



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**“SÍNTESIS ALTERNA DE NITAZOXANIDA Y EVALUACIÓN PROTEÓMICA DE ALGUNOS
ANTIPROTOZOARIOS CONTRA *G. intestinalis*”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. CARLOS ALBERTO MÉNDEZ CUESTA



TUTOR: DR. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA

AÑO: 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra, por todo el apoyo que me ha brindado durante la elaboración y revisión de esta tesis.

Al Dr. Francisco Hernández Luis y a la M. en C. Alicia Hernández Campos, por su apoyo en la revisión de esta tesis.

Al Dr. Javier Ambrosio Hernández y a la Bióloga Olivia Reynoso Ducoing, por el apoyo recibido durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Francisco Bolás y a Maria Auxiliadora Dea, por haberme recibido y enseñado en su laboratorio durante mi estancia en la Universidad Complutense de Madrid, donde realice parte de esta tesis.

Al proyecto CONACYT V43629-M por el apoyo recibido durante la realización de este proyecto.

Al personal de la USAI de la Facultad de Química, Rosa Isela del Villar Morales, Victor Manuel Arroyo Sánchez, Margarita Guzmán Villanueva, Georgina Duarte Lisci, Marisela Gutiérrez Franco, por la determinación de los espectros.

A la Dra. Lilián Yépez Mulia y Amparo Tapia por la determinación de la actividad biológica y preparación de las proteínas de estudio, en la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS.

A la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid, por la identificación de las proteínas por Espectrometría de Masas.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Parasitosis en México

2.2. Protozosis

2.2.1. Giardiosis

2.2.1.1. *Giardia intestinalis* como modelo de protozooario

2.3. Fármacos antiparasitarios

2.3.1. Agentes antiprotozoarios

2.3.2. Los 5-Nitroimidazoles

2.3.3. 5-Nitrotiazoles como nuevos agentes terapéuticos

2.3.4. Mecanismo de acción de los 5-Nitroimidazoles

2.3.5. Bencimidazoles como agentes antiprotozoarios

2.3.6. Mecanismo de acción de los Bencimidazoles

2.4. Modificaciones estructurales de Bencimidazoles

2.5. Métodos de Síntesis de Carboxamidas

2.5.1. A partir de Halogenuros de acilo

2.5.2. A partir de Ésteres

2.5.3 A partir de Ácidos utilizando un agente acoplante

2.6. Nitración de Compuestos Aromáticos y Tiazoles

2.7. Proteómica

2.7.1. Definición

2.7.2. Identificación y análisis de proteínas

2.7.3. Proteómica en el descubrimiento de fármacos

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

4. HIPÓTESIS

5. OBJETIVOS

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1. Parte Química

6.1.1. Secuencia sintética para la preparación de Nitazoxanida por una ruta alterna

6.2. Parte Biológica

6.2.1. Cultivo *in vitro* de *G. intestinalis* en presencia de los compuestos prueba

6.2.2. Obtención de parásitos para su observación por Microscopia Electrónica de Barrido

6.2.3. Observaciones por Microscopia Electrónica de Barrido

6.3. Análisis proteómico

6.3.1. Análisis de proteínas en una dimensión

6.3.2. Análisis de proteínas en dos dimensiones

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Resultados de la Parte Química

7.2. Resultados de la Parte Biológica

7.2.1. Microscopia Electrónica de Barrido

7.2.2. Análisis en 1D de proteínas de estudio

7.2.3. Análisis en 2D de proteínas de estudio

8. CONCLUSIONES

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APÉNDICE A. PARTE EXPERIMENTAL

PARTE QUÍMICA

A.a. Instrumentación

A.b. Cromatografía

A.c. Técnicas para la preparación de intermediarios y productos finales

PARTE BIOLÓGICA

A.d. Instrumentación

A.e. Técnicas para la obtención de los mapas proteómicos

A.f. Preparación de soluciones

APÉNDICE B. ESPECTROS

INTRODUCCIÓN

Las parasitosis son un grave problema de salud pública, no sólo en el ámbito nacional sino también a nivel internacional, especialmente en los países en vías de desarrollo. El número de casos de parasitosis por diferentes agentes es muy alto, lo que constituye un problema grave de salud debido, en gran medida, a factores socio-económicos, sanitarios, ecológicos, higiénicos y culturales que aún se encuentran rezagados en estos países.

Los parásitos intestinales son los agentes infecciosos más comunes en los humanos. Éstos se encuentran ampliamente diseminados alrededor del mundo; sin embargo, los países tropicales y subtropicales reúnen las características geográficas y climatológicas que favorecen la prevalencia de la mayoría de estos organismos.

La prevalencia de los parásitos intestinales está relacionada con las condiciones sanitarias ambientales así como también con las condiciones de vivienda en zonas marginadas, tales como la falta de alcantarillado, falta de agua potable, acumulación de basura, entre otros. En México existen deficiencias ancestrales de atraso en zonas marginadas, que propician que las infecciones gastrointestinales se encuentren fuertemente arraigadas en diversas comunidades de nuestro país.

En los países Latinoamericanos la magnitud del parasitismo intestinal es enorme. Lo más grave de este asunto es que la población infantil es la más afectada, ya que son los más expuestos a las vías de contagio. Esto es causa de desnutrición, poco desarrollo físico y mental, diarrea y cuando el problema se agrava sin tratamiento puede causar la muerte.

La quimioterapia sigue siendo el método más eficaz y barato para controlar casi todas las parasitosis. Los fármacos disponibles son esencialmente útiles para tratar las infecciones en seres humanos causadas por parásitos intestinales.

Dentro de los fármacos que más se han empleado en el tratamiento de las helmintosis están los derivados bencimidazol 2-carbamato de metilo (BC), como el mebendazol y el albendazol. Estos fármacos han demostrado una gran actividad, así como un amplio espectro de acción en infecciones intestinales, pero su baja solubilidad en agua reduce en gran medida su capacidad de absorberse, y por tanto, su eficacia en infecciones de tipo sistémicas también se ve reducida.

Para el tratamiento de protozoosis se cuenta con fármacos nitroheterocíclicos. De los más antiguos están los derivados del 5-nitroimidazol, entre ellos, el metronidazol, el tinidazol; y más recientemente, una nueva clase, los derivados del 5-nitrotiazol: como la nitazoxanida. Esta última ha demostrado tener una efectividad mayor que el metronidazol y con menos efectos secundarios; además de poseer un amplio espectro contra protozoarios intestinales.

A pesar de que los compuestos antiparasitarios son pocos, es escaso el desarrollo de nuevos compuestos contra este grave problema. Los fármacos disponibles actualmente llevan más de 20 años en el mercado, y, aunque han tenido gran aceptación, han provocado baja tolerancia por los pacientes y poseen una toxicidad considerable. Además de que se ha observado resistencia de los parásitos a los diferentes tipos de fármacos en cultivos y animales. Es por esto que en este campo se requiere hacer una gran inversión en el desarrollo de nuevos fármacos con baja toxicidad y menos efectos secundarios para el huésped.

Por estas razones, es necesario emprender la búsqueda de nuevos agentes antiparasitarios con un mayor espectro terapéutico, mejorar las propiedades intrínsecas de las moléculas, reducir la toxicidad, disminuir los costos e identificar los sitios de acción de las nuevas moléculas, las cuales son importantes para el desarrollo de tratamientos quimioterapéuticos más eficientes.

En este último punto el empleo de nuevas técnicas, como la Proteómica, es de gran utilidad para determinar el efecto de los compuestos sobre la expresión de proteínas de los parásitos; pudiendo determinar qué proteínas se ven afectadas por el empleo de ciertos fármacos. Con esto se determinarían las proteínas blanco específicas de los compuestos, pudiendo también hacerlos más selectivos y eficaces.

En el presente trabajo de tesis se abarcan varios puntos, como son: 1) realizar la síntesis alterna de la nitazoxanida, con el propósito de obtenerla de forma más eficiente y de buena calidad; 2) el efecto de los compuestos de interés (albendazol, metronidazol, nitazoxanida, RSD-8 y CMC-20), sobre la expresión de las proteínas de *Giardia intestinalis* y 3) determinar el efecto de los compuestos evaluados sobre los trofozoítos a nivel ultraestructural. Con esto se contribuye a la investigación básica sobre actividad antiprotozoaria de los nitroheterociclos y compuestos híbridos con derivados del bencimidazol y así acrecentando la base de datos ya existentes. Todo esto con el fin de mejorar el diseño racionalizado de fármacos antiparasitarios.

2. MARCO TEÓRICO

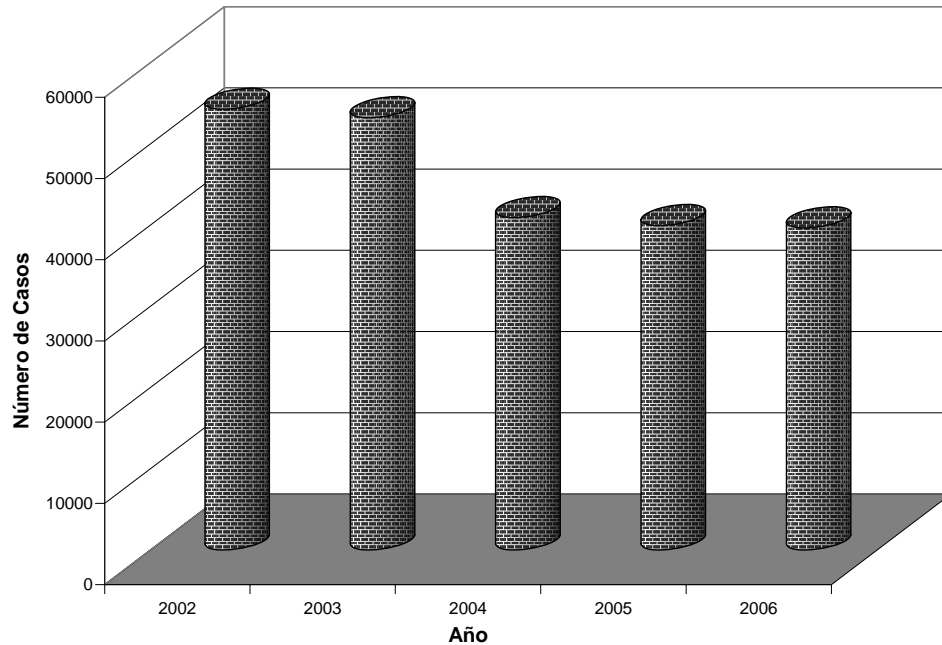
2.1. PARASITOSIS EN MÉXICO

Las infecciones parasitarias causadas por helmintos y protozoarios son un problema grave de salud pública en los países subdesarrollados y en vías de desarrollo, como el nuestro.¹ En la **Tabla 1** se presenta un reporte de los casos de parasitosis en México en el año 2006, generado por la Dirección General de Epidemiología de la SSA.² En esta tabla se puede apreciar la alta prevalencia de la amebiosis y Tricomonosis, causadas por los protozoarios *Entamoeba histolytica* y *Tricomonas vaginalis*; la primera puede causar severas diarreas e invasión sistémica y la segunda, que invade el tracto genitourinario, se transmite por contacto sexual.³ En tercer lugar destaca la giardiosis, causada por el protozoario *Giardia intestinalis*, que produce mala absorción de los nutrientes y retraso en el crecimiento de los menores.⁵ También resulta importante conocer la alta prevalencia de la ascariosis, causada por el nematelminto *Ascaris lumbricoides*, el cual merma el aprovechamiento de los nutrientes, lo que lleva también a un pobre crecimiento de los infantes. Aunque las otras parasitosis reportadas son de menor prevalencia, cobran importancia por la carencia de fármacos potentes y seguros para combatir las; tal es el caso de la Enfermedad de Chagas y la Leishmaniosis².

Tabla 1. Casos de Parasitosis en México

Parasitosis	Total de Casos
Amoebiosis Intestinal	762 937
Ascariosis	173 414
Giardiosis	36 918
Teniosis	393
Cisticercosis	306
Tricomoniosis	174 826
Leishmaniosis	868
Enfermedad de Chagas	361
Otras helmintiosis	400 759
Otras protozoosis	146 164

En la **Gráfica 1** se muestran las estadísticas de los últimos 4 años sobre la incidencia de la giardiosis en nuestro país, en donde se aprecia una ligera disminución de la tasa de morbilidad para el año 2006; aunque esto es favorable, sigue siendo un problema preocupante, ya que lejos de disminuir prometen en un futuro un comportamiento de persistencia con el transcurso de los años, a pesar del incremento en medidas higiénicas, sanitarias y tratamientos masivos con fármacos antiparasitarios. Esta última medida ha sido de gran utilidad en el control de las infecciones parasitarias; sin embargo, a últimas fechas, su uso ha favorecido la persistencia de parásitos resistentes.

