



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Efecto de derivados del bencimidazol en la morfología y en la
expresión de proteínas del citoesqueleto de cisticercos de
Taenia crassiceps cepa ORF**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
P R E S E N T A
A M É R I C A P É R E Z R E Y E S**



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Q.F.B. Abel Gutiérrez Ramos
Vocal	Dr. Francisco Hernández Luis
Secretario	Dr. Javier R. Ambrosio Hernández
1er Suplente	Dra. Maria Eva González Trujano
2do Suplente	Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio de Biología del Citoesqueleto de Parásitos, Depto. de Microbiología y Parasitología. Edificio A, Facultad de Medicina, UNAM.

ASESOR

Dr. Javier R. Ambrosio Hernández



SUPERVISOR TECNICO

M. en C. Laura E. Valverde Islas



SUSTENTANTE

América Pérez Reyes



i. AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández; por la oportunidad de trabajar en su laboratorio, compartir sus conocimientos, sus consejos y apoyarme para terminar exitosamente la tesis.

A la M. en C. Laura Elena Valverde Islas; por compartir sus conocimientos, sus consejos y amistad.

Al M. en C. David García Vilchis; por compartir sus conocimientos, sus consejos y amistad.

Al M en C. Carlos Alberto Méndez Cuesta; por compartir sus conocimientos, sus consejos y amistad.

A la Biol. Olivia A. Reynoso Ducoing; por sus observaciones, conocimientos y ayuda.

A la Dra. Lilián Yépez Mulia; por su apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Al Dr. Rafael Catillo Bocanegra y colaboradores; por proporcionar los compuestos empleados en la presente tesis.

A la M. en C. Beatriz King Díaz; por compartir sus conocimientos, consejos, apoyarme para terminar la tesis y amistad.

Al Biol. Gabriel Orozco; por la ayuda técnica en el manejo de las muestras en el Microscopio confocal FV1000 (Olympus).

A la Dra. Araceli Patrón; por facilitar el uso del microscopio confocal FV1000 (Olympus).

Al Biol. Armado Zepeda; por la ayuda técnica en el manejo de las muestras en el microscopio electrónico de barrido DSM-950 (Zeiss).

A la Dra. Teresa Imelda Fortoul; por facilitar el uso del microscopio electrónico de barrido (Zeiss).

Al Dr. Juan A. Molina Guarneros; por facilitarme el microscopio de fluorescencia Nikon.

A la Dra. Laura Escobar; por facilitar el criostato LEICA.

A los profesores que contribuyeron en mi formación.

A la UNAM y especialmente a la Facultad de Química; por ser mi segunda casa y formarme con éxito.

A la **Facultad de Medicina,** UNAM; por abrirme sus puertas.

Al jurado; por la atención prestada para la revisión de la tesis.

A los proyectos que financiaron la tesis:

- CONACYT

“Síntesis y Estudio de la Actividad Antiprotozoaria y Antihelmíntica de Compuestos Derivados del Bencimidazol y de Moléculas Híbridas con Nitrotiazol”.

No. de Registro V43629-M

- PAPIIT-UNAM

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

No. de Registro IN-216107-3

Al apoyo económico recibido:

- CONACYT. No. de Registro V43629-M

A mi familia:

Doy gracias a Dios por la familia que me brindo, por su ejemplo de vida y amor, ya que sin ellos no sería lo que soy.

- A mis padres: Teodora y Primitivo; por darme la vida, su amor, esfuerzo, sus oraciones, sus cuidados y la oportunidad de estudiar una carrera.
- A mis hermanos: Elizabeth, Henry y René; por su amor, sus consejos y sus cuidados.
- A mi primo: Gustavo; por su cariño y apoyo.
- A mi abuela; María de Jesús, a mis tíos y primos.
- A los que siempre me reciben con cariño: Bony, Chicorita, Dumbo[†] y Luck.

Con amor y admiración.

♪.....Eres lo que mas quiero en este mundo, eso eres, mi pensamiento mas profundo, también eres....///...Soy el que quererte quiere como nadie soy, el que te llevaría el sustento día a día, el que por ti daría la vida, ése soy.....

(E. Del Real)

A mis amigos:

A los que están conmigo y a los que han dejado huella. Por todos los momentos compartidos y ojalá sigamos compartiendo, por su cariño, por ser mis compañeros de estudio, por los regaños, por sus consejos y por sus cuidados.

- Adela, Baltazar, Dejanira, José Antonio, José Luis, Juan Ángel y Sanmatha.
- Ángel, Cesar, Georgina, Hugo, Jessica, Alfredo, Marlene, Mario, Nallely, Nancy, Paulina, y Ricardo.
- Christian, Edith, Fabián, Gerardo, Gustavo, Ibeth, Isadora, Jorge, Karla, Lulú, Lupita, Marixa, Mitzy, Montserrat, Nieves, Oscar, Paola, Priscilla, Sandra Luz, Susana y Yunuen.
- Carlos, David, Denisse, Efrén, Laura, Mónica, Rafael, Xochitl y Yamile; por los ratos tan amenos que hicieron agradable el trabajo del laboratorio y su amistad.

Con cariño y admiración

♪.....Y ahora que estamos en la pista tú y yo, no quiero que dejemos de bailar así, pues vienen otros ritmos que te quieren separar de mí, y no pueda abrazarte ni sentir tu cuerpo, y vuelva a bailar solo como antes de estar junto a

ti.....

(Café Tacvba)

ii. ÍNDICE GENERAL

	Pagina
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
1. Control de parasitosis mediante fármacos antiparasitarios.	3
2. Desarrollo de fármacos antiparasitarios.	4
3. Desarrollo de fármacos antiparasitarios derivados de la molécula del bencimidazol.	5
4. Mecanismo de acción de los bencimidazoles.	7
5. El albendazol en el tratamiento de las parasitosis producidas por <i>Taenia solium</i> .	8
6. Características del modelo biológico de cisticercosis murina producida por <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF.	10
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	18
1. Infecciones experimentales y obtención de parásitos.	18
2. Derivados bencimidazólicos.	18
3. Evaluación del efecto <i>in vitro</i> de los derivados bencimidazólicos sobre los parásitos.	21
4. Evaluación macroscópica del efecto de los derivados bencimidazólicos.	22
5. Evaluación microscópica del efecto de los derivados bencimidazólicos.	22
5.1. Observaciones mediante microscopia de fluorescencia.	22
5.1.1. Localización de actina filamentosa, tubulina- α y ADN.	24
5.1.2. Localización de miosina tipo II y ADN.	24
5.2. Observaciones mediante microscopia electrónica de barrido.	25
V. RESULTADOS	27
1. Observaciones macroscópicas.	27
2. Observaciones microscópicas mediante microscopia confocal.	31

2.1. Localización de actina filamentosa, tubulina- α y ADN.	31
2.1.1. Observaciones al objetivo de 40X. A un día de tratamiento.	31
2.1.2. Observaciones al objetivo de 100X y sus aumentos digitales. A un día de tratamiento.	33
2.1.3. Observaciones al objetivo de 40X. A dos días de tratamiento.	35
2.1.4. Observaciones al objetivo de 100X y sus aumentos digitales. A un día de tratamiento.	37
2.2. Localización de miosina tipo II y ADN	43
2.2.1. Observaciones al objetivo de 100X. A un día de tratamiento.	43
2.2.2. Observaciones al objetivo de 100X. A dos días de tratamiento.	44
3. Observaciones microscópicas mediante microscopia electrónica de barrido.	47
3.1. Morfología de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF.	47
3.2. Morfología de la superficie de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF.	50
VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	53
VII. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS	63
VIII. REFERENCIAS HEMEROBIBLIOGRAFICAS	65

iii. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pagina
1. Estructura química de la molécula del bencimidazol.	7
2. Mecanismo de acción de los bencimidazoles.	8
3. Estructuras químicas del albendazol y sus metabolitos.	10
4. Cisticerco de <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF.	12
5. Esquema del tejido de cestodos.	13
6. Esquema del sistema protonefrial de platelmintos.	15
7. Estructuras químicas del SOABZ y los derivados bencimidazólicos RCB15 y RCB20.	20
8. Cisticercos de <i>T. crassiceps</i> cepa ORF mantenidos en cultivo <i>in vitro</i> en ausencia o en presencia de derivados bencimidazólicos.	29
9. Evaluación del efecto reversible de los derivados bencimidazólicos en cisticercos de <i>T. crassiceps</i> cepa ORF cultivados <i>in vitro</i> .	30
10. Marcaje fluorescente de actina filamentosa, tubulina- α y ADN en pared vesicular de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> cepa ORF. A un día de cultivo <i>in vitro</i> .	39
11. Marcaje fluorescente de células flama de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> cepa ORF. A un día de cultivo <i>in vitro</i> .	40
12. Marcaje fluorescente de actina filamentosa, tubulina- α y ADN en pared vesicular de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> cepa ORF. A dos días de cultivo <i>in vitro</i> .	41

Marcaje fluorescente de actina filamentosa, tubulina- α y ADN en pared vesicular de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> cepa ORF. A dos días de cultivo <i>in vitro</i> .	41
Marcaje fluorescente de células flama de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> cepa ORF. A dos días de cultivo <i>in vitro</i> .	42
Marcaje fluorescente de miosina tipo II y ADN en pared vesicular de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> cepa ORF. A un día de cultivo <i>in vitro</i> .	45
Marcaje fluorescente de miosina tipo II, y ADN en pared de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> cepa ORF. A dos días de cultivo <i>in vitro</i> .	46
Observación mediante MEB de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> cepa ORF mantenidos en cultivo <i>in vitro</i> , en ausencia o en presencia de BZM.	49
Observación mediante MEB de la superficie de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> cepa ORF mantenidos en cultivo <i>in vitro</i> , en ausencia o en presencia de BZM. Aumento 200X.	51
Observación mediante MEB de la superficie de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> cepa ORF mantenidos en cultivo <i>in vitro</i> , en ausencia o en presencia de BZM. Aumento 2000X.	52
Estructuras químicas de derivados bencimidazólicos: RCB15, RCB20, TZB y compuesto-alfa.	60

iv. ABREVIATURAS

ABZ	Albendazol
AcM	Anticuerpo monoclonal
AcP	Anticuerpo policlonal
aF	Actina filamentosa
ASB	Albumina sérica bovina
BZM	Bencimidazol
BZMs	Bencimidazoles
CG	Capa germinal
CF	Células flama
CTR	Control
DAPI	2,4-diamino fenil indol
DMSO	Dimetilsulfóxido
dT	Día de tratamiento
FV	Fluido vesicular
MBZ	Mebendazol
MT	Microtúbulos
mt	microtriquias
nu	Núcleo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PV	Pared vesicular
PZQ	Prazicuantel
RCB15	6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol
RCB20	6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol
SOABZ	Sulfóxido de albendazol
SONABZ	Sulfona de albendazol
SP	Sistema protonefridial
SSAF	Solución salina amortiguadora de fosfatos
T	Tegumento
TA	Temperatura ambiente
ta	Tubulina- α
TZM	Triclabendazol

I. INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), es la quimioterapia la forma de control más efectiva e inmediata para el tratamiento de las enfermedades parasitarias. Entre los fármacos antiparasitarios más empleados se encuentran los derivados de los bencimidazoles (BZMs), los cuales, luego de haber sido modificados químicamente han puesto en evidencia que es posible la obtención de mejores fármacos para el tratamiento de infecciones por patógenos que no se han sólo circunscrito a las infecciones parasitarias, sino que, se ha extendido su uso para otro tipo de infecciones como por ejemplo las fúngicas y las bacterianas. Uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento antihelmíntico es el albendazol (ABZ), el cual ha demostrado tener un amplio espectro de acción, cuyo costo de producción es bajo y puede ser utilizado en el tratamiento de un mayor número de individuos infectados. Sin embargo, el ABZ (como los otros derivados bencimidazólicos) tiene una limitante importante: induce resistencia y los parásitos no pueden ser erradicados de los animales infectados debido a que algunos de los parásitos, como los nematodos, desarrollan resistencia a este fármaco. Por lo consiguiente, también como lo manifiesta la OMS, existe la necesidad de desarrollar y contar con nuevos fármacos antiparasitarios que tengan mejores características que los de uso actual y que durante su diseño se hayan hecho consideraciones relacionadas con su diseño racional. Una de las aproximaciones, en el mejor diseño y síntesis de sustancias con potencial de fármaco

antiparasitario, es su evaluación por ensayos *in vitro* con el empleo de de modelos experimentales.

En la presente tesis se utilizó el modelo experimental de cisticercosis murina producida por *Taenia crassiceps* cepa ORF, la cual es considerada como un modelo de estudio de la cisticercosis producida por *Taenia solium*. En estudios previos, se encontró que algunos derivados bencimidazólicos, como los denominados RCB15 y RCB20, produjeron mayor daño *in vitro* en los parásitos con respecto al sulfóxido de albendazol (SOABZ). Con base a ello, se procedió a evaluar el daño que causaban a sus tejidos.

II. ANTECEDENTES

1. Control de parasitosis mediante fármacos antiparasitarios.

Las enfermedades parasitarias ocupan un lugar importante en salud pública, tanto en países desarrollados como los que están en vías de desarrollo. Aunque este tipo de enfermedades podrían ser fáciles de prevenir, tratar y controlar (ya que se conocen sus agentes etiológicos causantes así como sus ciclos de vida), e incluso existen normas oficiales al respecto, como lo propuesto en el control de las enfermedades producidas por *T. solium* (NOM-021-SSA2-1994); en donde las medidas que se tengan que implementar son complejas y requieren de una adecuada organización. Según la OMS es el uso de la quimioterapia la forma más efectiva e inmediata para el control de las parasitosis, tanto a corto como a mediano plazo, ello se debe a que hasta el momento no existen métodos preventivos eficaces para las enfermedades producidas por parásitos (Fairlamb *et al*, 2003). Sin embargo, el uso indiscriminado de los fármacos antiparasitarios en la Medicina Veterinaria ha provocado la generación de resistencia en parásitos nematodos; se ha reportado falta de eficacia de antihelmínticos contra nematodos transmitidos a humanos, pero en los cuales hasta el momento, no se ha confirmado resistencia (Prichard, 2007). Así mismo, dado que continúan presentes los problemas asociados a falla terapéutica, por ejemplo, en el caso de las enfermedades causadas por protozoarios, aún no existen tratamientos efectivos y los fármacos empleados producen efectos

secundarios. Por lo anterior, también, la OMS recomienda que es necesario el desarrollar nuevos fármacos antiparasitarios a la par del desarrollo de vacunas. Estos fármacos deberán ser más efectivos, de amplio espectro, aplicados en dosis única, segura en su administración y económica para la población en general.

2. Desarrollo de fármacos antiparasitarios.

Se considera que con la aplicación de tecnologías modernas que incluyen a la Bioinformática, Bioquímica, Parasitología Molecular y Celular, Química, Biología Estructural, Farmacología, Toxicología, Proteómica, entre otras, así como la experiencia Clínica, se podrían sentar las bases que permitan el diseño y la síntesis de nuevos compuestos con actividad antiparasitaria. Con las modificaciones estructurales o moleculares a los fármacos conocidos, se podrían originar fármacos con mejor actividad biológica, de los cuales se deriven, lo cual favorezca las propiedades farmacológicas. Con conocimientos profundos de la Bioquímica, la Biología Molecular y Celular de los parásitos, se podrían desarrollar compuestos selectivos en contra de los parásitos y los cuales no producirían daño alguno en los hospederos (Fairlamb *et al*, 2003).

En un principio, los fármacos antiparasitarios se obtuvieron de plantas medicinales, sitios desde los cuales hubo una extracción importante de principios activos responsables; sin embargo, en la actualidad, se cuentan con herramientas mejores que permitan incrementar el rendimiento de la extracción, así como de la síntesis de fármacos. Un ejemplo de ello es el papel que tiene la química computacional, en donde se cuenta con la simulación de los requerimientos fisicoquímicos que los fármacos podrían requerir para tener especificidad en sus

sitios de acción y que, a su vez, ello permita generar un gran número de moléculas con potencial antiparasitario. Se considera que con la Química Farmacéutica se podría acelerar el desarrollo de nuevos fármacos. De 10^{40} moléculas de las cuales se parte, se puede llegar a una sola, a través del empleo de modelos biológicos, con los cuales se efectúan evaluaciones del efecto de los fármacos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Luego, con la integración de los conocimientos obtenidos en las áreas antes mencionadas, se podría llegar al principio activo final y a su evaluación como medicamento (Revah, 2002).

3. Desarrollo de fármacos antiparasitarios derivados de la molécula del bencimidazol.

Los BZMs son de los antiparasitarios más utilizados, comúnmente se les emplea como fármacos antihelmínticos. Se les ha reconocido como fármacos de elección, tanto para parasitosis intestinales como para las tisulares. Debido a su amplio espectro de acción y baja toxicidad, se les ha empleado tanto en la terapéutica veterinaria como en la humana. En México, en la práctica clínica, la Secretaría de Salud, emplea únicamente con dos BZMs: el ABZ y el mebendazol (MBZ) para el tratamiento contra los helmintos (CASES, 2005). Estos fármacos han mostrado tener una alta actividad y seguridad para el tratamiento de la mayoría de las infecciones intestinales. De hecho, por la tolerancia y fácil administración del ABZ, se le ha usado en campañas de desparasitaciones masivas en dosis únicas de 400 mg.

Dado que se considera que el desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios debería partir del conocimiento que se tiene de la efectividad con

fármacos utilizados hasta el momento (como lo recomienda la OMS). En el caso de los BZMs, en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM, se están dando los pasos necesarios para el diseño y la síntesis de compuestos derivados del BZM, mediante diseños basados en su modificación molecular o estructural. Esta estrategia busca el optimizar la actividad farmacológica de los BZMs con la intención de lograr obtener fármacos más selectivos, menos tóxicos y más económicos. Luego para determinar si los compuestos diseñados y sintetizados tienen potencial antiparasitario, se les ha evaluado bajo condiciones *in vitro* con algunos modelos de parásitos: *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Trichinella spiralis* (López-Vallejo *et al*, 2007; Navarrete-Vázquez *et al*, 2001; Valdez *et al*, 2002).

La molécula de BZM es un heterociclo versátil (Fig. 1) y susceptible de una amplia variedad de cambios estructurales. Las moléculas que se han obtenido han demostrado que no sólo tienen actividad en contra parásitos, sino que, también, se les ha utilizado como fármacos antivirales, antimicrobianos, antifúngicos y anticancerígenos. En base a estudios en donde se evalúan derivados del BZM, se sabe que un átomo de Hidrógeno en la posición 1 es esencial para la actividad antihelmíntica, pero ello no es esencial para la actividad antiprotozoaria; mientras que, un grupo metilo, en la misma posición, mejora la actividad contra protozoarios (López-Vallejo *et al*, 2007; Navarrete-Vázquez *et al*, 2001; Valdez *et al*, 2002).

