



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

DISTRIBUCIÓN DE PROTEÍNAS DEL
CITOESQUELETO EN CÉLULAS FLAMA DE
CISTICERCOS DE *Taenia solium*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

LAURA ELENA VALVERDE ISLAS

DIRECTOR DE TESIS: Dr. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ

MÉXICO, D. F.

NOVIEMBRE, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a dándur en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Laura Elena Valverde Islas
FECHA: 13/11/07
FIRMA: [Firma]

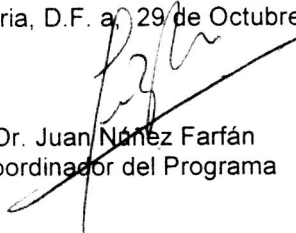
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de agosto de 2007, acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **LAURA ELENA VALVERDE ISLAS** con número de cuenta **94556227** con la tesis titulada: "**Distribución de proteínas del citoesqueleto en células flama de cisticercos de *Taenia solium***", realizada bajo la dirección del **DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ**:

Presidente: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
Vocal: DRA. KAETHE WILLMS MANNING
Secretario: DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ
Suplente: DRA. GLORIA ACACIA BENITEZ KING
Suplente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

Sin dudar de su atención, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 29 de Octubre de 2007.


Dr. Juan Néñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la
Universidad Nacional Autónoma de México.

A los Miembros del Comité Tutorial Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández, Dra. Keathe Willms Manning y Dr. Luis Felipe Jiménez García.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada con número de registro 194022.

Al PAPIIT proyecto IN216107 "Evaluación de cambios inducidos por estrés químico en la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia solium* y *Taenia crassiceps*" por la beca otorgada para la conclusión de esta tesis.

Al Programa de Apoyos a los Estudios de Posgrado convocatoria 2007.

Al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México en donde se realizó la presente tesis.

Al Dr. Javier R. Ambrosio Hernández por su dirección, consejos y experiencia transmitida para la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado Dr. Horacio Merchant Larios, Dra. Keathe Willms Manning, Dr. Javier R. Ambrosio Hernández, Dr. Luis Felipe Jiménez García y a la Dra. Gloria Benítez King por sus recomendaciones sobre este trabajo.

A la Biol. Olivia A. Reynoso-Ducoing por el apoyo técnico durante la realización de este trabajo.

A la M.C. Lilia Robert Guerrero por la asistencia técnica con el Microscopio Electrónico de Transmisión.

Al Dr. Juan A. Molina Guarneros por facilitarme el Microscopio de Fluorescencia Nikon.

A la Dra. Olga Araceli Patrón Soberano de la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular por la asistencia técnica con el Microscopio Confocal Olympus.

Al Biol. Gabriel Orozco de la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular por el apoyo técnico con el Microscopio Confocal Olympus.

Al Dr. Horacio Merchant Larios por facilitarme el Microscopio Confocal Zeiss del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Al Dr. Ramón Coral Vázquez por facilitarme el Microscopio de fluorescencia AXIOPLAN 2 Zeiss.

A la Dra. Laura Escobar por facilitarme el criostato Leica.

Al M. en C. Jorge A. Moreno Hernández del Centro de Informática de Biología de la Facultad de Ciencias por el apoyo técnico en la elaboración de la animación del video número 3 de este trabajo.

Al M. en Ingeniería Electrónica Elio Vega Murguía del Departamento de Visualización de la DGSCA por su colaboración en la realización de las imágenes 3D en la sala de visualización Ixtli.

A la Dra. Keith Gull por el anticuerpo monoclonal anti-tubulina-alfa (TAT-1) donado para la realización de este trabajo.

A mis compañeros

A Olivia por tu amistad y muy sabios consejos.

A Kriz por tu compañía, amistad e invaluable ayuda en todo momento...por eso gracias.

A Carlos, David, Mónica, Liliana, América, Yamile, Xochitl, Héctor, Denisse y Efrén por su amistad y apoyo durante la maestría.

A mi Familia

A René por ser biólogo, amigo, papá, trabajador, músico y esposo.

A Fernando por ser mi corazón, mi mente y mi hijo.

A mis padres Martha y Jorge por el apoyo que me han brindado durante todo este tiempo como hija, estudiante y mamá.

A mis hermanas "Mary" cruz, Estela y Guadalupe.

A Diana por ser mi sobrina y a veces niñera.

Por todo esto *Gracias*.

Índice

I. Resumen

II. Introducción

Sistema Protonefridial de Platelminotos

Schistosoma mansoni

Diphyllobothrium dendriticum

Taenia solium

Taenia solium

Ciclo de vida de *Taenia solium*

Morfología del cisticerco

Citoesqueleto

III. Justificación

IV. Hipótesis

V. Objetivos

VI. Materiales y Métodos

Parásitos

Cisticercos de *T. solium*

Fijación, inclusión y preparación de tejidos de parásitos

Microscopía de fluorescencia

Microscopía electrónica de transmisión

Inmunohistoquímica

Inmunofluorescencia

Inmunodetección de tubulina- α

Inmunodetección de miosina tipo II muscular
Identificación de actina F

Inmuno-oro

Inmunodetección de la tubulina- α
Inmunodetección de Miosina tipo II muscular
Inmunodetección de actina

Análisis microscópico de tejidos de parásitos

Microscopía de fluorescencia
Microscopía confocal
Microscopía electrónica de transmisión

Visualización de imágenes

VII. Resultados

Microscopía de fluorescencia y confocal

Identificación de la tubulina- α y γ
Identificación de miosina tipo II
Identificación de actina F

Microscopía electrónica de transmisión

Identificación de la tubulina- α
Identificación de miosina tipo II
Identificación de actina

Visualización tridimensional de las células flama

VIII. Discusión

IX. Conclusiones

X. Perspectivas

XI. Referencias

Índice de Abreviaturas

| | |
|-------------|---|
| AcM | Anticuerpo Monoclonal |
| AcP | Anticuerpo Policlonal |
| CE | Canal Espiral |
| C | Cilios |
| CB | Cuerpos Basales |
| CF | Células Flama |
| EI | Escólex Invaginado |
| EN | Envoltura Nuclear |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-Phenylindole |
| DIC | Contraste Diferencial de Interferencia |
| IP | Ioduro de Propidio |
| MET | Microscopio Electrónico de transmisión |
| MF | Microscopio de Fluorescencia |
| MC | Microscopio Confocal |
| MT | Microtúbulos |
| N | Núcleo |
| SP | Sistema protonefridial |
| SSAF | Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos |
| PV | Pared Vesicular |
| V | Vesículas |

1. **Esquema del sistema protonefridial de platelmintos.**
2. **Ciclo biológico de *Taenia solium*.**
3. **Metacestodo de *T. solium*.**
4. **Cortes de cisticercos vistos al nivel de pared vesicular y escólex invaginado.**
5. **Distribución de tubulina- α en cisticerco de *T. solium*.**
6. **Tubulina- α en pared vesicular**
7. **Tubulina- α en células flama en el canal espiral.**
8. **Localización de núcleos y Tubulina- α en células flama.**
9. **Comparación del reconocimiento de tubulina- α por los AcM TU-02 y TAT-1**
10. **Distribución de tubulina- α en pared vesicular y canal espiral.**
11. **Distribución de tubulina- γ .**
12. **Localización de miosina II y tubulina- α en cisticercos.**
13. **Miosina II revelada con avidina-rodamina.**
14. **Actina polimerizada en cisticercos.**
15. **Colocalización de tubulina- α y actina filamentosa.**
16. **Distribución de actina polimerizadas y tubulina- α en CF.**
17. **Localización de proteínas del citoesqueleto de CF.**
18. **Localización ultraestructural de tubulina- α en CF.**
19. **Localización ultraestructural de miosina II en CF.**
20. **Localización ultraestructural de actina polimerizada en CF.**
21. **Proyección tridimensional de la reconstrucción digital de proteínas del citoesqueleto en células flama.**
22. **Reconstrucción 3D de la distribución de fibras de miosina y tubulina- α en células flama de canal espiral.**
23. **Distribución esquemática de componentes de una CF.**
24. **Ultraestructura de células flama.**
25. **Representación esquemática de la posible dinámica de captura y excreción de sustancias por parte de la CF.**

Índice de Tablas

Tabla

- I **Anticuerpos primarios utilizados**
- II **Anticuerpos secundarios utilizados**
- III **Marcadores fluorescentes utilizados**

Índice de Videos

- Video I Reconstrucción de las imágenes en z de CF por el software Amira.
- Video II Imagen 3D de la estructuración de proteínas del citoesqueleto en CF.
- Video III Animación de la posible estructuración y función de las proteínas del citoesqueleto en CF de cisticercos de *T. solium*.

I. Resumen

Es bien conocido que el sistema protonefridial (SP) de los platelmintos es un sistema extremadamente complejo de conductos que terminan en células flama (CF). Estas son consideradas como la unidad básica del SP y están constituidas por cuerpos celulares largos que soportan un penacho de cilios. La caracterización de proteínas del citoesqueleto en el SP ha sido descrita para dos miembros del Phylum Plathelminthes *Schistosoma mansoni* y *Diphyllobotrium dendriticum*, sin embargo no existen, hasta este momento, estudios que demuestren si la arquitectura de las CF, se relaciona con sus funciones excretorias, de la cual no se conoce mucho. Por lo que en el presente proyecto se determinó la distribución de proteínas del citoesqueleto en el SP de otro platelminto, *Taenia solium* utilizando técnicas inmunohistoquímicas, microscópicas (fluorescencia, confocal y electrónica de transmisión), así como reconstrucciones tridimensionales de las imágenes fluorescentes. Los resultados muestran, por primera vez la distribución de tubulina- α en tejidos de cisticercos de *T. solium*, así como la constitución por tubulina- α , γ y actina filamentosa de las CF. Mientras que con las reconstrucciones tridimensionales se muestra la distribución espacial de las proteínas del citoesqueleto de CF y esto en conjunto con las observaciones por MET, proporciona datos que permiten proponer el esquema tanto de su composición como posible función.

I. Abstract

Well it is known that the protonephridial system (PS) of the flatworms is an extremely complex system of conduits that finish in flame cells (FC). These are considered like the basic unit of the PS and these are constituted by an extended cellular body that supports a tuft of cilia. The protein characterization of the cytoskeleton in the PS has been described for two members of the Phylum Plathelminthes *Schistosoma mansoni* and *Diphyllobotrium dendriticum*, nevertheless it does not exist, until this moment, studies that demonstrate if the architecture of the FC is related to their functions excretory, which much is not known. In the present project has been made a determination of protein distribution of the cytoskeletal in the PS of another flatworm, *Taenia solium*, using technical immunohistochemistry, microscopy (fluorescence, confocal and transmission electron), as well as three-dimensional reconstructions of the fluorescent images was determined. The results show, by first time the distribution of α -tubulin - in weaves of cysticerci of *T. solium*, as well as the constitution by α and γ -tubulin and actin filaments of FC. Whereas with the three-dimensional reconstructions we can see the space distribution of proteins of the cytoskeleton of CF and this with the observations by TEM provide data that allow proposing the scheme of their composition as much as a possible function.

II. Introducción

Sistema protonefridial de platelmintos.

El sistema protonefridial de muchos platelmintos (Brusca, 2003; Lamothe, 1983) es similar en estructura; está constituido por una red de túbulos que corren a través del mesénquima, se bifurcan en nefridioductos y terminan en células especializadas denominadas células flama (Figura 1). Estas células también han recibido el nombre de bulbos flamíferos, células flamíferas o células en flama, pero para los fines de la presente tesis se denominarán células flama. El conjunto de las CF y su asociación con la red de túbulos reciben el nombre colectivo de protonefridio. Estas células terminales del protonefridio contienen cilios, los cuales se extienden dentro de cavidades tubulares, las cuales están formadas por procesos de interdigitación del citoplasma celular de las células tubulares con las que interaccionan las células flama (Figura 1). Entre las paredes de los nefridioductos y las interdigitaciones de las CF, se cree existe un anillo de microvellosidades a través del cual se cree, podrían estar entrando los fluidos al túbulo de excreción y ser dirigidos a lo largo del túbulo por el movimiento ciliar que producen las células flama.

Células Flama

Las CF se encuentran formadas de cuerpos celulares largos. Internamente las células soportan un penacho de cilios, "la flama", la cual puede ser observada por el rápido batimiento de los cilios bajo el microscopio de luz polarizada (Voge, 1963). Al microscopio electrónico de transmisión, cada cilio presenta el típico patrón de nueve dobletes periféricos y un par central de microtúbulos en la

disposición clásica conocida como 9+2 (Alberts *et al*, 2002). Cada uno de los microtúbulos se encuentra arreglado en hileras que forman ramilletes, los cuales se encuentran en sucesivo movimiento ondulante (Harrison, 1991).

Estructura de los cilios

El centro del cilio, llamado axonema, contiene un conjunto de microtúbulos que corren en sentido longitudinal por todo el organelo. El axonema de un cilio presenta una estructura altamente ordenada formada por nueve microtúbulos dobles periféricos que rodean un par central. Los microtúbulos del axonema presentan la misma polaridad; los extremos positivos se encuentran en la punta de la proyección y los extremos negativos, en la base. Cada par consiste de un microtúbulo completo denominado A y un incompleto, el túbulo B, el cual consiste de 10-11 protofilamentos en lugar de 13. El par de microtúbulos centrales denominados vaina central se unen al protofilamento A por medio de rayos radiales. Las parejas están unidas entre sí por puentes formados por nexinas. Cada microtúbulo A contiene dos brazos internos y tres externos conformados por la proteína dineína. Cada cilio se genera de un cuerpo basal que se encuentra en la base en donde se lleva a cabo la nucleación de los microtúbulos y en donde hay un tipo de tubulina descubierta en los 80's como tubulina gamma (Karp, 2005; Keller, 2005).

Según Wilson (1969), las CF en los platelmintos están formadas por dos células: Una es la que constituye el penacho de cilios y la otra, la porción del túbulo. Sin embargo, esta teoría se ha rechazado porque no existe evidencia alguna al respecto (Rohde, 1986) y aún deja en duda todavía como es que las CF llevan a cabo sus funciones de excreción (Harrison, 1991).

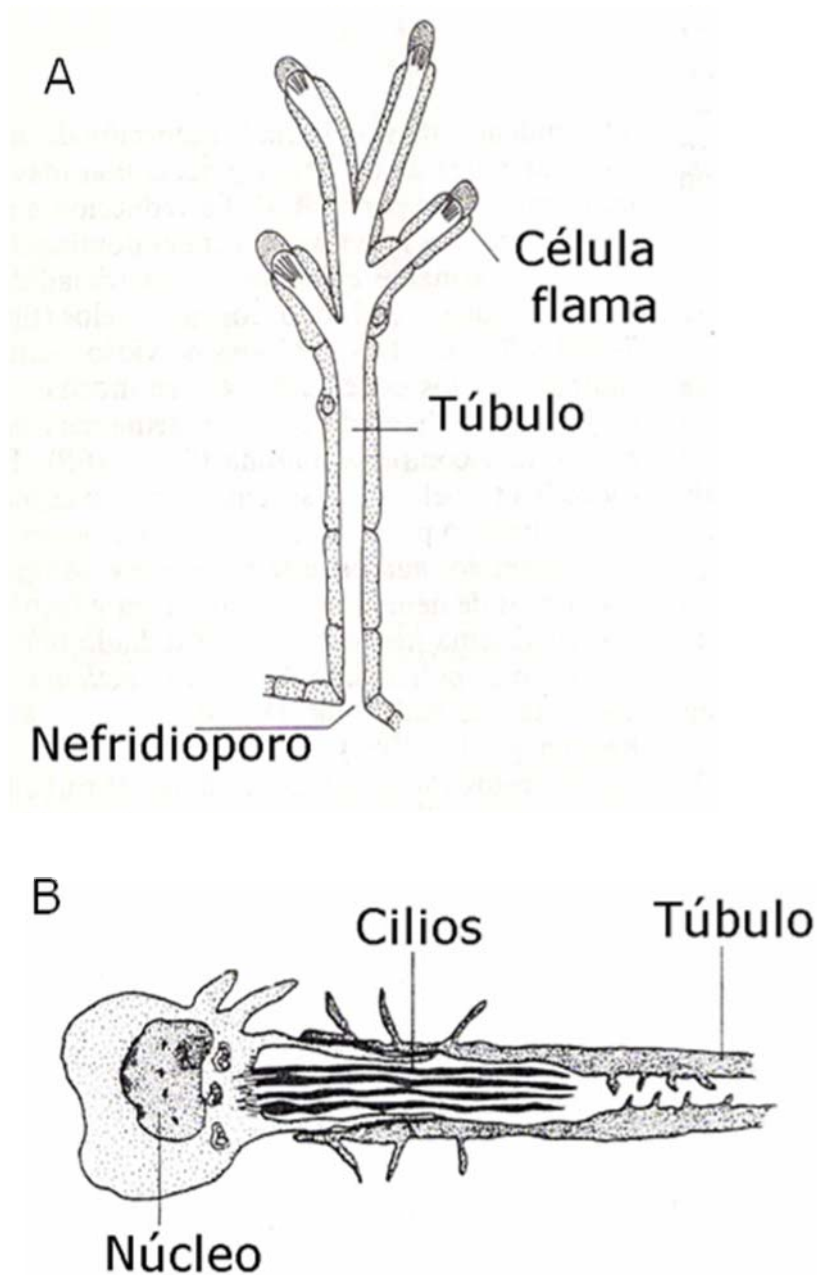


Figura 1. Esquema del sistema protonefridial de platelmintos. (A) Componentes del SP, túbulos conductores, células flama y los nefridioporos. (B) Célula flama clásica en la que destacan el núcleo, el citoplasma, las mitocondrias y sus cilios dirigidos hacia el túbulo. Tomado de Barnes (1994) y Brusca (2003).

Hay pocos estudios relacionados con los sistemas protonefridiales y las CF de los Plathelminthos; sólo en dos organismos del *Phylum: Schistosoma mansoni*, un tremátodo y *Diphyllobothrium dendriticum*, un céstodo, se han hecho algunos

avances en la caracterización de sus componentes mediante histoquímica y ello ha permitido tener conocimientos acerca de como están organizados algunos de los componentes de estos sistemas protonefridiales y sus CF, para *Taenia solium*, también un céstodo, se han identificado estructuras de su sistema protonefridial, entre los que se encuentran sus ductos colectores y las células flama en su forma larvaria o cisticerco.

S. mansoni. Se ha demostrado la presencia de actina polimerizada mediante el empleo de faloidina-Rodaminada y se le ha encontrado asociada a los túbulos protonefridiales de los diversos estadios de desarrollo estudiados, así como, establecido que los túbulos descansan entre las fibras musculares del parénquima parasitario. Con el mismo marcador fluorescente, se ha demostrado la distribución de actina en las CF, además de la presencia de tubulina en la porción relacionada con el penacho de cilios de estas células, por medio del uso de anticuerpos anti-tubulina y como por medio de una reconstrucción tridimensional, la forma que mantiene la actina en las células (Bahia *et al*, 2005).

D. dendriticum. Al igual que con *S. mansoni*, en experimentos en los que también se identificó a la actina mediante faloidina-TRITC, se evidenció la estructura del sistema excretor de los parásitos adultos. Se observó que los ductos excretores, localizados en el parénquima parasitario, se encontraban rodeados de fibras musculares que contienen actina. En estos organismos se encontró que sus CF están rodeadas por un anillo de actina (Wahlberg, 1998).

En los cestodos adultos, se ha visto que el sistema protonefridial está constituido por un par de conductos longitudinales que corren a lo largo de las cadenas estrobilares, los cuales reciben los fluidos provenientes de los túbulos ramificados, quienes, a su vez,

terminan en las células flama (Harrison, 1991; McManus, 1989). Sin embargo, no hay demostración alguna al respecto, ni tampoco, se ha hecho una caracterización completa de los componentes de tales sistemas y mucho menos, se ha estudiado como se estructura en otros estadios parasitarios.

