



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE NITAZOXANIDA
EN LA DISTRIBUCIÓN DE PROTEÍNAS DEL
CITOESQUELETO DEL CÉSTODO *Taenia solium*

REPORTE DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

RAFAEL VILLANUEVA OLEA

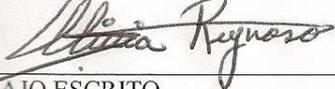
TUTOR

JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ



2008

HOJA DE DATOS DEL JURADO Y DEL PROYECTO

<p>ALUMNO Villanueva Olea Rafael Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología No. Cta. 40409994-9</p> 	<p>TUTOR (SECRETARIO) Ambrosio Hernández Javier Rolando Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina</p> 
<p>PRESIDENTE Segal Kischinevzky Claudia Andrea Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias</p> 	<p>VOCAL Kawasaki Watanabe Laura Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Fisiología Celular</p> 
<p>SUPLENTE Reynoso Ducoing Olivia A. Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina</p> 	<p>SUPLENTE Vilchis Peluyera Alfonso José Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias</p> 
<p>TRABAJO ESCRITO Evaluación del efecto de Nitazoxanida en la distribución de proteínas del citoesqueleto del céstodo <i>Taenia solium</i> 77 p 2008</p>	

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Javier R. Ambrosio Hernández, por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio, por ser mi tutor y poder titularme con el presente proyecto de investigación.

A la M. en C. Laura E. Valverde Islas, por enseñarme las técnicas con las que trabajé y realicé este proyecto.

A la Biól. Olivia A. Reynoso Ducoing, por la donación de parásitos adultos obtenidos a través del modelo de hámster dorado para la realización de la inmunohistoquímica, además de su asesoría y apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A la pBiól. Araceli Ferrer, por la donación de los parásitos cultivados con los cuales pude realizar el presente trabajo.

Al Biól. Gabriel Orozco y la Dra. Araceli Patrón, por la obtención de imágenes y la ayuda en el análisis en el microscopio confocal Olympus del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Al Dr. Juan A. Molina Guarneros, por facilitar el uso del microscopio de epifluorescencia Nikon.

Al M. en C. Elio Vega por su ayuda en la reconstrucción y visualización de imágenes en tercera dimensión en la sala IXTLI mediante el uso del programa Amira.

A la Dirección General de Servicios de Cómputo Académico (DGSCA), UNAM, por facilitar el uso de la Sala Ixtli para la visualización de las reconstrucciones en tercera dimensión.

A la Dra. Laura Escobar, por facilitar el uso del criostato LEICA.

A la UNAM y a la Facultad de Ciencias, por haberme acogido y formado como biólogo por más de cuatro años en sus aulas.

A la Facultad de Medicina y el Departamento de Microbiología y Parasitología, por permitirme realizar este proyecto de investigación.

Al jurado, por la atención prestada para la revisión del proyecto.

A los proyectos que me apoyaron durante la realización de este trabajo:

PAPIIT-UNAM

“Evaluación de cambios inducidos por estrés químico en la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia solium* y *Taenia crassiceps*”.

No. de registro IN-216107-3

IXTLI PAPIIT-UNAM

“Visualización en 3D del citoesqueleto de células u organismos celulares”

No. proyecto 0709008

CONACYT

“Síntesis y estudios de la actividad antiprotozoaria y antihelmíntica de compuestos derivados del bencimidazol y de moléculas híbridas con nitrotiazol”

No. clave 43629

A mi madre

Ma. Guadalupe Olea Jaimes, por ser la mejor del mundo, por su apoyo incondicional durante toda mi carrera en todos los aspectos de mi vida, por su amor y por su comprensión en todo momento.

A mi abuela

Ma. Isabel Jaimes Serrano, por su amor, cariño, su apoyo y sabios consejos que nunca olvidaré.

A mis hermanos

Moisés Pérez Olea y Kenya R. Pérez Olea, por sus consejos y ayuda en todo momento.

Al Pbro.

Bernardino Patiño por su preocupación y apoyo durante mi carrera.

Al M. en CB

José de Guadalupe Mejía Acevedo, porque gracias a él conocí y amé la Biología.

A mis amigos

Yamile Romero, Xóchitl González, Mónica Terán, Elizabeth Chávez y Antonio Sánchez por su amistad sincera y por estar conmigo en todo momento.

A mis compañeros y amigos de laboratorio

Héctor, América, Denisse, Laura, Mónica y Liliana, por su ayuda y compañerismo durante mi estancia en el laboratorio.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Esquema corte de cisticerco de <i>Taenia solium</i>	40
2	Sistema protonefridial de platelmintos	41
3	Tenia adulta no grávida	41
4	Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	42
5	Áreas con teniosis y cisticercosis endémica en el mundo	43
6	Estructura química de la NTZ	43
7	Cisticerco evaginado tratado con NTZ. ME	44
8	Distribución de tubulina en pared vesicular de cisticerco evaginado NTZ. ME	44
9	Distribución de miosina en pared vesicular de cisticerco evaginado sin tratamiento y tratado con NTZ. ME	45
10	Actina y tubulina en cisticerco sin tratamiento. MC	46
11	Actina y tubulina en cisticerco con tratamiento con NTZ. MC	47
12	Actina y tubulina en cisticerco evaginado sin tratamiento. MC	48
13	Actina y tubulina en cisticerco evaginado con tratamiento con NTZ. MC	49
14	Actina y tubulina en parásito adulto sin tratamiento. MC	50
15	Actina y tubulina en parásito adulto con tratamiento con NTZ. MC	51
16	Miosina y tubulina en cisticerco sin tratamiento. MC	52
17	Miosina y tubulina en cisticerco con tratamiento con NTZ. MC	53
18	Miosina y tubulina en cisticerco evaginado sin tratamiento. MC	54
19	Miosina y tubulina en cisticerco evaginado con tratamiento con NTZ. MC	55
20	Miosina y tubulina en parásito adulto sin tratamiento. MC	56
21	Miosina y tubulina en parásito adulto con tratamiento con NTZ. MC	57
22	Miosina y tubulina en zona del cuello de cisticerco evaginado sin tratamiento y tratado con NTZ. MC	58
23	Miosina y tubulina en la capa germinal mostrando túbulos protonefridiales en cisticercos y cisticercos evaginados con y sin tratamiento. MC	59
24	Células flama de cisticerco evaginado sin tratamiento. MC	60
25	Reconstrucción 3-D por programa Olympus de CF en cisticercos evaginados sin tratamiento. MC	60
26	Reconstrucción 3-D por programa Amira de CF en cisticercos evaginados sin tratamiento	61
27	Reconstrucción 3-D de cortes transversales a una CF de cisticerco evaginado sin tratamiento	62
28	CF en cisticerco con tratamiento con NTZ. MC	63
29	Reconstrucción 3-D por programa Olympus de CF en cisticerco con tratamiento con NTZ. MC	64
30	Reconstrucción 3-D por programa Amira de CF en cisticerco tratado con NTZ	65
31	Reconstrucción 3-D programa Amira de CF en cisticerco evaginado sin tratamiento y cisticerco tratado con NTZ	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Reactivos empleados en el revelado de proteínas del citoesqueleto de <i>Taenia solium</i>	67
2	Comparación del marcaje fluorescente de actina y tubulina en el tegumento en tres estadios de vida de <i>Taenia solium</i>	68
3	Comparación del marcaje fluorescente de actina y tubulina en ventosas de escólex de cisticercos y cisticercos evaginados	69
4	Comparación del marcaje fluorescente de actina y tubulina en CF marcando en tres estadios de vida de <i>Taenia solium</i>	70
5	Comparación del marcaje fluorescente de miosina y tubulina en el tegumento en tres estadios de vida de <i>Taenia solium</i>	71
6	Comparación del marcaje fluorescente de miosina y tubulina en parénquima en tres estadios de vida de <i>Taenia solium</i>	72
7	Comparación del marcaje fluorescente de miosina y tubulina en ventosas de escólex de cisticercos y cisticercos evaginados	73

ABREVIATURAS

SSAF	Solución salina fisiológica amortiguadora de fosfatos pH 7.2
NTZ	Nitazoxanida
TZX	Tizoxanida
ABZ	Albendazol
PZQ	Praziquantel
PV	Pared vesicular
CG	Capa germinal
CF	Célula flama
FV	Fluido vesicular
V	Ventosa
E	Escólex
PT	Parénquima
TP	Túbulo protonefridial
FM	Fibras musculares
CE	Canal espiral
C	Cuello
OMS	Organización Mundial de la Salud
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
ME	Microscopio de epifluorescencia
MC	Microscopio confocal
DIC	Contraste diferencial de interferencia
Tw	Tween
BSA	Albúmina sérica bovina

ÍNDICE GENERAL

I. RESUMEN 6

II. ANTECEDENTES 7

 2. 1. *Taenia solium*..... 7

 2. 1. 1. Morfología 7

 2. 1. 2. Ciclo de vida 8

 2. 1. 3. Patogenia..... 8

 2. 1. 4. Epidemiología 9

 2. 1. 5. Tratamiento quimioterapéutico 9

 2. 2. Desarrollo de fármacos antiparasitarios..... 9

 2. 2. 1. Quimioterapia según la OMS..... 10

 2. 2. 2. Química Medicinal 10

 2. 2. 3. Diseño racional de fármacos 11

 2. 3. Nitazoxanida 11

 2. 3. 1. Estructura química y propiedades farmacológicas 11

 2. 3. 2. Usos para tratamiento farmacológico de enfermedades infecciosas..... 11

 2. 3. 3. Eficacia terapéutica de la NTZ en organismos relacionados a *Taenia* 12

 2. 4. Citoesqueleto y su efecto por nitazoxanida en parásitos 12

 2. 5. Microscopia de fluorescencia..... 13

III. OBJETIVOS..... 15

 3. 1. General 15

 3. 2. Específicos 15

IV. HIPÓTESIS 15

V. JUSTIFICACIÓN 15

VI. ALCANCE..... 15

VII. MÉTODOS Y TÉCNICAS 16

 7. 1. Obtención de los parásitos 16

 7. 2. Mantenimiento *in vitro* de los parásitos..... 16

 7. 2. 1. Cisticercos..... 16

 7. 2. 2. Cisticercos evaginados..... 16

 7. 2. 3. Parásitos adultos 16

 7. 3. Inclusión de parásitos y obtención de criocortes..... 16

 7. 4. Inmunofluorescencia 17

7. 5. Adquisición, almacenamiento y edición de imágenes.....	17
7. 6. Edición para imágenes para su visualización en 3-D.	18
VIII. RESULTADOS Y ANÁLISIS	19
8. 1. Microscopio de epifluorescencia.....	19
8. 2. Microscopio confocal	20
8. 2. 1. Actina-F y Tubulina- α	20
8. 2. 1. 1. Cisticercos.....	20
8. 2. 1. 2. Cisticercos evaginados.....	21
8. 2. 1. 3. Adultos.....	22
8. 2. 1. 4. Distribución en tegumento.	23
8. 2. 1. 5. Distribución en ventosas	24
8. 2. 1. 6. Distribución en células flama.....	25
8. 2. 2. Miosina II y Tubulina- α	26
8. 2. 2. 1. Cisticercos.....	26
8. 2. 2. 2. Cisticercos evaginados.....	27
8. 2. 2. 3. Parásitos adultos.	27
8. 2. 2. 4. Distribución en tegumento	28
8. 2. 2. 5. Distribución en cuello.....	29
8. 2. 2. 6. Distribución en parénquima	30
8. 2. 2. 7. Distribución en túbulos.....	31
8. 2. 2. 8. Distribución en ventosas	32
8. 3. Reconstrucción en tercera dimensión.....	32
IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	35
X. FIGURAS	40
XI. TABLAS.....	67
XII. REFERENCIAS.....	74

Palabras clave: céstodo, *Taenia solium*, sistema protonefridial, célula flama, citoesqueleto, microscopía confocal, visualización 3-D, inmersión virtual, nitazoxanida.

I. RESUMEN

La cisticercosis y la teniosis son dos enfermedades parasitarias producidas por dos diferentes estadios de *Taenia solium*: el metacéstodo invaginado o cisticerco y la tenia adulta, respectivamente. Se considera que estas enfermedades son importantes problemas de salud pública en países en vías de desarrollo, como México. En la actualidad, la mejor forma de tratamiento está basada en el uso de fármacos antihelmínticos como el albendazol (ABZ) y el praziquantel (PZQ) y aún cuando se ha encontrado que la nitazoxanida (NTZ) es efectiva en otras afecciones parasitarias, no se han hecho estudios que validen su utilidad en las parasitosis producidas por *Taenia solium*.

La OMS considera a la quimioterapia como una de las mejores formas de control tanto a corto como a mediano plazos para combatir enfermedades de tipo parasitario. Sin embargo, debido a que en algunas parasitosis se ha provocado la resistencia a algunos fármacos, la OMS ha considerado pertinente la búsqueda de nuevos fármacos o bien, el rediseño de los ya existentes. Una forma de producción de nuevos fármacos es el diseño racional de fármacos que incluye a la química medicinal y uno de los ejemplos de este tipo de tecnología es la síntesis y aplicación de la NTZ.

La NTZ surgió del rediseño y la síntesis química de derivados de la niclosamida, la cual se utilizó ampliamente y de forma efectiva para el tratamiento de teniosis. Sin embargo, las compañías farmacéuticas han dejado de comercializarla en algunos países como México.

Rosignol, un químico francés, consideró que si utilizaba a la molécula de niclosamida como la base de la NTZ, obtendría un fármaco antiparasitario de mejor acción. La NTZ, como se comercializa en la actualidad, ha demostrado ser efectiva en contra de parasitosis como ciclosporiasis, isosporiosis, amebosis y fasciolosis y se ha encontrado que presenta pocos efectos secundarios en los pacientes tratados. En el caso de helmintos, se ha demostrado que es efectiva en el tratamiento de ascariosis, teniosis humana por *T. saginata* y toxocariosis experimental.

Por lo anterior, con la finalidad de encontrar otras formas de tratamiento farmacológico de las infecciones producidas por *T. solium*, es necesario evaluar el efecto de la NTZ en este parásito. En el presente proyecto se evaluó el efecto que produjo este fármaco en la morfología de parásitos mantenidos *in vitro* y se consideró que el efecto en la morfología de los parásitos podría estar asociado a los cambios que sufrieran proteínas del citoesqueleto y, con ello, cabría la posibilidad de determinar si la NTZ tiene algún efecto sobre el citoesqueleto de los parásitos.

El citoesqueleto es un componente importante para la forma, el tamaño y la dinámica de los organismos. Cualquier cambio que sufra en su estructura se verá reflejado en los organismos y una de las formas de valorarlo es por la observación al microscopio de fluorescencia de las proteínas que lo constituyen. En el laboratorio de investigación en el que se desarrolló el presente trabajo, se estudian las proteínas del citoesqueleto como tubulina, actina y miosina II de *T. solium*, ya que se considera que estas proteínas no sólo son importantes para la supervivencia de los parásitos, sino también para la patogenia que producen y por ello, éstas podrían ser algunos de los blancos farmacológicos involucrados en la acción de fármacos antiparasitarios.

II. ANTECEDENTES

2. 1. *T. solium*

T. solium es un gusano plano parásito que tiene como hospedero definitivo al humano y como intermediario al cerdo, presenta diferentes estadios en su ciclo de vida: huevo, metacéstodo invaginado o cisticerco, metacéstodo evaginado y adulto. Según la clasificación taxonómica de Cheng¹, este parásito se clasifica de la siguiente manera:

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Cestoda

Subclase: Eucestoda

Orden: Cyclophillidea

Familia: Taeniidae

Género: *Taenia*

Especie: *T. solium*

2. 1. 1. Morfología

El metacéstodo es macroscópico, mide de 0.5 a 1 cm de diámetro y, a simple vista, se le observa como una esfera blanquecina suspendida en una vesícula llena de líquido. A un nivel microscópico se sabe que la vesícula está formada por una pared vesicular, por un tegumento sincicial continuo y por un parénquima tisular que presenta diferentes tipos de células, las cuales se encuentran rodeadas tanto de tejido conectivo como de corpúsculos calcáreos².

Cuando se efectúa un corte transversal de la vesícula y se le observa al microscopio de luz, destaca el tegumento sincicial y anucleado. A mayores aumentos, con el uso del microscopio electrónico, se observa una gran cantidad de extensiones citoplásmicas que van hacia el interior del parásito, y dentro del tegumento se encuentran organelos como microvesículas y mitocondrias. La superficie del tegumento presenta una gran cantidad de estructuras semejantes a microvellosidades llamadas microtricas, las cuales permiten que aumente el área de absorción y lo cual favorece el que los céstodos capten fácilmente sus nutrientes, ya que carecen de un sistema digestivo (Fig. 1).

A nivel de la ultraestructura, por debajo del tegumento sincicial, los parásitos presentan varias capas de músculo liso los cuales pueden estar constituidos tanto de fibras musculares de tipo longitudinal como circulares. Luego, después de la capa muscular, se encuentra la zona subtegumentaria o capa germinal en donde se localizan la mayoría de los tipos celulares del parásito. Se supone que desde esta capa interior, nacen las extensiones citoplásmicas que llegan a la capa sincicial del tegumento, y que se piensa, forman puentes a través de los cuales se distribuyen y llegan muchas de las moléculas absorbidas para la nutrición de los parásitos (Fig. 1). Dentro del mismo parénquima hay y una gran cantidad de cuerpos lipídicos y los corpúsculos calcáreos, los cuales se sabe que son cuerpos esféricos con una base orgánica compuesta de DNA, RNA, proteínas, glucógeno, mucopolisacáridos, así como material inorgánico que consiste de calcio, magnesio, fósforo, dióxido de carbono y trazas de elementos metálicos¹.

Es en la capa germinal es donde se encuentra el sistema protonefridial, el cual es un sistema primitivo que permite la eliminación de sustancias de los céstodos y sus componentes básicos son las células flama (Fig. 2). Estas células también son conocidas como células flamíferas o bulbos flamíferos y tienen características específicas que determinan su funcionalidad en los platelmintos³; tienen una longitud aproximada de 10 μm , presentan un penacho de cilios con lo que impulsan los fluidos que pasan a través de los conductos protonefridiales³ y a través de los cuales se lleva a cabo el acarreo de materiales de desecho desde el interior del parásito hasta su superficie. Con el empleo de marcadores fluorescentes en las células flama, se han logrado visualizar algunos componentes de

su citoesqueleto y lo que se ha observado es que los cilios están unidos a la célula mediante una estructura en forma de hebilla principalmente compuesta de actina filamentosa⁴.

La tenia adulta (comúnmente conocida como solitaria) es un gusano aplanado dorso-ventralmente, en forma de cinta, que mide de 2 a 8 m de longitud y es de color blanco marfil (Fig. 3). El escólex, en donde se encuentra la porción cefálica, mide 1 mm de diámetro, está provisto de cuatro ventosas y un rostelo con una doble corona de 22 a 32 ganchos que miden de 130 a 180 μm de longitud y la cual le sirve para adherirse al epitelio intestinal de su hospedero^{1, 5}. El estróbilo, también conocido como cadena estrobilar, está conformado por segmentos conocidos como proglótidos de tipo cuadrangular, dentro de los cuales se encuentran poros genitales unilaterales. Dado que los proglótidos nacen después del cuello del gusano, se los clasifica como inmaduros, maduros y grávidos, siendo en los proglótidos totalmente diferenciados y maduros en donde están las características hermafroditas ya que presentan tanto ovarios como testículos⁵.

2. 1. 2. Ciclo de vida

El ciclo comienza cuando el ser humano consume carne infectada con cisticercos de *T. solium*, que debido a las condiciones del microambiente gastrointestinal (pH, CO₂, temperatura, enzimas proteolíticas) son determinantes para que el escólex contenido en los cisticercos evagine (Fig. 4). Luego, cuando el escólex recién evaginado llega al intestino, se ancla a la mucosa intestinal a través del despliegado de su doble corona de ganchos y de su fijación mediante sus ventosas. Una vez que el escólex se encuentra anclado, el estróbilo comienza a formarse, los proglótidos comienzan a diferenciarse y a dividirse a lo largo del lumen intestinal. Posteriormente, los proglótidos más alejados del escólex cuando han madurado y son capaces de producir gametos masculinos y femeninos, se autofecundan dentro del mismo proglótido y ello da origen a una gran cantidad de huevos. La tenia alojada en el intestino causa la teniosis humana. Los huevos son microscópicos, miden aproximadamente 30 μm y contienen al embrión hexacanto rodeado por una membrana oncosférica y un embrióforo, que lo hace resistente a las condiciones del ambiente natural⁶. Si los huevos son liberados del tracto intestinal y expulsados en las heces fecales, pueden contaminar los alimentos, ser ingeridos y alcanzar el estadio de desarrollo de cisticercos y producir la cisticercosis.

En caso de que un ser humano ingiera accidentalmente heces infectadas con los huevos, luego de que bajo la influencia de las condiciones microambientales los embriones contenidos en ellos son liberados en el tubo digestivo, estas formas parasitarias atraviesan la mucosa intestinal, se convierten en oncosferas e invaden varios sitios como el ojo, el músculo esquelético y el tejido subcutáneo. Una vez alojados en estos sitios, las oncosferas maduran y se convierten en cisticercos, causando cisticercosis. Si las oncosferas migran al cerebro, a través de la circulación linfática, ahí llegan a madurar, se forman como cisticercos y pueden producir la neurocisticercosis humana.

Otra vía que pueden tomar los huevos liberados de la tenia madura y desarrollada, se presenta cuando las heces contaminadas son consumidas por los cerdos, los cuales pueden desarrollar la cisticercosis porcina. Luego, el ciclo se cierra cuando el humano consume carne de cerdo infectada con los cisticercos.

2. 1. 3. Patogenia

La presencia de una tenia anclada en el intestino del ser humano, genera síntomas clínicos leves que podrían ser pasados por alto o relacionados con otros problemas digestivos diferentes a la presencia del parásito, entre los que se encuentran ligeros dolores abdominales, con diarrea o estreñimiento, sensación de hambre, prurito anal, pérdida de peso, eosinofilia y debilidad².

A diferencia de la teniosis, la neurocisticercosis es la forma más maligna de las infecciones producidas por *T. solium*. Se estima que el período de incubación llega a ser tan largo (entre los 4-5 años) y la aparición de los síntomas varía en función del sitio en donde se establezcan los metacéstodos, el estado, número de parásitos y la reacción inmunológica que se presente². Sin

embargo, cuando hay un problema de neurocisticercosis, el síntoma más común es la epilepsia, aunque también hay alteraciones motoras, sensoriales y neurofisiológicas. Si se encuentra más de un cisticerco en diferentes sitios del cerebro, podrían presentarse parestesias, anestesia localizada, síntomas visuales y auditivos, afasia, amnesia e incluso cambios de conducta.

En el caso de la cisticercosis ocular, los cisticercos se alojan generalmente en la zona subretiniana o flotan en el humor vítreo, lo que produce alteraciones en la visión⁷.

2. 1. 4. Epidemiología

La teniosis y la neurocisticercosis son enfermedades que tienen mayor incidencia en países en vías de desarrollo (Fig. 5). En las décadas de 1940-1970, los países que presentaban la mayor frecuencia de cisticercosis eran Brasil, México y Perú. Estudios más recientes muestran que los pacientes seropositivos a anticuerpos anti-cisticerco están localizados en México, Perú, Guatemala y Ecuador; Sin embargo, en otros países como Colombia, India, China, Nueva Guinea, África del Sur, África Occidental, Isla de la Reunión, Madagascar y Zimbabwe también se llegan a encontrar casos importantes⁶.

En países desarrollados como los Estados Unidos de Norteamérica también se han reportado casos de neurocisticercosis, sin embargo, se ha considerado que ello se debe a la migración desde Latinoamérica de personas asintomáticas infectadas con solitarias y quienes luego de su internalización a la Unión Americana, se dedican en su mayor parte a la preparación de alimentos y, en su mayor parte, no han adquirido adecuados hábitos higiénicos que eviten producir contagio en sus comensales. La neurocisticercosis se ha considerado como un problema de salud pública reemergente en países desarrollados.

2. 1. 5. Tratamiento quimioterapéutico

Debido a que la cisticercosis es una de las enfermedades que mas daño producen por *T. solium*, una de las formas de su tratamiento es la utilización de fármacos antiparasitarios como el praziquantel (PZQ) y el albendazol (ABZ). Ambos fármacos son diferentes, el PZQ es una molécula isoquinoleína-pirazina acilada sintética, mientras que el ABZ es un derivado del bencimidazol y, por lo consiguiente, su mecanismo de acción es diferente. De acuerdo a Flisser y Pérez-Tamayo, estos fármacos, en general, no provocan efectos secundarios y son fácilmente absorbidos en el organismo⁶. Las dosis recomendada para el PZQ es de 50 mg/kg de peso, tres veces al día durante 15 días, causando mejorías en el 70 al 96% de los pacientes con neurocisticercosis. Para pacientes con tenias, se recomienda una dosis única de 10-25 mg/kg de peso^{8,9}. La dosis para el ABZ es de 15 mg/kg por un mes⁶. La dosis recomendada para pacientes con equinococosis es de 400 mg por 28 días, pudiéndose extender hasta 20 meses⁹. Sin embargo, a pesar de lo efectivos que son estos fármacos para la cisticercosis, aún se considera que no llegan a cubrir las necesidades de los tratamientos debido a que algunos pacientes no evolucionan favorablemente a su administración y que ambos fármacos sólo logran la eliminación del 60-80% de los cisticercos parenquimatosos, alojados en el sistema nervioso central¹⁰.

2. 2. Desarrollo de fármacos antiparasitarios

Una de las expectativas que se tienen con la química medicinal es el generar fármacos específicos y efectivos en contra de los parásitos; por ejemplo, el desarrollo de compuestos derivados de la molécula de bencimidazol podría ser una estrategia, tal y como se ha hecho para los compuestos experimentales RCB15 y RCB20. Estos compuestos, bajo condiciones *in vitro*, han mostrado tener actividad cestocida en cisticercos obtenidos del modelo experimental de *Taenia crassiceps* y se espera que un efecto semejante podría ser encontrado para cisticercos de *T. solium*. Lo interesante de tales compuestos es que, aparentemente, su mecanismo de acción podría estar

relacionado con cambios en la expresión de proteínas del citoesqueleto localizadas en las células flama de los parásitos¹¹.

La idea que se persigue al diseñar, sintetizar y evaluar los compuestos mencionados, tiene que ver con el hecho de que tomando como base a moléculas que se sabe tienen acción antiparasitaria, podrían ser generados algunos otros compuestos a los que se les podrían diseñar cambios estructurales o sustituciones de grupos funcionales para mejorar su capacidad antihelmíntica. La nitazoxanida es una de estas moléculas.

2. 2. 1. Quimioterapia según la OMS

Aún cuando existe una alta demanda de nuevos fármacos antiparasitarios en países endémicos, no hay desarrollo en este campo. Es posible que las razones por las que las industrias farmacéuticas no se interesan en la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos se deban al alto costo que implica el desarrollo de un nuevo fármaco, así como a las condiciones socioeconómicas insuficientes en los países endémicos¹². Esta es una situación que se refleja en la falta de apoyo financiero para proyectos que permiten la creación de fármacos o nuevas entidades químicas (NCE's, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, se invierte más en enfermedades como las causadas por bacterias (16 mil millones de dólares), o la malaria (200-300 millones de dólares), y cada uno de estos mercados produce un mayor número de NCE's: 2 NCE's/año para el caso de los antibacteriales y 2 NCE's/década para el de la malaria¹².

Las recomendaciones de la OMS para el tratamiento de la teniosis indican que es necesario aplicar un tratamiento universal o selectivo con praziquantel (10 mg/kg de masa corporal), el cual debe estar acompañado de medidas veterinarias que incluyen la mejora de la inspección y el control de la carne, la mejora de la cría de cerdos y de su inspección, así como el tratamiento de los animales infectados. En este mismo sentido, la OMS propone que hay más probabilidades de éxito a largo plazo del control de las enfermedades parasitarias, si los programas que involucran la terapia antihelmíntica se integran con la sensibilización del público y el mejoramiento de prácticas de higiene; para ello, es necesario tener una provisión de agua limpia y de saneamiento, así como de educación sanitaria acerca de la transmisión de los parásitos y de la manera de mejorar los hábitos de higiene, además de las condiciones sanitarias de personas y animales¹³.

En lo referente a la cisticercosis, es claro que la mejora generalizada de las condiciones de vida, acompañada de una legislación adecuada, la modernización de la cría porcina y el aumento de la eficiencia y de la cobertura de la inspección de la carne, son factores que han reducido la transmisión de cisticercosis en muchos países industrializados¹³.

2. 2. 2. Química Medicinal

La química medicinal es una disciplina que se origina desde principios del siglo XIX, pero su mayor auge se ha dado desde finales del siglo XX con el desarrollo de nuevos fármacos. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) la refiere como el descubrimiento, desarrollo, identificación e interpretación del modo de acción de un compuesto biológicamente activo a nivel molecular. El interés está puesto principalmente en el fármaco, aunque también concierne a la química medicinal el estudio, identificación y síntesis de productos metabólicos de medicamentos y compuestos relacionados¹⁴.

Los inicios de la aplicación de la química medicinal se basaron en la comprensión del principio activo de un extracto, ya fuera vegetal, animal o mineral, como sustancia química. A partir de estas concepciones surgió la idea de aislar, purificar y utilizar estos compuestos para el desarrollo de fármacos y así lograr un efecto directo en la cura de varios problemas de salud.

Algunos ejemplos de compuestos activos productos de la extracción de plantas y animales han sido el opio, la cafeína, la codeína, la atropina y la papaverina. En 1870, se identificó la primera

estructura química de un alcaloide, la coniína¹⁴. Otros ejemplos son la gramicidina, la insulina y el ácido salicílico son también buenos ejemplos de ello.

Una vez conocida la estructura de los compuestos, se procedió al diseño de nuevos fármacos a partir de dicha estructura a través de la modificación de ciertos grupos funcionales, mediante los cuales se buscó el mejorar la actividad de las moléculas originales. Para evaluar el efecto de estas mejoras, se toma como referencia un fármaco que presenta una actividad ya conocida y se estudia el efecto que tienen las modificaciones. Esta estrategia comenzó desde mediados del siglo XX, y, aunque no es de las más actuales, es la que más se ha utilizado con mayor éxito. Sin embargo, lo ideal en la elaboración de un fármaco tendría que estar basado en el concepto conocido como el diseño racional de fármacos.

2. 2. 3. Diseño racional de fármacos

Como se indicó anteriormente, la NTZ es un producto del diseño racional de fármacos y sus orígenes tuvieron como base la molécula de niclosamida. El diseño racional de fármacos tiene como objetivo el dejar de buscar de forma azarosa aquellas estructuras moleculares que pudieran tener el potencial de ser fármacos y llegar a curar enfermedades. Una de las metas es determinar exactamente qué cambios son necesarios en las moléculas, así como el predecir qué tipo de actividad podrían producir en los patógenos. Normalmente, la selección se basa en la identificación de algún blanco molecular (como un receptor), la comprobación de que el blanco del fármaco es afectado por la misma (y por ende, que el medicamento funciona), la búsqueda de una molécula líder (a través de la búsqueda de la estructura química del fármaco), la optimización del compuesto líder (el ajuste de su estructura química, de manera que cumpla con los criterios ADMET), estudios preclínicos y clínicos y la aprobación del medicamento por una organización o institución importante (por ejemplo, la OMS). ADMET se refiere al proceso mediante el cual una nueva sustancia se evalúa y se refiere a la determinación de características de la sustancia tales como su absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicología¹⁴. Si una sustancia cubre los aspectos que se indican, ello le permite ser considerada para su utilización en la terapia farmacológica.

2. 3. Nitazoxanida

2. 3. 1. Estructura química y propiedades farmacológicas

La NTZ [2-(acetililoxi)-N-(5-nitro-2-tiazolil) benzamida] es un compuesto derivado del 5-nitrotiazol (Fig. 6), originalmente descubierto por Jean François Rossignol en el Instituto Pasteur¹⁵, para tratar la criptosporidiosis. Cuando se administra la NTZ, sufre una biotransformación en la que su metabolito principal es un producto de desacetilación conocido como tizoxanida (TZX). *In vivo*, su vida media es de 6 minutos ya que rápidamente se convierte a TZX, la que a su vez, es rápidamente metabolizada por glucuronidación a TZX glucurónido, la cual nuevamente vuelve a ser metabolizada o bien, excretada del organismo. Es la TZX la molécula que tiene la actividad antiparasítica y antibacteriana¹⁶.

Se sabe, al menos para *Helicobacter pylori*, que el grupo 5-nitro de la molécula interactúa con enzimas del metabolismo intermedio, como las nitrorreductasas y la piruvato óxido-reductasa, las cuales se encargan de activar por nitrorreducción a NTZ y, de esta manera, le permiten ejercer su actividad antimicrobiana¹⁷.

Cuando se administran 500 mg de NTZ en adultos, dos veces al día, los niveles más altos de TZX y TZX glucurónido llegan a ser de 10 µg/mL y tales niveles se alcanzan a las 2-4 horas para TZX y a las 4-5 horas para TZX glucurónido, después de una semana¹⁵. Este fármaco también ha sido aplicado a dosis de 1 g en pacientes con SIDA y se ha observado que no presenta efectos adversos importantes, aunque se ha encontrado la aparición de efectos colaterales gastrointestinales (náusea y vómito) los que aumentan con la dosis^{18, 19}.

2. 3. 2. Usos de la NTZ en el tratamiento farmacológico de enfermedades infecciosas.

Su acción es efectiva contra una amplia variedad de parásitos y bacterias que infectan tanto a animales como al hombre. Su espectro contra parásitos es amplio porque se ha comprobado que tiene acción no sólo en contra de protozoarios, sino también en contra de cestodos, nematodos y trematodos. Se ha encontrado que este fármaco es igualmente efectivo en el tratamiento de ciclosporiasis e isosporiosis, amebosis y fasciolosis¹⁹ y presenta pocos efectos secundarios^{19, 20}. También, resulta muy efectiva en el tratamiento de cepas de *Helicobacter pylori* resistentes a metronidazol²¹. En helmintos, se ha demostrado su efectividad para el tratamiento de teniosis humana por *T. saginata*²². La NTZ y la TZX presentan un amplio intervalo de acción de cepas en bacterias aerobias y anaerobias; hay estudios que demuestran que la NTZ es más efectiva que el metronidazol, la amoxicilina, la amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina, cefoxitina, imipenem y clindamicina²³. Otros estudios determinan que la NTZ tiene una efectividad del 71-100% para eliminar infecciones producidas por *Entamoeba histolytica/E. dispar*, *Giardia duodenalis*, *Blastocystis hominis*, *Isoospora belli*, *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris* e *Hymenolepis nana*, en casos registrados en el estado de Querétaro, México²⁰.

