNA (dsRNA) that is homologous in sequence to the silenced gene (Braasch *et al.*, 2003; Elbashir *et al.*, 2001; Hood, 2004). Gene silencing is considered a knockdown characterized by generating a partial reduction (between 60 and 90%) of the expression of target genes based on sequence complementarity (Braasch *et al.*, 2003; Elbashir *et al.*, 2001; Fire *et al.*, 1998; Hood, 2004; Mocellin and Provenzano, 2004).

RNA interference relies on small interference RNA (siRNA) and micro-RNA (miRNA) which are short RNA sequences derived from exogenous or endogenous double-stranded RNA (dsRNA) (Großhans and Filipowicz, 2008; Paddison *et al.*, 2002; Pushparaj *et al.*, 2008). Some plants, such as *Arabidopsis thaliana* and some eukaryotes such as *C. elegans* possess complementary endogenous siRNAs from the same locus as their target gene in such way that they are specific to the later (Vazquez *et al.*, 2004).

The key step of the RNAi is the processing of dsRNA to create small interfering RNAs (siRNA), single chains of 21 base pairs (bp) with protruding ends of 2 repeated nucleotides in 3' position and a phosphate group in 5' (Shi, 2003). siRNA is paired with its homologous mRNA target sequence, which is degraded by the RNA-induced silencing complex (RISC) (Shi, 2003; Unniyampurath *et al.*, 2016). The processing of the iRNA is carried out by Dicer, a helicase with endonuclease activity that slices dsRNA to produce siRNA and load it, with the help of a dsRNA binding protein (dsRBP), to the slicer enzyme Argonata (Ago) (Wilson and Doudna, 2013). In general, Ago is composed of six functional domains: N-terminal, linker 1 (L1), PAZ (PIWI, Argonata, Zwill), linker 2 (L2), middle domain (MID), C-terminal PIWI

(element-induced wimpy testis). The Dicer, dsRBP and Argonauta complex is the minimum RISC loading complex (RLC) required to carry out the silencing (Shi, 2003).

Depending on whether the complementarity is partial or total, inhibition of expression occurs either, via translational arrest or mRNA cut in nucleotide 10 or 11 of the target respectively (Haley and Zamore, 2004; Humphreys *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2017).

9.3. RNAi machinery in platyhelminths

Since it is not possible to generalize about the presence or absence of the working components of the iRNAs, a growing number of investigations related to the miRNAs and siRNAs in flatworms are being carried out, especially in *Schistosoma ssp.*, in which Dcr and Ago have already been described (Krautz-peterson *et al.*, 2010; Krautz- Peterson and Skelly, 2008; Verjovski-Almeida *et al.*, 2003). The biggest number of successful attempts of silencing in parasitic flatworms had been achieved in *Schistosoma spp.*

Specific miRNAs have already been found in *S. mansoni* and *Echinococcus granulosus* (Jin *et al.*, 2013), it is even speculated that miRNAs act in response to hormonal stimuli by the host, thus, influencing different stages of this parasite development (Cucher *et al.*, 2011). The presence of miRNAs indicates conservation of the silencing pathways in trematodes and cestodes (Jin *et al.*, 2013). Some conserved miRNAs in trematodes and cestodes are: Bantam, miR71, miR2a y miR124 conserved in *H. microstoma* y *T. saginata*, or miR 61, que se encuentra conservado en *H. microstoma*, *S. Japonicum*, *E. multilocularis* y *E. granulosus*, entre otros (Jin *et al.*, 2013).

Despite the conservation of iRNA pathways some of the components vary between species (Spiliotis *et al.*, 2010). It has been discovered that the genomes of *E. multilocularis*, *E. granulosus*, *T. solium*, and *H. microstoma* have in common the absence of the PIWI / Ago protein complex, considered key in the control of transmission of transposable elements (TE) in germ cells (Jin *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2013). However, it has been speculated that alternative silencing mechanisms of piRNA-like RNAs, harnessing other proteins or protein variants, may have taken the place of PIWI. One of these proteins maybe Argonauta 2, exclusive of flatworms and

related to long terminal repeat (LTR) transposable elements (TE) interference in ovary, viteline gland, testis and neoblast like cells from *S. mansoni* sporocysts (Cai *et al.*, 2012).

Other important component for RNAi is Dcr, which is composed of a DEAD N-terminal box, RNA helicase, Dicer, Piwi-Argonata-Zwille (PAZ), two RNase III one dsRNA binding domains. Phylogenetic studies show that invertebrate Dicer, unlike vertebrate, possesses two Dicer genes (Dicer1 and Dicer2) (Gao *et al.*, 2014). Dicer1 in flatworms presents all domains with the exception of the DEAD domain present in human Dicer. Dicer2 in *T. solium* presents only the RNase III domain (Gao *et al.*, 2014) and is duplicated in trematodes (Fontenla *et al.*, 2017). The existence of several variants of Ago and Dcr may be due to different catalytic functions of those variants in different types of RNAi, as happens in *Drosophila melanogaster*, where Dicer1 catalyzes the interference mediated by miRNAs and Dicer2 catalyzes the interference by dsRNAs (Lee *et al.*, 2004). Other already suggested possibility, at least for Dicer2, is that it works with the help of RNA binding proteins other than PIWI (Gao *et al.*, 2014). Likewise, the use of bioinformatics is making it possible to discover RNA pathways of interference in several species of flatworms (Fontenla *et al.*, 2017). Recently we have demonstrated Ago and Dicer expression in *T. crassiceps* which may suggest that the pathway is functional in this cestode (Guerrero *et al.* unpublished data). A generalized depiction of miRNA/siRNA pathways in flatworms is showed in Figure 1.

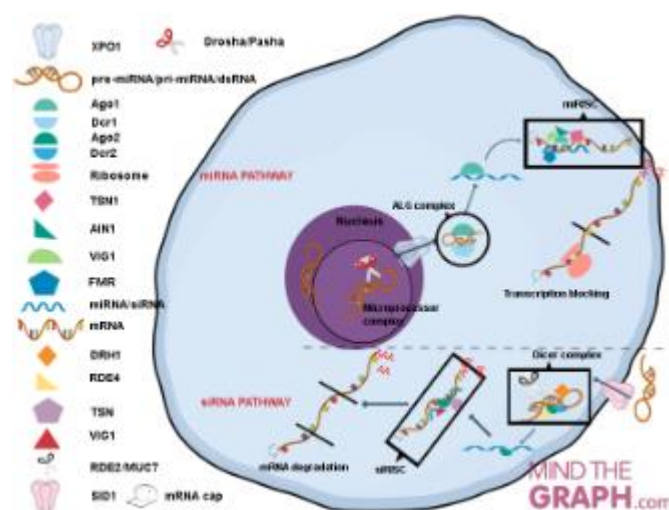


Fig1. miRNA/siRNA pathways in platyhelminths. Based in Fontenla *et al.*, 2017.

Silencing by RNA in flatworms

RNAi technology is based on the use of siRNA's to diminish gene expression taking advantage of the RNA-induced silencing complex "RISC". Despite its widely use in parasites, even in those who lacks all the RNAi components (Castellanos-Gonzalez *et al.*, 2016), RNAi use has been limited in flatworms. This situation is rapidly changing thanks to the discovery of novel parasite genomes (Tsai *et al.*, 2013; Vasconcelos *et al.*, 2017; Young *et al.*, 2012) and by the development of novel techniques for parasite culture and laboratory maintenance (Brindley and Pearce, 2007; Moguel *et al.*, 2015; Spiliotis *et al.*, 2008; Toledo *et al.*, 1997). Thus, the silencing in these organisms is feasible now and it has been successfully used in species such as *S. mansoni* and *E. multilocularis*, opening the way to functional genomics (Allan *et al.*, 2017; Boyle *et al.*, 2003; Brehm and Koziol, 2014; Mizukami *et al.*, 2010; Štefanic *et al.*, 2010).

The most important efforts in relation to gene silencing are directed towards the search for therapeutic targets and molecules involved in the host-parasite relationship. This, in the first case, due to the possibility of the emergence of resistance to drugs such as praziquantel or the decrease of susceptibility to them (Botros *et al.*, 2005; Štefanic *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011). There are studies in *Schistosoma* where iRNA is used as a method of validation of new molecular targets for the development of anti-schistosomiasis drugs (Guidi *et al.*, 2015), in the same way, in *F. hepatica* new targets have been explored with the aim to eliminate fascioliasis without the use of antiparasitic drugs that could result in drug resistance (Mcveigh *et al.*, 2014).

Successful attempts have been made by iRNAs silencing in *S. mansoni*, these includes, among others, the silencing of genes of Cathepsin B (Skelly *et al.*, 2003) and the glucose transporter by facilitated diffusion (SGTP1) (Boyle *et al.*, 2003). In addition, in *S. japonicum* the silencing of the Mago Nashi gene responsible for the maintenance of oogenesis in hermaphroditic individuals of *C. elegans* was successfully achieved and probably has the same function in *S. japonicum* (Zhao *et al.*, 2008). In the same way, the introduction and silencing of the luciferase reporter gene and the silencing of the tetraspanin 2 gene, a surface protein with signaling function, were achieved in *S. haematobium* (Rinaldi *et al.*, 2011). In the schistosomula of *S. mansoni*, large-scale screening strategies have been used to identify targets susceptible to treatment with antibiotics by dsRNA for 11 genes

considered vital and specific to the intestine and tegument with an efficiency of 75% (Štefanic *et al.*, 2010). In addition, new antigens apparently responsible for immune system evasion by *S. japonicum* have been found that are differentially expressed in the different stages of development of this parasite (Wu *et al.*, 2011). An exciting approach for gene silencing is the use of a lentiviral vector containing a cytomegalovirus (CMV) promoter and a gene coding for a short hairpin RNA (shRNA), this system helps to avoid the short duration of silencing and the variability in the response to dsRNA (Hagen *et al.*, 2015). Another recently published breakthrough is the confirmation of the high integration capacity of pseudotyped HIV virus with vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV) in the genome of *S. mansoni*, which opens the possibilities for further progress in functional genomics of flatworms (Suttiaprapa *et al.*, 2016).

In other recent studies the role of molecules as important in differentiation, proliferation and survival of eukaryotes as mitogen-activated protein kinases (MAPK) in *S. mansoni* was elucidated. Mice were infected with schistosomulas treated with iRNAs against different molecules of the MAPK family and explored as a possible therapeutic target, demonstrating their importance in *in vivo* survival and development (smJNK) and reproduction (smERK2), thus confirming their usefulness as target molecules (Andrade *et al.*, 2014). These research place Schistosomes as one of the best studied platyhelminths in terms of functional genomics.

In cestodes, iRNA has been used successfully in *E. multilocularis*, *E. granulosus*, *Moniezia expansa* (Pierson *et al.*, 2010) and *H. microstoma* (Pouchkina-stantcheva *et al.*, 2013). In protoscolexes of *E. multilocularis* the silencing of 14-3-3 gene, involved in signal transduction, cell cycle control, apoptosis, stress response, etc. was achieved (Mizukami *et al.*, 2010).

One of the most important and promising achievements made in *E. multilocularis* is the isolation and culture of its cells, in which transient transfection and the regeneration of parasite vesicles was achieved (Spiliotis *et al.*, 2008). Subsequently, the silencing by means of iRNAs of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 14-3-3 genes, and the ezrin-radixin-moesin-like protein was demonstrated in *E. multilocularis* co-rat hepatoma cells (Spiliotis *et al.*, 2010).

In other related organisms such as *M. expansa*, actin 1 (Me-act-1) and lipid binding protein (Me-lbp) were silenced (Pierson et al., 2010). Recently our group has demonstrated inhibition of glycolytic enzyme enolase in *T. crassiceps* by transfecting parasites cultured in the laboratory (Unpublished data). Other important gene silencing works are summarized in Table 1.

In summary the data described here, indicates that RNAi pathways are active in platyhelminths and had been used in benefit of research to inhibit expression of specific genes. Therefore, we anticipate that the optimization and improvement of novel transfection systems, culture methods and siRNA design programs will allow the identification of essential functions of unknown genes which may lead to a rapid development of novel drugs and vaccines.