T. solium. Las evidencias de que los parásitos tienen sistemas protonefridiales provienen de observaciones que se han realizado con técnicas microscópicas diversas (Willms *et al*, 2003; 2004,); las CF se identificaron por su motilidad mediante microscopía de luz polarizada (Voge, 1963) y los ductos protonefridiales se identificaron por la presencia de corpúsculos calcáreos dentro de ellos (Vargas-Parada, 1999 y Menlovic *et al*, 2006). Hasta la presente tesis, no se ha llevado ningún estudio de caracterización de componente alguno del sistema protonefridial de estos parásitos y mucho menos, la caracterización de alguno de los componentes del citoesqueleto asociados de estos sistemas.

Ciclo de vida

T. solium es un céstodo de importancia en la salud pública ya que es causante de enfermedades como la teniosis y más importantemente la neurocisticercosis en el humano en países en vías de desarrollo.

El ciclo de vida de *T. solium* incluye a dos hospederos: el hospedero definitivo que es el humano y al hospedero intermediario el cerdo; el ciclo se lleva a cabo cuando el ser humano ingiere accidentalmente la carne de cerdo infectada con cisticercos, los cuales son activados por acción de enzimas gástricas, intestinales y

sales biliares, induciendo la evaginación del escólex y su fijación en la pared del intestino delgado, una vez anclado el parásito crece hasta alcanzar la forma adulta (3-4 meses) productora de proglótidos grávidos y huevos. El ciclo se completa cuando los cerdos consumen los proglótidos grávidos y los aproximadamente 50,000 huevos contenidos en ellos durante la coprofagia, ya en el tracto digestivo del huésped intermediario, se liberan las oncosferas contenidas en los huevos por la acción digestiva (ácido clorhídrico, enzimas digestivas y bilis) de la zona y una vez que ellas se han diferenciado, se vuelven altamente móviles y atraviesan la pared del intestino. Luego, por vía sanguínea o linfática, estos organismos se dispersan prácticamente por todo el organismo e invaden tejido y órganos (tejido subcutáneo, musculo esquelético, y cardiaco, cerebro, ojos etc.) sitios en donde se transforman en cisticercos después de tres meses (García *et al*, 2003, Flisser *et al*, 2005).

Morfología: Cisticercos.

Los cisticercos o metacéstodos están constituidos por una vesícula ovalada y translúcida de aproximadamente 10 mm de diámetro, la cual en su interior está llena de fluido vesicular y un escólex invaginado (Figura 3A) (Slais, 1970). El escólex del cisticerco es idéntico al del adulto, esto es, presenta un escólex en donde se distinguen las cuatro ventosas y el róstelo compuesto de una doble corona de ganchos, se observa el cuello y muestra en su superficie muchos dobleces como septos. Estos septos son los que conforman el canal espiral. El cuello crece con mayor rapidez que el receptáculo y

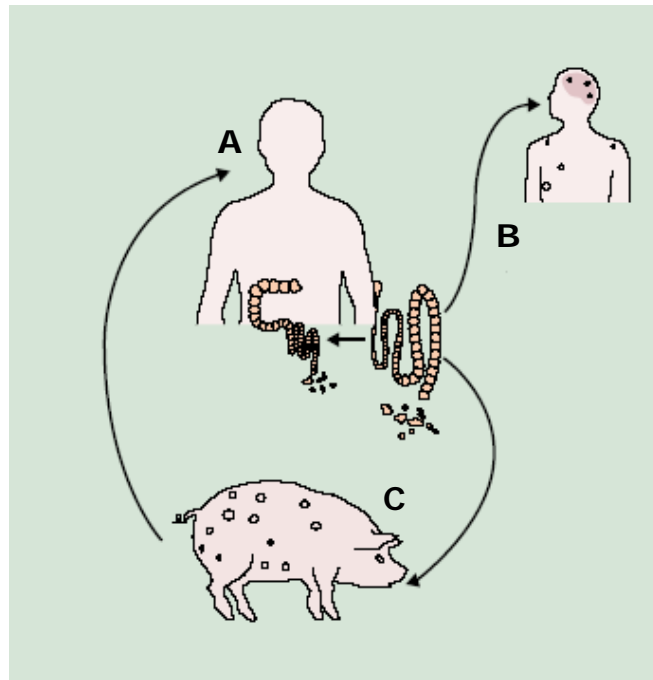


Figura 2. Ciclo biológico de *Taenia solium*. (A) La ingesta de carne de cerdos infectada con cisticercos de *T. solium* por el humano produce la teniosis. (B) El parásito adulto establecido en el intestino humano produce proglótidos, en donde se desarrollan miles de huevos que son liberados en la materia fecal que al ser ingeridos por el mismo humano, producen la cisticercosis humana o neurocisticercosis. (C) Los huevos al ser ingeridos por el cerdo produce cisticercosis porcina, forma en la que puede volver a iniciarse el ciclo. Imagen tomada de García 2003.

por lo tanto se enrolla sobre sí mismo en espiral o en forma de "S" (Figura 3B). La superficie externa de la vesícula está rodeada de microvellosidades conocidas también como microtricas, las cuales son prolongaciones del tegumento, el cual está delimitado por una membrana plasmática clásica. El tegumento es un sincicio continuo en el cual hay un gran número de microvesículas, mitocondrias, cuerpos densos y vacuolas; la función del tegumento es facilitar y proveer las condiciones para que se lleve a cabo la absorción de nutrientes debido a que los cestodos carecen de un sistema digestivo. Por debajo del tegumento se encuentran capas de músculo liso y células subtegumentarias unidas a él tegumento por puentes citoplasmáticos (Fig. 3C) (Flisser *et al*, 1997; Larralde *et al*, 2006).

Citoesqueleto

Son tres las principales proteínas filamentosas del citoesqueleto de los eucariontes: los microtúbulos (MT), los filamentos intermedios (FI) y los microfilamentos de actina (Actina F). Estas estructuras forman una red integrada, la cual mantiene funciones importantes tales como proporcionar el armazón estructural de las células que determina su forma, proporcionar la fuerza y la resistencia al estrés mecánico, organizar al citoplasma, controlar y dirigir los movimientos intra y extracelulares, permitir la secreción celular y determinar la locomoción celular (Cooper, 2004; Rubino, 1983; Alberts *et al*, 2004). Aun cuando el citoesqueleto en células de mamíferos es bien conocido, es poco lo que se sabe de él en los eucariontes inferiores. Por ejemplo, en contraste con la gran diversidad de FI en vertebrados, en los helmintos (específicamente en nematodos) sólo 2 proteínas se han identificado: el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia FI de mamíferos estableció la distribución de estas proteínas en 3 distintos tipos de músculo de *Ascaris lumbricoides*, así como en su tejido epitelial de hipodermis, intestino, útero, ovario y testículo (Sato y Kamiya, 2000). En lo que se refiere a MT en céstodos, sólo para uno, no patógeno al hombre, *Gymnorhynchus gigas*, se encontró que anticuerpos anti-tubulina revelaba de MT en el escólex de los parásitos (Moreno, 2001) pero no se estableció exactamente en qué sitios. Estudios realizados en células de cultivo de *Echinococcus granulosus* (Rubino *et al*, 1983) han mostrado la distribución de MT, MF y FI de tipo vimentina y que los MT son sensibles a fármacos derivados del bencimidazol. Otras proteínas del citoesqueleto, demostrados en tejidos de diferentes estadios parasitarios de *T. solium*, son la miosina tipo II y la actina F; la

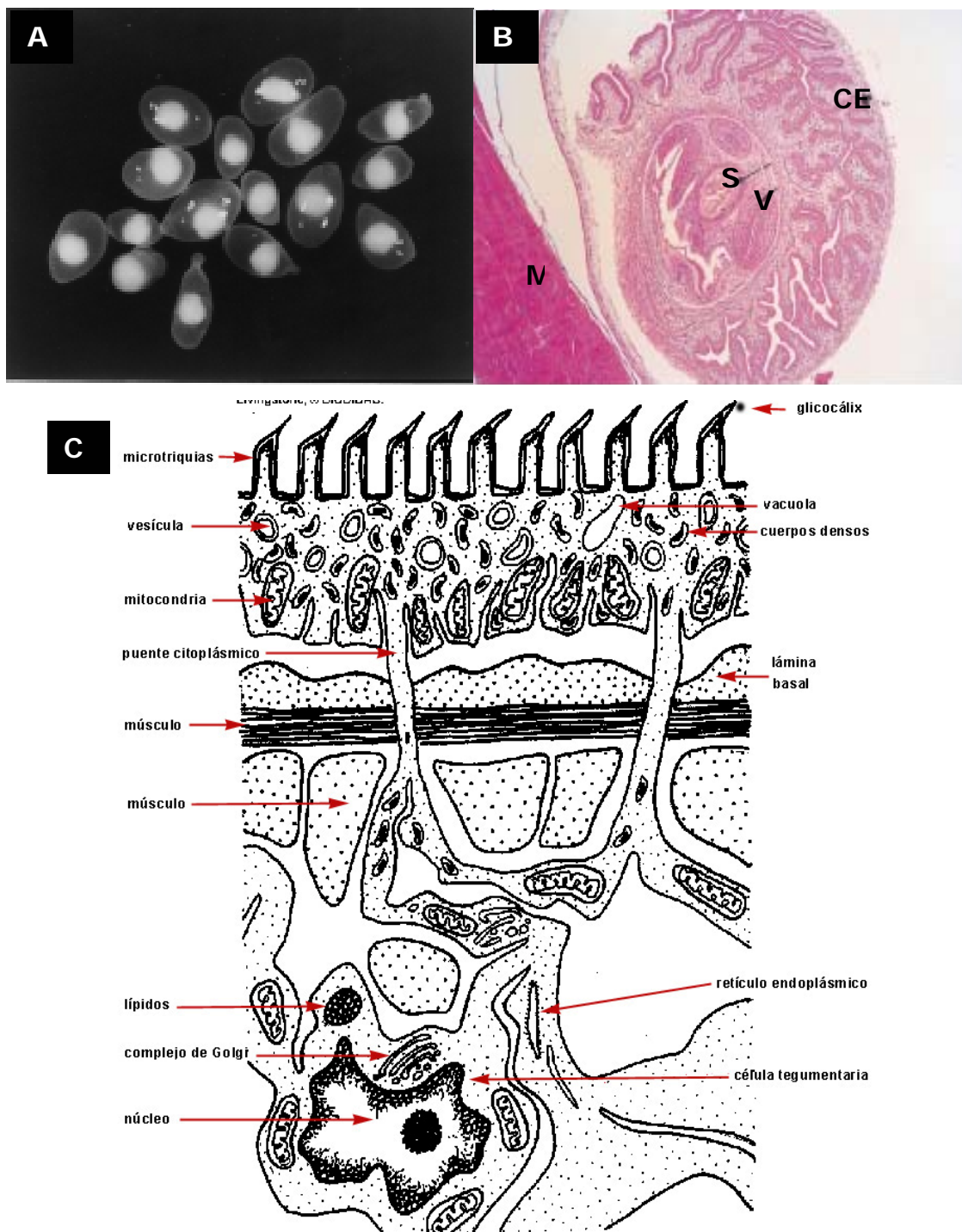


Figura 3. Metacestodo de *T. solium*. (A) Constituido por una vesícula translúcida con fluido y un pequeño escólice invaginado (puntos de color blanco). (B) Corte transversal de cisticerco en músculo de cerdo M. Canal espiral CE, Ventosas V, Imágenes tomadas de Sciutto *et al*, 2000 y (C) Esquema de tegumento de cestodos (Tomado de BIODIDAC, University of Ottawa).

miosina II es una de las principales proteínas contráctiles de los sistemas musculares de los parásitos (Ambrosio *et al*, 1997) y se presenta con varias isoformas dependientes del estadio de desarrollo de estos parásitos (González-Malerva *et al*, 2004). En el caso de la actina, también se ha encontrado que esta proteína se expresa con varias isoformas (Ambrosio *et al*, 2003), las cuales parecen variar durante el desarrollo de los parásitos (Reynoso-Ducoing O. Comunicación personal). Con base en estas consideraciones, cabría esperar que hay una gran plasticidad en la expresión de isoformas de proteínas filamentosas del citoesqueleto en *T. solium*, las cuales pueden ser demostradas mediante el uso de anticuerpos específicos tanto en los tejidos de los parásitos, como en los extractos de los mismos y que éstas pueden variar dependiendo de los estadios de desarrollo de los parásitos y que tal diversidad permita a los parásitos éxito en el establecimiento dentro de sus hospederos para sobrevivir.

V. Justificación

Las parasitosis producidas por *T. solium* como la cisticercosis y la teniosis son consideradas enfermedades importantes en la salud pública en los países en desarrollo, el conocimiento básico de la biología celular de los parásitos podría impactar en aspectos relacionados con su control, tratamiento e incluso, en el diagnóstico como se ha propuesto al respecto en este tipo de parásitos (Wolstenholme *et al*, 2004). Y dado que en la actualidad se ha visto que los fármacos antiparasitarios que están siendo efectivos en contra estos, actúan de forma directa o indirecta sobre proteínas relacionadas con el citoesqueleto (Palomares *et al*, 2006), un mayor conocimiento de las propiedades y estructuración de estas proteínas pueden ser un indicativo del papel que juegan en los parásitos e importante para los tratamientos quimioterapéuticos (Lightowlers, 1999), así como en el desarrollo de nuevos fármacos o sustancias con potencial cestocida, aparte de las que ya se conocen y aplican en la clínica (Dayan, 2003; García *et al*, 2002; Lacey, 1988) y para las que ya se han hecho evaluaciones para conocer mejor su mecanismo de acción (García-Domínguez *et al*, 1991; Peniche-Cardaña *et al*, 2002). Por lo que en el presente trabajo de tesis se busca identificar y conocer como se distribuyen las proteínas del citoesqueleto, en células flama localizadas en el sistema protonefridial de cisticercos de *T. solium*. Con lo que se espera que se haga una contribución en el conocimiento de la biología celular y la fisiología de estos parásitos que resulten de utilidad en la búsqueda de blancos proteicos o en la caracterización del sitio de acción de los mismos.

IV. Hipótesis

- Es factible demostrar, mediante estrategias inmunohistoquímicas, que proteínas del citoesqueleto constituyen a las células flama de cisticercos de *T. solium*.
- Las proteínas del citoesqueleto establecen la base estructural de las células flama del cisticerco de *T. solium*.

III. Objetivos

Objetivo General

- Determinar la distribución de proteínas del citoesqueleto en cisticercos de *T. solium* mediante su detección y su visualización con técnicas de microscopía de fluorescencia, confocal, electrónica de transmisión y análisis computacional de imágenes.

Objetivos Particulares

- Establecer la distribución tisular, mediante microscopía de fluorescencia y electrónica de transmisión, en donde se localizan las proteínas del citoesqueleto (tubulinas, miosina II y actina) en criocortes y cortes semifinos de cisticercos de *T. solium*.
- Determinar mediante reconstrucción tridimensional de las imágenes obtenidas por microscopía confocal, la forma en que las proteínas del citoesqueleto estudiadas se encuentran estructurando a las células flama del sistema excretor de los cisticercos.

VI. Materiales y Métodos

Parásitos

I. Cisticercos de *solium*. Los parásitos se obtuvieron, por necropsia de carne de cerdo infectado naturalmente. Se les lavó exhaustivamente con solución salina amortiguadora de fosfatos y se les separó en dos grupos: uno para ensayos de fluorescencia y el otro, para ensayos de microscopía electrónica de transmisión.

Preparación de tejidos de parásitos.

Fijación de tejidos para microscopía de fluorescencia. Los cisticercos, se incluyeron en una solución de montaje comercial (Tissue-Tek; Sakura) e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. Los parásitos se mantuvieron congelados a -20 -70°C hasta que se obtuvieron criocortes. Los parásitos congelados se seccionaron en un crióstato Leica para obtener cortes de 8-10 μm de grosor, los cuales se montaron sobre portaobjetos recubiertos con poly-L-Lisina 1:9 (Sigma) e inmediatamente después de montados se fijaron en acetona fría y se procesaron para los ensayos de inmunohistoquímica.

Fijación de tejidos para microscopía electrónica de transmisión. Los cisticercos se incluyeron en una solución de paraformaldehído al 2 % /glutaraldehído al 0.25 % (solución fijadora leve) por una hora a 4°C, los parásitos se lavaron tres ocasiones con SSAF (pH 7.2, 4°C) posteriormente se deshidrataron en porcentajes

crecientes de alcohol y se incluyeron en Lowicryl (Electron Microscopy Sciences) bajo la siguiente estrategia:

| Resina vol. / Etanol vol. | Temperatura °C | Tiempo |
|---------------------------|----------------|---------------|
| 1:1 | -35 | 60 |
| 2:1 | -35 | 60 |
| Resina pura | -35 | 60 |
| Resina pura | -35 | Toda la noche |

Para la polimerización de la resina pura, se le sustituyó por una nueva y se le dejó así por dos noches a -20°C ; al final, los parásitos así incluidos, se expusieron por una noche más, en una cámara con luz UV, a temperatura ambiente.

Inmunohistoquímica.

Inmunofluorescencia. Los cortes se fijaron en acetona fría (-20°C) por 5 minutos, se lavaron dos veces; una con SSAF y otra, con SSAF/Triton x100 al 0.3 %. Las muestras se bloquearon durante una hora a 37°C , en una cámara húmeda, con SSAF/Triton x100 al 0.3%/BSA al 0.1%. Después del bloqueo y para llevar a cabo un marcaje de fluorescencia, las muestras se lavaron nuevamente como se indicó anteriormente y se incubaron con el anticuerpo primario (Ver tabla I) por una hora a 37°C en cámara húmeda. El exceso de anticuerpo se eliminó a través de lavados con SSAF y SSAF/Triton x100. Después de lavar las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario, en las mismas condiciones utilizadas para el anticuerpo primario, sólo que dado que los anticuerpos secundarios estaban conjugados a marcadores fluorescentes (Ver tabla II), las muestras se incubaron en oscuridad. Se lavaron las muestras para eliminar el

exceso de anticuerpo e inmediatamente después se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad en presencia de Ioduro de Propidio (1:1000) o de DAPI (1mg/ml) (Ver tabla III) para la tinción de núcleos. Finalmente, las muestras se lavaron con SSAF y se montaron permanentemente en una solución de montaje comercial (Dako). Las muestras montadas se almacenaron en refrigeración (4°C) y en oscuridad hasta su análisis por microscopía de fluorescencia. En todos los casos, como controles, se incubaron cortes en presencia de anticuerpos secundarios, a las diluciones empleadas en los ensayos, y se observaron al microscopio (Ver tabla II).

Inmunodetección de tubulina- α . Se utilizaron los anticuerpos monoclonales comerciales DMIA (Sigma) (1:100), TU-02 (Santa Cruz) (1:40) y TAT-1 (1:100) donado por la Dra. Gull como anticuerpos primarios y como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo anti-IgG-ratón conjugado a fluoresceína (1:30) (Sigma).

Inmunodetección de miosina tipo II muscular. Se utilizó anticuerpo policlonal anti-*T.solium* (1:1000) producidos en el laboratorio (Cruz-Rivera *et al*, 2006) y, como anticuerpos secundarios, se utilizaron anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados a biotina (1:30) (VECTOR). Luego de incubar los cortes con los anticuerpos secundarios y de lavarlos, los cortes se incubaron en solución con avidina-rodamina (1:150) (VECTOR), se hicieron nuevamente otros lavados para eliminar el exceso del marcador fluorescente y se montaron los cortes para observación.

Identificación de actina polimerizada. El marcaje se hizo directamente sobre las muestras; para estos fines, las muestras luego de haber sido fijadas en acetona, se colocaron en una solución (1:40) que contenía faloidina-rodaminada (Alexa fluor phalloidin 594;

Molecular Probes), se lavaron con SSAF y se montaron como se indicó anteriormente.