2. 3. 3. Eficacia terapéutica de la NTZ en organismos relacionados a *Taenia*

Aparentemente el fármaco es mas efectivo en contra de protozoarios, sin embargo, hay estudios que demuestran su eficacia en *Echinococcus multilocularis* y por lo consiguiente ello podría ser lo mismo para los cestodos. De hecho, los estudios en que se ha valorado el ABZ combinado con NTZ han demostrado que la combinación causa un daño importante en pruebas *in vivo*²⁴. A nivel de microscopía electrónica se ha encontrado que la NTZ, en comparación con tratamientos con ABZ, provoca un daño severo en el tegumento y la capa laminada de los metacéstodos; mientras que el ABZ mostró ser un parasitostático, la NTZ se comportó como un parasiticida. En otros estudios, en ratones infectados con metacéstodos, varios de los parásitos tratados con ABZ se mantuvieron viables, a diferencia de los tratados con NTZ de los cuales ninguno sobrevivió²⁵. Mientras que para *T. saginata* la NTZ es efectiva a una dosis de 25 mg/kg²², durante su evaluación *in vitro* (en combinación con la TZX) en contra de cisticercos de *T. crassiceps* se encontró que el fármaco produjo alteraciones en la capa germinal, a diferencia de lo encontrado con el ABZ en donde no hubo daños severos en los parásitos. Aparentemente, según los mismos estudios, la combinación de TZX y el sulfóxido de ABZ, tiene un efecto sinérgico sobre la capa germinal de los parásitos y ello implica que el efecto encontrado por la combinación es la sumatoria de lo que cada uno de los dos fármacos tiene por separado²⁶.

2. 4. Citoesqueleto y su efecto por nitazoxanida en parásitos

El citoesqueleto constituye una red de fibras proteicas de localización citoplásmica. Tiene una gran variedad de funciones celulares como el movimiento de las células a través de cilios y flagelos, contracción muscular, movimiento de organelos, de cromosomas, migración celular y genera la forma celular²⁷. Las principales fibras proteicas que lo componen son los filamentos de actina o microfilamentos (formados por monómeros de actina) con un diámetro de 7 nm, los microtúbulos (formados de dímeros de α y β tubulina), con un diámetro de 24 nm, y los filamentos intermedios con un diámetro de 10 nm²⁷.

El movimiento celular está dado por el citoesqueleto de actina, que tiene la capacidad de controlar la forma de toda la célula por el ensamblaje en una región y densensamblaje en otra de los filamentos de actina, lo que permite, además de cambiar la forma, el movimiento de la célula como ocurre en los lamelipodios de las amebas²⁷. Las fibras musculares están formadas por filamentos de actina y miosina. Estas proteínas tienen como función favorecer los fenómenos de contracción

muscular tanto de células de músculo liso como estriado. El mecanismo de la contracción muscular se lleva a cabo por una hidrólisis de ATP por la miosina, se regula por calcio y AMP cíclico²⁷. La actina se encarga de activar a la miosina para que cumpla el rol de ATPasa. Los monómeros de actina globular (G) tienen un peso de 43-45 kDa, los filamentos de actina (F), la forma filamentosa, hasta de 2500 kDa. La miosina tiene variedades amplias de proteínas; en el caso de la familia de las miosinas tipo II, las cuales son los motores del movimiento muscular, las proteínas son diméricas y de alto peso molecular (440 kDa) y están constituidas por dos monómeros o cadenas pesadas homólogas; presentan una región globular y otra filamentosa²⁷. La región globular de miosina tiene un sitio de interacción con actina F, así como un sitio catalítico de ATP; cuando la miosina presenta la interacción con actina F, su desempeño pasa de una molécula de ATP hidrolizada por cada 30 segundos a 5-10 moléculas de ATP por segundo. Las cadenas ligeras, que se ubican en la porción globular de la miosina regulan las propiedades de unión a actina así como su acción enzimática²⁷.

Los microtúbulos se localizan en el citoplasma de todas las células eucariotas y se organizan en fibras huecas, las cuales a menudo se empaquetan en haces con la formación de puentes que le dan resistencia y rigidez a los paquetes. Uno de sus papeles más importantes se presenta durante la división celular: cuando ocurre la mitosis, el centriolo y los centros organizadores de microtúbulos forman los polos del huso mitótico. El huso mitótico permite que cada una de las células hijas reciba la misma cantidad de información genética que la célula parental. Los microtúbulos conforman, además, los cilios y flagelos eucariotas, los cuales son extensiones de la membrana plasmática. Cada cilio o flagelo contiene un anillo de nueve pares de microtúbulos fusionados, con un par no unido en el centro del anillo (arreglo 9 + 2). Este patrón de microtúbulos lo determina el cuerpo basal o centriolo, situado justo por debajo de la membrana plasmática. El ATP generado para mover los cilios y flagelos está dado por las mitocondrias que se encuentran muy cercanas al cuerpo basal²⁷. En el caso de *T. solium*, se observa la disposición ciliar dentro de las células flama⁴.

Es poco lo que se conoce del citoesqueleto de los céstodos. Se sabe que tienen sistemas musculares de tipo liso, formados por una parte citoplásmica no contráctil (miocito) y otra fibrosa, contráctil, que contiene filamentos presumiblemente de actina y miosina²⁸. Las miofibrillas de los céstodos se parecen a la de los turbeláridos y muchos trematodos: no estriadas y con miofilamentos gruesos y delgados. En trematodos se presenta un retículo sarcoplásmico poco desarrollado y carecen del sistema T tubular (invaginaciones tubulares del sarcolema). En céstodos, las miofibrillas estriadas se encuentran en algunos casos²⁸. En el caso de *T. solium* se ha demostrado que los cisticercos expresan hasta siete isoformas de actina²⁹ y tres isoformas de miosina II³⁰.

Por otra parte, se sabe poco o nada de si los fármacos antiparasitarios tienen efecto sobre la distribución de algunas de estas proteínas; del ABZ se sabe que altera la polimerización de los microtúbulos en los parásitos³¹ y, recientemente, parece que algunos compuestos derivados del benzimidazol tienen también efecto sobre la estructuración de la actina F y la miosina II¹¹.

2. 5. Microscopía de fluorescencia

Esta es una de las estrategias de observación más modernas. Permite mirar como se presenta la distribución de proteínas estructurales tales como las del citoesqueleto en los tejidos de muchos organismos. Bajo esta estrategia se espera que luego de que una luz de cierta longitud de onda incida sobre los electrones de los átomos de una sustancia, los electrones se exciten y emitan una energía luminosa que produce fluorescencia. La fluorescencia emitida ha sido estimulada por una fuente externa de energía y ello da como resultado el que se produzca una absorción de luz y una emisión de radiación electromagnética³². El funcionamiento de las diferentes excitaciones de los fluorocromos se debe a que estas sustancias requieren de dos tipos de longitud de onda; una de emisión y otra de excitación. En las moléculas fluorescentes, un tipo de luz (excitación) incide, pero la fluorescencia emitida es producida en otra longitud de onda diferente. Luego, para dejar pasar sólo la emisión deseada, se hace uso de filtros apropiados debajo del condensador del microscopio y encima del objetivo con lo que se logra definir la intensidad de la emisión producida. La utilidad de

la microscopía de fluorescencia es tal que permite la observación detallada de estructuras marcadas fluorescentemente y que se encuentran al interior de las células o de los tejidos, se puede eliminar la fluorescencia intrínseca (autofluorescencia) que muchos tejidos presentan, o bien, se puede observar la combinación de diversos fluorocromos en un mismo tejido. Además, esta tecnología permite que la sensibilidad del microscopio de fluorescencia tenga la capacidad de detectar cantidades muy pequeñas de material fluorescente bajo una alta sensibilidad y con una gran precisión³².

Una de las técnicas de vanguardia de la microscopía de fluorescencia es la microscopía confocal; un microscopio convencional crea imágenes con una profundidad de campo de alto poder de 2-3 μm , en donde incluso se pueden observar estructuras de hasta 0.2 μm . Un microscopio de epifluorescencia convencional permite, por el empleo de una luz de excitación y de emisión colectada por los objetivos, llegar a todo el espécimen e incluso observar la emisión por arriba y por abajo de los planos focales. Sin embargo, esta profundidad de observación de campos produce la superposición de imágenes y ello genera pérdida del detalle de lo que se pretende resolver; por lo consiguiente, la imagen resulta degradada por el reducido contraste y la baja nitidez. Por estas circunstancias, la microscopía confocal resulta mejor para las observaciones de marcajes fluorescentes, ya que con esta tecnología se controla la profundidad del campo, por la reducción o eliminación de la información de fondo que queda fuera del plano focal y por la capacidad de coleccionar secciones ópticas seriales de especímenes con grosor importante. Estos avances permiten obtener imágenes de muy alta calidad con respecto a la microscopía de fluorescencia, aunque sigue su mismo principio (<http://www.olympusfluoview.com/theory/index.html>).

En el presente proyecto de investigación se determina el efecto de la NTZ en diferentes estadios de desarrollo de *T. solium* sobre diferentes proteínas del citoesqueleto mediante el empleo de microscopía de epifluorescencia confocal. Los resultados obtenidos muestran que la NTZ afecta la distribución de la actina filamentosa a nivel de las células flama de los parásitos.

III. OBJETIVOS

3.1. General

- Establecer si mediante microscopía de epifluorescencia confocal es posible determinar si la NTZ afecta la distribución tisular de proteínas específicas del citoesqueleto de diferentes estadios parasitarios de *Taenia solium*.

3.2. Específicos

- Comparar el estado de los tejidos parasitarios en ausencia o en presencia de tratamiento de los parásitos con NTZ.
- Determinar si la NTZ afecta la distribución de las proteínas del citoesqueleto tales como actina-F, miosina II y tubulina- α en tejidos de cisticercos, cisticercos evaginados y adultos.

IV. HIPÓTESIS

La nitazoxanida altera la distribución de proteínas específicas del citoesqueleto de parásitos de diferentes etapas de desarrollo de *Taenia solium* y esto produce cambios en su morfología.

V. JUSTIFICACIÓN

El citoesqueleto de los diferentes estadios de *Taenia solium* seguramente es uno de los componentes estructurales importantes para que los parásitos mantengan su morfología, lleven a cabo la adquisición de nutrientes desde el microambiente en el cual se encuentran, favorezcan la eliminación de sustancias de desecho o tóxicas y con todo ello, se permita de forma eficiente que sobrevivan dentro de sus hospederos. Por tales causas, cualquier circunstancia que produzca alteración alguna en la estructuración del citoesqueleto producirá cambios en los parásitos que podrían conducir a su muerte. Uno de los efectos más claros sobre las estructuras del citoesqueleto es la acción de fármacos derivados de los benzimidazoles como el ABZ. En el presente proyecto, debido a que se ha encontrado la NTZ tiene efecto en los parásitos, se ha abordado la evaluación de si este fármaco produce alguna alteración sobre el citoesqueleto, lo cual puede contribuir a la comprensión de la forma en que la NTZ podría estar actuando. Los elementos que apoyan esta propuesta están basados en estudios de ultraestructura mediante microscopía electrónica de barrido, la exposición de los parásitos a NTZ produce alteraciones en la morfología de los parásitos que podrían estar asociadas a proteínas del citoesqueleto. Por tales causas se ha considerado que el citoesqueleto se ve afectado por la NTZ y con el presente proyecto se intenta encontrar si existe tal relación.

VI. ALCANCE

Debido a que los fármacos antiparasitarios de uso actual en el tratamiento de enfermedades producidas por *Taenia solium* no están cubriendo las necesidades que de ellos se espera, existe la preocupación de buscar alternativas que permitan un tratamiento eficiente y la NTZ, por su amplia acción antiparasitaria que se ha demostrado en otro tipo de parásitos, podría ser una opción farmacológica ideal; sin embargo, para lograrlo, se debe establecer a que nivel actúa el fármaco y cuál es su posible mecanismo de acción. Los resultados que se obtengan permitirán ampliar conocimientos al respecto y podrán abrir opciones de tratamiento parasitológico.

VII. MÉTODOS Y TÉCNICAS

7. 1. Obtención de los parásitos

Se recuperaron cisticercos de la carne de cerdo infectada con *T. solium*, se lavaron con solución salina fisiológica (SSAF) y se dividieron en varios grupos como se describe posteriormente para su mantenimiento *in vitro*, inducción a la evaginación y obtención de parásitos adultos.

7. 2. Mantenimiento *in vitro* de los parásitos

Después de ser lavados, los parásitos se colocaron en medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO) 16.2 g/L disuelto en agua desionizada (Milli-Q). El medio se complementó con 2.2 g de NaHCO₃ y 2.2 g de buffer HEPES (GIBCO). Se ajustó el pH a 7.2 y se aforó a 1 L con agua desionizada. El medio fue esterilizado por filtración con filtros de 0.22 µm (Millipore). Enseguida, se agregó al medio de cultivo, antibiótico-antimicótico (GIBCO BRL) a una concentración del 1%.

Se hicieron dos grupos de parásitos, uno de ellos sirvió como control, en el cual sólo se agregó DMSO al 0.25% y etanol al 0.15%. El otro contenía NTZ disuelta en DMSO a una concentración de 2.5 µg/mL.

7. 2. 1. Cisticercos

Una vez recuperados de la necropsia de los cerdos y lavados, los cisticercos se colocaron en medio de cultivo en ausencia o en presencia de NTZ durante 28 horas bajo condiciones definidas (37° C, 5% de CO₂ y 95% de humedad). Como los controles evaginaron, no se ocuparon para estos ensayos y se recurrieron a cisticercos extraídos directamente de la carne de cerdo.

7. 2. 2. Cisticercos evaginados

Debido a que otra parte de los cisticercos, inmediatamente después de que se aislaron de la carne de cerdo, comenzaron a evaginar, se les seleccionó por estas causas y se les colocó en el cultivo durante 23 horas como se indicó anteriormente.

7. 2. 3. Parásitos adultos

Para la producción de la teniosis experimental, grupos de ocho cisticercos se emplearon para infectar hámsteres dorados por vía oral. Los animales eran hembras, previamente desparasitadas con albendazol (30 mg/Kg de peso, cinco días) e inmunosuprimidas a lo largo de un mes por la administración, cada 15 días, con depomedrol (Pfizer) a una dosis de 2 mg/100 g de peso. Una vez transcurrido el tiempo de infección, los animales se sacrificaron colocándolos en cámara letal con cloroformo, se recuperaron sus intestinos y de ellos se hizo la obtención de las tenias. Luego se colocaron en el cultivo *in vitro* en presencia de la NTZ bajo las condiciones ya indicadas. Para los experimentos de la evaluación del efecto de la NTZ, con la finalidad de contar con un control, se seleccionó una tenia que no se mantuvo en cultivo y de ella se recuperó uno de sus estróbilos de aproximadamente 5 mm de longitud.

7. 3. Inclusión de parásitos y obtención de criocortes

Luego del mantenimiento en cultivo *in vitro*, los parásitos se recuperaron e incluyeron en una solución de inclusión (Tissue-Tek; Sakura) en cápsulas de inclusión tamaño "00" (Electron Microscopy Sciences) e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. Una vez fijados los parásitos, se guardaron congelados hasta su seccionamiento.

Para el seccionamiento de los parásitos se utilizó un criostato LEICA CM 1100, con el cual se obtuvieron criocortes de 10 μm de grosor, los cuales se colocaron en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina 1:9 (Sigma) y se fijaron con acetona fría durante 5 min. Una vez fijados los criocortes, estos se procesaron para su observación por microscopía de fluorescencia como se describe mas adelante.

7. 4. Inmunofluorescencia

Los criocortes de los parásitos se delimitaron con barniz transparente, se incubaron con solución de bloqueo que contenía SSAF/Tw₂₀ 0.3%/BSA 2% bajo condiciones definidas (37° C, 1 h, en cámara húmeda), se lavaron por segunda ocasión con SSAF y luego con SSAF/Tween₂₀ 0.3% y se incubaron, bajo las condiciones descritas, en presencia de los anticuerpos primarios y secundarios. Como anticuerpos primarios se utilizaron el anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina DM1-A a una dilución 1:100 para teñir tubulina- α , y el anticuerpo policlonal anti-*T. solium*³⁹, para teñir miosina tipo II a una dilución 1:1000, ambos diluidos en solución de bloqueo. Luego de la incubación con el anticuerpo, las laminillas se lavaron tres veces con SSAF 1X, tres con SSAF 1X/Tween₂₀ 0.3% y nuevamente se incubaron en presencia de los anticuerpos secundarios. Como anticuerpos secundarios se utilizaron el anti-IgG de ratón conjugado a fluoresceína a una dilución 1:30, para revelar tubulina y el anti-IgG de conejo conjugado a biotina a una dilución 1:30, para revelar miosina. Como el anti-conejo conjugado a biotina no contenía el fluoróforo que revelaría a miosina, se agregó un tercer elemento, la avidina-rodamina, que se unió a biotina y permitió el revelado de la miosina en los tejidos. Luego de la incubación con los anticuerpos secundarios, las laminillas se lavaron y procesaron en condiciones idénticas (37° C, 1 h, en cámara húmeda). Para su observación al microscopio, con la finalidad de mantener la fluorescencia en los cortes, las muestras se cubrieron con una o dos gotas del medio de montaje DAKO (DakoCytomation) se les colocaron los cubreobjetos y éstos se sellaron con barniz transparente. Una vez hecho el montaje, las placas se guardaron a 4° C protegidas de la luz con papel aluminio hasta su observación al microscopio.

No en todos los casos se hizo tinción fluorescente con anticuerpos ([Tabla 1](#)). En el caso del marcaje fluorescente de la actina filamentosa, ya que no se hizo uso de anticuerpos, se utilizó la faloidina rodaminada, que se une directamente a la actina filamentosa. En el caso de la tinción de núcleos celulares, se empleó el DAPI (4',6-Diamidino-2-fenil-indol; Sigma) a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y luego, las laminillas procesadas con este marcador fluorescente se incubaron por 30 min en oscuridad a temperatura ambiente.

7. 5. Adquisición, almacenamiento y edición de imágenes

Las laminillas se observaron inicialmente con un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E 600 y el registro de las imágenes se hizo mediante fotografía con películas fotográficas Fujicolor Superia Asa 1600, bajo observaciones con objetivos de 20x (Nikon Japan Plan Fluor 20x/0.50; Ph1 DLL) y 40x (Nikon Plan Fluor 40x/0.75; Ph2 DLL), y las observaciones se hicieron en presencia de los filtros G-1B (EX 541-551, DM 565, BA 590), para la observación de la fluorescencia por rodamina; B-2A (EX 450-490, DM 500, BA 515), para fluoresceína, y TRIPLE D-F-R (DAPI, FITC, TRITC), para la colocalización de la fluorescencia por rodamina, fluoresceína y DAPI. Las mejores laminillas se observaron en el microscopio confocal.

Para las observaciones se empleó un microscopio confocal Olympus ubicado en el Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM. Las condiciones bajo las cuales se hicieron tales observaciones fueron las siguientes: objetivo 10x (UPLSAPO NA:0.40), para aumentos de 10x y objetivo 60x (UPLSAPO NA:1.35), para aumentos de 60x. Con este último objetivo de observación se empleó el sistema de zoom digital del equipo para lograr aumentos de 3x y 5x. Las condiciones de longitudes de onda de los láseres empleados para el DAPI fueron: excitación 405 nm y emisión 461 nm. Para FITC: excitación 488 nm y emisión 519 nm. Para rodamina, excitación 543 nm y

emisión 591 nm. El registro de las imágenes se hizo mediante el programa de cómputo Olympus Fluoview FV1000 Ver 1.6. Con la finalidad de lograr observaciones en Z, se adquirieron de 14 a 28 imágenes OIB de 0.37 μm de espesor, que se guardaron en formato TIFF.

Todas las imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia y confocal se editaron bajo el uso del programa de cómputo Adobe Photoshop 7.0.

7. 6. Edición para imágenes para su visualización en 3-D.

Las imágenes guardadas en formato TIFF se procesaron mediante el paquete de cómputo Amira 4.0, a través del cual se hicieron sus reconstrucciones tridimensionales, se agregó color y volumen a las imágenes. Las imágenes obtenidas se proyectaron en la pantalla semicilíndrica (de 140°, de 8.9 m de largo X 2.55 m de ancho), localizada en la sala de visualización Ixtli por inmersión virtual (www.ixtli.unam.mx) y se hicieron observaciones del interior de los tejidos. Las imágenes obtenidas para su observación en computadoras convencionales se hicieron bajo formatos TIFF para imágenes fijas y MPG para animaciones o videos.

VIII. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Debido a las necesidades de evaluar si las condiciones de marcaje fluorescente eran las adecuadas, se hizo una evaluación inicial mediante microscopía de epifluorescencia. Luego, una vez corroborado que el marcaje era el correcto, las observaciones de los marcajes fluorescentes se hicieron mediante microscopía confocal.

8. 1. Microscopio de epifluorescencia.

Como se muestra en las figuras 7, 8 y 9, las observaciones se hicieron en criocortes de cisticercos evaginados en ausencia y en presencia de tratamiento con NTZ. La figura 7 muestra el marcaje de la tubulina; la figura 8, de miosina II y en la figura 9 se presenta la colocalización del marcaje fluorescente de tubulina y actina.

En la figura 7 las imágenes corresponden a dos diferentes aumentos de la pared vesicular de los cisticercos, una vez que sufrieron evaginación de su escólex y como se observa en ambos casos, hay un marcaje fluorescente intenso del tegumento sincicial continuo; mientras que en la figura 7A se muestra el criocorte de un cisticerco evaginado en ausencia de tratamiento a un aumento de 20x, en la fig. 7B se muestra una zona semejante, pero a aumentos de 40x, de un cisticerco evaginado tratado con NTZ. En ausencia de tratamiento con NTZ, se encontró que la tubulina está localizada a lo largo de todo el tegumento (Fig. 7A), pero el marcaje es suficiente para definir el contorno de esta región tisular del parásito. En el caso del tratamiento con la NTZ (Fig. 7B), aún cuando la observación se hizo a mayor aumento, el marcaje fluorescente es semejante a lo observado en la figura 7A, pero a diferencia de ella, se observan acumulaciones de marca; se observó que próximo a la superficie, los cúmulos de marcaje fluorescente son numerosos e intensos a diferencia de lo que se observó más al interior de los parásitos casi en proximidad hacia la zona en que se encuentra el fluido vesicular. Cabe la posibilidad, según lo observado, que en presencia de NTZ se induzca a un aumento de la tubulina acumulada en el tegumento, lo cual podría estar relacionado con la alteración que sufre el tejido que contiene a la proteína.

En lo referente al marcaje para miosina II como se muestra en la figura 8, a diferencia de lo observado para la tubulina, la fluorescencia tuvo un patrón distinto. Se le encontró en el tegumento y en la capa germinal, tal y como se había demostrado para el reconocimiento de los anticuerpos anti-miosina³³. En la figura 8A, el criocorte corresponde a un cisticerco sin tratamiento, se observa que además de la fluorescencia roja asociada al reconocimiento de los anticuerpos anti-miosina, aparece un marcaje fluorescente de color púrpura y que está asociado al marcaje fluorescente de los núcleos marcados con DAPI. El color púrpura producido podría deberse a la combinación de colores de la fluorescencia emitida por la rodamina y el azul del DAPI y sólo se encuentra en la capa germinal pero no en el tegumento. Luego, por debajo de la capa en donde se encontraron los núcleos, se observaron las fibras de miosina las cuales corren longitudinalmente por debajo del tegumento. En la 8B se muestra un criocorte del parásito que recibió tratamiento, los núcleos se encontraron más cerca del tegumento, las fibras musculares reveladas con los anticuerpos anti-miosina se presentaron delgadas, cortas y compactadas cerca del tegumento, con un patrón de apariencia desordenada debajo de él. Por las observaciones obtenidas, también se observó que bajo el tratamiento de los parásitos con la NTZ, se altera la constitución del tegumento, las fibras musculares tanto en su forma y tamaño, así como en su distribución. La alteración que sufrió el tegumento, así como las fibras musculares de los parásitos, podría ser un indicativo del grado de daño sobre los parásitos, ya que se observan cambios importantes que alteran su estructura tisular, su flexibilidad y, seguramente, se presentan alteraciones de los procesos fisiológicos en los que está involucrado el tegumento como la absorción de nutrientes y los procesos de contracción muscular debido a las alteraciones de las fibras musculares.

En la figura 9 se muestran varias imágenes del tegumento de un cisticerco evaginado tratado con NTZ. Como en las figuras anteriores, la zona corresponde a una región de pared vesicular (PV)

cercana al escólex evaginado. La marca fluorescente de tubulina se muestra en la [figura 9A](#) y la cual tiene una distribución semejante a la observada en la [figura 7B](#); hay cúmulos de fluorescencia intensamente marcados y los cuales se encuentran cercanos al tegumento (indicados con flechas negras). Según las imágenes se observó que del tegumento hay desprendimiento de una cantidad importante de vesículas que aparentemente están asociadas al mismo. La actina filamentosa, revelada por la faloidina rodaminada, se observa en el tejido de la [figura 9B](#). En esta imagen hay una expresión importante de la actina, principalmente en la zona del tegumento, sitio donde se observan las vesículas en aparente desprendimiento. En la [figura 9C](#) se muestra la colocalización de actina y tubulina reveladas fluorescentemente y en la [figura 9D](#) se muestra un marcaje fluorescente semejante a la de la [figura 9A](#), sólo que se muestra al tejido mediante la técnica de Interferencia diferencial de Nomarsky o también conocida como contraste diferencial de interferencia (DIC) en combinación con el marcaje fluorescente. Las imágenes de la [figura 9](#), al igual que las otras de las [figuras 7](#) y [8](#), muestran la alteración del tejido debido al tratamiento con la NTZ, así como los cambios que las proteínas del citoesqueleto sufren en relación a su distribución. Al parecer, tanto la actina como la tubulina están presentes en las vesículas que parecen desprenderse del tejido. Su presencia podría ser un indicativo de que hay pérdida de tejido de los parásitos bajo tratamiento, así como cambios en la estructura general del tegumento, lo cual afecta la fisiología de los parásitos en la que de manera importante, el tegumento juega un papel tanto en la absorción de nutrientes como en la excreción de productos.

8. 2. Microscopio confocal

Luego de las observaciones de los criocortes por microscopía de epifluorescencia y dado que se consideró que ya estaban ajustadas las condiciones precisas de marcaje, se decidió, bajo las mismas condiciones, hacer las observaciones mediante el microscopio confocal. Bajo esta estrategia de observación se logró establecer la distribución de las combinaciones actina filamentosa con tubulina- α y de miosina-II con tubulina- α en los tejidos de los parásitos, tal y como se describe a continuación.

8. 2. 1. Actina-F y Tubulina- α

Las observaciones se hicieron a nivel general tanto en cisticercos, en cisticercos evaginados y en parásitos adultos. En cada uno de los casos se puso atención en el marcaje fluorescente del tegumento, la porción cefálica de los parásitos y en las células de la matriz intersticial como las células flama.

8. 2. 1. 1. Cisticercos

Como se observa en la [figura 10](#) (A-D), a 10x de aumento, los criocortes teñidos por fluorescencia muestran la distribución clásica de los tejidos de la fase larvaria de *T. solium* como ya se había descrito^{33, 34}; en lo que se refiere a la pared vesicular, los cisticercos presentan su tegumento sincicial continuo y la región parenquimatosa correspondiente a la capa germinal de células. En el caso del escólex invaginado, específicamente en uno de los canales espirales, se observa cómo esta parte del parásito se encuentra en forma de tejido discontinuo y el cual corresponde a parte del escólex de la tenia enrollada en el interior de la pared vesicular ([Fig. 10D](#)). La fluorescencia correspondiente a la tubulina- α se muestra en la [figura 10A](#): en la imagen se observa cómo la proteína se presenta en la superficie del tegumento sincicial continuo, así como en la superficie, también del tegumento sincicial continuo del canal espiral. Se observa que la marca fluorescente es intensa en esta región del cisticerco y se diluye hacia el interior del escólex invaginado. En el caso de la colocalización con el DAPI en la faloidina rodaminada ([Fig. 10B](#)) se

observa que el primero tiñe en azul los núcleos celulares localizados en la PV y dentro del escólex invaginado, mientras que en el caso de la segunda, que tiñe la actina, el marcaje fluorescente en rojo se presenta básicamente en el tegumento sincicial continuo del escólex invaginado y luego hacia el interior del mismo en sitios puntuados específicos. En la [figura 10C](#) se muestra la combinación de los marcajes fluorescentes; como se observa, la colocalización muestra que el DAPI, la faloidina rodaminada y los anticuerpos secundarios fluorescentes marcan estructuras tisulares que no se superponen. En algunos casos, las marcas fluorescentes, como en el caso de la pared vesicular, el DAPI y la fluorescencia están en sitios distintos, mientras que en el escólex invaginado se les encuentra en aparente asociación. Debido a la colocalización de la actina-F, el DAPI y la tubulina- α en el canal espiral (CE) del escólex invaginado, las estructuras celulares marcadas corresponden a las células flama descritas con la misma forma de marcaje fluorescente reportada⁴, sin embargo a este nivel sólo se pueden ver como puntos fluorescentes, sin poder lograr verse el detalle de estas estructuras. A nivel de la PV no fue posible tomar una buena imagen que reflejara cómo se encuentra distribuida la actina filamentosa en las fibras musculares de la PV; sin embargo en imágenes no publicadas y como lo visto en Ambrosio *et al*³⁴, la actina-F se la encuentra formando parte importante de la PV en los metacéstodos invaginados.

Cuando los cisticercos se trataron con NTZ se encontró que el fármaco produjo cambios dramáticos en los tejidos de los parásitos ([Fig. 11](#)). Es necesario indicar que la imagen mostrada en la figura 11 equivale a la de la figura 10, sólo que el escólex en el tratado de la figura 11 presentó un encogimiento, seguramente debido al efecto del fármaco, lo que permitió que casi todo el tejido pudiera ser visto al aumento de 10x, en tanto que en el control de la figura 10, al mismo aumento, sólo se logró ver una porción del escólex. En las imágenes se observa tanto a la PV como a la zona del tegumento del escólex, entre otras estructuras. En la porción cefálica del escólex invaginado, se observó la pérdida de la morfología característica de las ventosas cuando se les marcó fluorescentemente con faloidina³⁴; según lo observado en la [figura 11B y C](#), las ventosas perdieron parte de las fibras musculares teñidas con la faloidina rodaminada y por lo consiguiente, su estructura. En el caso de la tubulina- α , la marca fluorescente se incrementó al nivel del tegumento sincicial continuo, en el parénquima del parásito invaginado y se mantuvo en las células flama ([Fig. 11 A y C](#)). [La figura 11D](#), donde se observó el tejido mediante DIC, mostró que al menos en el criocorte observado hubo una aparente pérdida de tejido, sobre todo en la porción cefálica del parásito invaginado. En esta zona se observó en una ventosa, lo cual se confirmó por el marcaje fluorescente ([Fig. 11C](#)) en donde sólo una parte de la ventosa tuvo fibras musculares marcadas con la faloidina, pero sí tenía una gran cantidad de núcleos. Igual que en el cisticerco control, se alcanzan a ver pequeños puntos verdes correspondientes a células flama (CF). A diferencia de la combinación de los marcajes fluorescentes empleados en la [figura 10C](#), en el criocorte de la [figura 11C](#) se observa que los tres marcadores fluorescentes se mezclaron por lo que en los cortes se observaron fluorescencias naranja-azul turquesa. Según el marcaje fluorescente de las fibras musculares de las ventosas, la intensidad de las fibras de estos tejidos se encontró reducida ([figura 11B](#)). Todo esto parece indicar que la NTZ afectó no sólo al tegumento sincicial de la PV, como lo vimos en las imágenes obtenidas del microscopio de epifluorescencia, sino también al tejido interno, en el momento en que se ha perdido ya una gran cantidad de éste en la zona del escólex invaginado y las ventosas también quedaron destruidas. Al haberse destruido el aparato de anclaje del parásito que es el escólex invaginado, hace prácticamente imposible que el cisticerco pueda desarrollarse en adulto, al no poder adherirse con sus ventosas y los ganchos al epitelio intestinal. Además, si el tegumento a nivel de PV está siendo afectado, también sería imposible que éste pueda desarrollar la función de absorción, como ya se indicó anteriormente.

8. 2. 1. 2. Cisticercos evaginados

Una vez que los cisticercos evaginaron bajo las condiciones en que se les estudió, como se muestra en la [figura 12](#), se observó que presentaron una distribución distinta a la de los cisticercos

sin evaginar (Fig. 10). El tejido parasitario sufre una compactación y comienzan a destacar las regiones características de los gusanos en su forma adulta: una cefálica, en la que se encuentran el escólex y las ventosas, el cuello y la cadena estrobilar. En la figura 12 se muestra un criocorte donde el parásito está en pleno proceso de evaginación, ha perdido la pared vesicular y el escólex comienza a desenrollarse para dar lugar a la tenia emergida de lo que queda de la PV del cisticercos como se observa por DIC (Fig. 12D). A este nivel, se observó un marcaje fluorescente intenso por parte de los anticuerpos fluorescentes, la faloidina rodaminada y el DAPI. La comparación del criocorte de esta figura con la figura 10, muestra que, en el caso del marcaje fluorescente de la tubulina- α (Fig. 12A), éste se presenta por todo el parénquima tisular, pero se concentra en las CF. En el caso de la faloidina rodaminada (Fig. 12B), la marca se encontró asociada a las fibras musculares distribuidas por todo el tejido, así como a la que se encuentra en puntos asociados a núcleos que corresponden a CF, según lo descrito⁴. Se encontró en estos cortes que la intensidad de la actina-F se incrementó notablemente cuando las fibras musculares (FM) asociadas a ellas se marcaron intensamente. Cuando se evaluó la colocalización de los marcajes fluorescentes como se muestra en la figura 12C, se encontró que había una colocalización entre los núcleos y el marcaje con tubulina- α , mientras que la actina-F se encontró localizada en regiones específicas del tejido parasitario.

Como se observa en la figura 13, de la misma manera que en la 11, el tratamiento con NTZ en los cisticercos produjo serias alteraciones en los tejidos: hubo una pérdida de tejido en la zona del escólex, daño en las ventosas las cuales alteraron su forma clásica (Fig 13D), además hubo pérdida de tejido parenquimatoso relacionado con la zona del rostelo. En el corte presentado en la figura 13, el tejido parece haberse retraído hacia los bordes de la porción cefálica y, según lo que se observa en la figura 13B, hay un cúmulo importante de células por la tinción de los núcleos con DAPI. En la misma figura se observan fibras musculares teñidas por la faloidina rodaminada y se ve como se acumulan en la zona central del parénquima, casi al inicio del cuello del gusano.

Los plegamientos que se muestran en el corte del parásito que no recibió tratamiento, indican la zona desde la cual los parásitos se desarrollan; sin embargo, en este caso, la NTZ produjo daños en tal región que provocaron que los parásitos no se desarrollaran y perdieran tejido en esta zona. Por los daños referidos, cabría la posibilidad de que la NTZ haya alterado a los parásitos para que no se desarrollaran y desplegaran exitosamente su capacidad infectiva; tal capacidad se muestra alterada desde el momento que hubo pérdida de tejido en la región que permite el anclaje de los parásitos en sus hospederos tales como en el escólex, el rostelo con su doble corona de ganchos y las ventosas.

