

Informe final publicable de proyecto

Organización y tráfico intracelular en el tegumento de cestodos: roles del citoesqueleto de microtubulos.

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_156125

Fecha de cierre de proyecto: 01/12/2022

KOZIOL ANTMANN, Uriel (Responsable Técnico - Científico)

GUARNASCHELLI ROVIRA, Inés (Investigador)

CASTILLO PRESA, Estela (Investigador)

GÓMEZ PEREYRA, Ania (Investigador)

PREZA PEREZ, Matías Facundo (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente) \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

Resumen del proyecto

Los platelmintos parásitos causan numerosas enfermedades de importancia para la salud humana y animal, especialmente en países en vías de desarrollo. En lugar de una epidermis clásica, estos parásitos cuentan con un tegumento especializado, que consiste en un sincitio superficial (llamado tegumento distal) conectado mediante puentes citoplasmáticos a cuerpos celulares sumergidos debajo de la membrana basal. En estos cuerpos celulares se localizan los núcleos y es dónde ocurre la síntesis de nuevas proteínas, que deben ser transportadas hasta el sincitio superficial para su recambio. Este recambio es esencial, al ser el tegumento la superficie de interacción con el hospedador. En este proyecto, estudiamos la organización de los microtúbulos y su importancia en el tráfico intracelular hacia el tegumento distal en el cestodo modelo *Mesocestoides corti* (syn. *vogae*). Los microtúbulos se distribuyen en haces polarizados en forma apicobasal en el el sincitio distal, y muestran una continuidad a través de los puentes citoplasmáticos hacia los cuerpos celulares del tegumento. El albendazol es un antihelmíntico cuyo blanco son los microtúbulos, y demostramos que los microtúbulos del tegumento distal son especialmente sensibles a esta droga (a concentraciones de relevancia terapéutica). En cambio, la colchicina, una droga clásica inhibidora de la polimerización de los microtúbulos, no tiene actividad antihelmíntica y no muestra efectos sobre el citoesqueleto de microtúbulos del tegumento a concentraciones similares. Adicionalmente, desarrollamos métodos para analizar la incorporación de nuevas proteínas en la superficie del tegumento, y demostramos que el albendazol afecta fuertemente este proceso. Los resultados de este proyecto comenzaron a discernir los mecanismos moleculares que permiten el recambio constante del tegumento, y generaron herramientas que permitirán expandir estos estudios a futuro.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Parasitología Molecular
Palabras clave: Citoesqueleto / Antihelmínticos / Cestodos /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Los platelmintos parásitos (cestodos, trematodos y monogéneos) causan numerosas enfermedades de importancia para la salud humana y animal, especialmente en países en vías de desarrollo (1). Los cestodos de mayor relevancia para la salud son aquellos que infectan al ser humano y a los animales domésticos en su forma larvaria (es decir como hospedador intermediario), como ser *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis* y *Taenia solium*. La larva de *E. granulosus* es el agente causal de la hidatidosis, una enfermedad de gran importancia a nivel mundial y en particular en Uruguay, dónde es endémica (2, 3). Para las infecciones con *Echinococcus* spp. que no pueden ser tratadas mediante cirugía, la única quimioterapia disponible consiste en la utilización de benzimidazoles (albendazol y mebendazol), antihelmínticos que tienen como blanco el citoesqueleto de microtúbulos de los parásitos (4). Clásicamente, se ha hipotetizado que los benzimidazoles probablemente afecten a las células proliferantes de los parásitos (en parte por analogía con las quimioterapias contra diferentes tipos de cáncer mediante drogas que alteran a los microtúbulos). Sin embargo, datos recientes sugieren que las células proliferantes de estos parásitos son particularmente resistentes a los benzimidazoles, por expresar isoformas de beta tubulina naturalmente resistentes (5). Por lo tanto, el blanco de estas drogas a nivel celular no está claramente definido.