Inmunoro-oro. De los tejidos incluidos en resina Lowicryl, se obtuvieron cortes semifinos (40-80 nm) y se depositaron sobre rejillas de níquel de 300 mallas, forradas con formvar. Hasta su uso, las rejillas con los cortes se mantuvieron en refrigeración a 4°C. Para los ensayos de inmuno-oro, todos los procedimientos se realizaron en cámara húmeda a temperatura ambiente, las rejillas se hidrataron con SSAF durante 30 min. Al término de la hidratación, las muestras se bloquearon con una gota de SSAF/BSA 1%/Tween 20 al 0.15% por 30 minutos, los cortes se incubaron a 4°C, toda la noche, con el anticuerpo primario (Ver tabla I), las rejillas se lavaron con 20 ml de SSAF/Tween 20 al 0.15% y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a oro coloidal durante dos horas. A continuación, los cortes se lavaron con SSAF, agua desionizada y se les dejó secar de 30-60 minutos. Para preparar la observación al microscopio electrónico de transmisión, se les aplicó una solución de acetato de uranilo al 5 % (el cual se centrifuga antes de cada uso) durante 10 minutos. Al término, los cortes se lavaron en 2 ocasiones con agua Milli Q y una con agua desionizada y se les dejó secar. También, como en el caso de la microscopía de fluorescencia, para las observaciones de los controles, se incubaron varios cortes en presencia de los anticuerpos secundarios conjugados con oro coloidal (Ver Tabla II).

Inmunodetección de tubulina- α . Como en el caso de la inmunofluorescencia, se utilizó el AcM DMIA (1:100) como anticuerpos primarios, solo que en el caso de anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos anti IgG de ratón (1:100) conjugados a Oro coloidal de 20 nm (BBInternational).

Inmunodetección de Miosina tipo II muscular. También, como en el caso de la inmunofluorescencia, se utilizaron anticuerpos policlonales anti-*T. solium* (1:50) sólo que como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos anti-IgG de conejo (1:100) conjugados a oro coloidal de 20 nm (BBInternational).

Identificación de actina. A diferencia del marcaje fluorescente, para estos experimentos se emplearon anticuerpos monoclonales comerciales anti-actina (C4; Chemicon) (1:100) y anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados con oro coloidal de 20 nm (BBInternational) (1:100) como anticuerpos secundarios.

Análisis microscópico de tejidos de parásitos.

Microscopia de fluorescencia. La observación de las muestras se llevó a cabo en diferentes microscopios dependiendo de las necesidades de las observaciones.

Inicialmente, con la finalidad de evaluar los cortes y las marcas fluorescentes, se hicieron observaciones en un microscopio de epifluorescencia NiKon Eclipse E 600 usando los objetivos de 10, 20, 40, 100x PLAN FLUOR con observaciones bajo las mismas condiciones descritas para actina y miosina II en *T. solium* (Ambrosio *et al*, 1997; 2003). Con los filtros triple (D-F-R) y G-1B se observaron las marcas fluorescentes de los núcleos obtenidos con el Ioduro de Propidio y DAPI. En el caso del registro de las imágenes, estas se obtuvieron mediante fotografía con una película de alta sensibilidad (Fujicolor Superia ASA 1600).

Microscopia confocal. Con la finalidad de obtener mejores imágenes de localización de dos o más marcadores fluorescentes y mejorar las observaciones obtenidas se recurrió a un microscopio

confocal ZEISS LSM 5 PASCAL y los objetivos utilizados fueron de 20x, 40x, 100x PLAN NEO FLUAR, con ajustes de longitud de onda de emisión de 488 y 633 para fluoresceína y rodamina, respectivamente, y de excitación de 520 para FITC y 590 TRICT. Así como el microscopio confocal Olympus FV1000, objetivos UPLSAPO 20x, 20x, 40x, 60x y 100x. Las imágenes se registraron a través de un paquete computacional LSM 510 PASCAL y para el caso de Olympus, el paquete computacional FV10-ASW 1.4.

De la misma forma, con la finalidad de evaluar las diferencias de las observaciones obtenidas con el microscopio confocal ZEISS y Olympus, se empleó otro microscopio de fluorescencia AXIOPLAN 2 (Zeiss) equipado con sistema apotome y que emplea un paquete computacional de axiovisión Versión 4.1.

Microscopia electrónica de transmisión. Para las observaciones se empleó un microscopio electrónico de transmisión JEOL (JEM-1200 EXII) y las observaciones se hicieron a 60-70 kv. Las imágenes obtenidas se obtuvieron en película fotográfica Kodabrome II RC, las cuales se procesaron por amplificación (BESELER 45V-XL) y se obtuvieron las imágenes positivas en papel fotográfico (Kodak). Finalmente, las imágenes obtenidas se digitalizaron en un equipo Scanner HP1315.

Todas las imágenes, una vez obtenidas, por observaciones directas del microscopio o luego de su digitalización, se editaron mediante el programa ADOBE PHOTOSHOP Versión 7.

Visualización en Tercera dimensión.

Con la finalidad de generar reconstrucciones de las observaciones obtenidas mediante microscopía confocal, de

analizarlas, reconstruirlas y proyectarlas en formatos de tercera dimensión, se empleó el paquete computacional AMIRA localizada en el Observatorio de visualización Ixtli de la DGSCA de la UNAM. De estas reconstrucciones se buscó la obtención de imágenes estáticas a diferentes ampliaciones, así como animaciones de las observaciones. Estas reconstrucciones y análisis se hicieron a partir de imágenes seriales en Z obtenidas del microscopio confocal ZEISS o del microscopio AXIOVERT (guardadas en formato MLS).

Tabla I. Anticuerpos primarios utilizados.

| Anticuerpo Primario | Fuente | Marca | Cat. | Propiedades |
|----------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------|---|
| Actina (C4) | Ratón | Chemicon | MAB1501 | Monoclonal IgG específico para dos tercias de la molécula de actina en el extremo amino terminal posiblemente dentro de los residuos 50-70. |
| Tubulina- α (DM1-A) | Ratón | Sigma | T-9026 | Monoclonal inmuno-específico para tubulina. |
| Tubulina- α (TU-02) | Ratón | Sta. Cruz | sc-8035 | Monoclonal (IgM) originado contra los aminoácidos 1-451. |
| Tubulina- γ | Cabra | Sta. Cruz | sc-7396 | Policlonal contra el carboxilo terminal. |
| Tubulina- α (TAT-1) | <i>Trypanosoma brucei</i> | Donado por la Dra. Keith Gull | | Monoclonal IgG contra tubulina- α (Woods A, <i>et al.</i> 1989). |
| Miosina AcP-Mios | <i>Taenia solium</i> | Producido en el laboratorio | | Policlonal contra Miosina II de <i>T. solium</i> (Malerva L., <i>et al</i> 2004). |

Tabla II. Anticuerpos secundarios utilizados.

| Anticuerpo secundario | Marca | Cat. |
|--|-----------------|-------------|
| Anti-conejo IgG (H+L) conjugado a fluoresceína | ZYMED | 81-6111 |
| Anti-ratón IgG (H+L) conjugado a fluoresceína | ZYMED | 85-6511 |
| Anti-ratón IgG + IgM conjugado a oro coloidal | BBInternational | BLGAF20 |
| Anti-conejo IgG conjugado a oro coloidal | BBInternational | BLGAR20 |
| Anti-ratón IgM conjugado a fluoresceína | MP Biomedicals | 67-231 |
| Anti-conejo biotinilado IgG (H+L) | VECTOR | BA-1000 |
| Avidina rodamina600 | VECTOR | A-2005 |

Tabla III. Marcadores fluorescentes utilizados.

| Marcadores | Marca | Cat. | Propiedades |
|--------------------------------------|--------------------------------|-------------|---------------------------------|
| ALexa fluor 594 phalloidina | Invitrogen Molecular Probes | A12381 | Marcador de actina filamentosa. |
| 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) | SIGMA | D9542 | Marcador cadena doble de DNA. |
| Ioduro de propidio | SIGMA | P4170 | Marcador cadena doble de DNA. |

VII. RESULTADOS

Microscopía de fluorescencia y confocal.

Identificación de Tubulina- α . Para determinar si los anticuerpos monoclonales (AcM) anti- α -tubulina (TAT-1, TU-02 y DM1-A) reconocían a esta proteína en los criocortes de los cisticercos, se hicieron observaciones mediante microscopía de fluorescencia (MF). En la figura 4 se presenta, a través de esquemas y micrografías seleccionadas, los sitios como la pared vesicular (PV), el canal espiral (CE) y el parénquima asociado al escólex invaginado (EI) en los cuales se hicieron las observaciones.

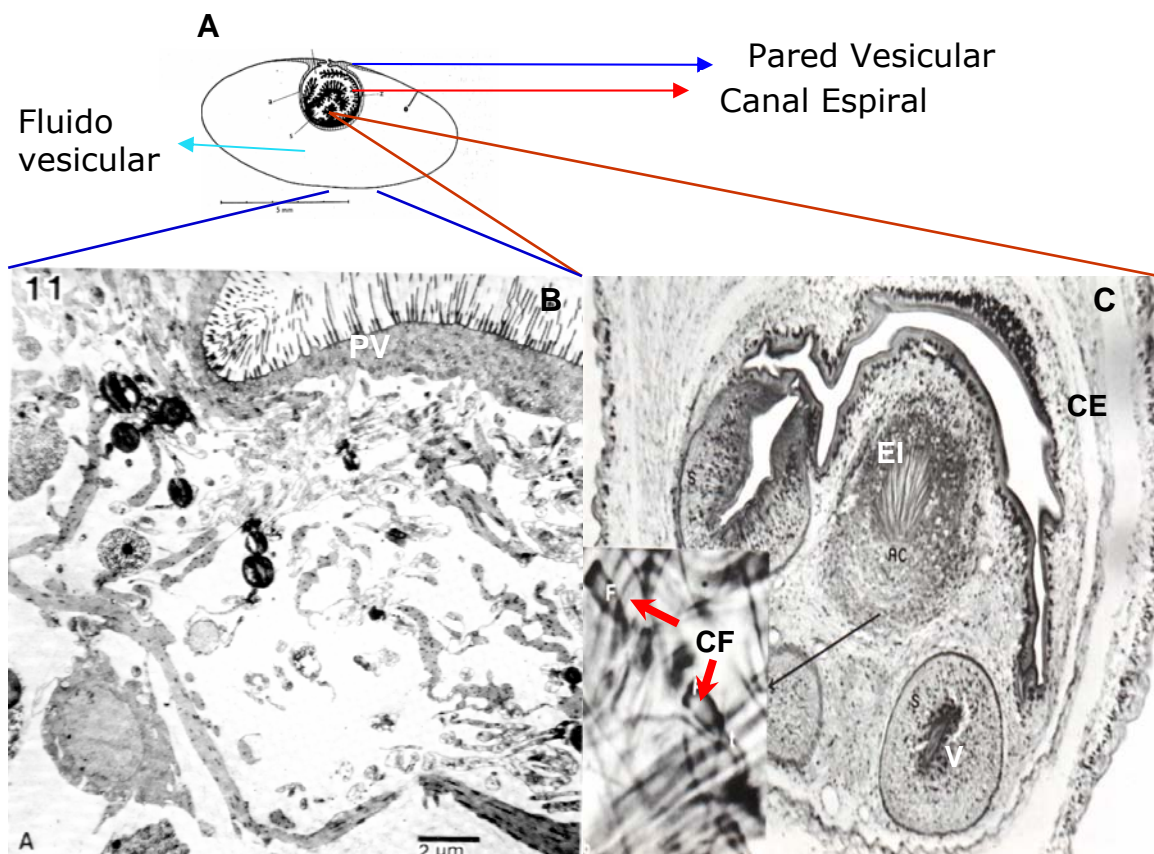


Figura 4. Cortes de cisticercos vistos al nivel de pared vesicular y escólex invaginado. (A) Dibujo esquemático de un cisticerco observado por microscopía de luz; destacan la pared vesicular, el espacio del fluido vesicular y el escólex invaginado. Observaciones de los tejidos obtenidas mediante MET (B) y microscopía de luz (C). Pared vesicular (PV), Canal Espiral (CE) en donde se ubica el escólex invaginado (EI) un par de ventosas (V) y la doble corona de gancho, en el recuadro derecho 4C, células flama (señaladas por flechas) (CF). Esquema tomado de Slais (1970).

Todos los AcM anti- α -tubulina que se utilizaron reaccionaron positivamente en tejidos de los cisticercos; Los AcM DM1-A (Fig. 5) y TAT-1 (fig. 9A, B) reaccionaron tanto en la PV como en el CE, mientras que el AcM TU-02 sólo reaccionó con la región más externa de la PV y en menor intensidad en las CF (Fig. 9C, D).

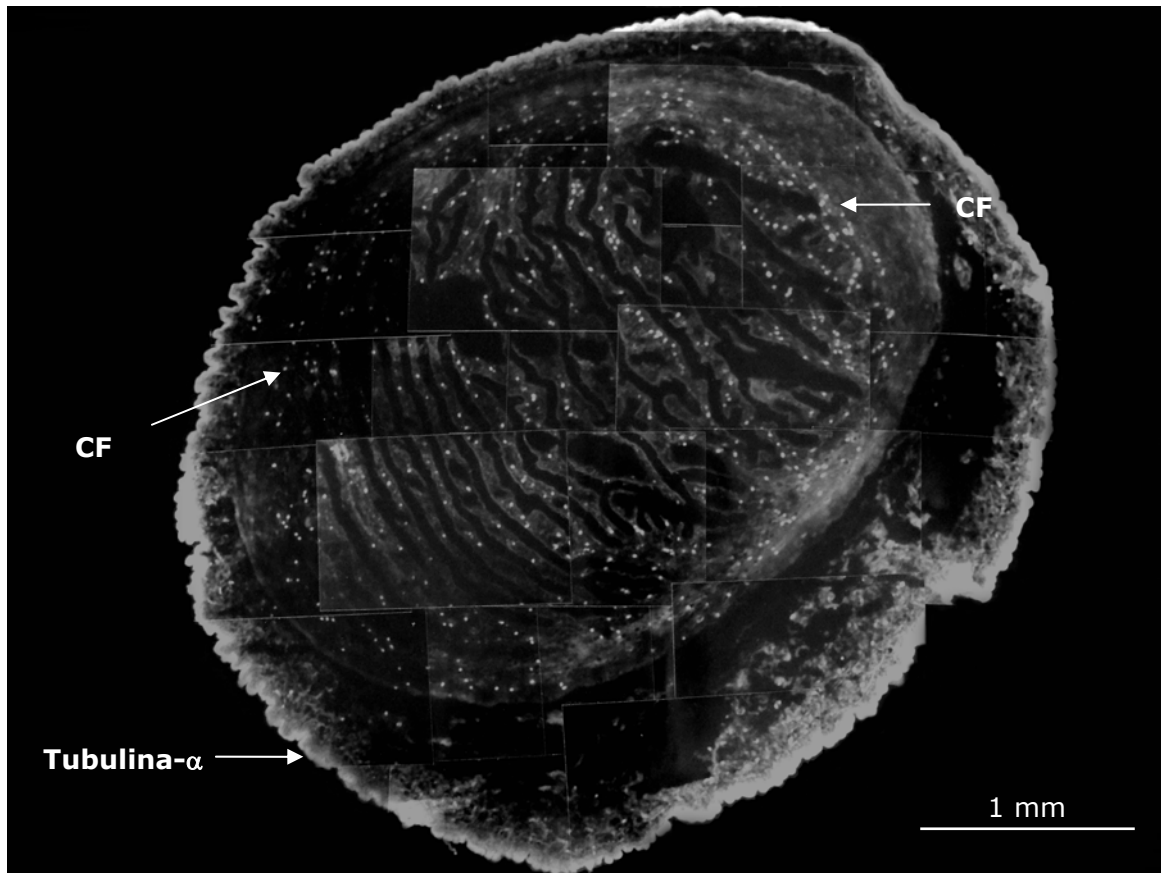


Fig. 5. Distribución de α -tubulina en cisticercos de *T. solium*. Reconocimiento de Tubulina- α por AcM anti-tubulina- α en PV y CF de criocortes de *T. solium*. En la figura se muestra un mosaico formado 36 de fotografías de imágenes obtenidas mediante el microscopio Nikon Eclipse 6000, a aumentos de 20X.

Como se observa en la figuras 5 y 9 (C, D) los AcM DM1-A y TAT-1 respectivamente se fijaron a lo largo y ancho de la PV, en donde destacaron varias estructuras con forma conoidal, las que al momento y por el aumento en el que se observaron no pudieron ser identificadas. Estas estructuras llamaron la atención de las

observaciones por su número y su localización en el escólex invaginado cerca de la zona de los ganchos y las ventosas.

En observaciones a aumento de 100x de inmersión (Fig. 6) se encontró, con la técnica de Nomarsky (Fig. 6B), a la fluorescencia asociada a la zona del tegumento y parte de la región tisular, por debajo de la membrana basal. También, parte de la marca fluorescente se encontró asociada a digitaciones localizadas en el parénquima laxo de los cisticercos. Estos sitios, según la colocalización que se hizo con la fluorescencia y el Nomarsky (Fig. 6).

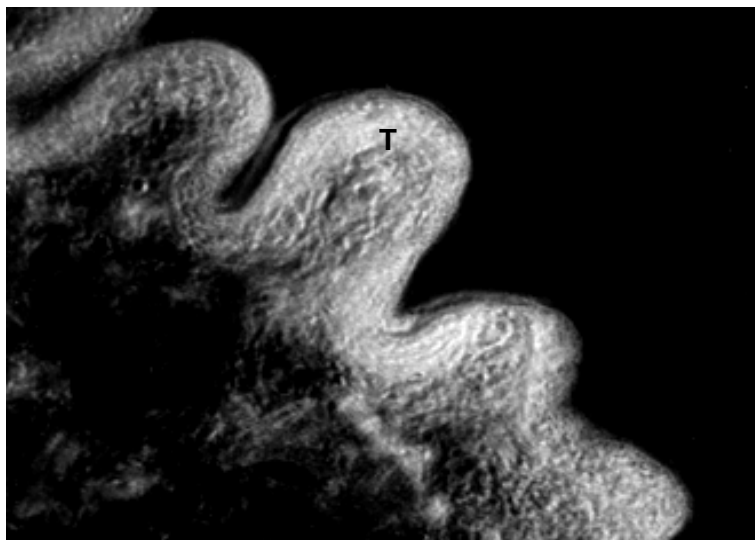


Figura 6. Tubulina- α en pared vesicular. Fluorescencia/ Nomarsky. Distribución de tubulina- α en tegumento (T) dada por el AcM DM1-A observada por MEF (imagen a 100X).

Observaciones a mayores aumentos de la marca fluorescente localizada en el CE, mostraron que los AcM DM1-A y TAT1 reaccionaron con parte del tejido parenquimatoso, además de las estructuras mencionadas anteriormente (Fig. 7). El análisis detallado de las estructuras que incluyó su forma (estructuras celulares de forma conoidal con terminación en punta; (Fig. 7A y B) y su localización (principalmente encontradas en la zona parenquimatososa

relacionada con el escólex invaginado; Fig. 7C y D) se consideraron como características de células flama, observándose además, que el número de células varía con respecto a su distribución en el tejido y por evaluaciones, realizadas en el mosaico mostrado en la figura 5, se encontró que el 87.7 % de las células flama estaban en el CE a diferencia del 21.2 % encontrado en la PV.

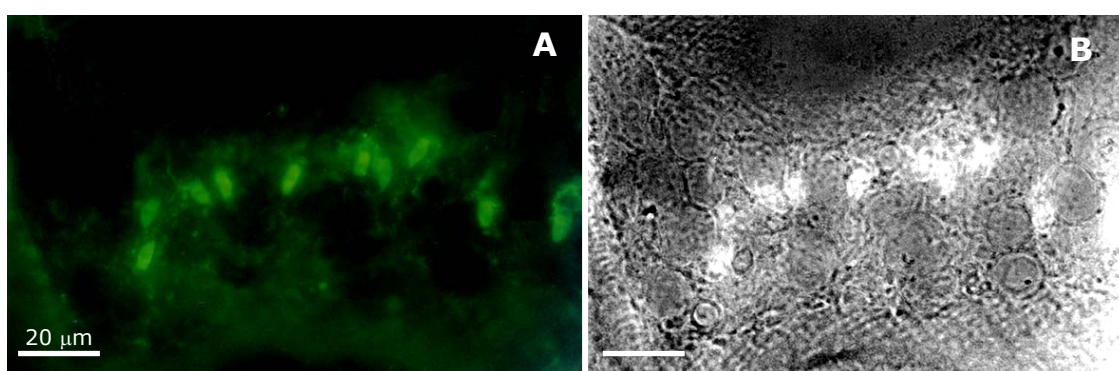


Figura 7. Tubulina- α en células flama del canal espiral. Luego de haber incubado los tejidos con el anticuerpo AcM DM1-A y el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a fluoresceína, (A) se muestra la presencia de tubulina en CF por MEF y su localización en los tejidos por DIC (B). (Imágenes a 40X).