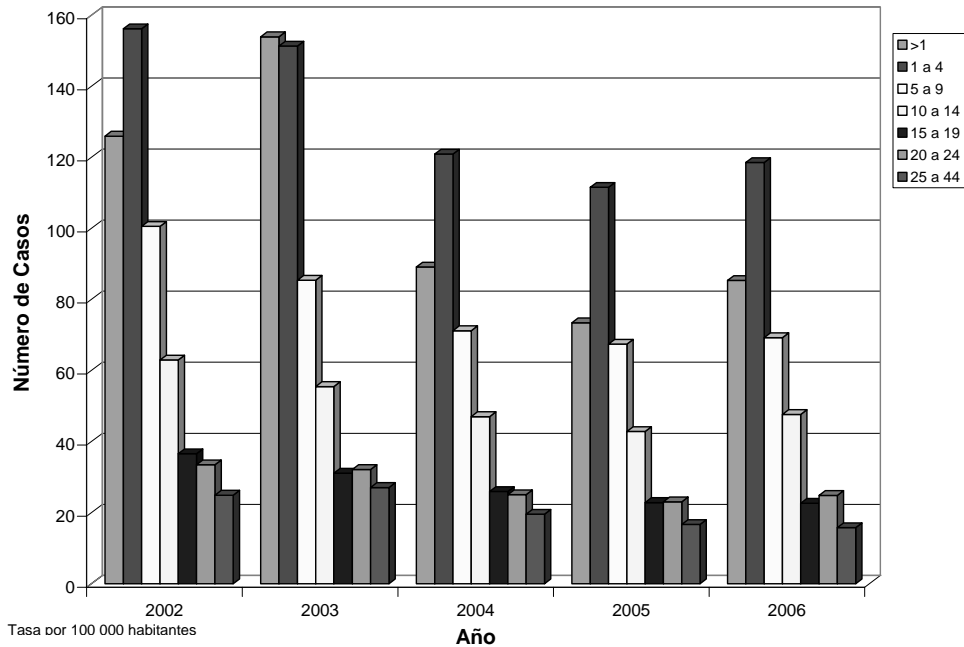


Gráfica 1. Casos de giardiosis en México reportados hasta el 2006. Tomado de Boletín de Vigilancia Epidemiológica del IMSS, 2006.

2.2. PROTOZOOSIS

2.2.1. Giardiosis

Como se mencionó anteriormente, la giardiosis es producida por el protozoo *G. intestinalis* (**Figura 1**). Afecta predominantemente a niños y presenta una prevalencia creciente. En nuestro país es la infección de más alta prevalencia distribuida homogéneamente a lo largo de la República Mexicana, siendo la población infantil el grupo de edad más afectado por esta parasitosis (**Gráfica 2**)². En general, la enfermedad no es una causa de mortalidad importante; sin embargo, debido a su patofisiología tiene graves implicaciones en el estado nutricional y en las tasas de crecimiento de la población infantil. La giardiosis es una enfermedad transmitida por la vía fecal-oral, las fuentes de infección más importantes son individuos infectados y los mantos acuíferos contaminados con aguas negras. Se sabe que más del 60% de los niños infectados desarrollan sintomatología asociada con diarrea explosiva, flatulencia y dolor epigástrico. Se ha observado que las cargas parasitarias altas interfieren con los mecanismos de absorción de grasas y vitaminas liposolubles, así como con la absorción de lactosa, glucosa, xilosa, vitamina A y B₁₂. El síndrome de malabsorción puede persistir por periodos largos después de haberse erradicado la infección. En los adultos comúnmente es asintomático.^{3,4,5}



Gráfica 2. Casos de giardiasis en México por grupo de edad reportados hasta el 2006. Tomado de Boletín de Vigilancia Epidemiológica del IMSS, 2006.

El trofozoíto de *G. intestinalis* tiene forma piriforme, posee dos núcleos, está compuesto de microtúbulos y tiene cuatro pares de flagelos que le dan movilidad. La concavidad constituye un disco ventral que tiene capacidad para adherirse a la mucosa del intestino delgado; ^{3,5} los quistes son la forma de resistencia del parásito.³

Los trofozoites colonizan el intestino delgado de sus hospederos, predominantemente en el yeyuno medio. Atacan por su superficie ventral cóncava (disco ventral) a la pared del intestino, donde obtienen los nutrientes necesarios y evitan el transporte a través del yeyuno. De esta manera el disco ventral juega un papel clave en la sobrevivencia del organismo en el intestino del hospedero.⁶

El disco ventral es una estructura única e importante del citoesqueleto. Esta estructura contiene las proteínas contráctiles actina, α -actina, miosina y tropomiosina como la base bioquímica para la contracción del disco. Ultraestructuralmente el disco ventral incluye un set de microtubulos que contiene 13 protofilamentos unidos a la membrana ventral. Estos microtubulos forman la base de los microlistones que se extienden perpendicularmente sobre la membrana. Las proteínas constituyentes de estos microlistones incluyen un set de giardinas, únicas en este organismo, las cuales son proteínas alfa-hélice de aproximadamente 29 a 38 KDa. Existen 23 formas de este tipo de proteínas y la secuencia N-terminal de algunas de éstas son idénticas, sugiriendo que las modificaciones se encuentran en los procesos post-traduccionales.⁶ Además, la β -giardina también se ha encontrado formando parte de la estructura del citoesqueleto. Los microtúbulos del disco ventral, así como el de los flagelos, están compuestos de $\alpha\beta$ -tubulina.⁶

La infección inicia desde la ingesta de agua contaminada, comida o por la ruta oral-fecal, los quistes llegan al intestino delgado, el movimiento libera los trofozoítos (cada quiste produce dos trofozoítos); se multiplican por fisión binaria y permanecen en el lumen del intestino delgado, donde pueden estar libres o adherirse a la mucosa. La enquistación ocurre cuando emigra hacia el colon y son expulsados en las heces no diarreicas (**Figura 2**).⁷

El diagnóstico etiológico sólo puede hacerse por identificación del parásito a través de un examen coproparasitológico, pero pueden usarse estudios alternativos de detección mediante pruebas inmunológicas (detección de anticuerpos y/o antígenos en suero y/o en heces) y detección de parásitos por inmunofluorescencia.⁷ El estudio microscópico del líquido duodenal obtenido por sondaje, puede demostrar la presencia de trofozoítos.⁵

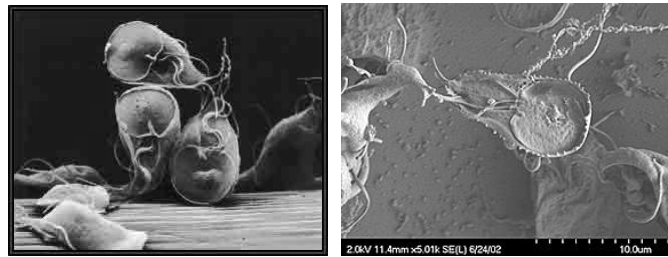


Figura 1. *Giardia intestinalis*. Fotografías de Microscopio Electrónico de Barrido de un cultivo.

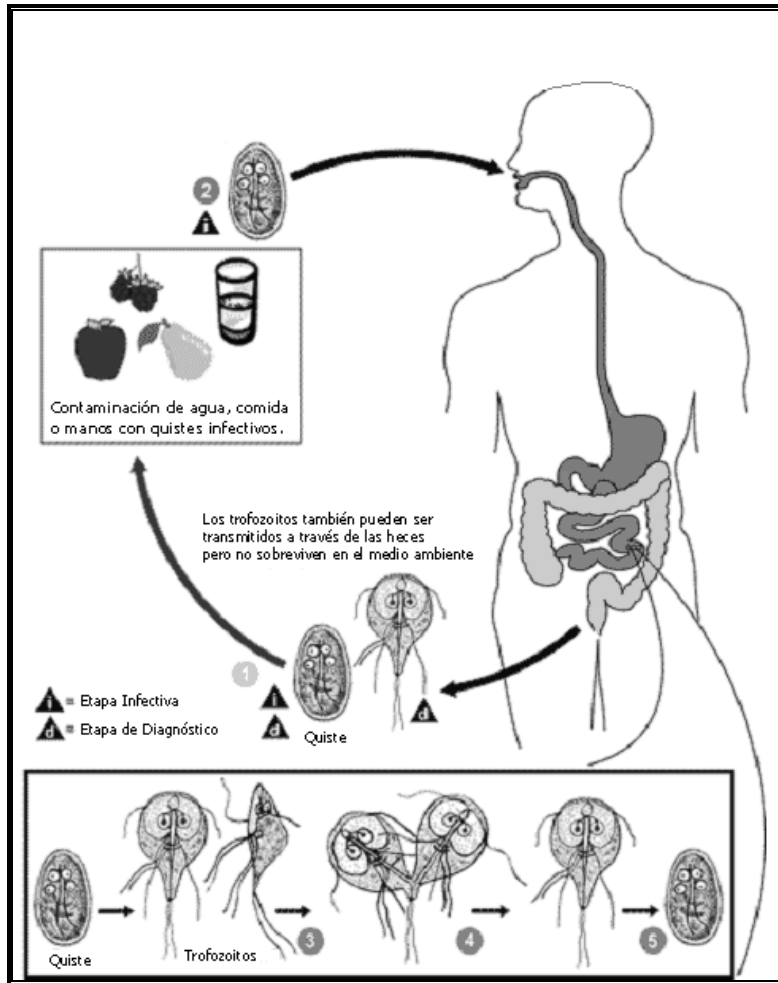


Figura 2. Ciclo de vida de *Giardia intestinalis*.

2.2.1.1. Uso de *Giardia intestinalis* como modelo para evaluar compuestos giardicidas.

Dado su ciclo de vida *G. intestinalis* se utiliza como modelo para evaluar compuestos con potencial giardicida dado su ciclo de vida. El parásito se puede incubar fácilmente *in vitro* bajo condiciones fisiológicas; su alta tasa de crecimiento en cultivos permite evaluar alteraciones estructurales, así como la viabilidad del organismo. En esta metodología, el compuesto a evaluar se puede disolver en algún disolvente orgánico (por ejemplo DMSO) para ser usado como stock, para posteriormente hacer diluciones con el medio de cultivo para obtener sólo el 1% del disolvente y de esta manera evaluar únicamente el efecto del compuesto.

El tiempo relativamente corto de incubación para realizar subcultivos en un estudio *in vitro*, proporciona una ventaja más para evaluar la actividad y la eficacia que podrían mostrar nuevos agentes antiparasitarios. Los trofozoitos de *G. intestinalis* se guardan a bajas temperaturas para conservar su viabilidad, cuando se requieren, se incuban a temperatura ambiente, después se hacen inóculos en medio de cultivo y se dejan incubar por 48 horas, tiempo en el cual se ha visto que alcanzan la fase logarítmica de crecimiento, esto permite estar seguros de que se cuenta con una gran cantidad de

trofozoítos viables. Se toman inóculos, se agrega medio de cultivo y las diferentes concentraciones del compuesto a evaluar, se incuban a 37°C por 48 horas.

En esta prueba se emplea al metronidazol como patrón de referencia por ser el fármaco de elección en el tratamiento de la giardiasis. La información proporcionada por este método y mediante el análisis Probit, se calcula la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀), la cual se define como la concentración en la que la mitad de la población de un sistema en estudio pierde viabilidad.⁸

2.3. FÁRMACOS ANTIPARASITARIOS

2.3.1. Agentes antiprotozoarios

Los medicamentos contra protozoarios son prácticamente los mismos desde hace años, porque no ha habido otros mejores que los sustituyan. Además, los productos antiprotozoarios eficaces suelen ser tóxicos a dosis terapéuticas y, en muchos casos, su empleo tan amplio ha ocasionado mayor resistencia de los parásitos. Los compuestos que se han diseñados a lo largo de todos estos años, aprovechan las diferencias perfectamente definidas entre el parásito y el huésped. Sin embargo, no han tenido aplicación terapéutica significativa.⁹

Los principales fármacos utilizados en la actualidad en el tratamiento de las infecciones causadas por protozoarios son de dos tipos: nitroheterociclos y bencimidazoles.