En lugar de una epidermis clásica, los platelmintos parásitos cuentan con un tegumento superficial altamente especializado (denominado Neodermis) (6). Este tejido es el principal sitio de contacto con el hospedador (en el caso de cestodos, que carecen de aparato digestivo, es el único sitio de contacto y es la superficie por la que adquieren todos los nutrientes). La organización del tegumento es sumamente peculiar. Se trata de un tegumento sincitial compuesto de dos grandes regiones. Por un lado, existe una región denominada tegumento distal que cubre completamente la superficie del parásito, y que se apoya sobre una membrana basal. Por otro lado, los núcleos de este sincitio se encuentran en cuerpos celulares (denominados citones) sumergidos por debajo de la membrana basal, y que se comunican con el tegumento distal a través de finos puentes citoplasmáticos que atraviesan la membrana basal. En estudios clásicos, se demostró que la síntesis proteica ocurre principalmente en los citones, y que las nuevas proteínas y glicconjugados son transportados hacia el tegumento distal (7, 8). Estudios de microscopía electrónica han identificado abundantes microtúbulos en los puentes citoplasmáticos y en el tegumento distal, sugiriendo un rol de los mismos en este transporte, si bien la complejidad y densidad de elementos de este tejido no permitieron establecer claramente su organización (9). Adicionalmente, existe evidencia de que la colchicina y el albendazol afectan la morfología del tegumento y el transporte de nuevas proteínas al tegumento distal (10, 11).

En epitelios típicos de otros animales, las células se encuentran polarizadas en su eje apicobasal, incluyendo dominios apicales y basolaterales de la membrana plasmática. El origen y mantenimiento de esta polaridad depende de los complejos de unión laterales entre las células, de los contactos de las células con la lámina basal, y de los mecanismos de señalización y complejos de polaridad asociados a estas estructuras (12–14). El mantenimiento de la polarización depende del correcto “sorting” (clasificación) y transporte de nuevas proteínas a los dominios correctos de la membrana plasmática. En modelos de epitelios típicos, se ha demostrado la importancia central del citoesqueleto (filamentos de actina y de tubulina) como vías de transporte para el tráfico intracelular polarizado (13–15). A diferencia de lo que ocurre en células no polarizadas, la mayor parte de los microtúbulos de las células epiteliales se disponen en haces paralelos con idéntica polaridad que sirven como rutas para los transportes en dirección apical y basal (16, 17). Estos microtúbulos son nucleados por centros organizadores de microtúbulos (MTOCs, microtubule organizing centers) no centrosomales localizados en la región apical. Estos MTOC típicamente reclutan a los complejos de gama-tubulina que permiten la nucleación y anclaje de microtúbulos desde su extremo (-), aunque el anclaje y estabilización de estos extremos también puede depender de otras proteínas, por ejemplo CAMSAP/Patronina y Nineína (16, 17). Claramente, deben existir mecanismos análogos en el tegumento de platelmintos parásitos, pero que deben estar modificados dadas las grandes especializaciones morfológicas existentes.

El tema central que enmarca a este proyecto es el estudio de los mecanismos celulares que permiten el transporte polarizado de nuevos componentes en el tegumento sincitial de platelmintos parásitos, permitiendo por lo tanto su renovación constante (“turnover”). En particular, deseamos comprender la organización del citoesqueleto de microtúbulos en este sincitio y sus roles en este tráfico polarizado, así como el efecto del antihelmíntico albendazol en estos procesos. En este proyecto, utilizamos al cestodo modelo *Mesocestoides corti* (syn. *M. vogae*) para el estudio de este tema utilizando técnicas modernas. Las larvas de *M. corti* son un modelo excelente para el estudio de la biología celular y molecular de cestodos. Estas larvas pueden ser obtenidas en grandes cantidades a partir del cultivo in vivo en ratones (18) lo que permite la realización de análisis de fraccionamiento celular y bioquímicos. Además, se han puesto a punto métodos robustos para su cultivo in vitro, lo que permite diferentes tipos de manipulaciones experimentales (19–22). La ultraestructura del tegumento de esta especie ha sido descrita en detalle (23). Recientemente, se ha publicado su genoma y disponemos de su transcriptoma. Un limitante del modelo, que es común a todos los cestodos, es la imposibilidad hasta el momento de manipularlos genéticamente.