Adicional a la inmunodetección de α -tubulina en los tejidos con los AcM y con la idea de determinar si las estructuras celulares reconocidas se trataban de células flama, se decidió utilizar el Ioduro de Propidio (IP) para marcar sus núcleos; este compuesto tiene la característica de intercalarse en el DNA y por sus características químicas emite una fluorescencia en color rojo bajo las condiciones de excitación/emisión utilizados para la fluoresceína y que contrasta con esta última por el color verde fluorescente que ella emite (Figura 8).

La combinación del marcaje fluorescente del AcM DM1-A anti-tubulina- α y del IP permitió visualizar gran parte de las células flama (Fig. 8A-D); Aún cuando el ioduro de propio marco los núcleos de otras células, que no se marcaron con el AcM DM1-A.

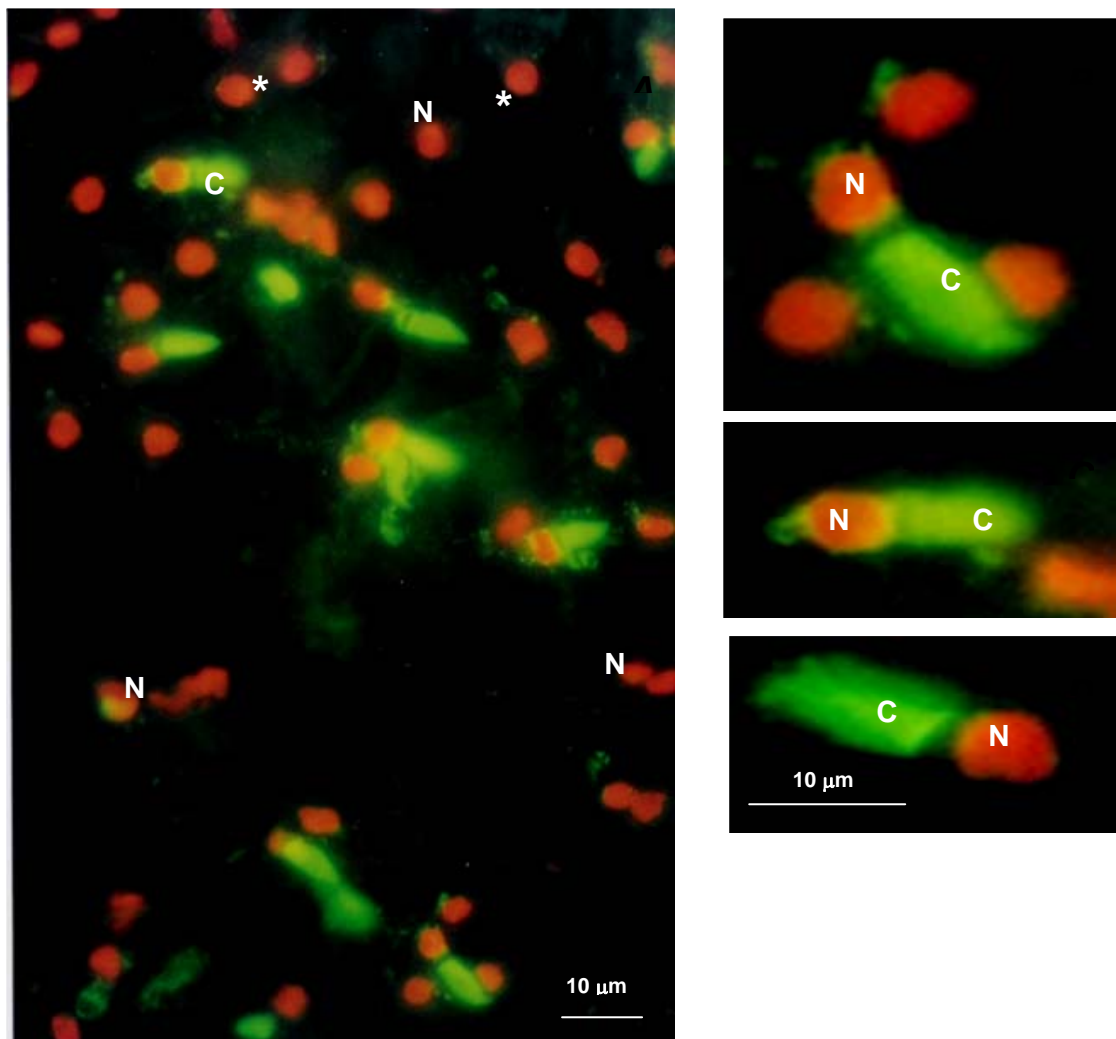


Figura 8. Localización de núcleos y tubulina- α en células flama. Se observa la marca fluorescente emitida por células flama localizadas en el canal espiral; mientras que el AcM DM1-A reaccionó con los cilios (C) (fluorescencia verde), IP lo hizo con los núcleos celulares (N) en fluorescencia roja. La imagen en A se obtuvo a 100x, mientras que las de B, C y D corresponden a aumento de las imágenes mediante el programa Adobe photoshop. Las imágenes se obtuvieron mediante MEF. Los asteriscos muestran las células con marca de tubulina en citoplasma.

Sin embargo, hubo células en las que posiblemente existió marca de tubulina en su citoplasma como se ve en la Fig. 8A en las células señaladas por un asterisco. Un acercamiento de las células flama mostró que los núcleos no están asociadas a los cilios y que existe una región de aproximadamente 1-2 μ m que no muestra marca fluorescente. Según las estimaciones por la microscopía empleada, el

promedio del diámetro de los núcleos teñidos con el IP es de 3-5 μ m, mientras que para las regiones correspondientes a los cilios, es de 10 μ m de largo y de 6 μ m de ancho en su zona más amplia. En todas las observaciones obtenidas para las células flama, las regiones de los cilios inician con una porción ancha y éstas terminan en punta (Fig. 8 B-D).

El reconocimiento mostrado por los AcM TU-02 y TAT-1, se encuentra en la PV y en células flama en canal espiral. Pero la intensidad de marca fluorescente generada por el AcM TU-02 es menor que la observada por el AcM TAT-1 (Figura 9). Según el IP, hay un menor número de células flama marcadas por el AcM TU-02 (Fig.9B) y no hay marcaje fluorescente relacionado con la α -tubulina en las células subtegumentarias (Fig. 9A) a diferencia de lo reconocido por el TAT-1, en donde no sólo parece reaccionar con α -tubulina de la PV, sino también con la de las células subtegumentarias y del tejido laxo por abajo de éstas (Fig.9C).

Debido a las semejanzas encontradas en los reconocimientos de los AcM DM1-A y TAT1 se decidió continuar los ensayos de inmunodetección de α -tubulina utilizando el anticuerpo comercial DM1-A.

De la misma forma que se hizo con el microscopio de fluorescencia se volvió a analizar el reconocimiento del AcM DM1-A por MC (Figura 10) realizándose observaciones tanto en PV (Fig. 10A-B) como en CE (Fig. 10C, D, E y F) con sus correspondientes DIC (Fig.10B, D y F) y los resultados mostraron nuevamente, como lo observado en la figura 8 y 5, que el anticuerpo AcM DM1-A y el IP marcaron a las células flama en PV y el CE. Como puede verse en la

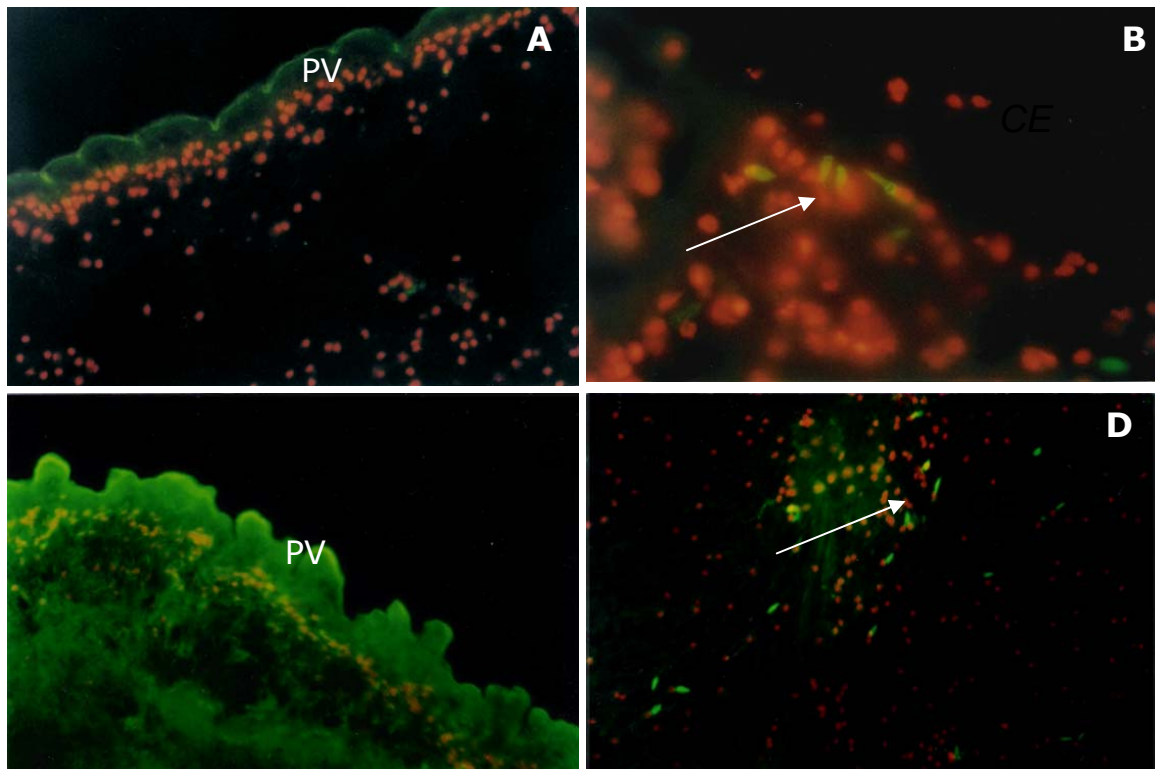


Figura 9. Comparación del reconocimiento de tubulina- α por los AcM TU-02 y TAT-1. Se observa la distribución de tubulina- α en pared vesicular (A y C) y en células flama (resaltadas por flechas) de canal espiral (B y D). Mientras en A y B se muestra el reconocimiento por el AcM TU-02, en C y D se muestra el reconocimiento del AcM TAT-1. La tubulina- α corresponde a la marca verde y los núcleos en rojo teñidos por IR. Aumentos a 40 y 100x.

imagen E de la figura 10, tanto en la marca fluorescente como en las observaciones por Nomarsky muestran a las CF aparentemente asociadas a estructuras circulares señaladas por asteriscos al centro de ellas, las cuales parecen tener un anillo concéntrico. El diámetro promedio calculado para tales estructuras circulares es de $10\mu\text{m}$ y en varias observaciones, se encontraron CF rodeando a tales estructuras como se observa en la figura 10E.

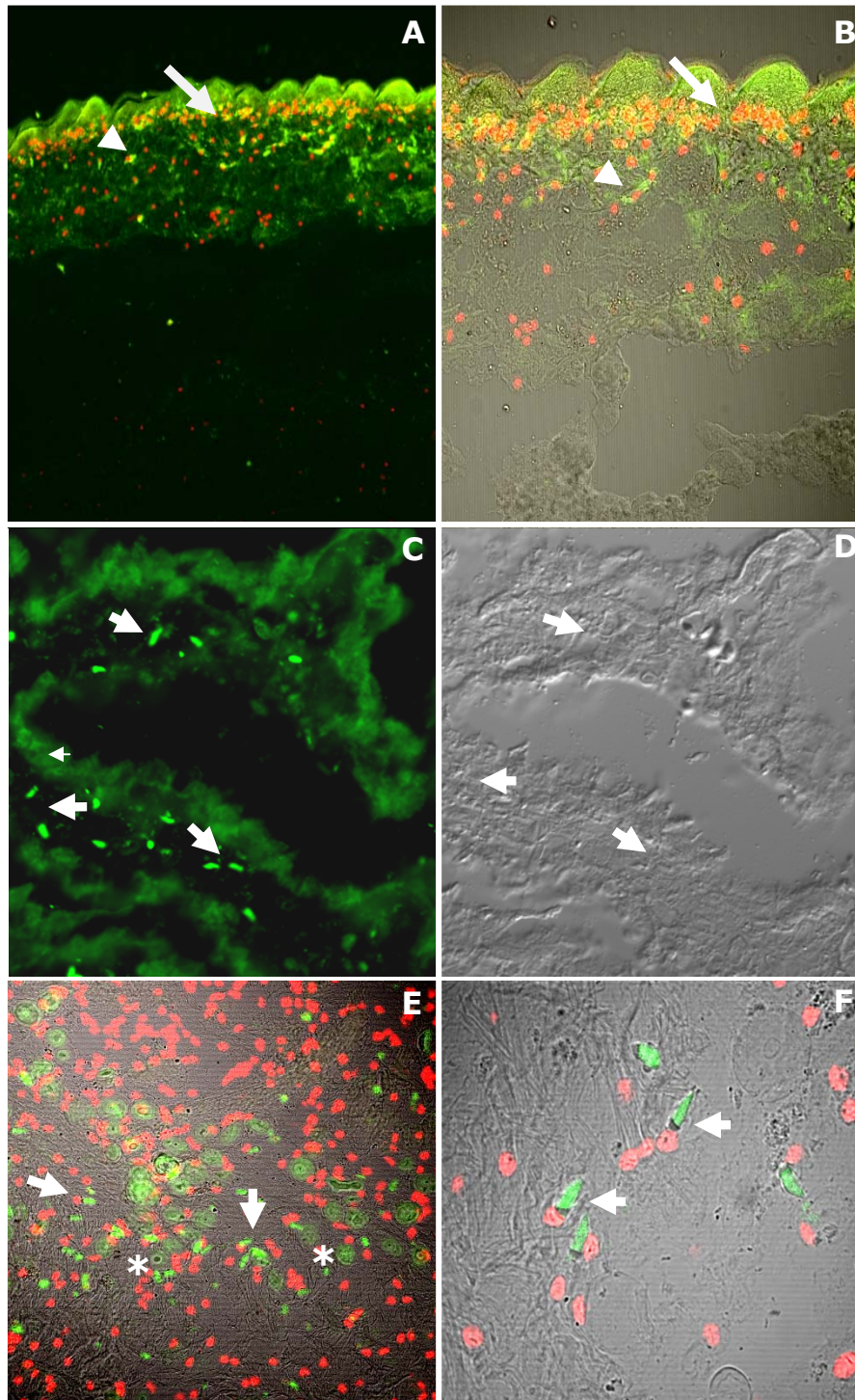


Figura 10. Distribución de tubulina- α en pared vesicular y canal espiral. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal utilizando el sistema de epifluorescencia (A, C) y Nomarsky (B, D, E, F); la tubulina- α , revelada por el AcM DM1-A, se observa la fluorescencia verde, mientras que los núcleos son teñidos en rojo por el IP. Las células flama están indicadas por cabezas de flecha, mientras que las células subtegumentarias están indicadas por flechas completas. Las estructuras circulares, observadas en el canal espiral, están indicadas con un asterisco. Las observaciones se obtuvieron a aumentos de 20x, 40x, 60x y 100x.

Tubulina- γ . Con respecto a otro miembro de la familia de tubulinas gama tubulina, se encontró que el AcM comercial anti-tubulina- γ C-20 (Santa Cruz) permitió observar su distribución en forma homogénea en la mayor parte del tejido del cisticerco de *T. solium* Fig.11A y B, mientras que en células flama se localiza en mayor intensidad en la base de los cilios y su marca disminuye en estos, como se puede observar en la imagen obtenida por microscopia confocal (figura 11). En la figura 11 localizamos a esta proteína con actina (Fig. 11F, G) y núcleos (Fig. 11C, G).

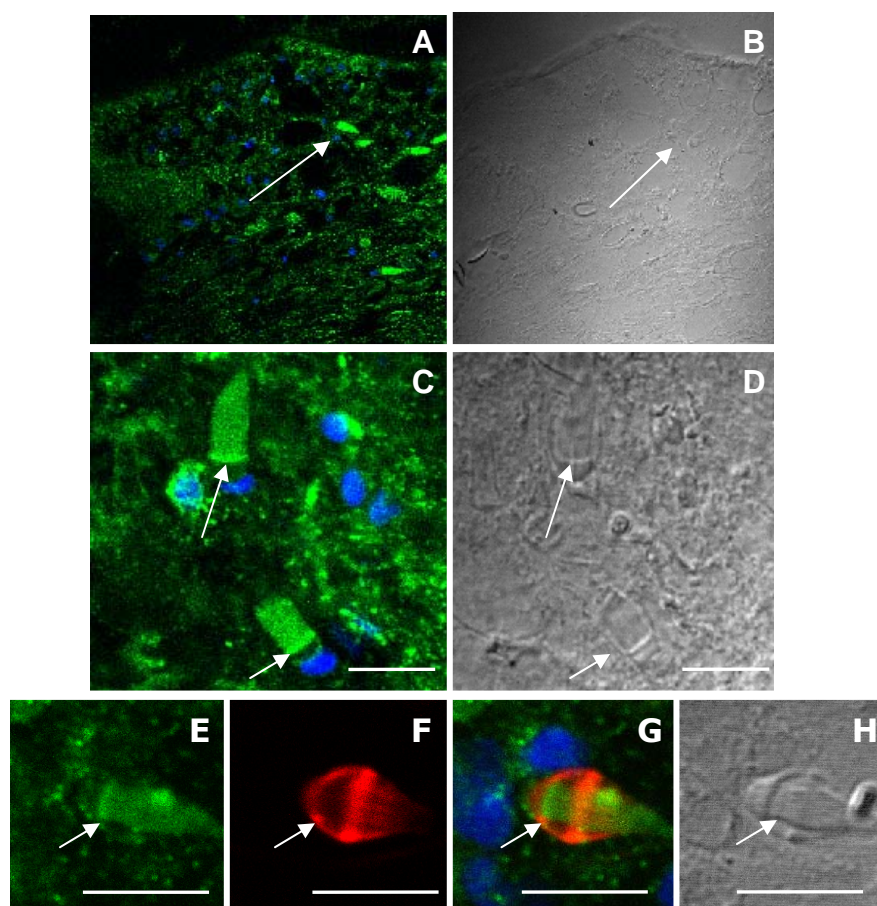


Figura 11. Distribución de tubulina- γ . Localización de tubulina- γ en parénquima y células flama en pared vesicular(A), Nomarsky (B). Células flama y su expresión de tubulina-gama en verde (C) y Nomarsky (D). Zoom de células flama (E, F, G, H) con la expresión de tubulina (verde), actina (rojo) y núcleos (azul).Las imágenes fueron obtenidas por MC con zoom 5. Las barras de las escalas corresponden a 10 μ m.

Identificación de miosina II. Con la finalidad de determinar la distribución de miosina II y α -tubulina en los cisticercos, se evaluó el anticuerpo policlonal anti-miosina II (AcPMios) de *T. solium* producido en el laboratorio (Cruz-Rivera *et al*, 2006; Kumar *et al*, 2003) y se compararon en ensayos de colocalización con el reconocimiento del AcM DM1-A. El AcPMios reaccionó tanto con fibras musculares localizadas en la PV (Fig. 12A y B) como con las que se encuentran localizadas rodeando los bordes del CE (Fig. 12C y D); mientras que el AcM DM1-A no sólo se encontró que reaccionó con el tegumento de la PV, sino que también lo hizo con células flama localizadas al nivel de la PV y el CE como se observa en la figura 12, lo cual ya se había observado cuando se hizo el marcaje con los diferentes AcM anti-tubulina utilizados en el presente trabajo de tesis (Figuras 7, 8 y 10). Las observaciones realizadas tanto con el microscopio confocal Zeiss, como por el de fluorescencia Nikon, mostraron que la localización de las células flama en el CE estaba asociada a estructuras circulares (Figura 12C, D, E y F; Figura 13A-C), las cuales ya habían sido observadas con la técnica de Nomarsky y fluorescencia mencionadas en la figura 10. Estas estructuras circulares, como se observa en las figuras 12 y 13 se encontraron marcadas fluorescentemente con los AcPMios; sin embargo, dichas estructuras también se tiñeron cuando los tejidos, tratados como controles de ensayo, se incubaron únicamente con la avidina rodaminada (Figura 13D). Con la finalidad de determinar si el marcaje encontrado era constante, se realizaron varios ensayos solo con avidina rodaminada sobre los tejidos, mostrando que sólo en ocasiones se presentaba la fluorescencia en estas estructuras.