2.3.2. Los 5-Nitroimidazoles

Los 5-nitroimidazoles poseen una estructura heterocíclica consistente de un núcleo de imidazol con un grupo nitro en posición 5.¹⁰ Estos compuestos son los agentes terapéuticos más efectivos y ampliamente usados para el control de *G. intestinalis* y los únicos disponibles para el tratamiento de infecciones por *T. vaginalis*. Los 5-nitroimidazoles más utilizados son el metronidazol y el tinidazol.^{11,12,13}

El MTZ tiene efectos adversos comunes: náuseas, mutagenicidad en bacterias y altas dosis pueden causar cáncer en ratones.¹⁴ Los fármacos nitroimidazólicos se han utilizado a lo largo de 40 años, desde su descubrimiento en los años 50's, y en 1962 se reportó su uso para tratamiento de la giardiasis. Sin embargo, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha incluido al metronidazol entre los compuestos para los cuales hay suficiente evidencia de carcinogenicidad en animales de experimentación. Desde hace tiempo, un número de otros nitroimidazoles como el tinidazol, nimorazol y ornidazol se han usado en medicina humana, mientras que el ronidazol y el ipronidazol han tenido aplicaciones veterinarias (**Figura 3**).¹⁵

El tinidazol se usa como antiprotozoario en el tratamiento de infecciones causadas por *T. vaginalis*, *E. histolytica* y *G. intestinalis*; también contra infecciones por bacterias anaeróbicas; como profiláctico en pacientes que han sido sometidos a cistectomía o cirugía colorectal. Su rango de efectividad es tan alto como el del MTZ.¹⁵ El ornidazol es otro miembro del grupo de los 5-Nitroimidazoles, tiene el mismo efecto antimicrobiano que el MTZ y también se usa en el tratamiento de infecciones protozoarias susceptibles, así como para el tratamiento de profilaxis de infecciones por bacterias anaeróbicas.¹⁰

2.3.3. 5-Nitrotiazoles como nuevos agentes terapéuticos

El anillo de nitrotiazol se seleccionó para remplazar al del nitroimidazol clásico, ya que en los estudios de AMES no se encontró efecto mutagénico con el cambio. El átomo de azufre, que reemplaza al nitrógeno en el anillo, es responsable de algunas detoxificaciones en los nitroderivados de esta familia. De esta manera, se aumenta su espectro, su eficacia, y se disminuye la toxicidad.¹⁶

La nitazoxanida es la 2-(acetiloxi)-N-(5-nitrotiazol-2-il)benzamida, un derivado del 5-nitrotiazol sintetizado por primera vez por Rossignol y col. (**Figura 3**)^{17,18}, la cual fue originalmente desarrollada como antihelmíntico veterinario y descrito en 1984 como un fármaco cestocida de uso humano. Su desarrollo se reinició en 1994 después que se descubriera su actividad antiprotozoaria. La NTZ tiene actividad *in vitro* contra *E. histolytica*, *T. vaginalis*, *Cryptosporidium parvum*, *G. intestinalis* e *Isospora belli*, y los helmintos *A. lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *T. trichiura*, *Taenia sagitana*, *Hymenolepsis nana* y *Fasciola hepatica*. A partir del 2002 ha sido aprobada por la FDA para el tratamiento de giardiasis en niños y tiene la ventaja sobre el MTZ de presentarse en una formulación líquida.¹⁹

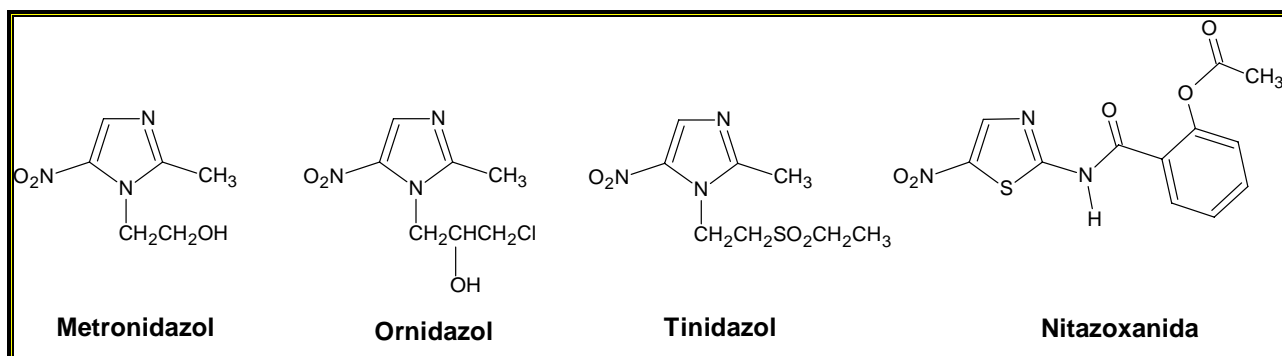


Figura 3. Agentes antiprotozoarios más empleados en la terapéutica.

La NTZ junto con algunos otros derivados fueron sintetizados por Rossignol y Cavier en la década de los 70's, utilizando la secuencia mostrada en la **Figura 4**.^{17,18}

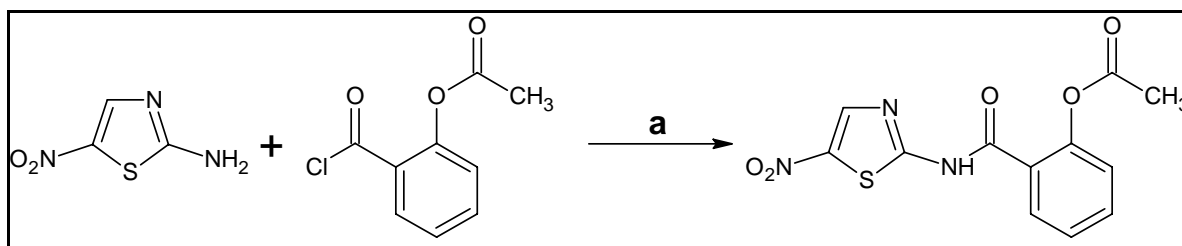


Figura 4. (a) Trietilamina/THF. Patente de la síntesis de nitazoxanida.

Sin embargo, el rendimiento de esta reacción es de 50-55%, no siempre resulta pura puesto que contiene residuos de descomposición, como lo es la tizoxanida. Además, de que dejaba residuos tóxicos como son la trietilamina y el THF.¹⁸ Por esta razón, no siempre se puede disponer de este fármaco y en cantidades suficientes. Por eso se

plantea la posibilidad de realizar la síntesis de la nitazoxanida por una ruta diferente, para evitar generar estos residuos, aumentar su rendimiento y pureza.

2.3.4. Mecanismo de acción de los 5-Nitroheterociclos

En los parásitos anaerobios, como *G. intestinalis*, el Metronidazol, sufre una reducción por la enzima piruvato ferredoxin oxidoreductasa (PFOR), la cual transfiere un electrón al grupo nitro y forma un radical nitroanión, tóxico para el parásito.^{12,14,20,21} Este rompe los puentes disulfuro y causa la ruptura de cadenas de DNA lo que ocasiona daños celulares múltiples que llevan a la muerte del parásito (**Figura 5**).^{10,11} La acción reductiva del metronidazol puede también generar radicales tóxicos, los cuáles reaccionan con componentes celulares esenciales. La falla del tratamiento para la giardiasis se ha atribuido a la resistencia a los nitroimidazoles; debido a la disminución de la actividad de la PFOR del parásito, debido a mutaciones en el sitio activo de la enzima, lo que no le permite metabolizar esta molécula, e inclusive porque puede haber un cambio en el transporte de electrones.¹¹

Estudios realizados en protozoarios han mostrado que la NTZ inhibe a la PFOR, una enzima vital en el metabolismo central en este organismo. En contraste con los nitroimidazoles, la NTZ parece interactuar directamente con la PFOR (NTZ no es dependiente de ferredoxina reducida), y sus productos de activación no inducen mutaciones en el ADN. Esta diferencia en el mecanismo de acción es importante para explicar la eficacia terapéutica de este fármaco contra organismos resistentes a MTZ.²²

Para el caso de los helmintos, se ha estudiado que la NTZ interfiere con el metabolismo de la glucosa del parásito, por alteración de las sustancias secretadas por el Aparato de Golgi (acetilcolinesterasa) y el consumo de glucosa del parásito, creando así un agotamiento del glucógeno y una acidosis láctica en el parásito, lo que ocasiona finalmente, su muerte.¹⁶

2.3.5. Benzimidazoles como agentes antiprotozoarios

El albendazol tiene un espectro amplio antihelmíntico, alta actividad contra larvas y adultos de nematodos y cestodos, es seguro y se utiliza en la medicina humana.¹³ El albendazol, al igual que el levamisol, mebendazol, tiabendazol y pirantel son los fármacos antihelmínticos incluidos en la lista de los fármacos esenciales de la OMS para el tratamiento de nematodos intestinales.¹

Los benzimidazoles, a pesar de tener un amplio espectro antiparasitario y baja toxicidad, debido a su pobre solubilidad y absorción *in vivo*, sólo se emplean para tratar enfermedades gastrointestinales. Aunque también se han utilizado en el tratamiento de infecciones sistémicas, se requieren altas dosis y largos tratamientos.^{12,23}

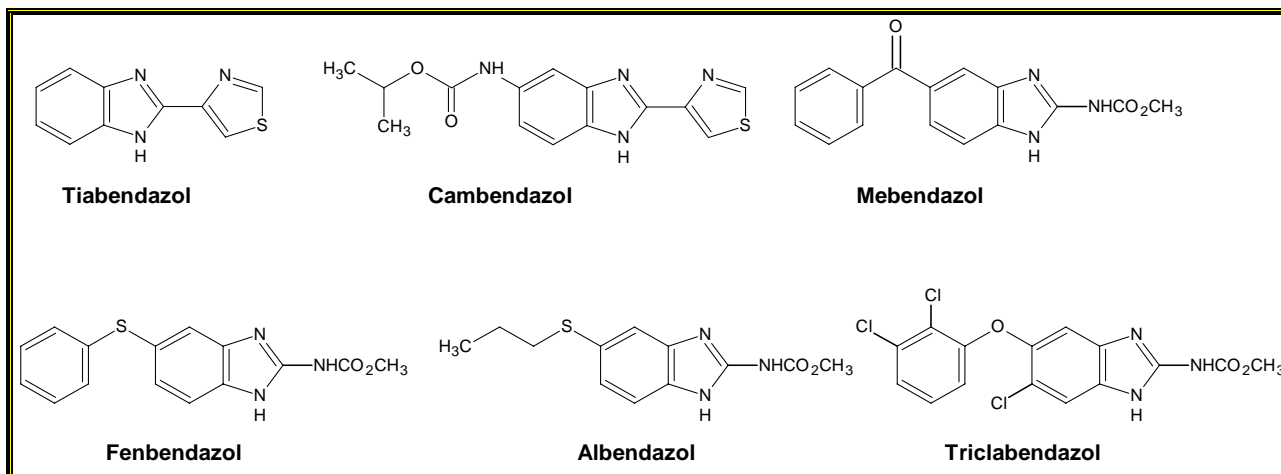


Figura 6. Algunos fármacos bencimidazólicos utilizados en el tratamiento de las infecciones helmínticas y protozoarias.

Los bencimidazol 2-carbamatos (BC) como el ABZ, MBZ, flubendazol y fenbendazol inhiben el crecimiento *in vitro* de *T. vaginalis* y *G. intestinalis*. El ABZ es tan efectivo como el MTZ, el fármaco de elección para el tratamiento de la giardiosis, pero es poco efectivo contra *E. histolytica* y *L. donovani*.²⁰ Otros bencimidazoles como el tiabendazol, cambendazol y triclabendazol también son ampliamente utilizados contra *G. intestinalis* y *T. vaginalis* (**Figura 6**).¹¹

Estudios recientes han demostrado que los compuestos bencimidazólicos 2-sustituídos, que además están halogenados en el anillo bencenoide, dan como resultado derivados con un alto índice antiprotozoario.²⁴

2.3.6. Mecanismo de acción de los bencimidazoles

Los microtúbulos, componentes muy importantes de las células eucarióticas, son ensamblajes de protómeros compuestos de los polipéptidos α -tubulina y β -tubulina. La participación de los microtúbulos en el ambiente intracelular es de gran importancia, ya que están involucrados en procesos fisiológicos que se basan en su capacidad para polimerizarse y despolimerizarse, entre los que están:

- Formación del huso acromático en la división celular.
- Transporte intracelular.
- Secreción celular.
- Absorción de nutrientes.
- Mantenimiento de la forma celular.