Este proyecto contó con cuatro grandes partes:

- 1) Realizamos una descripción detallada de la organización global de los microtúbulos en el tegumento, mediante inmunofluorescencia. Además, mediante el análisis de la localización de gama-tubulina, buscamos posibles regiones que funcionen como MTOC en el tegumento. Nuestra hipótesis inicial era que probablemente existan MTOC no centrosomales apicales en el tegumento distal (como es común en epitelios), junto a otros MTOC en los citones.
- 2) Establecimos definitivamente los sitios de síntesis proteica en el tegumento mediante ribopuromicilación (RPM), una nueva técnica de alta precisión.
- 3) Desarrollamos nuevas herramientas para medir la incorporación de nuevas proteínas desde los citones hasta el tegumento distal, utilizando métodos no radiactivos.
- 4) Estudiamos la importancia de los microtúbulos en estos mecanismos de transporte utilizando drogas que impiden su polimerización (colchicina y el antihelmíntico albendazol). Adicionalmente, estamos determinando la importancia de la dineína (un motor molecular dependiente de microtúbulos) para estos mecanismos de transporte, utilizando inhibidores farmacológicos

Metodología/Diseño del estudio

1. Organización de los microtúbulos en el tegumento.

Para describir la organización del citoesqueleto de microtúbulos mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal, utilizamos el anticuerpo monoclonal contra alfa-tubulina AA4.3 y un anticuerpo policlonal contra beta-tubulina sobre criocortes. Adicionalmente, analizamos la distribución de tubulina acetilada (microtúbulos estabilizados) y de la gamma-tubulina (posibles sitios de nucleación) mediante inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales, y la distribución del citoesqueleto de actina mediante tinción con faloidina.

2. Localización de ribosomas y síntesis proteica en el tegumento.

Utilizamos el anticuerpo monoclonal Y10b, e hibridación in situ para el ARNr 28S, para describir la distribución de los ribosomas. Para identificar los sitios de síntesis proteica, utilizamos el método de ribopuromicilación (24-26). Los parásitos fueron incubados in vitro con puromicina, que es incorporada covalentemente en péptidos nacientes en el ribosoma, en combinación con emetina, que impide la liberación de los péptidos. Tras fijar los tejidos, los sitios de síntesis se identifican mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal contra la puromicina.

3. Seguimiento de la incorporación al tegumento distal de nuevas proteínas.

El marcado de proteínas neosintetizadas se realizó mediante marcado metabólico con azidohomoalanina (AHA) como análogo de metionina para detectar la síntesis proteica (27), que puede ser detectado luego mediante química bio-ortogonal ("Click chemistry"). Tras la incorporación del AHA, procesamos las larvas mediante un método de fraccionamiento sub-celular que permite aislar las proteínas de membrana del tegumento distal de cestodos (28, 29). Validamos este método de fraccionamiento en *M. corti* utilizando marcadores moleculares en experimentos de Western Blot (descritos en los resultados). Las fracciones de proteínas totales y tegumentarias fueron luego reveladas por química "Click" mediante su conjugación a biotina, y su detección posterior utilizando estreptavidina-peroxidasa en Western Blot. Esta fue la estrategia más exitosa entre las estrategias planteadas originalmente. En el proyecto original, se planteó la utilización del análogo de N-acetilgalactosamina GalNAz para realizar experimentos de marcado análogos para glicoconjugados. Estos no fueron posibles ya que encontramos tras numerosos intentos en diferentes condiciones experimentales que *M. corti* no es capaz de incorporar este análogo en sus glicoconjugados.