8. 2. 1. 3. Adultos

Aún cuando se hicieron observaciones en amplias regiones del adulto, una demostración de lo que se obtuvo es lo que se presenta en la figura 14 relacionada con una zona de la cadena estrobilar de la tenia estudiada, donde se observa una amplia distribución de tubulina en todo el tejido, pero se acentúa en los bordes del tegumento (Fig. 14A), mientras que las fibras musculares que contienen a la actina se distribuyen a lo largo del gusano y, en algunos momentos, se les encuentra en forma de aglomerados en el interior del parénquima. También se observaron fibras musculares que contenían actina en los bordes del tegumento (Fig. 14B); en algunos casos, debido a la colocalización con tubulina (figura 14C), la marca fluorescente detectada fue amarilla. Sin embargo, en el mismo tejido observado, se encontró que no siempre la actina y la tubulina colocalizaron en las fibras musculares. En lo referente a la distribución de núcleos, por su marcaje fluorescente con el DAPI, se encontró que hay una gran cantidad de células distribuidas por todo el parénquima tisular por debajo del tegumento (Figs. 14A, B y C). La observación del tejido mediante DIC mostró la estructuración de dicho tejido, como se observa en la figura 14D, en donde se aprecian los plegamientos del tejido, e incluso, dentro del parénquima tisular, se observaron las fibras musculares que eran reveladas con la faloidina rodaminada en la figura 14B.

En comparación con la 14, la [figura 15](#) muestra el criocorte de una tenia tratada con NTZ que, al igual que en los casos anteriores, muestra cambios importantes relacionados con la distribución de las proteínas marcadas fluorescentemente, así como en la constitución del tejido. En la imagen D de la misma figura se presenta el tejido visto mediante DIC, se observa que aparentemente hay zonas de tejido que no corresponden a la continuidad del tejido que se observa en la mayor parte del criocorte; la apariencia del tejido, en general, parece ajustarse a lo que podría considerarse como un tejido rasgado. También, en comparación con el corte de la tenia que no recibió tratamiento (Figura 14D), se observa que hay pérdida de los plegamientos del tegumento. En lo que se refiere a la marca fluorescente de los núcleos (color azul), su número se redujo en comparación con el criocorte control, aunque se observó una gran cantidad de ellos localizados en el parénquima tisular ([Figs. 15A, B y C](#)). Para el caso del marcaje fluorescente de la tubulina (color verde), el marcaje disminuyó dramáticamente en la zona del parénquima a diferencia de lo que se observó en el tegumento en donde la marca se mantuvo intensa (Fig. 15A). Según lo que se observa en la figura 15B, la expresión de actina que en el criocorte del parásito sin tratamiento se encontró asociada a fibras musculares extendidas a lo largo del tejido parenquimatoso (Figura 14B) en el parásito tratado tales fibras no se encuentran, han perdido tanto su grosor como su longitud y parecen quedar algunos remanentes de ellas en forma de puntos aislados por debajo del tegumento. En la figura 15C se muestra, también, que se ha perdido la colocalización entre la tubulina y la actina. Dentro de la misma figura, con localización en la parte inferior izquierda de las fotografías, se observa parte del corte del tejido separado del corte principal. En tal corte, como se puede observar en las imágenes de la figura, parece que el tejido no sufrió daño alguno por el tratamiento y la disposición de las fibras, así como de la colocalización de tubulina y actina es clara.

La distribución de las fibras musculares en las que se detectó la actina, como se mostró en la [figura 14](#), está relacionada con las necesidades de los parásitos de efectuar los movimientos musculares requeridos para parasitar el intestino de su hospedero. Por lo consiguiente, cualquier alteración como la que se muestra en la [figura 15](#), luego del tratamiento con NTZ, podría generar que los parásitos no sean exitosos en las parasitosis que producen. La comparación entre el criocorte de la tenia control, contra la muestra respectiva de un parásito tratado, muestra que en presencia del fármaco hubo la manifestación de cambios en la constitución de los tejidos parasitarios relacionados con la musculatura de tipo liso y ello podría ser el motivo de que los parásitos pierdan su capacidad de movilidad, de la forma como se describió durante el tratamiento *in vitro* de los cisticercos con el Praziquantel³⁵, o bien, tal y como se observó con las tenias en las que se hicieron los presentes estudios antes de la obtención de sus criocortes y luego de su tratamiento *in vitro* con la NTZ (datos no mostrados). Por los resultados observados de pérdida del tejido parenquimatoso, así como de la disminución en la expresión de proteínas del citoesqueleto, ello podría significar que la NTZ debe tener algún efecto sobre estas proteínas, ya que es bien sabido que la forma y la estructuración de los tejidos es dependiente de la del citoesqueleto³⁶.

8. 2. 1. 4. Distribución en tegumento

Luego de la observación de los criocortes marcados fluorescentemente a bajo aumento (10x), con la finalidad de tener una visión panorámica de ellos, se hicieron observaciones a mayores aumentos, las cuales se enfocaron al tegumento de cada una de las fases parasitarias en estudio. De la misma manera, como se muestra en la [tabla 2](#), se compararon tales observaciones con los tejidos parasitarios tanto en ausencia como en presencia del tratamiento con la NTZ. En el tegumento está soportada la barrera de protección que los cestodos requieren para contender con el medio externo y, además, es a través del tegumento por donde este tipo de parásitos llevan a cabo sus funciones que les permiten sobrevivir en sus hospederos tales como la adquisición de nutrientes y la eliminación de sustancias tóxicas.

En la [tabla 2](#) se muestra la distribución de las marcas fluorescentes para actina, tubulina alfa y los núcleos de la forma en que fueron detectados para los tegumentos de las tres distintas etapas de

desarrollo de los parásitos. En el caso de los cisticercos y cisticercos evaginados, las imágenes corresponden al tegumento de la PV. Según lo que se observó en la [figura 10](#), hay una baja expresión de actina al nivel del tegumento de los cisticercos y ello se refleja de la misma manera, a lo encontrado en tabla 2 tanto para los criocortes de cisticercos como para el del parásito adulto. A diferencia de la actina, la tubulina tiene una mayor expresión en el tegumento y, según el marcaje fluorescente con el DAPI, ésta parece estar más asociada con tales núcleos como ya había sido observado en la figura 10. La comparación de estas observaciones con los tejidos parasitarios, luego de haber sido tratados con la NTZ, muestra que a nivel de tegumento hay mayor expresión de actina, sobre todo en los tejidos de los cisticercos evaginados, mientras que los núcleos se observaron más dispersos y la tubulina se observó con mayor expresión que en el tejido parasitario control. Bajo el tratamiento con la NTZ no se encontró a la faloidina fluorescente que marcara a la actina en fibras musculares típicas de estos parásitos como se observó en ausencia del tratamiento.

Las imágenes del criocorte del cisticerco evaginado se adquirieron en una área del tegumento de la PV cercana a la zona del cuello, el cual es el sitio por donde evagina el escólex. En el caso del criocorte del parásito sin tratamiento se observó que la actina estaba localizada en fibras musculares muy cercanas al tegumento y por arriba de los núcleos, lo cual es distinto a lo que se observó para el criocorte del parásito tratado con NTZ, ya que la marca fluorescente asociada a la actina se distribuyó por toda la superficie del tegumento, además de que ya no se la encontró en fibras musculares características sino en fibras de menor tamaño. Para la tubulina también sucedió algo semejante: se la encontró redistribuida dentro del tejido parasitario, como si estuviera agregada, y bajo estas condiciones, también los núcleos se encontraron colocalizando tanto con tubulina como con la actina dentro del tegumento parasitario. La imagen presentada en la tabla es semejante a lo que se observó en las figuras [7](#) y [9](#), tomadas mediante microscopía de epifluorescencia, en donde se observan distribuciones semejantes de la fluorescencia asociada a la actina, la tubulina y los núcleos celulares. También, como se describió en el caso de la [figura 13](#), la distribución de los marcajes fluorescentes parece indicar que el tratamiento produce que el tejido tratado se altere, en comparación con el control y esto produce un reacomodo de las proteínas del citoesqueleto de esta región de los tejidos.

En el caso de los tejidos del parásito adulto en ausencia de tratamiento, nuevamente se encontraron resultados semejantes para lo observado de la distribución de la marca fluorescente asociada a tubulina descrita para la [figura 14](#); la proteína se encontró en la periferia del tejido, lo delimita y su intensidad es mucho mayor que lo observado para el resto del tejido subtegumentario. También, como en el caso de los cisticercos evaginados, la marca fluorescente para la actina se encontró asociada a fibras musculares, sin colocalizar con el marcaje para tubulina y los núcleos.

8. 2. 1. 5. Distribución en ventosas

Otra región en la que se centró la atención de la observación fue la correspondiente a la de las ventosas. Estas estructuras que se encuentran en la porción cefálica de las tenias, tienen formas características que le permiten fijarse a la pared intestinal por succión. Están constituidas por una gran cantidad de fibras musculares cortas que le dan forma a los labios de las ventosas y que permiten su succión como se demostró por su marcaje fluorescente tanto para actina como para miosina^{33, 34}. La forma clásica de las ventosas presenta un hueco central, el cual es el sitio mediante el cual la ventosa genera el vacío que le permite el anclaje al epitelio intestinal. La comparación del marcaje fluorescente para actina, tubulina y núcleos en las ventosas de parásitos sin o con tratamiento con NTZ se presentan en la [tabla 3](#). Ahí se muestran las imágenes obtenidas tanto para cisticercos sin evaginar (escólex invaginado), como para un escólex evaginado. En las ventosas de parásitos que no recibieron tratamiento, las fibras musculares de las ventosas contienen actina como la principal proteína del citoesqueleto y se les encuentra tanto desde la superficie de la ventosa como en el interior de la misma. Según el marcaje fluorescente, las fibras que contienen a la actina son cortas y están aparentemente orientadas hacia el interior de la ventosa. Otras fibras musculares

se distribuyen en un plano perpendicular a las que se dirigen hacia el centro de la ventosa. No se encontró colocalización entre el marcaje fluorescente de la actina, la tubulina y los núcleos, aunque el marcaje fluorescente asociado a la tubulina- α fue menor en comparación con lo observado para la actina filamentosa. Es de llamar la atención que hacia el interior hay una gran cantidad de núcleos.

A diferencia de lo visto con los cisticercos que no recibieron tratamiento alguno, los cisticercos tratados presentaron alteraciones en las diferentes marcas fluorescentes ya mencionadas: ya no se observa la distribución clásica de las fibras musculares, tanto horizontales como verticales, en las ventosas ya que sólo se vió la acumulación de la actina replegada hacia las partes en que se pierde la continuidad de la ventosa. Aún se mantuvo la tubulina en el interior de la ventosa y bajo estas condiciones, ésta colocaliza con la actina y los núcleos celulares. Aún cuando se observa que la ventosa no se cierra en los parásitos que no recibieron tratamiento, esto se podría deber a la forma en que se obtuvieron los criocortes, ya que en otros casos las ventosas se obtienen completas. Además, en la ventosa de los controles se observa que esta tiene un volumen que permite apreciar su contorno, a diferencia de las ventosas que recibieron tratamiento ya que éstas pierden volumen y se las ve rasgadas en adición a la alteración vista en la distribución de sus fibras musculares.

La expresión de actina en las ventosas es un indicativo de la importancia que este tipo de proteínas tiene para estas regiones de los parásitos. El tamaño y la distribución de las fibras musculares que la contienen también están relacionadas con la funcionalidad de estos órganos en los parásitos y lo cual es distinto a la distribución de fibras musculares localizadas en otras partes de los parásitos como en el parénquima tisular y las cuales también se ha demostrado que contienen actina como se observa en las figuras 10 y 12. La disposición y el tipo de fibras musculares de las ventosas juega un papel importante para que estos órganos puedan realizar eficientemente la contracción y relajación de las ventosas como se ha establecido para los parásitos que las contienen¹. Cabría la posibilidad que por el tipo de fibras musculares que se encuentran en las ventosas, las actinas que ellas expresan sean isoformas distintas que las que se expresan en las fibras musculares del tejido parenquimatoso o subtegumentario³⁴.

8. 2. 1. 6. Distribución en células flama

En la tabla 4 también se hicieron observaciones de la distribución de los marcajes fluorescentes a niveles más profundos de los tejidos parasitarios, en este caso se puso atención en el marcaje de CF seleccionadas de las diferentes etapas de desarrollo. Los marcajes fluorescentes de las CF que no recibieron tratamiento corresponden a lo que se ha venido presentando en las imágenes anteriores. La distribución de las proteínas del citoesqueleto, así como el marcaje de los núcleos, corresponden a lo que se ha reportado para las CF⁴: el penacho de cilios con un alto contenido de tubulina- α se presenta en color verde, la hebilla de actina que rodea a tal penacho, en rojo y la cual se distribuye desde la base hasta la parte media del penacho. La hebilla de actina muestra que sobresalen del penacho ciliar. Las células tuvieron medidas semejantes, aproximadamente de 10 μm , cuando se les midió desde el núcleo teñido por el DAPI hasta el ápice del penacho ciliar. En todos los casos se encontraron núcleos teñidos que no necesariamente tenían correspondencia o estaban en la vecindad de otros penachos ciliares y por lo cual presumiblemente se podrían tratar de otros tipos celulares encontrados en el parénquima tisular de los parásitos.

Al comparar las CF de los cisticercos tratados con la NTZ se encontraron alteraciones claras debidas al tratamiento que se les dio a los parásitos. Lo más evidente es la pérdida de la conformación de la hebilla de actina, así como de los núcleos. Sin embargo, a pesar de los cambios notables en actina y núcleos, es de llamar la atención que los penachos ciliares parecen haber permanecido de manera semejante a lo observado en los criocortes de parásitos control. Según la tabla, es en los cisticercos evaginados en donde las CF sufrieron alteraciones incluso hasta en sus penachos ciliares; éstos se observaron más delgados y alargados pero mantuvieron su forma. A diferencia de los parásitos de esta etapa de desarrollo, las CF de los cisticercos y cisticercos evaginados tratados con la NTZ sufrieron cambios en la estructuración tanto de la hebilla de actina

como en los núcleos y, aparentemente, mantuvieron la estructura de sus penachos ciliares. En el caso de las CF de las tenias, se encontró que aparentemente la tubulina alfa mantiene su forma ovalada y estrecha, pero la hebilla de actina se deforma y parece ser desplazada hasta casi la punta de la flama. Los núcleos en esta etapa de desarrollo de los parásitos parecen haber sido totalmente alterados porque presentan discontinuidad y se les observan con agujeros en su parte central. Por lo presentado en la tabla, cabría la posibilidad de que el tratamiento de los parásitos con la NTZ haya producido alteraciones principalmente en la hebilla de actina y que ello ocasionara que las CF perdieran su estructura celular y sus penachos ciliares perdieran su estructuración clásica como se observa en las imágenes de los parásitos que no recibieron tratamiento. La pérdida de estructuración de las CF seguramente produjo que los parásitos perdieran la capacidad de filtrar o seleccionar lo que normalmente realizan para sobrevivir dentro de sus hospederos y que sufrieran una intoxicación que llevó a su muerte o su parálisis como se vio con los parásitos tratados, los cuales perdieron su movilidad. De acuerdo a estos planteamientos, la integridad de la hebilla de actina en las CF tiene un papel biológico relevante en la estructuración de tales células y si llega a sufrir algún tipo de alteración, esto produce que las células dejen de funcionar adecuadamente y por ello fallan los sistemas de excreción de los parásitos.

8. 2. 2. Miosina II y Tubulina- α

A continuación se hará la presentación de la identificación de miosina II y la tubulina- α en diferentes estadios parasitarios. Inicialmente las observaciones se hicieron a aumentos de 10x con la finalidad de obtener observaciones panorámicas de los marcajes fluorescentes, luego, a aumentos de 60x, se hicieron observaciones a nivel del tegumento, parénquima tisular, cuello, túbulos y ventosas.

8. 2. 2. 1. Cisticercos

En la [figura 16](#) se presenta el marcaje fluorescente para miosina II (fluorescencia roja), la tubulina- α (fluorescencia verde) y los núcleos celulares (fluorescencia azul) en un criocorte de un cisticerco. De la misma manera, en la [figura 16D](#), se muestra el tejido sin tinción alguna observado mediante DIC. Por lo que se observa en la imagen, este es el mismo tipo de estructuración de tejido que se observó en la [figura 10D](#).

El patrón de distribución de tubulina ([figura 16A](#)) es semejante al mostrado en la [figura 10A](#), e incluso, se observa que hay semejanzas en la forma de distribución de los núcleos, los cuales se observaron principalmente al nivel del parásito invaginado. En el caso de la miosina ([figura 16B](#)) se encontró que tiene una amplia distribución a lo largo del tegumento, así como en los contornos del CE y en la capa germinal (CG). En la parte inferior de la imagen se observa una ventosa en la que también se encontró que contenía miosina. La colocalización de las tres marcas fluorescentes se presenta en la [figura 16C](#), en donde se aprecia que tanto la tubulina, como la miosina están colocalizando tanto en el tegumento como en el parénquima tisular. Como se muestra en la imagen [16D](#), en la iluminación por DIC, el tejido parasitario es homogéneo, excepto al nivel del canal espiral. No hay marca en el tejido parenquimatoso que rodea al canal espiral y lo cual podría ser un indicativo de la naturaleza de dicho tejido que contiene isoformas específicas de miosina II y tubulina.

La distribución de las proteínas en estudio en el tejido de un cisticerco tratado con NTZ se presenta en la [figura 17](#). Como se observa desde la imagen obtenida mediante DIC ([Figura 17D](#)), debido al tratamiento parece que el parénquima tisular, localizado al nivel del CE y del escólex, no es homogéneo y da la impresión que se encuentra rasgado. Según la imagen, hay una pérdida importante tanto de tejido a nivel del CE, como del tegumento y el marcaje fluorescente también sufre alteraciones importantes en su distribución. No se percibió una distribución continua de la tubulina tanto a nivel del tegumento como del CE, aunque en el caso de la miosina II parece que

sufrió leves alteraciones sobre todo a nivel del CE. Como se observa para los núcleos en las figuras 17A-C, el marcaje fluorescente parece que se encuentra por todo el tejido y no asociado a ciertas estructuras de los cisticercos. Sólo luego del tratamiento para la miosina es que se logró distinguir lo correspondiente al canal espiral, pero aún así se ve el tejido parasitario muy dañado. También, a diferencia de la [figura 16](#), no se encontró que las proteínas tuvieran colocalización alguna (Fig. 16C). El hecho de que hubiera pérdida de tejido y que no hubiera una distribución adecuada de la miosina muscular, podría ser un indicativo de que luego del tratamiento con NTZ hubo alteraciones en la funcionalidad de los cisticercos y lo cual pudo haber afectado la viabilidad de los mismos.

8. 2. 2. 2. Cisticercos evaginados

En la [figura 18](#), debido al proceso de evaginación, se notan estructuras de la región cefálica de los parásitos como el escólex y las ventosas y parte del cuello de los parásitos (Fig. 18D). La tubulina se encontró por todo el parénquima del escólex y, principalmente, en la superficie de éste como se vió en la [figura 12A](#). Entre el tejido superficial marcado fluorescentemente y el canal espiral del parásito, se observan puntos con alta intensidad de marca fluorescente que, según los aumentos de, corresponden a células flama marcadas. Según la [figura 18B](#), la miosina está mas asociada a la superficie del escólex, delimita su contorno y colocaliza con la tubulina (Fig. 18C) por el marcaje fluorescente amarillo. Cuando se hizo localización de actina, ([Fig. 12](#), [tabla 3](#)) en cortes semejantes, se encontró que aparentemente hay mayor intensidad de la fluorescencia para esta proteína que para la miosina y lo cual llama la atención porque, al menos en las ventosas, debería haber un mayor marcaje de miosina debido a la presencia de las fibras musculares de éstos órganos de fijación como se demostró anteriormente³³.

Luego del tratamiento con NTZ de los cisticercos evaginados, como el criocorte que se muestra en la [Fig. 19](#), al igual que en la [figura 13](#) en la que se identificó a la actina, se encontró que hay una pérdida importante de tejido de la porción cefálica, además de que las ventosas se observan expandidas y abiertas, hay reducción del tamaño del escólex, así como una retracción o pérdida del parénquima asociado a esta porción del parásito. En la imagen obtenida por DIC (Fig. 19D) se nota claramente la alteración del tejido parasitario debida al tratamiento. Nuevamente, como en el caso de la [figura 18](#), las marcas fluorescentes muestran que la tubulina se concentra en la superficie del escólex, en el tegumento de la PV y en la base del escólex evaginado. A diferencia del criocorte del parásito que no recibió tratamiento mostrado en la [figura 18A](#), en la [figura 19A](#) se encontró que la tubulina tiene una distribución difusa no homogénea; mientras que la miosina, a diferencia de lo visto en la [figura 18B](#), está distribuida por todo el escólex y colocaliza con los núcleos celulares ([Fig. 19B](#)). En la [figura 19C](#), se encontró que tanto la miosina como la tubulina tienen colocalización a nivel del cuello, el tegumento y, en mayor medida, en la superficie del escólex. Se encontró que los núcleos están distribuidos en todo el tejido parasitario (Fig. 19C). La manera en la cual se encontró distribuida la miosina en el escólex podría estar asociada al estrés químico al que se sometieron los parásitos con la NTZ.

8. 2. 2. 3. Parásitos adultos.

En el criocorte del parásito adulto que no recibió tratamiento se observa que la tubulina, según el marcaje fluorescente, está asociada a la superficie del tegumento parasitario, a diferencia del parénquima tisular en que casi no se encuentra marcaje fluorescente ([Fig. 20A](#)). A diferencia del marcaje para la tubulina, como se ve en la [figura 20B](#), las fibras musculares que contienen miosina se revelaron fluorescentemente y se observa el sentido en el que se distribuyen dentro del tejido parasitario. También como en el caso de la tubulina, hay marca fluorescente relacionada con miosina en la superficie del tegumento y por debajo del mismo, se observa el marcaje fluorescente de fibras musculares de diferentes longitudes. La distribución de las fibras en el parénquima parece

estar asociada a un patrón de marcaje fluorescente que da la impresión que estas fibras se presentan a lo largo del parénquima tisular. Se encontró, por lo visto en la figura 20C, que hay colocalización de miosina y tubulina por el color amarillo fluorescente que se produce por la superposición de los marcadores fluorescentes asociados a estas proteínas. Sólo en la superficie del tegumento se presenta tal colocalización de proteínas del citoesqueleto, ya que en el resto del parénquima tisular se encuentra únicamente a fibras musculares que contienen miosina, así como los núcleos celulares que tienen una distribución definida en la región de observación y que parecen encontrarse en forma de cúmulos. Según la observación del tejido parasitario mediante DIC (Fig. 20D) el tejido está homogéneo y presenta ciertos plegamientos que corresponden con lo visto en la superficie tegumentaria marcada fluorescentemente y con lo que ya se había observado en la [figura 14D](#). Una visión detallada del tejido sin marcaje fluorescente permite identificar las fibras musculares a las que se asociaría el marcaje fluorescente de miosina, así como la región del tejido que contiene a la tubulina. Debido a la distribución de las fibras musculares que contienen a la miosina, cabría la posibilidad de que ellas también presentaran a la actina filamentosa, las cuales también se desplazan a lo largo del parénquima tisular. La asociación de la miosina y la actina en las fibras musculares podría estar relacionada con las necesidades que tienen los tejidos parasitarios para efectuar movimientos de contracción y relajación muscular. La colocalización de la tubulina y la miosina podría estar asociada a las necesidades que tiene el tejido de estos parásitos para internalizar nutrientes, mediante vesículas que se desplazan a lo largo de los microtúbulos o bien a lo largo de filamentos actina y que utilizan a la miosina II como motor biológico.

A diferencia de lo mostrado en la [figura 20](#), el tejido de un parásito adulto tratado con NTZ, como se muestra en la imagen vista por DIC ([Fig. 21D](#)), está demasiado alterado: el ancho del gusano ha disminuido, el tejido no es continuo ya que parecen existir regiones en los que se pierde parte del tejido y parece dividir al parásito. En el tegumento hay cambios en la textura del tejido parasitario ya que de una morfología lisa continua del tejido parasitario control, la textura del parásito tratado es rugosa, tiene varios plegamientos de corto rango que dan la apariencia de rugosidad. En el caso del marcaje para tubulina, igual que en el tejido del parásito control, se encontró que la fluorescencia es intensa en la superficie tegumentaria y que esta no se presenta de forma significativa en el resto del tejido ([Fig. 21A](#)). En el caso del marcaje fluorescente para la miosina, como en el caso del tejido del parásito control, se le encontró en la superficie tegumentaria, aunque también se le observa en el parénquima. Sin embargo, luego del tratamiento con NTZ, las fibras gruesas y largas encontradas en el tejido parenquimatoso del parásito control ([Fig. 20B](#)) ya no se observan en los tejidos del parásito tratado. Lo que pudiera corresponder a las fibras musculares marcadas fluorescentemente se ve que presentan una longitud corta y son gruesas ([Fig. 21B](#)). De la misma manera que en el invaginado, se encontró que en el parásito adulto hay colocalización de la miosina y la tubulina a nivel del tegumento parasitario. Los núcleos están asociados a las fibras musculares que contienen a la miosina ([Fig. 21C](#)). Probablemente, la NTZ tiene acción a nivel del tegumento y afecta la estructuración de las fibras musculares. Nuevamente, tales observaciones son un indicativo de que la alteración de la distribución de las proteínas del citoesqueleto en estudio produce alteraciones que repercuten en los procesos de absorción y excreción del parásito y, además, los efectos se reflejan en la pérdida de movimientos musculares de los gusanos.

8. 2. 2. 4. Distribución en tegumento

Según como se muestra en la [tabla 5](#), parece haber una distribución distinta entre miosina y tubulina a nivel de la PV de los diferentes estadios de vida de *T. solium*; aparentemente, también para el caso de los núcleos celulares, se encontró una distribución diferencial entre los diferentes tejidos.

En el caso de cisticercos que no recibieron tratamiento alguno, parece que la tubulina presenta una distribución tisular semejante a lo que se mostró en la [tabla 2](#); la marca fluorescente tiene una

alta concentración a nivel del tegumento sincicial, mientras que, en menor cantidad de fluorescencia, se encontró en el resto de la PV. En la misma figura, para el caso de los tejidos del cisticercos que recibió tratamiento con NTZ, se encontró que la cantidad de fluorescencia asociada a la tubulina disminuyó dramáticamente en comparación con lo observado con el parásito que no recibió tratamiento. En este caso, da la impresión que los parásitos debido al tratamiento que recibieron perdieron su tegumento marcado fluorescentemente en el tejido del parásito control, observación que podría estar soportada en lo que parece ser la pérdida de la superficie del tegumento al observarse el tejido desgarrado. En cuanto a la miosina, la marca rodaminada asociada al reconocimiento de los anticuerpos fluorescentes secundarios, se encontró con menor intensidad en el tejido del parásito control, a diferencia del tratado con NTZ en donde no sólo aumentó la intensidad de la marca fluorescente, sino que también parece que hubo un incremento en el número de fibras musculares que se localizan en esta región tisular de los parásitos. Las fibras musculares se encontraron más empacadas, con grandes cantidades tanto de núcleos como de penachos ciliares de CF que se distinguieron por su fluorescencia verde asociada a tubulina. El posible desprendimiento, luego del tratamiento con NTZ, también está soportado por observaciones de microscopía electrónica de barrido, en donde se encontró que luego del tratamiento los parásitos sufren desprendimiento de porciones de sus tejidos a nivel de la PV y del tegumento más específicamente.

En el caso del tejido del cisticercos evaginado control, se encontró que la marca fluorescente asociada con la miosina aparentemente colocalizaba con la tubulina. A diferencia de los cisticercos control, en este estadio de desarrollo hay un aumento en el número de núcleos celulares, los que aparentemente están en vecindad con el tegumento parasitario. Luego del tratamiento con NTZ, en una imagen adquirida de una zona cercana al cuello del parásito, el tegumento aparentemente se observa más grueso, la marca fluorescente se encuentra más compactada, pero parece que en el tejido se ha dado una pérdida del marcaje fluorescente típicamente asociado a fibras musculares y lo cual es aparentemente diferente de lo que sucedió con la tubulina, la cual en los parásitos tratados, parece que se incrementó en intensidad de marcaje a lo largo del tegumento parasitario y por debajo de la zona marcada fluorescentemente y asociada a miosina, y que coteja con lo visto en la [tabla 2](#), donde el tegumento presenta una gran cantidad de tubulina en los cisticercos evaginados tratados con NTZ. Una posible explicación de la forma en que las proteínas del citoesqueleto en estudio tuvieron un cambio en su distribución tisular, podría deberse a que los tejidos de los cisticercos intentan eliminar el posible efecto de la acción del fármaco debido al aumento de procesos como la secreción de sustancias tóxicas mediante el tráfico vesicular del tegumento que necesariamente depende de la tubulina en esa zona de los parásitos. El aumento en la intensidad de la fluorescencia asociada a la miosina podría estar relacionado con el hecho de que los parásitos requieren incrementar la fortaleza del trabajo de sus fibras musculares.

A diferencia de los estadios parasitarios indicados anteriormente, se encontró que la marca fluorescente para las proteínas mencionadas hasta aquí muestra que éstas podrían tener una distribución tisular distinta por efecto del tratamiento con NTZ. Nuevamente, como en el caso del cisticercos tratado, se encontró que en el adulto tratado, el tegumento parece estar desprendido de la PV ya que disminuyó en intensidad la marca fluorescente asociada a este tejido y que comparada con el adulto sin tratamiento se observa que es parte de tejido que parece haberse desprendido. De la misma manera, en cuanto a la marca fluorescente asociada a miosina para las fibras musculares, se observó que luego del tratamiento ellas se compactaron en el tejido parasitario. Tales fibras musculares, en el tejido del parásito tratado pierden su distribución tisular característica y algunas de ellas cambiaron de tamaño y de dirección. Nuevamente, los cambios de las proteínas del citoesqueleto que sufrieron en su distribución tisular están asociados al efecto del tratamiento que recibieron los parásitos.

8. 2. 2. 5. Distribución en cuello

Un criocorte efectuado a nivel del cuello de un cisticerco evaginado que no recibió tratamiento se presenta en la [figura 22](#), en dicho corte se alcanza a apreciar que el escólex del parásito ha evaginado desde la vesícula que lo contenía; mientras que la porción cefálica está orientada hacia la parte superior de las imágenes, la porción central de ellas muestra al cuello, a partir del cual se daría origen a la cadena estrobilar una vez que el parásito hubiera seguido desarrollándose hacia su estadio adulto bien diferenciado. La colocalización de tubulina, miosina y los núcleos celulares se presenta con una gama de colores que muestran que en ciertas regiones del tejido parasitario hubo expresión colocalizada de las proteínas del citoesqueleto estudiadas, lo cual se evidenció luego del marcaje fluorescente de cada una de ellas; la parte superior del cuello, correspondiente a la base del escólex, se encontró marcada fluorescentemente para tubulina (fluorescencia en verde) y aparentemente en esta zona hubo una mayor intensidad de marcaje que en el resto del tejido. Sin embargo, al nivel del tegumento, se encontró que la fluorescencia era de un color púrpura lo cual es un indicativo de que hubo una superposición de los marcajes fluorescentes empleados en los presentes estudios. En la [figura 22B](#), en donde se muestra la marca fluorescente de miosina y la iluminación por DIC, se observa que el parásito aún presenta invaginaciones del tegumento debido a que al momento de su fijación se encontraba en proceso de elongación. En esta misma figura, como se observa por la fluorescencia roja, aunque la miosina está expresada en todo el tejido del cuello, se encontró más intensa a nivel del tegumento. En la [figura 22C](#), que muestra al tejido parasitario del parásito tratado con NTZ, se observa que en comparación con la [figura 22A](#), las proteínas del citoesqueleto parecen colocalizar de semejante manera; sin embargo, parece que la marca fluorescente asociada a la miosina y a la tubulina en el tejido del parásito tratado con NTZ se incrementa con respecto al tejido del parásito que no recibió tratamiento. En la [figura 22D](#), la cual muestra la marca fluorescente de la miosina y su combinación con DIC, se observa que una parte importante del tejido asociado al cuello del parásito en evaginación aún se encuentra dentro de la pared vesicular. De la misma manera que en la [figura 22B](#), la miosina se encontró distribuida por todo el tejido del cuello y la pared vesicular. Sin embargo, aparentemente, el efecto de la NTZ se observa que dañó la base del cuello, la cual podría corresponder al inicio de la incipiente cadena estrobilar. En esta región del tejido parasitario se encontró que parte del tejido se ha perdido y, previo a la obtención de los criocortes del parásito, se encontró además que el parásito no tuvo éxito en la evaginación. Por el efecto que genera la NTZ en los tejidos de los parásitos en evaginación, como se mostró en estas figuras, cabría esperar que el fármaco produzca alteración en el desarrollo de los parásitos con lo que es posible que se logre evitar su crecimiento y fijación al intestino de su hospedero.

8. 2. 2. 6. Distribución en parénquima

En la [tabla 6](#) se muestran imágenes de colocalización de las proteínas del citoesqueleto en estudio dentro del parénquima tisular y se compara la distribución del marcaje fluorescente en los tres estadios de desarrollo en estudio, tanto para los parásitos controles como para los que recibieron tratamiento con la NTZ. Se observa que, para el caso del cisticerco control, la tubulina se encuentra asociada al contorno del CE así como en las CF que se encuentran en este tejido. La miosina se encontró asociada a fibras musculares cortas por debajo del tegumento y en asociación a núcleos celulares revelados por la tinción con el DAPI. A diferencia de lo que se observa en los tejidos del cisticerco control, en los del tratado con NTZ se encontró que las fibras musculares con miosina presentan un patrón difuso en el que parece que hay una compactación de las mismas y por lo consiguiente la miosina parece encontrarse aglutinada. En el caso de la tubulina, ésta perdió su distribución característica en el tegumento y se encontró mezclada, sin colocalizar, con la miosina. De la misma manera en que se perdió la distribución de tubulina y miosina, los núcleos celulares parecen haberse dispersado por todo el tejido ya que al parecer, hubo pérdida de la morfología

característica del CE. La redistribución de la miosina en el tejido parasitario tratado con NTZ se asocia a lo que ya se había observado a causa de que dicho tratamiento parece provocar que los tejidos parasitarios se compacten o retraigan y por ello se pierde su morfología como se observa en los cortes de los tejidos de parásitos que no recibieron tratamiento.