La unión del bencimidazol a la β -tubulina de *Giardia* altera el equilibrio tubulina-microtúbulos y causa la despolimerización de los microtúbulos, inhibiendo la polimerización del citoesqueleto, así como también altera la captura de glucosa (**Figura 7**).^{12,23} Además, cuando la alta afinidad de la tubulina se pierde, aparece la resistencia.^{11,12,23}

Otro mecanismo de acción de los bencimidazoles es la inhibición del metabolismo de la glucosa y en la eventual producción de energía. De acuerdo con esto, la inhibición de la fumarato reductasa se considera como un corto circuito en el proceso energético del parásito, provocando su parálisis. De hecho, la fumarato reductasa es única en los parásitos, lo que la hace un excelente blanco para la quimioterapia.²⁷

Los bencimidazoles pueden interferir con la ruta energética de los helmintos por inhibición de la malato deshidrogenasa (MDH) citoplasmática y mitocondrial. Los bencimidazoles antihelmínticos pueden actuar como conductores protónicos liposolubles, tanto en sistemas membranales artificiales como naturales. Estos fármacos perturban severamente el gradiente protónico transmembranal, dejando una considerable caída en los niveles celulares de ATP.²⁶

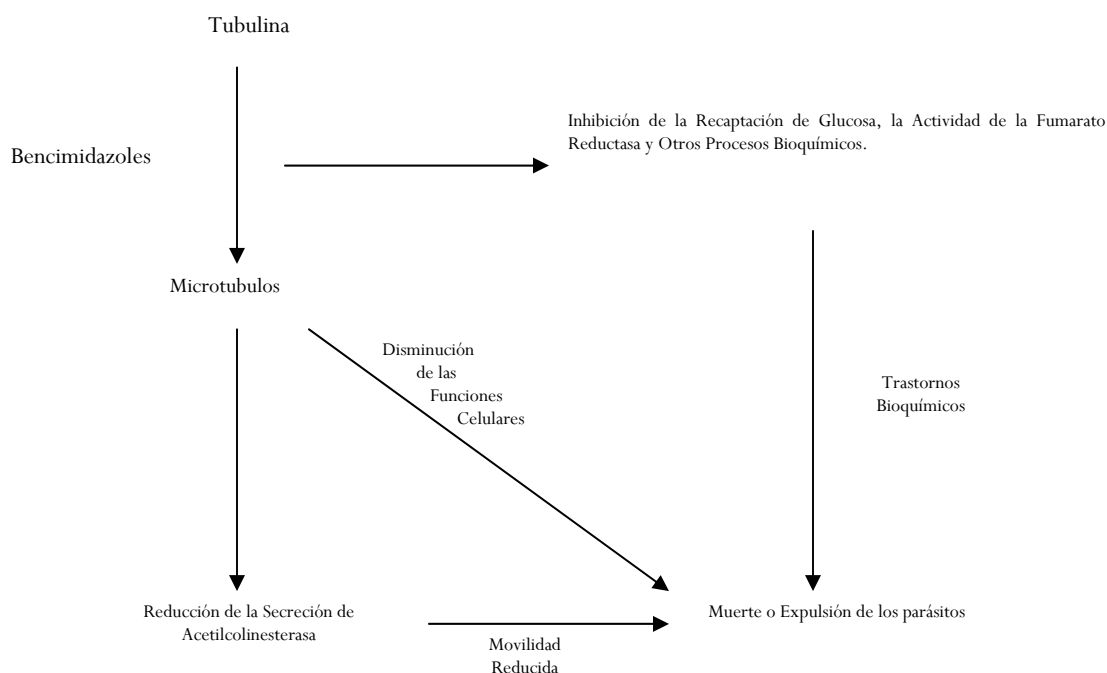


Figura 7. Mecanismo de acción de los Bencimidazoles.

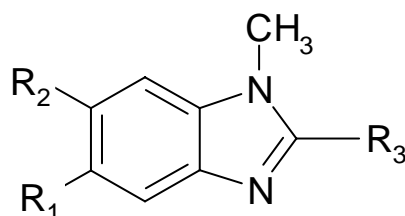
2.4. MODIFICACIONES ESTRUCTURALES DE BENCIMIDAZOLES

Actualmente no sólo se conoce que el núcleo bencimidazólico posee actividad antihelmíntica y antiprotozoaria, sino también se ha visto que esta molécula también puede tener propiedades antibacterianas, anticancerígenas, insecticidas y antifúngicas, entre otras, es por tal motivo que este heterociclo con amplia funcionalidad ha despertado el interés de muchos investigadores para enfocarse a su estudio.²⁷

La introducción de un grupo metilo en la posición 1 mejoró la actividad antiprotozoaria con respecto a sus análogos 1H bencimidazólicos. Tal es el caso de los compuestos presentados en la **Tabla 3** donde se observó que el patrón de sustitución conservado en el anillo de bencimidazol mostró una mayor actividad que el MTZ contra los trofozoítos de *G. intestinalis*.²⁸

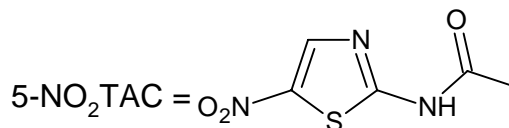
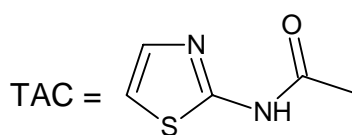
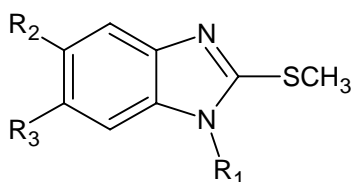
También se han desarrollado nuevos derivados bencimidazólicos productos de la hibridación molecular: híbridos de nitroheterociclos y bencimidazoles. Los cuales resultaron ser altamente eficientes contra *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*; inclusive por arriba de la NTZ y el ABZ (Tabla 4).²⁹

Tabla 3. Actividad antiprotozoaria de los 1-metilbencimidazoles sobre *T. vaginalis* y *G. intestinalis*



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	CI ₅₀ (μM) <i>G. intestinalis</i>
RSD-8	Cl	H	SCH ₃	0.122
RSD-12	H	Cl	SCH ₃	0.100
RSD-16	Cl	Cl	SCH ₃	0.150
NLB13	Piperidinilcarbonil	Cl	SCH ₃	0.122
NLB15	4-metilpiperidinilcarbonil	Cl	SCH ₃	0.099
ESR 37	Cl	Piperidinilcarbonil	SCH ₃	7.013
ESR 38	Cl	4-metilpiperidinilcarbonil	SCH ₃	4.226
NTZ				0.013
ABZ				0.037
MTZ				1.228

Tabla 4. Actividad antiprotozoaria de los compuestos híbridos sobre *T. vaginalis* y *G. intestinalis*



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	CI ₅₀ (μM) <i>T. vaginalis</i>	CI ₅₀ (μM) <i>G. intestinalis</i>
CMC-11	H	TAC	Cl	0.012	0.022
CMC-17	CH ₃	TAC	Cl	0.015	0.035

CMC-18	CH ₃	Cl	TAC	0.018	0.095
CMC-12	H	5-NO ₂ TAC	Cl	0.019	0.005
CMC-19	CH ₃	5-NO ₂ TAC	Cl	0.016	0.010
CMC-20	CH ₃	Cl	5-NO ₂ TAC	0.010	0.005
NTZ				0.110	0.013
ABZ				1.592	0.037
MTZ				0.216	1.228

2.5. MÉTODOS DE SÍNTESIS DE CARBOXAMIDAS

Como ya se había descrito anteriormente, la síntesis de la nitazoxanida tiene algunas desventajas. En base a esto resulta interesante encontrar una ruta alterna para la síntesis de este fármaco, con la finalidad de aumentar su rendimiento y pureza. Por tal razón se hace una breve revisión de algunos métodos de síntesis de carboxamidas.

El grupo funcional amida (-CONR₂) es parte de la estructura de todas las proteínas. Muchos compuestos de interés farmacéutico y productos naturales poseen un grupo amida como parte de su estructura.³⁰ Carboxamida es el término utilizado como sufijo en la nomenclatura sistemática para denotar el grupo -CONH₂.

La elaboración de estos compuestos resulta un poco difícil cuando directamente se hacen reaccionar ácidos carboxílicos y aminas, debido a que la reacción ácido-base entre ellos da como resultado la formación de la sal.³¹ Entre los procedimientos reportados para la preparación de las carboxamidas se han adoptado las condensaciones entre ácidos carboxílicos y aminas, vía la activación del ácido. Estas reacciones involucran el aislamiento o formación *in situ* de derivados reactivos de ácidos, por ejemplo cloruros de ácido, anhídridos, amidas activadas y ésteres activados.³²

2.5.1. A partir de cloruros de acilo

El método más común consiste en la reacción de cloruros de acilo con amoníaco o aminas. Su preparación involucra el empleo de dos equivalentes de la amina o alguna otra base como piridina o NaOH (reacción de Schotten-Bauman) para captar el ácido producido en la reacción. En general, la reacción entre el cloruro de acilo y la amina tiene lugar a temperatura ambiente y produce un buen rendimiento (**Figura 8**).³³

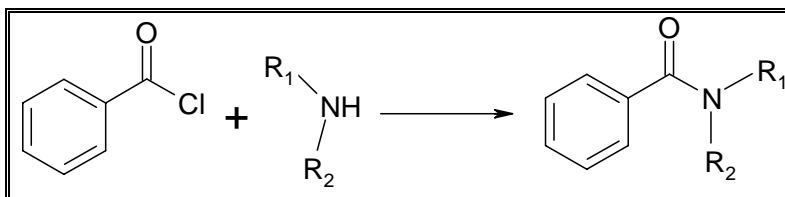


Figura 8. Formación de carboxamidas a partir de cloruros de ácido.

2.5.2. A partir de ésteres

Los ésteres sufren sustitución nucleofílica en sus carbonos acílicos cuando se les trata con amoníaco o con aminas primarias y secundarias. Estas reacciones ocurren con más lentitud que las de los cloruros y anhídridos de acilo, por lo que generalmente no se utilizan (**Figura 9**).³²

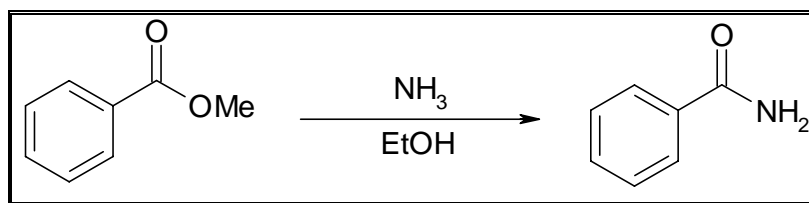


Figura 9. Formación de carboxamidas a partir de ésteres.

2.5.3. A partir de ácidos utilizando un agente acoplante

Un método excelente para la preparación de amidas a partir de aminas y ácidos carboxílicos utiliza *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) como reactivo activante. Los rendimientos son generalmente elevados y las condiciones sumamente suaves como para permitir la utilización de este reactivo muy costoso en muchas síntesis de péptidos complejos (**Figura 10**).^{32,33}

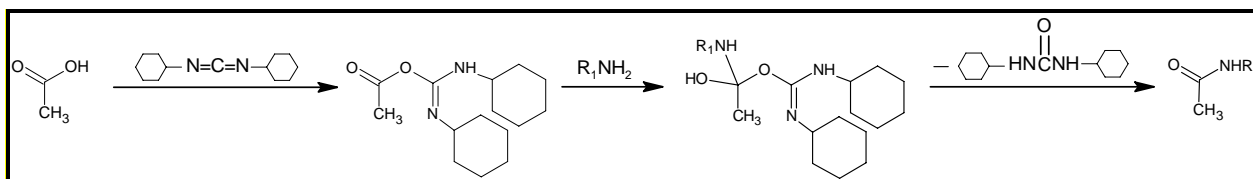


Figura 10. Formación de carboxamidas utilizando DCC como agente acoplante.

Otro método de preparación de carboxamidas, utilizando un agente acoplante, consiste en la reacción de ácidos carboxílicos con 1,1'-carbonildiimidazol (CDI). Se forma un intermediario imidazólico, al cual, posteriormente se le adiciona la amina, para finalmente obtener la amida correspondiente. Este método reporta buenos rendimientos y es relativamente fácil (**Figura 11**).³⁴

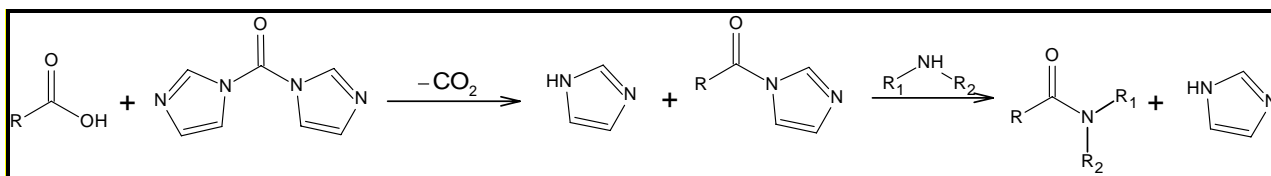


Figura 11. Formación de Carboxamidas utilizando CDI como agente acoplante.