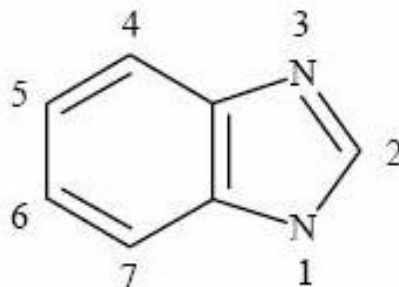


Figura 1. Estructura química de la molécula del bencimidazol. La estructura consiste en un anillo anular bicíclico, en donde el anillo de benceno se encuentra unido a las posiciones 4 y 5 del anillo de imidazol.

4. Mecanismo de acción de los bencimidazoles.

Según lo reportado en la literatura, los BZMs inhiben el metabolismo y transporte de glucosa, así como, inhiben la polimerización de la tubulina en los microtúbulos (MT). La inhibición del metabolismo de la glucosa se debe a la disminución de la acción de la enzima fumarato reductasa; enzima responsable de convertir el fumarato en succinato, lo cual es importante en el metabolismo anaerobio de la glucosa y la eventual producción de energía en los helmintos. La inhibición de la polimerización de los MT se debe a la unión de los BZMs a la tubulina- β ; esta interacción produce que los parásitos resulten inmovilizados y afectados en su composición tisular, lo cual puede ocasionar que haya una muerte lenta de ellos (Fig. 2).

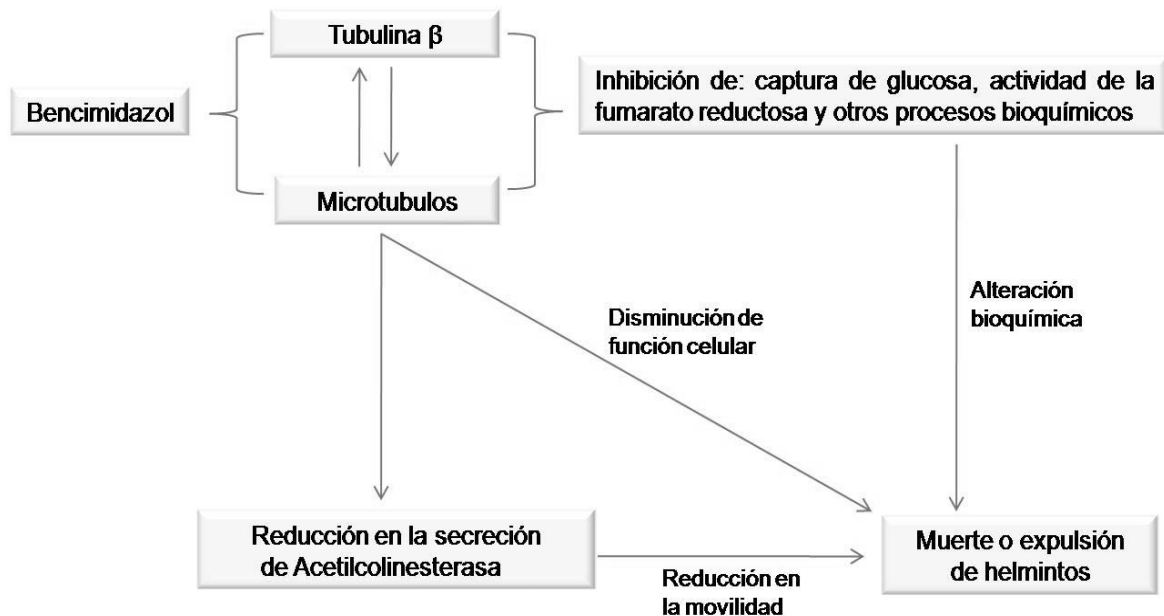


Figura 2. Mecanismo de acción de los bencimidazoles. Los BZM tienen dos principales mecanismos de acción: uno, por inhibición de la captación de glucosa y otro por la inhibición de la polimerización de la tubulina en los MT. En ambos casos, ello produce la muerte o favorece la expulsión de los parásitos. Tomado de Sharma, 1994.

5. El albendazol en el tratamiento de las parasitosis producidas por *Taenia solium*.

Las principales ventajas en el tratamiento quimioterapéutico con ABZ son: produce pocos efectos adversos, tiene un amplio espectro de acción en contra helmintos y su precio es barato (Katzung *et al*, 1994). El ABZ, como un derivado del BZM, es poco soluble en agua y totalmente soluble en solventes orgánicos, las cuales son propiedades que influyen en su absorción y distribución en el organismo. Después de su administración oral, un 5% de ABZ es absorbido y rápidamente metabolizado a SOABZ; el cual es el metabolito con actividad

antihelmíntica. Este metabolito se transforma rápidamente en SOANBZ, la cual se convierte en un metabolito inactivo (Fig. 3). Del total de SOABZ, el 70% se une a proteínas plasmáticas y, el restante, se distribuye a los tejidos y alcanza la bilis y el líquido cefalorraquídeo (Dayan, 2003).

Debido a que las helmintiasis son las parasitosis más frecuentes que se presentan en nuestro país, los esfuerzos gubernamentales han puesto su atención en el control quimioterapéutico masivo con ABZ; sobre todo, se ha aplicado en las poblaciones de las zonas rurales. La teniasis, producida por parásitos adultos de *T. solium* y de *T. saginata*, es una de las parasitosis intestinales para las que se considera que hay que tratar con ABZ. En el caso de *T. solium*, la infección se debe al consumo accidental de carne de cerdo contaminada con cisticercos vivos. Por otra parte, dado que el hombre es un hospedero intermediario, por haberse infectado con huevos provenientes de las tenias, puede llegar a desarrollar la cisticercosis humana. Ésta, es una enfermedad causada por las formas larvianas de *T. solium*, las cuales se alojan principalmente en los tejidos musculares u otros órganos. El mayor daño por la presencia de cisticercosis se da cuando los parásitos se alojan en el sistema nervioso central y producen la neurocisticercosis. Esta enfermedad es incapacitante y costosa para su diagnóstico y el fármaco de elección es el ABZ para su tratamiento, ya que el fármaco tiene la capacidad de llegar hasta el espacio subaracnoideo; sin embargo, aparentemente, su efectividad ha ido disminuyendo, por lo que se ha propuesto que debería ser administrado en combinación otro fármacos antihelmínticos como el praziquantel (PZQ) y la tizoxanida. Según resultados de evaluaciones *in vitro* en cisticercos de *T. crassiceps*, se encontró que tanto en combinaciones de SOABZ y PZQ como en

combinaciones de SOABZ y tizoxanida, hubo daños importantes en los parásitos y en sus tejidos (Palomares *et al*, 2006; 2007).

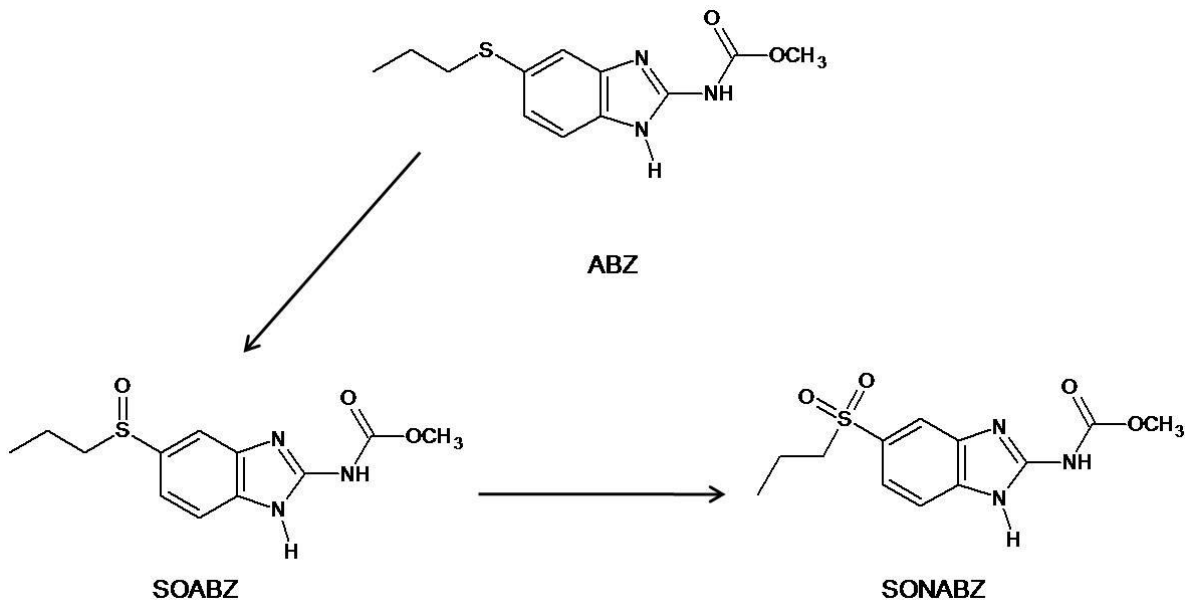


Figura 3. Estructuras químicas del albendazol y sus metabolitos. El albendazol (ABZ) cuando es absorbido a torrente circulatorio se transforma rápidamente en sulfóxido de albendazol (SOABZ), el cual es inestable y se transforma a sulfona de albendazol (SONABZ) que es inactiva. Tomado de Dayan, 2003.

6. Características del modelo biológico de cisticercosis murina producida por *Taenia crassiceps* cepa ORF.

Por lo complicado de llevar a cabo los suficientes experimentos que requiere el estudio de los cisticercos de *T. solium*, dado que en muchas de las ocasiones no hay homogeneidad de las infecciones ni en los parásitos, se ha recurrido al empleo del modelo biológico de cisticercosis murina producida por *T.*

crassiceps cepa ORF. Los parásitos crecen en el peritoneo de los ratones y se reproducen por gemación. Además de lo anterior, otra gran ventaja del uso de cisticercos de *T. crassiceps* es que se puede sincronizar las infecciones, se recuperan grandes cantidades de parásitos. Los parásitos se pueden mantener en cultivo *in vitro* bajo condiciones mínimas y debido a que son morfológicamente idénticos a la pared vesicular de los cisticercos de *T. solium*, se les ha venido utilizando con fines de evaluación de la actividad cestocida de diversos compuestos (García-Vilchis, 2007; Palomares *et al*, 2004; 2006; 2007).

A simple vista, un cisticerco de *T. crassiceps* cepa ORF presenta una forma ovoide, en la que en uno de sus polos se lleva acabo la gemación; tiene una apariencia translúcida por que en su interior está contenido el fluido vesicular; tiene un tamaño aproximado de 6 mm de longitud por 3 mm de ancho aproximadamente (Fig. 4). A nivel microscópico, en cortes obtenidos de los parásitos, se les encuentra formados por una superficie que esta sostenida por un tegumento sincicial continuo y, a un nivel más profundo del tejido, se encuentra la capa germinal en donde están localizadas células subtegumentarias y las células flamas (Ambrosio *et al*, 1994; Palomares *et al*, 2006). Es en el tegumento en donde los parásitos basan su absorción de nutrientes y eliminación, ya que carecen de aparato digestivo. Este tegumento, además, sirve como una barrera de protección para los parásitos. A nivel ultraestructural, en la superficie del tegumento, se encuentra una gran cantidad de microvellosidades denominas microtriquias, las cuales están delimitadas por una membrana plasmática y presentan una forma clásica de ribete de cepillo (Ambrosio *et al*, 1994). El tegumento, morfológicamente, está conformado por el citoplasma, las

microvesículas y las mitocondrias. En su porción basal esta delimitado por una membrana basal, la cual puede formar parte de los puentes citoplasmáticos que conectan a las células subtegumentarias con el tegumento (Fig. 5). A este nivel las células están embebidas en un tejido parenquimatoso que contiene fibras musculares y otros tipos de células como las células flama (Barnes, 1994; Smyth & McManus, 1989).

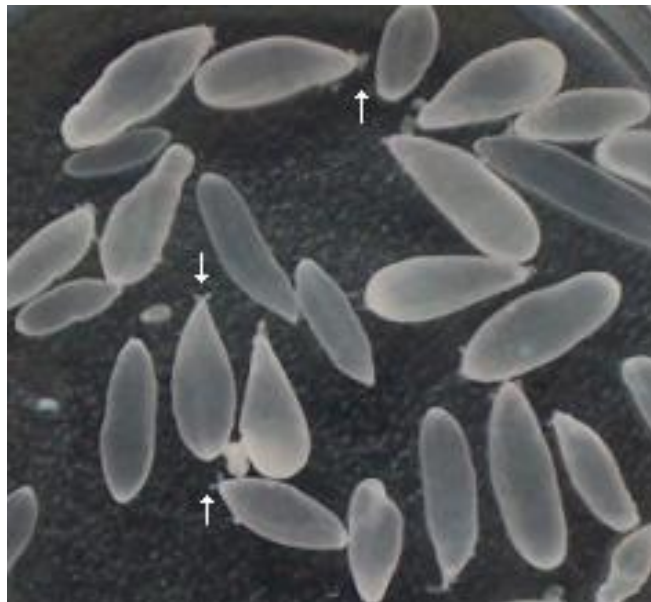


Figura 4. Cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF. Los parásitos recuperados de la cavidad peritoneal de ratones infectados experimentalmente, presentan la morfología característica: están constituidos por una vesícula ovalada y translúcida, llena de fluido vesicular. En uno de los polos se observa la gemación de los parásitos (señalados con flechas).

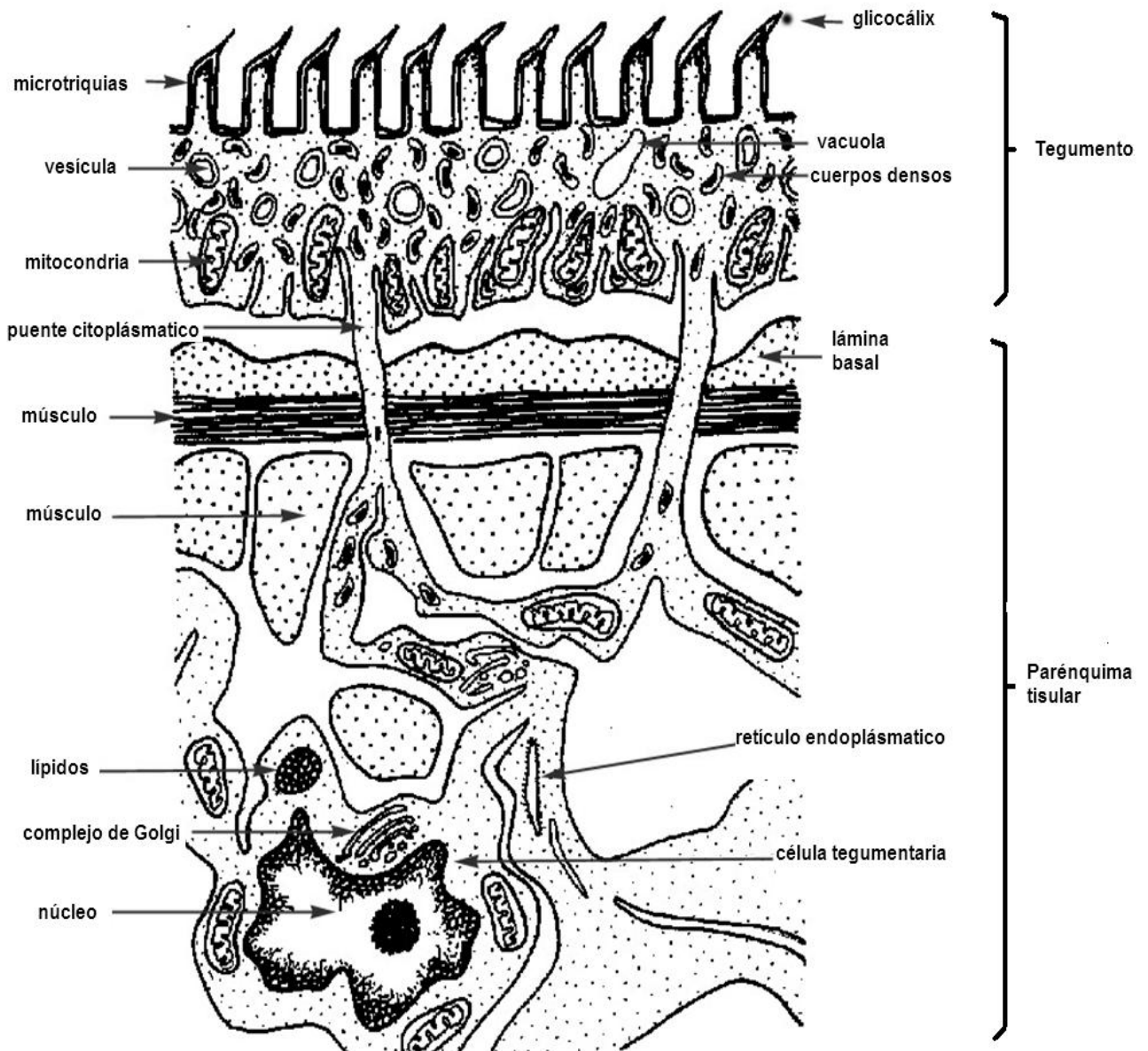


Figura 5. Esquema del tejido de cestodos. Se muestran los principales compartimentos: el tegumento y el parénquima tisular. En cada uno se muestran sus principales componentes. Tomado de Biodidac, University of Ottawa.

La forma de adaptación de estos parásitos en sus hospederos, se supone, depende de un mecanismo de osmorregulación, el cual, aparentemente, se regula por el sistema protonefridial (SP). Sin embargo, también se plantea que podría estar cumpliendo con la función de un sistema excretor, ya que a través de él se daría la eliminación de productos de desechos. Este SP está compuesto por túbulos protonefridiales de diferentes diámetros, los cuales terminan en unidades básicas celulares conocidas como células flama, bulbos flamígeros o células en flama (Fig. 6). Las células flama están conectadas a los túbulos y a los ductos colectores y, aparentemente, es a través de ellas se lleva la filtración y selección de componentes que serán excretados por los parásitos (Barnes, 1994; Smyth & McManus, 1989). No hay una demostración clara relacionada con la expulsión de sustancias de desecho hacia el exterior de los parásitos a través de nefridioporos como lo demostrado en trematodo. Las células flama presentan una morfología típica asociada a su posible función en los parásitos: en un extremo presentan un penacho de cilios orientados hacia los túbulos protonefridiales, mientras que, en el otro, se encuentra el cuerpo celular en el cual están anclados los cilios, el citoplasma, el núcleo de la célula y gran cantidad de vesículas en aparente tráfico vesicular (Barnes, 1994; Valverde-Islas, 2007). Por su localización y su morfología, las células flama podrían tener un papel relevante en la eliminación de sustancias tóxicas para los parásitos y, por lo tanto, su papel podría ser importante para la evaluación de daños ocasionados por sustancias cestocidas.