4. Efecto de drogas que afectan a microtúbulos y a la dineína.

Se utilizaron drogas que llevan a la despolimerización de microtúbulos (colchicina y albendazol) o que inhiben específicamente a la dineína (ciliobrevina y dinarrestina (30, 31). Se estudió su efecto en la organización de los microtúbulos mediante la detección de alfa-tubulina y beta-tubulina por inmunofluorescencia. Se cuantificó el efecto del albendazol y de la colchicina a plazos cortos (hasta 6 horas) en la incorporación de nuevas proteínas al tegumento distal mediante las estrategias descritas en la sección anterior.

Resultados, análisis y discusión

1. Organización del citoesqueleto en el tegumento de *M. corti*.

Analizamos mediante inmunofluorescencia la distribución de los microtúbulos en criocortes de *M. corti* utilizando anticuerpos contra alfa-tubulina y contra beta-tubulina, encontrando que en el tegumento distal los microtúbulos son muy abundantes y se disponen en haces con una orientación general apico-basal (similar a la observada en epitelios de otros animales) y que parecen irradiar desde puntos regularmente espaciados en el borde basal del tegumento distal, correspondientes a los lugares de unión de los puentes citoplasmáticos con el sincitio. En los citones, en cambio, los microtúbulos se disponen concentrados alrededor de los núcleos, sin una orientación preferencial evidente en el citoplasma

Por otra parte, realizamos inmunofluorescencia para detectar tubulina acetilada, una modificación post-traducciona de la tubulina asociada a microtúbulos estabilizados, como los presentes en prolongaciones neuronales (32). No observamos señal en el tegumento distal, sugiriendo que los microtúbulos del sincitio son muy dinámicos. Sí observamos tubulina acetilada en las terminaciones sensoriales que atraviesan el tegumento.

Utilizando faloidina fluorescente, confirmamos la escasez de filamentos de actina en el tegumento. Existen pequeñas acumulaciones de filamentos de actina que colocalizan junto a la región apical de las terminaciones sensoriales ricas en tubulina acetilada, lo que sugiere que pueden estar asociados a las uniones septadas existentes entre el sincitio y la prolongación nerviosa, previamente descritas por microscopía electrónica (33).

Buscando posibles centros organizadores de tubulina no centrosomales (ncMTOC) en el tegumento de *M. corti*, realizamos inmunofluorescencia para detectar gama-tubulina. En epitelios de absorción de otros animales la gama-tubulina se acumula en el borde apical de las células (34,35), donde se encuentran los ncMTOC. Sorprendentemente, encontramos que el tegumento distal de *M. corti* carece casi completamente de gama-tubulina, con excepción de algunos focos de señal aislados. En todos los

citones, se observa en general un único foco de señal de gama-tubulina. Parece improbable que los abundantes microtúbulos del sincitio sean nucleados apicalmente por tan escasa gama-tubulina en el tegumento distal. Es posible que los microtúbulos sean nucleados en forma independiente de gama-tubulina en la región apical del sincitio (recientemente, Imasaki et al. (36) demostraron que CAMSAP2 nuclea microtúbulos en ausencia de gama-tubulina in vitro). Otra posibilidad es que exista ramificación de microtúbulos (branching). El branching consiste en la formación de microtúbulos a partir de microtúbulos ya existentes. Uno de los mecanismos de branching conocidos es dependiente de gama-tubulina, que es reclutada en conjunto con otros factores a los laterales de microtúbulos existentes (37). Otro mecanismo, involucra al factor remodelador de microtúbulos SSNA1, que es capaz de inducir branching mediante un mecanismo independiente de gama-tubulina in vitro, en el que, protofilamentos de un microtúbulo madre se curvan y dan lugar a un segundo microtúbulo (38). No podemos descartar que exista un mecanismo análogo, independiente de gama-tubulina, en el tegumento de *M. corti*.

Otra posibilidad es que la nucleación no ocurra apicalmente, como en epitelios clásicos, sino que los microtúbulos sean nucleados en otras regiones del tegumento, por ejemplo en los citones, donde se observan frecuentemente focos de señal de gama-tubulina cercanos al núcleo, en cuyo caso es posible que los microtúbulos tengan una orientación de sus extremos invertida con respecto a epitelios clásicos, es decir, con sus extremos (+) en la región apical.