Identificación de actina F. Como en el caso de la inmunodetección con los AcPMios, la faloidina fluoresceínada se encontró distribuida en fibras musculares de los tejidos parasitarios, tanto en el tegumento de la PV (Figura 14A y B), como en el tejido parenquimatoso del CE (Figura 14C y D); al igual que el reconocimiento de los AcM DM1-A, la faloidina reaccionó con las células flama (Figura 14E y F). Los ensayos de colocalización del reconocimiento de los AcM DM1-A con la faloidina fluoresceínada mostraron que hay reconocimiento de sitios diferentes, así como colocalización de los dos marcadores fluorescentes, en los tejidos cuando se observa a la PV y el CE; En el caso de las células flama, el reconocimiento con el anticuerpo específico y el marcador fluorescente mostraron que había colocalización de ellos en estas células, pero que las proteínas se encontraban distribuidos en distintas regiones de las células como se muestra en la figura 15B. Observaciones que se hicieron a mayores aumentos, como se muestran en la figura 16, confirmaron lo que se encontró en relación a la colocalización de la marcas fluorescentes e incluso, cuando se llevó a cabo la reconstrucción por computadora de una serie de 15 cortes en "Z", se encontró que en efecto, las proteínas reconocidas tienen una distribución diferente en las células flama (Fig. 16E y F). Reconstrucciones tridimensionales de la colocalización de la marcas fluorescentes (ver lo correspondiente a visualización) mostraron mayores detalles de la distribución de tales proteínas.

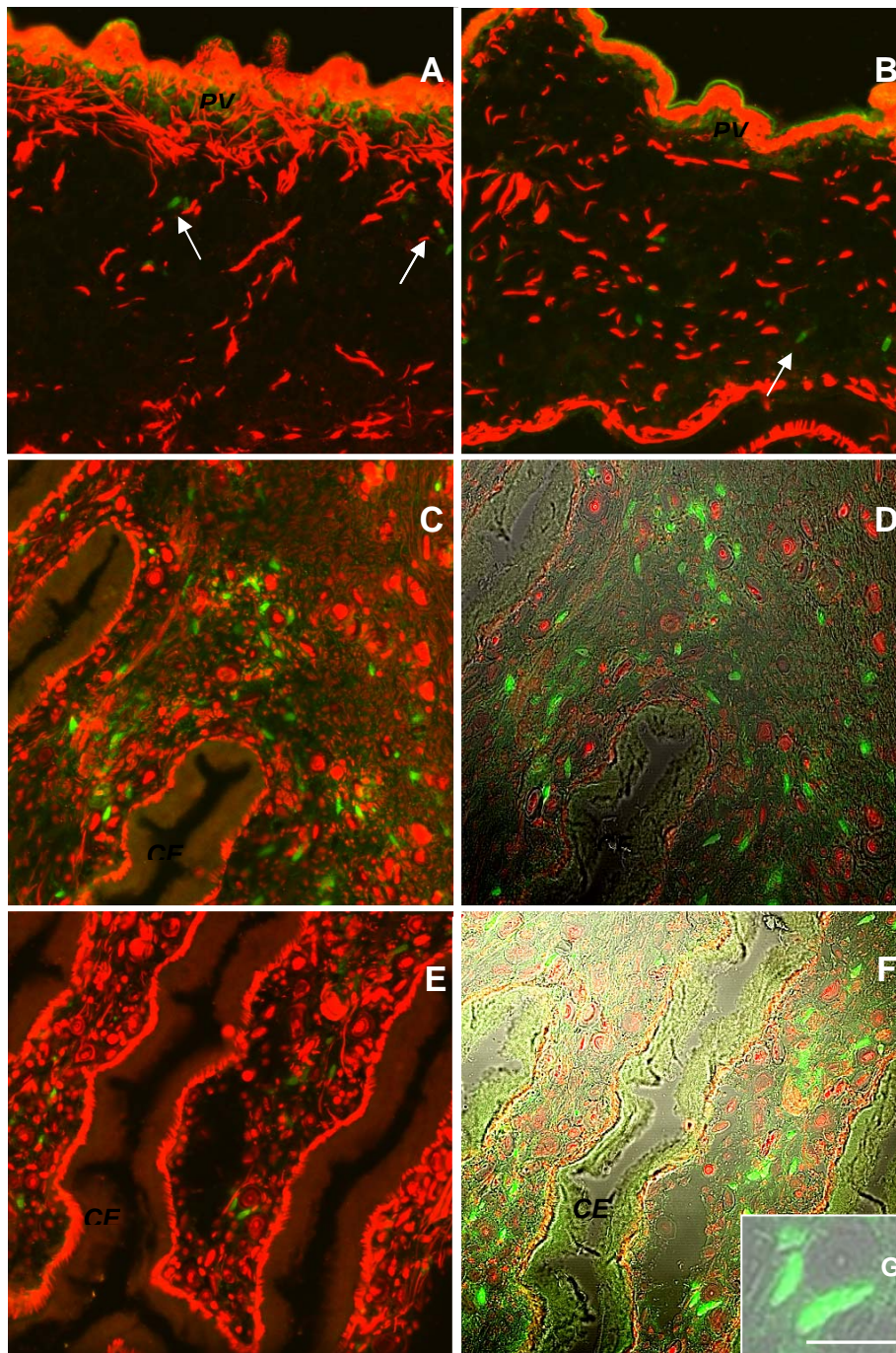


Figura 12. Localización de miosina II y tubulina- α en cisticercos. (A y B) Observaciones por MC muestra en rojo la distribución de fibras de miosina revelada por la avidina rodamina y tubulina- α en pared vesicular y células flama resaltadas por flechas. (C, D, E y F) distribución de estas dos proteínas del citoesqueleto del canal espiral. (G) Aumento realizado con Adobe photoshop en donde se observa con mayor claridad la relación de las estructuras circulares marcadas con * y células flama de canal espiral de *T. solium*. La barra corresponde a 10 μ m.

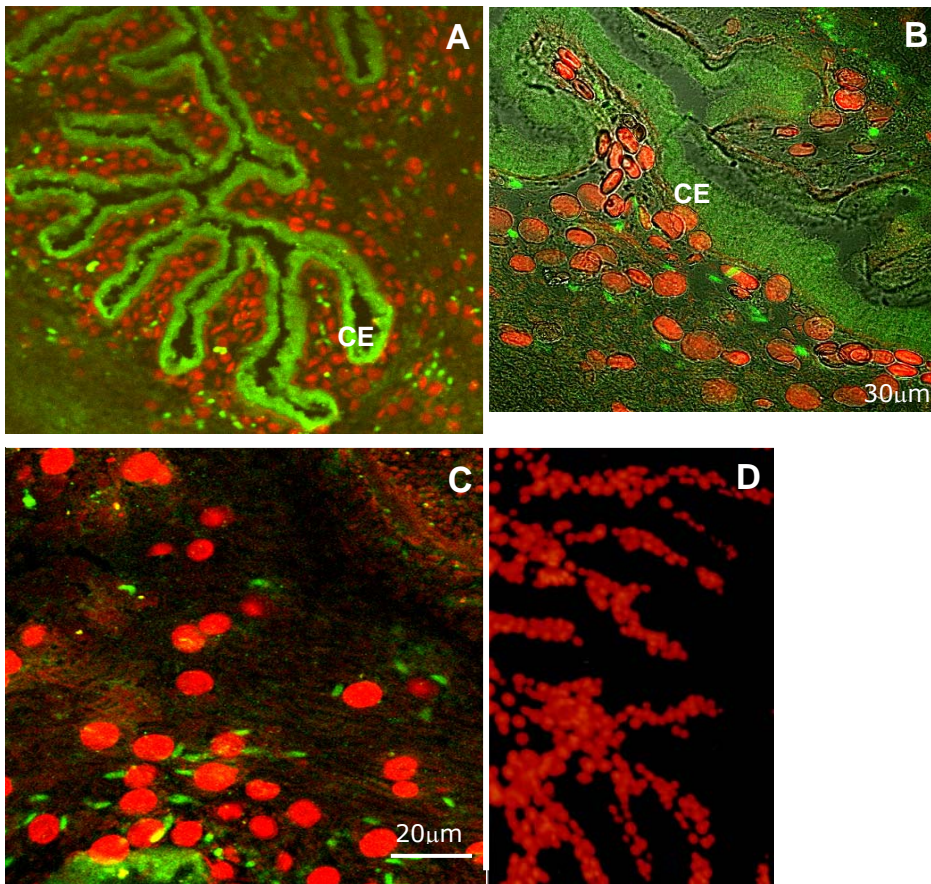


Figura 13. Miosina II revelada con avidina-rodamina. (A y B) imágenes obtenidas por el revelado con avidina rodamina 40x microscopio de fluorescencia en cortes de *T. solium*. (C) localización de fibras de miosina reveladas con avidina rodamina y células flama reveladas con fluoresceína 40x imágenes obtenidas del microscopio confocal Zeiss. (D) Unión de avidina rodamina en estructuras del sistema excretor de *T. solium*.

Con la finalidad de lograr imágenes de microscopía confocal que mostraran completas a las células flama, se hicieron ensayos de colocación de fluorescencia con faloidina rodaminada, los AcM DM1-A, DAPI para la tinción de núcleos y observaciones por Nomarsky como se muestra en la figura 17.

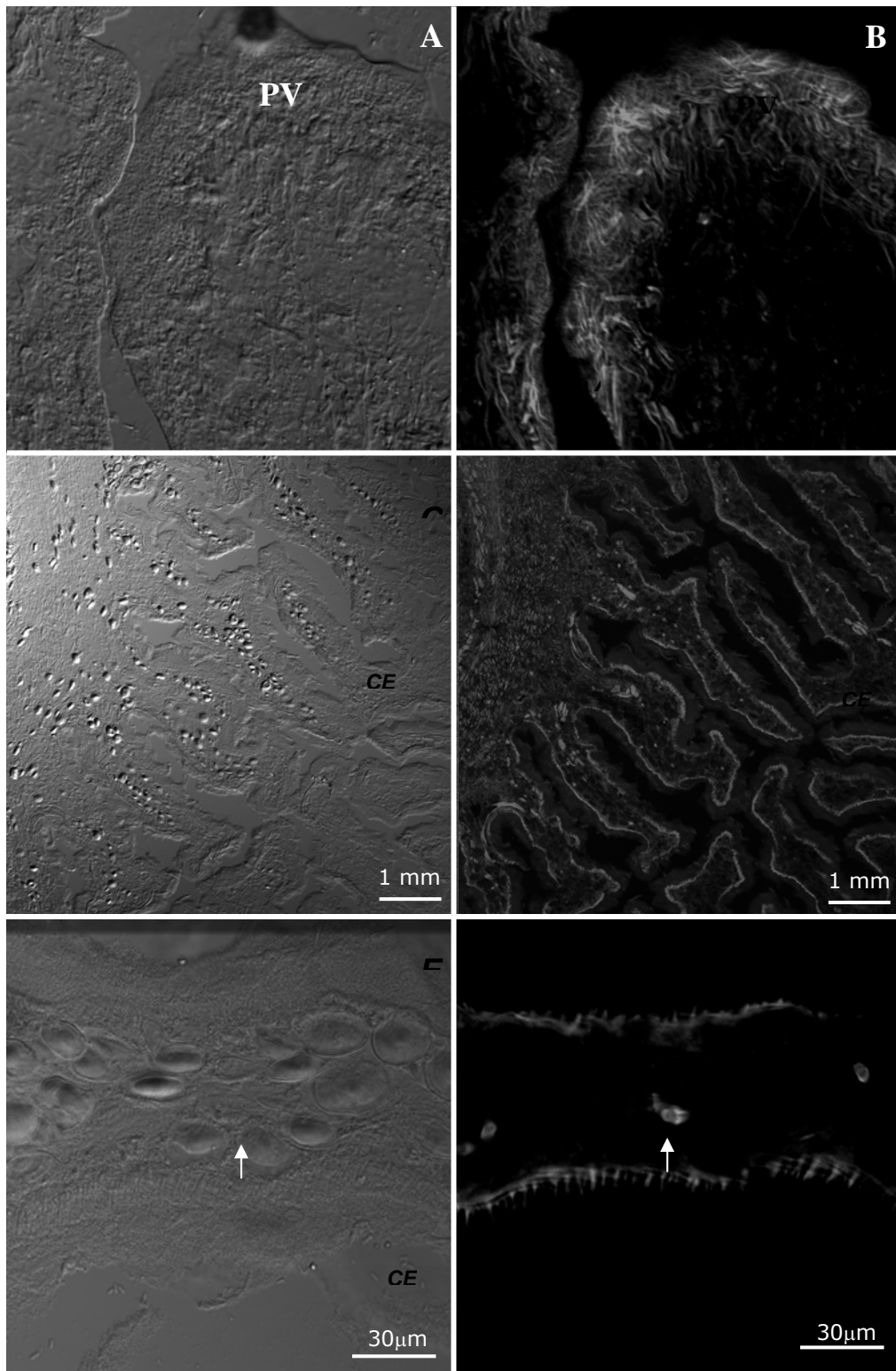


Figura 14. Actina polimerizada en cisticercos. (A) Visualización de la pared vesicular, (B) Fibras de actina filamentosas en pared vesicular Imagen del CE (C), actina-F localizada en bordes del canal espiral (D), DIC de canal espiral por MC y actina-F presente en CF (flecha blanca) de CE (F) obtenidas por MC OLYMPUS FV 1000.

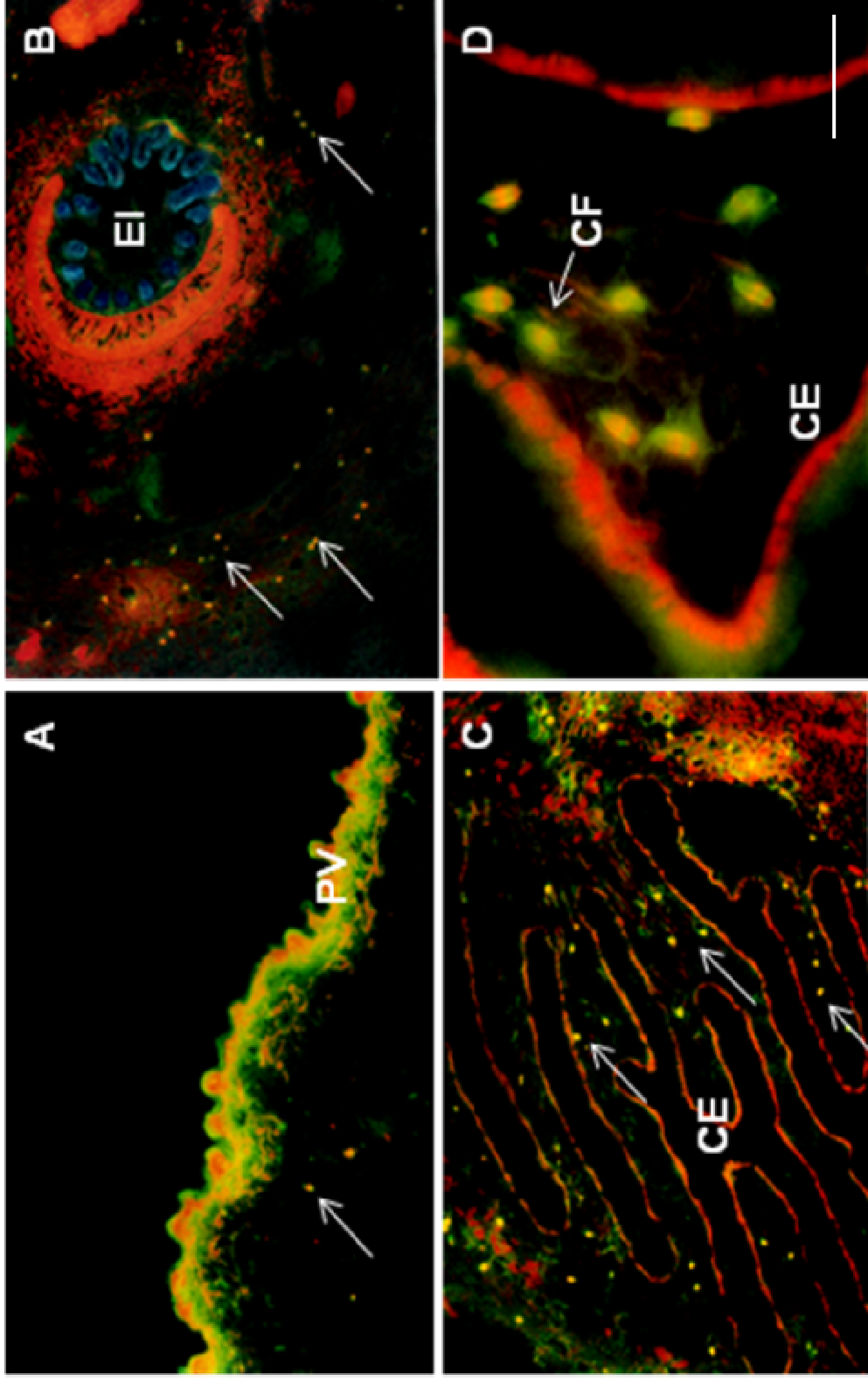


Figura 15. Colocalización de tubulina- α y actina filamentosos. Distribución de tubulina- α (verde) en y filamentosos de actina (rojo) en PV (A). Colocalización de ambas proteínas del citoesqueleto en CF de CE (B). Distribución de ambas proteínas en canal espiral, células flama señaladas con las flechas blancas, EI escólex invaginado con la corona de ganchos. Imágenes obtenidas por MEF. La barra corresponde a 20 μm .