En el presente trabajo de tesis, se busca evaluar el efecto de sustancias con potencial antiparasitario en cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF y determinar el daño se produzca en los tejidos de los parásitos.

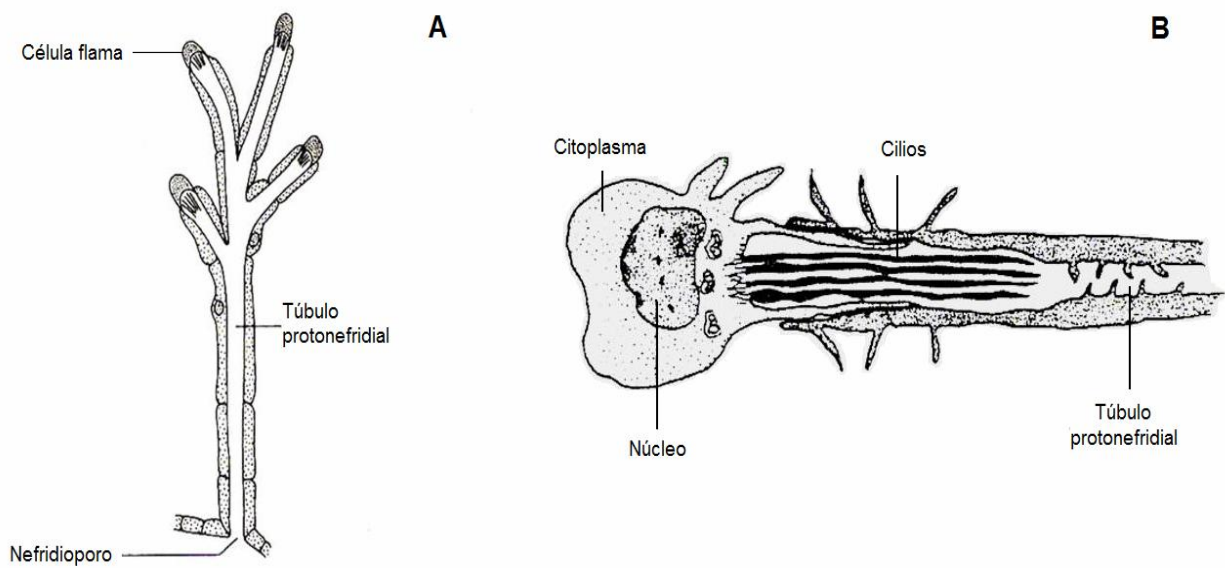


Figura 6. Esquema del sistema protonefrial de platelmintos. A) Componentes del SP; túbulos protonefriales, células flama y nefridioporo. B) Célula flama, se destacan el núcleo, el citoplasma y los cilios dirigidos hacia el túbulo protonefrial. Tomado de Barnes, 1994

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

Debido a que los derivados bencimidazólicos RCB15 y RCB20 presentan una estructura química semejante al sulfóxido de albendazol, podrían tener una actividad semejante en contra de cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de derivados del bencimidazólicos RCB15 y RCB20 en la morfología, así como en la expresión de proteínas del citoesqueleto de cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto macroscópico de los derivados bencimidazólicos en los cisticercos mantenidos en cultivo *in vitro*.
- Evaluar el efecto microscópico, a nivel estructural, mediante observación por microscopía confocal, de los derivados bencimidazólicos sobre la expresión de proteínas del citoesqueleto.
- Evaluar el efecto microscópico, a nivel ultraestructural, de los derivados bencimidazólicos en los cisticercos mediante su observación por microscopía electrónica de barrido.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Infecciones experimentales y obtención de parásitos.

Cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF se inocularon en la cavidad peritoneal de ratones hembra Balb/c de 5 semanas de edad. Después de 3 meses de infección, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y de sus cavidades peritoneales se recolectaron los parásitos, los cuales se lavaron inmediatamente en tres ocasiones con SSAF estéril y luego, en tres ocasiones, con SSAF suplementada con una mezcla de antibióticos-antimicótico. Esta mezcla contenía 100 µg/mL de Penicilina G y de Sulfato de Estreptomicina y 0.25 µg/mL de Anfotericina B (Gibco). Posteriormente, para los ensayos de evaluación con los derivados bencimidazólicos, se seleccionaron en función de su apariencia, motilidad y tamaño. Finalmente los parásitos se pusieron en cultivo *in vitro* como se indica posteriormente en la sección IV.3.

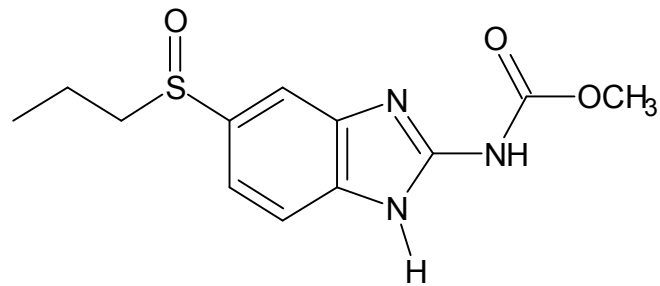
2. Derivados bencimidazólicos.

Los compuestos derivados del bencimidazol que se emplearon en la presente tesis se diseñaron, sintetizaron y evaluaron químicamente por el grupo del Dr. Rafael Castillo del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM. La evaluación de los compuestos se hizo como parte del megaproyecto de investigación “Síntesis y Estudio de la actividad Antiprotozoaria y Antihelmíntica de Compuestos Derivados del Bencimidazol y Moléculas Híbridas con Nitrotiazol”,

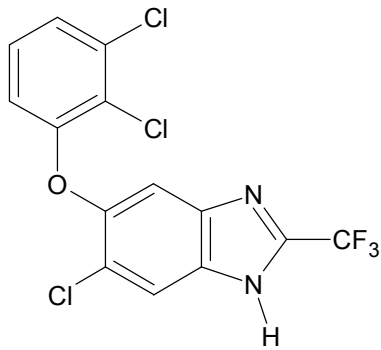
apoyado por el CONACYT con clave V43629-M. De los derivados seleccionados para ser evaluados en la presente tesis, pertenecen a la Serie A, los cuales previamente se les había determinado que tenían efecto en los cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF (García-Vilchis, 2007). De estos compuestos, el RCB15 y RCB20 no se conocía el efecto que producían en los tejidos de los parásitos y por ello se decidió el continuar con su estudio. En las evaluaciones se decidió analizar a estos compuestos en comparación con el efecto que produce el SOABZ (Fig. 7), el cual es el metabolito activo del ABZ y para el cual se han hecho evaluaciones *in vitro* (García-Vilchis, 2007; Palomares *et al*, 2004; 2006; 2007).

Para los experimentos, los derivados se solubilizaron en una solución que contenía DMSO al 50%, etanol al 30% y agua destilada suficiente para alcanzar una concentración final de la solución de 1 mg/mL. A partir de esta solución, considerada como la solución patrón, se hicieron las diluciones respectivas para valorar a los derivados en cultivo *in vitro* de los parásitos a una concentración única de 6.6 μ M.

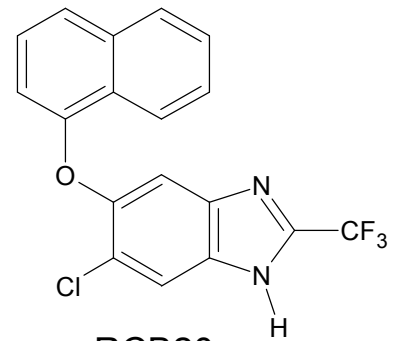
- RCB15: 6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxi)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol.
- RCB20: 6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol.



SOABZ



RCB15



RCB20

Figura 7. Estructuras químicas del SOABZ y de los derivados bencimidazólicos RCB15 y RCB20. Nótese el cambio en las posiciones 2, 5 y 6 del anillo bencimidazólico.

3. Evaluación del efecto *in vitro* de los derivados bencimidazólicos sobre los parásitos.

Para las valoraciones, se empleo medio de cultivo RPMI 1640 complementado con solución amortiguadora de HEPES 6.9 mM, Bicarbonato de Sodio 30 mM y una mezcla de una solución de antibióticos-antimicótico (a la concentración mencionada en la sección IV.1); el medio de cultivo se ajustó a pH 7. Al medio se le adiciono un volumen equivalente a 6.6 μ M de los derivados bencimidazólicos RCB15, RCB20 y SOABZ (soluciones prueba). Para las evaluaciones, se utilizaron cajas multipozos de 3.5 cm de diámetro (NUNC), a las cuales se adicionaron 30 cisticercos por pozo en un volumen de 4 mL de soluciones prueba. Para el cultivo, los pozos con los parásitos se colocaron en una incubadora Thermo Electron Corporation (REVCO) ajustada a 37 °C, 5% de CO₂ y 90 % de humedad relativa. Los parásitos se incubaron durante 11 días, en ensayos por triplicado y, diariamente, se hicieron cambios por soluciones prueba frescas. Como controles negativos se incubaron cisticercos en ausencia de derivados, pero en presencia de los disolventes DMSO y etanol. Estos disolventes se ajustaron a la dilución en que se utilizó el SOABZ durante las valoraciones con los derivados; 0.092 % y 0.055% respectivamente. Durante el mantenimiento del cultivo *in vitro* se hicieron recolecciones periódicas de parásitos, los cuales se lavaron inmediatamente 3 veces con SSAF y se procesaron de acuerdo a las necesidades del proyecto como se indica en las secciones IV.4 y IV.5. Todo el manejo del cultivo *in vitro* se hizo en una campana de flujo laminar ESCO Clase II (Airstream).

4. Evaluación macroscópica del efecto de los derivados bencimidazólicos.

Con la finalidad de evaluar el estado de los parásitos, durante el tiempo que se mantuvieron en cultivo *in vitro*, se les observó continuamente mediante un microscopio de disección (KIOMO), bajo aumentos de 3X y 6X. En todas las observaciones hubo registro de la morfología y la motilidad de los parásitos. Luego, con la finalidad de registrar el estado de los parásitos, se tomaron imágenes de ellos mediante un fotodocumentador (Bio-Rad), con el programa de computacional ChemicDoc XRS. Las imágenes se procesaron, editaron y guardaron en formato TIFF con el empleo del paquete computacional de Photoshop Adobe V. 6.0. También, con la finalidad de registrar la dinámica de movimiento de los parásitos, se hicieron grabaciones de videos de 80 segundos mediante una cámara SONY DS650 a través de una adaptación con el microscopio indicado. Posteriormente, los videos se editaron en el programa computacional Movie Maker (Microsoft).

5. Evaluación microscópica del efecto de los derivados bencimidazólicos.

5.1. Observaciones mediante microscopia de fluorescencia

Para las observaciones se utilizaron varios tipos de microscopios: el microscopio de fluorescencia Eclipse E600 (Nikon) localizado en el Dpto. de Farmacología de la Facultad de Medicina, UNAM, en donde se verificó la fluorescencia en las muestras y el microscopio confocal FV1000 (Olympus) localizado en la Unidad de Microscopia del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en el cual se utilizaron objetivos de 10X (UPLSAPO), 40X (UPLFLN) y 100X

(UPLSAPO), en donde las imágenes se registraron mediante el programa Olympus Fluoview Ver. 1.6.

Luego de que los parásitos se recuperaron de los cultivos, se colocaron en cápsulas been (tamaño "00", EMS), se embebieron en una solución de inclusión comercial "Tissue-Tek" (O.C.T. Compound, Sakura) e inmediatamente se sumergieron Nitrógeno líquido. Una vez congelados los parásitos, se cortaron en congelación mediante un criostato (LEICA), a 10 μm de grosor, y se recuperaron sobre portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina al 10% p/v (Sigma). Luego, los criocortes se mantuvieron en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Previo al tratamiento de los criocortes, éstos se fijaron con acetona fría ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 5 min, con la finalidad de preservar las estructuras celulares y posteriormente se procesaron para ensayos de histoquímica. Los criocortes se bloquearon con una solución de bloqueo, la cual contenía SSAF/Tween₂₀ 0.3%/ASB 2% en condiciones de incubación definidas (1 h, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, cámara húmeda y protegidos de la luz). Luego, una vez finalizada la incubación, los cortes se incubaron tanto con anticuerpos como con marcadores fluorescentes para el revelado de actina filamentosa, tubulina- α , miosina tipo II y núcleos (nu). Todos los reactivos de marcaje se diluyeron en la solución de bloqueo para los ensayos en los que se utilizaron. En todos los casos de incubación con los anticuerpos, luego de las incubaciones, los criocortes se lavaron 3 veces con SSAF y 3 veces con SSAF/Tween₂₀ al 0.3%.

5.1.1 Localización de actina filamentosa, tubulina- α y ADN

Luego del bloqueo, los cortes se incubaron en una solución que contenía la mezcla del marcador fluorescente de actina filamentosa (Alexa-Fluor Faloidina 594, dilución 1:40; Molecular Probes), así como del AcM de ratón anti-tubulina- α (DM1A, dilución 1:100; Sigma). Tanto la incubación como los lavados de los cortes se siguieron de acuerdo a lo descrito en la sección IV.5.1. En el caso del marcaje fluorescente para la tubulina- α , luego de la incubación de los cortes con el anticuerpo primario, se hizo la incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG-ratón conjugado a FITC (dilución 1:30; Zymed); nuevamente, tanto las incubaciones como los lavados, se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente. En el caso de la tinción de núcleos: a los cortes se les incubó en presencia de 2,4'-Diamino-2-fenilindol (DAPI, concentración 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma) durante 30 min a TA y bajo protección de la luz. Finalmente, el exceso de DAPI se retiró con papel filtro y las laminillas con los cortes se montaron en una solución comercial que preserva la fluorescencia (DAKO, DAKO), se sellaron cubriendo con un cubreobjetos y con barniz de uñas comercial transparente. La polimerización de la solución de montaje se permitió durante 30 min a TA y bajo protección de la luz y las laminillas se guardaron a 4°C hasta las observaciones microscópicas.

5.1.2. Localización de miosina tipo II y ADN

El marcaje para miosina II se hizo mediante la incubación de los cortes con un AcP de conejo anti-miosina II de *T. solium* (dilución 1:30) preparado en el

laboratorio (Kumar *et al*, 2003). De la misma manera, tanto la incubación como los lavados de los cortes se siguieron de acuerdo a lo descrito en el inciso IV.5.1. En el caso del anticuerpo secundario, los criocortes se incubaron en presencia de una solución que contenía el AcP de conejo anti-IgG conjugado a biotina (dilución 1:30; SIGMA) y luego, después de la incubación y lavados, los cortes se hicieron reaccionar con una solución que contenía avidina-rodamina (dilución 1:30; SIGMA). De la misma manera que se indicó en la sección IV.5.1.1, los criocortes se hicieron reaccionar con DAPI. Luego, para su observación al microscopio, las laminillas se lavaron y se montaron como se describió en la sección IV.5.1.1.

5.2 Observaciones mediante microscopia electrónica de barrido.

Luego de la recuperación de los parásitos desde los cultivos, se lavaron con SSAF e inmediatamente después se colocaron en una solución fijadora que contenía glutaraldehído (Grado EM) al 4% disuelto en una solución amortiguadora de cacodilato de sodio (Tri-hidratado) 0.1 M a pH 7.4 durante 1 h a 4 °C. Luego, los parásitos se lavaron 5 veces en la misma solución amortiguadora mantenida a 4 °C. Con la finalidad de hacer una postfijación, los parásitos se colocaron en una mezcla (1:1) que contenía de tetraóxido de osmio (Grado EM) al 2 %, así como solución amortiguadora de Cacodilato de Sodio 0.2M por 1 h a 4 °C. Al finalizar, los parásitos se lavaron 5 veces en la misma solución amortiguadora a 4 °C y se deshidrataron manteniéndolos en concentraciones de 30, 50, 70, 80, 90 % de etanol (GR) durante 10 min, a 4°C, en cada una de ellas, luego, se trataron con dos cambios de etanol al 100% durante 15 min a 4 °C. Se desecaron por punto crítico de Bióxido de Carbono

(CPD, Polaron E5000) y, a continuación, se montaron en portaespécimen de aluminio usando etiquetas adhesivas doble cara, a base de carbón y pintura de plata coloidal, para garantizar la conductividad de las muestras. Finalmente, los parásitos se cubrieron con una capa de 15 nm de espesor de oro ionizado (Polaron SEM Coater System, HD-11) y luego, se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido (MEB) de Alto Voltaje DSM-950 (Zeiss), el cual está localizado en el Dpto. de Biología Celular de la Facultad de Medicina, UNAM. Las imágenes se registraron en película blanco y negro pancromática de 4x5 pulg, las cuales se revelaron en papel fotográfico brillante. Las fotografías, se digitalizaron en un escáner HP LaserJet 3055 y las imágenes se procesaron, editaron y guardaron en formato TIFF con el empleo del paquete computacional de Photoshop Adobe V. 6.0.

V. RESULTADOS

1. Observaciones macroscópicas.

1.1. Grupo Control, en ausencia de tratamiento con derivados bencimidazólicos. Los parásitos, luego de 11 días de cultivo, se encontraron con su vesícula de tamaño, apariencia y movilidad normales como se muestra en la figura 8 (columna CTR) y como se registró en la película tomada al respecto; los parásitos, luego de 1 minuto de incubación y durante 15 segundos de observación a un aumento de 3X, presentaron movimientos continuos de contracción y relajación de la vesícula, los cuales se hicieron más notorios en algunas zonas de ellos. Aparentemente, la dinámica de los movimientos era más activa en la zona de los polos y las gemas de reproducción. Según las imágenes obtenidas durante el tiempo del cultivo, los parásitos siempre se observaron llenos de fluido vesicular (FV) y sin alteración alguna.

1.2. Grupo tratado con SOABZ. Luego de 11 días de cultivo en presencia del derivado, no se observó cambio alguno en la morfología de los cisticercos; sin embargo, en algunos de ellos, se pudo apreciar una leve disminución de su tamaño y se les encontró movimientos menos vigorosos que los observados en los controles (Fig. 8, columna SOABZ).

1.3. Grupo tratado con RCB15. Los parásitos, al primer día de cultivo, se observaron con pérdida de su FV y un colapso total de sus tejidos, como se muestra en la figura 8 (columna RCB15). Se encontró, en los registros de video

tomados bajo las mismas condiciones que los controles, que los parásitos perdieron completamente sus movimientos y se alteró notablemente su morfología.