2.6. NITRACIÓN DE TIAZOLES

La nitración de tiazol con la mayoría de los agentes nitrantes da el derivado 5 sustituido más que el 4, la posición 2 no se nitra.³⁵

Para sustratos de baja reactividad, el reactivo más común es una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico concentrados, pero para sustratos activados, la reacción puede llevarse a cabo con ácido nítrico concentrado, en agua, en ácido acético o en anhídrido acético.³⁵

El 2-aminotiazol se nitra en la posición 5 con buenos rendimientos utilizando la mezcla sulfonítrica (**Figura 12**).³⁴

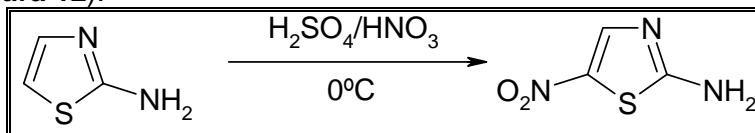


Figura 12. Nitración de tiazoles utilizando mezcla sulfonítrica.

Si las condiciones anhidras son requeridas, la nitración puede ser efectuada con N_2O_5 , el cual remueve el agua formada en la reacción. La nitración en medio alcalino puede ser acompañada con ésteres de ácido nítrico, como el nitrato de etilo (EtONO_2) (**Figura 13**). Este reactivo también se emplea con ácidos de Lewis.³¹

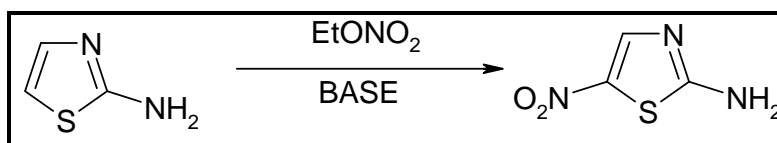


Figura 13. Nitración de tiazoles utilizando nitrato de etilo.

Otros agentes nitrantes son NaNO_2 y ácido trifluoroacético, N_2O_4 (el cual da buenos rendimientos con hidrocarburos policíclicos), $\text{VO}(\text{NO}_3)_3$, y sales de nitronio, así como $\text{NO}_2^+\text{BF}_4^-$, $\text{NO}_2^+\text{PF}_6^-$, y $\text{NO}_2^+\text{CF}_3\text{SO}_3^-$. Una mezcla de HNO_3 /anhídrido acético en una β -ceolita da una buena selectividad en la orientación 5 en la nitración (**Figura 14**).³⁵

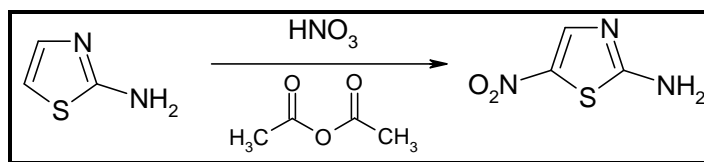


Figura 14. Nitración de tiazoles utilizando ácido nítrico y anhídrido acético.

2.7. PROTEÓMICA

2.7.1. Definición

El término Proteoma fue “acuñado” en 1995 para describir el complemento total de proteínas expresado por un genoma dentro de un tipo celular, tejido o fase de desarrollo en un tiempo determinado. La Proteómica es el estudio e identificación de proteínas a gran escala con una alta resolución por métodos bioquímicos, bajo ciertas condiciones experimentales, asociada con el despliegue de un gran número de proteínas de una línea celular dada u organismo, incluyendo estudios de localización e interacción empleando geles de poliacrilamida en dos-dimensiones.³⁶⁻³⁹

En muchos organismos, la abundancia de la transcripción está pobremente relacionada a niveles de expresión de proteínas. Es por eso que la proteómica es complementaria a la genómica, ya que se enfoca en los productos de los genes: las proteínas, que son las moléculas activas de las células. Las modificaciones de las proteínas que no son aparentes de la secuencia de DNA, tanto como isoformas, modificaciones post-traduccionales, interacciones proteína-proteína y composición de los organelos únicamente pueden ser determinadas por metodologías proteómicas.^{36,38,39}

La meta de la proteómica es la completa identificación y cuantificación de un proteoma específico, con la última meta de revelar la función proteica como parte de un sistema complejo e interrelacionado.³⁸

La caracterización de proteomas ha sido posible por avances recientes en dos puntos tecnológicos: electroforesis en gel de 2D y espectrometría de masas.³⁶

2.7.2. Identificación y análisis de proteínas

Uno de los pasos cruciales es obtener y manejar la muestra proteica. Una línea celular posee alrededor de 100,000 genes, pero solo puede expresar 10,000; un número más alto es expresado en tejidos. Sin embargo, el rango dinámico de abundancia de proteínas en muestras biológicas puede ser tan alta como 1×10^6 . Debido a que el mejor gel de 2-D rutinariamente puede resolver no más de 1,000 proteínas, evidentemente sólo las proteínas más abundantes pueden ser visualizadas por electroforesis en gel, si es usado un extracto crudo.³⁶

El método de elección para la investigación proteómica es la electroforesis en una dimensión o en dos dimensiones. Las ventajas de la electroforesis en 1-D como un método de preparación son que virtualmente todas las proteínas son solubles en dodecil sulfato de sodio (SDS), el rango de masa molecular relativa de 10,000 a 300,000 Da es cubierto fácilmente, y proteínas extremadamente ácidas o básicas son visualizadas fácilmente.^{36, 37}

La separación de proteínas por electroforesis en 2D se basa en el enfoque isoeléctrico en la primera dimensión seguido por el SDS-PAGE (masas) en la segunda dimensión.³⁸ La técnica fue descrita primero por O'Farrell.³⁸ Al principio presentaba problemas de reproducibilidad por la degradación de anfolitos acarreadores durante el isoelectroenfoco, pero fue resuelto con el desarrollo de gradientes inmobilizados de pH, actualmente disponibles. Estas mejoras permitieron analizar mezclas de proteínas altamente reproducibles y dar mapas detallados de cientos de miles de proteínas de un extracto.^{37,38}

Las mayores limitaciones de la 2D incluyen la incapacidad de resolver proteínas de baja abundancia, aquellas con gran número de dominios transmembranales, los de gran masa molecular o de puntos isoeléctricos extremos. Aparte de estas limitaciones, la 2D sigue siendo la herramienta más importante de este tipo de estudios, que continúa en constante mejora tecnológica.³⁸

Recientemente fue posible identificar proteínas sólo por su secuencia primaria de aminoácidos o por sus propiedades antigénicas. En un principio se utilizó la degradación de Edman para secuenciar aminoácidos y anticuerpos específicos. Actualmente la Espectrometría de Masas (EM) ha reemplazado la técnica clásica de la degradación de

Edman, es mucho más sensible y compatible con mezcla de proteínas, además de ofrecer una mayor eficiencia. Esta técnica es aplicable para todas las proteínas.^{37,38}

Existen dos formas para la identificación de proteínas por espectrometría de masas. El primero consiste en obtener el espectro de masas de la mezcla peptídica, a esto se le llama "huella de masa peptídica" de la proteína estudiada. El espectro es obtenido por un método simple de espectrometría de masas, primero se volatiliza la proteína por Desorción/Ionización Laser Asistida por Matriz (MALDI) o por electrospray (ESI), después se separan los péptidos resultantes usando un Tiempo de Vuelo (Tof). Este separa los péptidos por su relación masa-carga en la mezcla. Estos espectros obtenidos son comparados contra base de datos para determinar la identidad de las proteínas.^{36,37}

El segundo método para identificar proteínas se basa en la fragmentación de péptidos individuales en la mezcla para obtener información de la secuencia. Esta técnica tiene la habilidad de resolver peptidos en una mezcla, aislar una especie en un tiempo determinado y disociarlo en fragmentos que contengan extremos amino o carbonilo terminal. El método espectrométrico de Tandem Masas es técnicamente más complejo y menos escalable que la huella peptídica por MALDI. Su principal ventaja es que la secuencia de información derivada de varios péptidos es mucho más específico para la identificación de una proteína que una lista de masas de péptidos.^{36,37}

Para identificar las proteínas, las secuencias obtenidas teóricamente se deben correlacionar con la base de datos del genoma de interés. La huella de masa peptídica se compara con huellas peptídicas *in silico* de proteínas en una base de datos. Una perfecta correlación es improbable (debido a la pobre desorción e ionización de ciertos péptidos) e innecesario; tan sólo de tres o cuatro a seis correlaciones son suficientes para hacer una correlación con la proteína, al cDNA y hasta el gen.^{37,38}

2.7.3. Proteómica en el descubrimiento de Fármacos

Debido a que las proteínas son los efectores primarios de las enfermedades, la mayoría de los fármacos son diseñados o elegidos para actuar a nivel proteico y no al nivel de ácidos nucleicos.⁶² Por esta razón la tecnología proteómica aplicada a la identificación de blancos de fármacos puede darnos una perspectiva global de este proceso. Aún más si se le compara con una muestra control para identificar las proteínas que han sido diferencialmente expresadas y que podrían ser relevantes para la progresión del tratamiento.^{38, 39}

Las técnicas de proteómica para identificar blancos potenciales de fármacos y mecanismos de acción pueden ser concebidas en tres formas³⁹:

- a) Estudios biológicos básicos de composición celular, regulación y función.
- b) Cambios en la expresión global de proteínas como respuesta a los fármacos.
- c) En ensayos específicos de búsqueda de proteínas unidas a bibliotecas químicas o aductos covalentes con fármacos.

Uno de los aspectos más importantes de la proteómica es su habilidad para estudiar directamente las interacciones dinámicas de proteína con otras proteínas, cofactores, sustratos, lípidos de membranas y ácidos nucleicos.³⁹

La tecnología proteómica permitirá descubrir nuevos marcadores clínicos de enfermedades, nuevas proteínas terapéuticas y nuevos blancos de fármacos.³⁹ Un ejemplo de la aplicación de la proteómica en este campo se observa en estudios recientes en Japón, donde se ha utilizado la proteómica comparativa para evaluar la actividad del compuesto N-89, un compuesto endoperóxido antimalárico, sobre *Plasmodium falciparum*;⁴⁰ pudiendo identificar 15 proteínas que resultaban afectadas como consecuencia del tratamiento. Las proteínas identificadas presentaban diferentes funciones, la mayoría principalmente relacionada con la ruta glicolítica y el metabolismo de proteínas y lípidos. Estos resultados sugirieron que las proteínas identificadas pueden ser candidatos a blancos de endoperóxidos antimaláricos.⁴⁰

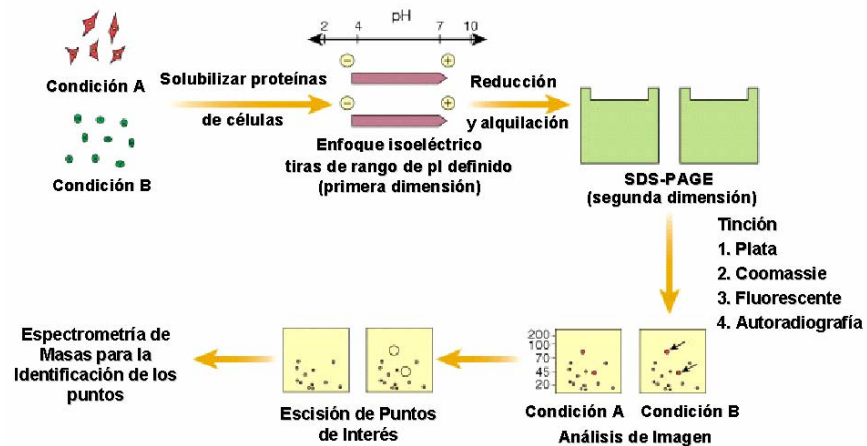


Figura 15. Esquema General del Análisis Proteómico de Muestras Biológicas.³⁹

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aún cuando en la actualidad existen fármacos disponibles para combatir enfermedades causadas por helmintos y protozoarios, algunos estudios relacionados con su toxicidad, baja absorción y la generación de parásitos resistentes a los fármacos de elección, hacen indispensable el continuar con la búsqueda de moléculas con actividad antiparasitaria. Que además se produzcan con un alto rendimiento y alto grado de calidad, para que estén disponibles para todo el público. Como el caso de la NTZ, donde se tiene un fármaco con una muy buena efectividad, pero con un rendimiento menor al 60% y con algunas impurezas.