Table 1. Other silenced genes in flatworm species

Species	Type of interference	Gene	References
<i>S. mansoni</i> (<i>miracide</i>)	dsRNA	Catepsina B SGTP1	Skelly <i>et al.</i> 2003 Boyle <i>et al.</i> 2003
<i>S. japonicum</i>	shRNA	Mago-Nashi	Zhao 2008
<i>F. hepatica</i>	dsRNA	FheCL and FheCB	(McGonigle <i>et al.</i> , 2008)
<i>S. mansoni</i> (<i>esquistosómula</i>)	dsRNA (large scale screening)	Catepsin B1, both isoformas (CB1.1 y CB1.2), catepsin C, catepsin D, CB2, anexin, Sm29, GSK3, MetAP, PP-2a, neuroendocrine convertase (NEC) and n-miristoil transferase (nMT)	Stefani <i>et al.</i> c 2010
<i>E. multilocularis</i>	siRNA	14-3-3 protein gene, Elp	Mizuka <i>et al.</i> mi 2010
<i>E. multilocularis</i> (<i>células en cultivo</i>)	siRNA	Gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenase, 14-3-3 and ezrin-radixin-moesin-like protein	Spilioti <i>et al.</i> s 2010

<i>M. expansa</i>	dsRNA	Actin 1 and lipid binding protein	Pierso et al. n 2010
<i>S. mansoni</i>	Plasmid driven shRNA	Luciferase	Ayuk et al., 2011
<i>S. haematobium</i>	siRNA	Tetraspanin 2 Luciferase	Rinaldi 2011
<i>S. japonicum</i>	siRNA	Genes de tetraspanins tsp1, 3, 6, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 17, 20, Sj 23, 26, 76D.	Wu et al. 2011
<i>H. microstoma</i>	ds/siRNA	Post-2	Pouchkina-stantcheva et al., 2013
<i>S. mansoni</i>	dsRNA	MAPK gene family SmCaMK2, SmJNK, SmERK1, SmERK2 and SmRas	Andrad et al e 2014 .,
<i>S. mansoni</i>	Lentivirus driven shRNA	Omega-1, ipse and/or kappa-5	Hagen et al., 2014
<i>E. granulosus</i>	siRNA	Eg-TSP1	Hu et al., 2015
<i>S. mansoni</i>	dsRNA	Sm-Calm, Sm-Apkc, Sm-PLK1, Sm-MAPK p38, Sm- aPKC	Guidi et al., 2015
<i>S. mansoni</i>	dsRNA	SmCYP450	Ziniel et al., 2015
<i>S. mansoni</i>	dsRNA	SmPLK1	Long et al., 2016
<i>F. hepatica</i>	Long dsRNA	(SOD), σ class of glutathione -s-transfer ase (GST), cathepsin (Cat) L1-D, Cat B1, Cat B2 and Cat B3	Anandanarayana n et al., 2017

<i>E. granulosus</i>	siRNA	E. granulosus hormone	Yang <i>et al.</i> , 2017
----------------------	-------	--------------------------	---------------------------

		receptor 3-like (EgHR3)	
<i>S. japonicum</i>	siRNA	Sjvasa3	He <i>et al.</i> , 2018

9.4. Perspectives

Gene silencing can provide invaluable information in the host-parasite relationship. It is known that the evasion strategies used by the flatworms to stay for years and even decades in their hosts is related to the active evasion of the immune response and the use of several mechanisms, including the use of host hormones in the case of *S. mansoni* (Han *et al.*, 2009) and *T. crassiceps* (Escobedo *et al.*, 2005) and the intake by pinocytosis and possible use of host's immunoglobulins by *T. solium* (Ambrosio *et al.*, 1994; Navarrete-Perea *et al.*, 2014) although the exact mechanism implicated in this internalization remains to be elucidated. A recent study carried out in *T. crassiceps* cysticerci shows that IgG is intact after internalization and widely distributed in the parasite's tissues (Flores-bautista *et al.*, 2018). In addition, the immune response by the host may be regulated by parasite glycans (Tundup *et al.*, 2012).

There are also several conserved molecular targets able to regulate and switch immune response to a Th2 regulatory response. For example, heat shock proteins (HSP) expressed in *T. solium* and *T. crassiceps* cysticerci (Vargas-Parada *et al.*, 2001), *E. multilocularis* protoscolexes (Martinez *et al.*, 1999), oncosphere of *T. saginata* (Benitez *et al.*, 1998), cercariae of *S. mansoni* (Knudsen *et al.*, 2005). In addition, HSP 70 has been proposed to initiate cercarial host invasion and transformation to schistosomula (Ishida and Jolly, 2016). Proteases related to invasion of *S. japonicum* had been described in cercaria and schistosomula, which loss around 25 proteases after invasion, majority of these proteinases are conserved throughout the genus (Liu *et al.*, 2015). Another interesting molecule to be explored is paramyosin, which has been implicated in inhibition of the complement cascade at C1, by binding C1q (Laclette *et al.*, 1992). Intestinal platyhelminths genome search

and targeting of genes of molecules such as phospholipase C, related to alternative complement pathway evasion (Pearce *et al.*, 1990). *S. mansoni* possess surface binding proteins for complement C2, C3, C8 and C9 and surface Fc to impair complement function (Skelly, 2004). All these processes and molecules are suitable

for functional genomic assays, and other molecules related to invasion and immune response evasion might be available for large scale screenings to find targets suitable for therapy.

9.5. Conclusions

RNAi is a widely used antisense genomic technology, proved to work in several animal models, including flatworms. We know, by genetic and in silico analysis, that the silencing pathways are functional in parasitic platyhelminths, and the use of gene silencing is being spreading in these parasites related research, especially in trematodes. However, given the advances in platyhelminth genetics and the use of suitable laboratory models, gene silencing by RNAi is emerging as an important part in cestodes research in order to make new discoveries and to find or validate susceptible targets for new treatments and vaccines. It is also helping us to unravel basic biological mechanisms to better understand the live cycle and the relationships between parasitic platyhelminths and its hosts.

9.6. References

- Allan, E.R.O., Tennessen, J.A., Bollmann, S.R., Hanington, P.C., Bayne, C.J., Blouin, M.S., 2017. Schistosome infectivity in the snail, *Biomphalaria glabrata*, is partially dependent on the expression of Grctm6, a Guadeloupe Resistance Complex protein. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005362>
- Ambrosio, J., Landa, a, Merchant, M.T., Laclette, J.P., 1994. Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Arch. Med. Res.* 25, 325–330.
- Anandanarayanan, A., Raina, O.K., Lalrinkima, H., Rialch, A., Sankar, M., Varghese, A., 2017. RNA interference in *Fasciola gigantica*: Establishing and optimization of experimental RNAi in the newly excysted juveniles of the fluke. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006109>
- Andrade, L.F. De, Mourão, M.D.M., Geraldo, J.A., Coelho, F.S., Silva, L.L., Neves, R.H., Volpini, A., Machado-Silva, J.R., Araujo, N., Nacif-Pimenta, R., Caffrey, C.R., Oliveira, G., 2014. Regulation of *Schistosoma mansoni* Development and Reproduction by the Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2949. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002949>

Andrea, W., 2015. Landscape analysis: management of neurocysticercosis with an emphasis on low- and middle-income countries 65.

Ayuk, M.A., Suttiaprapa, S., Rinaldi, G., Mann, V.H., Lee, C.M., Brindley, P.J., 2011. *Schistosoma mansoni* U6 gene promoter-driven short hairpin RNA induces RNA interference in human fibrosarcoma cells and schistosomules. *Int. J. Parasitol.* 41, 783–789. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.02.004>

Benitez, L., Harrison, L.J.S., Parkhouse, R.M.E., Garate, T., 1998. Sequence and preliminary characterisation of a *Taenia saginata* oncosphere gene homologue of the small heat-shock protein family. *Parasitol. Res.* 84, 423–425. <https://doi.org/10.1007/s004360050422>

Botros, S., Sayed, H., Amer, N., El-Ghannam, M., Bennett, J.L., Day, T.A., 2005. Current status of sensitivity to praziquantel in a focus of potential drug resistance in Egypt. *Int. J. Parasitol.* 35, 787–791. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.02.005>

Boyle, J.P., Wu, X.J., Shoemaker, C.B., Yoshino, T.P., 2003. Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Mol. Biochem. Parasitol.* 128, 205–215. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00078-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00078-1)

Braasch, D.A., Jensen, S., Liu, Y., Kaur, K., Arar, K., White, M.A., Corey, D.R., 2003. RNA interference in mammalian cells by chemically modified RNA. *Biochemistry* 42, 7967–7975. <https://doi.org/10.1021/bi0343774>

Brehm, K., Koziol, U., 2014. On the importance of targeting parasite stem cells in anti-echinococcosis drug development. *Parasite* 21, 72. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014070>

Brindley, P.J., Pearce, E.J., 2007. Genetic manipulation of schistosomes. *Int. J. Parasitol.* 37, 465–473. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.12.012>

Cai, P., Piao, X., Hou, N., Liu, S., Wang, H., Chen, Q., 2012. Identification and Characterization of Argonauta Protein, Ago2 and Its Associated Small RNAs in *Schistosoma japonicum*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001745>

Campos, A., Cummings, M.P., Reyes, J.L., Lacleite, J.P., 1998. Phylogenetic relationships of platyhelminthes based on 18S ribosomal gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 10, 1–10. <https://doi.org/10.1006/mpev.1997.0483>

- Castellanos-Gonzalez, A., Perry, N., Nava, S., White, A.C., 2016. Preassembled Single-Stranded RNA-Argonata Complexes: A Novel Method to Silence Genes in *Cryptosporidium*. *J. Infect. Dis.* 213, 1307–1314. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv588>
- Cucher, M., Prada, L., Mourglia-Ettlin, G., Dematteis, S., Camicia, F., Asurmendi, S., Rosenzvit, M., 2011. Identification of *Echinococcus granulosus* microRNAs and their expression in different life cycle stages and parasite genotypes. *Int. J. Parasitol.* 41, 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.11.010>
- Dorny, P., Praet, N., Deckers, N., Gabriel, S., 2009. Emerging food-borne parasites. *Vet. Parasitol.* 163, 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.026>
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T., 2001. Duplexes of 21 ± nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494–498. <https://doi.org/10.1038/35078107>
- Escobedo, G., Roberts, C.W., Carrero, J.C., Morales-Montor, J., 2005. Parasite regulation by host hormones: An old mechanism of host exploitation? *Trends Parasitol.* 21, 588–593. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.09.013>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Flores-bautista, J., Navarrete Perea, J., Fragoso, G., Flisser, A., Soberón, X., Laclette, J.P., 2018. Fate of uptaken host proteins in *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. *Biosci. Rep.* 38, 1–10.
- Fontenla, S., Rinaldi, G., Smircich, P., Tort, J.F., 2017. Conservation and diversification of small RNA pathways within flatworms. *BMC Evol. Biol.* 17, 215. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-1061-5>
- Gao, Z., Wang, M., Blair, D., Zheng, Y., Dou, Y., 2014. Phylogenetic analysis of the endoribonuclease Dicer family. *PLoS One* 9, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095350>
- Großhans, H., Filipowicz, W., 2008. Molecular biology The expanding world of small RNAs. *Nature* 451, 414–416. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.01.009>
- Guidi, A., Mansour, N.R., Paveley, R.A., Carruthers, I.M., Besnard, J., Hopkins, A.L., Gilbert, I.H., Bickle, Q.D., 2015. Application of RNAi to Genomic Drug Target Validation in Schistosomes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003801>

- Hagen, J., Scheerlinck, J.P.Y., Young, N.D., Gasser, R.B., Kalinna, B.H., 2015. Prospects for vector-based gene silencing to explore immunobiological features of schistosoma mansoni, *Advances in Parasitology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2015.02.002>
- Hagen, J., Young, N.D., Every, A.L., Pagel, C.N., Schnoeller, C., Scheerlinck, J.P.Y., Gasser, R.B., Kalinna, B.H., 2014. Omega-1 knockdown in Schistosoma mansoni eggs by lentivirus transduction reduces granuloma size in vivo. *Nat. Commun.* 5, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms6375>
- Haley, B., Zamore, P.D., 2004. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 599–606. <https://doi.org/10.1038/nsmb780>
- Han, Z.-G., Brindley, P.J., Wang, S.-Y., Chen, Z., 2009. Schistosoma Genomics: New Perspectives on Schistosome Biology and Host-Parasite Interaction. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 10, 211–240. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082908-150036>
- Hannon, G.J., 2002. RNA interference. *Nature* 418, 244–251. <https://doi.org/10.1038/418244a> [doi]\r418244a [pii]
- He, S., Zhu, L., Liu, F., Liu, Q., Shao, Y., Hua, M., Ding, H., Shao, W., Du, Y., Hou, X., Ren, C., Liu, M., Shen, J., 2018. Functions of the Vasa gene in Schistosoma japonicum as assessed by RNA interference. *Gene* 638, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.09.054>
- Hood, E., 2004. RNAi: What's all the noise about gene silencing? *Environ. Health Perspect.* 112. <https://doi.org/10.1289/ehp.112-a224>
- Hu, D., Song, X., Xie, Y., Zhong, X., Wang, N., Zheng, Y., Gu, X., Wang, T., Peng, X., Yang, G., 2015. Molecular insights into a tetraspanin in the hydatid tapeworm Echinococcus granulosus. *Parasites and Vectors* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0926-y>
- Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I.K., Preiss, T., 2005. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16961–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506482102>
- Ishida, K., Jolly, E.R., 2016. Hsp70 May Be a Molecular Regulator of Schistosome Host Invasion. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004986>

- Jin, X., Lu, L., Su, H., Lou, Z., Wang, F., Zheng, Y., Xu, G.T., 2013. Comparative analysis of known miRNAs across platyhelminths. *FEBS J.* 280, 3944–3951. <https://doi.org/10.1111/febs.12395>
- Knudsen, G.M., Medzihradzky, K.F., Lim, K.-C., Hansell, E., McKerrow, J.H., 2005. Proteomic Analysis of *Schistosoma mansoni* Cercarial Secretions. *Mol. Cell. Proteomics* 4, 1862–1875. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500097-MCP200>
- Koziol, U., 2017. Evolutionary developmental biology (evo-devo) of cestodes. *Exp. Parasitol.* 180, 84–100. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.12.004>
- Krautz-peterson, G., Bhardwaj, R., Faghiri, Z., Cibele, A., Skelly, P.J., 2010. RNA interference in schistosomes: machinery and methodology 137, 485–495. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991168.RNA>
- Krautz-Peterson, G., Skelly, P.J., 2008. *Schistosoma mansoni*: The dicer gene and its expression. *Exp. Parasitol.* 118, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.06.013>
- Laclette, J.P., Shoemaker, C.B., Richter, D., Arcos, L., Pante, N., Cohen, C., Bing, D., Nicholson-Weller, A., 1992. Paramyosin inhibits complement C1. *J. Immunol.* 148, 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2014.06.009>
- Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J., Carthew, R.W., 2004. Distinct Roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA / miRNA Silencing Pathways 117, 69–81.
- Liu, M., Ju, C., Du, X.F., Shen, H.M., Wang, J.P., Li, J., Zhang, X.M., Feng, Z., Hu, W., 2015. Proteomic analysis on cercariae and schistosomula in reference to potential proteases involved in host invasion of *Schistosoma japonicum* larvae. *J. Proteome Res.* 14, 4623–4634. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00465>