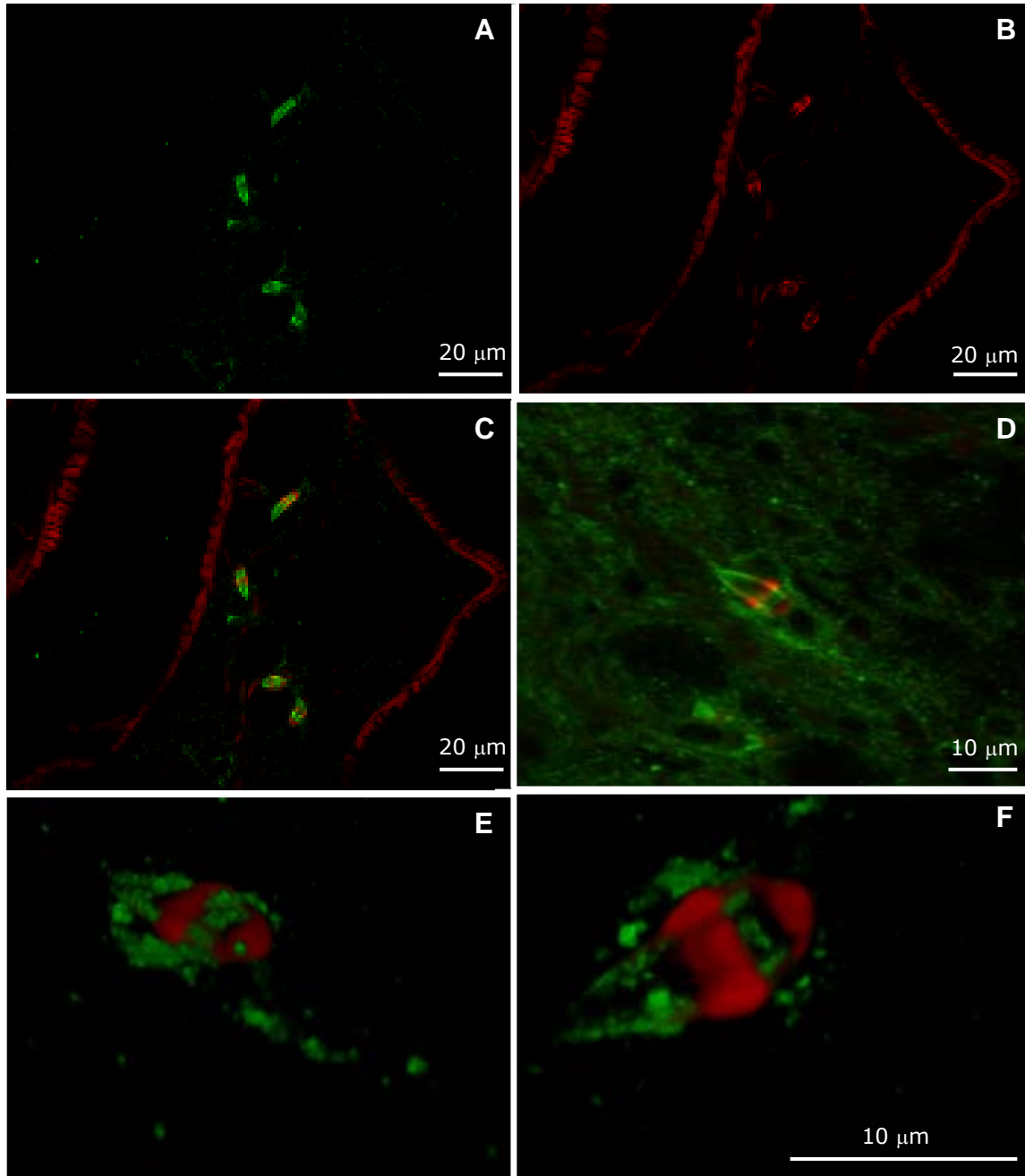


Figura 16. Distribución de actina polimerizada y tubulina- α en CF. Tubulina- α en cilios de CF (A), Actina (rojo) en bordes del canal espiral y CF (B). Colocalización de las proteínas del citoesqueleto en CF del CE (C). Aumento de célula flama con la localización de tubulina (verde) y actina (rojo) (D). Visualización tridimensional de CF obtenida por MC axioplan 2 a aumentos de 63x.

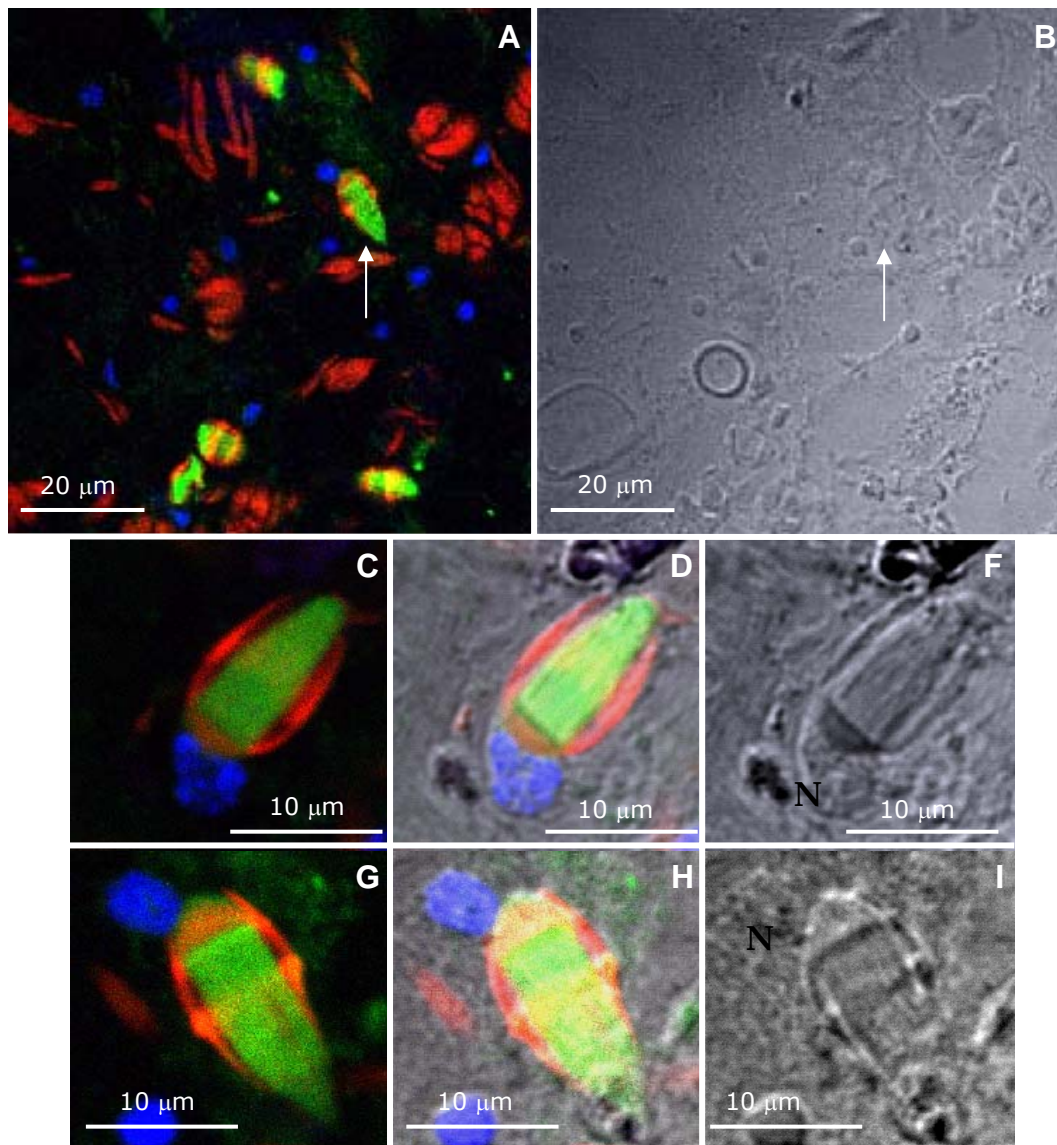


Figura 17. Localización de proteínas del citoesqueleto de CF. (A) Distribución de tubulina- α (verde), actina-F (rojo) y núcleos (azul) en CF (resaltadas con la flecha blanca) de CE. (B) e imagen del tejido por Nomarsky. (Zoom 10) localización de ambas proteínas (C, D, G, H) y Nomarsky (F e I).

Microscopia electrónica de transmisión.

Identificación de tubulina- α . El reconocimiento de tubulina- α por el AcM DM1-A, revelado con el anticuerpo secundario conjugado a oro coloidal, mostró un mayor número de partículas de oro en el penacho de cilios y en menor cantidad en el citoplasma de las CF como se puede observar en la figura 18A, mientras que en la zona electrodensa (ZE), la cual aparentemente es el sitio donde nacen los cilios no hubo oro coloidal (Fig. 18A). Una ampliación de esta región (figura 18B), muestra estructuras filamentosas finas distribuidas en forma paralela y perpendiculares al acomodo de los cilios, aparentemente sujetando a los cilios en esta zona.

Identificación de miosina II. Miosina II no muestra una localización exacta; por lo que se le encuentra tanto en el tejido que rodea a las células flama, como en las células en sí (Fig. 19A). Como se observa en la figura 19B, un acercamiento de la zona apical de la célula flama, los cilios terminan hacia un espacio que se abre, el cual tiene, aparentemente adosados a sus paredes, pequeñas vesículas. A la mitad de los cilios de la célula flama, hacia el borde, se observa dos zonas electrodensas que acompañan a los cilios hasta el ápice de las CF (figura 19A).



Figura 18. **Localización ultraestructural de tubulina- α en CF.** Los cortes se incubaron con DM1-A y se revelaron con anticuerpos acoplados a oro coloidal (20nm). (A) Vista de célula flama y distribución de tubulina- α en donde se puede observar partículas de oro en sus cilios resaltados por flechas, su núcleo (N) y envoltura nuclear (EN). (B) Aumento de la zona electrodensa de la CF obtenidas por MET a 10k

Identificación de actina. La distribución de actina por el AcM C4, en células flama, se localiza en los bordes que rodean a los cilios como se muestra en la figura 20A.

En la micrografía de la figura 20A se observa que hacia el interior de los bordes, en los que se depositaron partículas de oro coloidal, se contabilizan 80 cilios seccionados de forma transversal, los cuales están acomodados en hileras que van de 3 a 7 cilios. Cada uno de los cilios presenta en su interior un acomodo clásico de los protofilamentos, conocidos como axonemas, en distribución 9+2 en el que el 2 representa al par central de microtúbulos. De la misma forma, en la misma imagen, se observa que los axonemas están aparentemente unidos entre ellos por finas extensiones señalados por asteriscos en la figura 20A, que van de un axonema a otro. En la figura 20B, la cual corresponde al aumento de una micrografía, obtenida de un corte a nivel de la base de la célula flama, se observa que la distribución de los protofilamentos es diferente, no hay una distribución 9+2 (no hay par central de microtúbulos) y la orientación de los microtúbulos es distinta de la que se observa en la figura 20A.

VISUALIZACIÓN TRIDIMENSIONAL

Las imágenes seriadas en "z" obtenidas de diferentes microscopios confocales (Zeiss, Axioplan 2 Zeiss y Olympus) se guardaron en formato MLS y se procesaron para la reconstrucción tridimensional mediante el paquete computacional AMIRA. A través de este paquete, todos los espacios entre cada imagen en z se rellenaron y dio volumen a las imágenes (ver video 1). De esta forma la reconstrucción permitió ver la distribución de los componentes del citoesqueleto en la célula flama, y que, gracias a la animación

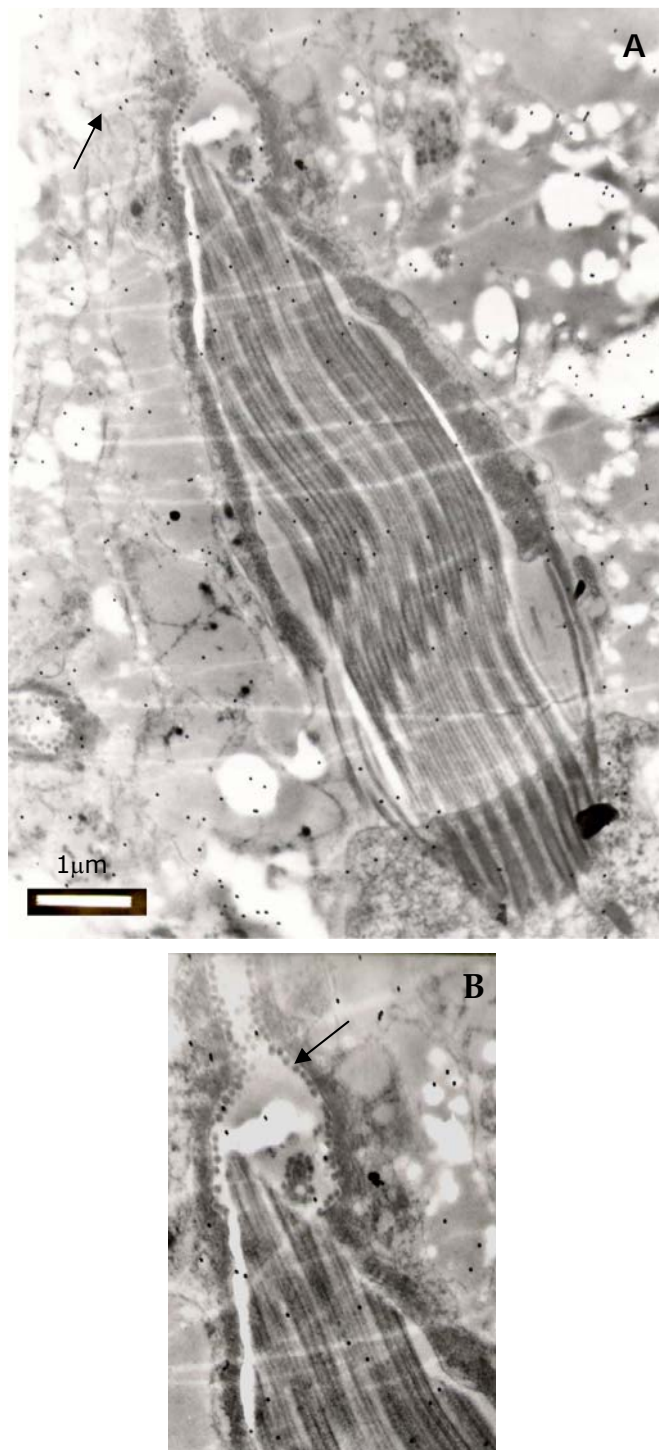


Figura 19. Localización ultraestructural de miosina II en CF. (A) Distribución de miosina II en canal espiral de cisticercos al incubarse con AcPMios y revelado por un anticuerpo acoplado a oro coloidal (20 nm). CF a nivel de CE en donde se observan sus cilios y la distribución de partículas de oro reconociendo a miosina II (distinguidas por flechas negras). (B) Aumento del túbulo del SP con pequeñas vesículas (resaltadas por flechas) y su unión con la CF, aumento realizado por adobe photoshop.

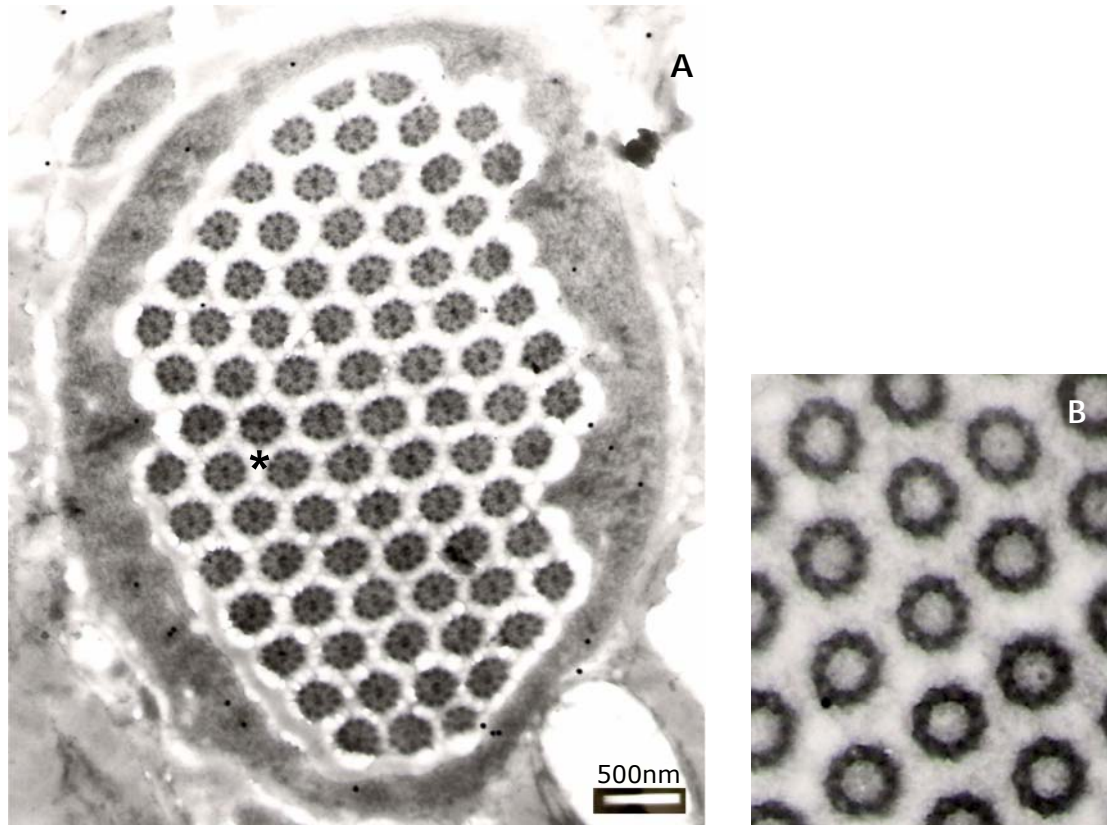


Figura 20. Localización ultraestructural de actina polimerizada y cuerpos basales en cortes transversales de CF. Imágenes obtenidas por MET y (A) muestran la distribución de actina revelada por las partículas de oro alrededor de los cilios (indicado por la flecha) que presentan la estructura típica de 9+2 a un aumento de 10k, mientras que en cortes (B) más cercanos al citoplasma de la célula el patrón cambia a 9+0 aumento realizado con el programa Adobe photoshop, (*) indica uniones entre axonemas.

generada se pudo distinguir a la actina polimerizada (marca roja) en forma de hebilla rodeando al penacho de cilios, los cuales son reconocidos por el anticuerpo anti-tubulina- α DM1-A (marca verde) (Figura 21 y video 2). Sumado a esto las imágenes fijas mostraron como las células flama se encuentran inmersas en fibras marcadas como miosina mediante los AcPMios, así como su asociación con los túbulos del sistema protonefridial que el reactivo reveló (avidina-rodamina) (Figura 22 A y B).

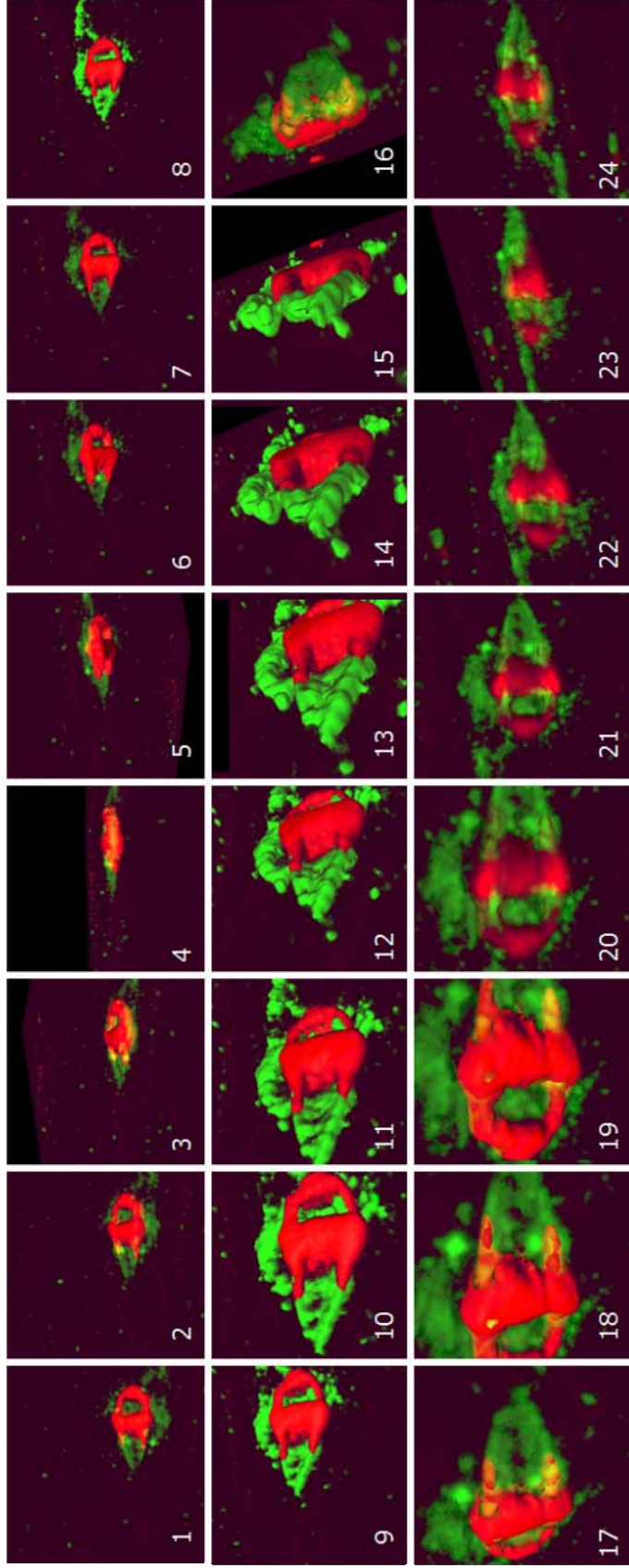


Figura 21. Proyección tridimensional de la reconstrucción digital de proteínas del citoesqueleto en células flama. Visualización 3D realizada con el programa computacional Amira, en donde se puede observar en rojo a actina polimerizada y en verde a tubulina- α estructurando a las CF del SP.