2. Sitios de síntesis proteica en el tegumento de *M. corti*.

Existen pocos trabajos, de hace más de medio siglo, sobre la síntesis proteica en el tegumento de algunas especies cestodos (7,8). En ellos se realizaron experimentos de pulso y caza con precursores radiactivos, y sus resultados indicaron que la síntesis proteica ocurre mayormente en las células subtegumentarias. En nuestro trabajo, utilizamos distintas técnicas modernas para establecer los sitios de síntesis proteica en el tegumento.

En primer lugar, realizamos hibridación in situ fluorescente whole mount (WMISH) sobre larvas enteras de *M. corti*, para detectar el ARNr 18S. Acorde a lo observado por Hess (23) por microscopía electrónica, la señal se localiza casi exclusivamente alrededor de los núcleos, indicando una ausencia de ARNr en el tegumento distal. Por otra parte, como estrategia complementaria, utilizamos el anticuerpo Y10b (que detecta los ARNr 18S, 5.8S, 23S y posiblemente 5S) para inmunofluorescencia. El resultado coincide con lo observado mediante WMISH, la señal se localiza exclusivamente en la región subtegumentaria, no observándose señal en el tegumento distal.

Finalmente, para identificar los sitios de síntesis proteica, realizamos experimentos de ribopuromicilación sobre larvas de *M. corti*. Brevemente, la técnica consiste en la utilización de puromicina, un análogo de ARNt que, al ser incorporado a la cadena peptídica, produce la interrupción de la traducción. Luego se detecta la puromicina mediante inmunofluorescencia. Comprobamos que los péptidos puromicilados no se localizan en el tegumento distal, sino que se encuentran restringidos a la región celular subtegumentaria.

En conjunto, nuestros resultados confirman que la maquinaria de traducción proteica del tegumento se localiza en los citones, y está ausente en el tegumento distal. Las proteínas son sintetizadas en los citones, y luego deberán ser transportadas hacia la superficie. Es probable que en este proceso participen los microtúbulos, dada la ausencia casi total de filamentos de actina en el sincitio.

3. Establecimiento de una metodología para analizar la incorporación de nuevas proteínas al tegumento distal

Para detectar la síntesis de nuevas proteínas y poder seguir su destino intracelular, pusimos a punto el marcado metabólico de nuevas proteínas utilizando el análogo de metionina L-azidohomoalanina (AHA). Tras la incorporación a nuevas proteínas, este análogo puede ser detectado mediante estrategias de química bio-ortogonal, utilizando biotina-alquino (el grupo alquino, en presencia de cobre, reacciona con el grupo azida, formando un enlace covalente). Luego pudimos detectar las proteínas biotiniladas a partir de extractos de proteínas totales de *M. corti* y posterior Western Blot, utilizando estreptavidina-HRP para el revelado. Si bien tras 1 hora de incubación con AHA logramos detectar el análogo en extractos totales de los parásitos, este experimento funcionó de manera robusta para marcados con AHA de por lo menos 3 horas. Intentamos detectar además el AHA mediante microscopía confocal, utilizando Alexa488-alquino, pero esta estrategia sólo funcionó para tiempos de incubación muy largos (de hasta 24 horas), que no eran útiles para nuestros objetivos. Por lo tanto, adaptamos nuestra estrategia para la detección de proteínas neo-sintetizadas incluyendo el fraccionamiento de los parásitos.