1.4. Grupo tratado con RCB20. Los cambios más notables en los parásitos tratados con el compuesto se manifestaron hacia el segundo día de cultivo; se encontró que los parásitos estaban colapsados, perdieron su FV (Fig. 8, columna RCB20) y no tenían movimientos.

Al tercer día de cultivo RCB15 y al cuarto día para RCB20, los parásitos pareció que se inflaron en uno de sus extremos, sin embargo, se colapsaron en los días posteriores y, en ningún momento, hubo movilidad en ellos.

Con la finalidad de determinar si los derivados bencimidazólicos tenían un efecto reversible, luego del cuarto día de cultivo *in vitro*, con las soluciones prueba, los parásitos se recuperaron, se lavaron 3 veces con medio de cultivo complementado y se colocaron, nuevamente, en el mismo medio bajo las condiciones de cultivo iniciales indicadas en la sección IV.3. En la figura 9 se observa que, luego de los 11 días de cultivo, únicamente los parásitos de los grupos CTR y SOABZ mantienen su morfología y movilidad como se les observó al principio de los experimentos, a diferencia de los parásitos que recibieron el tratamiento con RCB15 y RCB20, los cuales no se recuperaron; se mantuvieron colapsados y perdieron por completo su movilidad.

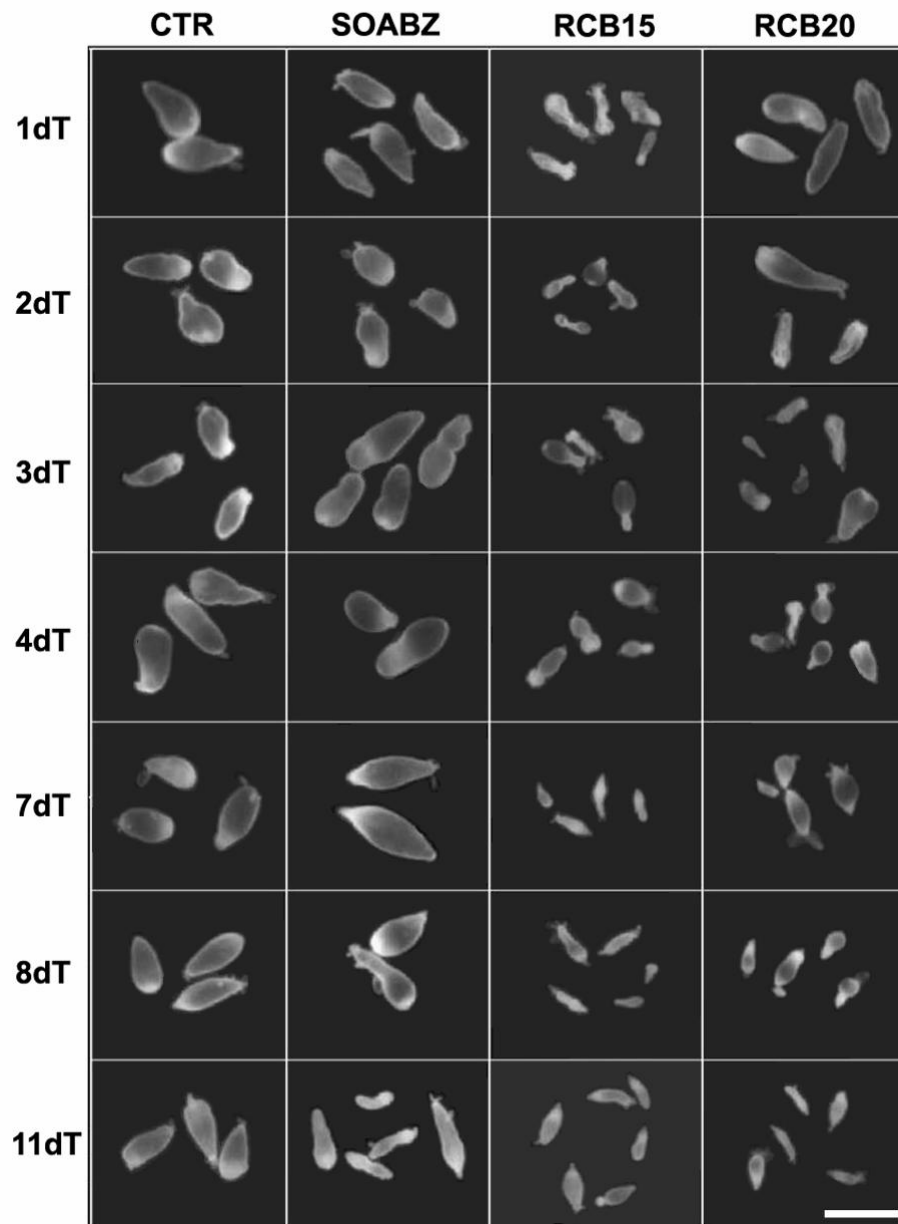


Figura 8. Cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF mantenidos en cultivo *in vitro* en ausencia o en presencia de derivados bencimidazólicos. Luego del cultivo *in vitro*, de los diferentes grupos que se estudiaron, se seleccionaron para su observación a diferentes días de tratamiento (dT): 1, 2, 3, 4, 7, 8 y 11 días. En total, todos los parásitos se mantuvieron durante 11 días de cultivo. Mientras que los parásitos del grupo CTR estuvieron incubados en presencia de RPMI 1640 complementado, DSMO al 0.092 % y etanol al 0.055% (Primer columna), los parásitos tratados tuvieron contacto con el SOABZ 6.6 μ M (segunda columna), RCB15 6.6 μ M (tercer columna) y RCB20 6.6 μ M (cuarta columna). Las imágenes se adquirieron mediante un fotodocumentador. La escala equivale a 5 mm.

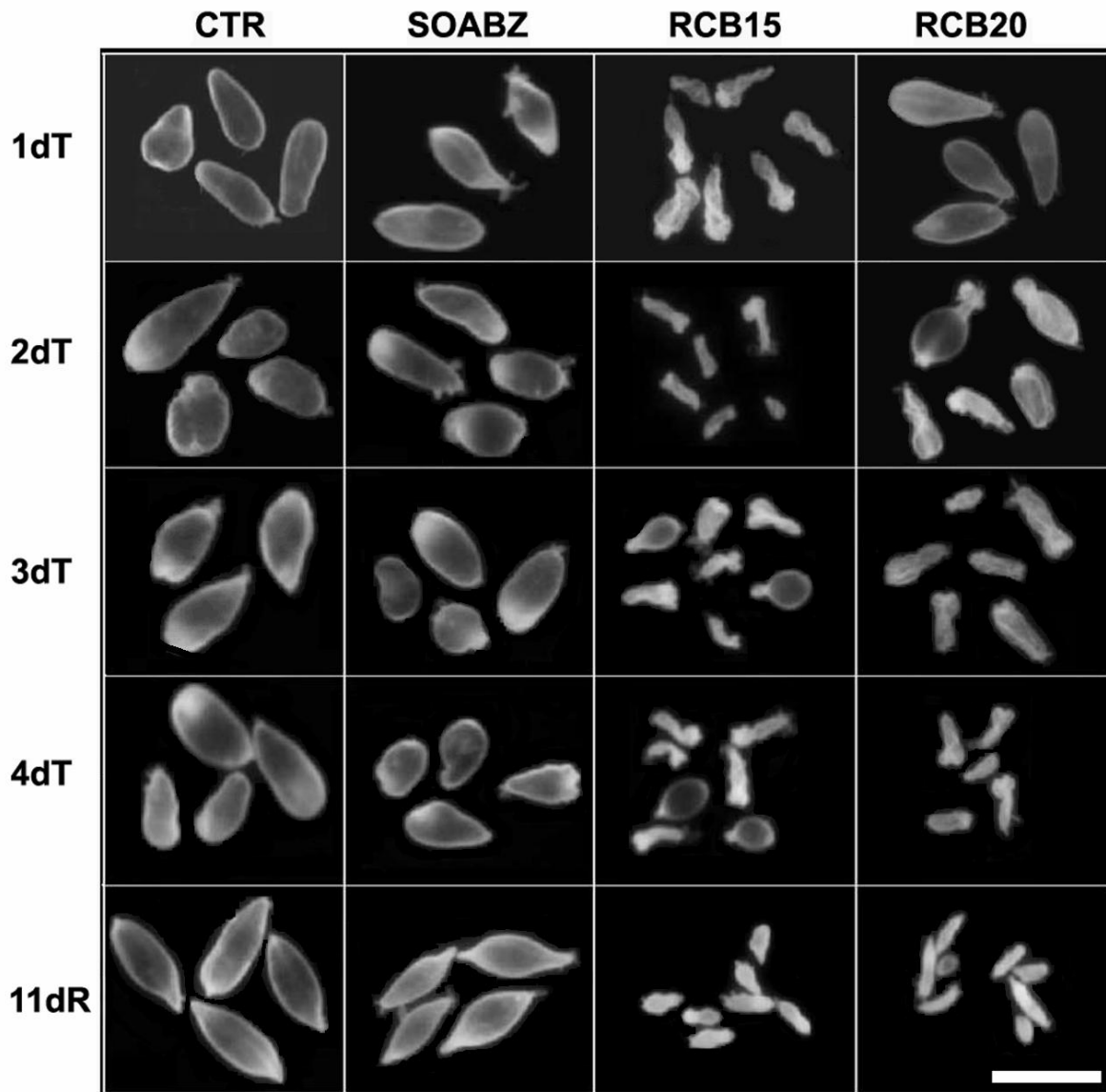


Figura 9. Evaluación del efecto reversible de los derivados bencimidazoles en cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF cultivados *in vitro*. Luego de 4 días de cultivo con las soluciones prueba, los parásitos se cambiaron a medio de cultivo RPMI 1640 complementado y en ausencia de derivado alguno para una incubación por 11 días. En las figuras se observa que solo los parásitos que recibieron tratamiento con RCB15 y RCB20 no tuvieron la capacidad de revertir a su estado original como se muestra en las columnas CTR y SOABZ. La escala equivale a 5 mm.

2. Observaciones microscópicas mediante microscopia confocal

2.1 Localización de actina filamentosa, tubulina- α y ADN.

Las figuras 10, 11, 12 y 13, corresponden a porciones de pared vesicular (PV) del polo en que los cisticercos tienen un mayor número de gemas en formación. Mientras que, tanto el tegumento como los cilios de las células flama (CF) se tiñeron con los anticuerpos fluoresceinados (fluorescencia verde); los anillos de las CF, con la faloidina rodaminada (fluorescencia roja) y los núcleos de las células, con el DAPI (fluorescencia azul).

2.1.1. Observaciones al objetivo de 40X. A un día de tratamiento.

2.1.1.1. Grupo Control (Fig. 10, columna CTR, filas A-D). Como se observa por Nomarsky en la imagen A (aún en el caso de los tratamientos con los BZM), se distinguen la PV con el tegumento, la capa germinal (CG) y el espacio que ocupa el FV. El tegumento es sincicial continuo y compacto, mientras que la CG es laxa con menor cantidad de tejido. El espacio correspondiente al FV no contiene tejido alguno. La faloidina rodaminada tiñó pobremente a la actina filamentosa localizada en el tegumento y la CG, pero lo hizo con mayor intensidad en las CF (Fig. 10, fila B). Mientras que los anticuerpos fluorescentes para tubulina- α marcaron a todo el tegumento, también se encontró que lo hacían en las CF (Fig. 10, fila C). El DAPI tiñó a todos los núcleos de la PV, tanto a los que se encuentran por abajo del tegumento, como a los que están alojados en las células de la CG y que corresponden al parénquima tisular de los parásitos (Fig. 10, filas B y C). Aparentemente, según la sobreposición de los tres marcajes fluorescentes

y el nivel del tejido parasitario, parece que sólo en las CF hay colocación de actina filamentosa, núcleos y tubulina- α . Otros núcleos, correspondientes a otro tipo de células, presumiblemente células subtegumentarias o musculares, también resultaron marcados fluorescentemente.

2.1.1.2 Grupo tratado con SOABZ (Fig. 10, columna SOABZ, filas A-D). Como en el caso del grupo CTR, el marcaje fluorescente se encontró distribuido de forma semejante en el tejido de los cisticercos; nuevamente, en la sobreposición de los tres marcajes fluorescentes, la actina filamentosa estaba colocándose con el marcaje de núcleos y de tubulina- α . A este nivel de observación se encontró que tanto las CF del grupo CTR y las del grupo tratado con SOABZ presentan una morfología similar. Aparentemente hay un aumento en la cantidad de fluorescencia a nivel de tegumento.

2.1.1.3 Grupo tratado con RCB15 (Fig. 10, columna RCB15, filas A-D). A diferencia de los grupos ya mencionados, bajo este tratamiento se encontró que el tejido de los parásitos era más compacto y, aparentemente, debido a ello, aumentó el número de CF en las zonas de observación (Fig. 10, fila A). También, a diferencia del marcaje de la tubulina- α de los otros grupos, el tratamiento con RCB15 pareció disminuir la intensidad en la cantidad de fluorescencia en el tegumento a pesar de lo compacto del tejido; sin embargo, al nivel del parénquima tisular, en el sitio donde se congregan las CF, aumentó la intensidad de fluorescencia. Otra diferencia encontrada para este tratamiento es el colocación de actina filamentosa, núcleos y tubulina- α dentro en las CF (presentada como mayor intensidad de la fluorescencia de color amarillo por la

combinación de la fluoresceína y la rodamina), en estas células, aparentemente es mayor que la observada en los grupos CTR y SOABZ.

2.1.1.4 Grupo tratado con RCB20 (Fig. 10, columna RCB20, filas A-D). Aunque el tejido aparenta un grosor semejante al del grupo tratado con SOABZ, se observó que aumentó la cantidad de CF, debido a la compactación del tejido, las cuales no sufrieron algún cambio aparente en su morfología. En el caso del tegumento, aparentemente hubo una disminución del marcaje fluorescente de tubulina- α en comparación con el grupo CTR.

2.1.2 Observaciones al objetivo de 100X y sus aumentos digitales. A un día de tratamiento.

Entre los tejidos de los parásitos observados, a nivel de CF (Fig. 11, filas A-D), se encontraron varias diferencias que se mencionan a continuación: según las observaciones con Nomarsky (Fila A), las CF están embebidas en la capa germinal; tienen forma de cometa, en la porción basal muestran un engrosamiento de forma de capuchón, luego, hacia la porción apical del cometa, hay otro engrosamiento que va de un extremo lateral al otro. Esta estructuración se observa mejor en las CF completamente extendidas en el plano de observación. El tratamiento que recibieron los parásitos parece modificar tanto el tamaño como el grosor de las CF. En el caso de la CG que rodea a las CF en el parásito del grupo control (Fig. 11, columna CTR, fila A), se observa que es más laxa que la que se encuentra en los tejidos parasitarios asociados a los tratamientos. El marcaje fluorescente de actina filamentosa se presentó en forma de una banda roja (Fig. 11, columna CTR, fila B), que corresponde al engrosamiento descrito bajo la

observación en el Nomarsky; mientras que el núcleo fluorescente en azul se localizó por arriba del capuchón descrito en la observación sin fluorescencia (Fig. 11, columna CTR, fila B-D). Se encontró que la actina filamentosa era marcada fluorescentemente en forma de una banda que va de un extremo lateral a otro (Fig. 11, filas B) y, cuando se incrementó la cantidad de fluorescencia, observada en el microscopio confocal empleado, se encontró que la marca fluorescente de actina filamentosa rodea al capuchón, lo cual da la impresión que la actina cubre a la tubulina y parece estar más pronunciado en la imagen correspondiente al tratamiento de los parásitos con RCB20 (Fig. 11, columna RCB20, fila B). En el caso del marcaje fluorescente para tubulina- α , se encontró que la proteína está localizada en la cola de los cometas y se concentra intensamente, en forma de banda, en la base del capuchón y que en las imágenes de la fila C parece separar a dicho capuchón de los núcleos, los cuales se localizan en los extremos de las células. Otros núcleos no se encontraron asociados a CF. Dependiendo del tipo de tratamiento, la intensidad de la marca fluorescente asociada a la actina filamentosa varía; hay mayor marcaje, al mismo aumento, en las CF de los parásitos tratados con RCB20 (Fig. 11, columna RCB20, fila B). La tubulina- α se observó distribuida a lo largo de las CF de forma diferente dependiente del tratamiento que recibieron los parásitos; en el caso de RCB15 se encontró que no hay una distribución de tubulina semejante a lo observado tanto para el tejido del grupo control y los tratados con SOABZ y RCB20 (Fig. 11, filas B). Bajo el tratamiento con RCB15, las CF sufrieron cambios en su morfología, perdiendo el aspecto de marcaje de la tubulina- α en forma de cometa, además parece que los

núcleos podrían estar colocalizando con la tubulina, por lo cual la fluorescencia es de color rosa; sin embargo, cabría la posibilidad de que, dado que el tejido está compactado, los núcleos están sobrepuestos sobre la cola de los cometas. Bajo el tratamiento con RCB20, las CF están más anchas en los cilios (4 μm) que en el caso del tejido parasitario del grupo control (3 μm) y lo cual corresponde al marcaje fluorescente de la tubulina- α . Apparently, el grosor de algunas CF de los parásitos tratado con SOABZ es semejante al de los tratados con RCB20. La longitud de los cilios en todas las CF, incluidas las de los grupos tratados, no varió, se mantuvo en 11 μm . Los núcleos se mantuvieron compactados y constantes en su diámetro (4.5 μm) sólo en los parásitos del grupo control y de los tratados con SOABZ y RCB20; los del grupo tratado con RCB15 se encontraron expandidos y discontinuos en sus centros, por lo que no tuvieron una forma regular a la observada en los otros casos y por lo consiguiente, su medición es menos precisa (Fig. 11, filas B-D). En la sobreposición de los tres marcajes fluorescentes, se observa la misma distribución en todos los tratamientos, cabe mencionar que en el tejido del tratamiento con RCB15 el marcaje se observa en color rosa, observándose de fondo la marca fluorescente azul de los núcleos (Fig. 11, filas D).

2.1.3 Observaciones al objetivo de 40X. A dos días de tratamiento.

2.1.3.1 Grupo Control (Fig. 12, columna CTR, filas A-D). Según lo observado por Nomarsky, no hubo cambios en la estructura de los tejidos al segundo día de tratamiento y aparentemente estos se mantuvieron igual que los observados al primer día. Respecto al marcaje fluorescente de actina filamentosa,

se encontró que esta es débil tanto al nivel del tegumento como de la CG pero mejor en las CF. Esto es diferente de lo observado con lo revelado por los anticuerpos fluorescentes para tubulina- α , ya que éstos marcaron todo el tegumento así como a las CF. El DAPI se observó marcando a todos los núcleos localizados por abajo del tegumento, así como aquellos alojados en la CG. Según las imágenes obtenidas por la sobreposición de las tres marcas fluorescentes, a nivel de tejido parasitario, da la impresión de que sólo en las CF se mantiene la colocación de actina filamentosa, núcleos y tubulina- α al igual que el primer día de tratamiento.