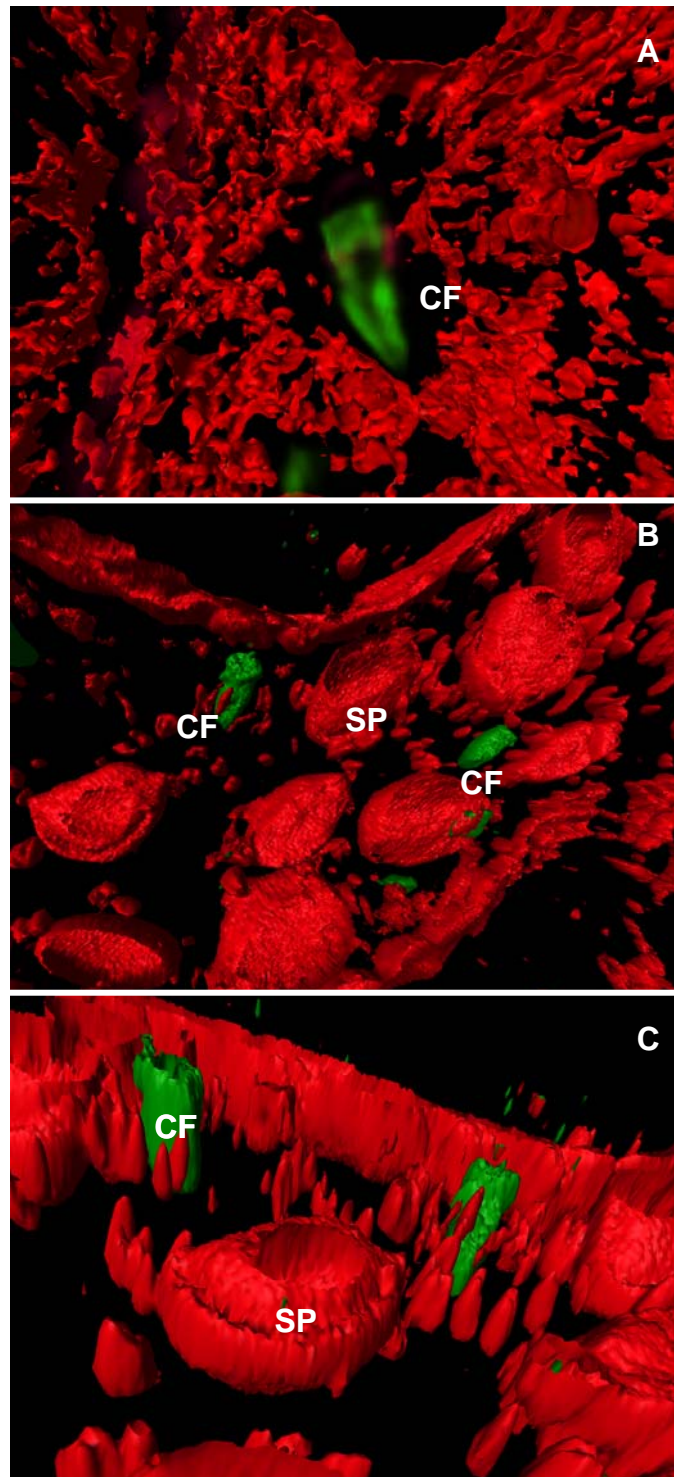


Figura 22. Reconstrucción 3D de la distribución de fibras de miosina y tubulina-alfa en células flama de canal espiral. Imágenes realizadas con el programa computacional Amira de la distribución de fibras de miosina (rojo) y tubulina- α (A). Localización de los túbulos del SP (Rojo) y CF en CE (B). Acercamiento a CF (verde) y túbulos del SP (rojo) (C).

VIII. Discusión

Los anticuerpos empleados en el presente trabajo de tesis permitieron la identificación y localización de cuatro proteínas del citoesqueleto; las tubulinas-alfa y gama, la miosina II y la actina. Por primera ocasión, para cisticercos de *T. solium*, se demuestra claramente como es la distribución de las tubulinas; mientras que, para miosina II y actina se ratifica lo que ya se había obtenido (Ambrosio *et al*, 1997; 2003).

Tubulina

Tubulina-alfa se identificó con los AcM DM1-A y TAT-1, como se muestra en la figura 5 y 9, tanto al nivel del tegumento de la PV, como en las células flama en donde hubo una mayor reacción (ver figura 5). Mientras que con el AcM TU-02 la reacción fue más débil en intensidad de fluorescencia y al igual que los dos anticuerpos mencionados anteriormente este reconoce a tubulina-alfa en pared vesicular y CF como se muestra en la figura 9A y B, lo cual se discute posteriormente. Según el mosaico de un cisticerco completo revelado fluorescentemente (Figura 5), la tubulina tiene amplia distribución en los tejidos del parásito. La presencia de tubulina- α en tegumento de *T. solium* es semejante a lo publicado para *Fasciola gigantica* en donde la inmunolocalización de tubulina, está asociada a tegumento y parénquima en diferentes fases juveniles y adulta (Tansatit *et al*. 2005). Es posible que la elevada distribución de tubulina en el tegumento de PV de los cisticercos, este asociado al intenso tráfico vesicular que se supone se efectúa en esta región de acuerdo a lo publicado para la internalización de macromoléculas en cisticercos de *T. crassiceps* (Ambrosio *et al*, 1994). Se sabe que la tubulina tiene

una participación clave para que se lleve a cabo el tráfico vesicular en las células (Alberts *et al*, 2002; Karp *et al*, 2005) y que gracias a ello las células adquieren nutrientes y sobreviven al medio en el que se encuentran. El tráfico vesicular, en el que la tubulina participa, debe también ser vital para la sobrevivencia y adaptación de los cestodos, porque de esta manera los parásitos mantienen la absorción continua y efectiva de nutrientes, así como la posible eliminación de sustancias de desecho dado que éstos parásitos carecen de sistema digestivo (McManus 1989). Según observaciones mediante MET de cisticercos de *T. crassiceps* marcados con ferritina catiónica, el tráfico vesicular puede tener dos destinos: Uno, de la superficie parasitaria hacia el fluido vesicular, o bien, de la superficie hacia las células subtegumentarias (Ambrosio *et al*. 1994). Es posible que si se llegaran a utilizar los AcM contra tubulina-alfa que fueron utilizados en la presente tesis, mediante ensayos de inmuno-oro y en conjunto con el marcaje con ferritina, se podría identificar si tubulina está realmente asociada al transporte de las microvesículas, así como en el destino que siguen. Aparentemente la tubulina-alfa no colocalizó con la red de filamentos de actina polimerizada descrita en estos parásitos (Ambrosio *et al*, 2003); sin embargo, entre ellas debe existir comunicación que favorezca el transporte de las microvesículas de un lado a otro del tegumento sincicial o hacia el interior de las células subtegumentarias, ya que se ha demostrado que la interconexión de la red de microtúbulos con la actina polimerizada facilita el transporte vesicular, el cual es dependiente de motores biológicos (Goode *et al*, 2000, Alberts *et al*, 2002), entre los que se encuentran miosina V si el transporte se lleva a cabo a través de actina y dineína o quinesinas si el transporte es por MT, dependiendo de la dirección del transporte vesicular. Posiblemente, si se llevaran a

efecto experimentos de distribución de estas proteínas motores con las proteínas filamentosas se podría establecer el grado de relación entre los MT, la actina-F y su participación en la endocitosis o exocitosis en céstodos.

Aparentemente existen dos isoformas de tubulina-alfa y esto podría estar apoyado en los diferentes reconocimientos de los anticuerpos anti-tubulina utilizados en el presente proyecto de tesis. Está ampliamente documentado que en células eucariontes, debido a modificaciones post-traduccionales existe la expresión de múltiples isotipos de tubulinas-alfa y beta (Rosebaum, 2000), lo cual es causa de tal variabilidad. Entre las modificaciones post-traduccionales conocidas están la acetilación, la palmitoilación, la fosforilación y poliglutamilación; y debido a estos tipos de modificaciones, las proteínas se expresan como isotipos con diferentes propiedades bioquímicas dado que sufren cambios en su estructura primaria (McKean 2001). Tanto para la tubulina-alfa, como la beta, las modificaciones se presentan en el carboxilo terminal, sitio donde se lleva a cabo las principales modificaciones como son la tirosinación/destirosinación (para tubulina alfa), así como la poliglutamilación y poliglicilación (para α y β). Por todo esto, cabría la posibilidad que el AcM TU-02 reconozca un isotipo de tubulina-alfa, el cual únicamente está expresado en el borde externo del tegumento y en menor cantidad en los cilios de las CF (Fig. 9A y B); esta, a diferencia del AcM DM1-A, el cual podría reconocer una isoforma distinta de tubulina-alfa que se expresa con mayor intensidad en la pared vesicular y en los cilios de las CF como se observa en las figuras 5, 6 y 7. Debido a la tinción de los núcleos con IP e inmunodetección con el AcM DM1-A, se hizo la mejor identificación de las CF; varias de estas células, se encontraron cerca del tegumento

por debajo de la membrana basal, pero la mayoría de ellas están localizadas en el parénquima del escólex invaginado. Una estimación del número de CF detectadas por el AcM DM1-A (Mosaico de la Figura 5) muestran que el 87.7 % de CF se encuentran en el CE, mientras que el restante se encuentra por debajo del tegumento, por lo que posiblemente, esta disposición esté relacionada a las funciones que desempeñaran en los diferentes estadios del parásito. Es de llamar la atención que durante los experimentos de inmunodetección de tubulina-alfa y tinción del DNA, no sólo se encontró marca del núcleo de las CF, sino también los núcleos de otras células y solo en algunos casos aislados se encontró un pobre un marcaje de tubulina-alfa en el citoplasma de estas (Fig. 8A). El no haber conseguido el marcaje de tubulina-alfa en otras células diferentes a las CF, podría deberse a que en las primeras es pobre la expresión del isotipo de tubulina-alfa que se encontró en los cilios de las segundas; esta consideración tendría que ser evaluada mediante análisis de electroforesis de doble dimensión, tal como lo recientemente logrado con tubulinas aisladas de cisticercos de *T. crassiceps* ORF (Paredes C, datos no publicados); en estos estudios se encontró que con el AcM TU-02 se identifican 15 diferentes puntos. Sin duda el tipo de análisis permitirá definir no solo el número, sino las posibles diferencias que podrían tener las isoformas de la tubulina-alfa. Sin embargo es necesario aclarar que dichos cisticercos no tienen escólex como los de de *T. solium* y, al igual que con lo obtenido en la presente tesis, el AcM TU-02 reaccionó de manera débil con el tegumento y CF, lo que podría significar que en el escólex estén presentes otras isoformas de tubulina-alfa. Otra isoforma miembro de la familia de las tubulinas es gama, la cual se encontró distribuida homogéneamente en todo el tejido del parásito como se observa en la figura 11A; en las CF esta

proteína es reconocida más intensamente por el anticuerpo comercial anti-tubulina-gama (C-20), en la base de los cilios, área que por MET corresponde a la zona de los cuerpos basales (Figura 11B) o a la zona de nucleación de los microtúbulos. Estas zonas, se sabe, presentan tubulina-gama (Karp, 2005 y Alberts *et al*, 2002) entre otras proteínas que han sido caracterizadas al aislar los cuerpos basales de cilios de *Chlamydomona reinhardtii* (Keller, 2005) y para poder confirmar su localización en los cisticercos de *T. solium* a nivel ultraestructural, los ensayos adecuados serian por inmuno-oro utilizando el mismo anticuerpo.

Miosina

En lo referente a la miosina II, se encontró que la proteína está distribuida principalmente en fibras musculares de los cisticercos, tanto al nivel de la PV como en canal espiral (figura 12) y tales observaciones correlacionaron con lo ya reportado por Ambrosio *et al*, (1996). Utilizando el mismo anticuerpo anti-miosina AcP-Mios de *T. solium*, no se encontró reacción en algún sitio de las CF a pesar de sus características policlonales; y a diferencia de lo reportado en CF de *Schistosoma mansoni*, donde se encontró miosina, tubulina y actina (Bahia *et al*, 2006). Es posible que los AcP-Mios no hayan reaccionado con miosina en tales células, ya que los tipos de miosina que este anticuerpo (AcP-Mios) reconoce no están presentes en tales células, lo cual tendría que ser confirmado con el empleo de distintos anticuerpos anti-miosina.

De los hallazgos interesantes, al utilizar los AcP Mios fue la visualización de los ductos protonefridiales. Como se recordara, estas estructuras fueron descritas como estructuras circulares asociadas a las CF, después de las observaciones por DIC en la microscopía

confocal (Figura 10E). Lo que llamó más la atención fue el hecho de encontrar que tales estructuras eran reveladas luego de realizar la incubación con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado a biotina y revelado por avidina rodaminada (Figuras 13A-D). Sin embargo, cuando se ejecutaron ensayos de marcaje únicamente con avidina rodaminada, se encontró que la marca fluorescente sólo se presentaba en estos ductos lo que nos llevo a pensar que, estas estructuras podrían contener biotina que reaccionó específicamente con la avidina rodaminada utilizada en los ensayos. Según la literatura, la biotina es una vitamina encontrada en riñones e hígado de mamíferos (Polak *et al*, 2003) y se ha demostrado como una sustancia endógena en tejidos de diferentes estadios de desarrollo de *S. mansoni* (Chávez *et al*, 1997) y dado que los ténidos, y en general los céstodos, tienen un sistema protonefridial considerado como sistema de excreción (Barnes *et al*, 1994; MacManus *et al*, 1983), cabría la posibilidad de que la biotina sea también una sustancia asociada a estos sistemas, por lo que no siempre se encontró en los ensayos. En este sentido sería interesante, como en el caso de *S. mansoni* (Chávez *et al*, 1997) efectuar ensayos bioquímicos en extractos de tejidos parasitarios, así como observaciones por MET en ensayos con avidina conjugada a oro coloidal para determinar su localización a nivel ultraestructural. Es de llamar la atención que en las observaciones microscópicas del marcaje de los ductos y de las células flama, aun cuando fueron numerosas y en diferentes tejidos, no se encontró la presencia de corpúsculos calcáreos en los ductos como ha sido descrito por Vargas-Parada 1999 y Menlovic *et al*, 2006. La evidencia por su marcaje fluorescente de la asociación de células flama con los ductos protonefridiales es una primera aportación a la forma en que se estructura el sistema protonefridial en los céstodos

(Figuras 10 E y 13A-D) la cual solo se ha descrito en *Schistosoma mansoni*.

Actina F

La identificación de actina polimerizada, mediante la faloidina rodaminada, mostró que esta proteína se encuentra asociada a las fibras musculares de los parásitos tanto en PV como en bordes del CE (Figuras 14A-D) tal y como ya había sido publicado (Ambrosio et al. 1997). En las células flama se encontró que esta proteína se encuentra presente al igual que lo reportado en el cestodo *Diphyllobothrium dendriticum* (Wahlberg, 1998) y al tremátodo *S. mansoni* (Bahia et al, 2006). Para *D. dendriticum*, se ha descrito que la actina envuelve en forma de anillo alguna región de las células flama; mientras que para *S. mansoni* se describió más ampliamente como la actina se estructura en tales células; Según lo publicado actina F está rodeando a la región de los cilios de las CF dando la impresión de un "barril sin fondo" en donde en su interior se aloja la tubulina. Mientras que en la presente tesis: se encontró que la distribución de actina F es diferente a lo establecido para *S. mansoni*, pero no así para la tubulina-alfa; mientras que la tubulina está presente en los cilios de las células flama, la actina en CF de *T. solium* forma una especie de estructura en "hebilla" situada por debajo del núcleo (Fig. 16) y que rodea a una región en la que se detectó tubulina gama sitio en donde se anclan los cilios (ver esquema propuesto Fig.23). Según las imágenes de localización de faloidina rodaminada sobre el tejido por DIC, la estructura en forma de "hebilla" está asociada a una zona protuberante que se proyecta hacia afuera de las células flama (figura 17C-I). Es posible que las diferencias encontradas para la distribución de la actina F en los

cisticercos, con las de los otros dos organismos mencionados, estén relacionadas a una estructuración de proteínas del citoesqueleto asociada a las diferencias de *Clase*; por ejemplo, mientras que la estructuración encontrada en las células flama de *S. mansoni* es diferente de la encontrada en cisticercos de *T. solium*, observamos mayor similitud entre *T. solium* con lo encontrado para *D. dendriticum*, los cuales pertenecen a la misma *Clase*.

Microscopia Electrónica de Transmisión

En las observaciones por MET, en donde se enfocó la atención hacia células flama, se encontró que la tubulina alfa se concentra en los cilios (Figura 18). Estos, según el nivel del corte en el que se les observe, pueden presentar en su interior la estructura típica de los microtúbulos, los cuales contienen a los protofilamentos constituidos por las tubulinas alfa y beta. Según la observación de micrografías con cortes transversales de los cilios de las CF en cisticercos de *T. solium* se encontraron en un intervalo de 80-108 (Figura 20A), mientras que en *Trilocularia acanthiaevulgaris*, otro céstodo, es de 50-70 cilios (McCullough *et al*, 1991). Esta diferencia en el número de cilios aun no podemos explicarlo, sin embargo es una característica importante en la taxonomía. Con respecto a la expresión de actina en CF parece que se encuentra concentrada en lo que es la parte del anillo, el cual rodea los cilios según las visualizaciones en 3D y ello podría asociarse a que su distribución tiene la función de mantener la alineación de cilios, anclaje al citoplasma celular y posiblemente unión entre las CF y los túbulos de excreción según lo observado por MET, aunque hasta el momento no existe evidencia clara con respecto a esto. La distribución de miosina por MET aunque no fue muy clara en los presentes estudios, el uso de mas anticuerpos anti-miosinas en el futuro podría revelarnos su posible localización y

asociación con otras proteínas, como podría ser con la actina, ya que actualmente se conoce que tal interacción genera movimientos de contracción como lo descrito durante la división celular o contracción muscular, lo cual podría definir mejor su función dentro de las CF (Alberts *et al*, 2002).

Reconstrucción Tridimensional

La reconstrucción en 3D de las imágenes en Z de microscopía confocal, es una estrategia innovadora que junto con técnicas clásicas habitualmente utilizadas en el trabajo de investigación hacen de nuestros resultados una forma de visualizar más claramente lo encontrado. Por lo que el uso de esta tecnología en la reconstrucción de la distribución de proteínas del citoesqueleto en CF permitieron determinar su estructuración en este tipo celular, mostrando la forma en que el anillo de actina rodea los cilios que contienen tubulina y como se da su disposición en la base de los mismos. Según las imágenes reconstruidas, entre el anillo y la base formada por actina se observa un espacio, el cual podría funcionar como sitio de entrada de sustancias, las cuales después de ser filtradas serían expulsadas por el movimiento de los cilios hacia los túbulos protonefridiales, además de determinar la disposición de las CF en el tejido del cisticerco de *T. solium* (Figura 22) en donde se puede observar que se encuentran inmersas entre fibras de miosina, las cuales posiblemente les sirvan como apoyo dentro del espacio que ocupan en el tejido.

Propuesta de estructuración de proteínas del citoesqueleto y su posible función en las CF

Todos los resultados obtenidos a través de las observaciones por MC, MET, así como las reconstrucciones tridimensionales nos permitieron proponer como las proteínas del citoesqueleto, se encuentran estructurando a las CF y como estas podrían estar desempeñando un papel importante en su función dentro del sistema protonefridial de *T. solium* (Fig. 23). En el video número 3 o en la Fig. 25, se muestra la animación de la propuesta de la distribución de las proteínas del citoesqueleto estructurando a las CF y cual es su posible papel en la función de este tipo celular. 1) Se observa la distribución de actina filamentosa en rojo y en verde tubulina- α en la CF, además de mostrarse su unión al túbulo de excreción, se puede distinguir en azul las partículas que van a ser eliminadas a través del SP. 2) Se puede ver a las partículas dirigiéndose hacia el orificio formado por la estructura en forma de hebilla constituida por actina-F; mientras en el interior del citoplasma se puede observar la formación de vesículas. 3) las partículas en el interior de la estructura en forma de hebilla son expulsadas por el movimiento de contracción realizado por la estructura mencionada anteriormente y dirigidas por el movimiento ciliar hacia la luz túbulo de excreción 4 y 5, con respecto a las vesículas que se puede observar en el citoplasma de la célula por observaciones realizadas por MET (Fig. 24) es posible que la dirección que toman estas vesículas sea hacia la base de los cilios en donde al parecer liberan su contenido para después ser eliminado a través del SP 3, 4 y 5 llevándose a cabo con esto la eliminación selectiva por este medio.