Además, también es importante conocer el mecanismo de acción de estos fármacos, para saber cuáles son sus principales blancos, para hacer fármacos más específicos y evitar la resistencia de los parásitos a estos. Para este propósito, el uso de la proteómica ha venido a ayudar para conocer el nivel de expresión de proteínas bajo ciertos tratamientos y con esto conocer que proteínas son las que resultan afectadas en menor o mayor grado.

Hoy se conoce por nuestro grupo de investigación, que los derivados 1-metilbencimidazólicos (RSD-8), entre ellos los 2-metil-5(6)-carboxamidas, han mostrado importante actividad antiprotozoaria contra *G. intestinalis*, como fue el caso del compuesto CMC-20; cuya actividad fue mejor que la NTZ.

Con base en estas premisas surgen los siguientes planteamientos:

¿Será posible encontrar una ruta alterna para la síntesis de nitazoxanida a fin de obtener mejor rendimiento y de buena calidad?

¿Será posible mediante un estudio proteómico encontrar modificaciones en la expresión de proteínas en *G. intestinalis*, específicas para fármacos tanto 5-nitroheterocíclicos como la nitazoxanida, como para los derivados bencimidazólicos, con los cuales se permitan encontrar las proteínas blancos de estos fármacos?

4. HIPÓTESIS

La Nitazoxanida se puede sintetizar de manera alterna a la patente dando un producto con buenos rendimientos y buena calidad. Además un estudio proteómico mostrará modificaciones en la expresión de proteínas de *G. intestinalis* como respuesta al tratamiento de nitazoxanida, comparados con metronidazol, albendazol y a los compuestos RSD-8 y CMC-20. Esto permitirá conocer sus proteínas blanco y conocer parte de su mecanismo de acción.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar la nitazoxanida por una ruta alterna a la patente y someterla junto con otros fármacos al estudio Proteómico.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

5.2.2. Purificar y caracterizar los intermediarios y productos finales de la síntesis de NTZ, mediante el empleo de las diferentes técnicas de separación y purificación convencionales, así como de técnicas espectroscópicas con la finalidad de comprobar su estructura química.

5.2.3. Realizar el estudio Proteómico de los compuestos nitazoxanida, metronidazol, albendazol, RSD-8 y CMC-20, sobre *G. intestinalis*.

5.2.4. Analizar y comparar los resultados de los mapas proteómicos obtenidos de los diferentes tratamientos.

5.2.5. Seleccionar las proteínas que mostraron mayor relevancia en su expresión como respuesta a los diferentes tratamientos.

5.2.6. Identificar las proteínas seleccionadas mediante Espectrometría de Masas.

5.2.7. Analizar los resultados del análisis por EM y relacionarlo con un posible mecanismo de acción de los compuestos probados.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

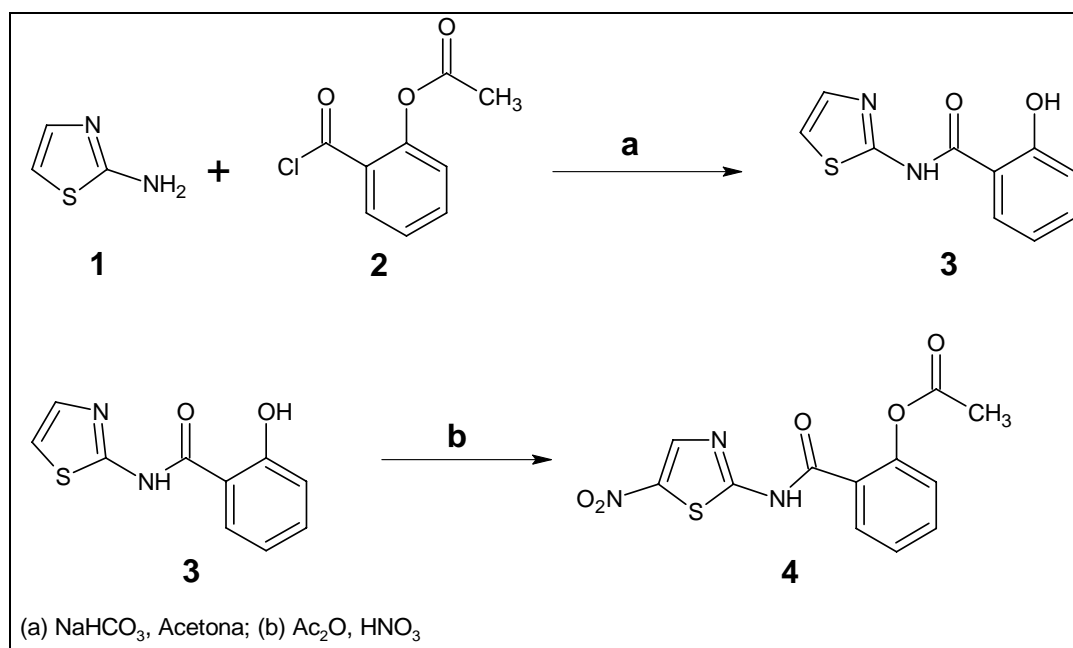
Para una mejor comprensión de las actividades llevadas a cabo en el presente trabajo de tesis, éste se divide en tres partes: la primera, la parte química, comprende los estudios realizados en la síntesis de la nitazoxanida; la segunda parte, la biológica, presenta la evaluación del cambio morfológico ocasionado por los fármacos sobre *G. intestinalis* visto por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB); y la tercera parte, la proteómica, que abarca el estudio proteómico de las giardias tratadas, así como el análisis de proteínas. Las metodologías involucradas para la preparación de cada uno de los intermediarios, productos finales, comprobación estructural realizada por métodos espectroscópicos, la metodología empleada para la obtención del proteoma, su análisis y el estudio de proteínas por Espectrometría de Masas, se presentan en los Apéndices A y B.

6.1. PARTE QUÍMICA

6.1.1. Secuencia sintética para la preparación de nitazoxanida por una ruta alterna

La síntesis del compuesto **4** (nitazoxanida) se dividió en 2 partes. Primero se obtuvo el intermediario 2-hidroxil-N-1,3-tiazol-2-ilbenzamida (**3**), luego, la nitazoxanida **4**, según el **Esquema 1**.

Para obtener el intermediario **3** se partió del cloruro de acetilsaliciloilo comercial (**2**), el cual se sometió a reacción con el 2-aminotiazol comercial (**1**) en acetona en presencia de carbonato de potasio a reflujo, para dar la carboxamida (**3**), la cual se sometió a reacción con anhídrido acético a 78°C; después, la mezcla de reacción se enfrió a 3°C, se le adicionó ácido nítrico fumante y se obtuvo el compuesto deseado **4**.



Esquema 1. Secuencia de síntesis para la preparación del compuesto **4**.

6.2. PARTE BIOLÓGICA

6.2.1. Cultivo de *G. intestinalis* en presencia de los compuestos seleccionados

Los cultivos *in vitro* de los parásitos se llevaron a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del IMSS, Centro Médico Siglo XXI, bajo la dirección de la Dra. Lilián Yépez Mulia. Para estos ensayos se siguió el método descrito por Cedillo-Rivera y Muñoz (1992),³⁶ con algunas modificaciones que a continuación se describen, brevemente: se incubaron 20×10^6 trofozoítos/mL de *G. intestinalis* Cepa WB en medio de cultivo TYI-S-33 modificado suplementado con 10% de suero fetal y bilis bovina, a 37°C por 24 h con una concentración de 3 µg/mL del compuesto a evaluar (albendazol, metronidazol, nitazoxanida, RSD-8, CMC-20). Como control negativo se incubó el mismo número de parásitos únicamente en presencia del dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado para la disolución de los compuestos.

Al término de este tiempo, el cultivo se enfrió en hielo por 30 min. Se centrifugó a 3500 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se decantó y el sedimento se lavó 3 veces con PBS centrifugando a 3500 rpm por 10 min a 4°C. El paquete celular se resuspendió en agua desionizada y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se decantó y se agregó 1 mL de coctel de inhibidores de proteasas con EDTA (Complete, Roche) en agitación. Finalmente, para provocar la ruptura de los parásitos se realizaron 7 ciclos de congelamiento y descongelamiento (-70°C; 37°C). Las muestras se conservaron a -70°C.

6.2.2. Obtención de parásitos para su observación por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

Para estos fines se incubaron 6×10^6 trofozoítos/mL en medio de cultivo al cual se le adicionó el compuesto a evaluar a una concentración de 3 µg/mL, se incubaron por 24 h a 37°C. Posteriormente, los parásitos se concentraron por centrifugación a 200 rpm por 5 min. El paquete celular se resuspendió en buffer de fosfatos salino (PBS) pH 7.2 y se volvió a concentrar a 200 rpm x 5 min por 3 veces. Nuevamente, al paquete celular se le adicionó glutaraldehído al 3% y se conservó a 4°C hasta su uso.

6.2.3. Observaciones por Microscopia Electrónica de Barrido

Las observaciones se realizaron en el Departamento de Microscopia del Instituto de Fisiología Celular, como parte del Servicio que ofrece la unidad a instituciones de la UNAM. Una vez que se obtuvieron los parásitos, como se indicó en la sección 6.2.2, se tomó una alícuota de 200 µL y se colocó sobre un cubreobjetos, previamente cubierto con poli-L-lisina, para después lavarla con PBS. Posteriormente, los parásitos se fijaron con 1% de OsO₄ 0.1 M en solución amortiguadora de cacodilato de sodio ajustada a pH 7.2 por 30 min, se les deshidrató con etanol y se les secó a punto crítico usando CO₂. Finalmente, los parásitos se cubrieron con oro y se observaron en un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-5410 LV, usando una transmisión de 15 kV y a los aumentos de 5000x y 7500x. Las imágenes obtenidas se guardaron en formato TIFF y se retocaron con el programa de computación PHOTOSHOP Versión 7 (ADOBE).

6.3. ANALISIS PROTEOMICO

6.3.1. Análisis de proteínas en una dimensión

El lisado total obtenido se homogeneizó con un sonicador VibraCell (Ultrasonic Processor); bajo condiciones definidas (50 decibeles por 30 segundos, con tres repeticiones, con intervalos de descanso de 1 min entre cada repetición. Todo el proceso se efectuó en hielo. Posterior a la homogeneización de las proteínas se determinó la concentración de ellas mediante el método de Lowry modificado (Bio-Rad DC Protein Assay. Cat: 500-0116), usando como estándar Albúmina Sérica Bovina, (Apéndice B).

La evaluación de la calidad de las proteínas obtenidas se realizó con una concentración de 30 µg de proteína utilizando una minicámara de electroforesis (Mini-Protean 3, Bio-Rad), con geles de poliacrilamida preparados con una concentración de 4% de acrilamida para el gel concentrador y al 10% de acrilamida para el gel separador. Los geles se prepararon con 1.5 mm de grosor. Las proteínas se sometieron a condiciones reductoras con beta mercaptoetanol calentándolas a ebullición previo al cargado de las cámaras. Luego, una vez que las proteínas se colocaron en los pozos, se sometieron a 80 V durante 10 min para lograr su concentración y posteriormente, para su fraccionamiento, se llevaron a 100 V durante 2 h.⁴⁰ En la determinación del peso molecular de los proteínas se utilizaron estándares comerciales de amplio rango de pesos moleculares (Bio-Rad). Los geles se retiraron de la cámara y se tiñeron con azul de Coomassie brillante. Las imágenes de los geles se obtuvieron mediante un fotodocumentador ChemiDoc XRS (Bio-rad) y se evaluaron mediante el programa de cómputo Quantity One Versión 4.6. Las capturas y los análisis de los geles se hicieron bajo parámetros definidos de sensibilidad (10.0). Con estos parámetros se calcularon el número de bandas de los fraccionamientos electroforéticos, su movilidad relativa (Rf), su concentración por el índice de intensidad de píxeles y la estimación de su peso molecular aparente.

6.3.2. Análisis de proteínas en dos dimensiones

Con la finalidad de determinar el perfil de proteínas mediante su análisis en doble dimensión, se obtuvieron los mapas proteómicos de las proteínas solubles obtenidas de *G. intestinalis*: Para estos fines se utilizaron Tiras Immobiline™ DryStrip (Amershan Biosciences) con un intervalo de pH de 4 a 7 y de 7 cm de longitud, las cuales se hidrataron en presencia de 50 µg de proteínas. Previamente las proteínas se mezclaron con una Solución de Rehidratación la cual contenía Urea 8M, CHAPS al 2%, Solución amortiguadora IPG al 2% y Azul de Bromofenol al 0.02% de acuerdo a lo descrito por el fabricante (GE Healthcare Bio-Sciences AB; Immobiline™ DryStrip) .