2.1.3.2 Grupo tratado con SOABZ (Fig. 12, columna SOABZ, filas A-D). De la misma manera como lo descrito para el caso del grupo CTR y por lo observado al día anterior, el marcaje fluorescente de actina filamentosa, núcleos y tubulina- α , continuó igual en el tejido de los cisticercos con respecto al primer día de tratamiento. A este nivel de observación se encontró que tanto las CF del grupo CTR, así como las del grupo tratado con SOABZ presentaron una morfología similar.

2.1.3.3 Grupo tratado con RCB15 (Fig. 12, columna RCB15, filas A-D). Este derivado bencimidazólico aparentemente produjo que el tejido de los parásitos se hiciera más compacto con respecto a los parásitos tratados de los grupos control y SOABZ y que, por ese motivo, se observara un aumento en el número de CF en los campos de observación (Fig. 12, columna RCB15, filas B-D). También, según el efecto del tratamiento, la intensidad en la cantidad de fluorescencia tubulina- α disminuyó dramáticamente a nivel de tegumento. A este nivel de observación, se observó un marcaje fluorescente diferente, tanto para actina filamentosa como

para tubulina- α , en el interior en las CF. La observación de la sobreposición de los marcajes fluorescentes (fluorescencia de color amarillo en la fila D), mostraron que hubo cambios en la morfología de las CF y que la fluorescencia amarilla es mayor a la observada en los tejidos de los parásitos de los grupos CTR y SOABZ.

2.1.3.4 Grupo tratado con RCB20 (Fig. 12, columna RCB20, filas A-D). Como se observa en el Nomarsky, a diferencia de los parásitos con un día de tratamiento, el tejido es más compacto (Fig. 12, Fila A), lo cual podría haber ocasionado que hubiera un aumento en la cantidad de CF, las cuales también sufrieron cambios aparentes en su morfología. La actina filamentosa se encontró con la misma localización en las CF, así como con igual intensidad. En la intensidad de fluorescencia de tubulina- α hubo una disminución en el tegumento. La cantidad de núcleos aumentó en la zona debido a lo compacto del tejido como se muestra en la fila D. A este nivel de observación, se observa un cambio en la morfología de las CF.

2.1.4 Observaciones al objetivo de 100X y sus aumentos digitales. A dos días de tratamiento.

A este nivel de observación, se encontraron varias diferencias en los tejidos de los parásitos (Fig. 13, filas A-D): las observaciones con Nomarsky (fila A), al igual que lo observado en el primer día de tratamiento, las CF asociadas a la CG mantuvieron su forma de cometa en los grupos tanto control como tratados con SOABZ. Según las observaciones, los parásitos luego de recibir el tratamiento con los compuestos RCB15 y RCB20 modificaron su tamaño y grosor de las CF. En el caso de la CG que rodea a las CF, en el tejido del parásito del grupo control, se

observa que esta es laxa a diferencia de la que se encuentra en los tejidos parasitarios asociados a los otros tratamientos. El marcaje fluorescente de la actina filamentosa se presentó como una banda roja en todos los casos (Fila B), mientras que el marcaje fluorescente para tubulina- α se observó que variaba de acuerdo al tratamiento que recibieron los parásitos; las CF en los tejidos de los grupos control y SOABZ mantuvieron su morfología de cometa, pero debido al tratamiento con RCB15 y con RCB20, esta morfología se alteró, con una disminución en la intensidad de fluorescencia en comparación con lo observado para el grupo control y los tratados con SOABZ (Fig. 13, filas C). Según las mediciones de los cilios en las CF, bajo el tratamiento con RCB15, ellas están más anchas ($3.5 \mu\text{m}$) que las vistas en los grupos control y tratado con SOABZ. Observaciones semejantes se obtuvieron bajo el tratamiento con RCB20. También, la longitud de los cilios de las CF (medida desde la parte apical hasta la base), vario con respecto a lo observado para los grupos control y tratado con SOABZ, ya que su medición es de $11 \mu\text{m}$, mientras que para el RCB15, de $6 \mu\text{m}$ y para el RCB20, $19 \mu\text{m}$. En lo que se refiere a los núcleos, éstos se mantuvieron compactados y constantes en su diámetro ($4.5 \mu\text{m}$), tanto para los tejidos de los parásitos del grupo control y de los tratados con SOABZ; sin embargo, para los de los grupos tratados con RCB15 y RCB20 se encontraron expandidos y discontinuos de sus centros, lo cual no permitió una medición precisa de sus diámetros. La sobreposición de los tres marcajes fluorescentes es rosa, bajo el tratamiento con RCB20.

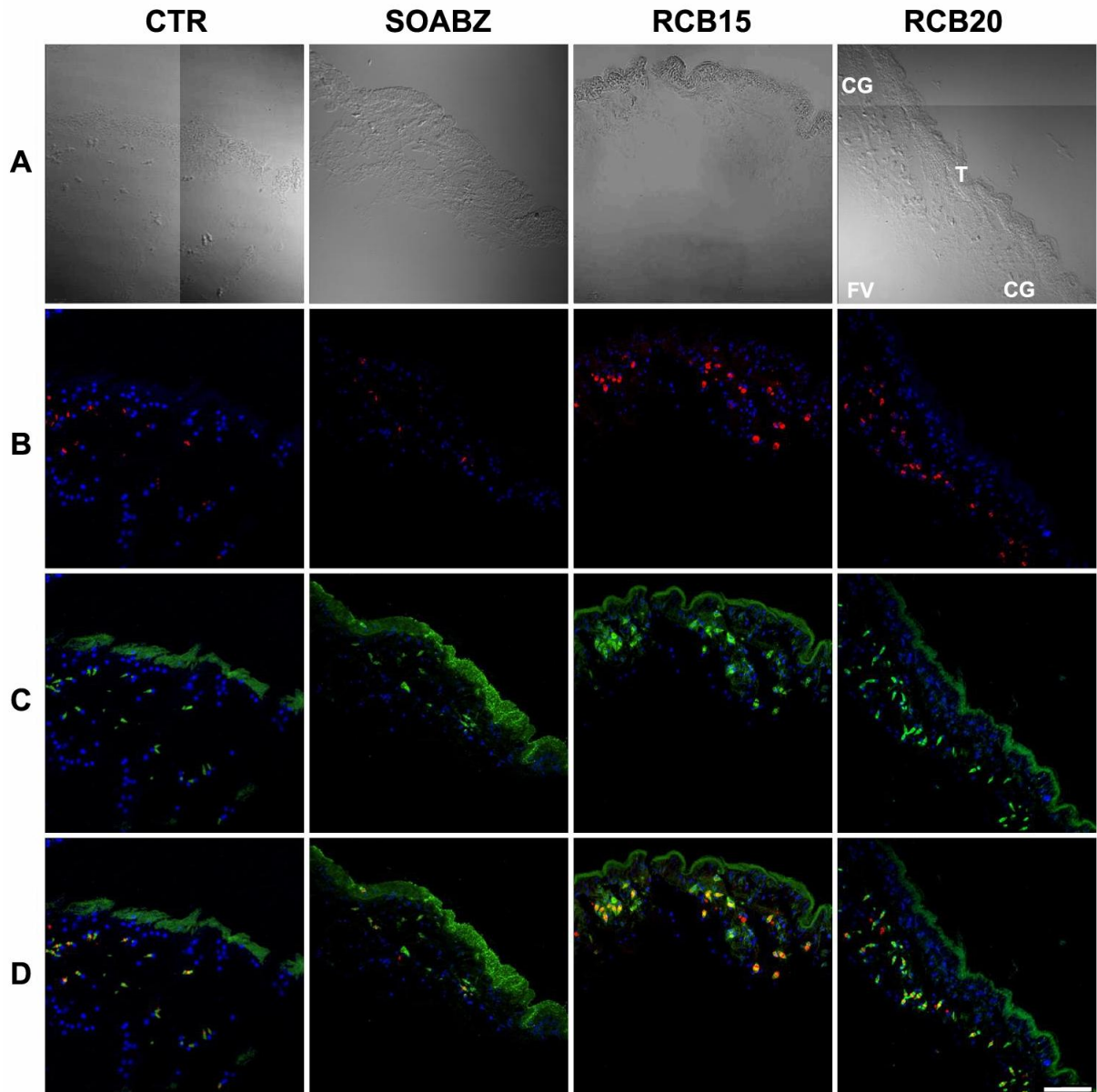


Figura 10. Marcaje fluorescente de actina filamentosa, tubulina- α y ADN en pared vesicular de cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF. A un día de cultivo *in vitro*, en ausencia o en presencia de BZM, los parásitos se procesaron para su observación por microscopía confocal; Nomarsky (fila A), fluorescencia emitida en rojo por la faloidina rodaminada (fila B), fluorescencia emitida en verde por los anticuerpos fluoresceinados (fila C) y la combinación de todos los tipos de fluorescencia (fila D). En todos los casos de fluorescencia se hicieron reaccionar los tejidos con DAPI (fluorescencia azul). Se muestran las PV de los parásitos del grupo control (CTR), tratados con SOABZ, RCB15 y RCB20. Todos los BZM se usaron a una sola concentración de 6.6 μ M. La escala corresponde a 50 μ m.

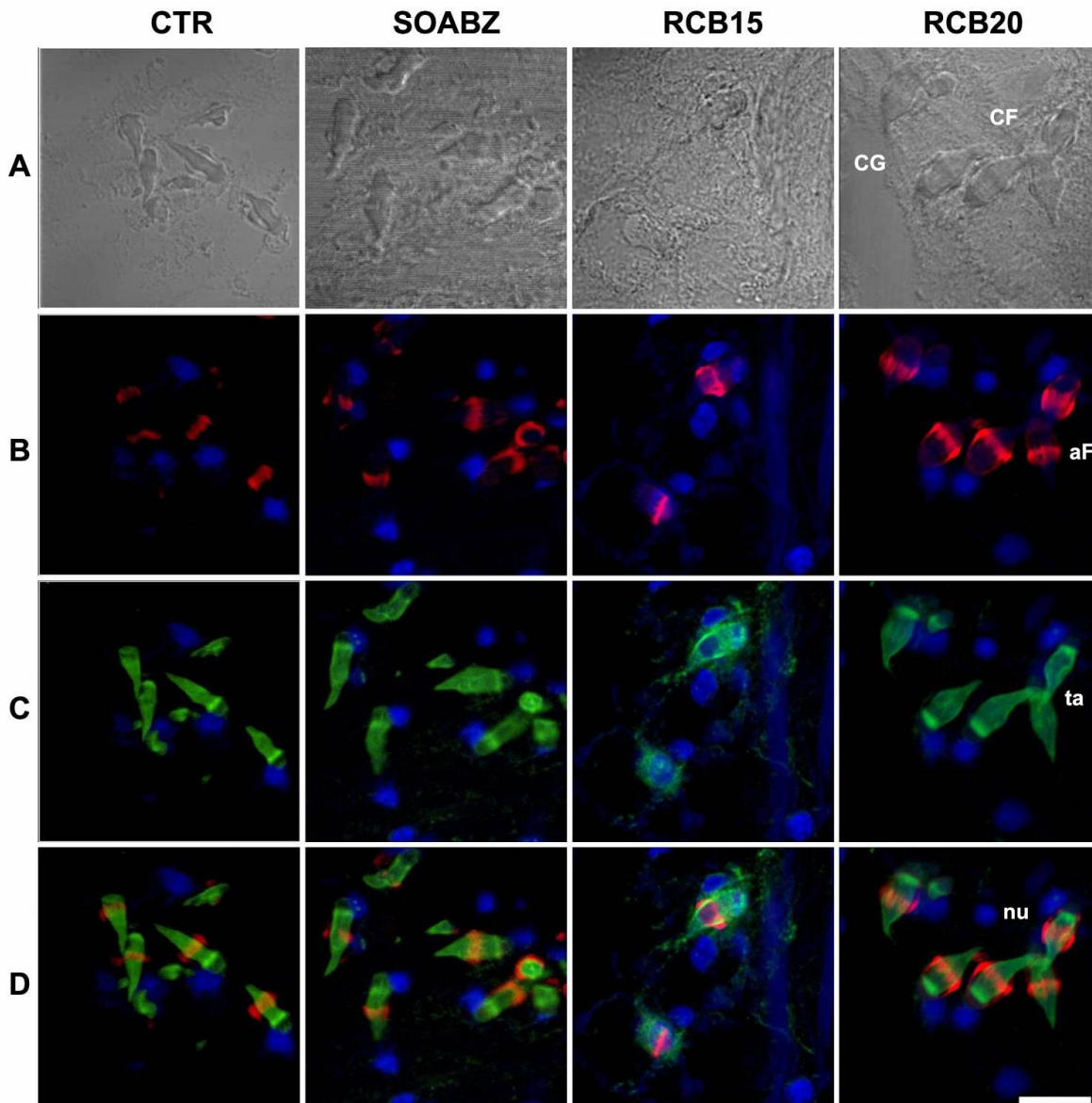


Figura 11. Marcaje fluorescente de células flama de cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF. A un día de cultivo *in vitro*, en ausencia o en presencia de BZM, los parásitos se procesaron para su observación por microscopía confocal; Nomarsky (fila A), fluorescencia emitida en rojo por la faloidina rodaminada (fila B), fluorescencia emitida en verde por los anticuerpos fluoresceinados (fila C) y la combinación de todos los tipos de fluorescencia (fila D). En todos los casos de fluorescencia se hicieron reaccionar los tejidos con DAPI (fluorescencia azul). Se muestran las PV de los parásitos del grupo control (CTR), tratados con SOABZ, RCB15 y RCB20. Todos los BZM se usaron a una sola concentración de 6.6 μM . La escala corresponde a 10 μm .

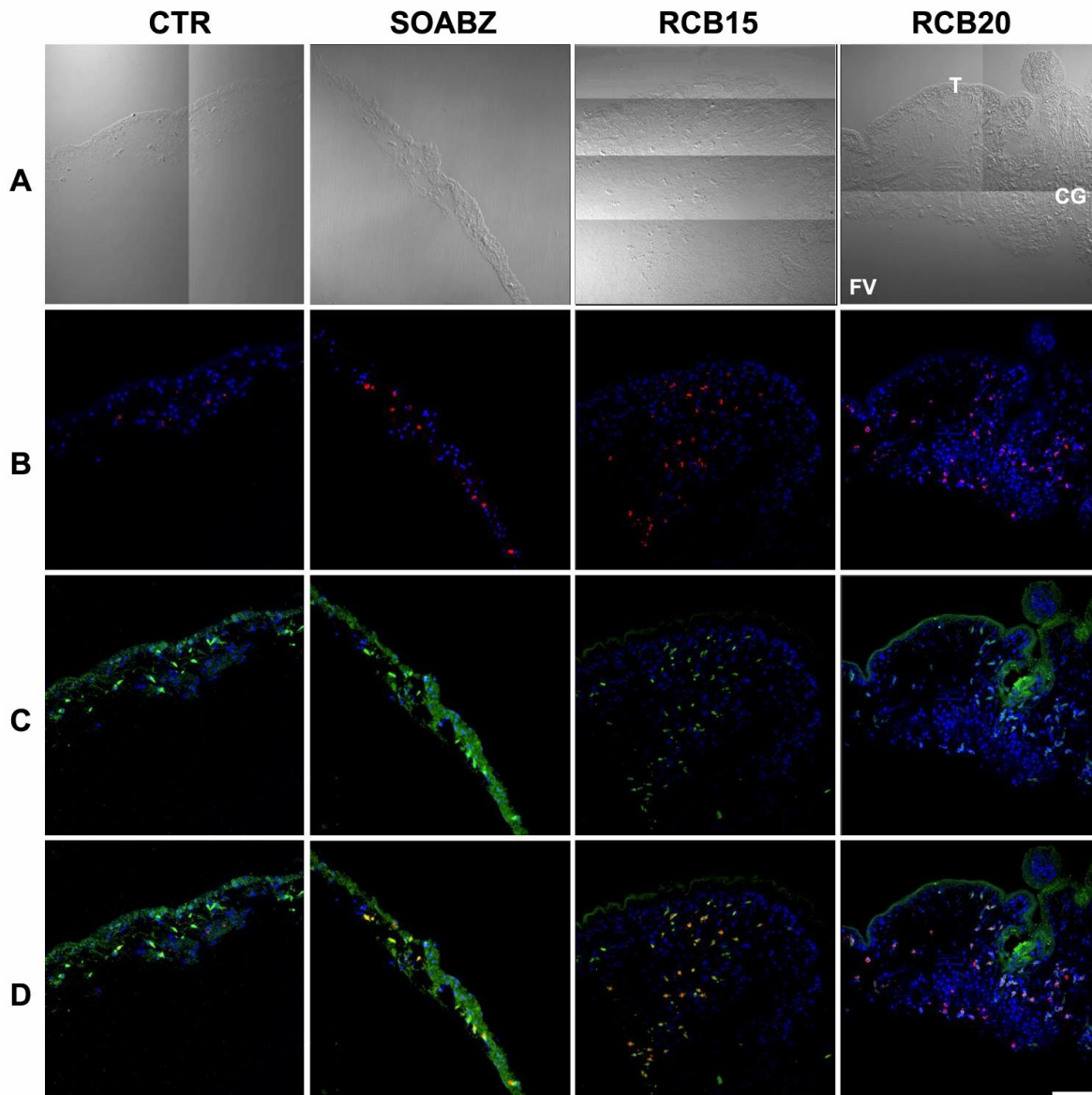


Figura 12. Marcaje fluorescente de actina filamentosa, tubulina- α y ADN en pared vesicular de cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF. A dos días de cultivo *in vitro*, en ausencia o en presencia de BZM, los parásitos se procesaron para su observación por microscopía confocal; Nomarsky (fila A), fluorescencia emitida en rojo por la faloidina rodaminada (fila B), fluorescencia emitida en verde por los anticuerpos fluoresceinados (fila C) y la combinación de todos los tipos de fluorescencia (fila D). En todos los casos de fluorescencia se hicieron reaccionar los tejidos con DAPI (fluorescencia azul). Se muestran las PV de los parásitos del grupo control (CTR), tratados con SOABZ, RCB15 y RCB20. Todos los BZM se usaron a una sola concentración: 6.6 μ M. La escala corresponde a 50 μ m.