En el caso del tejido del cisticerco evaginado control se observa que, a nivel del CE, hay colocalización de miosina y tubulina en el contorno del tejido parasitario y, en el caso de tubulina, junto con la tinción de los núcleos celulares, se observa que se asocia con las CF como las indicadas con flechas. A diferencia de lo que se observa en el tejido del cisticerco control, en el del tratado con NTZ, el CE y en la zona del parénquima los núcleos celulares están integrados a las fibras musculares marcadas fluorescentemente para miosina y casi no se observa el marcaje fluorescente asociado a la tubulina de manera semejante a lo observado para el tejido del cisticerco. Una vez más, luego del tratamiento de los parásitos con la NTZ ello produce que se pierda el marcaje fluorescente de las CF, al menos como se les observa en sus respectivos controles.

A nivel de los tejidos del parásito adulto que no recibió tratamiento se observa la colocalización de los tres marcajes fluorescentes; como se ve en las figuras la distribución de los núcleos celulares, la miosina y la tubulina aparentemente está acorde a la morfología de este tipo de tejido; mientras que la tubulina se distribuye hacia los extremos del tejido, la miosina está localizada en fibras musculares que corren a lo largo del parénquima y entre tales fibras se observa el marcaje fluorescente correspondiente a los núcleos celulares. En la imagen del tejido parasitario que no recibió tratamiento se observa que las fibras musculares están empacadas en grupos de dos o tres haces de fibras y tales grupos están localizados a una distancia definida entre uno y otro dentro del parénquima. Sin embargo, luego del tratamiento con NTZ, se observa que hubo un aumento en los grupos de fibras musculares y éstas disminuyeron en tamaño, hubo compactación de los núcleos celulares y parece que se perdió una parte importante del marcaje fluorescente de la tubulina. Observaciones semejantes se obtuvieron y describieron para la figura 21B, en donde se describió el acortamiento de las fibras musculares. Como se indicó para la actina filamentosa, luego del tratamiento del parásito adulto (Fig. 15), se encontró que también hubo una reducción de la intensidad de la marca fluorescente en las fibras musculares que la contenían. La disminución en la cantidad de fibras musculares en las que se encuentran tanto la actina como la miosina es un claro indicativo de que los parásitos han perdido la capacidad de realizar movimiento muscular y con ello perdieron la capacidad de establecerse eficientemente dentro del lumen intestinal de su hospedero.

8. 2. 2. 7. Distribución en túbulos

En la [figura 23A](#) se muestra, luego de un acercamiento con el objetivo de 60x, a los túbulos protonefridiales revelados por los marcajes fluorescentes empleados: a nivel de la capa germinal, con vecindad al CE, se encontró una gran cantidad de CF marcadas fluorescentemente para tubulina en sus penachos ciliares, mientras que los túbulos protonefridiales se observan con un centro libre de marcaje fluorescente alguno. En la figura 23A, correspondiente al tejido del cisticerco control, los túbulos protonefridiales se muestran con un diámetro aproximado de 20 micras y de formas ovaladas o redondas. En el caso de los tejidos bajo tratamiento con NTZ, se observaron túbulos protonefridiales sólo que éstos tenían un mayor diámetro, mas ovalados y, en algunos casos, se encontraron fusionados entre ellos. En todos los casos observados para la presencia de los ductos protonefridiales se encontró que éstos estaban asociados a las CF, las cuales se marcaron en su penacho ciliar con el marcador fluorescente para la tubulina.

Las [figuras 23C y D](#), correspondientes a los tejidos de los cisticercos evaginados, se obtuvieron mediante aumentos de 100x y de 60x con un aumento digital de 5x respectivamente. Se observa que el túbulo protonefridial de 20 μm y redondo, está rodeado de células flama (Fig. 23A) que se ven mejor a un mayor aumento como el que se muestra en la figura 23C. En la figura 23D se nota que el patrón de distribución de la tubulina por su marcaje fluorescente no presenta a las CF asociadas a los túbulos y lo cual es otro indicativo de que el tratamiento daña la estructuración morfológica de

las CF. Nuevamente, el tratamiento de los parásitos con la NTZ produce que el tejido sufra alteraciones en las que hay una compactación severa del tejido parasitario y que los túbulos protonefridiales se asocien unos a otros junto con la compactación del tejido parasitario. Nuevamente, con la alteración del tejido parasitario por administración de la NTZ a los parásitos se refleja el envenenamiento que podrían sufrir los parásitos al perder la funcionalidad de su sistema de excreción en donde las CF son las estructuras más importantes para llevar a cabo la filtración de lo que ello implica.

8. 2. 2. 8. Distribución en ventosas

Como se presentó en la [tabla 3](#), en la [tabla 7](#) se muestra una comparación del marcaje fluorescente entre ventosas de distintos parásitos en las cuales se hizo el marcaje para tubulina (fluorescencia verde), miosina II (fluorescencia roja) y para los núcleos celulares (fluorescencia en azul). En el cisticerco control, debido al nivel del corte obtenido, la ventosa se aprecia incompleta; aparentemente, según el corte, hacia el centro de la ventosa se observa su fondo. La distribución de la tubulina en el corte se orienta al interior de la ventosa, mientras que hacia el exterior se encuentra el marcaje fluorescente para la miosina; los núcleos celulares se encuentran en la interfase de las fibras musculares que contienen a la miosina, así como la región en la que se encuentra la tubulina. En esta misma imagen, las fibras musculares que contienen a la miosina están distribuidas de forma paralela a la marca correspondiente a la tubulina con un aparente sentido que va del fondo de la ventosa hacia su exterior. A diferencia de la distribución de las proteínas del citoesqueleto indicadas, en el caso de la ventosa del parásito tratado con NTZ, en este tejido hubo una pobre expresión de tubulina y las pocas fibras musculares que contenían a la miosina se les encontró con un menor tamaño; pareciera que la ventosa ha sido alterada morfológicamente, de tal suerte que se observa como si hubiese sido rasgada. En el caso de los núcleos celulares, éstos se encontraron hacia el exterior de las ventosas y no hacia el centro de ellas como se vio en ausencia del tratamiento.

Aunque en el caso de los tejidos del cisticerco evaginado control no se puede observar en el interior de sus ventosas, hubo imágenes que muestran que estas ventosas presentan la forma clásica con que se les ha descrito en estos parásitos³³. La marca fluorescente asociada a miosina se encontró sobre fibras musculares cortas y dispuestas de manera que le dan forma a los labios de la ventosa, mientras que la marca fluorescente asociada a tubulina y a los núcleos celulares se encontró insertada entre las fibras musculares. No hubo colocación con la miosina según se vio en las imágenes. En el caso del cisticerco evaginado tratado con NTZ, las ventosas sufrieron alteraciones morfológicas en las que se les encontró con un mayor diámetro de apertura, una pobre distribución de la marca fluorescente asociada a tubulina, las fibras musculares con miosina se encontraron con un menor tamaño y los núcleos celulares se encontraron insertados en los labios de las ventosas. Aparentemente, como se observa en las fibras musculares, éstas se encontraron con una distribución diferente a lo visto en la ventosa del cisticerco que no recibió tratamiento.

El hecho de haber encontrado tanto miosina como actina en las fibras musculares de las ventosas de los parásitos, es un indicativo de que su asociación está relacionada con las funciones de contracción y relajación que estos órganos de fijación efectúan en los parásitos. Debido a que bajo el tratamiento con la NTZ las ventosas perdieron su morfología clásica y la distribución de sus proteínas del citoesqueleto, como se observó para las ventosas de los parásitos que no recibieron tratamiento, ello es un indicativo de que el tratamiento podría haber producido que los parásitos no tuvieran efectividad en su anclaje al intestino y con ello que esta pueda ser una forma de acción del fármaco para favorecer el tratamiento de las infecciones intestinales que producen estos parásitos en su hospedero.

8. 3. Reconstrucción en tercera dimensión

Luego de la adquisición de las imágenes mediante el microscopio confocal, con un enfoque a lo que se presentó al nivel de las CF, los cortes obtenidos en Z se procesaron para su reconstrucción en 3D como se muestra en la [figura 24](#). Las reconstrucciones obtenidas mediante el programa de cómputo del equipo de microscopía confocal permitieron hacer observaciones de las reconstrucciones en diferentes ángulos y posiciones: Las [figuras 25A y D](#) corresponden a lo observado por delante y por detrás de las imágenes, en tanto que las 25B y C muestran una rotación de la imagen y se observa de perfil. Como se observa en dichas imágenes, la hebilla de actina parece envolver al penacho de cilios marcado fluorescentemente para tubulina y, en el caso de los núcleos celulares correspondientes a las CF, éstos se encontraron que aparentemente están a diferentes profundidades del tejido.

Aún cuando se puede observar en las reconstrucciones 3D de las imágenes que se logra apreciar la distribución de las proteínas del citoesqueleto en estudio, la resolución del programa de cómputo no es suficiente para lograr una mejor definición, por ello hubo necesidad de buscar una forma que permitiera una mejor visualización. Para esto se recurrió a la reconstrucción de imágenes que ofreció el programa AMIRA de la sala Ixtli de la DGSCA-UNAM. Con este sistema se encontró que no sólo hubo una mejor reconstrucción, sino que se pudo efectuar una inmersión virtual en el modelo creado, ya que la imagen pudo visualizarse en diferentes planos, con volumen y color artificiales como se muestra en la [figura 26](#). En dicha figura se observa cómo el penacho de cilios en color verde, está rodeado de la hebilla de actina en color rojo, mientras que en azul se presentan a los núcleos y, todo el resto del tejido (el parénquima tisular) en el que están inmersas las CF reconstruidas se presenta con un color beige. Las observaciones en 3D de esta figura muestran que el parénquima no es homogéneo ya que está dispuesto en forma de relieve en el que se alcanza a observar que las CF están incrustadas dentro de espacios en los tejidos de los parásitos. Estas observaciones se presentaron muy claras durante las reconstrucciones hechas en la sala de visualización IXTLI.

Luego de la observación de la reconstrucción de las CF y su incrustación en el tejido parasitario, se procedió a seccionar transversalmente tales imágenes virtuales con la finalidad de observar de qué manera se podría hallar la distribución espacial de la tubulina y la actina a nivel de las CF como se muestra en la serie de imágenes presentadas en la [figura 27](#). En estas imágenes se buscó segmentar a la CF desde la base de su penacho ciliar (figura A) hasta la porción correspondiente a la mitad, al nivel de la hebilla de actina (figura F). Mientras que en la figura 27A se ve claramente que la actina forma una hebilla o un candado perfectos alrededor del penacho ciliar, se le observa que se extiende desde la base del penacho hasta su parte distal. Cuando se realiza el seccionamiento como se indicó (Figuras 27A a la E) se observa que la hebilla de actina desaparece hacia el centro del corte de la CF y sólo queda una parte de ella en los costados del penacho y luego, hacia la parte inferior con dirección hacia el núcleo, se preserva como si fuera una capa protectora. En la figura 27F, sección que corresponde a lo que podría considerarse como la parte media del penacho, se observa que la actina se acumula nuevamente y esta sección se podría considerar como el sitio en el que se limita a la hebilla o candado de actina.

El seccionamiento virtual que se aplicó a las CF reconstruidas permitió observar la forma en que la hebilla de actina estaba estructurada en función del penacho ciliar de las CF. Según las observaciones, la hebilla de actina parece ser una estructura completa que se encuentra incrustada en el interior del penacho. Estas observaciones concuerdan con las obtenidas por Valverde-Islas⁴ quien describió y propuso que la hebilla de actina mantiene en su sitio al penacho de cilios con la finalidad de permitir los movimientos de los cilios para dar dirección al movimiento de los fluidos en los que están incluidas las sustancias de excreción de los parásitos.

Luego de haber hecho las reconstrucciones tridimensionales de las CF del cisticercos evaginado en ausencia de tratamiento con NTZ, se decidió aplicar la misma estrategia computacional para las CF de un cisticercos tratado con NTZ. Según lo obtenido, el seccionamiento en Z se hizo a un total

de 14 cortes de los cuales la imagen final se muestra en la [figura 28](#). Como se observa en la imagen, aparentemente el tratamiento con NTZ produjo la separación de la hebilla de actina de la CF, de la que aún se observa completo el penacho ciliar y del que parece también estar separado el núcleo. Las marcas fluorescentes rojas podrían corresponder a las hebillas de actina de diferentes CF, mientras que los penachos ciliares parecen tener un adelgazamiento en su forma en comparación con los observados en la imagen de las CF del cisticerco que no recibió tratamiento. Como en la [figura 24](#), se hizo una reconstrucción tridimensional que se muestra en la [figura 29](#); según la imagen, uno de los núcleos está incrustado a una mayor profundidad del tejido, mientras que aparentemente la actina, la tubulina y el núcleo de una CF se encuentran al mismo nivel de profundidad, sólo que parece que se encuentran separados de acuerdo a la imagen obtenida. Luego, como lo que se hizo para las figuras [26](#) y [27](#), se procedió a la reconstrucción y seccionamiento computacional de las imágenes como se muestra en la [figura 30](#). Las imágenes obtenidas bajo distintos planos corresponden: en A, desde la parte inferior de las CF. En B, desde una vista lateral de la parte superior o frontal. En C y D, desde la misma cara sólo que en diferentes posiciones. Como se observó en tales imágenes y su comparación con las obtenidas en las figuras [28](#) y [29](#), hay pérdida de la estructuración de las CF ya que hay un desarreglo de las estructuras del citoesqueleto en estudio. Según lo que se observa en las imágenes B, C y D de la [figura 30](#), los penachos ciliares presentan un hueco que presumiblemente correspondería al sitio en el que estaría integrada la hebilla de actina, la cual ha perdido toda su forma y se ha desprendido de la célula. La actina se ve totalmente disgregada.

Las comparaciones de las CF en ausencia (A) o en presencia de la NTZ (B) se muestran en la [figura 31](#): como se indicó para la figura anterior, la actina perdió su forma, se separó de las CF y aparentemente ello produjo un cambio en la morfología de dichas células. En el caso de las CF en ausencia del tratamiento, se encontró que la forma de la célula es la clásica reportada⁴.

Según las imágenes de reconstrucción tridimensional, la actina o alguna de sus proteínas asociadas podrían ser blancos de ataque de la NTZ y los penachos ciliares se ven alterados por la pérdida de la hebilla de actina. En las imágenes originales obtenidas mediante la microscopía confocal, se observó que una parte importante de CF resultó afectada por el tratamiento, sin embargo, algunas otras no fueron afectadas por el fármaco. Sin embargo, aquellas células que resultan afectadas parecen haber perdido su estructuración y ello les ha provocado la separación de los penachos de tubulina de sus cuerpos celulares los cuales podrían estar unidos a ellos mediante la hebilla de actina.

IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Con los resultados del presente trabajo se ha mostrado por el empleo de la microscopía de fluorescencia, tanto de epifluorescencia como confocal, la forma en que las proteínas del citoesqueleto estudiadas se localizan en los tejidos de los parásitos (Figuras 7-23), además de cómo se distribuyen de acuerdo a las diversas etapas de desarrollo de *T. solium* (Tablas 2-7); la combinación de la observación de la fluorescencia emitida por los marcadores empleados y el uso de la técnica de Nomarsky (DIC) fueron estrategias que permitieron determinar la distribución de dichas proteínas en el tejido (Figuras 10-22). Como se observó, la ventaja de haber empleado la microscopía de fluorescencia es que hubo la posibilidad de hacer la observación, en un mismo instante, de diferentes marcadores fluorescentes en el mismo tejido y ello reveló que en determinados momentos las proteínas del citoesqueleto presentan una colocalización (figuras 9-22, C) o bien, que se encuentran distribuidas en diferentes lugares de los tejidos parasitarios estudiados (figuras 9-22, A y B) y lo cual es una de las ventajas máximas que produce el uso de esta tecnología de observación como ha sido establecido³⁷.

De las proteínas del citoesqueleto estudiadas, la actina filamentosa revelada por la faloidina rodaminada se encontró presente en todos los tejidos y en todas las fases parasitarias, lo cual ya había sido evidenciado en la fase larvaria³⁴. Se encontró que en los cisticercos, esta proteína está principalmente expresada en fibras musculares de la zona del tejido subtegumentario (figuras 10-15, B), en los bordes del canal espiral y las ventosas del escólex (figuras 10-13) y a nivel de las células flama (tabla 4). Por lo observado, la actina F es una proteína de amplia distribución tisular en *T. solium*, lo cual es un indicativo que esta proteína es importante para la estructuración tisular de estos parásitos y que ello podría tener importancia en la sobrevivencia de los parásitos en sus hospederos^{34, 38}. La actina en su forma filamentosa, aparte de brindar las características de estructuración de las células, tiene un papel relevante en su fisiología, como el servir como puente de unión de proteínas del metabolismo como las de la glucólisis, la formación de nuevas estructuras celulares como las gemaciones en hongos, el transporte de RNA mensajero durante la síntesis de proteínas, el tráfico vesicular en el interior de las células durante los procesos de endocitosis y exocitosis³⁶. Por ello, en la actualidad existen determinadas sustancias químicas que se ha encontrado tienen efecto específico en la polimerización de la actina³⁶ y lo cual se ha establecido podría servir como base del desarrollo de fármacos antiparasitarios específicos para este tipo de organismos³⁸. En los presentes estudios, se encontró que la NTZ tuvo un efecto aparente al nivel de la estructuración de la actina filamentosa (figuras 9, 11, 13 y 15, B; tablas 2-4), lo cual podría ser un indicativo de que esta sustancia química también afecta al citoesqueleto de actina; no existe certidumbre del mecanismo de acción de la NTZ, pero se postula que actúa por inhibición de la funcionalidad de la piruvato ferredoxina oxido-reductasa (una enzima del metabolismo celular). Si la NTZ altera la estructuración de la actina F y ésta es necesaria para la estabilidad y funcionalidad de las enzimas del metabolismo celular, cabría la posibilidad de que la NTZ, cuando altera la estabilidad de la actina F, produzca una alteración indirecta de la funcionalidad de la enzima mencionada. Además, se asegura que otras enzimas del metabolismo anaerobio podrían ser afectadas por NTZ²⁵, y en ambos casos, el daño sobre actina podría estar provocando el efecto en todo este grupo de enzimas. En el laboratorio se han obtenido evidencias experimentales adicionales, no presentadas en este trabajo experimental, en las que por microscopía electrónica de barrido se encontró que los tejidos de *T. solium* resultaron alterados en su estructura por el efecto de la NTZ y los filamentos de actina estuvieron aparentemente involucrados (Ferrer A, datos no publicados).

En el caso de la miosina II, revelada por el marcaje con los anticuerpos anti-miosina de *T. solium*, se encontró que esta proteína al igual que la actina F estuvo localizada en las fibras musculares de los tejidos ya mencionados (figuras 16-23; tablas 5 y 6). No se hicieron experimentos de colocalización de estas dos proteínas, pero ambas se encontraron principalmente en fibras musculares como también ya se había descrito³³, así como se les encontró en diferentes estadios

parasitarios como había sido demostrado en extractos parasitarios musculares^{30, 39}. De la misma manera que en la distribución y la función de la actina F, la miosina II muscular podría estar involucrada en importantes funciones celulares de los parásitos que se requieren para su sobrevivencia en sus hospederos y, por lo consiguiente, podría ser una proteína blanco para el desarrollo de fármacos³⁸.

El marcaje fluorescente de la tubulina- α mostró que esta proteína tiene una amplia distribución en todos los tejidos parasitarios y, aparentemente, también se le encontró colocalizando junto a las fibras musculares que contenían tanto actina como miosina (figuras 9-23). Sin embargo, no siempre se le encontró a nivel de fibras musculares. Aunque sería necesario el continuar con la detección de la tubulina- α en los tejidos de los parásitos de *T. solium*, principalmente para definir si se encuentra esta proteína en fibras musculares, la distribución que se le encontró en los tejidos parasitarios es algo nuevo para este tipo de parásitos ya que no se ha descrito nada al respecto en la literatura. De acuerdo a lo visto en la literatura, la importancia de establecer la distribución de la tubulina en los parásitos muestra que esta proteína es esencial para los parásitos en lo referente a su sobrevivencia en sus hospederos, así como a la patogenia que producen en ellos. Esta proteína, al igual que la actina y la miosina, por ser una proteína del citoesqueleto se presenta como un excelente blanco de acción farmacológica como lo muestra el empleo de fármacos antiparasitarios de amplia acción que afectan la estructuración de la tubulina como en el caso de los derivados de la molécula del bencimidazol^{9, 31}, por lo que es necesario continuar con los estudios de caracterización de las proteínas del citoesqueleto de estos parásitos, ya que se ha encontrado que estas presentan isoformas de las proteínas específicas de los parásitos y de su estadio de desarrollo³⁸. El marcaje fluorescente más importante de tubulina se encontró a nivel del tegumento de los tres estadios parasitarios analizados. Sin embargo, también se le encontró de manera importante a nivel del parénquima tisular, específicamente en el canal espiral y en las ventosas del escólex invaginado. Sin embargo, por las imágenes obtenidas por el microscopio confocal (figuras 14, 15, 20 y 21) se encontró que en el estadio adulto aparentemente hay una menor expresión de la tubulina en comparación con los otros estadios parasitarios estudiados. El que se haya encontrado una importante expresión de tubulina en el tegumento podría estar en relación con lo que se conoce para los cisticercos de *T. crassiceps* en los cuales se estableció que a este nivel, ellos efectúan un dinámico e intenso tráfico vesicular, el cual seguramente incluye tanto a procesos de endocitosis como de exocitosis que van desde la superficie parasitaria al tejido laxo o el parénquima tisular y viceversa⁴⁰. El tratamiento con fármacos derivados del benzimidazol altera de manera importante dicho tráfico vesicular, también en cisticercos de *T. crassiceps*²⁶ y seguramente esto motiva que los parásitos sean dañados por el hospedero y pierdan la capacidad de sobrevivir en ellos porque no logran obtener nutrientes ni logran sacar los productos tóxicos. La tubulina- α también se encontró en otras regiones de los tejidos parasitarios y de ellas destaca su presencia a nivel de las células flama, específicamente en lo que se refiere al penacho de cilios como ya se había reportado⁴. En este sitio, se encontró que la tubulina está distribuida desde la hebilla de actina y se encuentra al interior de los cilios (tabla 4), pero nunca se le observó al interior del cuerpo celular de tales células. Como se indicó para el papel biológico de la tubulina, en el caso de los parásitos, cualquier estado que altere su dinámica o estabilización produce cambios importantes en las células u organismos, motivo por el cual les puede conducir a sufrir daños irreversibles, e incluso su muerte.

La utilidad del DAPI como marcador fluorescente permitió identificar los núcleos celulares en las diferentes capas de los tejidos parasitarios de los diferentes estadios de desarrollo estudiados; se encontró, como se ha publicado al respecto¹ que una parte importante de células se encuentran por debajo del tegumento en la capa germinal y que se asocian a diferentes tipos de células como las de fibras musculares, subtegumentarias y células flama. Según observaciones realizadas con DAPI al máximo aumento del microscopio confocal empleado (60x) y con aumentos digitales que van desde los 5x hasta los 9x, se observó que los núcleos son redondos con diámetros aproximados de 4 μm y según el marcaje fluorescente son densos y compactos (Fig. 24; tabla 4). A diferencia de los núcleos de parásitos que no fueron tratados con NTZ, se encontró que en aquellos en que si hubo

tratamiento, los núcleos perdieron sus características morfológicas ya que se vieron difusos, de tamaño variable, perdieron su forma redonda clásica, se agregaron en el tejido y se encontraron en mayor cantidad en los campos observados (figuras 11, 13, 15, 17, 19, 21; tabla 4). Es posible que debido al efecto del fármaco en los tejidos de los parásitos, se haya producido una compactación del tejido que hizo que las células se aglomerasen y que se observó más notoriamente en la pared vesicular de los cisticercos y de los cisticercos evaginados. En los parásitos adultos, aparentemente, no hubo una agregación tan marcada de los núcleos como se observó en los metacéstodos. Los núcleos observados, luego de las reconstrucciones tridimensionales, permitieron dar una idea de la disposición espacial de las células, lo cual permitió definir qué tanto daño se presentó en las células luego del tratamiento con la NTZ.

Luego de la obtención de las imágenes mediante el microscopio confocal, éstas se editaron de manera que se las pudiera observar en cuanto a su distribución en tercera dimensión. Sin embargo, aún cuando la resolución de tales reconstrucciones no permite ver las imágenes con un mayor aumento ni permite mejorar la definición de las imágenes, se pudo observar que la distribución de la marca fluorescente también se presenta en un plano espacial (figuras 25 y 29). Estos problemas de reconstrucción se lograron sobrellevar cuando las imágenes se procesaron mediante el programa de cómputo AMIRA y las observaciones se efectuaron en la sala IXTLI. Con tal programa no sólo se hicieron mejores observaciones, sino que se logró mejorar la nitidez de las imágenes y lograr la reconstrucción completa de las células flama por el marcaje fluorescente de sus núcleos, de actina y tubulina. No se hicieron reconstrucciones con los marcajes fluorescentes para la miosina. Los resultados obtenidos permitieron establecer la forma en que se distribuyen las proteínas del citoesqueleto en estudio en las células flama y con ello, corroborar lo que se había obtenido al respecto para cisticercos de *T. solium*⁴; en los presentes resultados se encontró que la tubulina está asociada a los cilios de las células, los cuales muestran una forma ovalada y alargada (figura 26), envueltos de forma semejante por la hebilla de actina-F marcada fluorescentemente con rodamina y asociados a núcleos teñidos por DAPI. Según las imágenes en 3-D, los núcleos pueden estar en el mismo plano del penacho ciliar o bien, pueden estar proyectados en un plano perpendicular, incrustados en el parénquima tisular. Las inmersiones que se hicieron en las reconstrucciones tridimensionales, en diferentes planos de observación (Fig. 27), mostraron que las CF están al interior de un espacio que les ofrece la matriz intersticial en la que se encuentran incrustadas, y, aparentemente, se encontró que las CF están en vecindad o en conexión con ductos relacionados con el sistema protonefridial de los cisticercos como se ha descrito para otros invertebrados³. Gracias a la reconstrucción que se realizó para los marcajes fluorescentes, las imágenes de la CF se seccionaron mediante el programa AMIRA (figura 27) y se lograron obtener observaciones de la distribución de la marca fluorescente al interior de las células en diferentes niveles: de las observaciones obtenidas, se encontró que la hebilla de actina filamentosa está incrustada al interior del penacho de cilios y, aparentemente, la forma de la incrustación permite que el cuerpo celular esté anclado o unido al penacho ciliar. Es posible que la función de la hebilla de actina en las CF no sólo sea para estructurar el soporte de unión del cuerpo celular y el penacho ciliar, sino que esta hebilla podría tener un papel importante en los fenómenos de contracción que estas células realizan al eliminar o seleccionar las sustancias que pasan a través de ellas con la finalidad de ser redistribuidas al interior de los parásitos o bien, para la eliminación de los mismos. Observaciones adicionales que se han obtenido en el laboratorio, durante los marcajes fluorescentes con miosina, han mostrado que a nivel de la hebilla de actina hay presencia de la miosina II, lo cual habla de la presencia de un sistema de acto-miosina cuya función podría estar relacionada con los movimientos de contracción o movimientos celulares que este tipo de células podrían requerir y que también ya se ha establecido que podría darse en células semejantes⁴.

El papel importante que la estructuración de la actina filamentosa juega en las células flama podría ser ejemplificado con el efecto encontrado en esta proteína de los parásitos tratados con la NTZ. Según las observaciones mediante 3-D, la actina se separa de las CF y ello produce la pérdida de su estructura clásica, así como la separación del penacho ciliar del cuerpo celular. Se observó

que de todas las CF, el penacho ciliar fue la única estructura celular que aparentemente se mantuvo intacta luego del tratamiento con NTZ, por lo que cabría la posibilidad de que uno de los efectos de la acción de la NTZ sea a nivel de la actina F, de proteínas asociadas a actina o bien, también, del sistema acto-miosina. Esta propuesta aparentemente contrasta con lo descrito para el posible mecanismo de acción de la NTZ, para la cual se ha propuesto que actúa a nivel de enzimas del metabolismo del parásito como la piruvato ferredoxina oxido-reductasa^{25, 17}. Si se comprueba la relación entre actina y esta enzima, la idea de que actina pueda ser el blanco de NTZ, lo cual, a su vez, provocaría un efecto sobre dicha enzima, tendría mayor validez y aumentaría el conocimiento que se tiene del modo de acción de NTZ. Sin embargo, lo contrario también es plausible: el hecho de que NTZ tenga como blanco a la enzima, y ésta, a su vez, afecte a la actina; es por eso que más estudios deben ser hechos para conocer cuál es la interacción entre NTZ y actina u otra proteína del citoesqueleto.

La importancia de definir cuál es el efecto de la NTZ en parásitos céstodos de importancia médica como *T. solium* es necesaria para la búsqueda de nuevos fármacos efectivos para el tratamiento de las enfermedades parasitarias que producen este tipo de patógenos. Aún en la actualidad, con los conocimientos actuales y la tecnología que existe para el desarrollo de nuevos fármacos, se ha puesto poca atención en el desarrollo de fármacos antiparasitarios que sean muy efectivos, de fácil adquisición por la población que padece las enfermedades y que su síntesis y producción sea simple y a gran escala. La NTZ se considera que cumple con todas esas expectativas y su síntesis se ha basado en un diseño racional del fármaco. Este diseño ha venido mostrando que la sustancia química es efectiva para tratar diversas afecciones producidas por agentes parásitos, así como agentes de tipo bacteriano, por lo que parece presentan un amplio intervalo de acción. No se han hecho muchos estudios relacionados al efecto que tiene la NTZ sobre parásitos céstodos que afectan al hombre, sin embargo, los pocos estudios que se han hecho indican que este fármaco podría ser uno de elección durante las quimioterapias antiparasitarias^{25, 26}. Sin embargo, para que se haga un uso racional del fármaco y en el que se aplique toda la efectividad que pudiera ofrecer, es necesario ampliar los estudios concernientes a su forma de acción y sus blancos farmacológicos reales con lo que podrían encontrarse otras variantes efectivas para este tipo de compuestos, ya que paradójicamente el fármaco se diseñó para aliviar otros tipos de afecciones y ha resultado ser excelente para tratar enfermedades parasitarias diversas. Con los estudios realizados en el presente trabajo y otros que se han hecho en el laboratorio, se ha encontrado que la NTZ altera de forma importante la morfología de los cisticercos, cisticercos evaginados y los parásitos adultos de *T. solium*. No se ha determinado si los daños en los tejidos parasitarios se han presentado por efecto directo o indirecto de la NTZ, pero estos son evidentes en la morfología de los parásitos, sus tejidos y sus células como las CF, así como en la estructuración de las proteínas del citoesqueleto estudiadas. Al respecto valdría la pena evaluar el efecto de estas sustancias químicas sobre otras proteínas del citoesqueleto que podrían estar participando en la acción *in vitro* de esta sustancia. Según lo observado, los daños más evidentes se dieron a nivel de la capa germinal en donde hubo afectación de estructuras importantes como los componentes del sistema protonefridial. Esto seguramente produjo en los parásitos un proceso de autoenvenenamiento por falta de elementos para la eliminación de las sustancias de desecho tóxicas que producen los mismos parásitos. Así también, se encontraron alteraciones en los sistemas de fijación de los parásitos adultos, tales como las ventosas y el rostelo armado, en conjunto con el tegumento y las fibras musculares asociadas, con lo que los parásitos no podrían producir infección en sus hospederos y sobrevivir al ambiente que éstos les pudieran presentar.

Por lo visto en el presente proyecto, el empleo de la microscopía de fluorescencia, asociada a la reconstrucción tridimensional mediante la tecnología de cómputo indicada, es una herramienta experimental poderosa para visualizar no sólo la forma de estructuración de los tejidos parasitarios sino para evaluar la importancia de estructuras internas de las células como el caso de las proteínas del citoesqueleto y también, para evaluar el efecto de sustancias con potencial farmacológico en los parásitos como la NTZ. Aún más, mediante esta tecnología se pudo visualizar la estructuración de

las proteínas del citoesqueleto marcadas fluorescentemente en diferentes estadios de desarrollo de *T. solium*. La tecnología presentada de microscopía y reconstrucción por 3-D permite, a falta de un sistema de visualización a nivel ultraestructural, con la resolución que tiene la microscopía confocal, hacer una aproximación a este nivel de la constitución de los tejidos parasitarios y del efecto que en ellos se produce por la acción de fármacos. Ejemplos de esto han sido estudios hechos sobre la distribución de vasos y núcleos en el tejido cardíaco⁴², de la posición de órganos en un gasterópodo⁴³ o para ver el daño sufrido en diferentes regiones del hueso cortical⁴⁴. En este caso, esta técnica sirvió para dilucidar la ultraestructura del sistema protonefridial en *T. solium* y su componente más importante, las CF.

Lo obtenido en este trabajo de investigación, como otros que se han efectuado en el laboratorio con estrategias similares, permite ampliar estudios como lo que se ha hecho para la NTZ. Esto no solamente puede ser aplicado a lo que se estudia para céstodos de importancia médica como *T. solium*, sino que también se puede extender para otros organismos parasitarios o células en general. La combinación de las estrategias que se presentan aquí con lo que en el laboratorio se efectúa (tales como microscopía electrónica y el empleo del análisis proteómico) podrían definir cuál es el mecanismo de acción de compuestos como la NTZ y que están asociados a los cambios que produjeron en los tejidos de los organismos tratados.

Cabe ser mencionado que los efectos que se encontraron para la NTZ estuvieron asociados a exposiciones *in vitro* del compuesto, en tiempos definidos de manera arbitraria como los 5 min de exposición para el caso de tenias hasta 23-28 horas para los cisticercos evaginado y no evaginado, respectivamente. Sin embargo, aún con estos tiempos se encontraron daños que podrían reflejar el efecto de la NTZ bajo condiciones *in vivo*. Por lo consiguiente, es necesario el evaluar el efecto del compuesto bajo condiciones *in vivo* en modelos experimentales como la cisticercosis murina producida por cisticercos de *T. crassiceps* para determinar si las alteraciones en los parásitos son las mismas observadas en estos estudios o bien, si hay cambios importantes por la fisiología de los animales que contienen a los parásitos. Los efectos que la NTZ podría tener en los parásitos, podrían tener acciones distintas por la biodisponibilidad o biotransformación del fármaco en los organismos tratados y esto podría ser diferente de lo ya observado. Existe evidencia como lo obtenido en casos de tratamientos de *Echinococcus multilocularis*, otro céstodo de importancia médica, en donde otras concentraciones de NTZ han afectado a los parásitos²⁵ o bien, como con cisticercos de *T. crassiceps*²⁶, en donde una concentración de 0.06 µg/mL fue suficiente para alterar de manera notable la capa germinal de los parásitos, sin embargo en estos estudios, el efecto del compuesto químico se observó hasta los 11 días de tratamiento. No obstante, es urgente evaluar la concentración de la NTZ ideal, que afecte a los parásitos debido a que se tiene que evitar la presencia de efectos secundarios importantes por el uso de este fármaco¹⁸.