En la rehidratación con las proteínas, las tiras se colocaron en una charola de hidratación de 12 carriles para tiras de 7 cm (Bio Rad) y a cada una de ellas se les aplicó 125 µL de muestra proteica, se cubrieron con aceite mineral, se tapó la charola y se dejó incubar por 16 h. Después de la hidratación, las tiras se colocaron en otra charola de corrida y, por cada carril en cada uno de los electrodos, se colocaron dos puentes de papel filtro impregnado con agua MilliQ. Las tiras se cubrieron con aceite mineral, se colocó la cubierta de la charola y esta última se colocó en el equipo Protean IEF (BIO-RAD), al cual

se le dio una programación como se muestra en el Apéndice B y bajo estas condiciones se llevó a cabo el isoelectroenfoque o primera electroforesis.

Luego del isoelectroenfoque, las tiras se recuperaron de la charola, se colocaron sobre la parte superior del gel de poliacrilamida y se moldearon con agarosa al 0.5%. Con la finalidad de llevar a cabo la transferencia y la separación de las proteínas separadas por su punto isoeléctrico en las tiras IPG (análisis de segunda dimensión), se realizó un fraccionamiento electroforético bajo condiciones reductoras en geles de poliacrilamida prehechos con una concentración de gel de 4 al 12% (Invitrogen), utilizando una cámara XCell Sure Lock™ Mini-Cell de 7x8 cm (Invitrogen); el fraccionamiento se realizó a 200 V durante 1 h. Al término del fraccionamiento, se recuperaron los geles y se tiñeron con Sypro® Ruby para la visualización de las proteínas (Apéndice B).

Una vez que las proteínas se revelaron con la tinción utilizada, las imágenes se capturaron en el fotodocumentador ya mencionado y se analizaron mediante un programa computacional PDQuest Versión 7.4.0. Cabe aclarar que tal programa computacional permitió la estimación del número de proteínas, su movilidad relativa (Rf), el cálculo de su intensidad, la estimación de su peso molecular aparente, de acuerdo a los marcadores de peso molecular comercial que se utilizaron, así como la comparación entre los diferentes geles obtenidos en la evaluación del efecto de los compuestos a estudiar.

Posteriormente, luego de haber separado a las proteínas en geles 2D y dado que se estableció que a través de este proceso era factible identificar que había proteínas afectadas por el tratamiento de los parásitos, se decidió identificarlas mediante su análisis por espectrometría de masas. Para estos fines se hicieron análisis 2D e identificación de las proteínas por espectrometría de masas de acuerdo a lo descrito por Dea y col,⁴² en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid en España. La diferencia de estos análisis con los que se hicieron en el laboratorio en México, fue que se buscó una mejor separación de las proteínas mediante su electroforesis en geles más grandes y para ello se utilizaron tiras Immobiline™ DryStrip de pH 4-7 y 18 cm (Amersham Biosciences). Además, se hicieron otras modificaciones como que las muestras tuvieron que ser liofilizadas para su envío.

Para el análisis de 500 µg de proteínas, las muestras liofilizadas se resuspendieron en agua MilliQ y se precipitaron las proteínas con TCA para eliminar sales y otros agentes contaminantes. Las muestras se recuperaron por centrifugación y se solubilizaron en una solución amortiguadora de rehidratación que contenía Urea 7M, Tiourea 2M, solución amortiguadora IPG al 0.5%, Azul de Bromofenol al 0.02% y DTT al 0.28%. En seguida, las tiras se colocaron individualmente en sarcófagos de 18 cm (Amersham Bioscience) y se les adicionaron 340 µL de muestra para lograr la hidratación de la tira IPG. El isoelectroenfoque se aplicó luego de que las tiras entraron en contacto a través de puentes colocados en cada uno de los electrodos y para ello se empleó un equipo IPGphor-Isoelectric (Amersham Bioscience), el cual se programó como se indica en el Apéndice B.

Al finalizar el isoelectroenfoque, se recuperaron las tiras y se colocaron sobre geles de poliacrilamida al 12%, se moldearon con agarosa al 0.5% y se procedió a su transferencia y fraccionamiento electroforético, bajo condiciones reductoras, en una cámara de 16 x 16 cm (Hoefer SE 660, Amersham Biosciences) bajo condiciones de 80 mA durante 6 horas. Una vez que se logró el fraccionamiento, los geles se recuperaron y se tiñeron con Azul de Coomassie Coloidal (Bio-Rad). Una vez reveladas las proteínas, las imágenes de los geles se obtuvieron mediante un fotodocumentador ChemiDoc XRS (Bio-Rad), se

analizaron y se compararon mediante el software PDQuest Versión 7.4.0. Con base al programa se obtuvo el número de proteínas, punto isoeléctrico de cada proteína teñida, su intensidad en píxeles y peso molecular. Además, se compararon los geles obtenidos bajo los diferentes tratamientos con el mismo programa, en base a ello se establecieron qué proteínas podrían ser de interés para llevar a cabo su identificación. Una vez seleccionadas, las proteínas se recuperaron de los geles cortándolos con un sacabocados y se colocaron en tubos eppendorf con agua MilliQ. Las muestras se enviaron a la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid para su análisis mediante espectrometría de masas.

Las proteínas se trataron en un Digestor Multiple probe 215 liquid handler y Turbo Vap 96 Workstation de Amersham Bioscience. La espectrometría de masas se realizó por MS-MS en un Espectrómetro de Masas 4700 Proteomics Analyzer con TOF/TOF™, con fuente de ionización tipo MALDI y dos analizadores tipo tiempo de vuelo en tandem y cámara de colisión (CID) para fragmentación de iones de Applied Biosystems. La búsqueda de las proteínas se realizó por la técnica "Combined", que es la combinación de huella peptídica más fragmentación; utilizando el sistema de búsqueda MASCOT.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA PARTE QUÍMICA

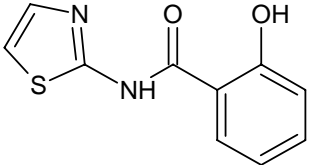
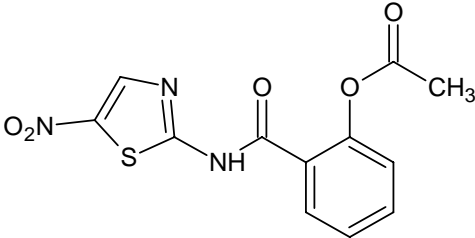
En la **Tabla 5** se presentan las constantes físicas de los intermediarios y del producto final sintetizado en este trabajo así como los rendimientos. En la **Tabla 6** se resumen las constantes espectroscópicas de IR, RMN ¹H y espectrometría de masas así como las asignaciones realizadas para cada compuesto.

Tabla 5. Constantes físicas de los compuestos sintetizados

Compuesto	Rendimiento Crudo (%)	Rendimiento Recristalizado (%)	Punto de Fusión (°C)	Disolvente utilizado en la Recristalización	Rf (Sistema)
3	65.45	56	253.8 – 254.9	Etanol/DMF	0.37
4	42.30	65.30	195.3 –197.5	Metanol	0.58

Sistema I: CHCl₃/Acetona

Tabla 6. Constantes espectroscópicas de los compuestos sintetizados

COMPUESTO	SEÑALES
<p>2-Hidroxi-N-1,3-tiazol-2-ilbenzamida (3)</p> 	<p>Espectro 1, IR: Pastilla (KBr) cm⁻¹: 3102.77 (Ar-NH-R), >3000 (C-H Aromático), 1675.54 (C=O de amida), 1548.91 (-NH-), 3182.59 (R-OH), 1211.16 (fenol).</p> <p>Espectro 2, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆) ppm: 7.180 (d, <i>J</i>=4 Hz, 1H, H-4'); 7.542 (d, <i>J</i>=3.7 Hz, 1H, H-5'); 7.275 (dd, <i>J</i>₁=9.17, <i>J</i>₂=1.33 Hz, 1H, H-3); 7.404 (td, <i>J</i>₁=8.42 Hz, <i>J</i>₂=8.5 Hz, <i>J</i>₃=1.67 Hz, 1H, H-5); 7.622 (td, <i>J</i>₁=8.67 Hz, <i>J</i>₂=8.67 Hz, <i>J</i>₃=1.67 Hz, 1H, H-4); 7.778 (dd, <i>J</i>₁=8.5 Hz, <i>J</i>₂=2 Hz, 1H, H-6); 12.082 (s, 1H, int. con D₂O, N-H de amida); 12.592 (s, 1H, int. con D₂O, O-H aromático).</p> <p>Espectro 3, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 220 (M⁺, 55%); 121 (M-99, 100%)</p>
<p>2-[[5-nitro-1,3-tiazol-2-il]amino]carbonil}fenil acetato (Nitazoxanida) (4)</p> 	<p>Espectro 4, IR: Pastilla (KBr) cm⁻¹: 3190.15 (Ar-NH-R), >3000 (C-H Aromático), 1679.83 (C=O de amida), 1563.55 y 1371.76 (Ar-NO₂), 1760.90 (C=O de éster), 1236.69 (C-O-C de éster).</p> <p>Espectro 5, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆) ppm: 2.205 (s, 3H, CH₃ de éster); 7.263 (dd, <i>J</i>₁=12, <i>J</i>₂=3 Hz, 1H, H-3); 7.387 (td, <i>J</i>₁=9 Hz, <i>J</i>₂=5 Hz, <i>J</i>₃=1.5 Hz, 1H, H-5); 7.608 (td, <i>J</i>₁=9.75 Hz, <i>J</i>₂=9 Hz, <i>J</i>₃=2 Hz, 1H, H-4); 7.760 (dd, <i>J</i>₁=9.5 Hz, <i>J</i>₂=1.5 Hz, 1H, H-6); 8.650 (s, 1H, H-4'); 12.570 (sa, 1H, int. con D₂O, N-H de amida).</p> <p>Espectro 6, EM: FAB+1 <i>m/z</i>: 307 (M+1, 34%).</p>

Para la obtención del compuesto **3** se partió del cloruro de acetilsaliciloilo comercial (**2**), el cual se sometió a una reacción de sustitución con 2-aminotiazol en presencia de bicarbonato de sodio, una reacción con buenos rendimientos. El análisis espectroscópico de IR mostró una banda a 1675 cm^{-1} , la cual se asignó al grupo carbonilo de amida, al igual que una señal en 3182 cm^{-1} reveló la presencia de un grupo -OH , que confirmó que es un fenol por la señal característica en 1211 cm^{-1} . El espectro de RMN ^1H mostró dos dobletes, uno a 7.180 y el otro a 7.542 ppm, con $J=3.7\text{ Hz}$, los cuales integraron para un hidrógeno cada uno, correspondientes a los hidrógenos H-4' y H-5' respectivamente del anillo de tiazol; además de dos señales en 12.082 y 12.592 ppm, correspondientes al hidrógeno del grupo N-H de la carboxamida y al grupo O-H del grupo hidroxilo, respectivamente; las cuales desaparecieron cuando se hizo el intercambio con D_2O . En el espectro de masas se observó el ion molecular con una relación m/z de 220 (55%) que correspondió a la masa molecular. El pico base del espectro apareció en una relación m/z de 121 generado a partir de la pérdida de un hidrógeno de la amida y a un hidrógeno del grupo hidroxilo.

La carboxamida **3** se nitró con HNO_3 fumante y anhídrido acético entre $40\text{-}50\text{ }^\circ\text{C}$, dando el producto acetato de 2-[(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)amino]carbonil)fenil acetato o nitazoxanida (**4**). El espectro de IR mostró las bandas características del grupo nitro en 1539 y 1352 cm^{-1} . En el espectro de RMN ^1H se observaron dos señales doble de dobles en 7.263 y 7.760 ppm que integraban para un hidrógeno, correspondientes a los H-4 e H-5 respectivamente; dos dobletes tripletes en 7.387 y 7.608 ppm que integraron para 1 H, correspondientes a H-3 y H-6 respectivamente del anillo bencénico; una señal simple a 8.650 ppm, que integró para 1 H correspondió al hidrógeno H-4 del anillo de tiazol, lo que evidenció la presencia del grupo nitro en la posición 5 y una señal a 12.570 ppm que integró para 1H correspondiente al hidrógeno del grupo N-H de la carboxamida, la cual desapareció en el intercambio con D_2O . El espectro de masas se determinó por la técnica de ionización FAB+ dada la baja estabilidad del ion molecular. En este espectro se observó el ion con una relación m/z de 307 y una abundancia relativa del 34%, que correspondió a la masa molecular esperada ($M+1$).