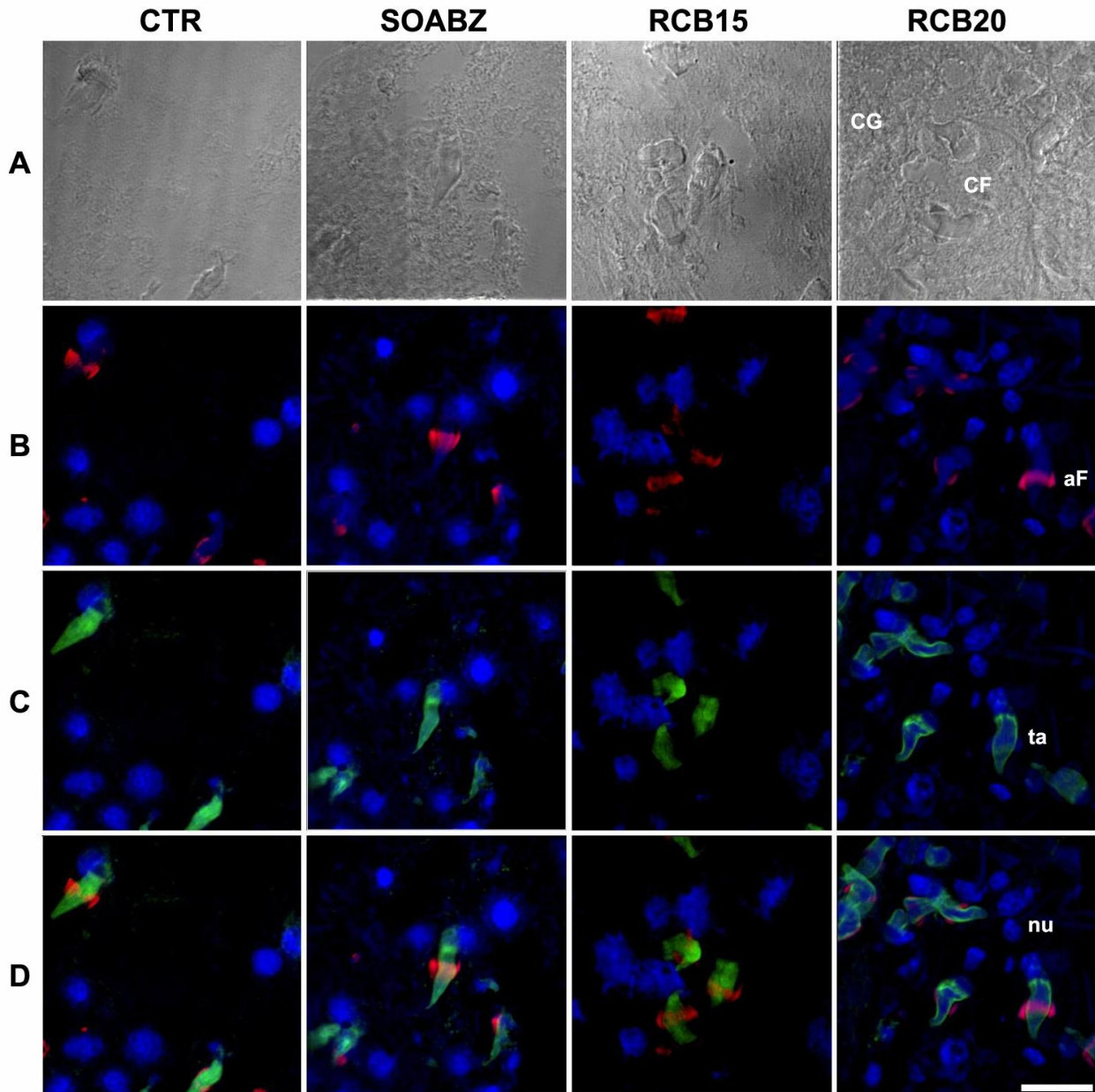


Figura 13. Marcaje fluorescente de células flama de cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF. A dos días de cultivo *in vitro*, en ausencia o en presencia de BZM, los parásitos se procesaron para su observación por microscopía confocal; Nomarsky (fila A), fluorescencia emitida en rojo por la faloidina rodaminada (fila B), fluorescencia emitida en verde por los anticuerpos fluoresceinados (fila C) y la combinación de todos los tipos de fluorescencia (fila D). En todos los casos de fluorescencia se hicieron reaccionar los tejidos con DAPI (fluorescencia azul). Se muestran las PV de los parásitos del grupo control (CTR), tratados con SOABZ, RCB15 y RCB20. Todos los BZM se usaron a una sola concentración de 6.6 μ M. La escala corresponde a 10 μ m.

2.2. Localización de miosina tipo II y ADN.

El marcaje fluorescente de las fibras de miosina, así como de los núcleos, se muestran en las figuras 14 y 15. Los marcajes corresponden a tejido de los parásitos correspondientes a la PV en una región diferente a los polos. Como se había observado anteriormente, al utilizar el Nomarsky, el tratamiento con los compuestos RCB15 y RCB20 produjo un engrosamiento del tejido. Bajo el marcaje fluorescente del grupo control, se encontró como se distribuían las fibras musculares en el tegumento junto con los núcleos y lo mismo sucedió en el caso del tratamiento con el SOABZ. Sin embargo, luego del tratamiento con los derivados, hubo serias alteraciones del tejido y a que las fibras no sólo estaban asociadas en el tegumento, sino que también se encontraban dispersas por la CG.

2.2.1. Observaciones al objetivo de 100X. A un día de tratamiento.

Después de un día de tratamiento (Fig. 14), se encontró que las fibras musculares tanto del grupo control como las del tratamiento con SOABZ son cortas, se encuentran en pares y se proyectan hacia un sentido del tegumento. Los núcleos en estos tratamientos se encuentran asociados a las fibras musculares (Fig. 14, columnas CTR y SOABZ, filas B). En el tratamiento con RCB15, aún cuando hay un reconocimiento por el AcP antimiosina, no se observó un reconocimiento de fibras, con forma y longitud definida como en el caso de los tejidos del control y el tratamiento con SOABZ y, la fluorescencia con los anticuerpos antimiosina muestran un tejido desordenado, además, no hubo marca fluorescente de los núcleos asociada a las fibras (Fig. 14, columna RCB15, fila B). Para el RCB20, al igual que en tratamiento con RCB15, no se observaron fibras

musculares y, aunque los núcleos estaban teñidos, el tamaño de estos es mayor a lo que se observó bajo los otros tratamientos, además de que no tuvieron una forma definida como las de los grupos control y tratado con SOABZ (Fig.14, columna RCB20, fila B).

2.2.2. Observaciones al objetivo de 100X. A dos días de tratamiento.

Según lo observado por Nomarsky, para los grupos control y tratamiento con SOABZ, no hubo cambios en la estructura de los tejidos al segundo día de tratamiento y, aparentemente, estos se mantuvieron igual que los observados al primer día. En el caso del marcaje fluorescente de miosina II, se encontró que esta sobre el tegumento de los tejidos en forma de fibras para los mismos tratamientos. En el tratamiento con RCB15 hubo disminución en la intensidad de fluorescencia de miosina a nivel de tegumento y, en la CG, las fibras se presentan en desorden y los núcleos no se encuentran asociados a las fibras (Fig. 15, Columna RCB15, fila B). En cambio, para el tratamiento con RCB20, la marca fluorescente para miosina II, aparentemente es similar al primer día de tratamiento, con un aumento en la cantidad de núcleos debido a la compactación de tejido, pero no se encuentran asociados a fibras (Fig. 15, columna RCB20, fila B). En los tratamientos con RCB15 y con RCB20, no se observan núcleos a nivel de tegumento.

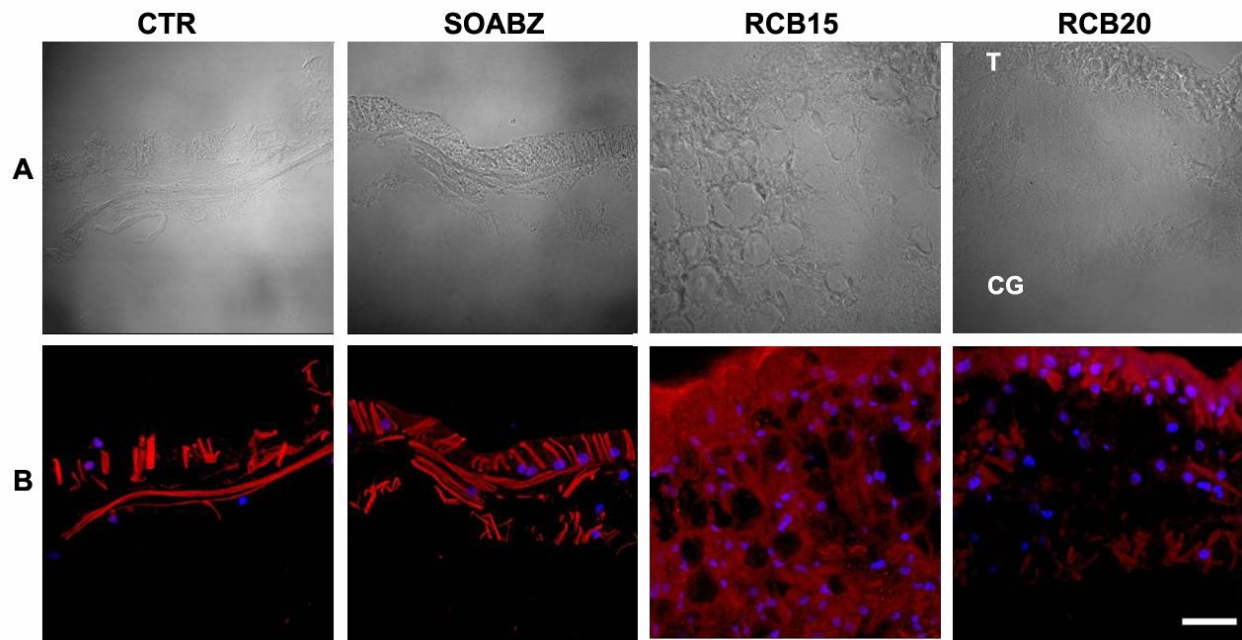


Figura 14. Marcaje fluorescente de miosina tipo II y ADN en pared de cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF. A un día de cultivo *in vitro*, en ausencia o en presencia de BZM los parásitos se procesaron para su observación por microscopía confocal y se observaron por Nomarsky (fila A), con los anticuerpos antimiosina II revelados por la avidina rodaminada, fluorescencia roja, y con DAPI para la identificación de los núcleos, fluorescencia azul (fila B). La colocalización de los diferentes marcajes fluorescentes y el tejido se observa en la fila D. Los cortes de tejidos corresponden a la PV de los parásitos del grupo control (CTR), tratados con SOABZ, con RCB15 y con RCB20. Los BZM se utilizaron a una concentración de 6.6 μ M. La escala corresponde a 20 μ m.

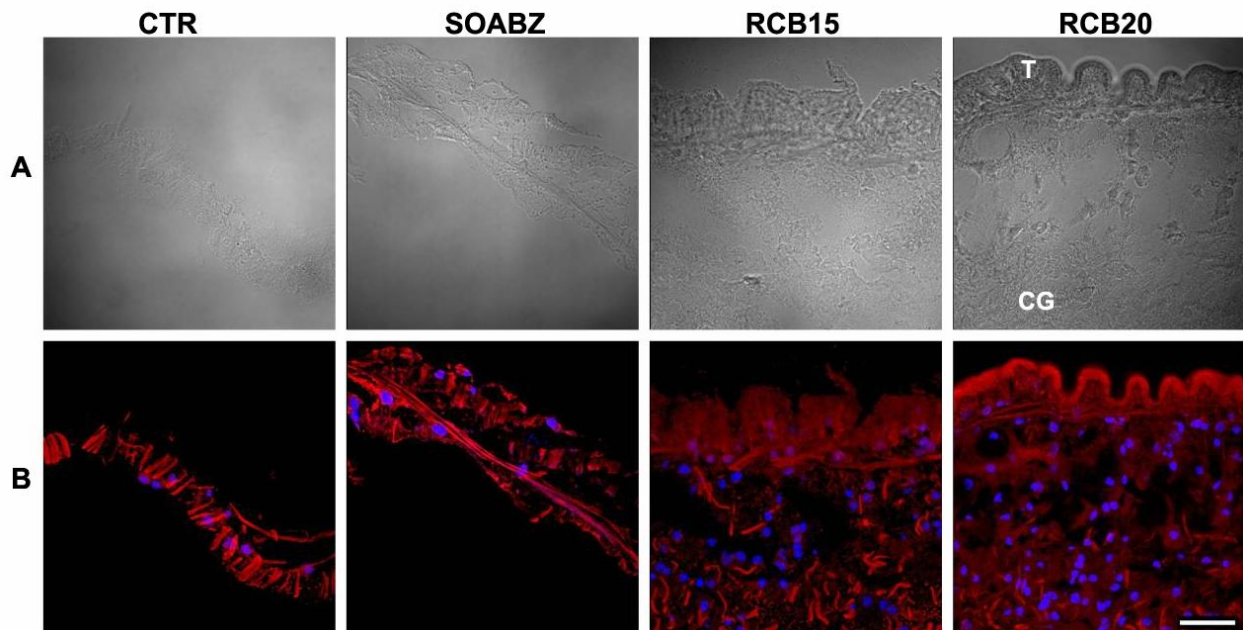


Figura 15. Marcaje fluorescente de miosina II, y ADN en PV de cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF. A dos días de cultivo *in vitro*, en ausencia o en presencia de BZM, los parásitos se procesaron para su observación por microscopía confocal y se observaron por Nomarsky (fila A), con los anticuerpos antimiosina II revelados por la avidina rodaminada, fluorescencia roja, y con DAPI para la identificación de los núcleos, fluorescencia azul (fila B). La colocalización de los diferentes marcajes fluorescentes y el tejido se observa en la fila D. Los cortes de tejidos corresponden a la PV de los parásitos del grupo control (CTR), tratados con SOABZ, con RCB15 y con RCB20. Los BZM se utilizaron a una concentración de 6.6 μ M. La escala corresponde a 20 μ m.

3. Observaciones mediante microscopía electrónica de barrido.

Las imágenes presentadas, con sus respectivos aumentos (Fig. 16-18), corresponden a parásitos que se tomaron de cada uno de los diferentes tratamientos correspondientes a los mostrados en la figura 8. Las imágenes que se muestran se consideraron de acuerdo a los días en los que se hubo efecto de los derivados del BZM en los parásitos. De las imágenes mostradas, se hicieron observaciones semejantes para todos los tratamientos, en por lo menos tres parásitos, y, de ellas, se hicieron selecciones de las representativas para cada caso.

3.1. Morfología de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

Como se observa en la imagen A (Fig. 16), el parásito del grupo control presentó su vesícula, tanto en tamaño como en apariencia, normal con superficie lisa, luego de los once días de cultivo *in vitro*. El parásito de 3 mm de largo y 1.2 mm de ancho, presentó gemación en uno de sus polos, mientras que, en el polo contrario, la superficie parece estar contraída hacia el interior del parásito. Observaciones semejantes se hicieron en dos parásitos del mismo grupo y no se encontró diferencia alguna en lo observado en ellos.

En el caso del cisticerco de la imagen B (Fig. 16), perteneciente al grupo con tratamiento con SOABZ, luego de once días de cultivo *in vitro*, se encontró que su tamaño había disminuido a 2.4 mm de longitud y a 0.64 mm de diámetro. La apariencia de su superficie, en comparación con la del cisticerco del grupo control, se encontró con diferente textura; rugosa, contraída y con muchos

pliegues transversales. Aparentemente, en el caso de las gemas, estas se encontraron de menor tamaño, pero con la misma textura que se encontró para las del parásito del grupo control.

En el cisticerco de la imagen C (Fig. 16), pertenecientes al grupo tratado con RCB15, luego del primer día de cultivo *in vitro*, se observó una disminución notable del tamaño (1.9 mm de longitud y 0.7 mm de diámetro), con una superficie claramente rugosa, llena de pliegues principalmente longitudinales. Al nivel de los polos, en ambos, el cuerpo del parásito sufre una torsión, mientras que la gema está totalmente contraída y presenta la misma textura que el resto del parásito.

En el caso del tratamiento con RCB20 (Fig. 16, D), al segundo día de cultivo, el parásito disminuyó su tamaño (1.9 mm de longitud y 0.54 mm de diámetro) y su superficie es distinta de todos los otros parásitos observados (Fig.16, A-C). Presenta una rugosidad diferencial a la observada en el parásito tratado con SOABZ, en donde, mientras en uno de los polos hay mayor contracción del cuerpo del parásito; en el otro polo, la rugosidad de la superficie es tan marcada. La gema, aparentemente, no sufrió daño alguno por el tratamiento.

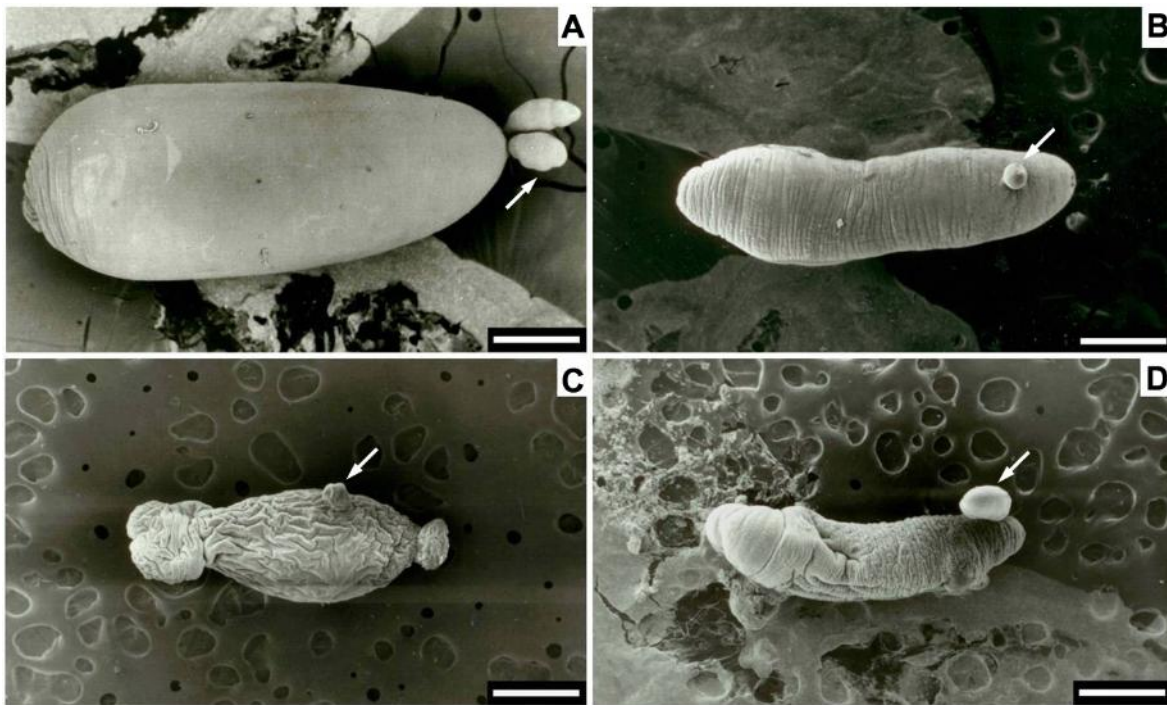


Figura 16. Observación mediante MEB de cisticercos de *T. crassiceps* ORF mantenidos en cultivo *in vitro* en ausencia o en presencia de BZM. Las imágenes corresponden a parásitos seleccionados de los diferentes grupos tratados con BZM (B, C, D), así como del grupo control (A). Mientras que las imágenes A y B corresponden a parásitos incubados *in vitro* luego 11 días de cultivo en RPMI 1640, DMSO al 0.092 % y etanol al 0.055% y SOABZ 6.6 μ M, respectivamente, en C y D los parásitos se observaron luego de un día de incubación en presencia de RCB15 6.6 μ M y luego de dos días de incubación con RCB20 6.6 μ M. Las flechas completas señalan a las gemas de cada parásito. La escala equivale a 500 μ m.