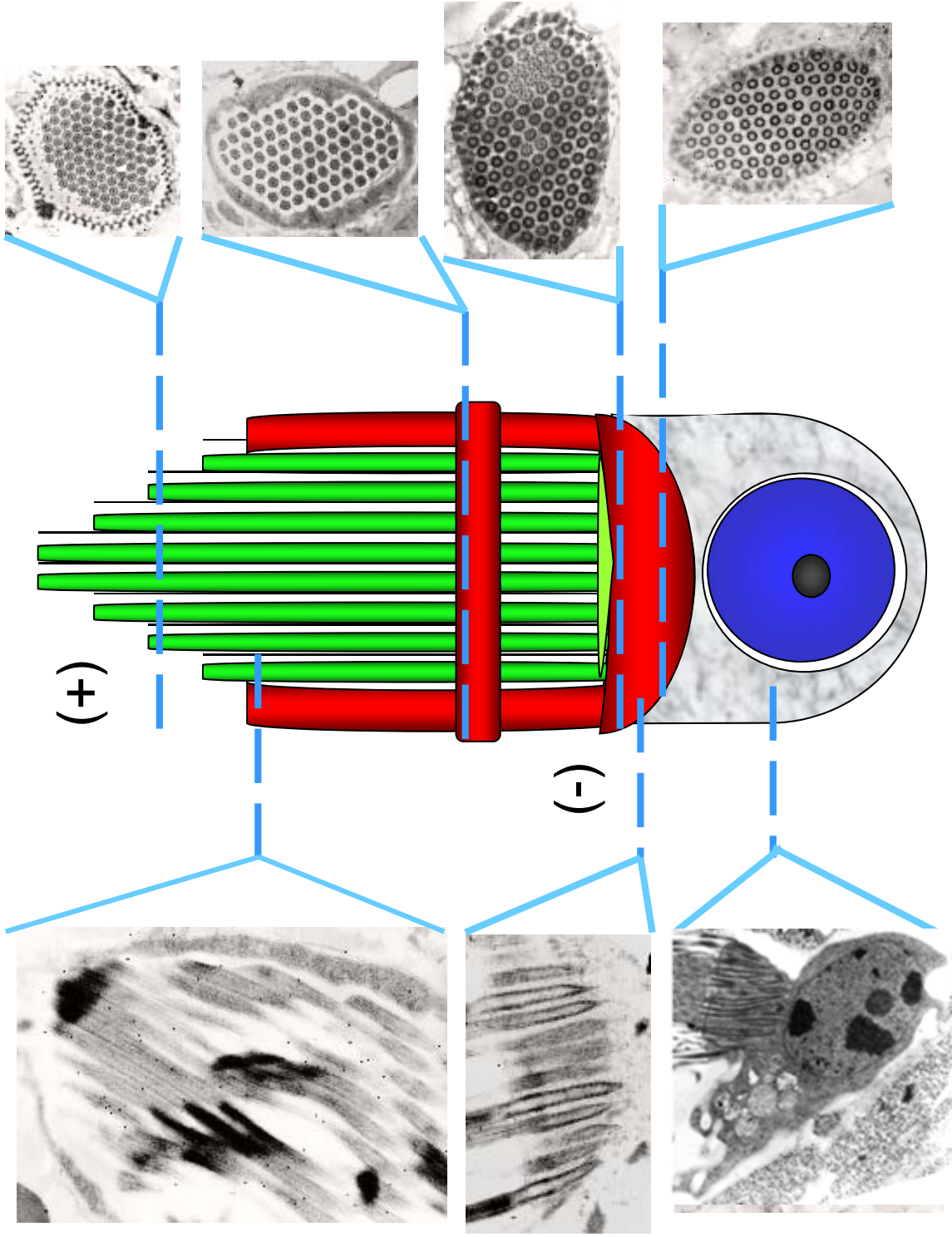


Figura 23. Distribución esquemática componentes de una célula flama. El esquema se construyó en base a las observaciones obtenidas durante la colocación de proteínas del citoesqueleto por MC (figuras 16 y 17), MET (Figuras 18-20). El núcleo representado en azul, corresponde al marcaje de DAPI, mientras que el color rojo corresponde a la actina en forma de hebilla, la cual sujeta a los microtubulos en verde, los cuales están orientados hacia la región + de los MT.



Figura 24. Ultraestructura de célula flama. En la imagen se observa el núcleo (N) con su envoltura nuclear (EN), cuerpo basales (CB), cilios (C) y una gran cantidad de vesículas (V) en el citoplasma de este tipo de células. Las vesículas aparentemente se forman en el espacio intersticial (puntas de flecha), viajan en el citoplasma de la CF y depositan su contenido hacia la zona de los CB.

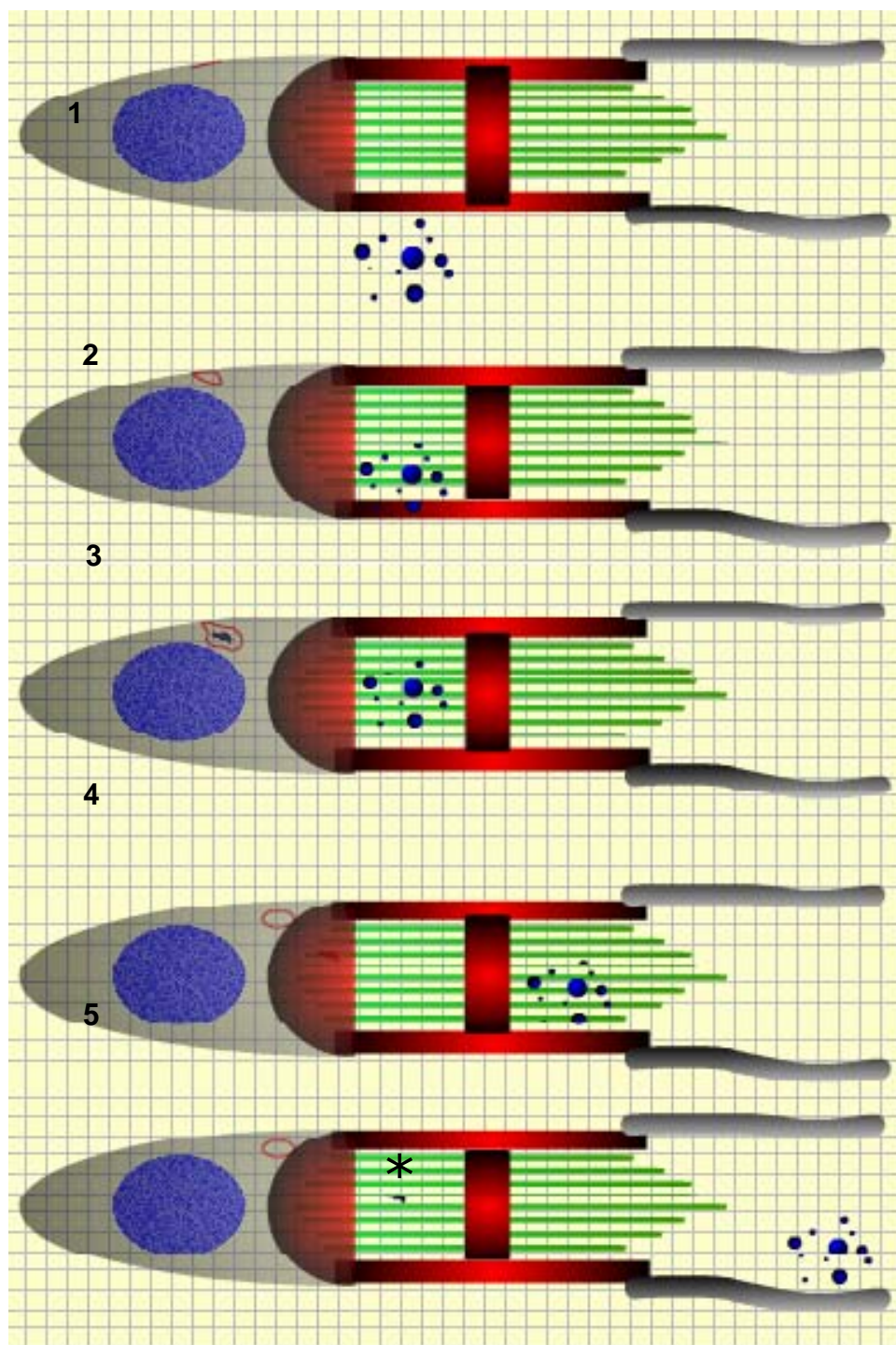


Figura 25. Representación esquemática de la posible dinámica de captura y excreción de sustancias por parte de CF. En 1, 2 y 3 se puede observar la entrada de las partículas de desecho (esferas azules) a las CF por la estructura en forma de hebilla (en rojo), así como la formación de vesículas (círculo en rojo). En 4 y 5 se ve como las partículas son dirigidas hacia el túbulo, además de la liberación del contenido de las vesículas para después ser eliminado (resaltado por *).

IX. Conclusiones

- El anticuerpo DM1-A anti-tubulina- α nos permitió determinar por medio de técnicas de microscopía de fluorescencia, por primera vez la distribución de esta proteína en el tejido de cisticercos de *T. solium*.
- El uso de anticuerpos anti-tubulina- α (DM1-A, TAT-1 y TU-02) mostro la expresión y distribución de posibles isoformas de esta proteína presentes en PV y CF en el estadio larvario de *T. solium*.
- La localización de proteínas como la actina F y tubulina- α y γ por diferentes técnicas microscópicas resultó en la demostración de la presencia de ambas proteínas en CF de *T. solium*.
- Con las reconstrucciones 3D se determinó la posible estructuración de las proteínas del citoesqueleto como base de la arquitectura de las CF del SP en los cisticercos.
- El resultado del uso de Microscopía de fluorescencia, confocal y electrónica de transmisión, así como las reconstrucciones tridimensionales han permitido proponer el esquema de estructuración y posible función de las proteínas del citoesqueleto en células flama de *T. solium*.

X. Perspectivas

La demostración de como las proteínas del citoesqueleto son constitutivas de las células flama, sumado a que sea reportado que son blanco de fármacos, podría tener relevancia para el desarrollo de sustancias con potencial cestocida o bien ser utilizadas, como modelos celulares para la definición de sitios blanco de los fármacos en uso actual. Por lo que hay varios aspectos a estudiar que permitirían profundizar y evaluar lo propuesto: 1. Aislamiento y purificación. 2. la Identificación y caracterización completa de las proteínas del citoesqueleto (tales como dineínas, cinesinas, tubulinas, actinas y todas sus posibles isoformas, así como proteínas asociadas) mediante análisis de tipo proteómico. 3. Evaluación del efecto de fármacos o sustancias que actúen sobre componentes proteicos de las células flama mediante ensayos *in vitro*, mediante análisis proteómicos. 4. Determinación, mediante videofilmación, del efecto de las sustancias cestocidas en la funcionalidad de las células flama.

XI. Referencias

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter. (2002). *Molecular Biology of the cell*. Garland Science. New York. 907-982.
- Ambrosio J., Landa A., Merchant M.T. and Laclette J. (1994): Protein Uptake by Cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Archives of Medical Research*. 25 (3): 325-330.
- Ambrosio J., Reynoso D. O., Hernández S. H., Correa P. D., González M. L., Cruz R. M. and Flisser A. (2003): Actin expression in *Taenia solium* cysticerci (cestoda): tisular distribution and detection of isoforms. *Cell Biology International*. 27. 727-733.
- Ambrosio J., Cruz R. M., Allan J., Morán E., Ersfeld K., and Flisser A. (1997): Identification and partial characterization of a myosin-like protein from cysticerci and adult of *Taenia solium* using a monoclonal antibody. *Parasitology*. 114, 545-553.
- Cruz-Rivera M., Reyes T. A., Reynoso D. O. Flisser A. and Ambrosio J. R. (2006): Comparison of biochemical and immunochemical properties of myosin II in taeniid parasites. *Cell Biology International*. 30:598-602.
- Barnes D. R. (1994). *Invertebrates Zoology*. Interamericana. 58-62.
- Bahia D. Avelar L. G. A., Vigorosi F., Cioli D., Oliveira C. and Mortara R. A. (2006): The distribution of motor proteins in the muscles and flame cells of the *Schistosoma mansoni* miracidium and primary sporocyst. *Parasitology*. 1-9.
- Brusca C.R. (2003). *Invertebrates*. Sinauer Associates. Massachussetts. 285-313.
- Dayan A. D. (2003): Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica* 86:141-159.
- Flisser A., Madrazo I. y Delgado H. (1997). *Cisticercosis Humana*. Manual moderno. 5-17.
- Flisser A., Rodríguez C. R. and Lee W. A. (2006): Control of taeniosis/cysticecrosis complex: Future developments. *Veterinary Parasitology*. 139:283-292.
- Garcia H. H., Gonzalez E. A., Evans W. C. and Gilman H. R. (2003). *Taenia solium cysticercosis*. *Lancet*. 362: 547-556.

- García H. H., Evans W. C., Nash E. T., Takayanagui M. O., White C. A., Botero D., Rajshekhar V., Tsang W. C., Schantz M. P., Allan C. J., Flisser A., Correa D., Sarti E, Friedland SJ, Martinez S, Gonzalez EA, Gilman H. R., and Del Brutto H. O. *et al.* (2002): Current Consensus Guidelines for Treatment of Neurocysticercosis. *American Society for Microbiology*. p. 747–756.
- González M. L., Cruz R. M., Reynoso D. O., Retamal C., Flisser A. and Ambrosio J. (2004): Muscular myosin isoforms of *Taenia solium* (cestoda). *Cell Biology International*. 28:885-894.
- Goode B., Drubin D. and Barnes G. (2000): Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*. 12:63–71.
- García D. C., Correa D., Rabiela M. T., Flisser A. (1991): Praziquantel treatment of muscle *Taenia solium* cysticercosis. *Parasitology Research*. 77: 691-696.
- Harrison W. F. and Bogith J.B. (1991). Microscopic Anatomy of Invertebrates. Wiley-Liss. Nueva York. 211-283.
- Karp G. (2005). Biología Celular y Molecular. McGraw-hill interamericana. Colombia. 357-423.
- Keller C. L., Romijn P. E., Marshall F. W. (2005): Proteomic analysis of isolated *Chlamydomonas* centrioles reveals orthologs of ciliary-disease genes. *Current Biology*. 15:1090-1098.
- Lamothe A. R. (1983). Introducción a la biología de los platelmintos. AGT EDITOR.México. 125-141.
- Larralde C. y S.de Aluja A. (2006). Cisticercosis. Guía para profesionales de la salud. Cap. I. Biología del parásito. Fondo de Cultura Económica. Mexico DF. 19-38.
- Lacey E. (1988): The role of the cytskeletal protein, tubulin, in the mode of de action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal Parasitology*. 18 (7):885-936.
- Lightowlers M. (1999): Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. *International Journal for Parasitology* 29 (6):811-817.
- Malerva G. L., Cruz-Rivera M., Reynoso-Ducoing O., Retamal C., Flisser A. and Ambrosio J. (2004). Muscular myosin isoforms of *Taenia soilum* (cestoda). *Cell Biology International*. 28:885-894.
- McManus D. P. and Smyth J. D. (1989). The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge. Great Britain. 5-35.

- Mckean G. P, Vaughan S. and Gull K. (2001): The extended tubulina superfamily. *Journal of Cell Sciences*. 114,2723-2733.
- McCullough J. S and Fairweather I. (1991): Ultrastructure of the excretory system of *Trilocularia acanthiaevulgaris* (Cestoda, Traphyllidea). *Parasitol Res*. 77 (2):157-160.
- Mendlovic F., Carrillo-Farga J., Torres J., Laclette J. and Flisser A. (2006): Differential expression of calreticulin in developmental stages of *Taenia solium*. *Journal Parasitol*. 92 (4):789-795.
- Moreno J. M, Casado N., Urrea P. A. and Rodríguez C. F. (2001): Evidence of tubulin in the scolex gland ducts of *Gymnorhynchus gigas* plerocercoid (cestoda: Trypanorhyncha). *Folia Parasitologica*. 48: 163-164.
- Palomares F., Palencia G., Ambrosio J. R, Ortiz A., and Jung-Cook H. (2006): Evaluation of the efficacy of the albenzazole sulphoxide and praziquantel combination on *Taenia crassiceps*: in vitro studies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.57 (3):482-8.
- Palomares F., Piliado J., Palencia G., Ortiz A., and Jung-Cook H. (2007): Efficacy of nitazoxanide and tizoxanide/albendazole sulphoxide combination against *Taenia crassiceps* cysts. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 59:212-218.
- Peniche-Cardena A., Dominguez-Alpizar J. L., Sima-Alvarez R., Argaez-Rodriguez F., Fraser A., Craig P. S., Rodriguez-Canul R. 2002. Chemotherapy of porcine cysticercosis with albendazole sulphoxide. *Veterinary Parasitology*. 108(1):63-73.
- Polak J. M. and Van Noorden. (2003). Introduction to immunocytochemistry. Bios Scientific. Oxford. United Kingdom. 76-79.
- Rosenbaum J. (2000): Cytoskeleton: Functions for tubulin modifications at last. *Current Biology*, 10:R801–R803.
- Rubino S, Fiori P. L, Lubino G. (1983): The cytoskeleton of hydatid cyst cultured cells and its sensitivity to inhibitors. *European Journal of Cell Biology*.30: 182-190.
- Slais J. (1970).The morphology and pathogenicity of the bladder worms. Academia. Czechoslovakia. 7-135.
- Schiaffino S., Reggiani C. (1996): Molecular diversity of myofibrillar proteins: Genes regulation and functional significance. *Physiol Review*. 76 (2): 371.
- Sciutto E., Fragoso G., Fleury A., Laclette J. P., Sotelo J., Alujad, Vargas L., Larralde C. (2000): *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing

countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes and Infection*. 2:1875-1890.

- Tansatit T., Sahaphong, Riengrojpitak S., Viyanant V. and Sobhon P. (2005): Immunolocalization of cytoskeletal components in the tegument of the 3-week-old juvenile and adult *Fasciola gigantica*. *Veterinary Parasitology*. 18; 135 (3-4): 269-78.
- Vargas-Parada L., Merchant M. T, Willms K. and Lacleste J. (1999): Formation of calcareous corpuscles in the lumen of excretory canals of *Taenia solium* cysticerci. *Parasitol Research*. 85:88-92.
- Wahlberg H. M. (1998): The distribution of F-actin during the development of *Diphyllobothrium dendriticum* (cestoda). *Cell Tissue Research*. 291:561-570.
- Wolstenholme J. A; Fairweather I., Prichard R., Samson-Himmelstjerna G. and Sangster C. N. (2004): Drug resistance in veterinary helminthes. *Trends in Parasitology*. 20(10):469-476.
- Willms K., Robert L. and Caro J. A. (2003): Ultrastructure of smooth muscle, gap junctions and glycogen distribution in *Taenia solium* tapeworms from experimentally infected hamsters. *Parasitol Resesearch*. 89(4):308-16.
- Willms K., Robert L., Jimenez J. A., Everhart M and Kuhn R. E. (2004): Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon in *Taenia crassiceps* strobilae WFU strain (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae) from golden hamsters. *Parasitol Research*. 2004 Jul; 93(4):262-7
- Woods A., Sherwin T., Sasse R., MacRae T., Baines A. and Gull K. (1989). Definition of individual components within the cytoskeleton of *Trypanosoma brucei* by a library of monoclonal antibodies. *Journal of Cell Science*. 93:491-500.