X. FIGURAS

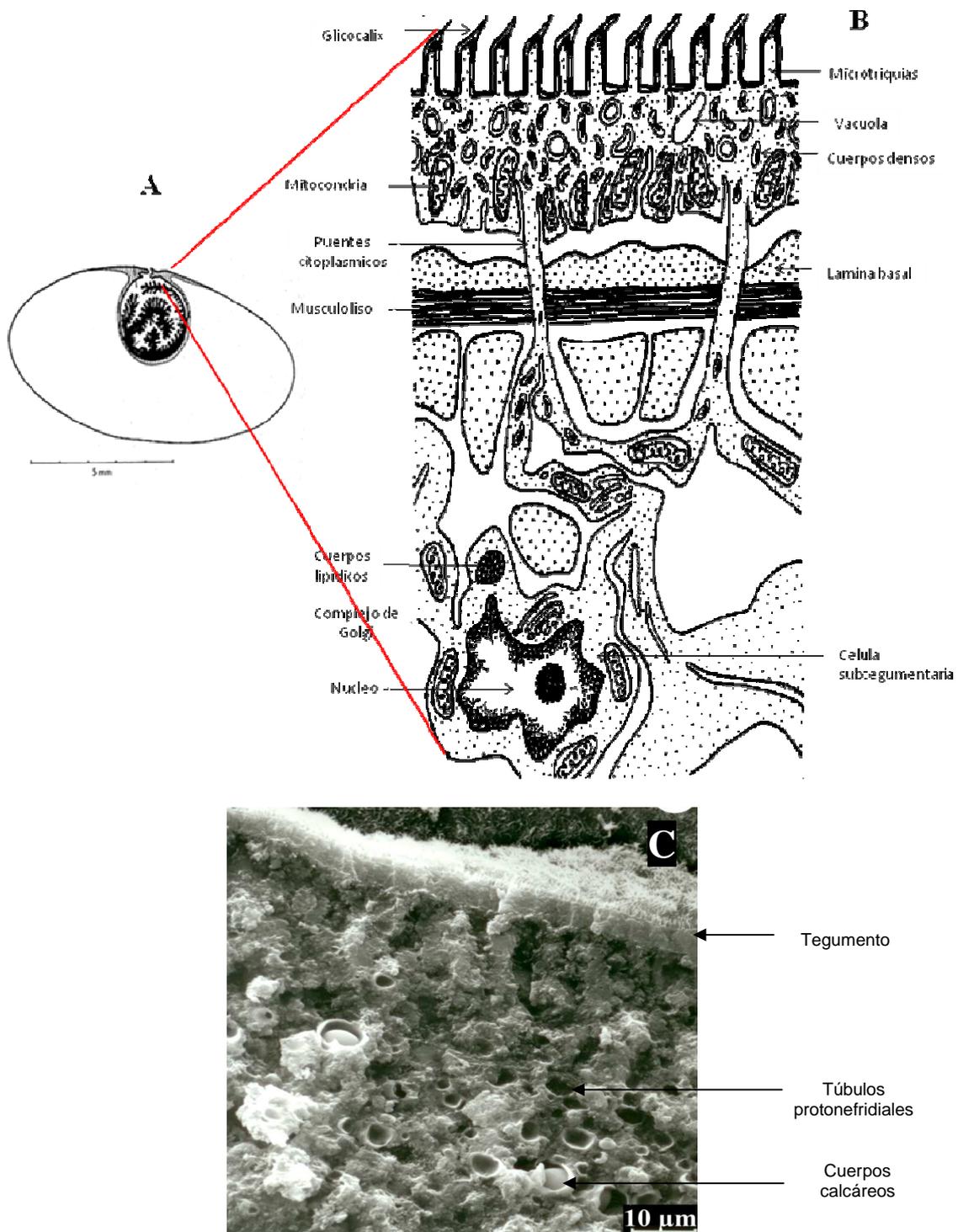


Fig. 1. Corte macroscópico de un cisticerco de *Taenia solium*. A. Esquema del corte transversal, B. Esquema de la ultraestructura del corte. C. Microfotografía tomada del microscopio electrónico de barrido que muestra la ultraestructura de *Taenia solium* (arriba, el tegumento; en el centro los túbulos protonefridiales que contienen células flama). A. Tomado de Slaiss⁴¹. B. Tomado de Biodidac, University of Ottawa. C. Tomada por A. Zepeda (Dpto. Biol. Cel. Fac. Med. UNAM).

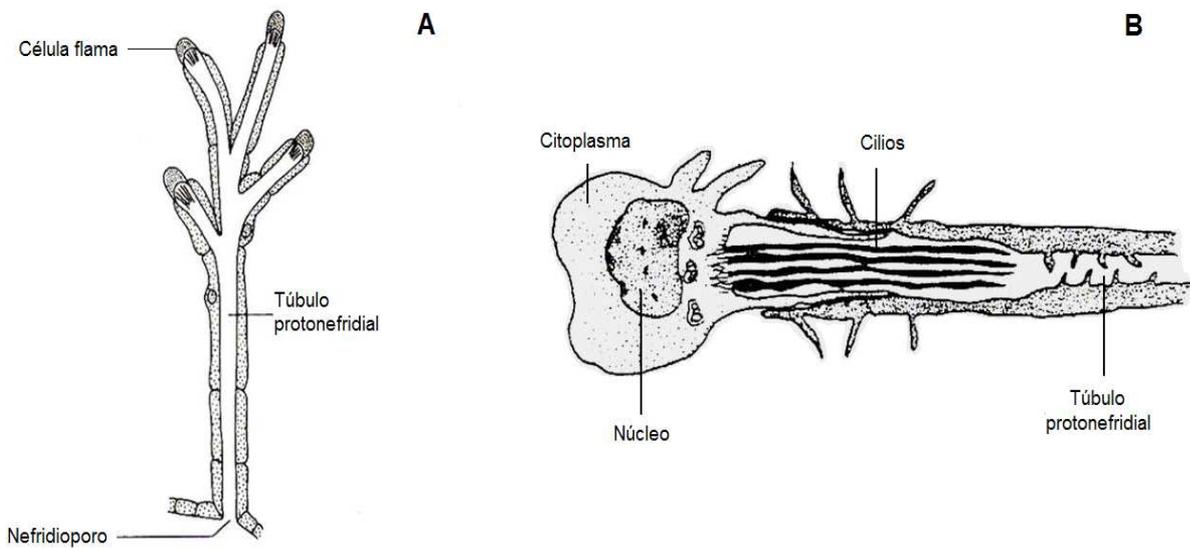


Fig. 2. Sistema protonefrial de los platelmintos. A. Túbulos protonefriales que terminan en células flama (Tomado de: Barnes³). B. Esquema de una célula flama y sus componentes (Tomado de: Walker JC, Anderson TD. 1998. The Platyhelminthes, Nemertea, Entoprocta and Gnathostomulida en: Anderson DT (Ed.). Invertebrate Zoology. Oxford University Press, Australia, p. 68.

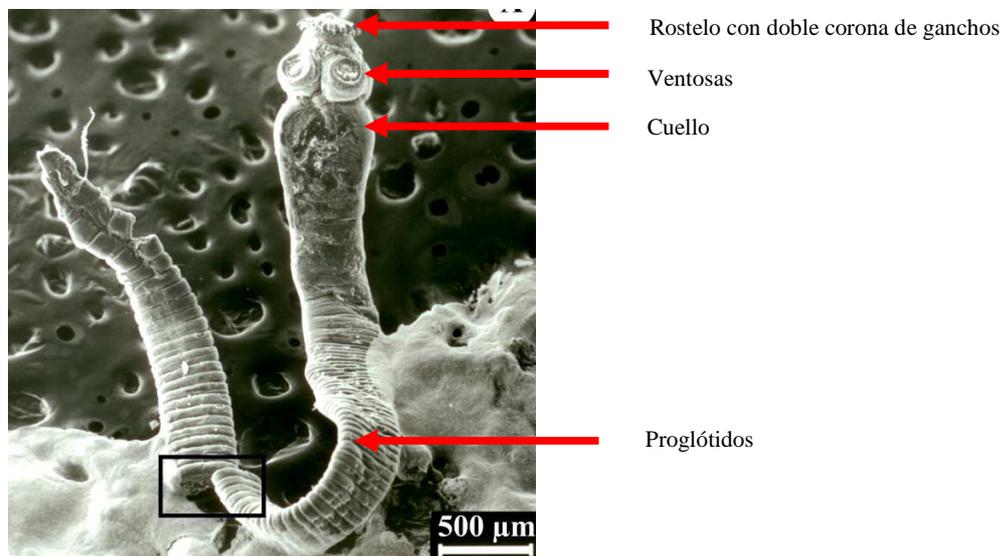


Fig. 3. Tenia adulta no grávida, recuperada de una infección experimental en hámster dorado inmunosuprimido. Se muestra el escólex con el rostelo y su doble corona de ganchos, las ventosas y el estróbilo conformado por varias unidades conocidas como proglótidos (obtenida por: Biól. Olivia Reynoso).

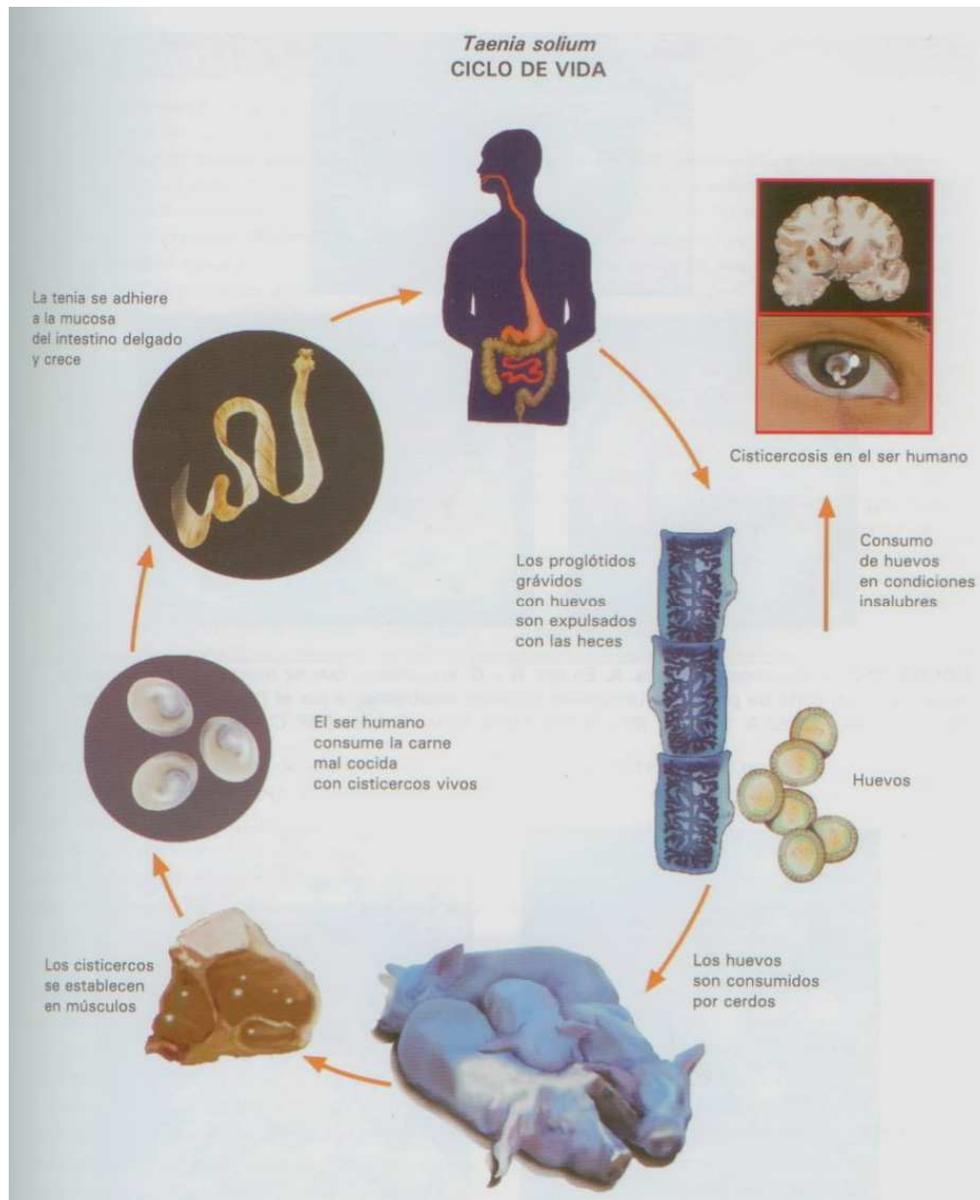


Fig 4. Ciclo de vida de *Taenia solium*. El ser humano es el hospedero definitivo del parásito, albergando la forma adulta en el intestino. Ahí, ésta forma huevos que son expulsados en las heces, los cuales pueden ser consumidos por los cerdos, los que desarrollarán la forma larvaria (cisticerco) en los tejidos musculares. El ciclo se cierra cuando el humano consume la carne de cerdo infectada con los cisticercos que, en el intestino, evaginan para desarrollar la forma adulta (Tomado de Flisser y Pérez-Tamayo, 2006).

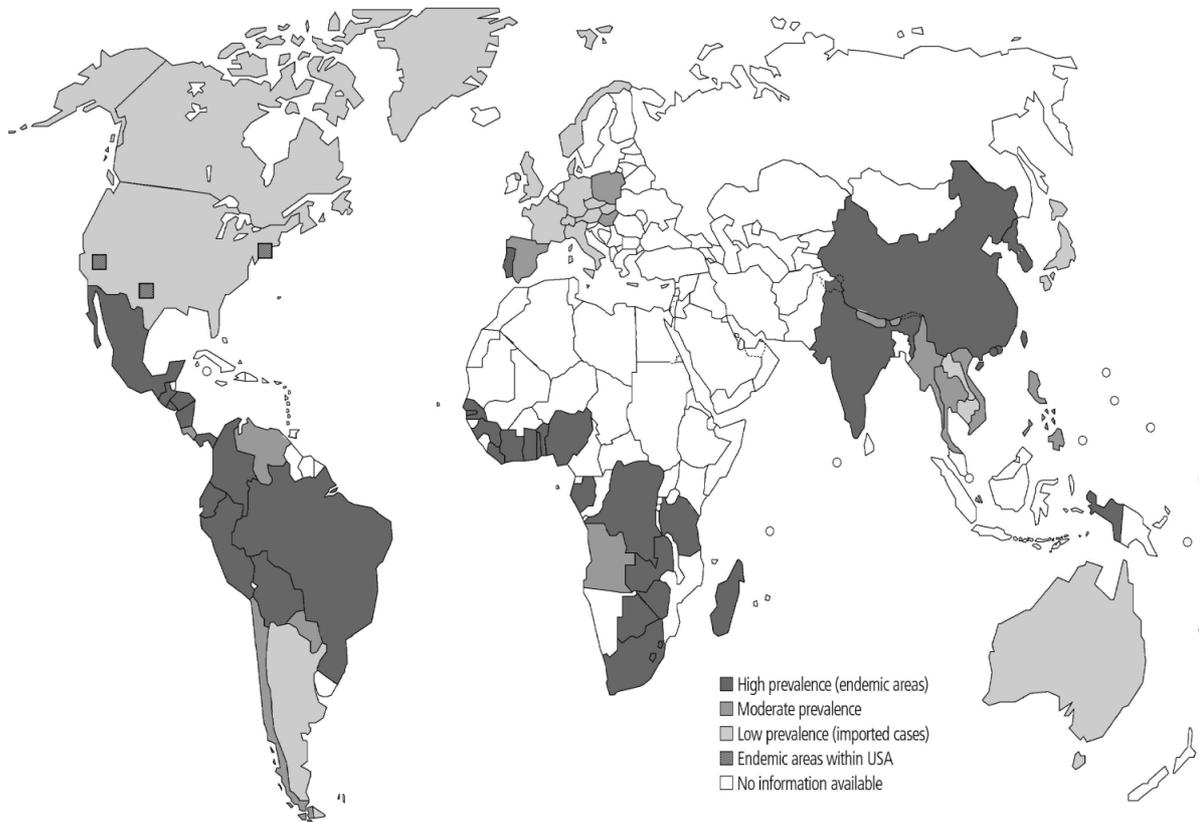


Fig. 5. Áreas con cisticercosis endémica en el mundo (Fuente: OMS, 2002).

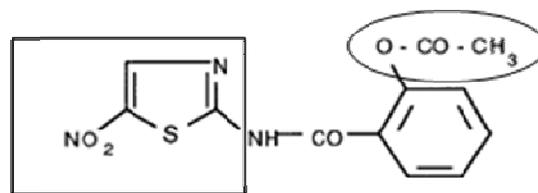


Fig. 6. Estructura química de la nitazoxanida. La NTZ se compone de una benzamida unida en la posición 2 al grupo acetiloxi (encerrado en círculo), y en la posición 1, al 5-nitro-2-tiazolil (encerrado en cuadro).

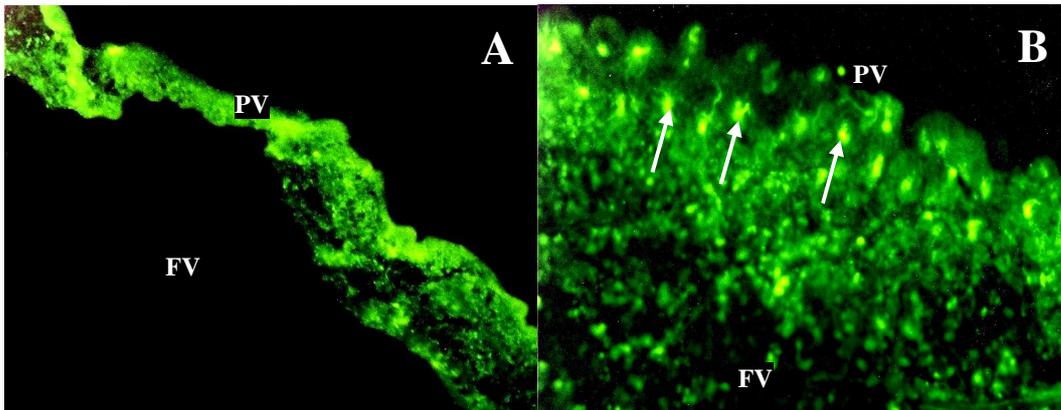


Fig. 7. Criocorte de un cisticerco evaginado marcado fluorescentemente para tubulina. La imagen muestra el marcaje fluorescente a nivel del tegumento de la pared vesicular del parásito que no recibió tratamiento y observado a un aumento de 20x (A) y del parásito tratado con NTZ, a 40x (B). El marcaje fluorescente en los tejidos del parásito que no recibió tratamiento es uniforme a lo largo del tegumento, mientras que en el tejido del parásito tratado se presenta en forma de aglomerados de marca fluorescente (señalados con flechas), así como la presencia de vesículas situadas en la superficie del tejido. FV: Fluido vesicular, PV: Pared vesicular.

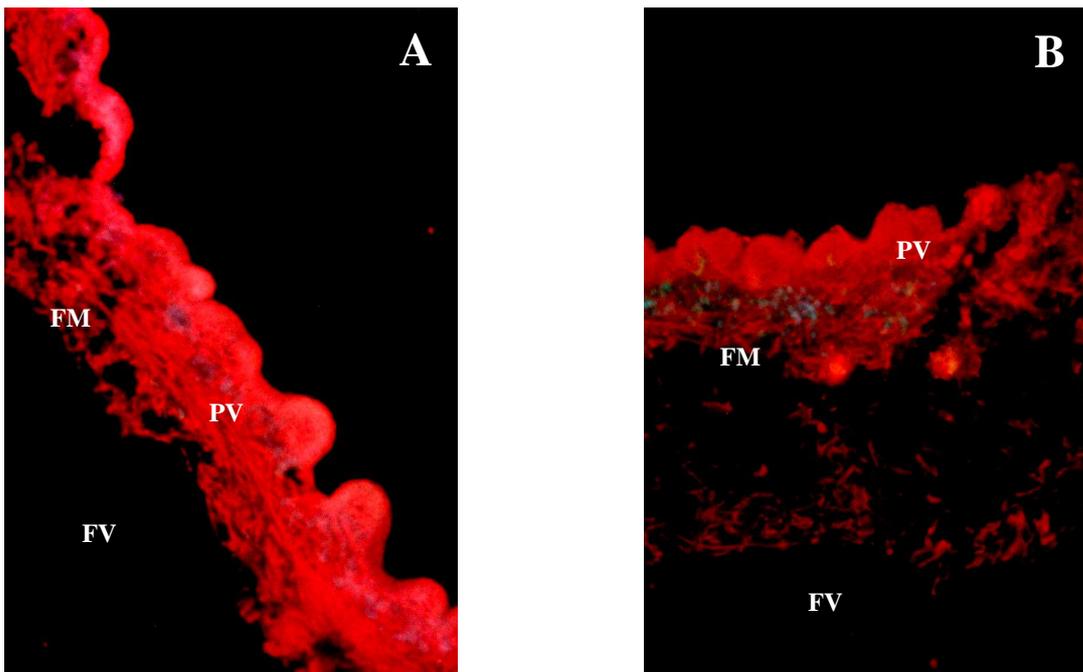


Fig. 8. Criocorte de un cisticerco evaginado marcado fluorescentemente para miosina tipo II. La imagen muestra el marcaje fluorescente que se localizó a nivel subtegumentario en las fibras musculares del tejido parasitario; en el caso del parásito que no recibió tratamiento alguno se encuentra la fluorescencia en fibras musculares que están situadas a lo largo del tejido parasitario (A), mientras que en el caso del tejido del parásito tratado, se observa que el marcaje fluorescente también se localiza en fibras musculares que son de menor longitud y no presentan el patrón de marcaje encontrado en el control (B). Las observaciones se hicieron con un objetivo de 40x. FM: Fibras musculares, FV: Fluido vesicular, PV: Pared vesicular.

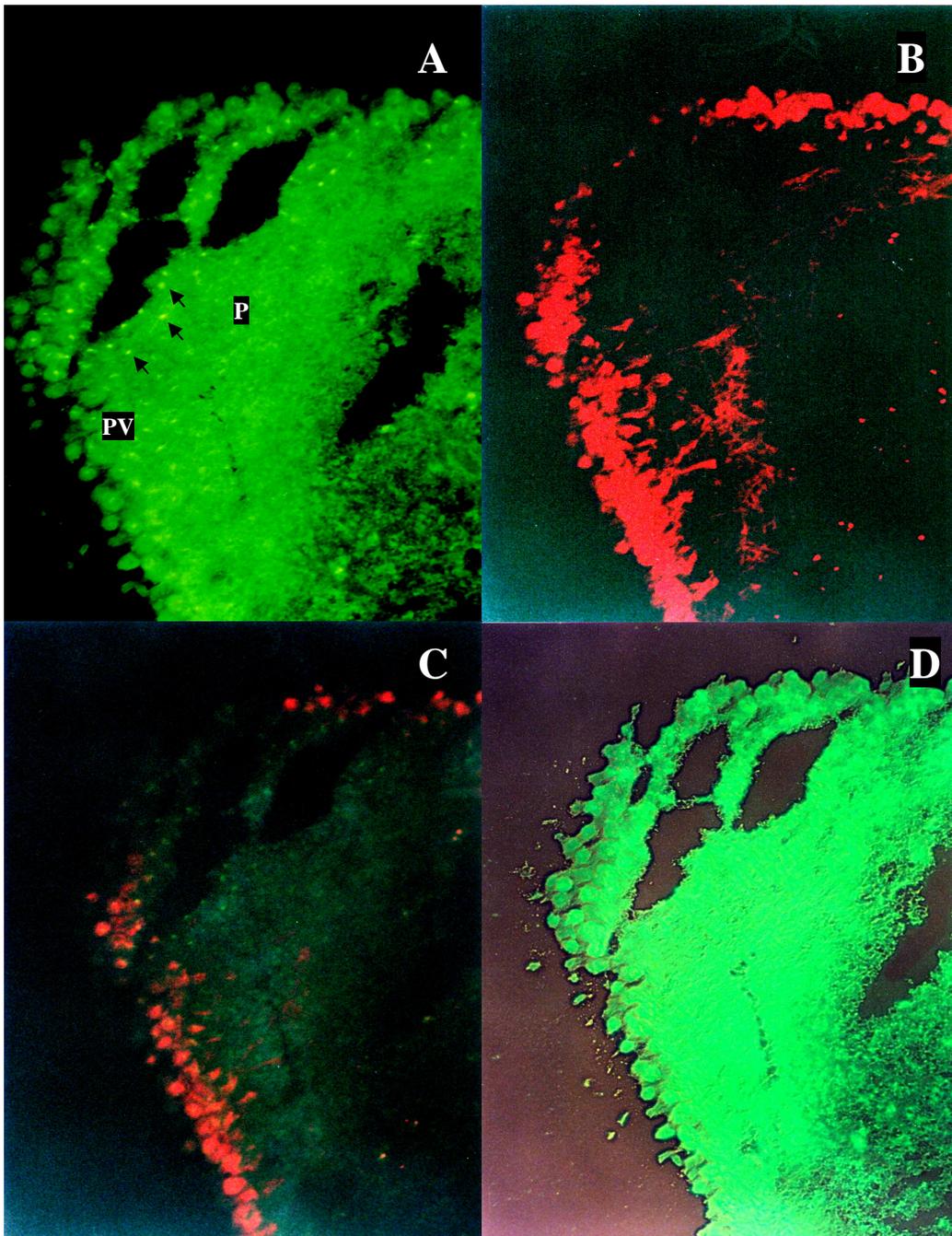


Fig. 9. Criocorte del cisticerco evaginado tratado con NTZ. Se observa la pared vesicular situada cerca de un sitio de evaginación del escólex. Las imágenes son semejantes, sólo que en una de ellas se muestra el marcaje fluorescente para tubulina (A) y en el otro se muestra el marcaje para actina filamentosa (B). La combinación de marcajes fluorescentes y la observación del tejido bajo la técnica DIC se presenta en las figuras C y D, respectivamente. En flechas negras se evidencian los manchones cercanos a la pared vistos en la figura 7. Las observaciones se hicieron con un objetivo a 20x. P: Parénquima, PV: Pared vesicular.

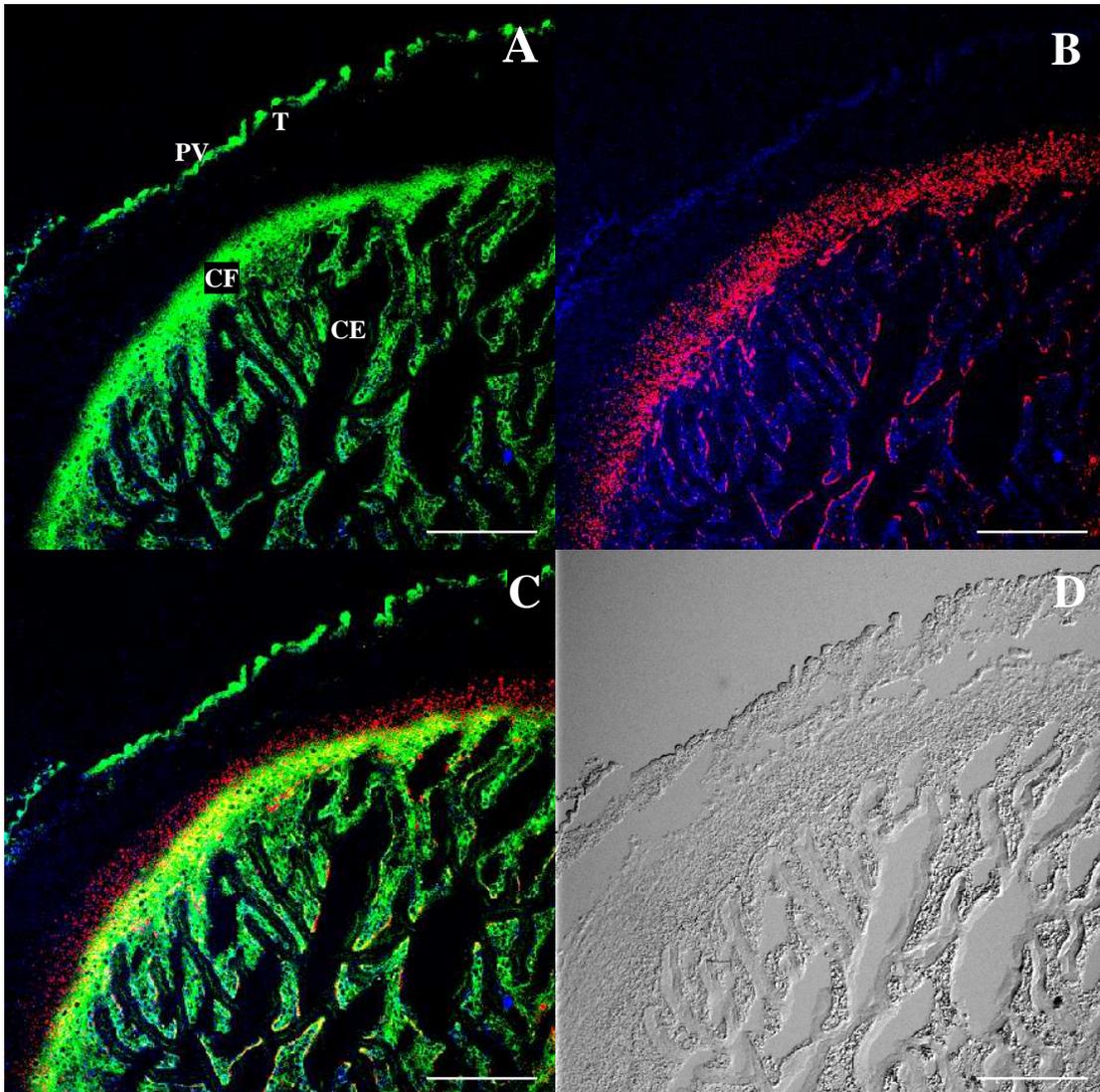


Fig. 10. Criocorte de un cisticerco. En la imagen se muestran las observaciones que se obtuvieron en una misma región del metacéstodo. Mientras que en A, B y C se muestra su marcaje fluorescente con anticuerpos secundarios marcados con fluoresceína (A y C), con faloidina rodamina (B y C), y con DAPI para teñir núcleos (A, B y C), en D se muestra al tejido sin marcaje fluorescente observado bajo condiciones de iluminación DIC. La imagen se tomó a 10x, en la que la línea corresponde a 250 μm . CE: Canal espiral, CF: Células flama, PV: Pared vesicular, T: Tegumento sincicial continuo de la PV.

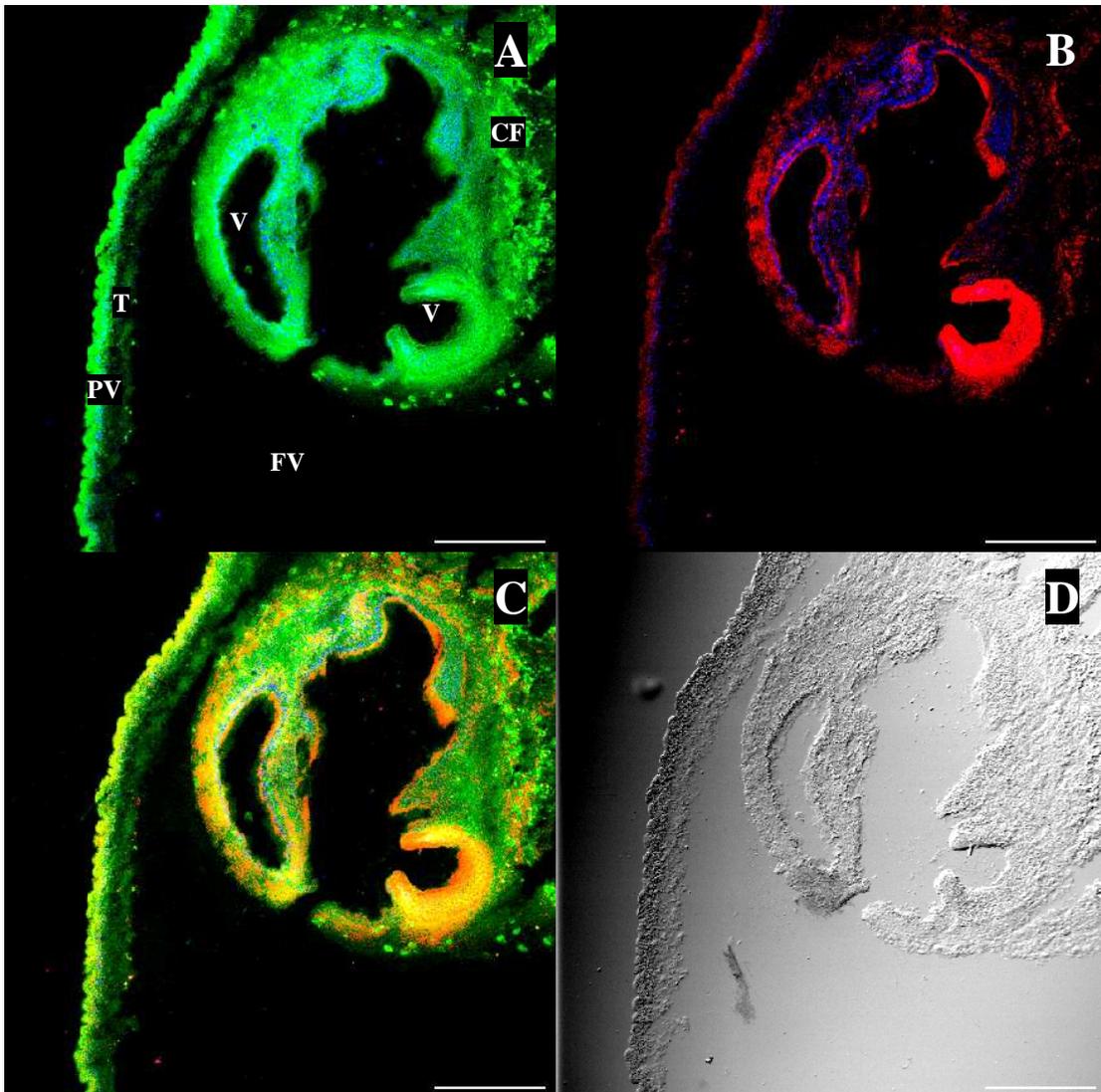


Fig. 11. Criocorte de un cisticerco tratado con NTZ. Como en la figura 10, las imágenes obtenidas muestran el marcaje para tubulina- α (A), actina-F y núcleos (B), la colocalización de las marcas fluorescentes (C) y el criocorte observado mediante DIC (D). Aún cuando se observa por DIC que hay pérdida de tejido parasitario, el nivel de fluorescencia por tubulina- α se incrementó en el tegumento sincicial continuo perteneciente a la PV y según la imagen en C, los marcadores fluorescentes se encuentran localizados en las mismas zonas de tejidos. Luego que los parásitos se recuperaron, se mantuvieron *in vitro* en presencia de NTZ (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Imagen tomada a aumentos de 10x. La barra corresponde a 250 μm . CF: Célula flama, FV: Fluido vesicular, PV: Pared vesicular, T: Tegumento sincicial continuo, V: Ventosa.