- Long, T., Neitz, R.J., Beasley, R., Kalyanaraman, C., Suzuki, B.M., Jacobson, M.P., Dissous, C., McKerrow, J.H., Drewry, D.H., Zuercher, W.J., Singh, R., Caffrey, C.R., 2016. Structure-Bioactivity Relationship for Benzimidazole Thiophene Inhibitors of Polo-Like Kinase 1 (PLK1), a Potential Drug Target in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004356>
- Martinez, J., Perez-Serrano, J., Bodega, G., Casado, N., Rodriguez-Caabeiro, F., 1999. Heat shock proteins HSP70 and HSP60 in *Echinococcus granulosus* protoscolices. *Folia Parasitol. (Praha)*. 46, 76–78.
- McGonigle, L., Mousley, A., Marks, N.J., Brennan, G.P., Dalton, J.P., Spithill, T.W., Day, T.A., Maule, A.G., 2008. The silencing of cysteine proteases in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration. *Int. J. Parasitol.* 38, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.10.007>
- Mcveigh, P., Mccammick, E.M., Mccusker, P., Mophew, R.M., Mousley, A., Abidi, A., Saifullah, K.M., Muthusamy, R., Gopalakrishnan, R., Spithill, T.W., Dalton, J.P., Brophy, P.M., Marks, N.J., Maule, A.G., 2014. RNAi Dynamics in Juvenile *Fasciola* spp . *Liver Flukes Reveals the Persistence of Gene Silencing In Vitro* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003185>
- Mizukami, C., Spiliotis, M., Gottstein, B., Yagi, K., Katakura, K., Oku, Y., 2010. Gene silencing in *Echinococcus multilocularis* protoscoleces using RNA interference. *Parasitol. Int.* 59, 647–652. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.08.010>
- Mocellin, S., Provenzano, M., 2004. RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. *J. Transl. Med.* 2, 39. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-2-39>
- Moguel, B., Mendoza, N.M., Bobes, R.J., Carrero, J.C., Monroy, J.C., Hernández, M.E.D., Estrella, L.H., Laclette, J.P., 2015. Transient transgenesis of the tapeworm *Taenia crassiceps*. *Springerplus*. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1278-y>
- Navarrete-Perea, J., Moguel, B., Mendoza-Hernández, G., Fragosó, G., Sciutto, E., Bobes, R.J., Laclette, J.P., 2014. Identification and quantification of host proteins in the vesicular fluid of porcine *Taenia solium* cysticerci. *Exp. Parasitol.* 143, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.04.011>
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J., Conklin, D.S., 2002. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* 16, 948–958. <https://doi.org/10.1101/gad.981002>

- Pearce, E.J., Hall, B.F., Sher, A., 1990. Host-specific evasion of the alternative complement pathway by schistosomes correlates with the presence of a phospholipase C-sensitive surface molecule resembling human decay accelerating factor. *J. Immunol.* 144, 2751–2756.
- Pierson, L., Mousley, A., Devine, L., Marks, N.J., Day, T.A., Maule, A.G., 2010. RNA interference in a cestode reveals specific silencing of selected highly expressed gene transcripts. *Int. J. Parasitol.* 40, 605–615. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.10.012>
- Pouchkina-stantcheva, N.N., Olson, P.D., Cunningham, L.J., Hrc, G., 2013. RNA-mediated gene suppression and in vitro culture in *Hymenolepis microstoma* 43, 641–646. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.03.004>
- Pushparaj, P.N., Aarthi, J.J., Manikandan, J., Kumar, S.D., 2008. siRNA, miRNA, and shRNA: in vivo Applications. *J Dent Res* 87, 992–1003. <https://doi.org/87/11/992> [pii]
- Rinaldi, G., Okatcha, T.I., Popratiloff, A., Ayuk, M.A., Suttiprapa, S., Mann, V.H., Liang, Y., Lewis, F.A., Loukas, A., Brindley, P.J., 2011. Genetic Manipulation of *Schistosoma haematobium*, the Neglected Schistosome 5, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001348>
- Shabalina, S.A., Koonin, E. V., 2008. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference Svetlana. *Trends Ecol. Evol.* 23, 578–587. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.06.005.Origins>
- Shi, Y., 2003. Mammalian RNAi for the masses. *Trends Genet.* 19, 9–12. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(02\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)00005-7)
- Skelly, P.J., 2004. Intravascular schistosomes and complement. *Trends Parasitol.* 20, 370–374. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.05.007>
- Skelly, P.J., Da'dara, A., Harn, D.A., 2003. Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference. *Int. J. Parasitol.* 33, 363–369. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00030-4](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00030-4)
- Spiliotis, M., Lechner, S., Tappe, D., Scheller, C., Krohne, G., Brehm, K., 2008. Transient transfection of *Echinococcus multilocularis* primary cells and complete in vitro regeneration of metacystode vesicles 38, 1025–1039. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.11.002>

Spiliotis, M., Mizukami, C., Oku, Y., Kiss, F., Brehm, K., Gottstein, B., 2010. Molecular & Biochemical Parasitology *Echinococcus multilocularis* primary cells : Improved isolation , small-scale cultivation and RNA interference &. *Mol. Biochem. Parasitol.* 174, 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.07.001>

Štefanić, S., Dvořák, J., Horn, M., Braschi, S., Sojka, D., Ruelas, D.S., Brian, S., Lim, K.C., Hopkins, S.D., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R., 2010. RNA interference in *Schistosoma mansoni* schistosomula: Selectivity, sensitivity and operation for larger-scale screening. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000850>

Suttiaprapa, S., Rinaldi, G., Tsai, I.J., Mann, V.H., Dubrovsky, L., Yan, H. Bin, Holroyd, N., Huckvale, T., Durrant, C., Protasio, A. V., Pushkarsky, T., Iordanskiy, S., Berriman, M., Bukrinsky, M.I., Brindley, P.J., 2016. HIV-1 Integrates Widely throughout the Genome of the Human Blood Fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog.* 12, 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005931>

Toledo, A., Cruz, C., Fragoso, G., Laclette, J., Merchant, M., Hernandez, M., Sciuotto, E., 1997. In vitro culture of *Taenia crassiceps* larval cells and cyst regeneration after injection into mice. *J Parasitol* 83, 189–193. <https://doi.org/10.2307/3284437>

Tsai, I.J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garcarrubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K.L., Tracey, A., Bobes, R.J., Fragoso, G., Sciuotto, E., Aslett, M., Beasley, H., Bennett, H.M., Cai, J., Camicia, F., Clark, R., Cucher, M., De Silva, N., Day, T.A., Deplazes, P.,

Estrada, K., Fernández, C., Holland, P.W.H., Hou, J., Hu, S., Huckvale, T., Hung, S.S., Kamenetzky, L., Keane, J.A., Kiss, F., Koziol, U., Lambert, O., Liu, K., Luo, X., Luo, Y., Macchiaroli, N., Nichol, S., Paps, J., Parkinson, J., Pouchkina-Stantcheva, N., Riddiford, N., Rosenzvit, M., Salinas, G., Wasmuth, J.D., Zamanian, M., Zheng, Y., *Taenia solium* Genome Consortium, Cai, X., Soberón, X., Olson, P.D., Laclette, J.P., Brehm, K., Berriman, M., 2013. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 496, 57–63. <https://doi.org/10.1038/nature12031>

Tundup, S., Srivastava, L., Harn Jr., D.A., 2012. Polarization of host immune responses by helminth-expressed glycans. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1253, E1–E13. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06618.x>

Unniyampurath, U., Pilankatta, R., Krishnan, M.N., 2016. RNA interference in the age of CRISPR: Will CRISPR interfere with RNAi? *Int. J. Mol. Sci.* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17030291>

Utzinger, J., Becker, S.L., Knopp, S., Blum, J., Neumayr, A.L., Keiser, J., Hatz, C.F., 2012. Neglected tropical diseases: Diagnosis, clinical management, treatment and control. *Swiss Med. Wkly.* 142, 19–22. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13727>

Vargas-Parada, L., Solís, C.F., Lacleste, J.P., 2001. Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (Cestoda). *Parasitology* 122, 583–588. <https://doi.org/10.1017/S0031182001007764>

Vasconcelos, E.J.R., Dasilva, L.F., Pires, D.S., Lavezzo, G.M., Pereira, A.S.A., Amaral, M.S., Verjovski-Almeida, S., 2017. The *Schistosoma mansoni* genome encodes thousands of long non-coding RNAs predicted to be functional at different parasite life-cycle stages. *Sci. Rep.* 7, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10853-6>

Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gascioli, V., Mallory, A.C., Hilbert, J.L., Bartel, D.P., Crété, P., 2004. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of arabidopsis mRNAs. *Mol. Cell* 16, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.09.028>

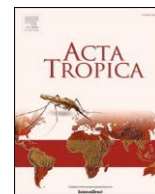
Verjovski-Almeida, S., DeMarco, R., Martins, E. a L., Guimarães, P.E.M., Ojopi, E.P.B., Paquola, A.C.M., Piazza, J.P., Nishiyama, M.Y., Kitajima, J.P., Adamson, R.E.,

Ashton, P.D., Bonaldo, M.F., Coulson, P.S., Dillon, G.P., Farias, L.P., Gregorio, S.P., Ho, P.L., Leite, R. a, Malaquias, L.C.C., Marques, R.C.P., Miyasato, P. a, Nascimento, A.L.T.O., Ohlweiler, F.P., Reis, E.M., Ribeiro, M. a, Sá, R.G., Stukart, G.C., Soares,

M.B., Gargioni, C., Kawano, T., Rodrigues, V., Madeira, A.M.B.N., Wilson, R.A., Menck, C.F.M., Setubal, J.C., Leite, L.C.C., Dias-Neto, E., 2003. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat. Genet.* 35, 148–57. <https://doi.org/10.1038/ng1237>

WHO, 2012. Accelerating Work to Overcome The Global Impact of NTDs executive summary.

- Wilson, R.C., Doudna, J.A., 2013. Molecular Mechanisms of RNA Interference. *Annu. Rev. Biophys.* 42, 217–39. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130404>
- Wu, W., Cai, P., Chen, Q., Wang, H., 2011. Identification of novel antigens within the *Schistosoma japonicum* tetraspanin family based on molecular characterization. *Acta Trop.* 117, 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.01.001>
- Yang, M., Li, J., Wu, J., Wang, H., Guo, B., Wu, C., Shou, X., Yang, N., Zhang, Z., McManus, D.P., Zhang, F., Zhang, W., 2017. Cloning and characterization of an *Echinococcus granulosus* ecdysteroid hormone nuclear receptor HR3-like gene. *Parasite* 24. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017037>
- Young, N.D., Jex, A.R., Li, B., Liu, S., Yang, L., Xiong, Z., Li, Y., Cantacessi, C., Hall, R.S., Xu, X., Chen, F., Wu, X., Zerlotini, A., Oliveira, G., Hofmann, A., Zhang, G., Fang, X., Kang, Y., Campbell, B.E., Loukas, A., Ranganathan, S., Rollinson, D., Rinaldi, G., Brindley, P.J., Yang, H., Wang, J., Wang, J., Gasser, R.B., 2012. Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. *Nat. Genet.* 44, 221–225. <https://doi.org/10.1038/ng.1065>
- Zhang, W., Zhang, Z., Wu, W., Shi, B., Li, J., Zhou, X., Wen, H., McManus, D.P., 2015. Epidemiology and control of echinococcosis in central Asia, with particular reference to the People's Republic of China. *Acta Trop.* 141, 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.03.014>
- Zhao, Z. Rong, Lei, L., Liu, M., Zhu, S. Chun, Ren, C. Ping, Wang, X. Nan, Shen, J. Jia, 2008. *Schistosoma japonicum*: Inhibition of Mago nashi gene expression by shRNA-mediated RNA interference. *Exp. Parasitol.* 119, 379–384. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.03.015>
- Zhu, L., Jiang, H., Sheong, F.K., Cui, X., Wang, Y., Gao, X., Huang, X., 2017. Understanding the core of RNA interference: The dynamic aspects of Argonata-mediated processes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 128, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2016.09.008>
- Ziniel, P.D., Karumudi, B., Barnard, A.H., Fisher, E.M.S., Thatcher, G.R.J., Podust, L.M., Williams, D.L., 2015. The *Schistosoma mansoni* Cytochrome P450 (CYP3050A1) Is Essential for Worm Survival and Egg Development. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.000427>



Identification and functional characterization of the siRNA pathway in *Taenia crassiceps* by silencing Enolase A

Julio Guerrero-Hernández^a, Raúl J. Bobes^a, Martín García-Varela^b, Alejandro Castellanos-Gonzalez^{c,d,**}, Juan P. Lacleste^{a,*}

^a Biomedical Research Institute, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 04510, Coyoacán, Cd. de México, México

^b Biology Institute, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Coyoacán, Cd. de México, México

^c Division of Infectious Diseases, University of Texas Medical Branch, United States

^d Center for Tropical Diseases, University of Texas Medical Branch, United States.