Pusimos a punto una modificación del protocolo de Oaks et al. (39) para la obtención de fracciones enriquecidas en proteínas

tegumentarias. Brevemente, los parásitos vivos son incubados por 10 minutos en presencia de Tritón 0,2% en hielo, y luego son vortexeados durante 30 segundos, con lo que se desprende el tegumento distal; a continuación, se realizan una serie de centrifugaciones diferenciales para obtener fracciones enriquecidas en tegumento distal, mientras que paralelamente, se realizan extractos totales de proteínas de parásitos intactos. Para validar el método, realizamos Western Blot sobre seis réplicas de fraccionamiento. Para corroborar la efectividad del protocolo, utilizamos un anticuerpo para detectar la fosfatasa alcalina, proteína de la membrana externa del tegumento de *M. corti* (resultados nuestros no publicados), y la lectina WGA para detectar glicoconjugados, que están presentes en el tegumento distal mayoritariamente. Comprobamos que ambos componentes se encuentran enriquecidos en las fracciones tegumentarias con respecto a los extractos totales. Por otra parte, utilizamos un anticuerpo para detectar tropomiosinas de alto peso molecular, proteínas del músculo (40) que no deberían estar presentes en las fracciones tegumentarias. Efectivamente, solo observamos bandas en los extractos totales, descartando niveles apreciables de contaminación de la fracción tegumentaria con tejidos subyacentes (los cestodos tienen una capa de músculo inmediatamente por debajo del tegumento distal, cuyas fibras se intercalan con los puentes citoplasmáticos). Finalmente, realizamos experimentos preliminares de proteómica de ambas fracciones, encontrando en las fracciones tegumentarias un enriquecimiento de proteínas homólogas a las asociadas al tegumento en otros platelmintos parásitos. Mediante esta estrategia de fraccionamiento de los parásitos combinada con Western Blot, pudimos detectar la incorporación de proteínas neo-sintetizadas en el tegumento distal tras 3 horas de incubación en presencia de AHA.

4. Sensibilidad al albendazol y tráfico de proteínas del tegumento.

Para evaluar la sensibilidad de los parásitos a drogas despolimerizantes de microtúbulos, cultivamos larvas de *M. corti* in vitro por 6 horas en presencia de albendazol 1 μM y 10 μM , colchicina 10 μM y 100 μM , y DMSO como control de solvente. Se cree que el albendazol y la colchicina comparten el sitio de unión a la tubulina, pero la colchicina no es utilizada como antihelmíntico, y no es efectiva en modelos murinos de infección con *Echinococcus* (41). En primera instancia, mediante inmunofluorescencia sobre criocortes, comprobamos que ambas concentraciones de albendazol producen la despolimerización de los microtúbulos del tegumento distal, pero no de los microtúbulos de las terminaciones sensoriales, indicando que los microtúbulos del tegumento son particularmente sensibles al albendazol (esto podría ser debido a que los microtúbulos tegumentarios sean más dinámicos). En contraste, los parásitos tratados con colchicina 10 μM no mostraron alteraciones de los microtúbulos en el tegumento distal, aunque sí se observa una desaparición de los microtúbulos cuando la concentración es de 100 μM . En el control con DMSO, los microtúbulos se observan con su distribución normal.

Para evaluar el efecto del albendazol sobre la incorporación de nuevas proteínas en el tegumento distal, incubamos parásitos durante 6 horas con albendazol 1 μM , colchicina 10 μM o DMSO agregando AHA 50 μM al medio durante las últimas 3 horas de tratamiento. Posteriormente, realizamos el fraccionamiento de los parásitos, obteniendo extractos totales y fracciones tegumentarias. A continuación, biotinilamos las proteínas marcadas con AHA mediante reacción bio-ortogonal sobre extractos totales y fracciones, y realizamos Western Blot, utilizando estreptavidina-HRP para el revelado. Utilizando el programa FIJI, cuantificamos la señal de AHA en cada uno de los carriles, normalizando la intensidad de AHA con las proteínas totales presentes en el carril detectadas mediante tinción con Ponceau S. De este modo, obtuvimos medidas relativas de la cantidad de proteínas nuevas para cada condición experimental. Sorprendentemente, el tratamiento de 6 horas con albendazol 1 μM produce una disminución en la síntesis proteica total de los parásitos, que en extractos totales es en promedio 53% con respecto al control DMSO (100%) (realizamos 4 réplicas de este experimento). Con respecto a la fracción tegumentaria, los parásitos tratados con albendazol incorporaron solamente 31% de nuevas proteínas en el tegumento en comparación con los parásitos control tratados con DMSO. No sucede lo mismo con la colchicina 10 μM , que produce una disminución moderada tanto en la síntesis proteica general, que es en promedio 88% con respecto al control DMSO, como en la cantidad de nuevas proteínas en el tegumento, que es de un 89% respecto al control.