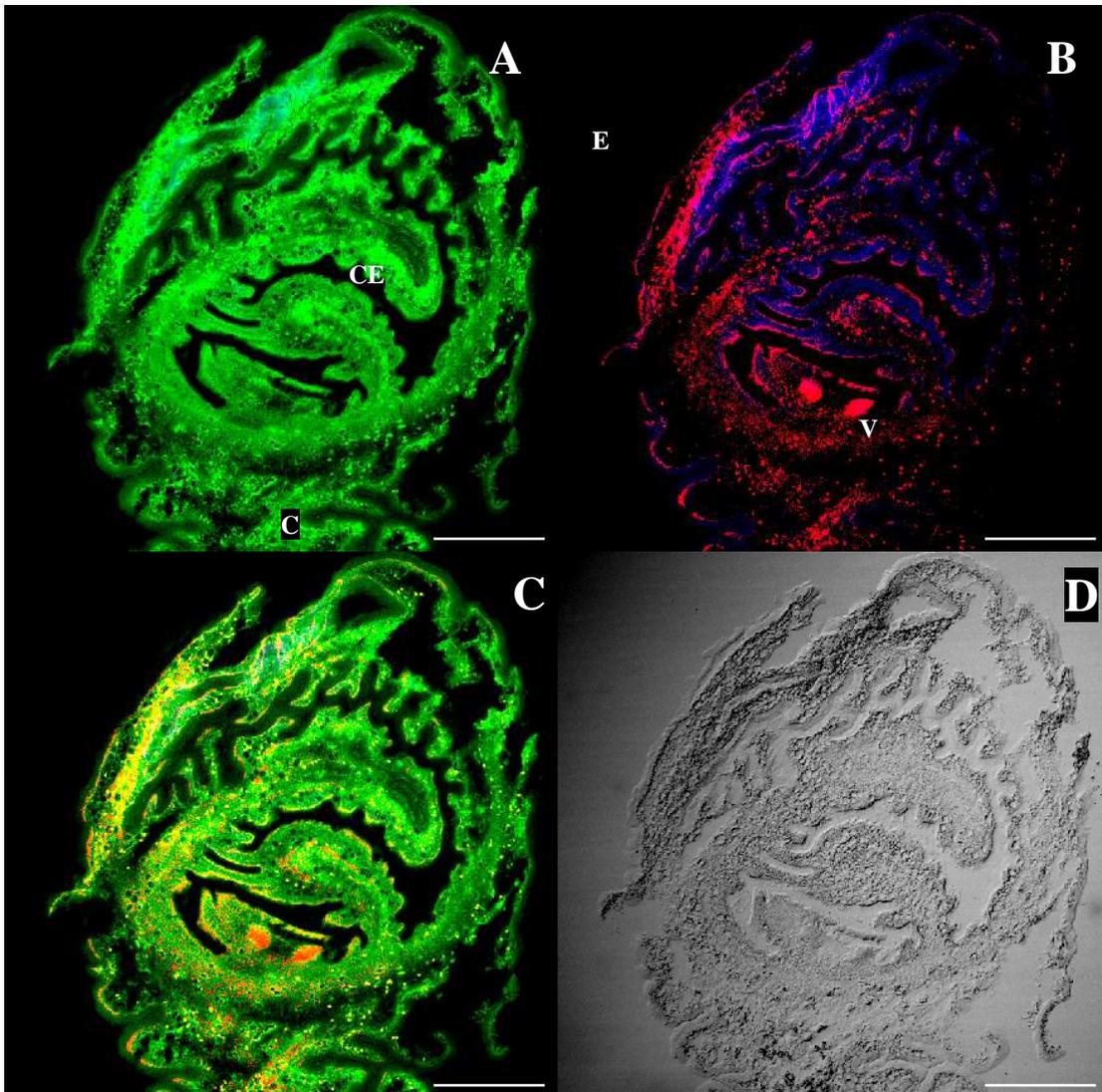


Fig. 12. Criocorte de cisticerco evaginado. Las marcas fluorescentes corresponden a las mismas empleadas anteriormente; A. Tubulina en verde B. Actina en rojo, C. Colocalización de los tres marcajes fluorescentes y D. criocorte bajo observación por DIC. El DNA teñido en azul por DAPI se presenta en A-C. La barra corresponde a 250 μ m. La imagen se obtuvo por observación con un objetivo 10x. C: Cuello, CE: Canal espiral, E: Escólex, V: Ventosa.

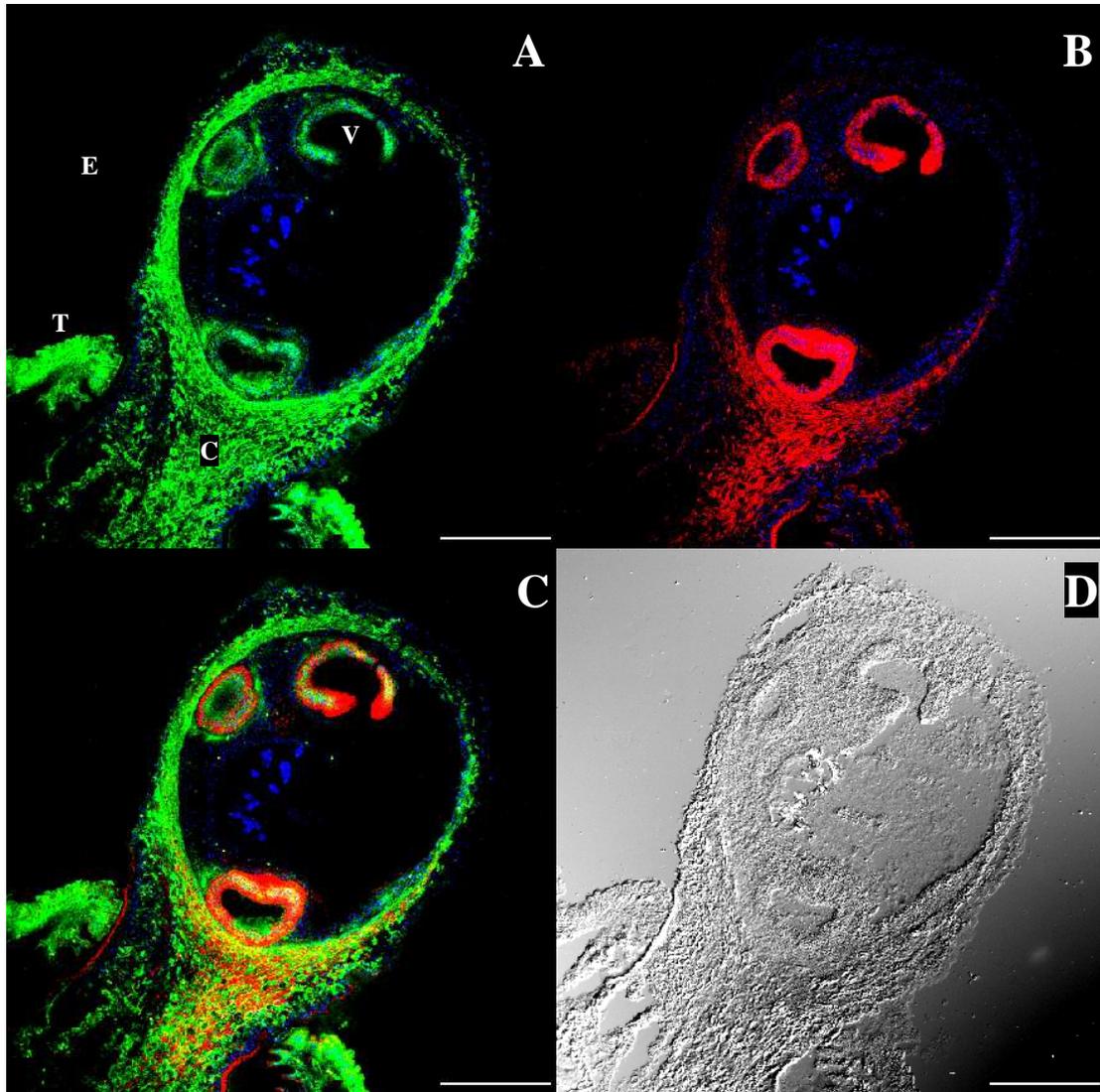


Fig. 13. Criocorte de un cisticerco evaginado tratado con NTZ (2.5 µg/mL). De la misma manera, los marcajes corresponden a: A. Tubulina, B. Actina, C. Colocalización actina y tubulina y D. Iluminación DIC. En azul se marcan los núcleos (A-C). Escala 250 µm; objetivo 10x. C: Cuello, E: Escólex, T: Tegumento, V: Ventosa.

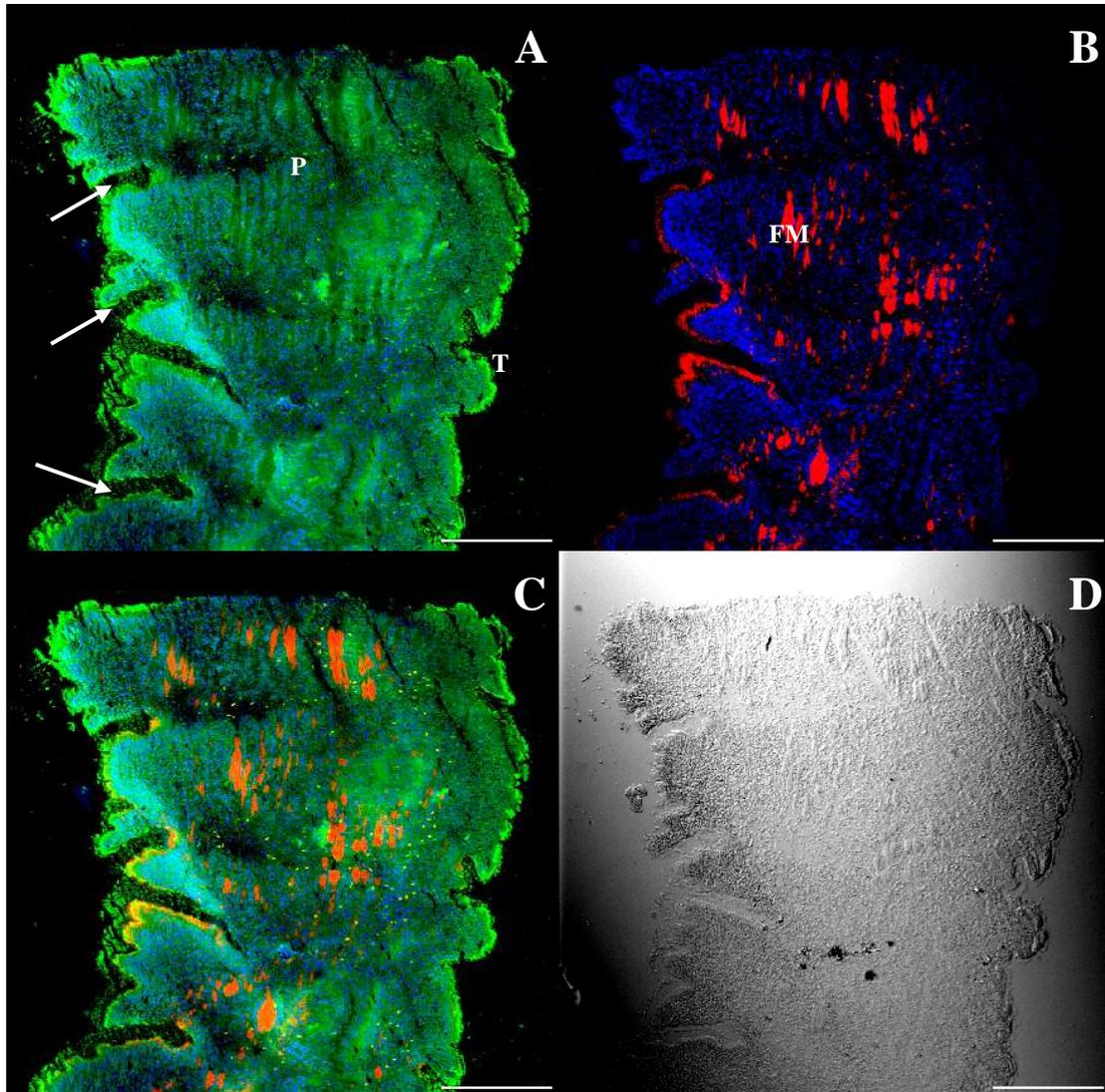


Fig. 14. Fragmento del estróbilo inmaduro de una tenia adulta control. Los marcajes fluorescentes corresponden a tubulina alfa (A), actina filamentosa (B), la colocalización de actina y tubulina (C) y las imágenes sin marcaje fluorescente observadas mediante DIC (D). El marcaje en azul corresponde a los núcleos celulares (DNA) hechos reaccionar con el DAPI (A-C). Las flechas están situadas a nivel de las invaginaciones del tegumento parasitario. Las observaciones se efectuaron con un objetivo 10x. La barra corresponde a 250 μ m. FM: Fibras musculares, P: Parénquima y T: Tegumento.

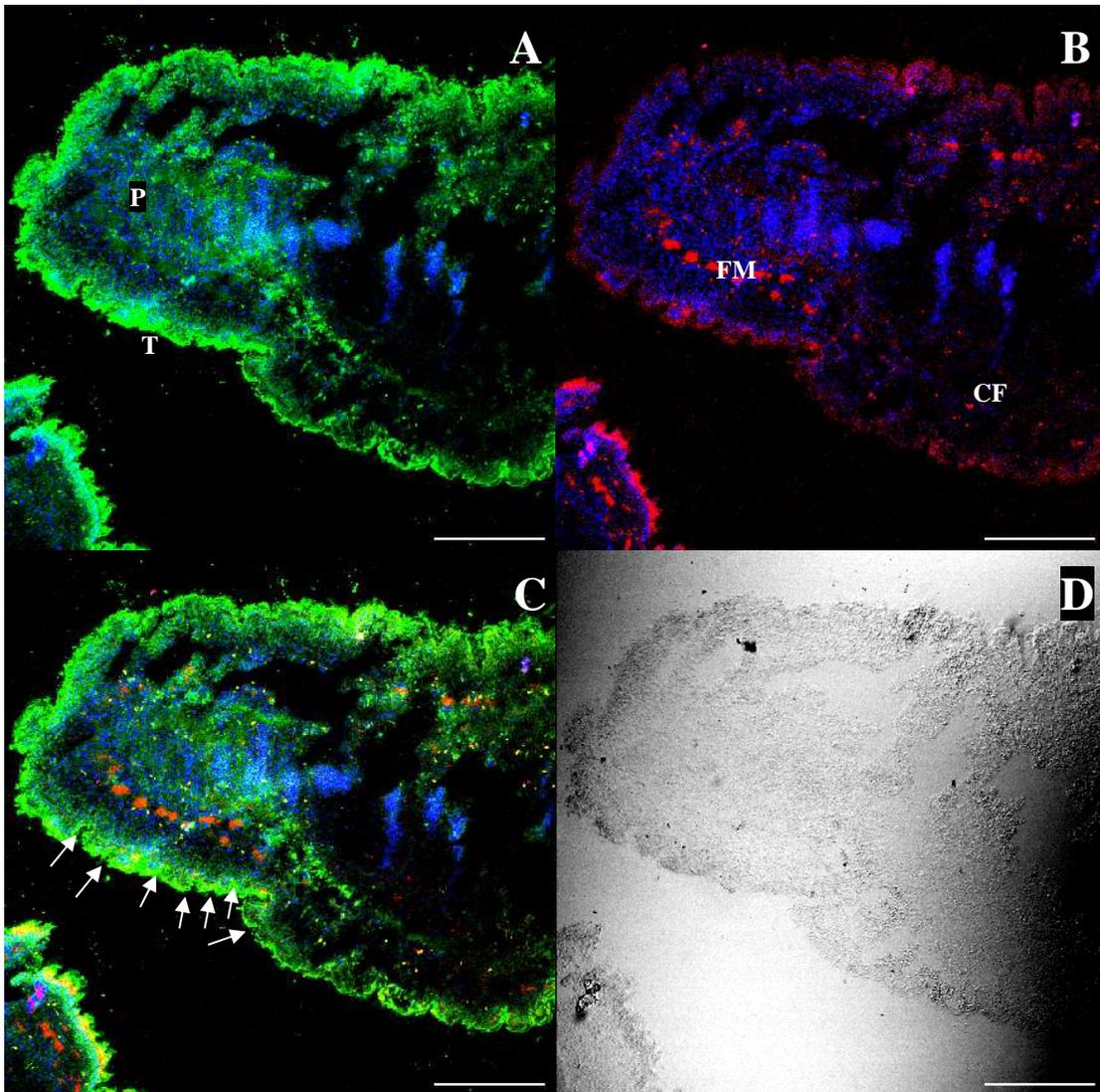


Fig. 15. Criocorte del estróbilo inmaduro de *Taenia solium* adulto tratado con NTZ. Las marcas fluorescentes corresponden a A. tubulina, B. actina, C. colocalización actina y tubulina y en D. la iluminación por DIC. En azul se observa el DNA, mayoritariamente marcando núcleos (A-C). Nótese la gran cantidad de pliegues señalados en flechas. Escala 250 μ m; objetivo 10x. CF: Células flama, FM: Fibras musculares, P: Parénquima, T: Tegumento.

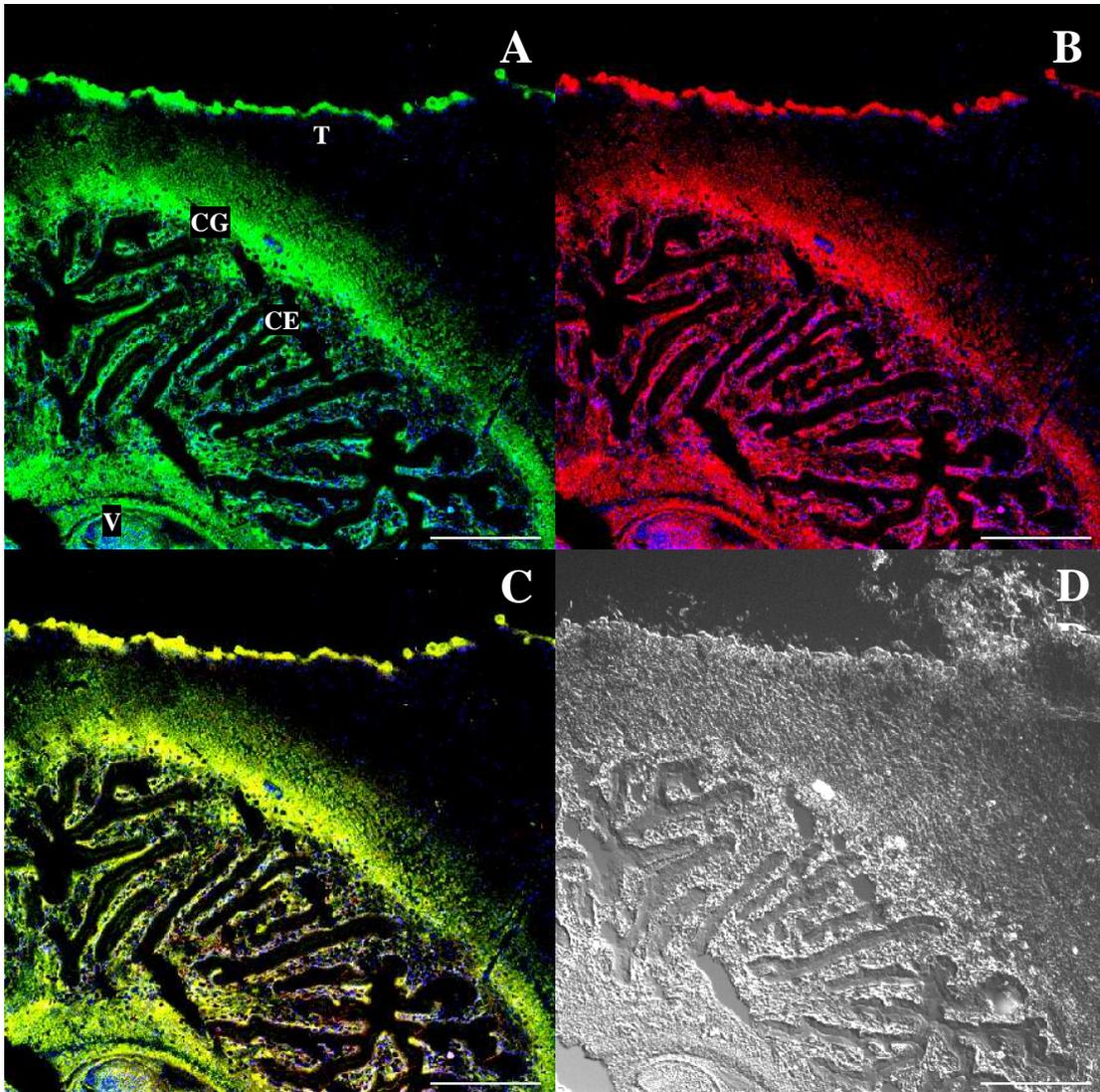


Fig. 16. Criocorte de un cisticerco. Las marcas fluorescentes empleadas en estas imágenes corresponden a la identificación de la tubulina alfa (A), miosina II de *Taenia solium* (B), la colocalización de ambas proteínas (C) y la distribución del tejido parasitario observado mediante iluminación por DIC (D). Los núcleos celulares se evidenciaron por el marcaje fluorescente azul sobre el DNA (A-C). Las imágenes se obtuvieron mediante un objetivo 10x. La barra de la escala corresponde a 250 μm . CE: Canal espiral, CG: Capa germinal T: Tegumento.

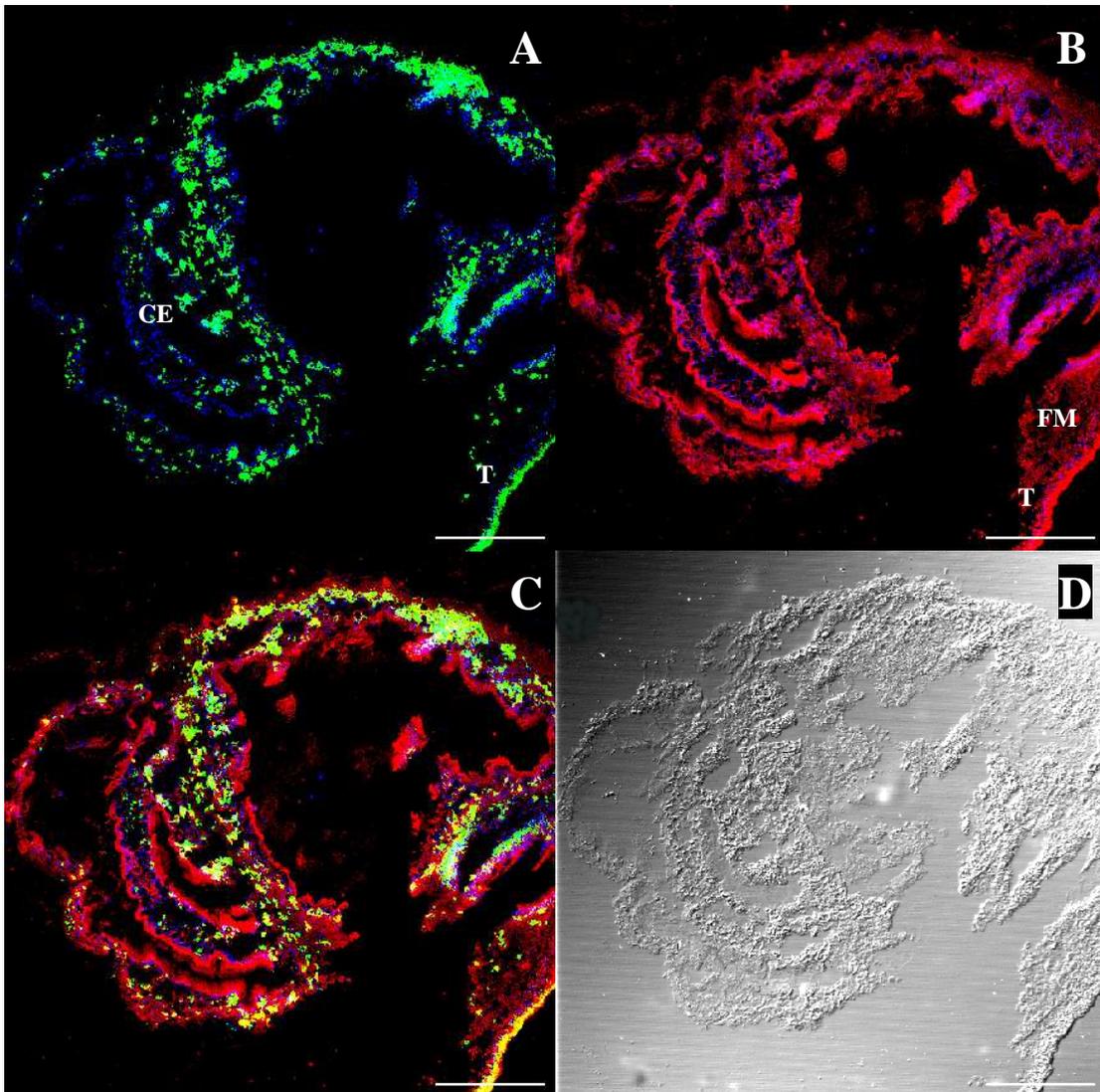


Fig. 17. Criocorte de un cisticerco tratado con NTZ. Como en la figura 16, las marcas fluorescentes corresponden al marcaje para tubulina alfa (A), miosina II (B), la colocalización de estas marcas (C) y el DNA (A-C), así como la observación del tejido parasitario mediante DIC (D). Las observaciones se hicieron bajo las mismas condiciones descritas en la figura anterior. CE: Canal espiral, FM: Fibras musculares, T: Tegumento.

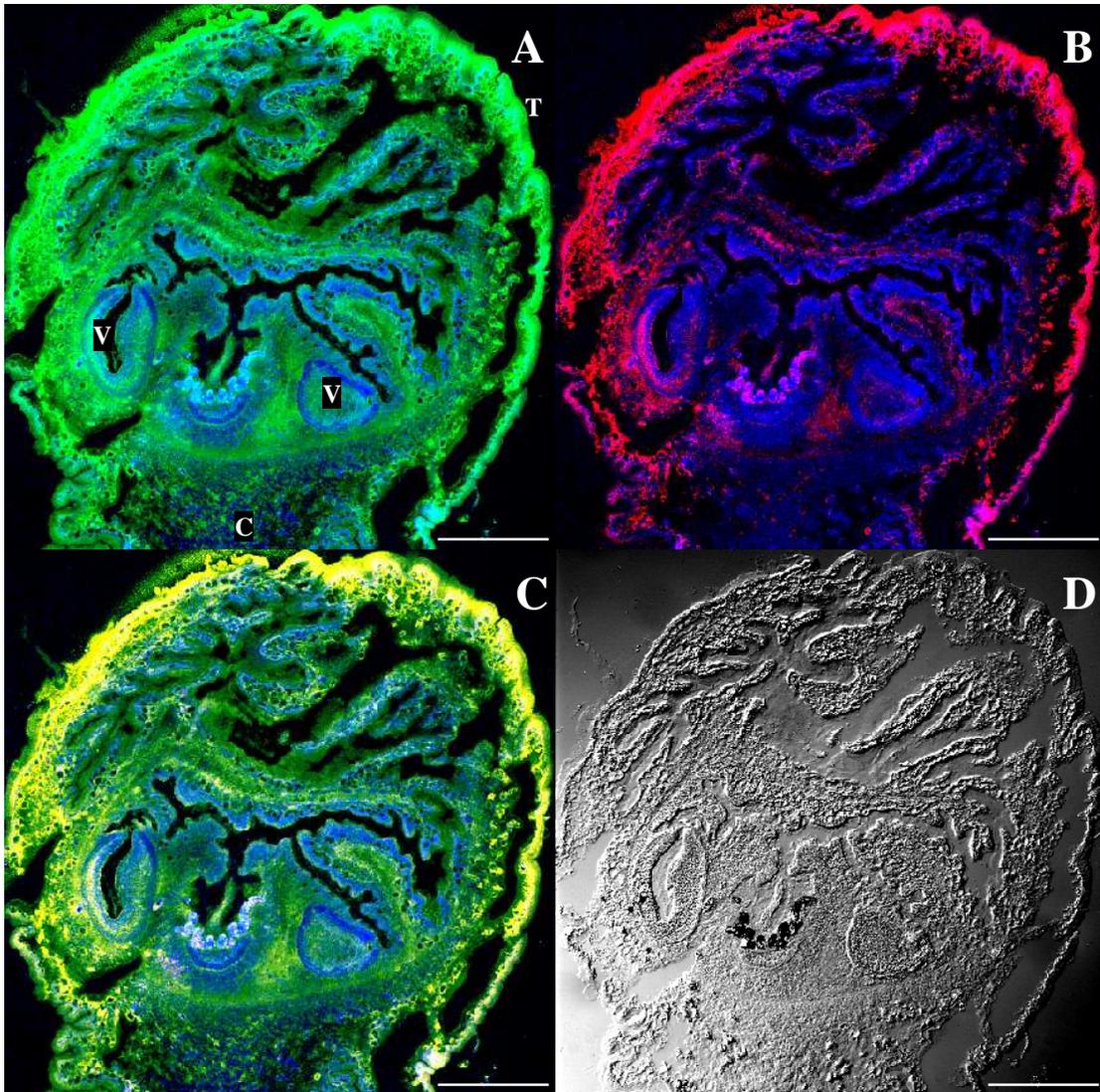


Fig. 18. Criocorte de un cisticerco evaginado control. Como en las figuras anteriores, las marcas fluorescentes corresponden a Tubulina (A), Miosina (B), la colocalización de ambas proteínas (C) y se observa al mismo corte bajo condiciones de DIC (D). En color azul se muestra el marcaje del ADN debido a su reacción con DAPI (A-C). Escala 250 μ m. Objetivo 10x. C: Cuello, T: Tegumento de la pared vesicular, V: Ventosas.

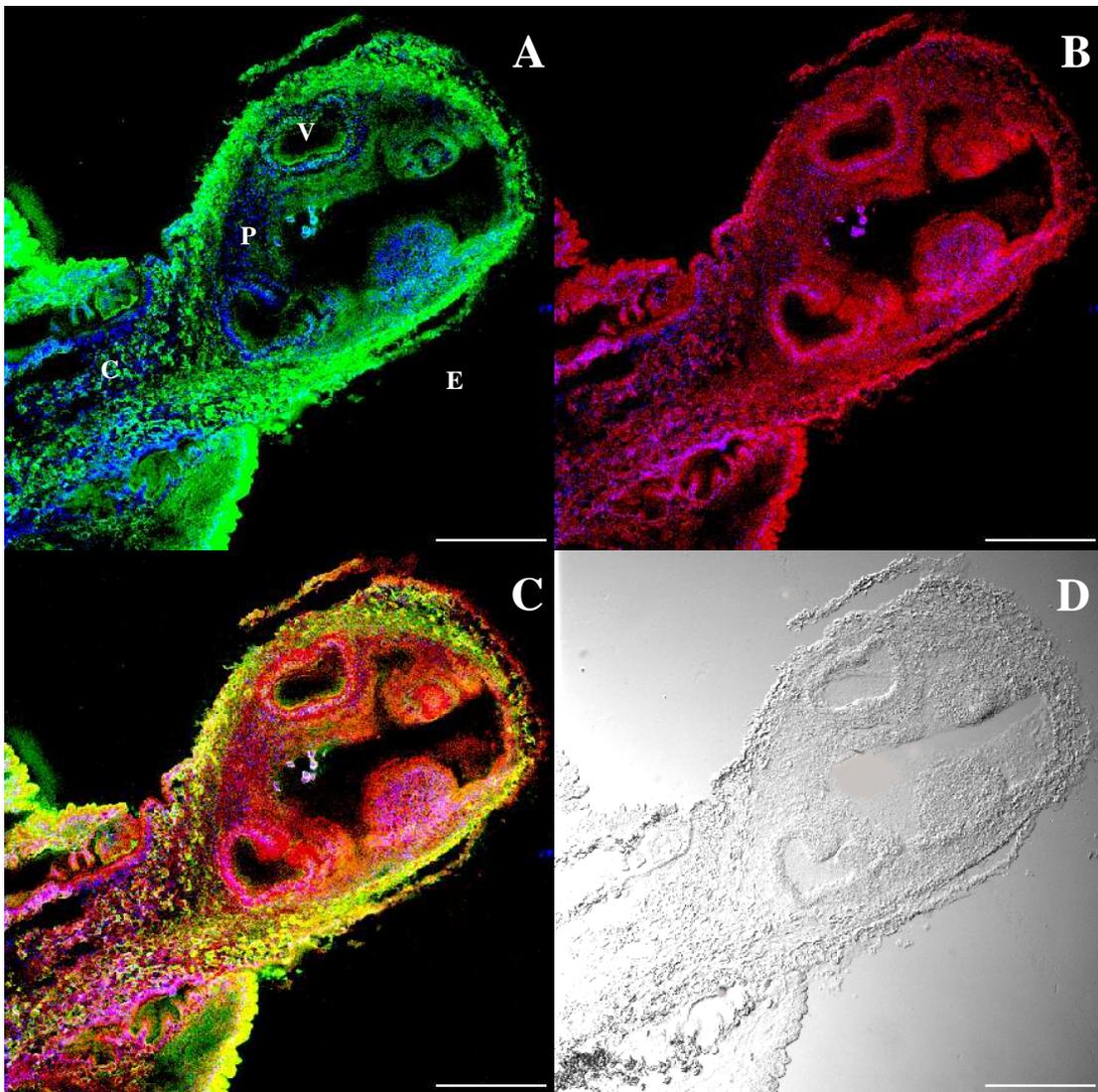


Fig. 19. Criocorte de cisticerco evaginado tratado con NTZ. Cisticercos que evaginaron espontáneamente se procesaron para observar la fluorescencia emitida como se indica en las figuras anteriores: Tubulina (A), Miosina (B), Colocalización de miosina y tubulina (C). El mismo corte se observa bajo DIC (D). La fluorescencia en azul corresponde al marcaje con DAPI (A-C). Escala 250 μ m. Objetivo 10x. C: Cuello, E: Escólex, V: Ventosas, P: Parénquima.