ARTICLE INFO

Keywords:

Taenia crassiceps
Gene silencing
siRNA
Enolase
Dicer and Argonaute
Glycolysis and Krebs cycle

ABSTRACT

A gene silencing procedure on cysticerci of the taeniid cestode *Taenia crassiceps* is described. This is the first time this technique is reported in this species that is widely used as an animal model for human cysticercosis. Genome database searches were performed in order to find out if relevant genes involved in gene silencing and non-coding RNA processing, Argonaute and Dicer (AGO and Dcr) are present in *T. crassiceps*. We found three AGO and two Dcr orthologues that were designed TcAGO1, Tc2 and Tc3, as well as TcDcr1 and TcDcr2. In order to elucidate the evolutionary relationships of *T. crassiceps* TcAGO and TcDcr genes, separate phylogenetic analyses were carried out for each, including AGO and Dcr orthologues of other 20 platyhelminthes. Our findings showed a close phylogenetic relationship of TcAGO and TcDcr with those previously described for *Echinococcus spp.* Our RT-PCR studies demonstrated expression of all TcAGO and TcDcr orthologues. Our results show that the gene silencing machinery in *T. crassiceps* is functionally active by inducing silencing of TcEnoA (~90%). These results clearly show that gene silencing using siRNAs can be used as a molecular methodology to study gene function in taeniid cestodes.

1. Introduction

The larval stage of the tapeworm *Taenia solium*, the causative agent of human and porcine taeniasis/cysticercosis, is still prevalent in developing countries (Sciutto et al., 2000). The disease is included in a group of human parasite diseases related to poverty, known as neglected tropical diseases. Taeniasis/cysticercosis by *T. solium* is prevalent in sub-Saharan Africa, South-East Asia and several countries in the Americas (Uttinger et al., 2012; WHO, 2015). Due to migration processes, this parasite disease is also affecting developed countries (Wallin and Kurtzke, 2004; Sorvillo et al., 2011; Del Brutto and García, 2012; Yanagida, et al., 2012; Zammarchi et al., 2013; Bobes et al., 2014); in the USA, around 5000 new cases of human cysticercosis occur every year, including native and imported (Serpa & White, 2012). Although cysticerci may establish in several organs of humans after ingestion of contaminated food (eyes, skeletal muscle, heart, subcutaneous tissue), larvae lodged in the central nervous system generates neurocysticercosis

(NC) which is of outmost interest because it is a highly debilitating disease (Bobes et al., 2014). NC is the most common parasite infection of the central nervous system and is associated with an important decrease of life quality of patients (Sciutto et al., 2000; Dorny et al., 2009; Uttinger et al., 2012; WHO, 2015). Despite the importance of this illness, the choice of drugs to treat cysticercosis and neurocysticercosis is limited (Palomares-Alonso et al., 2020).

Taenia crassiceps is other cestode parasite that is closely related to *T. solium*, showing the ability to bud, allowing multiplication of the cysts in the peritoneal cavity of mice (Freeman, 1962). This ability facilitates its maintenance under laboratory conditions through simple intraperitoneal passage of cysts from an infected to a recipient mouse. Currently, several strains of *T. crassiceps* are maintained in different laboratories: KBS, ORF, WFU and HYG, although ORF has been the most widely used because its quicker reproductive rate in the peritoneal cavity of mice (Dorais and Esch, 1969; Everhart et al., 2004, Fragoso et al., 2008; Willms and Zurabian 2010). *T. crassiceps* has been used in numerous

* Corresponding author at: Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Coyoacán, Cd. de México, México.

** Corresponding author at: Division of Infectious Diseases, University of Texas Medical Branch, 301 University, Galveston, TX, 77555-0435, USA.

E-mail addresses: alcastel@utmb.edu (A. Castellanos-Gonzalez), lacleste@iibiomedicas.unam.mx (J.P. Lacleste).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106197>

Received 7 April 2021; Received in revised form 1 September 2021; Accepted 13 October 2021

Available online 21 October 2021

0001-706X/© 2021 The Author(s).

Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

studies related the host-parasite relationship in cysticercosis: sex and genetic influence on susceptibility to infection (Sciutto et al., 1991), vaccine development (Toledo et al., 2001), influence of the parasite on the hormonal status of the infected host (Morales-Montor et al., 2008), development of practical methods for transfection of exogenous genes (Moguel et al., 2015), among many others.

Development of molecular approaches to study gene function could accelerate identification of targets for new drug treatments and vaccine production (Jeon and Eom, 2013; Kumar et al., 2020). Gene silencing by siRNA is a powerful tool that has been widely used to identify drug targets in pathogens. The gene silencing by siRNA is carried out by the "RNA induced silencing complex" (RISC) (Wilson and Doudna, 2013). This protein complex is formed by the endonuclease (Dcr), the strand-RNA binding protein (dsRBP) and the slicer enzyme argonaute (AGO). *In vivo*, gene silencing is activated in the cytoplasm when the Dcr binds to siRNA. After sense strand is removed, AGO uses the antisense strand as a guide to search for target mRNA, thus protein translation is blocked when target is bound to Ago and then degraded by its slicer activity.

Phylogenetic studies of Dcr have revealed that invertebrates possess two genes (Dcr1 and Dcr2) (Gao et al., 2014). It is possible that these two variants have different functions, catalyzing miRNA mediated interference and dsRNA interference, respectively (Lee et al., 2004). A growing number of investigations have demonstrated the use of siRNAs for the endogenous interference of gene expression in trematodes as in schistosomes (Verjovski-Almeida et al., 2003; Krautz-Peterson & Skelly, 2008; Krautz-Peterson, et al., 2010, Hagen et al., 2015), including characterization of the molecular machinery for siRNA processing.

We have recently reported the existence of four genes for the glycolytic enzyme enolase in *T. solium* and *T. crassiceps*: EnoA, EnoB, EnoC and Eno4 (Ayoñ-Núñez et al., 2018); Eno4 has not a role in the glycolytic pathway. Enolase is a glycolytic enzyme that catalyzes conversion of 2-phospho-D-glycerate to phosphoenolpyruvate (Pancholi, 2001). Recently, enolase has been included in a group of proteins that bind human plasminogen (Pancholi, 2001), suggesting that it could carry out additional functions in the context of host-pathogen relationships. Furthermore, this protein has been identified as an excretion-secretion protein in proteomic studies on *T. solium* metacercariae (Bjorn et al., 2012). It has also been proposed that enolase could be involved in the migration and establishment of early infective forms of *T. solium* in the tissues or organs of their hosts (Ayoñ et al., 2018).

In cestodes, siRNA gene silencing has been proven for *Echinococcus multilocularis*, *Hymenolepis* and *Moniezia* (Spiliotis et al., 2008, Mizukami et al., 2010 Pierson et al., 2010, Pouchkina-Stantcheva et al., 2013). However, characterization of siRNA processing could prove useful to evaluate if enolase genes could become target candidates for drug development, as reported for other protozoan and helminth parasites (Chandra et al., 2010; Avilañ et al., 2011; Boukli et al., 2011; El Ridi and Tallima, 2013). Our silencing of EnoA in *T. crassiceps* and the characterization of the siRNA-processing pathway in taeniid cestodes, is a first step in this direction referred to *T. solium* cysticercosis. We also studied concomitant effects on expression of glycolytic and Krebs cycle enzymes after TcEnoA silencing. Our results clearly show that gene silencing using siRNAs can be used as a molecular methodology to study gene function in taeniid cestodes.

2. Materials and methods

2.1. *Taenia crassiceps* cysticerci

Experiments were carried out using the ORF strain of *T. crassiceps* cysticerci. Cysticerci were maintained by intraperitoneal passage of cysts from infected to naïve BALB/cAnN, 8 weeks old female mice as described before (Sciutto et al., 2011). After about eight weeks of infection, cysticerci were collected from the peritoneal cavity of mice after humanitarian sacrifice and washed several times with sterile

phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS) before *in vitro* culture. Cysts were maintained *in vitro* in 24 well plates using RPMI (Gibco) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco) and 1 µg/mL of penicillin/streptomycin at 37°C, under 5% CO₂ until use (Vázquez-Talavera et al., 2001). All procedures involving mice were carried out in accordance to the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals (CICUAL permit No. ID199).

2.2. Genomic and phylogenetic analysis of AGO2 and Dcr2

We conducted a bioinformatic analysis to identify key elements of siRNA pathway. Ago1, 2 and 3 and Dcr1 and 2 sequences of *Taenia crassiceps* were identified through Blastn searches from our *T. crassiceps* genome database (unpublished data). AGO2 and Dcr2 are the most active genes among family of Argonaut and Dicer genes described for the silencing mediated by siRNA (Lee et al., 2004), therefore in this work we conducted the phylogenetic analysis of *T. crassiceps*, only for these 2 genes. Other AGO2 and Dcr2 sequences from a variety of organisms were downloaded from GenBank and WormBase Parasite datasets (<https://parasite.wormbase.org/index.html>). Accession numbers for all sequences included in the phylogenetic analysis are provided in Supplementary Table 1; sequences used in phylogenetic analysis for AGO2 and Dcr2 are provided in Supplementary Files 1 and 2, respectively. All AGO2 and Dcr2 sequences were aligned using the software SeaView v.4 (Gouy et al., 2010) and adjusted with the Mesquite program (Maddison & Maddison, 2011). The AGO2 alignment included the *T. crassiceps* sequence plus 23 AGO2 sequences of other species. The Dcr2 sequence of *T. crassiceps* was aligned with 14 other from different helminths, including other sequences of invertebrates and vertebrates that were used as outgroup (see Supplementary Table 1). The phylogenetic analyses were performed using maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) methods. The ML analysis was carried out with RAxML version 7.0.4 (Silvestro & Michalak, 2011), and Bayesian inference (BI) analyses were inferred with MrBayes version 3.2.7 (Ronquist et al., 2012) using the online interface Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research (CIPRES) Science Gateway v3.3 (Miller et al., 2010). The best model was estimated with the Akaike information criterion (AIC) using the jModel Test version 0.1.1 program (Posada, 2008). The best model for both datasets was transversion model (TVM), + Gamma distribution (G) + proportion of invariable sites (I) (TVM + I + G). ML analyses were inferred with models previously estimated for each molecular marker. To support each node, 10,000 bootstrap replicates were run. The BI analyses included Markov Chain Monte Carlo (MCMC) searches of two simultaneous runs for 10 million generations, with sampling every 1,000 generations, a heating parameter value of 0.2 and a "burn-in" of 25%. Trees were drawn using FigTree program v.1.3.1 (Rambaut, 2012).

2.3. Detection of AGO1, 2, 3 and Dcr1 and 2 by RT-PCR assays

We designed oligonucleotides for AGO1, 2 and 3 and Dcr1 and 2 sequences, obtained from our *T. crassiceps* genome database, using "Oligo design tool" PrimerQest (Integrated DNA Technologies, IDT). All oligo sequences are presented in Supplementary Table 1. *T. crassiceps* RNA was extracted from cysticerci by the phenol-chloroform protocol using Trizol reagent (Invitrogen) following vendor instructions, and then purified RNA was quantified by spectrophotometry (NanoDrop 2000 spectrophotometer, Thermo-Scientific). Detection of AGO1,2,3 Dcr1 and 2 transcripts was carried out by end-point RT-PCR, using 500 ng of total RNA as template for cDNA synthesis with the SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Life Technologies) kit and HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen), and a T100 Thermal cycler, BioRad, for the PCR reaction.

End-point PCR were run under the following conditions: 50°C for 15 minutes, 95°C for 5 minutes, and 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 65°C for 1 minute. PCR products were visualized by UV transillumination of 1% agarose gels after electrophoresis. PCR amplification

of actin gene was used as a reference

2.4. siRNA design for silencing *Taenia crassiceps* EnoA

For siRNA design we used nucleotide sequences of *T. solium* EnoA, the sequences were obtained from GeneBank (Ayoñ-Nun˜ez et al., 2018); orthologue sequences were obtained from our *T. crassiceps* gene database. Similarity between both taeniid species was higher than 98% (unpublished data). We designed two double stranded siRNAs primers (EnoA-1 and EnoA-2), for silencing *T. crassiceps* EnoA gene using BLOCK-iT™RNAi Designer software (Thermo-Fisher). Other siRNAs were discarded if they had low binding probability or accessibility hindrance to the target sequence due to secondary structure. To confirm binding probability and accessibility of siRNA to the mRNA, we conducted analysis with RNAfold web server. Another unrelated siRNA target, the *T. crassiceps* KE7 protein gene was used as negative control. KE7 is a 264 amino acid protein containing one of the peptide sequences (KETc7) that conform the S3Pvac anti-cysticercosis vaccine (Bobes et al., 2017). Function of the complete protein is under investigation. As expected, no effect on glycolysis were detected using the siRNA directed to KE7. RT-PCR amplification using primers for *T. crassiceps* actin gene was also used as comparison to determine expression level. Selected siRNA duplex sequences are listed in Table 1, including nucleotide positions of annealing on EnoA sequence.

2.5. Electroporation of cysticerci

Groups of 12 *T. crassiceps* cysticerci were collected and maintained *in vitro* in 24 well dishes as described above. For electroporation experiments we followed the protocol used for *Moniezia* described before (Pierson et al., 2010). Cysticerci (approximately 5 mm in diameter) were pre-soaked either with EnoA-1 or EnoA-2 siRNAs at concentrations ranging from 45 μmoles each siRNA in 2ml of washing buffer (RPMI medium with HEPES 10 mM and 1 μg/ml of penicillin/streptomycin) prepared as described elsewhere (Correnti et al., 2007). These cysticerci were maintained for 2 h at 37° C and 5% CO₂ in air. For reference, intake of a fluorescent double stranded unrelated RNA, was evaluated under a fluorescence inverted microscope (Olympus IX71) with a FITC filter (not shown). Cysts were transferred to 2 mm gap electroporation cuvettes (Sigma-Aldrich) and electroporated at room temperature with a BTX 600 electro cell manipulator using 125 volts square wave for 20 milliseconds; afterwards, cysts were left recovering for 1h. Parasites were washed with PBS and cultured in RPMI, 10% FBS and 1 μg/ml penicillin-streptomycin at 37° C and 5% CO₂ in air. Cysticerci were collected at 0, 3, 12 and 24 hours after electroporation, washed in PBS and stored until use at -20 ° C.