Estos resultados indican que si bien ambas drogas (albendazol y colchicina) inhiben la polimerización de los microtúbulos, el albendazol es mucho más eficiente en cestodos, y además, por un mecanismo desconocido aún, está produciendo una disminución en la síntesis proteica no observable tras el tratamiento con colchicina, que es al menos cien veces menos potente en cuanto a sus efectos sobre los microtúbulos y la síntesis y el tráfico de proteínas en el tegumento. La colchicina suele utilizarse en el tratamiento de la gota. La dosis estándar administrada a pacientes es de 0,5-1,5 mg, lo que produce concentraciones máximas de 10-17 nM en el plasma (42). Además, existen reportes de casos clínicos de intoxicación severa por colchicina con concentraciones de la droga en el plasma de los pacientes desde 50 nM (43), muy inferior a las dosis utilizadas por nosotros in vitro. Estos antecedentes y nuestros resultados, coinciden con la falta de actividad antihelmíntica de la colchicina (41).

Conclusiones y recomendaciones

El citoesqueleto de microtúbulos tiene una distribución polarizada en el tegumento del cestodo *Mesocestoides corti*, con haces de microtúbulos orientadas apico-basalmente en el tegumento distal, que son continuos con microtúbulos presentes en los puentes citoplasmáticos que conectan al tegumento distal con los cuerpos celulares (citones) tegumentarios. La síntesis proteica ocurre exclusivamente en los citones tegumentarios, por lo que la incorporación de nuevas proteínas al tegumento distal requiere su transporte desde los sitios de síntesis en los citones. La abundancia de microtúbulos y la ausencia de filamentos de actina en el tegumento distal sugieren un rol central de los microtúbulos en este transporte. El antihelmíntico albendazol tiene un efecto muy rápido y potente (a concentraciones clínicamente relevantes) en la despolimerización de los microtúbulos del tegumento distal, y provoca una caída importante en la incorporación de nuevas proteínas en esta región del tegumento, sugiriendo que su efecto antihelmíntico podría deberse en parte al bloqueo del transporte de nuevas proteínas hacia el tegumento distal. Sin embargo, también observamos un efecto no descrito del albendazol en la síntesis proteica total, mediante mecanismos aún desconocidos, y que podrían también contribuir a su efecto antihelmíntico. En cambio, la colchicina tiene un efecto mucho menos potente sobre los microtúbulos y la incorporación de proteínas en el tegumento distal, que se correlaciona con su ausencia de eficacia como antihelmíntico.