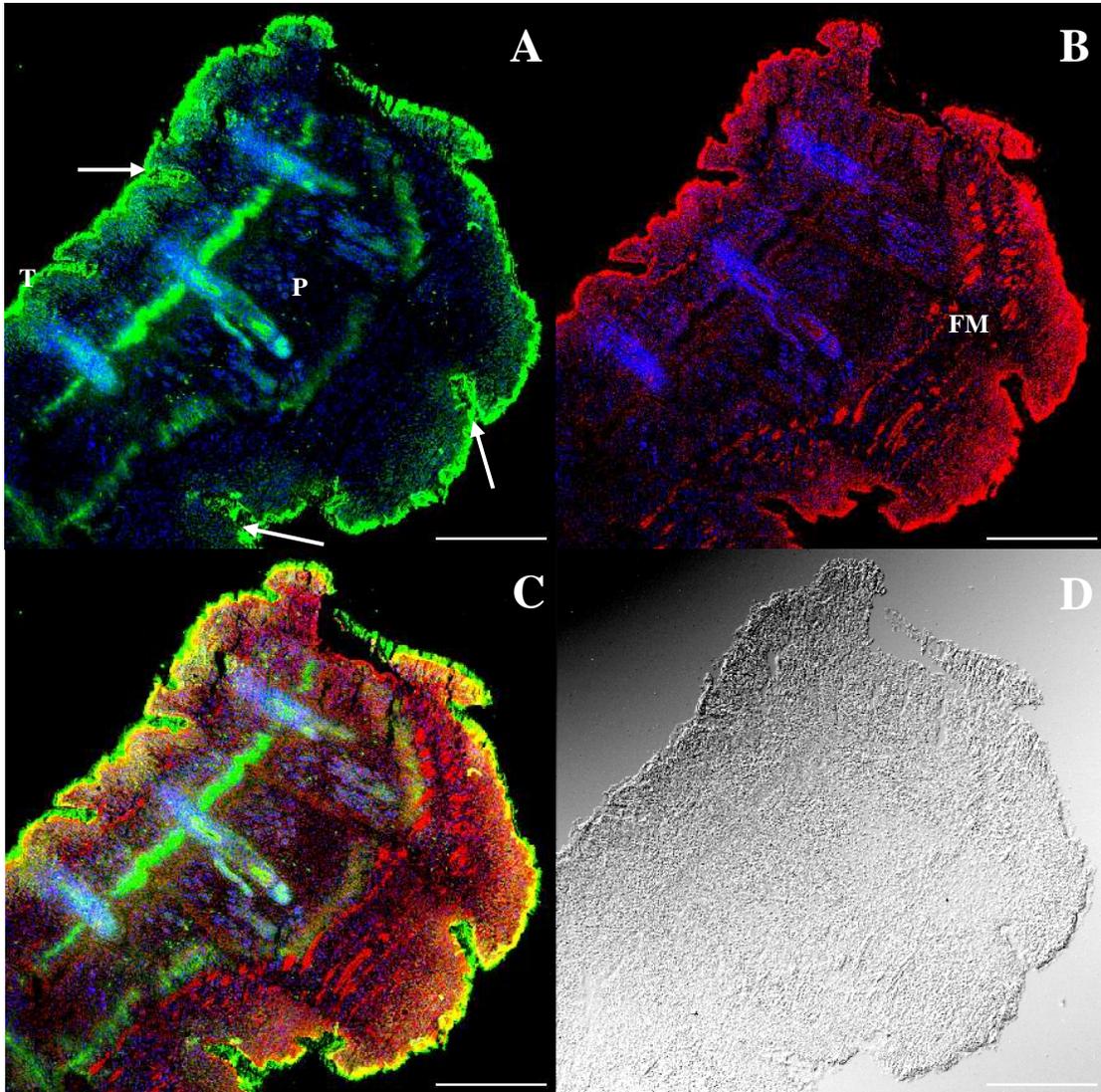


Fig. 20. Criocorte de un segmento de tenia adulta control. La porción del estróbilo observado corresponde a una región cercana al cuello. Como en las figuras anteriores, las marcas fluorescentes corresponden a Tubulina (A), Miosina (B), colocalización miosina y tubulina (C). En D se muestra la misma imagen observada por DIC. Las flechas indican los sitios en que la superficie del segmento estrobilar se pliega de manera profunda. La fluorescencia en azul corresponde al DNA marcado por el DAPI (A-C). Escala: 250 μm . Objetivo: 10x. FM: Fibras musculares, P: Parénquima, T: Tegumento.

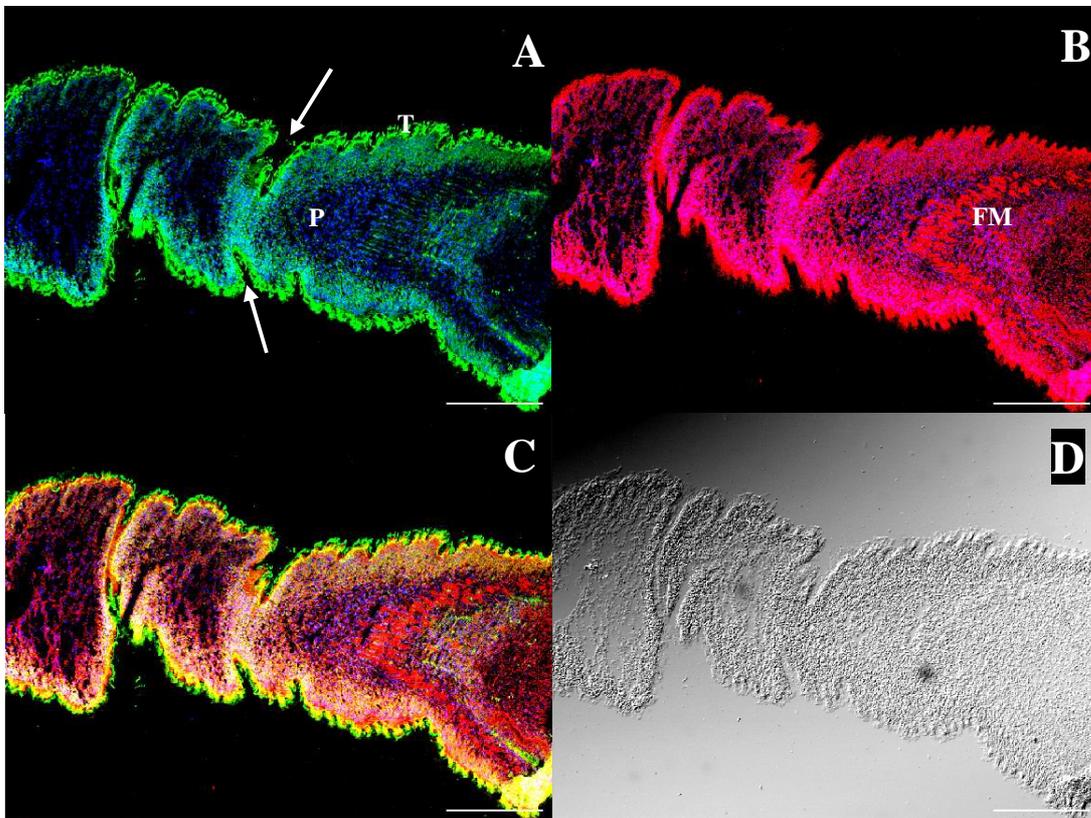


Fig. 21. Criocorte de un segmento de tenia adulta tratada con NTZ. La porción de la cadena estrobilar corresponde a una porción cercana al escólex. Como en las figuras anteriores, las marcas fluorescentes corresponden a Tubulina (A), Miosina (B), Colocalización de miosina y tubulina (C) y en D se observa el tejido mediante DIC. Las flechas indican las zonas en que el tejido sufre una invaginación pronunciada. El color azul corresponde al marcaje fluorescente del DNA debido al DAPI (A-C). Escala: 250 μ m. Objetivo: 10x. FM: Fibras musculares, P: Parénquima, T: Tegumento.

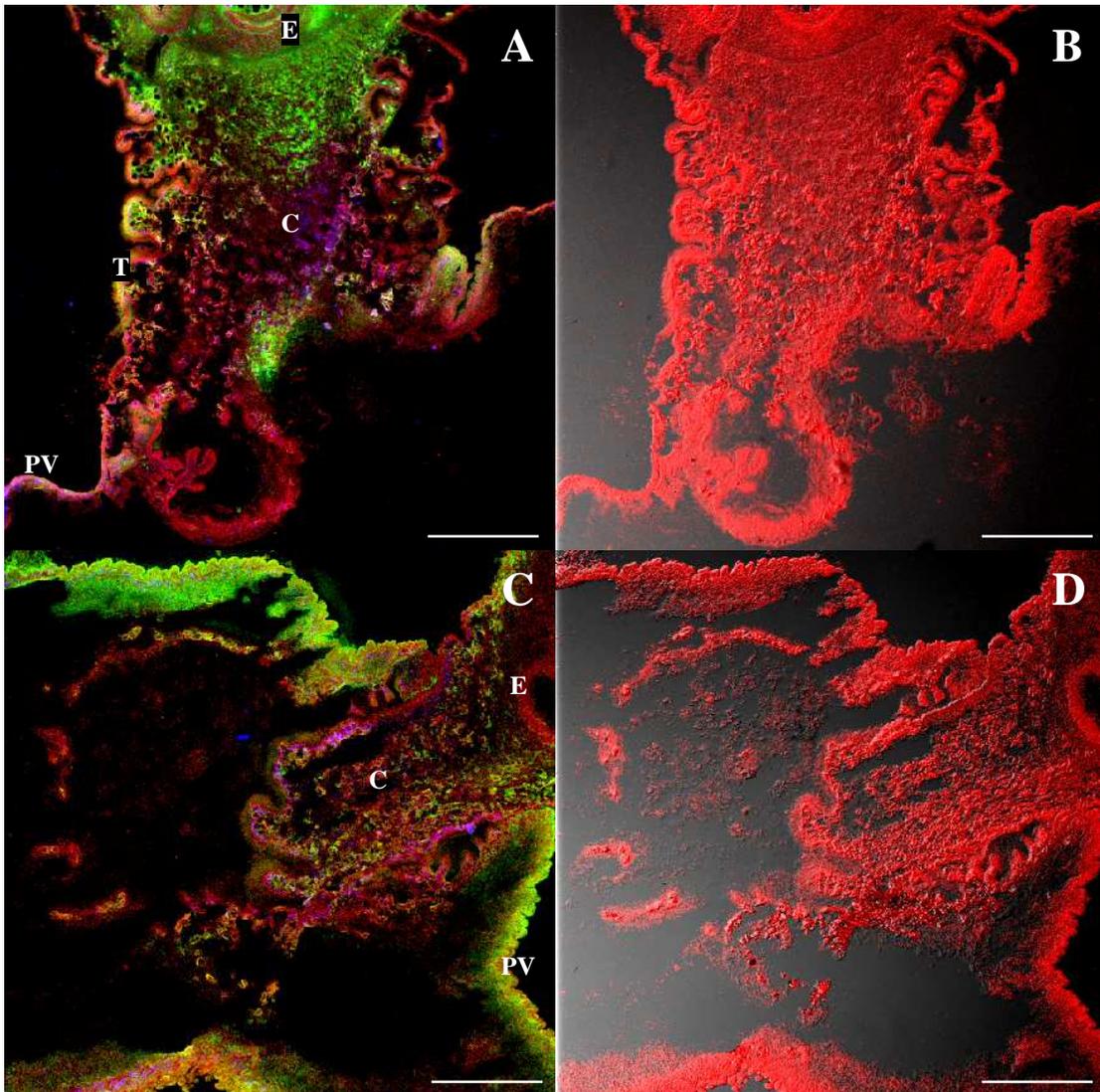


Fig. 22. Comparación de criocortes de cisticercos evaginados a nivel del cuello. Corte de parásito control (A y B) y tratado con NTZ (C y D). En A y C se muestra la colocalización de las marcas fluorescentes asociadas a miosina (rojo), tubulina (verde) y de DNA (azul). En B y D se muestra la marca fluorescente debida a miosina junto con la iluminación del tejido mediante DIC. Escala: 250 μ m. Objetivo: 10x. C: Cuello, E: Escólex, PV: Pared vesicular, T: Tegumento.

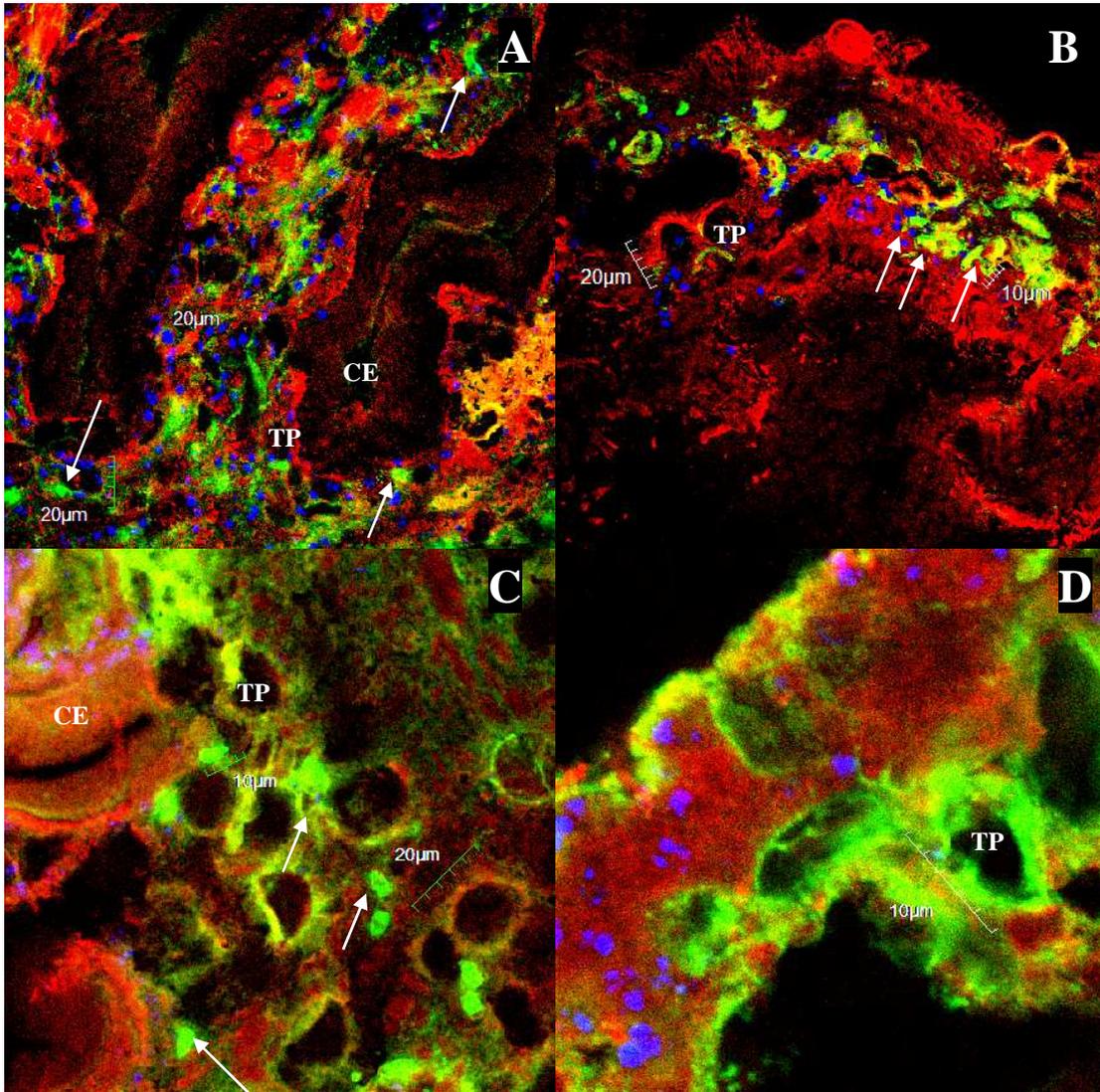


Figura 23. Criocortes de parénquima asociado al escólex de cisticercos y que muestran los túbulos protonefridiales. Se observa el tejido asociado al escólex invaginado de cisticercos (A y B), así como del de cisticercos evaginados espontáneamente (C y D). Los cisticercos del grupo control se observan en A y C, mientras que los tratados con NTZ se observan en B y D. En todos los criocortes, debido al marcaje fluorescente asociado a la tubulina (verde), se encontró la presencia de células flama (indicadas por flechas) asociadas a los túbulos protonefridiales (TP). Como en las figuras anteriores, la marca fluorescente roja está asociada a la miosina, la verde a la tubulina y la azul al DNA. Debido a los diferentes aumentos de observación, se muestran las escalas numéricas. Las imágenes de A y B se obtuvieron mediante un objetivo de 60x, mientras que C se obtuvo con uno de 100x. En D, la imagen se obtuvo con un objetivo 60x y se aplicó un aumento digital de 5x. CE: Canal espiral.

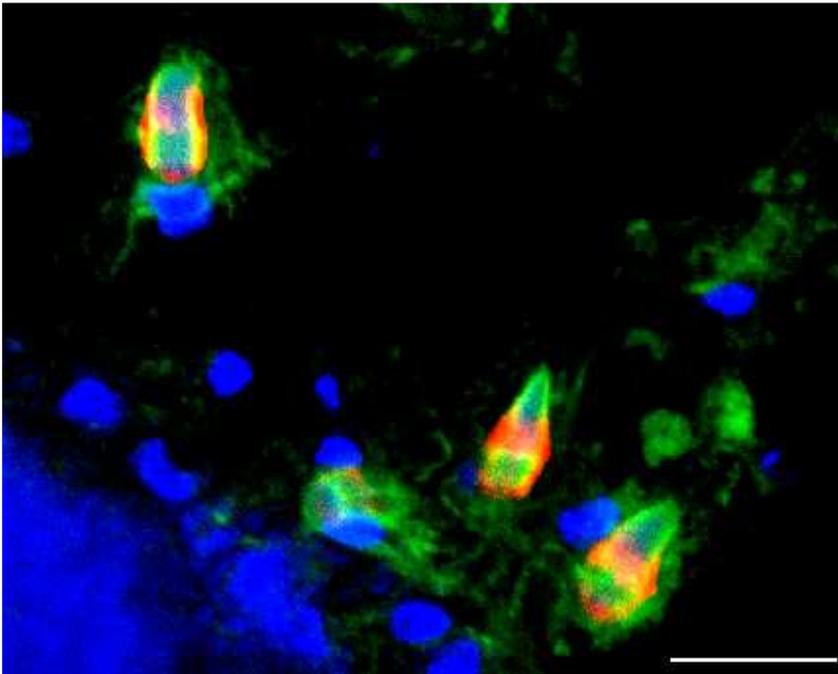


Figura 24. Células flama de un cisticerco evaginado control. La imagen corresponde a uno de los segmentos de los cortes realizados en Z en el microscopio confocal. Las marcas fluorescentes corresponden a actina (rojo) localizada en las hebillas; tubulina (verde) localizada en los penachos ciliares y el DNA (azul) asociado a núcleos celulares. Escala: 10 μm .

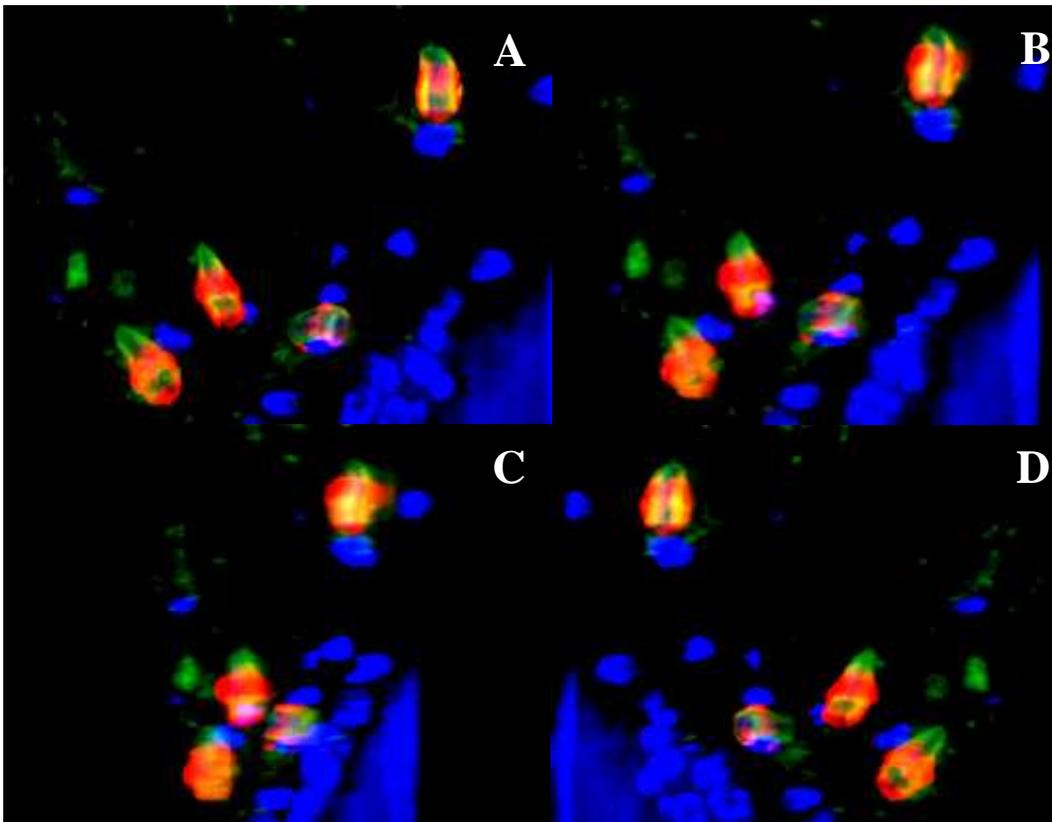


Fig. 25. Reconstrucción en 3D de células flama mediante el microscopio confocal. A partir de los segmentos obtenidos en la imagen anterior, las imágenes se procesaron mediante el paquete computacional OLYMPUS FLUOVIEW V1.6. Se observa la evolución de la reconstrucción de la imagen A a la D en diferentes ángulos de observación.

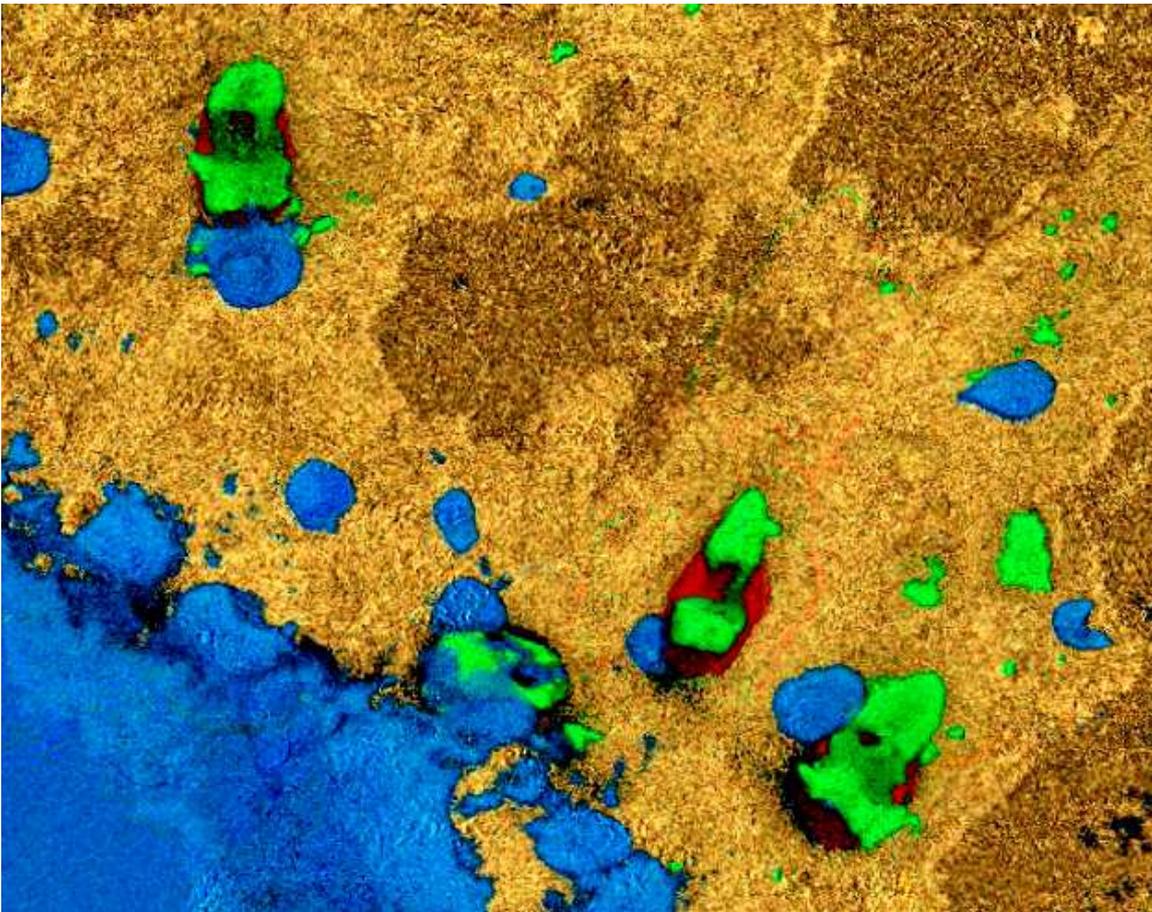


Fig. 26. Reconstrucción en 3D de células flama mediante el sistema de visualización de la sala IXTLI de la UNAM. Las imágenes obtenidas, como se presentaron en las figuras 24 y 25, se procesaron mediante el programa computacional Amira V. 4.0 y se proyectaron en la pantalla de la sala. Se aplicaron colores ficticios correspondientes a los descritos en las figuras referidas. La reconstrucción del tejido asociado a las células flama se presenta en color amarillo y la profundidad de los relieves se muestra con una tonalidad distinta. Se observa que las células flama se encuentran incrustadas en dicho tejido.

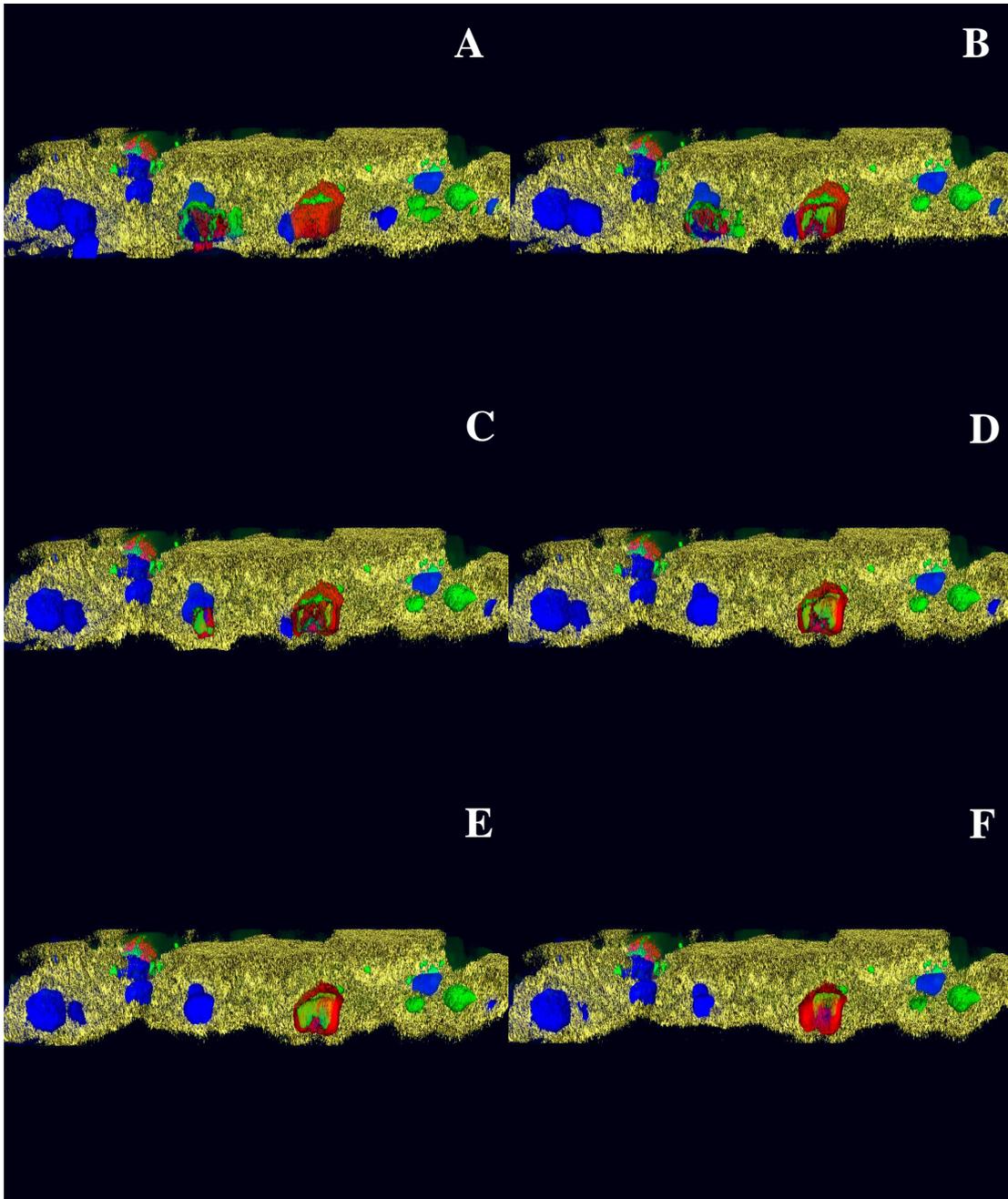


Fig. 27. Seccionamiento digital de células flama reconstruidas mediante el sistema de visualización de la sala IXTLI. Una vez que las imágenes se reconstruyeron como se muestra en la figura 26, se procedió a realizar cortes de tipo transversal para observar el interior de una de las células flama y del tejido asociado a ellas. Las imágenes muestran de manera secuencial las observaciones obtenidas a diferentes profundidades de corte; en A se muestra el corte más cercano a la base de la célula, mientras que F corresponde a la zona más distal, donde se cierra la hebilla.

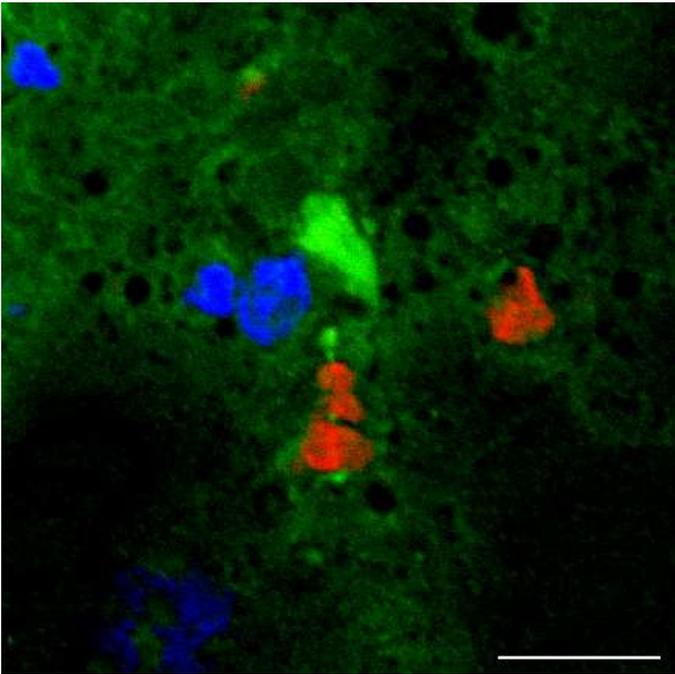


Fig. 28. Células flama de un cisticerco invaginado y tratado con NTZ. Como en la figura 24, se obtuvieron imágenes en Z mediante microscopía confocal y una de ellas se muestra. Los marcajes fluorescentes corresponden a como se describió en la figura referida. Se observa que las células perdieron su morfología clásica; la hebilla de actina y el penacho ciliar se separaron de las células, evidenciadas por los núcleos, y el tejido parece estar alterado por numerosos agujeros. Escala: 10 μm .

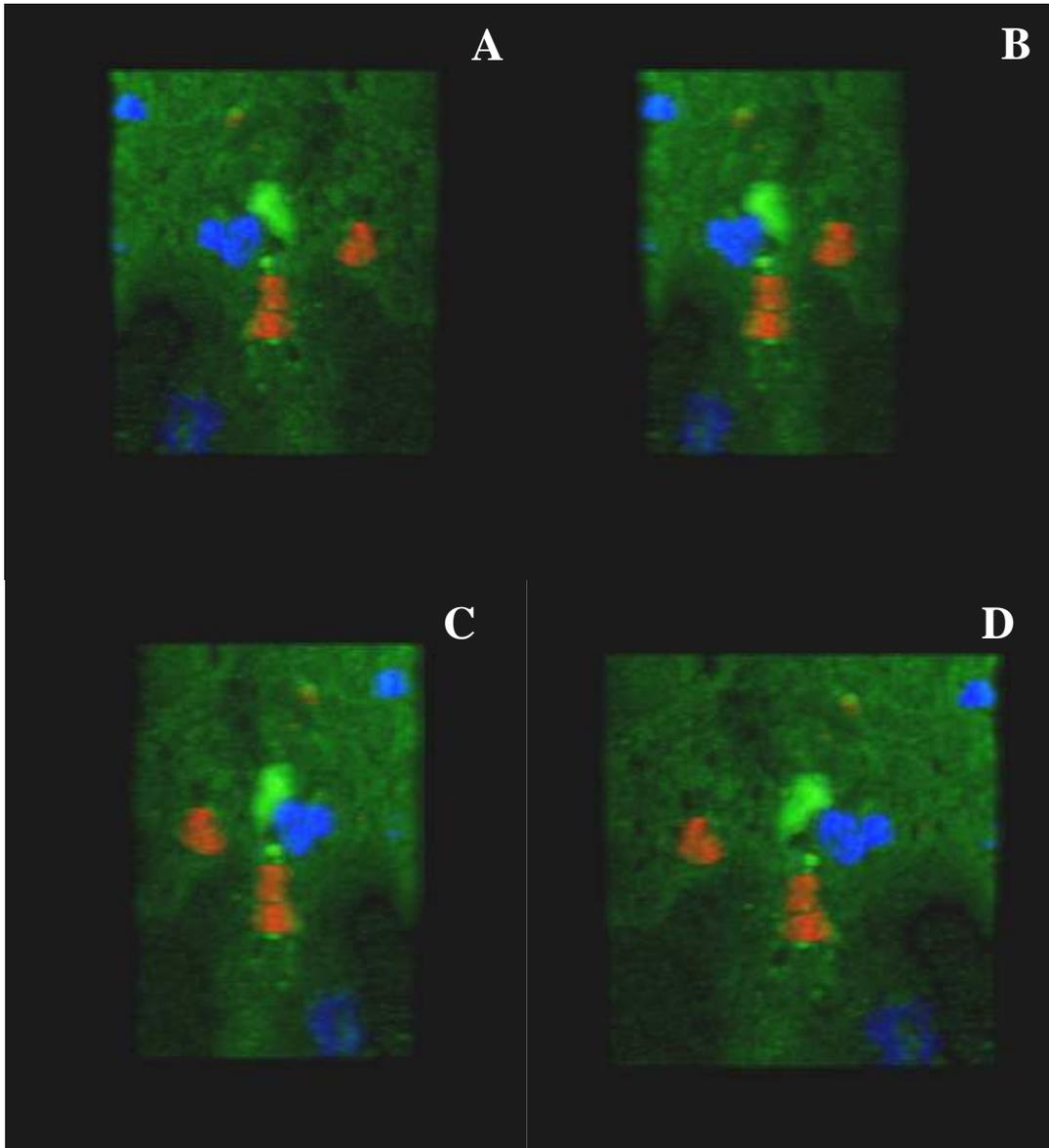


Fig. 29. Reconstrucción en 3D mediante el microscopio confocal de células flama de los cisticercos no evaginados tratados con NTZ. Como se indicó en la figura 25, los cortes se procesaron para su visualización y los marcajes fluorescentes corresponden a lo indicado en la figura 24. Se observa la secuencia de imágenes reconstruidas de A hacia D.