2.6. Evaluation of *TcEnoA* silencing by RT-PCR

After electroporation, cysticerci RNA was extracted as described below. Efficiency of the two designed siRNA (Eno-1 or Eno-2) was evaluated by end point RT-PCR with the conditions described above at 32 cycles. Densitometric semi-quantification from agarose gels were carried out using the ImageJ image analyzer. Optimal results were obtained with 30 μmol of siRNA EnoA-2, thus subsequent silencing experiments and qRT-PCR assays were carried out only with of siRNA

EnoA-2. To evaluate silencing efficiency, mRNA target from treated and untreated parasites was analyzed by qRT-PCR, for these assays we used 100 ng of total RNA as template, using the qScript One-Step SYBR Green RT-qPCR kit (QuantaBio), reaction was analyzed with the AB7500 Fast RT-PCR System (Life Technologies). The conditions for qRT-PCR reaction were: 50°C for 15 minutes, 95°C for 5 minutes, and 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 65°C for 1 minute. Relative fold change of gene expression was evaluated by the delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) method. Gene expression was evaluated in 2 independent experiments using PCR duplicates, actin 1 gene was amplified and used as a reference gene. For some experiments, cysticerci were electroporated with transfection media or unrelated siRNAs control.

2.7. Gene expression analysis of other metabolic enzymes by RT-PCR Evaluation of *TcEnoA* silencing by RT-PCR

We evaluated gene expression of metabolic enzymes after *TcEnoA* silencing. For these experiments, first we searched in our *T. crassiceps* database for gene sequences corresponding to enzymes of the glycolytic and Krebs cycle pathways. Selected glycolytic enzymes were: Enolase A (EnoA), Hexokinase (HK), glucose-6-phosphate (GPI), phosphofructokinase (PFK), Aldolase (Aldo), triosephosphate isomerase (TPI), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), phosphoglycerate kinase (PGK), phosphoglycerate mutase (PGM), pyruvate kinase (PYRK) and pyruvate dehydrogenase (PDH). Selected Krebs cycle enzymes were: Citrate synthase (CS), Alpha-ketoglutarate dehydrogenase (AKGDH), Fumarase (FM), and Succinic dehydrogenase (SDH). We confirmed expression of selected genes by end point RT-PCR assays using the conditions described above. Oligonucleotides were designed with the oligo-design tool PrimerQest as described before (primer sequences are listed in Supplementary Table 2). To evaluate effect of silencing in metabolic pathways, we compared gene expression of parasites treated (at 3 h) with EnoA siRNA using the actin 1 gene, also amplified by qRT-PCR as a reference. The qRT-PCR data are presented as fold change using CT values of sample vs reference gene. Expression panel (heat-map) is a representative pattern observed in two independent biological experiments.

3. Results

3.1. The siRNA machinery is expressed in *Taenia crassiceps*

To determine if AGO2 and Dcr2 are expressed in *T. crassiceps* cysticerci, oligonucleotides were designed to do RT-PCR assays on total RNA isolated from *T. crassiceps* cysticerci. RT-PCR demonstrated expression of AGO and Dcr genes (Fig. 1). RT-PCR fragments sequenced confirmed the expression of these genes.

3.2. AGO and Dcr were identified in *Taenia crassiceps*

TcAgo2 and TcDcr2 are closely related to orthologues of other cestode species.

In order to identify the presence of AGO and Dcr genes, we screened the *T. crassiceps* genome database for both genes. We identified three AGO genes [AGO1(2961 bp; 987 aa), AGO2 (1659 bp; 553 aa), AGO3 (2880 bp; 960 aa)] and two Dcr [Dcr1 (5658 bp; 1886 aa), Dcr2 (2469

Table 1

Selected siRNA duplexes designed for silencing *T. crassiceps* enolase A and actin. Also included are the nucleotide positions of annealing for each gene coding sequence. Duplex sequences were obtained using the BLOCK-iT™RNAi Designer software design tool.

siRNA	Duplex sequence	Accession No.	Sequence position
siRNA EnoA-1	5' AGAACGUCAAUGAAGUCAUUGCUCC 3' GGAGCAAUGACUUCACGUUCUUG	TsM_000595600	200-224
siRNA EnoA-2	5' CCACUGUUGAGGUUGAUCUAACCAC 3' GUGGUUAGAUAACCUCAACAGUGGGA	TsM_000595600	53-77

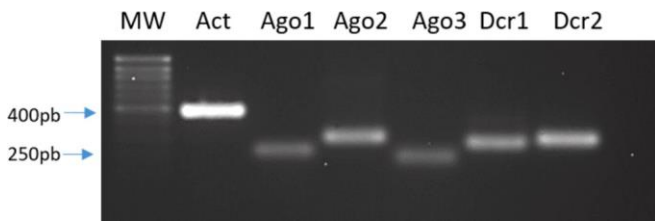


Fig. 1. Expression of Argonaute and Dicer isoforms in *T. crassiceps* cysticerci. Expression analysis of AGO and Dcr isoforms in the tissues of *T. crassiceps* cysts was carried out by end point RT-PCR as described previously. PCR products were run in 1% agarose gels.

bp; 823 aa)] (Supplementary file 1 and 2). AGO2 and Dcr2 are the most active of Argonaute and Dicer genes in gene silencing mediated by siRNA (Lee et al., 2004). The Ago2 dataset included 2,547 characters, and the best evolution model obtained was TVM + I + G. The alignment included 18 sequences representing diverse taxa from the phylum Platyhelminthes; three species of ecdysozoa, plus three taxa of vertebrates that were used as outgroup. The phylogenetic tree inferred with the ML and BI methods suggested that the species of the phylum Platyhelminthes, including *T. crassiceps*, form a monophyletic assemblage

with strong bootstrap support (93%) and a high Bayesian posterior probability (1.0). The phylogenetic trees showed that the species *T. crassiceps* is sister to *T. asiatica* and *T. solium* (Fig. 2A). The Dcr2 dataset included 2, 962 characters with 15 terminals and the best-selected model was TVM + I + G. The alignment included 13 sequences representing diverse taxa from the phylum Platyhelminthes, plus two species of ecdysozoa that were used as outgroup. The phylogenetic tree inferred with the ML and BI methods also supported the monophyly of the phylum Platyhelminthes, with strong bootstrap support (100%) and a high Bayesian posterior probability (0.9). The phylogenies inferred for Dcr2 consistently placed *T. crassiceps* as sister taxon of *T. solium* (Fig. 2B). The accession numbers of the sequences included in the analysis are shown in Supplementary Table 1. In summary, the phylogenetic trees clearly showed that *T. crassiceps* TcAGO2 and TcDcr2 are closely related to orthologues AGO2 (Fig. 2A) and Dcr2 (Fig. 2B) genes in other cestode species. Our results demonstrated for the first time the presence of these two essential components of the siRNA machinery in *T. crassiceps*, suggesting that gene silencing might be feasible, because this parasite is capable of mRNA post-transcriptional regulation by small non-coding RNA.

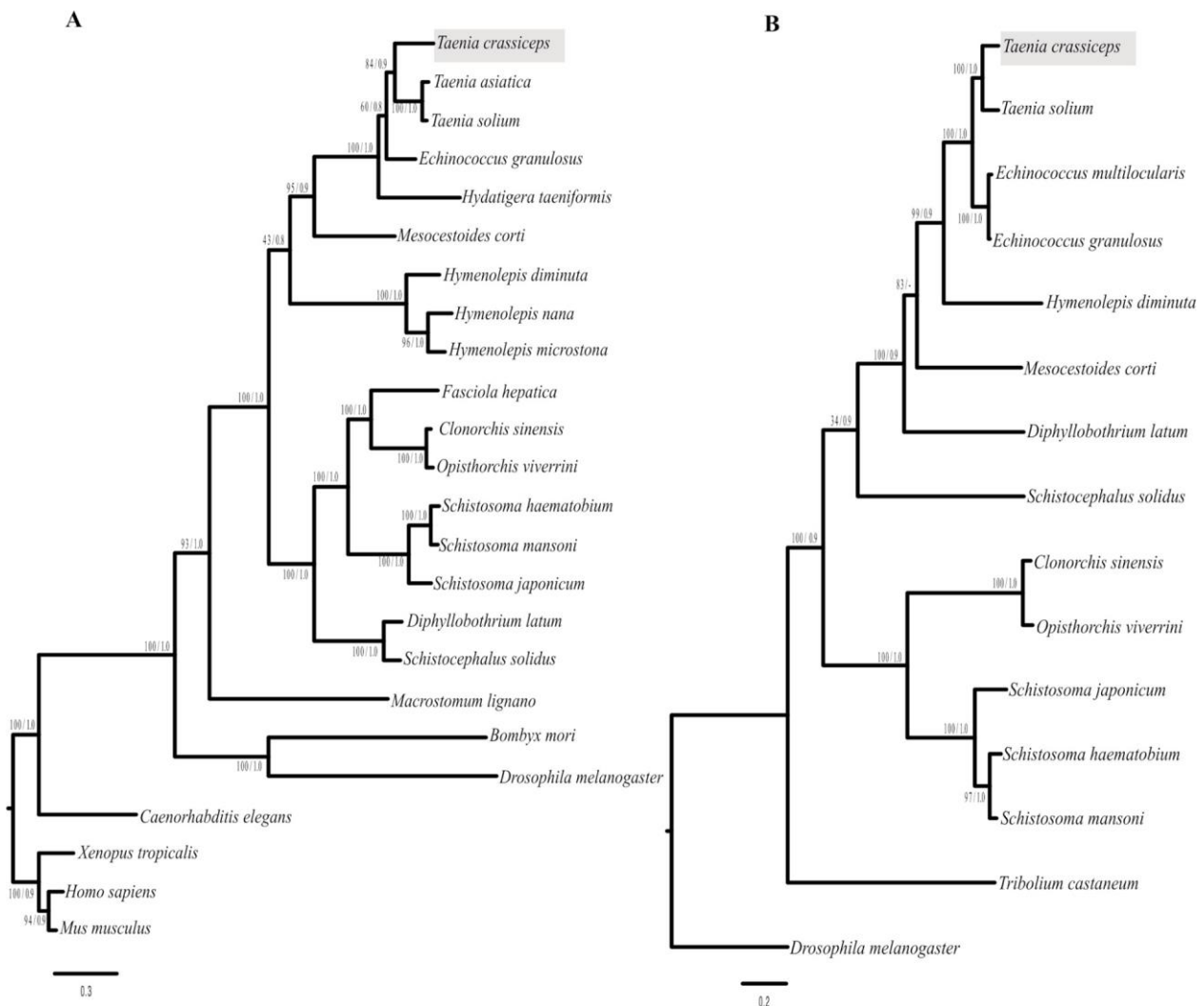


Fig. 2. Maximum likelihood tree and consensus Bayesian Inference tree inferred from the Argonaute 2 data set (A) and Dicer 2 data set (B). Numbers near internal nodes show ML bootstrap clade frequencies and posterior probabilities (BI). All sequences were obtained from GeneBank and Wormbase Parasite databases. Accession numbers of AGO and Dcr genes used in these analyses are included in Supp Table 1; AGO2 and Dcr2 DNA sequences are included in Supplementary Files 1 and 2, respectively.

3.3. *Taenia crassiceps* Enolase A is silenced by siRNA

We decided to attempt gene expression silencing of TcEnoA due to the special interest of our group in the study of the function of this metabolic protein in the maintenance of the host-parasite relationship. We first performed a thorough search of the *T. crassiceps* genome in order to find the genes of the four enolase isoforms (EnoA, EnoB, EnoC and Eno4) recently described for *T. solium* (Ayon-Nun˜ez, et al., 2018). We identified the presence of all enolase isoform genes in the *T. crassiceps* genome. Later we designed oligonucleotides for the evaluation of the relative gene expression of the same genes in *T. crassiceps*. Silenced cysts were compared to non-silenced counterparts. EnoA-2 siRNA demonstrated that EnoA-2 siRNA at cycle 28 was the most proficient of the evaluated siRNAs (Fig. 3A), these results were confirmed with densitometric semi quantification of TcEnoA gene expression (Fig. 3B) using total RNA of silenced cysticerci with EnoA-1. Subsequent experiments were performed with EnoA-2 siRNA. Follow-up of the silencing effect of incubation with siRNA (EnoA-2) was measured at different times (0, 3, 12 and 24 h) by means of qRT-PCR. We calculated the of TcEnoA expression relative to the expression of *T. crassiceps* Actin1. Significant gene silencing was observed since 3 h after electroporation (about 40%), reaching a maximum at 24 h. The decrease in the level of expression of TcEnoA reached up to 90% at 24 h; however, there was no statistical difference between 12 h and 24 h groups (Fig. 4). These results demonstrated the feasibility of gene silencing in *T. crassiceps* as well as the activity of the siRNA pathway in this tapeworm. Subsequent experiments were carried out at 3 h after electroporation.