Referencias bibliográficas

1. P. J. Hotez et al., *J. Clin. Invest.* 118, 1311–1321 (2008).
2. P. R. Torgerson, C. Carmona, R. Bonifacino, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94, 703–713 (2000).
3. C. M. Budke, P. Deplazes, P. R. Torgerson, *Emerg. Infect. Dis.* 12, 296–303 (2006).
4. M. Siles-Lucas, A. Casulli, R. Cirilli, D. Carmena, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006422 (2018).
5. U. Koziol, K. Brehm, *Vet. Parasitol.* 213, 92–102 (2015).
6. S. Tyler, M. Hooge, *Can. J. Zool.* 82, 194–210 (2004).
7. R. Lumsden, *Z. Parasitenkd.* 28, 1–13 (1966).
8. J. A. Oaks, R. D. Lumsden, *J. Parasitol.* 57, 1256–1268 (1971).
9. J. M. Holy, J. A. Oaks, *Cell Motil. Cytoskeleton.* 13, 41–56 (1989).
10. D. J. Etges, B. Bogitsh, *J. Parasitol.* 71, 290–296 (1985).
11. J. Schmidt, *Parasitol. Res.* 84, 362–368 (1998).
12. I. Mellman, W. J. Nelson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 833–845 (2008).
13. S. Zink, R. Jacob, in *Cell Polarity 1: Biological Role and Basic Mechanisms*, K. Ebnet, Ed. (Springer International Publishing, Cham, 2015), pp. 375–394.
14. O. A. Weisz, E. Rodriguez-Boulan, *J. Cell Sci.* 122, 4253–4266 (2009).
15. F. Lafont, J. K. Burkhardt, K. Simons, *Nature.* 372, 801–803 (1994).
16. A. D. Sanchez, J. L. Feldman, *Curr. Opin. Cell Biol.* 44, 93–101 (2017).
17. M. Toya, M. Takeichi, *Cell Struct. Funct.* 41, 127–135 (2016).
18. D. Specht, M. Voge, *J. Parasitol.* 51, 268–272 (1965).
19. U. Koziol, M. F. Domínguez, M. Marín, A. Kun, E. Castillo, *Front. Zool.* 7, 1–12 (2010).
20. M. Voge, L. S. Coulombe, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 15, 902–907 (1966).
21. N. J. Barrett, J. D. Smyth, S. J. Ong, *Int. J. Parasitol.* 12, 315–322 (1982).
22. M. M. Markoski et al., 89, 27–34 (2003).
23. E. Hess, *Z. Parasitenkd.* 61, 135–159 (1980).
24. A. David et al., *J. Cell Biol.* 197, 45–57 (2012).
25. S. Kim, K. C. Martin, *Elife.* 4, 1–24 (2015).
26. M. Nevalainen, M. Kaakinen, K. Metsikkö, *Cell Tissue Res.* 353, 539–548 (2013).
27. S. T. tom Dieck et al., *Metabolic labeling with noncanonical amino acids and visualization by chemoselective fluorescent tagging* (2012), *Curr Protoc Cell Biol Unit* 7.11.
28. W. J. Knowles, J. A. Oaks, *J. Parasitol.* 65, 715–731 (1979).
29. D. P. McManus, N. J. Barrett, *Parasitology.* 90, 111–129 (1985).
30. D. H. Roossien, K. E. Miller, G. Gallo, *Front. Cell. Neurosci.* 9:252 (2015),
31. S. Höing et al., *Cell Chem. Biol.* 25, 357–369 (2018).
32. Y. Nekooki-Machida, H. Hagiwara, *Med Mol Morphol.* 53, 191–197 (2020).
33. E. Hess, H. Guggenheim, *Z. Parasitenkd.* 53, 189–199 (1977).
34. J. Waschke, D. Drenckhahn, *Eur J Cell Biol.* 79, 317–26 (2000).
35. Y. Bobinsec, M. Fukuda, E. Nishida, *J Cell Sci.* 113, 3747–3759 (2000).
36. T. Imasaki et al., *Elife* 11:e77365 (2022).
37. R. Alfaro-Aco, A. Thawani, S. Petry, *Elife.* 9:e49797 (2020).
38. N. Basnet et al., *Nat Cell Biol.* 20, 1172–118 (2018).
39. J. A. Oaks, W. J. Knowles, G. D. Cain, *J. Parasitol.*, 63, 476–485 (1977).
40. U. Koziol et al., *Mol Biochem Parasitol.* 175, 181–91 (2011).
41. G. Lubinsky, C. -F. Lee, R. W. Baron, *Can. J. Zool.* 49, 1301–1304 (1971).
42. G. Thomas, C. Gierre, J. M. Scherrmann, P. Francheteau, J. L. Steimer, *Europ. J. Clin. Pharmacol.* 37, 79–84 (1989).
43. D. Jarvie, J. Park, M. J. Stewart, *Clin. Toxicol.*, 14, 375–381 (1979).

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)