3.2 Morfología de la superficie de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

En las imágenes de la figura 17, correspondientes a observaciones con mayor aumento de los cisticercos mostrado en la figura 16, se observaron diferencias que se presentan a continuación: En el cisticerco del grupo control, su superficie es lisa, con pliegues finos y con huecos aparentes (Fig. 17, A). En el caso del tratamiento con SOABZ, la superficie no es tan lisa como en el caso del parásito del grupo control, pero presenta pliegues más profundos y marcados (Fig. 17, B). En el caso del parásito tratado con RCB15, se encontró que su superficie de los parásitos no es continua, presenta muchas sinuosidades con pliegues profundos y los surcos siguen diferentes direcciones (Fig. 17, C). En el parásito del tratamiento con RCB20 se encontró que su superficie tiene mayor cantidad de pliegues y sinuosidades que las observadas en el parásito tratado con RCB15; estas sinuosidades son de menor tamaño y en mayor número y el tejido se observa más deteriorado aparentemente (Fig. 17, D).

Observaciones a mayores aumentos de las presentadas en la figura 17 muestran la superficie llena de microtriquias (mt). En el caso del parásito del grupo control (Fig. 18, A) se observa que las mt son alargadas y en gran parte de los casos, las puntas de varias de ellas se encuentran aparentemente unidas. En el caso del tratamiento con SOABZ (Fig. 18, B), las mt tienen un tamaño menor, no están unidas en sus puntas como en el caso del parásito del grupo control y se presentan en desorden. Con los tratamientos con RCB15 y RCB20 (Fig. 18, C y D, respectivamente) no se observa la morfología típica de ribete de cepillo que se muestra en la imagen A del parásito del grupo control (Fig. 18). Aparentemente, en

ambos casos, las mt han desaparecido y ello ha dado lugar a que se presenten estructuras que podrían corresponder a cuerpos celulares en forma de esfera y de filamentos delgados dispersos, en el caso del tratamiento con el RCB15 (Fig. 18, C); mientras que, en el caso del tratamiento con RCB20, hay una gran cantidad de fibras filamentosas con cuerpos celulares agregados y de mayor tamaño a los observados con el tratamiento con RCB15 (Fig. 18, D). Apparently, in the treatments with RCB15 and RCB20 the mt have been lost and the germinal layer of the parasitic tissues has been exposed.

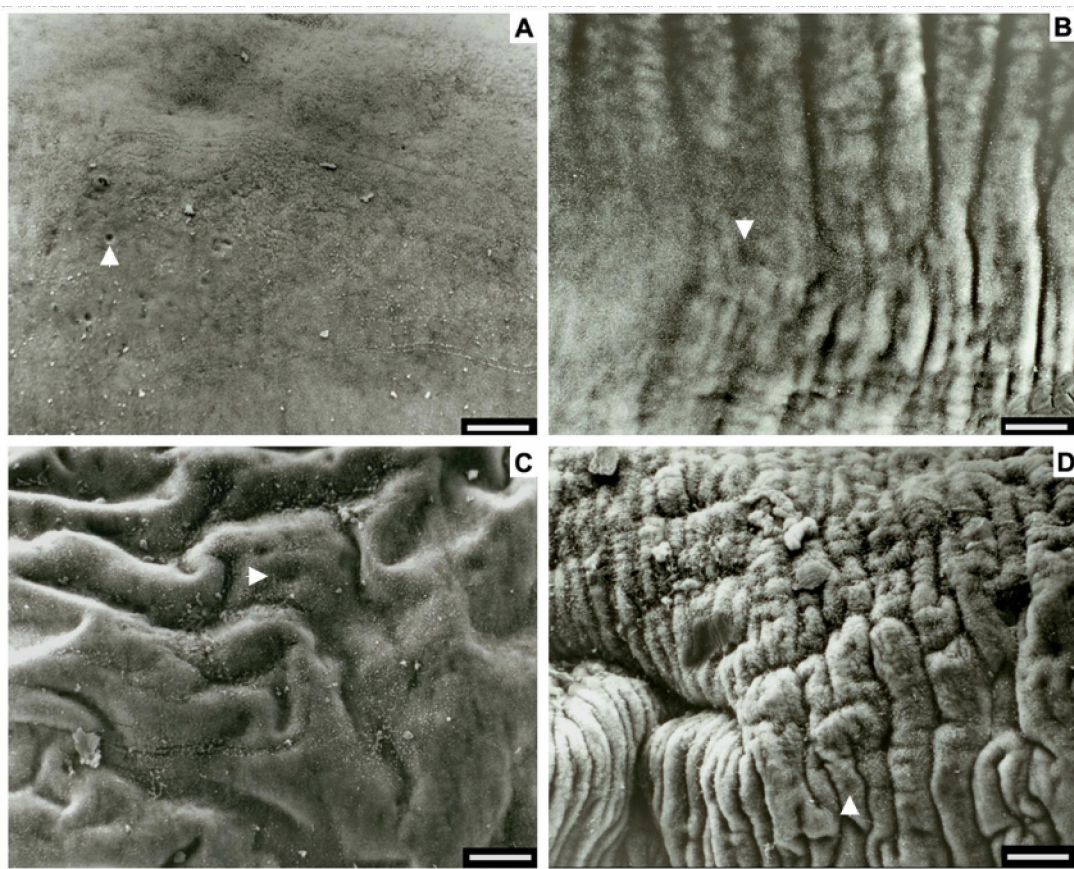


Figura 17. Observación mediante MEB de la superficie de cisticercos de *T. crassiceps* ORF mantenidos en cultivo *in vitro*, en ausencia o en presencia de BZM. Las imágenes corresponden a aumentos de 200X de los parásitos presentados en la figura 16. Las cabezas de flecha indican los sitios en los que aparentemente la superficie de los parásitos presenta huecos. La escala equivale a 50 μ m.

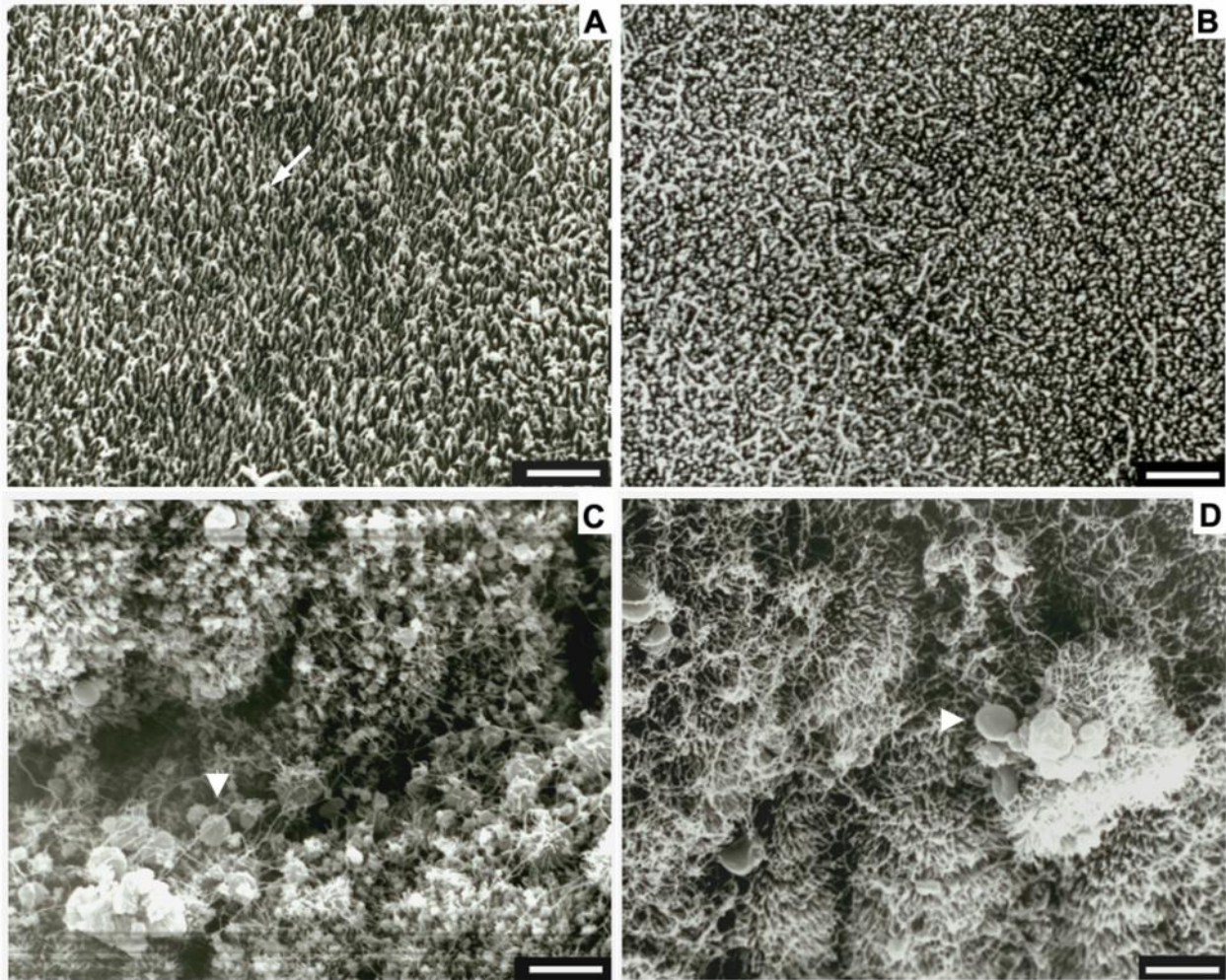


Figura 18. Observación mediante MEB de la superficie de cisticercos de *T. crassiceps* ORF mantenidos en cultivo *in vitro*, en ausencia o en presencia de BZM. Las imágenes corresponden a aumentos de 2000X de los parásitos presentados en la figura 16. Las flechas indican los aglomerados de las puntas de microtriquias, mientras que las cabezas de flechas señalan los cuerpos celulares en el caso de los parásitos tratados con RCB15 y RCB20. La escala equivale a 5 μ m.

VI. DISCUSION DE RESULTADOS

Debido a que el tratamiento de las infecciones parasitarias se considera de importancia para la salud pública en países en desarrollo, la búsqueda de nuevos fármacos o el rediseño de los que ya están en uso es una estrategia que ha sido recomendada por la OMS. Se espera que los cambios que hayan sido producidos en las moléculas seleccionadas ayuden a evitar los problemas derivados por las fallas en los tratamientos terapéuticos, los efectos secundarios y la resistencia que se considera que se desarrollarán, o ya están en desarrollo, por fármacos de esta naturaleza. Dentro de estos aspectos, el grupo de químicos orgánicos asociados al grupo de trabajo en el que se desarrolló la presente tesis, se ha propuesto mejorar las características de los fármacos basados en la molécula del BZM.

Estudios recientes, en los que se evaluaron dos compuestos derivados del BZM, el RCB15 y el RCB20, mostraron que cuando se adicionaban al medio de cultivo a una concentración de 2.5 µg/mL alteraban macroscópicamente la morfología de los cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF. Estos derivados, en comparación con el SOABZ, se encontró que provocaban mayor daño en tiempos de cultivo menores (de 1 a 2 días) en los parásitos (García-Vilchis, 2007), por lo cual se consideró la necesidad de evaluar el efecto *in vitro* derivados RCB15 y RCB20, tanto en los cambios morfológicos, así como en la expresión de proteínas del citoesqueleto de los parásitos.

Como se observó en la figura 8, tanto el RCB15 como el RCB20 tuvieron un

efecto más rápido en la alteración morfológica de los parásitos al primer y segundo días de la incubación, en comparación con el SOABZ, el cual tuvo su máximo efecto a partir del día 11 de tratamiento, con un efecto menor en los parásitos. Los resultados obtenidos fueron semejantes a lo publicado por Palomares *et al* (2004; 2006) en el caso del SOABZ y lo cual es un reflejo del claro efecto *in vitro* de los derivados RCB15 y RCB20. Considerando que los BZM tienen su principal acción en la inhibición de la polimerización de los MT, por la unión directa con la tubulina- β , se supone esto podría ser causa de que los parásitos sufran cambios morfológicos y parálisis que lleva a que su hospedero sea capaz de eliminarlo (Robinson *et al*, 2004) y, lo cual podría explicar los resultados obtenidos con los tratamientos con RCB15 y RCB20, en donde se presentan efectos semejantes. Pero este fenómeno se ha visto que es reversible en nematodos como el *Haemonchus contortus* y, por lo consiguiente, los parásitos tienen la capacidad de recuperarse y llegar a desarrollar resistencia (Kwa *et al*, 1994). En el caso de los cisticercos de *T. crassiceps* y de *T. solium* se ha establecido que es la exposición continua y prolongada al SOABZ, lo que produce que los parásitos se dañen, pero ello no es suficiente y por lo cual se considera que ellos necesitan ser tratados en conjunto con otros fármacos antihelmínticos como el PZQ y la nitazoxanida (Palomares *et al*, 2004; 2006; 2007).

En los resultados de la presente tesis, mostrados en la figura 9, los cisticercos se recuperaron del efecto del SOABZ luego de haber sido cambiados a un medio de cultivo en el había ausencia de compuesto, a diferencia de los tratados con los derivados RCB15 y RCB20, los cuales no lograron recuperarse del daño causado. El que los compuestos RCB15 y RCB20 provoquen daños en

los parásitos, mas rápido de lo que hizo el SOABZ, podría estar asociado con que ellos tienen un modo de acción distinto; el efecto es tal que los parásitos no son capaces de recuperarse luego de haberles retirado el medio de cultivo con compuesto. Sin embargo, la garantía de que los parásitos han sido dañados irreversiblemente tendría que ser evaluado, en relación a su viabilidad, mediante la infección de ratones con los parásitos tratados. Se sabe que los cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF son parásitos que poseen células que les permite que sus tejidos se recuperen totalmente luego de una infección experimental (Toledo *et al*, 1997).

De acuerdo a lo descrito para las imágenes de las figuras 10 y 12, de todos los marcajes fluorescentes, sólo en el caso de la tubulina- α hubo una disminución notable de la fluorescencia en el tegumento, luego del tratamiento con RCB15 y RCB20. Lo cual podría indicar, que el cambio ocasionado está asociada al mecanismo de acción sobre las tubulinas que se conoce para los BZM; se ha propuesto que los BZM actúan inhibiendo la polimerización de los MT al unirse a la tubulina- β (Lacey, 1988). Aunque en los presentes experimentos se empleó un AcM anti-tubulina- α , es bien conocido que la formación de los polímeros de tubulina involucran forzosamente la unión de heterodímeros de tubulina- α y tubulina- β (Alberts *et al*, 2002); por lo consiguiente, al disminuir la cantidad de MT por su despolimerización, disminuye la cantidad de tubulina- α que haya sido fluoresceinada. Debido a que en el tegumento se requiere de una gran cantidad de MT polimerizados, con la finalidad de que se lleve a cabo el intenso tráfico vesicular que ahí se efectúa, necesario para la internalización y secreción de

proteínas que estos parásitos requieren (Ambrosio *et al*, 1994; Smyth and McManus, 1989), el efecto de los derivados de los BZM podría estar tener asociación con la alteración de los procesos fisiológicos de nutrición, osmorregulación, destoxificación y liberación de sustancias de desecho de los parásitos. Luego, esta disminución de tubulina- α también se encontró en el nivel de las CF (Fig. 11 y 13) y ello podría tener relación con lo observado en la figura 8, en donde los parásitos se observaron dañados por la pérdida de tamaño y de su FV. Esto podría ser un efecto debido a la intoxicación que los parásitos pudieron haber sufrido al no tener un mecanismo de excreción funcional, ya que las CF, al ser las unidades básicas del los protonefridios de los helmintos, se encuentran dañadas. Se ha establecido que el SP es necesario para que los parásitos eliminen los desechos de metabolismo, así como de otras sustancias no útiles (Barnes, 1994; Smyth & McManus, 1989).

La composición celular de las CF se ha hecho mediante histoquímica, o inmunohistoquímica, como lo efectuado para *Diphyllbothrium dendriticum* (Wahlberg, 1998), *Gymnorhynchus gigas* (Moreno *et al*, 2001), *Schistosoma mansoni* (Bahia *et al*, 2005) y *T. solium* (Valverde-Islas, 2007). En los experimentos realizados, mediante marcaje fluorescente de algunos componentes del citoesqueleto, se ha establecido la forma del marcaje para la actina en las CF y se ha establecido que esta rodea, en forma de anillo, a dichas células (Bahia *et al*, 2005; Wahlberg, 1998); sin embargo, en el caso de *T. solium*, la actina se encuentra rodeando a los cilios de CF, a manera de una hebilla que vá desde el núcleo revelado fluorescentemente por DAPI (extremo apical), abarca la zona de

cuerpos basales y llega al inicio de los cilios (extremo basal), en los cuales la tubulina ha sido evidenciada fluorescentemente con los anticuerpos respectivos (Valverde-Islas, 2007). En estudios de evaluación del efecto del SOABZ, en cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF (Palomares *et al*, 2006), se encontró que uno de los efectos *in vitro* más importantes del fármaco antiparasitario afecta la morfología de las CF y ello corresponde con lo que se ha propuesto en relación de que el SOABZ es efectivo para la destrucción de la organización de protofilamentos (Lacey, 1988).