3.4. *TcAGO* and *TcDcr* genes are highly expressed in *Taenia crassiceps*

Expression levels of TcAGO 1, 2 and 3, and TcDcr 1 and 2 were analyzed at 0 and 3 hours using as reference actin gene, a structural gene highly expressed in this parasite. Our results showed that all tested genes had expression levels superior to actin ranging from 3-5-fold times (Supplementary Fig. 1). High expression levels suggest these enzymes process double strand RNA. In order to find out if expression were

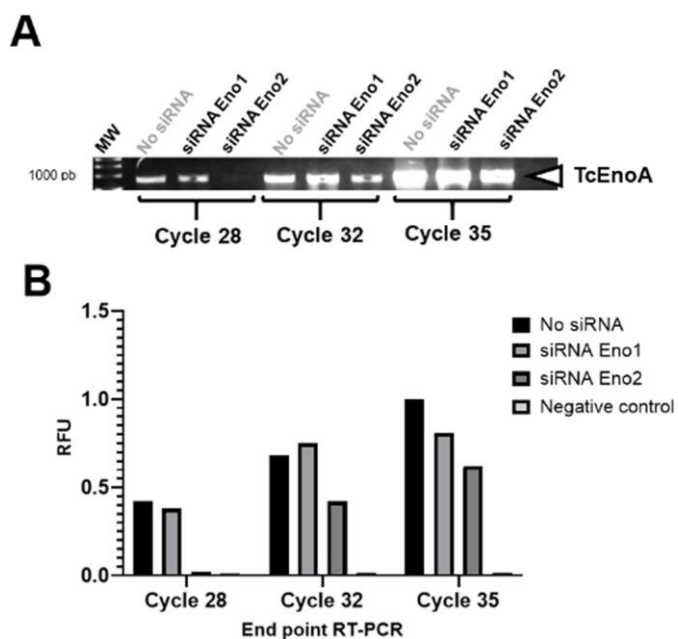


Fig. 3. Silencing of TcEnoA with EnoA-1 and EnoA-2 siRNA. **A)** Agarose gel of end-point RT-PCR products evaluated at cycles 28, 32 and 35. **B)** Densitometric analysis of RT-PCR products quantified as relative intensity units using ImageJ analyzer.

Enolase A silencing

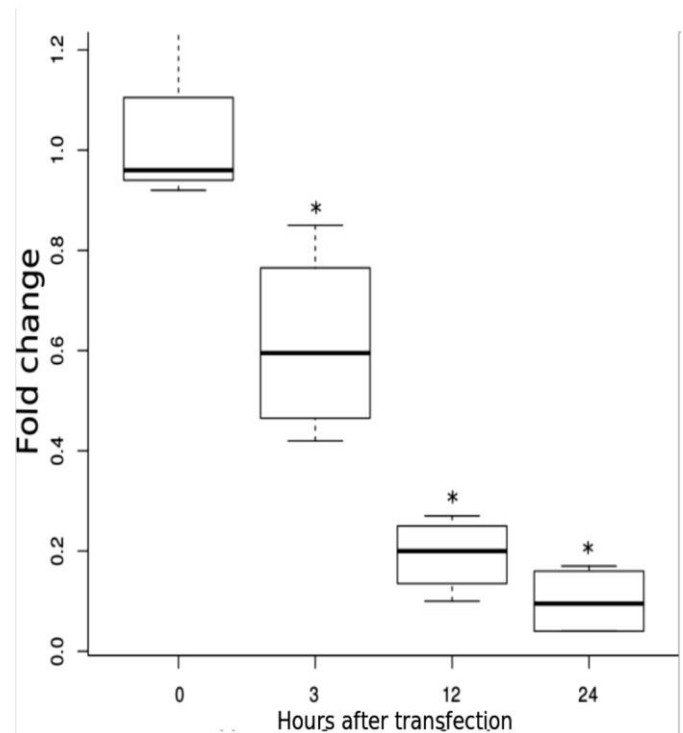


Fig. 4. Silencing of TcEnoA expression in *T. crassiceps* cysticerci. Silencing of TcEnoA was carried out using total RNA from *T. crassiceps* cysticerci extracted 0 hr, 3 hr, 12 h and 24 h after electroporation of EnoA siRNA. A qRT-PCR was performed and the results analyzed by $\Delta\Delta CT$ method. For statistical analysis we performed one-way ANOVA and Tukey post-hoc test using Jupyter notebook and R statistics version 3.6.2. We found statistically significant differences between control and 3hr experiments (*) ($p = 0.0044$), control and 12 h experiments ($p = 0.0000066$), and control and 24 h ($p = 0.0000022$) experiments. On the other hand, there was no statistical difference (a) between 12 h and 24 h experiments ($p = 0.7579$).

induced, we compared basal expression before treatment (0 h) and after treatment (3 h). We did not detect up regulation of Ago and Dcr genes in response to the treatment (Supplementary Fig. 1), which may suggest that basal expression for these genes is sufficient to handle EnoA 1 siRNA added at standard concentrations (45 μ M).

3.5. *Taenia crassiceps* TcEnoA silencing induce changes in expression of glycolytic enzymes

In order to determine if TcEnoA silencing influenced or affected expression of other glycolytic enzymes, twelve enzymes that participate in the pathway were searched in the *T. crassiceps* gene database. We design corresponding oligonucleotides to evaluate their expression in non-silenced and silenced TcEnoA. RT-PCR was initially carried out for all genes in non-silenced cysts to determine their basal expression (Supplementary Fig. 2). Afterwards, to determine level of expression of all glycolytic enzymes we performed qRT-PCR in cysts after 3hrs of silencing. Our results demonstrated that enzymes downstream TcEnoA were slightly over-expressed (with the exception of pyruvate kinase 2 ~10% and 5 ~ 60% down expressed). In contrast, upstream enzymes were under-expressed, except for phosphoglycerate kinase (Fig. 5).

3.6 *Taenia. crassiceps* TcEnoA silencing affects the expression of the Krebs cycle enzymes

The Krebs cycle (tricarboxylic acids cycle) is an important destination of oxidative products from the glycolytic pathway. It is conceivable

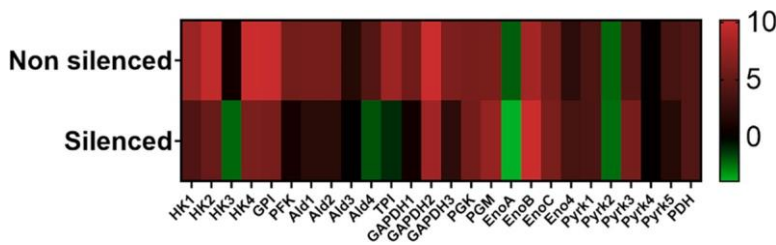


Fig. 5. Heat map. Expression of glycolytic enzymes in *T. crassiceps* cysticerci after TcEnoA silencing. After TcEnoA silencing, the fold change of expression of all glycolytic enzymes was analyzed by qRT-PCR using total RNA extracted from *T. crassiceps* silenced cysts, and pairs of specific oligonucleotide primers for each enzyme. Heat map obtained with Prisma graph pad software shows expression levels after 3 h in non-silenced and silenced TcEnoA cysticerci. levels after 3 h in non-silenced and silenced TcEnoA cysticerci.

that silencing of TcEnoA could have repercussion on the expression of the enzymes of the Krebs cycle. Therefore, four enzymes (Citrate synthase, Alpha-ketoglutarate dehydrogenase, Fumarase, Succinic dehydrogenase) of the tricarboxylic cycle were searched for in the *T. crassiceps* gene database, in order to design oligonucleotides to evaluate their expression after silencing of TcEnoA, in untreated and silenced cysticerci. RT-PCR was initially carried out for all six genes in untreated cysts to determine their basal expression (Supplementary Fig. 3). Our results demonstrated that contrary to the effect on glycolytic enzymes, expression levels for these four Krebs cycle enzymes resulted less affected after TcEnoA silencing; alfa-ketoglutarate dehydrogenase 3 was found clearly over expressed, whereas citrate synthase was down regulated (Fig. 6).

4. Discussion

In this work we identified and demonstrated the functionality of TcAGO2 and TcDcr2 by inducing silencing of TcEnoA gene in *T. crassiceps*. Gene silencing using siRNAs is a molecular methodology that has been widely used to study gene function in several organisms. After siRNA enters the cells, gene silencing is triggered by the RISC complex. AGO and Dcr are key components of RISC and have been demonstrated that are essential to block gene expression (Rivas, et al 2005). However, RISC components including AGO and Dcr are absent or not functional in several parasites (Castellanos-Gonzalez, 2020). Therefore, our first goal here, was to determine if AGO and Dcr were expressed in *T. crassiceps*. Using primers designed from conserved regions of AGO1, 2, 3, Dcr1 and 2, we amplified the corresponding RT-PCR fragments. After sequencing DNA, we conducted a blast analysis that confirmed expression of AGO and Dcr genes in *T. crassiceps*. Our phylogenetic analysis showed clearly that TcAGO and TcDcr sequences belong to AGO and Dcr families. As expected, the most closely related to *T. crassiceps* AGO2 and Dcr2 genes corresponded to *T. asiatica* and *T. solium*, respectively. The high similarity to orthologous genes and

RT-PCR transcripts suggested that the siRNA machinery is expressed and fully active to process siRNA in *T. crassiceps*. Here we report a successful method to silence genes in parasites of the genus *Taenia*. To validate our methodology and as a proof of concept, we silenced TcEnoA, an important glycolytic enzyme of this parasite which have been recently characterized (Ayo'n-Nún~ez et al., 2018). We demonstrated that Eno2 siRNA induce significant silencing (~40%) as soon as in 3 hours, while ~90% reduction in TcEnoA expression was achieved 24 h after transfection. Viability evaluated by parasite's motility was not affected after silencing (Data not shown). Reduction in expression is therefore due to the addition of specific siRNA. Silencing levels of TcEnoA (40-90%) agrees with levels observed in other tapeworms as *Hymenolepis microstoma*, for the suppression of a Hox transcript up to 80% (Pouchkina-Stantcheva et al. in 2013).

Previous studies have reported increases in the expression of AGO2, AGO3 and Dcr2 in *Drosophila* (Lee et al., 2004) and other insects (Garbutt and Reynolds, 2012), in response to siRNA transfection, leading to the conclusion that these genes are key components in siRNA mediated gene silencing. In contrast, AGO1 and Dcr1 appear to be implicated in miRNA processing (Garbutt and Reynolds 2012; Fontenla et al., 2017). Therefore, in order to determine expression levels, we evaluated expression of TcAGOs and TcDcrs in comparison with the expression level of actin. We confirmed these genes are well expressed (Supplementary Fig. 1), however concentrations of siRNA that we used to effectively silence TcEnoA did not induce up regulation of these genes (Supplementary Fig. 1) which may suggest that these genes are continuously expressed in this parasite to handle endogenous siRNA and miRNA. Our silencing experiments indicate that the siRNA pathway is active in this tapeworm parasite and since transcriptomic data of *T. crassiceps* and *T. solium* is available, we anticipate that our silencing methodology will be applicable to study other genes in these parasites. However as shown in our initial silencing experiments, there are differences in silencing efficiency using different siRNAs (Eno 1 >90% vs Eno 2 > 20%). Silencing may require to be optimized, after testing several siRNA for other regions of the gene.

Previous reports pointed out that AGO2 and Dcr2 are the main effectors of silencing pathway (Gao, et al., 2014), however here we detected other key components as AGO1, AGO3 and Dcr 1, therefore the participation of these other elements on siRNA processing remains to be shown. These results provide additional evidence to the information collected in other parasitic platyhelminths, showing the ability of cestodes to process non coding RNA, even though they lack important proteins such as PIWI (Fontenla et al., 2017; Tsai et al., 2013; Zheng, 2013), which is a crucial component of germ line protection against transposable elements (TE) in *Drosophila*, free living planarians and vertebrates (Kuramochi-Miyagawa et al., 2010; Liang et al., 1994; Sheth et al., 2010). The occurrence of AGO3, a unique flatworm feature, and the existence of three PL10 genes in *T. crassiceps* (unpublished data) may be an adaptation to the absence of PIWI, and the processing of transposable elements in germinal cells of taeniids (Skinner et al., 2015).

Recent RNAseq allowed identification of Dicer and AGO orthologue genes in the *T. crassiceps* genome (unpublished data). These finding suggests that the parasite could involve other genes of the same family in the silencing process. Here we show that at least Dcr and AGO genes are functionally active. Future studies should be carried out to confirm the

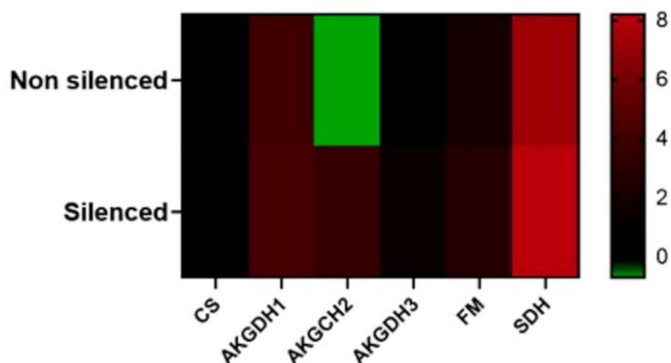


Fig. 6. Heat map. Expression of Krebs cycle enzymes in *T. crassiceps* cysticerci after TcEnoA silencing. After TcEnoA silencing, the fold change of expression of all Krebs cycle enzymes was analyzed by qRT-PCR using total RNA extracted from *T. crassiceps* silenced cysts, and pairs of specific oligonucleotide primers for each enzyme. Heat map obtained with Prisma graph pad software shows expression levels after 3 h in non-silenced and silenced TcEnoA cysticerci.

participation of each of them in the gene silencing functional process.