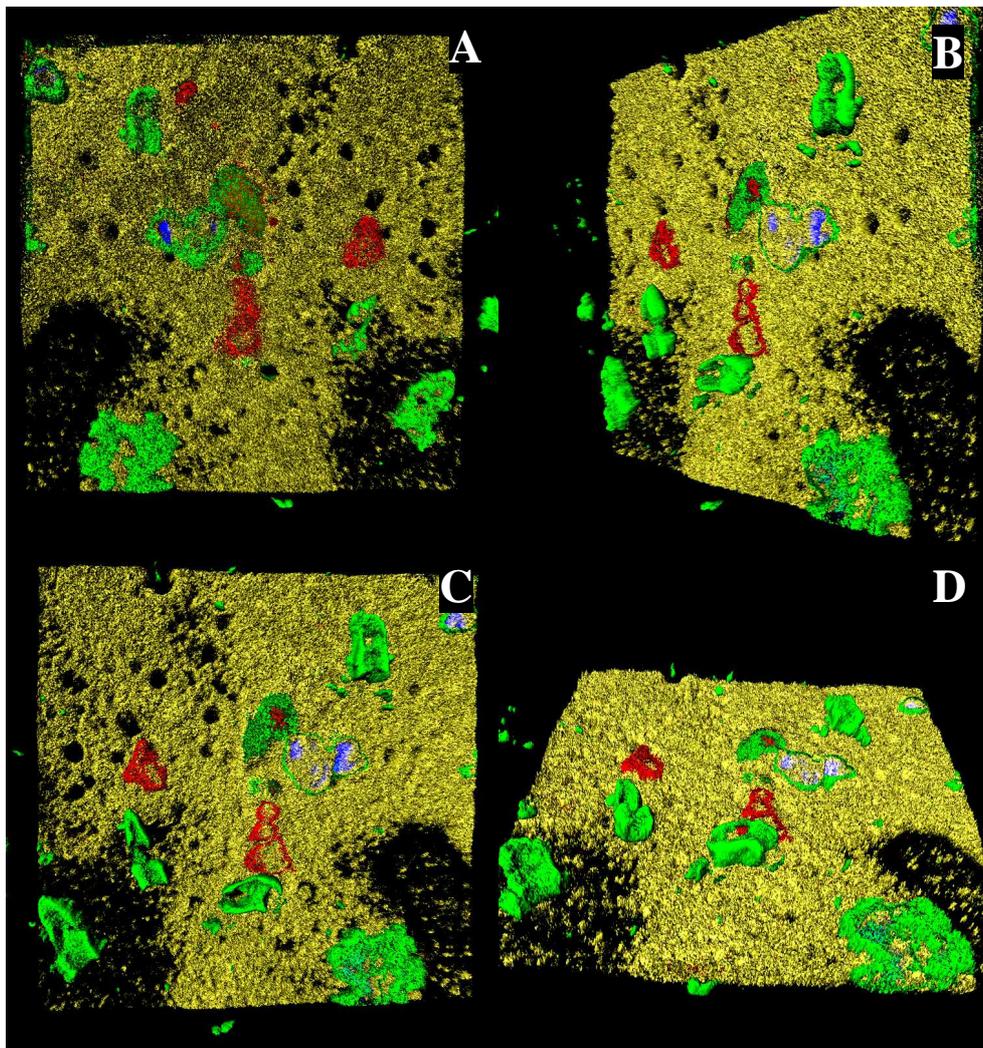


Fig. 30. Reconstrucción en 3D mediante el sistema de visualización de la Sala IXTLI de la UNAM de células flama de cisticercos tratados con NTZ. En la imagen, de A hacia D, se observa una secuencia de imágenes presentada en diferentes ángulos de observación. Los colores falsos corresponden a los ya indicados. Los penachos ciliares están intactos y presentan el hueco correspondiente al sitio de inserción de las hebillas de actina, las cuales se encuentran separadas de las células.

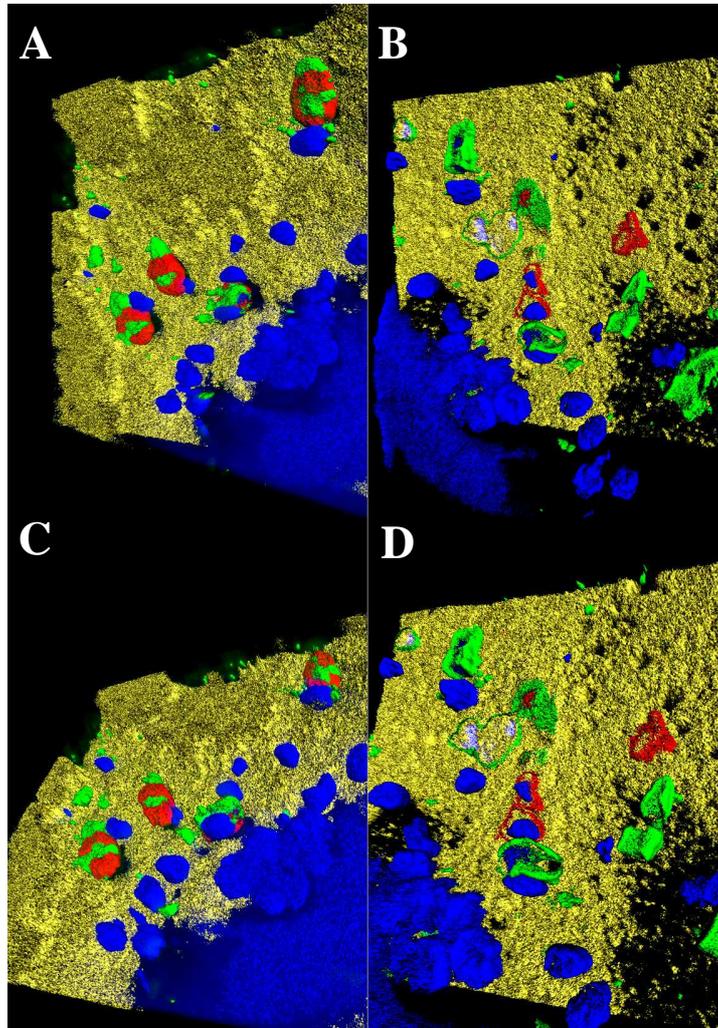


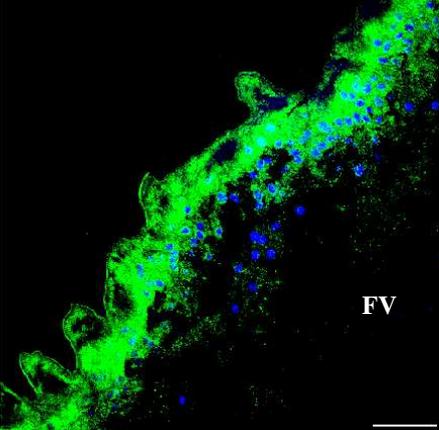
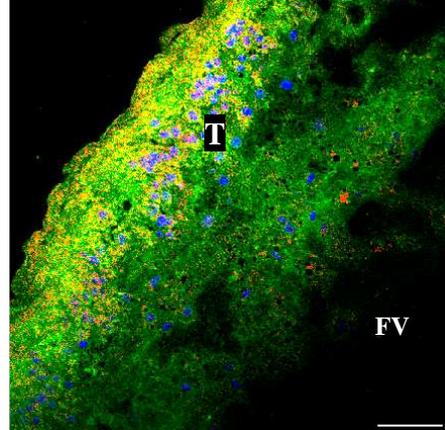
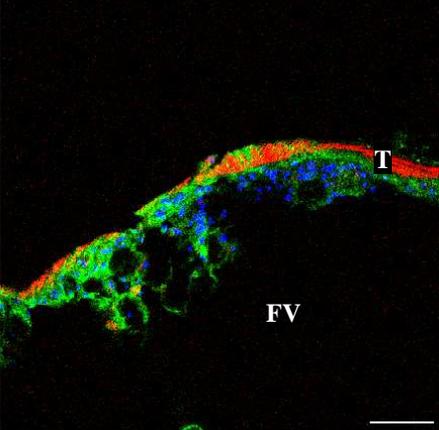
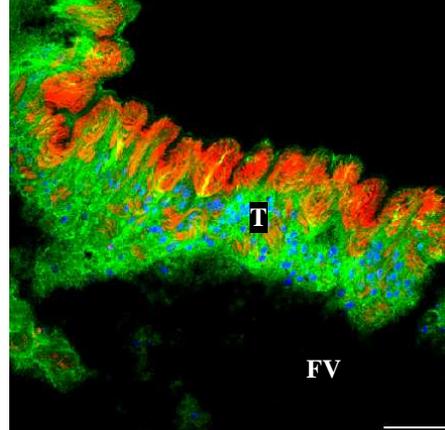
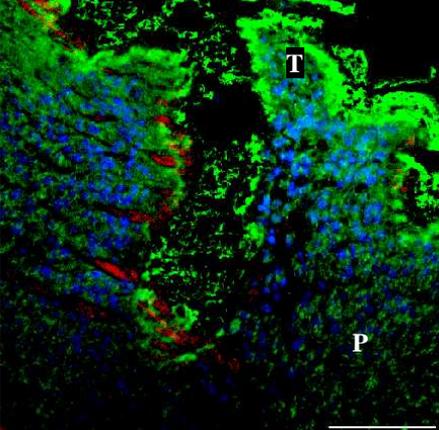
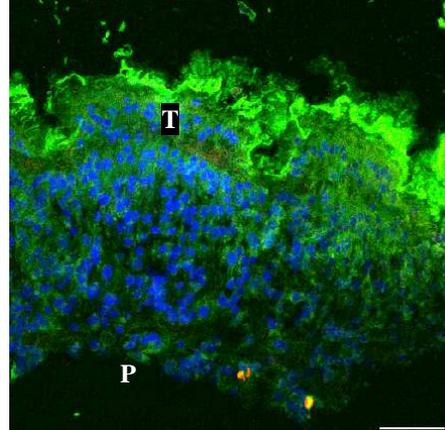
Fig. 31. Comparación de la reconstrucción en 3D por el sistema de visualización de la sala IXTLI de células flama de cisticercos control y tratado con NTZ. Las imágenes se presentan bajo diferentes ángulos de observación. Las células flama de cisticercos evaginados sin tratamiento se observan en A y C, mientras que en B y D se observan las células de los cisticercos tratados con NTZ. Se observan cambios importantes en la morfología de las células flama debido al tratamiento con NTZ.

XI. TABLAS

TABLA 1. REACTIVOS UTILIZADOS PARA EL MARCAJE FLUORESCENTE DE PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO DE *Taenia solium*.

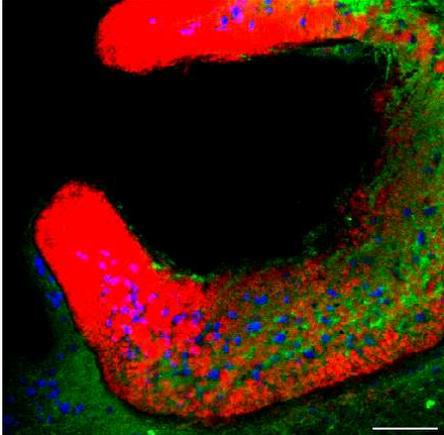
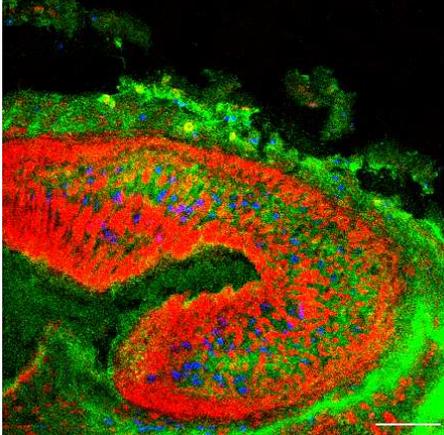
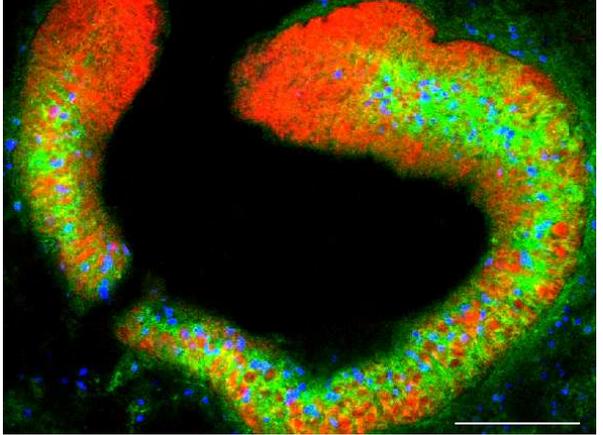
Estructura por revelar	Anticuerpo primario (dilución)	Anticuerpo secundario (dilución)	Fluorocromo
Actina F	----	----	Alexa-Fluor, Faloidina ₅₉₄ rodaminada (Molecular Probes) 1:40
Miosina II	Policlonal anti- miosina <i>T. solium</i> (1:1000)	anti-IgG de conejo- biotina (Vector; 1:30)	Avidina-rodamina (Vector; 1:150)
Tubulina- α	Monoclonal anti- α - tubulina DM1-A (Sigma; 1:100)	anti-IgG de conejo- fluoresceína (Zymax Grade; 1:30)	----
DNA			DAPI (4',6-Diamidino- 2-fenil-indol; Sigma) 50 μ g/mL

TABLA 2. COMPARACIÓN DEL TEGUMENTO EN LOS TRES ESTADIOS PARASITARIOS DE *T. solium* EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE TRATAMIENTO CON NTZ.

ESTADIO DE VIDA	CONTROL	NITAZOXANIDA
CISTICERCO		
CISTICERCO EVAGINADO		
ADULTO		

Nota: La barra en las imágenes corresponde a 30 µm. FV: Fluido vesicular; P: Parénquima; T: Tegumento.

TABLA 3. COMPARACIÓN DE LAS VENTOSAS DEL ESCÓLEX DE CISTICERCOS Y CISTICERCOS EVAGINADOS DE *T. solium* EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE TRATAMIENTO CON NTZ.

ESTADIO DE VIDA	CONTROL	NITAZOXANIDA
CISTICERCO		
CISTICERCO EVAGINADO		

NOTA: La barra en las imágenes corresponde a 30 μ m.

TABLA 4. COMPARACIÓN DE CÉLULAS FLAMA DE DISTINTOS ESTADIOS PARASITARIOS DE *T. solium* Y EVALUACIÓN EN ELLAS DEL EFECTO DE LA NTZ.

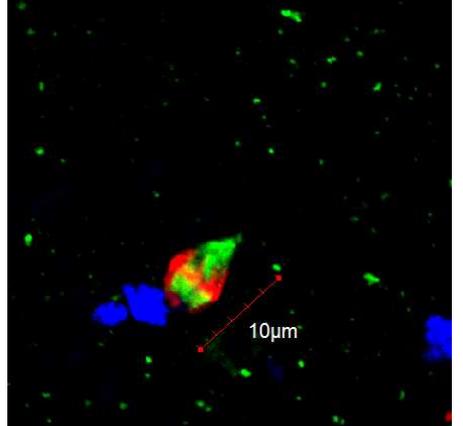
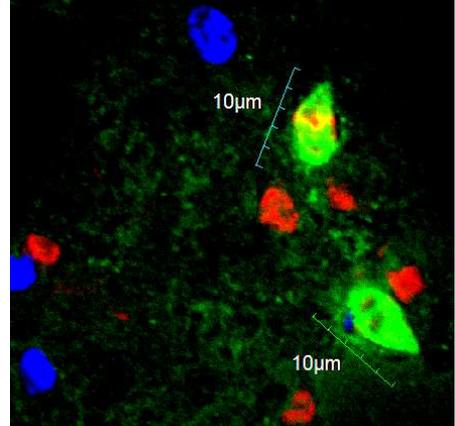
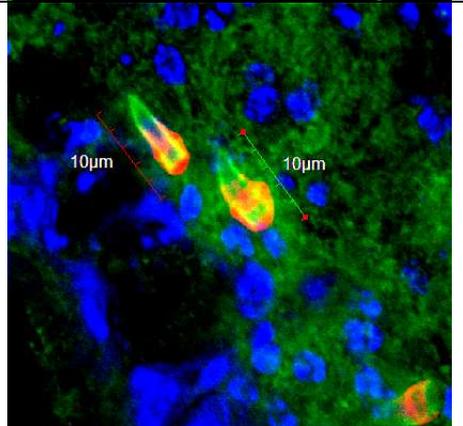
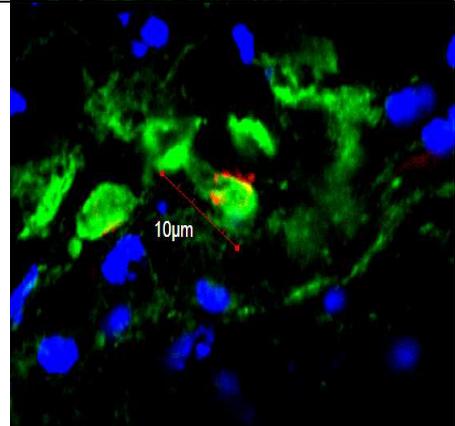
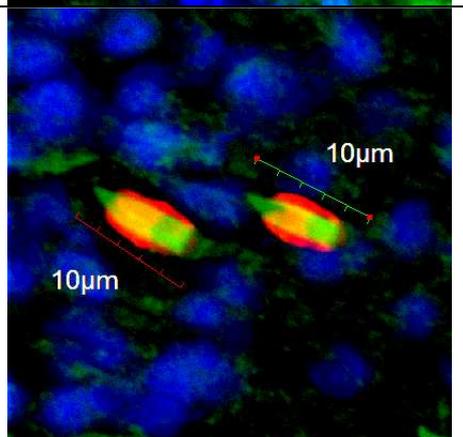
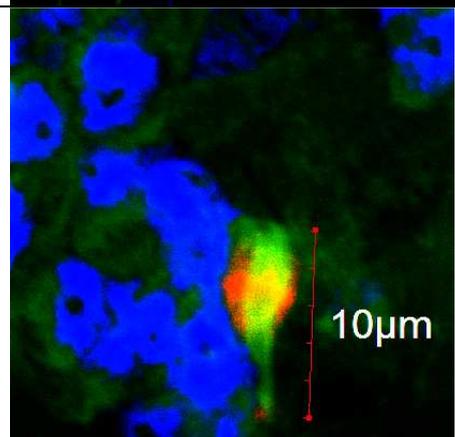
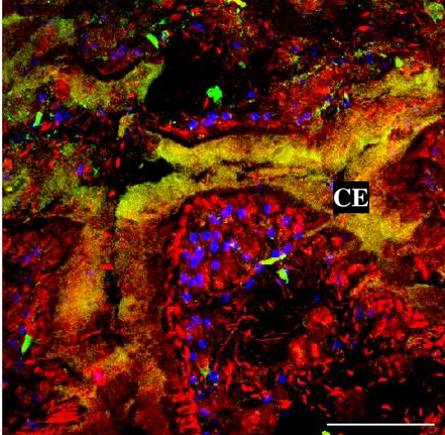
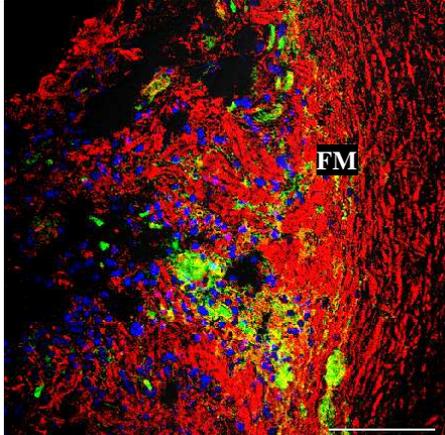
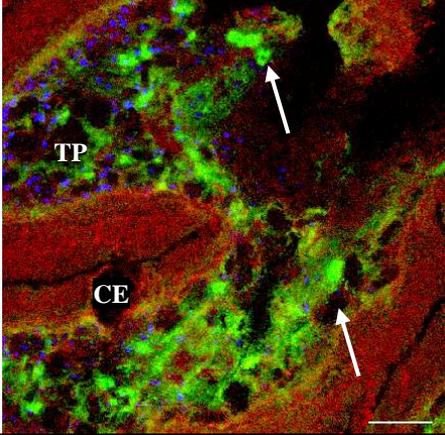
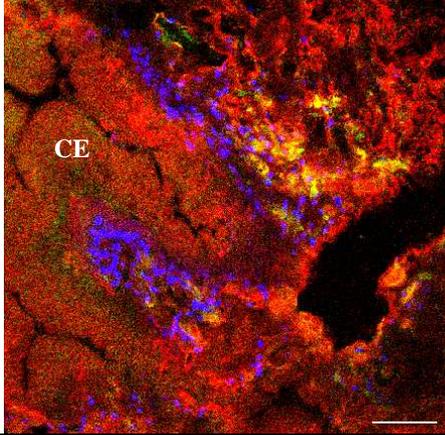
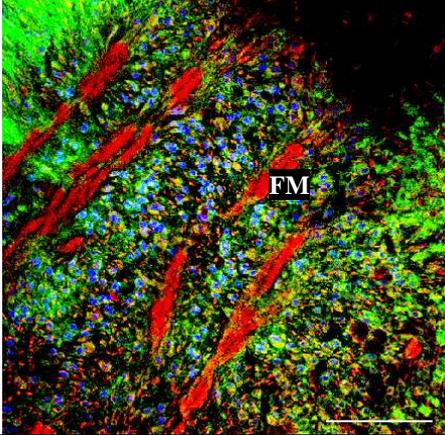
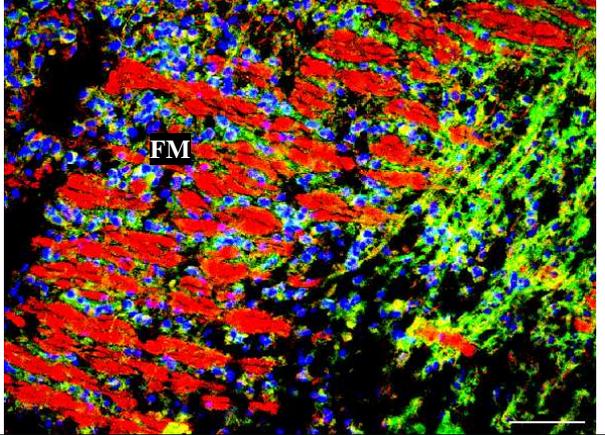
ESTADIO DE VIDA	CONTROL	TRATADO CON NTZ
CISTICERCO		
CISTICERCO EVAGINADO		
TENIA ADULTA		

TABLA 5. DISTRIBUCIÓN DE MIOSINA Y TUBULINA EN EL TEGUMENTO DE LOS DIFERENTES ESTADIOS DE DESARROLLO DE *T. solium*.

ESTADIO DE VIDA	CONTROL	TRATADO CON NTZ
CISTICERCO		
CISTICERCO EVAGINADO		
ADULTO		

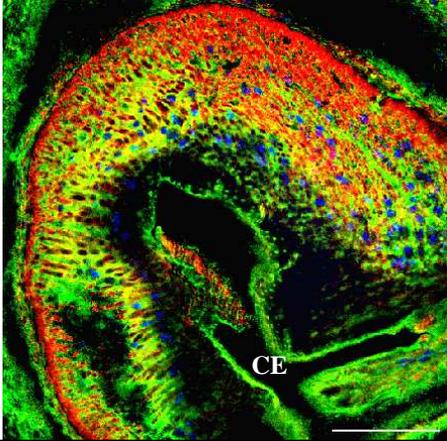
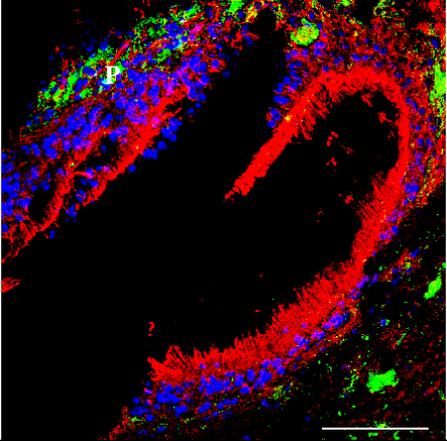
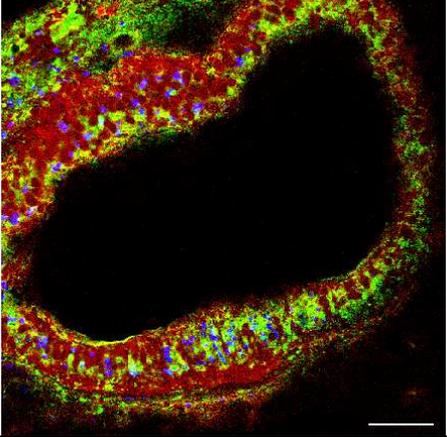
Nota: Las flechas señalan los sitios en que se observaron células flama. FM: Fibras musculares, T: Tegumento. Escala: 30 μ m.

TABLA 6. COLOCALIZACION DE MIOSINA Y TUBULINA EN PARÉNQUIMA DE TRES ESTADIOS DE DESARROLLO DE *T. solium*.

ESTADIO DE VIDA	CONTROL	TRATADO CON NITAZOXANIDA
CISTICERCO		
CISTICERCO EVAGINADO		
ADULTO		

Nota: Las flechas señalan los sitios en los que se observaron células flama. Escala: 30 μ m, objetivo: 60x. CE: Canal espiral, FM: Fibras musculares, TP: Túbulos protonefridiales

TABLA 7. COMPARACION DE LA DISTRIBUCIÓN DE MIOSINA, TUBULINA Y DNA EN VENTOSAS DE DIFERENTES ESTADIOS DE DESARROLLO DE CISTICERCOS DE *T. solium*.

ESTADIO DE VIDA	CONTROL	NITAZOXANIDA
CISTICERCO		
CISTICERCO EVAGINADO		

Escala: 30 μ m. CE: Canal Espiral.

XII. REFERENCIAS

1. Cheng TC. 1986. General Parasitology. Academic Press College Division, 2nd edition, USA, pp. 387-444.
2. Tato-Saldívar P, Molinari-Soriano JL. 2004. Teniosis y cisticercosis. En: Becerril-Flores MA, Romero-Cabello R. (Eds.). Parasitología Médica de las Moléculas a la Enfermedad. Edit. Mc Graw Hill, 1^a. edición, México, pp. 131-135.
3. Barnes RD. 1989. Zoología de los Invertebrados. Interamericana, Mc Graw-Hill, 5^a. edición., México, p. 192.
4. Valverde-Islas LE. 2007. Distribución de proteínas del citoesqueleto en células flama de cisticercos de *Taenia solium*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Medicina, UNAM.
5. Schmidt GD, Roberts LS. 1984. Fundamentos de Parasitología. Compañía Editorial Continental, S. A. de C. V., México, pp. 397-400.
6. Flisser A, Pérez-Tamayo R. 2006. Aprendizaje de la Parasitología basado en problemas. Editores de Textos Mexicanos, México, p. 338.
7. Martínez SM, Rodríguez S, García HH. 2001. Cisticercosis humana en: García HH, Gonzales AE, Martínez SM, Gilman RH (Eds.) Teniasis/cisticercosis por *Taenia solium*, un serio problema de salud pública en el Perú. *Oficina General de Epidemiología*. Ministerio de Salud. Serie informes técnicos de investigación Epidemiológica N°025, 11-19.
8. Martindale W. 1993. The Extra Pharmacopoeia. In: Reynolds, J.R. (Ed.), Praziquantel, 30th Edition. Pharmaceutical Press, London, pp. 52-53.
9. Dayan AD. 2003. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica* 86 (2-3): 141-159.
10. Del Brutto OH. 2005. Neurocisticercosis: actualización en diagnóstico y tratamiento. *Neurología* 20(8): 412-418.
11. Pérez-Reyes A. 2008. Efecto de derivados del bencimidazol en la morfología y en la expresión de proteínas del citoesqueleto de cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF. Tesis de licenciatura en QFB, Facultad de Química, UNAM.
12. Ridley RG. 2003. The need for new approaches to tropical disease: Drug discovery and development for improved control strategies. In: Fairlamb AH, Ridley RG, Vial HJ. (Eds.). Drugs against parasitic diseases: R&D methodologies and issues discoveries and drug development. *World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*, Switzerland, pp. 13-21.
13. Organización Mundial de la Salud. 2002. Control de la neurocisticercosis. 55^a Asamblea Mundial de la Salud, A55/23.
14. Ravaschino EL. 2007. Diseño racional de drogas: en busca de la droga ideal. *Química Viva* 6(3): 91-103.

15. Rossignol JF, Cavier R. 1976. New derivative of 2-benzamido-5-nitro thiazoles. *Chemical Abstracts* 83: 28216.
16. Clinton-White Jr. 2004. Nitazoxanide: a new broad spectrum antiparasitic agent. *Expert Review Anti-infective Therapy* 2(1): 43-50.
17. Sisson G, Goodwin A, Raudonikiene A, Hughes NJ, Mukhopadhyay AK, Berg DE, Hoffman PS. 2002. Enzymes associated with reductive activation and action of nitazoxanide, nitrofurans, and metronidazole in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(7): 2116-2123.
18. Stockis A, De Bruyn S, Gengler C, Rosillon D. 2002. Nitazoxanide pharmacokinetics and tolerability in man during 7 days dosing with 0.5 g and 1 g b. i. d. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 40(5): 221-227.
19. Rossignol JF, Abaza H, Friedman H. 1998. Successful treatment of human fascioliasis with nitazoxanide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 92(1): 103-104.
20. Romero-Cabello R, Guerrero LR, Muñoz-García MR, Geyne-Cruz A. 1997. Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 91(6): 701-703.
21. Megraud F, Ochialinni A, Rossignol JF. 1998. Nitazoxanide, a potential drug for eradication of *Helicobacter pylori* with no cross-resistance to metronidazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42(11): 2836-2840.
22. Rossignol JF, Maisonneuve H. 1984. Nitazoxanide in the treatment of *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana* infections. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 33(3): 511-512.
23. Dubreuil L, Houcke I, Mouton Y, Rossignol J F. 1996. *In vitro* evaluation of activities of nitazoxanide and tizoxanide against anaerobes and aerobic organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40(10): 2266-2270.
24. Gottstein B, Haag K, Walker M, Matsumoto J, Mejri N, Hemphill A. 2006. Molecular survival strategies of *Echinococcus multilocularis* in the murine host. *Parasitology International* 55 Suppl: S45-S49.
25. Stettler M, Fink R, Walker M, Gottstein B, Geary TG, Rossignol JF, Hemphill A. 2003. *In vitro* parasitocidal effect of nitazoxanide against *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(2): 467-474.
26. Palomares F, Piliado JC, Palencia G, Ortiz-Plata A, Jung-Cook H. 2007. Efficacy of nitazoxanide, tizoxanide and tizoxanide/albendazole sulphoxide combination against *Taenia crassiceps* cysts. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59(2): 212-218.
27. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2000. *Molecular Cell Biology*. Edit. Freeman, USA, pp. 751-809.
28. McManus DP, Smyth JD. 1989. *The physiology and biochemistry of cestodes*. Cambridge University Press, Australia, pp. 20-22.

29. Hooper SL, Thuma JB. 2005. Invertebrate muscles: muscle specific genes and proteins. *Physiological Reviews* 85(3): 1001-1060.
30. González-Malerva L, Cruz-Rivera M, Reynoso-Ducoing O, Retamal C, Flisser A, Ambrosio J R. 2004. Muscular myosin isoforms of *Taenia solium* (Cestoda). *Cell Biology International* 28(12): 885-894.
31. Lacey E. 1990. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today* 6(4): 112-115.
32. Herman B. 1998. Fluorescence Microscopy. Bios Scientific Publishers, 2nd edition, USA.
33. Ambrosio J, Cruz-Rivera M, Allan J, Morán E, Ersfeld K, Flisser A. 1997. Identification and partial characterization of a myosin-like protein from cysticerci and adults of *Taenia solium* using a monoclonal antibody. *Parasitology* 114 (Pt 6): 545-553.
34. Ambrosio J, Reynoso-Ducoing O, Hernández-Sánchez H, Correa-Piña D, González-Malerva L, Cruz-Rivera M, Flisser A. 2003. Actin expression in *Taenia solium* cysticerci (cestoda): tisular distribution and detection of isoforms. *Cell Biology International* 27(9): 727-733.
35. García-Domínguez C, Correa D, Rabiela MT, Flisser A. 1991. Praziquantel treatment of muscle *Taenia solium* cysticercosis. 4. Reversible *in vitro* effect. *Parasitology Research* 77(8): 691-696.
36. Bray D. 2001. Cell Movements from Molecules to Motility. Garland Publishing, 2nd edition, USA, pp. 67-77.
37. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. Molecular Biology of the Cell. Garland Science, 4th edition, USA, pp 555-556.
38. Ambrosio JR. 2007. Cytoskeletal proteins of parasites as therapeutic agents. Ed. by: Terrazas LI. In: Advances in the immunobiology of parasitic diseases. *Research Signpost*: 73-90.
39. Cruz-Rivera M, Reyes-Torres A, Reynoso-Ducoing O, Flisser A, Ambrosio JR. 2006. Comparison of biochemical and immunochemical properties of myosin II in taeniid parasites. *Cell Biology International* 30(7): 598-602.
40. Ambrosio J, Landa A, Merchant MT, Lalette JP. 1994. Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Archives of Medical Research* 25(3): 325-330.
41. Slais J. 1970. The Morphology and Pathogenicity of the Bladder Worms. Academia, Czechoslovakia, p. 30.
42. Dickie R, Bachoo RM, Rupnick MA, Dallabrida SM, DeLoid GM, Lai J, DePinho RA, Rogers RA. 2006. Three-dimensional visualization of microvessel architecture of whole-mount tissue by confocal microscopy. *Microvascular Research* 72(1-2): 20-26.

43. Neusser TP, Heß M, Haszprunar G, Schrödi M. 2006. Computer-based three-dimensional reconstruction of the anatomy of *Microhedyle remanei* (Marcus, 1953), an interstitial acochlidian gastropod from Bermuda. *Journal of Morphology* 267(2): 231-247.
44. Zarrinkalam KH, Kuliwaba JS, Martin RB, Wallwork MAB, Fazzalari NL. 2005. New insights into the propagation of fatigue damage in cortical bone using confocal microscopy and chelating fluorochromes. *European Journal of Morphology* 42(1-2): 81-90.