Debido a que la tubulina- α , de los cisticercos evaluados en el presente proyecto de tesis, se encontró alterada, tanto en cilios de las CF y en el tegumento, cabría la posibilidad de que los derivados RCB15 y RCB20 estuvieran actuando específicamente en isoformas de estas regiones; porque, aparentemente, no hubo alteración de la tubulina de la capa germinal. Existen evidencias, con otro derivado de BZM diferente a los empleados en la presente tesis, denominado como compuesto alfa, el cual causa una disminución significativa en la expresión de tubulina- α en cepas resistentes de *Fasciola hepatica* a triclabendazol (TCBZ) (McConville *et al*, 2007). Una comparación de las estructuras químicas del TCBZ, el compuesto- α y los derivados RCB15 y RCB20 muestra que estos compuestos químicos tienen una amplia semejanza; mientras que los dos primeros tienen una sustitución 2-metiltio, los segundos tienen una sustitución 2-trifluorometilo (Fig. 18). El parecido estructural, así como la disminución en la intensidad de fluorescencia en el tegumento de los parásitos, podrían ser indicativos de que la tubulina podría ser el blanco de acción de los

derivados RCB15 y RC20; y ello podría indicar que su mecanismo de acción es semejante.

Con el empleo del AcP anti-miosina tipo II (Ambrosio *et al*, 1997) en los tejidos de los parásitos se encontraron importantes diferencias en los casos de los parásitos tratados con RCB15 y RCB20; mientras que los tejidos de los parásitos del grupo CTR y del tratado con SOABZ se encontró que la fluorescencia estaba asociada a fibras musculares, las cuales presentaron una distribución clásica semejante a lo reportado para cisticercos de *T. solium* (Ambrosio *et al*, 1997), bajo el tratamiento con RCB15 y RCB20 no hubo marcaje fluorescente de fibras musculares. En todos los casos, los núcleos de las células estuvieron marcados por el DAPI y en el caso de los grupos CTR y SOABZ se encontró que los núcleos podrían estar asociados a las fibras musculares correspondientes, mientras que en los otros tratamientos, no se encontró que los núcleos estuvieran asociadas a alguna célula en especial. Según las observaciones por Normansky, cuando se tiñeron fluorescentemente a las fibras musculares, éstas estuvieron localizadas por debajo del tegumento (Fig. 14, A), mientras que en el caso de los tratamientos con RCB15 y RCB20 la marca fluorescente se dispersó por todo el tejido de los parásitos y, al segundo día, luego del tratamiento con RCB20, se encontró un marcaje fluorescente disperso, hubo uno asociado con toda la parte superficial del tegumento (Fig. 15). Cabría la posibilidad de que por el efecto con estos compuestos se haya producido alguna alteración en las fibras musculares y que, aparentemente, podría estar asociado con su destrucción o bien, con la inducción de la expresión de otro tipo de miosina no muscular. El anticuerpo antimiosina, aún cuando es específico, es un AcP que podría tener reconocimiento hacia otro

tipo de miosinas y en este caso, el aumento de la concentración de alguna miosina diferente en la superficie del tegumento la reacción es intensa. Esto es de llamar la atención, ya que se sabe que las miosinas tipo II son proteínas altamente conservadas, que se les puede encontrar principalmente asociadas a varios tipos de tejidos musculares, pero que también pueden encontrarse en otras regiones no musculares como podría ser el caso de los cestodos (Smyth & McManus, 1989). En estos parásitos se ha encontrado que hay dos tipos de sistemas musculares; uno de tipo somático corresponde a aquel que le da forma y locomoción a los parásitos y el otro, que no es somático, que corresponde a los que se encuentran en órganos de adhesión, en el tracto digestivo, de aquellos que lo posean, y en los tractos reproductores (Mousley *et al*, 2005). Las fibras musculares en los metacestodos son células musculares simples, alargadas, curvas y cortas, las cuales pueden tener una disposición longitudinal, transversal o circular dependiendo del sitio en donde se observen a los parásitos (Ambrosio *et al*, 1997; 2003; Slais, 1970). Las fibras musculares se pueden encontrar entrelazadas como parte de mallas musculares tanto en el tegumento del escólex invaginado o, bien, en forma de ramilletes de fibras que se distribuyen por debajo de las membranas basales y entre los citones subtegumentarios a nivel de PV. Se ha demostrado, por ensayos bioquímicos e inmunoquímicos, que hay regiones compartidas entre las miosinas tipo II de cisticercos de *T. solium*, *T. taeniaformis* y *T. crassiceps*, así como en adultos de *T. solium*, *T. taeniaformis* y *T. saginata* (Cruz-Rivera *et al*, 2006) y ello podría ser una explicación de porqué los anticuerpos antimiosina utilizados reconocieron a los tejidos de los cisticercos de *T. crassiceps* evaluados en el presente proyecto de tesis. Por los resultados obtenidos y las implicaciones

presentadas, cabría la posibilidad de que las proteínas que están contenidas en las fibras musculares, pudieran estar involucradas en el mecanismo de acción de los compuestos RCB15 y RCB20.

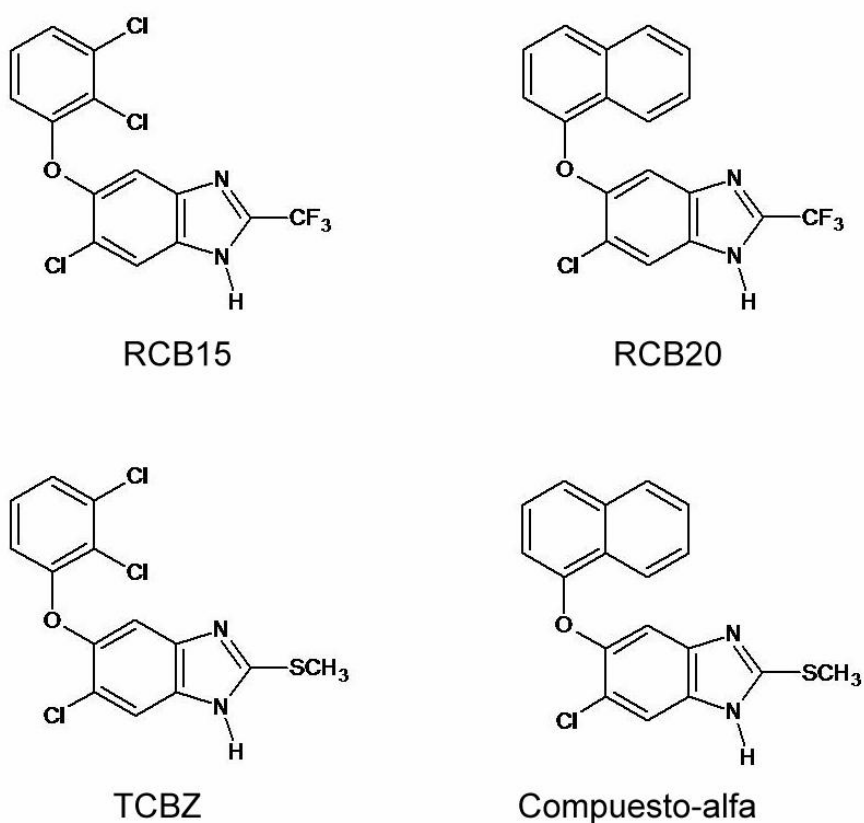


Figura 19. Estructuras químicas de derivados bencimidazólicos: RCB15, RCB20, TZB y compuesto-alfa. Nótese la similitud en la posición 1, 5 y 6 entre el compuesto RCB15 y el triclabendazol (TZB), así como entre el compuesto RCB20 y el compuesto-alfa.

En un análisis de estructuración conformacional de la molécula de RCB15, comparada con la del SOABZ, se encontró que el primero adquiere una configuración espacial semejante a la letra L y que, según los valores de

electronegatividad de los dominios, de esta forma la molécula puede tener mayor interacción con las moléculas que la rodean. El SOABZ, según el mismo análisis, tiene menor cantidad de dominios de interacción porque su configuración espacial es diferente (García-Vilchis, 2007). Aún no existen estudios de estructuración conformacional para el RCB20. Aparentemente, por el diseño químico de los compuestos RCB15 y RCB20, ellos no sufrieron cambio alguno en su estructura que interacciona con la tubulina como en el caso del SOABZ; sin embargo, debido a lo comentado en cuanto al efecto de los derivados, el tiempo en que actuaron, la conformación que ellos presentan y los cambios en la expresión de tubulina- α en los tejidos de los parásitos, cabría la posibilidad de que ello fuera un indicativo de que están involucrados otros blancos proteicos distintos o que la sea la misma tubulina- β el blanco, pero que la interacción de los derivados sea distinta que lo que se observó con el SOABZ.

Debido a los efectos que hubo para los diferentes tratamientos; once días de cultivo *in vitro* para los parásitos del grupo control y del tratado con SOABZ, así como para el primer día con RCB15 y al segundo día de tratamiento con RCB20, se evaluaron por MEB para observar los cambios en el tejido. Los cisticercos pertenecientes al grupo control se observaron con su morfología clásica (Fig.16, A), mientras que en los casos de tratamientos con los derivados de los BZM se encontró que los parásitos sufrieron cambios tanto en su tamaño, como en su morfología (Fig. 16, B-D). Tales cambios podrían deberse a que los daños ocasionados en los parásitos produjo la pérdida de su FV. Se observó, además, que la superficie de los parásitos estaba alterada porque había microtriquias que

presentaron una disminución de su tamaño (Fig.17, B) y otras en las cuales, aparentemente, había ausencia de ellas (Fig. 17, C y D). El daño en los parásitos podría estar relacionado con lo que se conoce acerca de la superficie y el tegumento de los cestodos; se sabe que tiene un papel importante para la absorción, protección, unión e intercambio para el intercambio molecular de los parásitos con su hospedero; así como, para la eliminación de materiales de desecho. Hacia el interior de las microtriquias, se sabe que están constituidas principalmente por fibras de actina dispuestas en ramilletes que le dan forma y sostén su estructura. Estas estructuras se encuentran a lo largo de la superficie de los cisticercos y su tamaño y distribución difieren por las funciones que se lleven a cabo en cada una de las regiones del cuerpo de los cestodos (Smyth & McManus, 1989). Los tratamientos con derivados de BZM produjeron cambios en el tamaño de las microtriquias (Fig. 18, B) y, bajo los tratamientos con RCB15 y RCB20, produjeron desaparición de ellas (Fig. 18, C y D). Estos resultados de desaparición de las microtriquias podrían estar asociados con los cambios en la expresión de proteínas del citoesqueleto que se encontraron mediante microscopía de fluorescencia, como se vió en las figuras de la 10 a la 13. De la misma manera, el tratamiento con SOABZ produjo alteraciones en la superficie de los parásitos como se encontró mediante microscopía electrónica de transmisión (Palomares *et al*, 2006).

VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- Los derivados bencimidazólicos, RCB15 y RCB20, mostraron una mayor efectividad *in vitro*, en comparación con el SOABZ que es el fármaco de elección.
- Dado el cambio ocasionado en la distribución de tubulina- α y miosina tipo II en los tejidos parasitarios, es posible, dado que el compuesto RCB15 posee una sustitución 5-(2,3-diclorofenoxi) y el compuesto RCB20, presenta un 5-naftiloxi en anillo bencimidazólico, las moléculas podrían adoptar una conformación espacial diferente entre ellas, así como con respecto al SOABZ y ello, también, podría ser el motivo de que su mecanismo de acción sea diferentes. Cabría la posibilidad de que cuando se tenga un estudio de estructuración conformacional para el RCB20, se podría comparar con los del SOABZ y RCB15 y ello podría dar una mayor idea de su relación con las alteraciones que produjeron en los parásitos.
- El daño ocasionado por los derivados en la superficie de los parásitos, puede estar relacionado, a que estos no son capaces de recuperarse en medio de cultivo *in vitro*, después de haberlos retirado del contacto con los derivados bencimidazólicos. Con la idea de evaluar su potencial acción

antiparasitaria *in vivo*, Los derivados podrían ser valorados directamente en el modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps* cepa ORF. A través de este modelo, se podría determinar todos los aspectos con la evaluación de efectividad y seguridad de en fármaco; administración, distribución, metabolismo y excreción, así como la toxicidad de los derivados bencimidazólicos.

- A la par de estos experimentos, una de las formas de aproximación para conocer un blanco de ataque distinto, sería la determinación de las proteínas involucradas mediante análisis de tipo proteómico; los perfiles de los mapas proteómicos resultantes, podrían ser comparados entre los parásitos con y sin tratamiento.
- Todo lo presentado hasta aquí, se considera una aportación más que permitirá profundizar en el conocimiento de las características moleculares que un potencial fármaco requiere para llevar a cabo su actividad.

VII. REFERENCIAS HEMEROBIBLIOGRÁFICAS

- Alberts B, Jonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter (2002) Molecular Biology of the cell. 4a edition, Garland Science. USA, pp 907-982
- Ambrosio J, Cruz-Rivera M, Moran E, Ersfeld K, Flisser A (1997) Identification and partial characterization of a myosin-like protein From cysticerci and adults of *Taenia solium* using a monoclonal antibody. *Parasitology* 144: 545-553
- Ambrosio J, Landa A, Merchant MT, Laclette JP (1994) Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Archives of Medical Research* 25(3):325-330
- Barnes RD (1994) Zoología de los Invertebrados. 5ª edición, Interamericana. México, pp 192, 213-222
- Bahia D, Avelar LGA, Vigorosi F, Cioli D, Oliveira GC, Mortara RA (2006) The distribution of motor proteins in muscles and flame cells of the *Schistosoma mansoni* miracidium and primary sporocyst. *Parasitology*:1-9
- Cruz-Rivera M, Reyes-Torres A, Reynoso-Ducoing O, Flisser A, Ambrosio JR (2006) Comparison of biochemical and immunochemical properties of myosin II in taeniid parasites. *Cell Biology International* 30:598-602
- Dayan AD (2003) Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta tropica* 86:141-159

- Fairlamb AH, Ridley RG, Vial HJ (2003) Drugs against parasitic diseases: R&D methodologies and issues. World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.
http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/TDR_PRD_03.1.pdf
- García Vilchis D (2007) Determinación del potencial antihelmíntico de derivados de bencimidazol en cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM
- Mousley A, Maule AG, Halton DW, Marks NJ (2005) inter-phyla studies on neuropeptides: the potential for broad-spectrum anthelmintic and/or endectoide discovery. *Parasitology* 131:S143-S167
- Katzung BK (2002) Farmacología Básica y Clínica. 8ª edición, El Manual Moderno. México, pp 1013-1034
- Kwa MS, Veenstra JG, Roos MH (1994) Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in b-tubulin isotype 1, *Molecular Biochemical Parasitology* 63:299-303
- Kumar D, McGeown JG, Reynoso-Ducoing O, Ambrosio JR (2003) Observation on the musculatura and isolated muscle fibres of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 127:457-473
- Lacey E (1988) The role of the cytoskeletal protein, tubulin, un the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal for Parasitology* 18(7):885-936
- López-Vallejo F, Medina-Franco JL, Hernández-Campos A, Rodríguez-Morales S, Yépez L, Cedillo R, Castillo R (2007) Molecular modeling of some 1H-

- benzimidazole derivatives with biological activity against *Entamoeba histolytica*: A comparative molecular field analysis study. *Bioorganic & Medical Chemistry* 15: 1117-1126.
- McConville M, Brennan GP, McCoy M, Castillo R, Hernández-Campos A, Ibarra F, Fairweather (2007) Immature triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: tegumental responses to *in vitro* treatment with the sulfoxide metabolite of the experimental fasciolicide compound alpha. *Parasitology Research* 100:365-377
 - Moreno JM, Casado N, Urrea PA, Rodríguez CF (2001) Evidence of tubulin in the scolex gland ducts of *Gymnorhynchus gigas* plerocercoid (cestoda: Trypanorhyncha). *Folia Parasitologica* 48:163-164
 - Navarrete-Vázquez G, Cedillo R, Hernández-Campos A, Yépez L, Hernández-Luis F, Valdez J, Morales R, Cortés R, Hernández M, Castillo R (2001) Synthesis and Antiparasitic Activity of 2-(Trifluoromethyl)-benzimidazole Derivates. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 11:187-190
 - Norma Oficial Mexicana, NOM-021-SSA2-1994, Para la vigilancia, prevención y control del complejo taeniosis/cisticercosis en el primer nivel de atención medica.
 - Prichard RK (2007) Markers for benzimidazole resistance in human parasitic nematodes? *Parasitology* 134(8):1087-1092
 - Palomares F, Palencia G, Pérez R, González-Esquivel D, Castro N, Jung-Cook H (2004) In vitro Effects of Albendazole Sulfoxide and Praziquantel Against *T.solium* and *Taenia crassiceps* Cysts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(6): 2302-2304

- Palomares F, Palencia G, Ambrosio JR, Ortiz A, Jung-Cook H (2006) Evaluation of the efficacy of albendazole sulphoxide and praziquantel in combination on *Taenia crassiceps* cysts: *in vitro* studies. *Journal of Microbial Chemotherapy* 57:482-488
- Palomares-Alonso F, Piliado JC, Palencia G, Ortiz-Plata A, Jung-Cook H (2007) Efficacy of nitazoxanide, tizoxanide and tizoxanide/albendazole sulphoxide combination against *Taenia crassiceps* cysts. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 59(2):212-218
- Revah PF (2002) De 10⁴⁰ à 10 molécules. *Science & Vie* 218:18-26
- Robinson MW, McFerran N, Trudgett A, Hoey L, Fairweather I (2004) A possible model of benzimidazole binding to b-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 23:275-284
- Secretaria de Salud, Catálogo de Servicios Esenciales de Salud (CASES) 2005 <http://www.ssn.gob.mx/transparencia/pdf/t13-12.pdf>
- Slais J (1970) The Morphology and Pathogenicity of the Bladder Worms. Academia. Czechoslovakia, pp 51-60
- Smyth JD, McManus DP (1989) The Physiology and Biochemistry of Cestodes. Cambridge University Press. Australia, pp 5-52
- Toledo A, Cruz C, Fragoso G, Lacleite JP, Merchant MT, Hernández M, Sciutto E (1997) In vitro culture of *Taenia crassiceps* larval cells and cyst regeneration after injection into mice. *Journal Parasitology* 83(2):189-193
- Valdez J, Cedillo R, Hernández-Campos A, Yépez L, Hernández-Luis F, Navarrete-Vázquez G, Tapia A, Cortés R, Hernández M, Castillo R (2002) Synthesis and

Antiparasitic Activity of 1*H*-Benzimidazole Derivates. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 12:2221-2224

- Valverde-Islas LE (2007) Distribución de proteínas del citoesqueleto en células flama de cisticercos de *Taenia solium*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM
- Wahlberg MH (1998) The distribution of F-actin during the development of *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda). *Cell Tissue Research* 291:561-570
- Willms K, Robert L, Jiménez JA, Everhart M, Kuhn R (2004) Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon *Taenia crassiceps* strobilae WFU strain (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae from golden hamsters. *Parasitology Research* 93:262-267