Enolase family includes TcEnoA, TcEnoB and TcEnoC; we hypothesized that silencing TcEnoA would modulate expression of other Eno genes. We evaluated expression of TcEnoB and C by inducing moderate silencing at 3 h to reduce stress and warrant parasite viability. After TcEnoA silencing, an increase in the expression of TcEnoB, TcEnoC expression was found, suggesting a compensatory mechanism. Other recent report on *Toxoplasma gondii*, an intracellular protozoal parasite in humans possessing two enolase variants, coincide showing that Eno2 silencing resulted in a slight increase in the expression of Eno1 (Holmes et al., 2010), evidencing an exquisite homeostasis between enolase variants after silencing. Unlike previous studies in *Clonorchis sinensis* and *Ascaris suum*, in which efficient silencing of Eno1 results in fatal damage for the parasites (Wang et al., 2014; Chen et al., 2011), *T. crassiceps* cysts appeared normal after silencing of TcEnoA, which may suggest that other enolases could compensate this silencing.

To gain a better understanding of the metabolic consequences after TcEnoA silencing in *T. crassiceps*, the function of all enzymes participating in the glycolytic pathway was studied in untreated and silenced cysts. Results demonstrated that all enzyme genes participating in the glycolytic cascade downstream enolase resulted slightly over-expressed (except for pyruvate kinases 4 and 5). In contrast, upstream enzymes were under-expressed, except for phosphoglycerate kinase evidencing a functional feedback of the pathway. As conversion of 2-phosphoglycerate to phosphoenol-pyruvate (mediated by enolase) is one-step upstream pyruvate formation, our results suggested that silencing of TcEnoA resulted in a reduction of pyruvate formation.

To explore if TcEnoA silencing, and the resulting reduction of pyruvate production also influenced the expression of enzymes participating in the Krebs cycle, we performed qRT-PCR assays on four enzymes of this cycle. Results showed no changes on the expression of the four enzymes in the Krebs cycle, suggesting that other incoming pathways compensate the reduction of pyruvate production. These results may also reflect that functional compensation through increasing the activity of other *T. crassiceps* Eno genes, may be enough to maintain the metabolic function of cysticerci. Functional assays should be performed to corroborate these compensatory mechanisms. Gene silencing studies in glycolytic enzymes has been carried out; gene silencing of phosphoglycerate mutase (Singh et al., 2013) and Trehalose-6-phosphate synthase (Kushwaha et al., 2012) have shown effect on the life cycle of the nematode *Brugia malayi*, leading to reduction in adult motility and release of microfilariae *in vitro*, as well as in a diminished *in vivo* survival of the parasite. Silencing enolase gene in infective larvae of the nematode *Ascaris suum* provoked reduction in larval size caused by delay of larval development (Chen et al., 2011). Another report about silencing of *Clonorchis sinensis* enolase (CEno) established its physiological importance in this trematode, showing dead of parasites after 120 h of incubation with CEno siRNA (Wang et al., 2014). Our results demonstrate that silencing triggered by siRNA affected expression of several Glycolysis enzymes, which suggest that TcEnoA is an essential gene for this parasite.

Standardizing a silencing method for *T. crassiceps* Enolase will allow a more in depth analysis of its function not only inside the Glycogenic pathway, but also the analysis of its other functions such as its implication in parasite invasion and its implications in the human parasite *T. solium* (Ayoñ-Núñez et al., 2018). Further genetic and functional genomic analysis of the glycogenic pathway and its enzymes may reveal the role of paralogous genes found in the *T. crassiceps* genome. For example, Hexokinase (HK) has 4 isoforms in mammals, which promote the efficiency of glycolysis; one of those, HK-2 is over-expressed in cancer cells and its inhibition correlates with a reduction in the Krebs cycle activity (Yamamoto et al., 2017). Inhibition of other glycolytic enzymes such as HK-2 may result in an important inhibition of *T. crassiceps* metabolism, including other interesting homeostatic responses such as the Warburg effect.

Glycolytic enzymes of some parasites had been proposed as targets to

treat parasitic diseases (Timson, 2016). The hexokinase of *Trypanosoma brucei* has two isoforms (TbHK1 and TbHK2), silencing TbHK1 leads to a 60% reduction of cellular hexokinase provoking parasites death suggesting that TbHK1 is essential for parasite survival (Chambers et al., 2008). *In vitro* studies of TPI from *T. solium* was shown to be recognized by specific antibodies that can affect its catalytic activity (Sanabria-Ayala et al., 2013), and has been used to find specific target regions to inhibit TPI catalytic activity (Sanabria-Ayala et al., 2013, 2015).

On the other hand, *in vitro* evidence in tumor cell lines shows that phosphoenol pyruvate to phosphoglycerate is independent of enolase action under anaerobic conditions, which means that even in the absence of this enzyme, pyruvate production continues. If this is an alternative pathway also active in cestodes is unknown (Vander Heiden et al., 2010). More evidence of *in vitro* cell culture reveals that alpha-enolase is inhibited and beta-enolase is overexpressed under hypoxic conditions (Discher et al., 1998). Similar activation of the enolase variants, the activation of an alternative pathway or both may explain the survival of cysticerci after TcEnoA silencing and required future studies.

Our results showing that 24 h silencing of TcEnoA did not affect viability of *T. crassiceps* cysticerci, even though a reduction of almost 90% in enolase A expression was achieved. This observation is in agreement with other works, including *S. mansoni* GADPH knock-down with dsRNA (Boyle et al., 2003), the knock-down of acetylcholinesterase of *Nippostrongylus brasiliensis* (Hussein et al., 2002), among others. These paradoxical results are attributed to metabolic plasticity in *S. mansoni*, which changes its metabolic requirements between developmental stages (Tielens et al., 1992), involving the redundancy of some genes (Boyle et al., 2003).

A decrease of about 90% in the expression of TcEnoA after 24 hour of treatment with specific siRNAs was achieved; inhibition of TcEnoA induced an increased expression on TcEnoB, TcEnoC and TcEno4, as demonstrated by real time RT-PCR experiments. Silencing of TcEnoA also showed that all glycolytic enzymes upstream to enolase in this metabolic pathway, resulted under-expressed, except for phosphoglycerate kinase. In contrast, all enzyme downstream enolase resulted slightly over-expressed (except for pyruvate kinases 4 and 5). Both effects suggest a functional feedback of the pathway. We also investigated the influence of TcEnoA silencing on the expression of enzymes in the Krebs cycle. No significant changes were detected, indicating that TcEnoA silencing does not influence this downstream pathway. In summary, our results show that gene silencing machinery in *T. crassiceps* is functionally active. These results clearly show that gene silencing using siRNAs can be used as a powerful molecular methodology to characterize gene function in taeniid cestodes.

Funding

This report was supported in part by grants A1-5-11306 (CONACYT) and [IN 205820] PAPIIT-UNAM. JGH is a PhD student in the Doctorado en Ciencias Biológicas-UNAM and was supported by a CONACYT scholarship (No. 440780). AC and RJB were supported by CONTEX 2020-54B (UT system-Conacyt).

CRediT authorship contribution statement

Julio Guerrero-Hernández: Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing —original draft, Writing —review & editing. **Raúl J. Bobes:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Writing —original draft, Writing —review & editing. **Martín García-Varela:** Data curation, Formal analysis, Software, Writing —review & editing. **Alejandro Castellanos-Gonzalez:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Software, Supervision, Writing —original draft, Writing —review & editing. **Juan P. Laclette:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Software, Supervision, Project administration, Writing —original draft, Writing —review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors deeply thank P. de la Torre, K. Estrada, S.I. Mora-Herrera and O. Rangel-Rivera for their expert technical assistance.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.actatropica.2021.106197](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106197).

References

- Avila'n, L., Gualdro'n-Lo'pez, M., Quin'ones, W., Gonz'alez-Gonzalez, L., Hannaert, V., Michels, P.A., Concepcio'n, J.L., 2011. Enolase: a key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites-perspectives for its use as a therapeutic target. *Enzyme Res.* 2011, 932549 <https://doi.org/10.4061/2011/932549>.
- Ayo'n-Nu'nez, D.A., Fragoso, G., Espitia, C., Garcia-Varela, M., Sobero'n, X., Rosas, G., Lacllette, J.P., Bobes, R.J., 2018. Identification and characterization of *Taenia solium* enolase as a plasminogen-binding protein. *Acta Trop.* 182, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.02.020>.
- Bobes, R.J., Fragoso, G., Fleury, A., Garcia-Varela, M., Sciuotto, E., Larralde, C., Lacllette, J.P., 2014. Evolution, molecular epidemiology and perspectives on the research of taeniid parasites with special emphasis on *Taenia solium*. *Infect. Genet. Evol.* 23, 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.02.005>.
- Bobes, R.J., Navarrete-Perea, J., Ochoa-Leyva, A., Anaya, V.H., Hern'andez, M., Cervantes-Torres, J., Estrada, K., Sanchez-Lopez, F., Sobero'n, X., Rosas, G., Maroni Nunes, C., Garcia-Varela, M., Sotelo-Mundo, R.R., Lo'pez-Zavala, A.A., Gevorkian, G.A., Acero, G., Lacllette, J.P., Fragoso, G., Sciuotto, E., 2017. Experimental and Theoretical Approaches to Investigate the Immunogenicity of *Taenia solium*-Derived KE7 Antigen. *Infect. Immun.* 85, 1–3. <https://doi.org/10.1128/IAI.00395-1>.
- Bjorn, V., Kanobana, K., Gabri'el, S., Polman, K., Deckers, N., Dorny, P., Deelder, A.M., Palmblad, M., 2012. Proteomic analysis of *Taenia solium* metacystode excretion-secretion proteins. *Proteomics* 12, 1860–1869. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100496>.
- Boukli, N.M., Delgado, B., Ricaurte, M., Espino, A.M., 2011. *Fasciola hepatica* and *Schistosoma mansoni*: identification of common proteins by comparative proteomic analysis. *J. Parasitol.* 97 (5), 852–861. <https://doi.org/10.1645/JE-2495.1>.
- Boyle, J.P., Wu, X.J., Shoemaker, C.B., Yoshino, T.P., 2003. Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Mol. Biochem. Parasitol.* 128, 205–215. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00078-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00078-1).
- Castellanos-Gonzalez, A., 2020. "A novel method to silence genes in trypanosporidium" in *cryptosporidium*. *Methods Protocols*. *Methods Mol Biol.* 2052, 193–203. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9748-0_11.
- Chambers, J.W., Fowler, M.L., Morris, M.T., Morris, J.C., 2008. The anti-trypanosomal agent lonidamine inhibits *Trypanosoma brucei* hexokinase I. *Mol. Biochem. Parasitol.* 158, 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.12.013>.
- Chandra, S., Ruhela, D., Deb, A., Vishwakarma, R.A., 2010. Glycobiology of the *Leishmania* parasite and emerging targets for antileishmanial drug discovery. *Expert Opin. Ther. Targets* 14 (7), 739–757. <https://doi.org/10.1517/14782822.2010.495125>.
- Chen, N., Xu, M.J., Nisbet, A.J., Huang, C.Q., Lin, R.Q., Yuan, Z.G., Song, H.Q., Zhu, X.Q., 2011. *Ascaris suum*: RNAi mediated silencing of enolase gene expression in infective larvae. *Exp. Parasitol.* 127, 142–146. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.07.019>.
- Corentin, J.M., Jung, E., Freitas, T.C., Pearce, E.J., 2007. Transfection of *Schistosoma mansoni* by electroporation and the description of a new promoter sequence for transgene expression. *Int. J. Parasitol.* 37, 1107–1115. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.02.011>.
- Del Brutto, O.H., Garcia, H.H., 2012. Neurocysticercosis in nonendemic countries: time for a reappraisal. *Neuroepidemiology* 39 (2), 145–146. <https://doi.org/10.1159/000341693>.
- Discher, D.J., Bishopric, N.H., Wu, X., Peterson, C.A., Webster, K.A., 1998. Hypoxia regulates beta-enolase and pyruvate kinase-M promoters by modulating Sp1/Sp3 binding to a conserved GC element. *J. Biol. Chem.* 273 (40), 26087–26093. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.26087>.
- Dorny, P., Praet, N., Deckers, N., Gabriel, S., 2009. Emerging food-borne parasites. *Vet. Parasitol.* 163, 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.026>.
- El Ridi, R.A., Tallima, H.A., 2013. Novel therapeutic and prevention approaches for schistosomiasis: review. *J. Adv. Res.* 4 (5), 467–478. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2012.05.002>.
- Everhart, M.E., Kuhn, R.E., Zelman, D.A., 2004. Infrapopulation dynamics of a wild strain of *Taenia crassiceps* (WFU) (Cestoda: Taeniidae) in BALB/cJ mice. *J. Parasitol.* 90 (1), 79–84. <https://doi.org/10.1645/GE-3255>.
- Fontenla, S., Rinaldi, G., Smircich, P., Tort, J.F., 2017. Conservation and diversification of small RNA pathways within flatworms. *BMC Evol. Biol.* 17, 215. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-1061-5>.
- Fragoso, G., Meneses, G., Sciuotto, E., Fleury, A., Larralde, C., 2008. Preferential growth of *Taenia crassiceps* cysticerci in female mice holds across several laboratory mice strains and parasite lines. *J. Parasitol.* 94 (2), 551–553. <https://doi.org/10.1645/GE-1287.1>. Erratum in: *J. Parasitol.* 2008, 94(6):1442.
- Gao, Z., Wang, M., Blair, D., Zheng, Y., Dou, Y., 2014. Phylogenetic analysis of the endoribonuclease Dicer family. *PLoS One* 9, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095350>.
- Garbutt, J.S., Reynolds, S.E., 2012. Induction of RNA interference genes by double-stranded RNA; implications for susceptibility to RNA interference. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42, 621–628. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.05.001>.
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SEAVIEW Version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>.
- Hagen, J., Scheerlinck, J.P.Y., Gasser, R.B., 2015. Knocking down schistosomes - promise for lentiviral transduction in parasites. *Trends Parasitol.* 31, 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.03.009>.
- Holmes, M., Liwak, U., Pricop, I., Wang, X., Tomavo, S., Ananvoranich, S., 2010. Silencing of tachyzoite enolase 2 alters nuclear targeting of bradyzoite enolase 1 in *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.* 12, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.09.010>.
- Hussein, A.S., Kichenin, K., Selkirk, M.E., 2002. Suppression of secreted acetylcholinesterase expression in *Nippostrongylus brasiliensis* by RNA interference. *Mol. Biochem. Parasitol.* 122, 91–94. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00068-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00068-3).
- Krautz-Peterson, G., Skelly, P.J., 2008. *Schistosoma mansoni*: the dicer gene and its expression. *Exp. Parasitol.* 118 (1), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.06.013>.
- Krautz-Peterson, G., Bhardwaj, R., Faghiri, Z., Tararam, C.A., Skelly, P.J., 2010. RNA interference in schistosomes: machinery and methodology. *Parasitology* 137 (3), 485–495. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991168>.
- Kumar, S., Gupta, S., Mohamad, A., Fular, A., Parthasarathi, B.C., Chaubey, A.K., 2020. Molecular tools-advances, opportunities and prospects for the control of parasites of veterinary importance. *Int. J. Trop. Insect Sci.* 29, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s42690-020-00213-9>.
- Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Takamatsu, K., Chuma, S., Kojima-Kita, K., Shiromoto, Y., Asada, N., Toyoda, A., Fujiyama, A., Totoki, Y., Shibata, T., Kimura, T., Nakatsuji, N., Noce, T., Sasaki, H., Nakano, T., 2010. MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons. *Genes Dev.* 24, 887–892. <https://doi.org/10.1101/gad.1902110>.
- Kushwaha, S., Singh, P.K., Shahab, M., Pathak, M., Bhattacharya, S.M., 2012. *In Vitro* Silencing of *Brugia malayi* Trehalose-6-Phosphate Phosphatase Impairs Embryogenesis and *In Vivo* Development of Infective Larvae in Jirds. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001770>.
- Jeon, H.K., Eom, K.S., 2013. Molecular approaches to *Taenia asiatica*. *Korean J. Parasitol.* 51 (1), 1–8. <https://doi.org/10.3347/kjp.2013.51.1.1>.
- Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J., Carthew, R.W., 2004. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA Silencing Pathways 117, 69–81. [10.1016/s0092-8674\(04\)00261-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00261-2).
- Liang, L., Diehl-Jones, W., Lasko, P., 1994. Localization of vasa protein to the *Drosophila* pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. *Development* 120, 1201–1211. PMID: 8026330.
- Maddison, W.P., Maddison, D.R., 2011. Mesquite: A Modular System for Evolutionary Analysis. Version 2.7.5. Available at: <http://mesquiteproject.org/>.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>.
- Mizukami, C., Spiliotis, M., Gottstein, B., Yagi, K., Katakura, K., Oku, Y., 2010. Gene silencing in *Echinococcus multilocularis* protoscolices using RNA interference. *Parasitol. Int.* 59, 647–652. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.08.010>.
- Moguel, B., Moreno-Mendoza, N., Bobes, R.J., Carrero, J.C., Chimal-Monroy, J., Diaz-Hern'andez, M.E., Herrera-Estrella, L., Lacllette, J.P., 2015. Transient transgenesis of the tapeworm *Taenia crassiceps*. *Springerplus* 15 (4), 496. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1278-y>.
- Morales-Montor, J., Escobedo, G., Vargas-Villavicencio, J.A., Larralde, C., 2008. The neuroimmunoenocrine network in the complex host-parasite relationship during murine cysticercosis. *Curr. Top. Medicin. Chem.* 8, 400–407. <https://doi.org/10.2174/156802608783790866>.
- Palomares-Alonso, F., Toledo, A., Palencia-Hern'andez, G., Jung-Cook, H., Fleury, A., 2020. Effect of dexamethasone on albendazole cysticidal activity in experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in BALB/c mice: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Exp. Parasitol.* 208, 107801 <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107801>.
- Pancholi, V., 2001. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (7), 902–920. <https://doi.org/10.1007/pl00000910>.
- Pierson, L., Mousley, A., Devine, L., Marks, N.J., Day, T.A., Maule, A.G., 2010. RNA interference in a cestode reveals specific silencing of selected highly expressed gene transcripts. *Int. J. Parasitol.* 40, 605–615. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.10.012>.
- Pouchkina-Stantcheva, N.N., Olson, P.D., Cunningham, L.J., Hrc, G., 2013. RNA-mediated gene suppression and *in vitro* culture in *Hymenolepis microstoma* 43, 641–646. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.03.004>.
- Posada, D., 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253–1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>.

- Rambaut, A., 2012. FigTree v1.4.0. Institute of Evolutionary Biology. University of Edinburgh, UK. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rivas, F.V., Tolia, N.H., Song, J.J., Aragon, J.P., Liu, J., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L., 2005. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12 (4), 340–349. <https://doi.org/10.1038/nsmb918>.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.
- Sanabria-Ayala, V., Medina Flores, Y., Zavala Carballo, A., Jiménez, L., Landa, A., 2013. Characterization of a monoclonal antibody that specifically inhibits triosephosphate isomerase activity of *Taenia solium*. *Exp. Parasitol.* 134, 495–503. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.05.010>.
- Sanabria-Ayala, V., Belmont, I., Landa, A., 2015. Triosephosphate isomerase of *Taenia solium* (TTPi): phage display and antibodies as tools for finding target regions to inhibit catalytic activity. *Parasitol. Res.* 114, 55–64. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4159-3>.
- Sciutto, E., Fragoso, G., Diaz, M.L., Valdez, F., Montoya, R.M., Govezensky, T., Lomeli, C., Larralde, C., 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol. Res.* 77, 243–246. <https://doi.org/10.1007/BF00930866>.
- Sciutto, E., Fragoso, G., Fleury, A., Laclette, J.P., Sotelo, J., Aluja, A., Vargas, L., Larralde, C., 2000. *Taenia solium* disease in humans and pigs: An ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect.* 2, 1875–1890. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01336-8](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01336-8).
- Sciutto, E., Fragoso, G., Larralde, C., 2011. *Taenia crassiceps* as a model for *Taenia solium* and the S3Pvac vaccine. *Parasite Immunol.* 33 (1), 79–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01257.x>.
- Serpa, J.A., White Jr., A.C., 2012. Neurocysticercosis in the United States. *Pathog. Glob. Health* 106 (5), 256–260. <https://doi.org/10.1179/2047773212Y.0000000028>.
- Sheth, U., Pitt, J., Dennis, S., Priess, J.R., 2010. Perinuclear P granules are the principal sites of mRNA export in adult *C. elegans* germ cells. *Development* 137, 1305–1314. <https://doi.org/10.1242/dev.044255>.
- Silvestro, D., Michalak, I., 2011. RaxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organ. Divers. Evol.* 12, 335–337. <https://doi.org/10.1007/s13127-011-0056-0>.
- Singh, P.K., Kushwaha, S., Mohd, S., Pathak, M., Misra-Bhattacharya, S., 2013. *In vitro* gene silencing of independent phosphoglycerate mutase (iPGM) in the filarial parasite *Brugia malayi*. *Infect. Dis. Poverty* 2, 1. <https://doi.org/10.1186/2049-9957-2-5>.
- Skinner, D.E., Rinaldi, G., Koziol, U., Brehm, K., Brindley, P.J., 2015. How might flukes and tapeworms maintain genome integrity without a canonical piRNA pathway? 30, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.01.001>.
- Sorvillo, F., Wilkins, P., Shafir, S., Eberhard, M., 2011. Public health implications of cysticercosis acquired in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 17 (1), 1–6. <https://doi.org/10.3201/eid1701.101210>.
- Spiliotis, M., Lechner, S., Tappe, D., Scheller, C., Krohne, G., Brehm, K., 2008. Transient transfection of *Echinococcus multilocularis* primary cells and complete *in vitro* regeneration of metacystode vesicles 38, 1025–1039. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.11.002>.
- Tielens, A.G.M., Horemans, A.M.C., Dunnewijk, R., van der Meer, P., van den Bergh, S.G., 1992. The facultative anaerobic energy metabolism of *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Mol. Biochem. Parasitol.* 56, 49–57. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90153-B](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90153-B).
- Timson, D.J., 2016. Metabolic enzymes of helminth parasites: potential as drug targets. *Curr. Protein Pept. Sci.* 17 (3), 280–295. <https://doi.org/10.2174/1389203717999160226180733>.
- Toledo, A., Fragoso, G., Rosas, G., Hernández, M., Gevorkian, G., López-Casillas, F., Hernández, B., Acero, G., Huerta, M., Larralde, C., Sciutto, E., 2001. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect. Immun.* 69, 1766–1773. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1766-1773.2001>.
- Tsai, I.J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garciarubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K.L., Tracey, A., Bobes, R.J., Fragoso, G., Sciutto, E., Aslett, M., Beasley, H., Bennett, H.M., Cai, J., Camicia, F., Clark, R., Cucher, M., De Silva, N., Day, T.A., Deplazes, P., Estrada, K., Fernández, C., Holland, P.W.H., Hou, J., Hu, S., Huckvale, T., Hung, S.S., Kamentzky, L., Keane, J.A., Kiss, F., Koziol, U., Lambert, O., Liu, K., Luo, X., Luo, Y., Macchiaroli, N., Nichol, S., Paps, J., Parkinson, J., Pouchkina-Stantcheva, N., Riddiford, N., Rosenzvit, M., Salinas, G., Wasmuth, J.D., Zamanian, M., Zheng, Y., Consortium, *Taenia solium* Genome, Cai, X., Soberón, X., Olson, P.D., Laclette, J.P., Brehm, K., Berriman, M., 2013. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 496, 57–63. <https://doi.org/10.1038/nature12031>.
- Utzinger, J., Becker, S.L., Knopp, S., Blum, J., Neumayr, A.L., Keiser, J., Hatz, C.F., 2012. Neglected tropical diseases: Diagnosis, clinical management, treatment and control. *Swiss Med. Wkly.* 142, 19–22. <https://doi.org/10.4414/smww.2012.13727>.
- Vander Heiden, M.G., Locasale, J.W., Swanson, K.D., Sharfi, H., Heffron, G.J., Amador-Noguez, D., Christofk, H.R., Wagner, G., Rabinowitz, J.D., Asara, J.M., Cantley, L.C., 2010. Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells. *Science* 329 (5998), 1492–1499. <https://doi.org/10.1126/science.1188015>.
- Verjovski-Almeida, S., DeMarco, R., Martins, E.A., Guimaraes, P.E., Ojopi, E.P., Paquola, A.C., Piazza, J.P., Nishiyama Jr, M.Y., Kitajima, J.P., Adamson, R.E., Ashton, P.D., Bonaldo, M.F., Coulson, P.S., Dillon, G.P., Farias, L.P., Gregorio, S.P., Ho, P.L., Leite, R.A., Malaquias, L.C., Marques, R.C., Miyasato, P.A., Nascimento, A. L., Ohlweiler, F.P., Reis, E.M., Ribeiro, M.A., Sa, R.G., Stukart, G.C., Soares, M.B., Gargioni, C., Kawano, T., Rodrigues, V., Madeira, A.M., Wilson, R.A., Menck, C.F., Setubal, J.C., Leite, L.C., Dias-Neto, E., 2003. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat. Genet.* 35 (2), 148–157. <https://doi.org/10.1038/ng1237>.
- Wang, X., Chen, W., Tian, Y., Huang, Y., Li, X., Yu, X., 2014. RNAi-mediated silencing of enolase confirms its biological importance in *Clonorchis sinensis*. *Parasitol. Res.* 113, 1451–1458. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3785-0>.
- Wallin, M.T., Kurtzke, J.F., 2004. Neurocysticercosis in the United States: review of an important emerging infection. *Neurology* 63 (9), 1559–1564. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000142979.98182.ff>.
- Willms, K., Zurabian, R., 2010. *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. *Parasitology* 137 (3), 335–346. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991442>.
- Wilson, R.C., Doudna, J.A., 2013. Molecular Mechanisms of RNA Interference. *Annu. Rev. Biophys.* 42, 217–239. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130404>.
- World Health Organization, 2015. Landscape Analysis: Management of Neurocysticercosis with an Emphasis on Low- and Middle-Income Countries. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/152896>.
- Yamamoto, M., Inohara, H., Nakagawa, T., 2017. Targeting metabolic pathways for head and neck cancers therapeutics. *Cancer Metastasis Rev.* 36, 503–514. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9691-z>.
- Yanagida, T., Sako, Y., Nakao, M., Nakaya, K., Ito, A., 2012. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium* in Japan. *Parasit Vectors* 17 (5), 18. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-18>.
- Zammarchi, L., Strohmeyer, M., Bartalesi, F., Bruno, E., Muñoz, J., Buonfrate, D., Nicoletti, A., García, H.H., Pozio, E., Bartoloni, A., COHEMI Project Study Group, 2013. Epidemiology and management of cysticercosis and *Taenia solium* taeniasis in Europe, systematic review 1990–2011. *PLoS One* 8 (7), e69537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069537>. Erratum in: *PLoS One* 2013;8(12)<https://doi.org/10.1371/annotation/1bcc3e5b-1159-412b-be86-b18d94515cc2>.
- Zheng, Y., 2013. Phylogenetic analysis of the Argonaute protein family in platyhelminths. *Mol. Phylogenet. Evol.* 66, 1050–1054. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.11.014>.