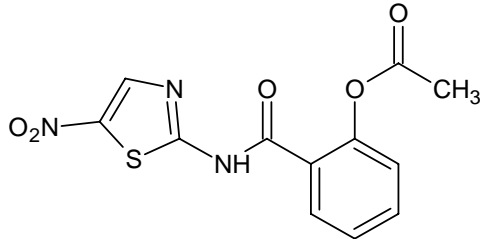
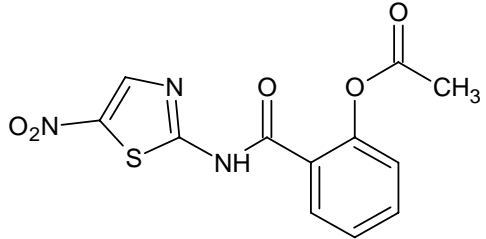
Como el fin de esta síntesis era obtener la Nitazoxanida por una vía alterna a la de la patente, se compararon sus propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas. Estos datos se muestran en las **Tabla 7 y 8**.

Tabla 7. Comparación de las constantes físicas de NTZ comercial y sintetizada

Nitazoxanida	Rendimiento Crudo (%)	Apariencia	Punto de Fusión ($^\circ\text{C}$)	Disolvente utilizado en la Recristalización	Rf (sistema)
Patente	55.0	Sólido amarillo oscuro	202	Etanol	0.58 (I)
Sintetizada	42.30	Sólido blanco grisáceo	195.3-197.5	Metanol	0.58 (I)

Sistema I: $\text{CHCl}_3/\text{Acetona}$, 75:25

Tabla 8. Constantes espectroscópicas de los compuestos sintetizados

COMPUESTO	SEÑALES
<p>Nitazoxanida Sintetizada</p> 	<p>Espectro 4, IR: Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3190.15 (Ar-NH-R), >3000 (C-H Aromático), 1679.83 (C=O de amida), 1563.55 y 1371.76 (Ar-NO₂), 1760.90 (C=O de éster), 1236.69 (C-O-C de éster).</p> <p>Espectro 5, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆) ppm: 2.205 (s, 3H, CH₃ de éster); 7.263 (dd, $J_1=12$, $J_2=3$ Hz, 1H, H-3); 7.387 (td, $J_1=9$ Hz, $J_2=5$ Hz, $J_3=1.5$ Hz, 1H, H-5); 7.608 (td, $J_1=9.75$ Hz, $J_2=9$ Hz, $J_3=2$ Hz, 1H, H-4); 7.760 (dd, $J_1=9.5$ Hz, $J_2=1.5$ Hz, 1H, H-6); 8.650 (s, 1H, H-4'); 12.570 (sa, 1H, int. con D₂O, N-H de amida).</p> <p>Espectro 6, EM: FAB+1 m/z: 307 (M+1, 34%).</p>
<p>Nitazoxanida Patentada</p> 	<p>Espectro 7, IR: Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3356.15 (Ar-NH-R), 3086.63 (C-H Aromático), 1661.12 (C=O de amida), 1526.92 y 1363.64 (Ar-NO₂), 1772.15 (C=O de éster), 1224.65 (C-O-C de éster).</p> <p>Espectro 8, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆) ppm: 2.237 (s, 3H, CH₃ de éster); 7.308 (dd, $J_1=10$, $J_2=1$ Hz, 1H, H-3); 7.437 (td, $J_1=9.5$ Hz, $J_2=10$ Hz, $J_3=1.5$ Hz, 1H, H-5); 7.676 (td, $J_1=9.88$ Hz, $J_2=9.5$ Hz, $J_3=2.5$ Hz, 1H, H-4); 7.841 (dd, $J_1=9.75$ Hz, $J_2=2.5$ Hz, 1H, H-6); 8.526 (s, 1H, H-4'); 13.626 (sa, 1H, int. con D₂O, N-H de amida).</p> <p>Espectro 9, EM: FAB+1 m/z: 307 (M+1, 36%).</p>

En lo que respecta a las propiedades físicas de la nitazoxanida, el producto comercial difiere en el color en relación al sintetizado, ya que el comercial es de un color amarillento y el producto de síntesis es blanco grisáceo. La diferencia entre los puntos de fusión es de 5°C, esto puede deberse a que el producto comercial generalmente está contaminado con el producto de hidrólisis, la tizoxandia. Esta contaminación hace que aumenta su punto de fusión, a diferencia del producto sintetizado que es puro. Aunque igual que la patente, es propensa de sufrir hidrólisis en condiciones ambientales. El R_f de ambos productos es el mismo, lo que indica que tienen el mismo desplazamiento en la CCD (0.58).

Sin embargo, el rendimiento del producto sintetizado es menor con respecto al de la patente. Esto es debido a que durante el proceso de nitración se forma parte del producto de hidrólisis, dando la tizoxanida. Además de que el producto es poco soluble en metanol, perdiéndose un poco en las aguas madres durante los lavados. Sin embargo, al final se obtiene el producto blanco y puro, además de que no genera subproductos muy tóxicos, como en el caso de la patente que produce trietilamina y tetrahidrofurano.

En el análisis espectroscópico por IR la señal característica del grupo nitro en ambos espectros indicó que ambos compuestos se encuentran nitrados. La RMN¹H reveló el mismo patrón de comportamiento de los hidrógenos aromáticos tanto de la NTZ comercial

como de la sintetizada. De igual forma, la señal del hidrógeno del anillo tiazólico de ambos compuestos está situado a campos bajos similares, lo que demuestra que la posición del grupo nitro en el anillo tiazólico del compuesto sintetizado es correcta (posición 5). Por último, en la Espectrometría de Masas, el patrón de fraccionamiento es similar para los dos compuestos, dando el ion molecular prácticamente con la misma abundancia (34-36%).

Estos datos demuestran que se trata del mismo producto con propiedades físicas similares, que se corroboró con ayuda de las características espectroscópicas y espectrométricas. De esta forma obtuvimos un producto de calidad, el cual se procedió a evaluar por un estudio proteómico junto con otros compuestos antiparasitarios.

7.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA PARTE BIOLÓGICA

7.2.1. Microscopia Electrónica de Barrido

Los trofozoitos de *G. intestinalis* tratados con 3 µg/mL de los compuestos ABZ, NTZ, MTZ, RSD-8 y CMC-20, se sometieron a un estudio de Microscopia Electrónica de Barrido. Los resultados de muestran en la **Figura 16**.

En las microfotografías se muestran variaciones en la estructura de los trofozoitos dependiendo del tratamiento al cual fueron sometidos. En las fotografías A y B se observa la morfología tradicional del trofozoito. La fotografía A muestra al trofozoito en vista posterior, donde se aprecia la forma ovoide del parásito, así como la totalidad de los flagelos caudales, laterales y frontales; en la fotografía B se ve al trofozoito en vista ventral, donde se aprecia el disco ventral así como los flagelos caudales y laterales que nacen del disco ventral del parásito.

El efecto del MTZ sobre *G. intestinalis* se muestra en las imágenes 21C y 21D, donde se observa un daño parcial en la parte dorsal y ventral del trofozoito. El efecto es mínimo tanto en los flagelos como en el disco ventral, sin llegar al daño total. Este efecto del MTZ, el cual es un nitroimidazol, muestra que su efecto es más destructivo que el ABZ, y posiblemente, su efecto es menos específico y localizado.

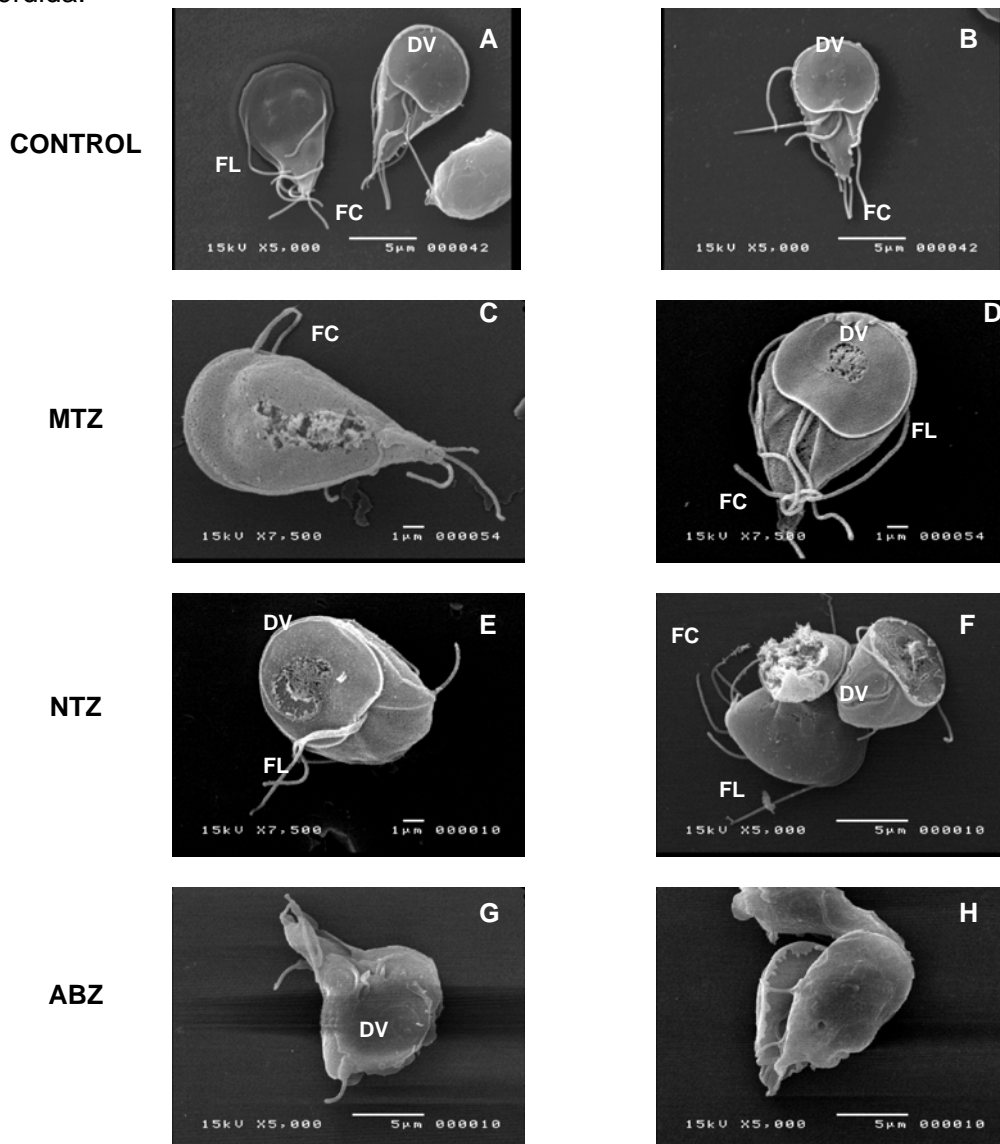
La NTZ, un nitrotiazol, presenta un efecto similar al del MTZ aunque más potente que éste. En las fotografías 21E y 21F se aprecia ruptura parcial o total del trofozoito por su parte dorsal, así como en la zona ventral y en el centro del disco ventral. Se observa acortamiento de los flagelos caudales aunque muy poco perceptible. El daño en general fue mayor que el del MTZ.

El tratamiento de los trofozoitos con ABZ indujo cambios en la morfología del parásito (Figura 21G y 21H), tal como la forma irregular, muy diferente a la forma ovoide del control; así como acortamiento de los flagelos y presencia de pequeños aglomerados (vesículas) en el cuerpo. Se tiene conocimiento de que el ABZ actúa inhibiendo el proceso de polimerización de tubulina (impidiendo la unión entre α y β -tubulina); así como su despolimerización, estabilizando el dímero $\alpha\beta$ -tubulina⁴⁴, lo que explica el cambio de morfología y la formación de vesículas, sin ningún otro daño aparente.

En las figuras 21I y 21J se muestra el daño provocado en los trofozoitos por el derivado bencimidazólico, RSD-8. Se aprecia pérdida de la membrana de la parte dorsal, presencia de poros en todo el cuerpo, acortamiento de los flagelos caudales y daño en el centro del

disco ventral. Este derivado bencimidazólico parece tener un mecanismo de acción diferente al del ABZ.

Finalmente, en las figuras 21K y 21L se muestran los efectos del compuesto CMC-20, en las cuales se observa un daño mayor en los trofozoítos con respecto a los otros compuestos. Las imágenes muestran cómo el parásito pierde totalmente su morfología característica. Además, observamos pérdida parcial o total de los flagelos. Es notable la pérdida de la membrana en todo el cuerpo del parásito. Además de daño en el centro del disco ventral, que en ocasiones es tan grande que abarca todo el disco, provocando su pérdida.



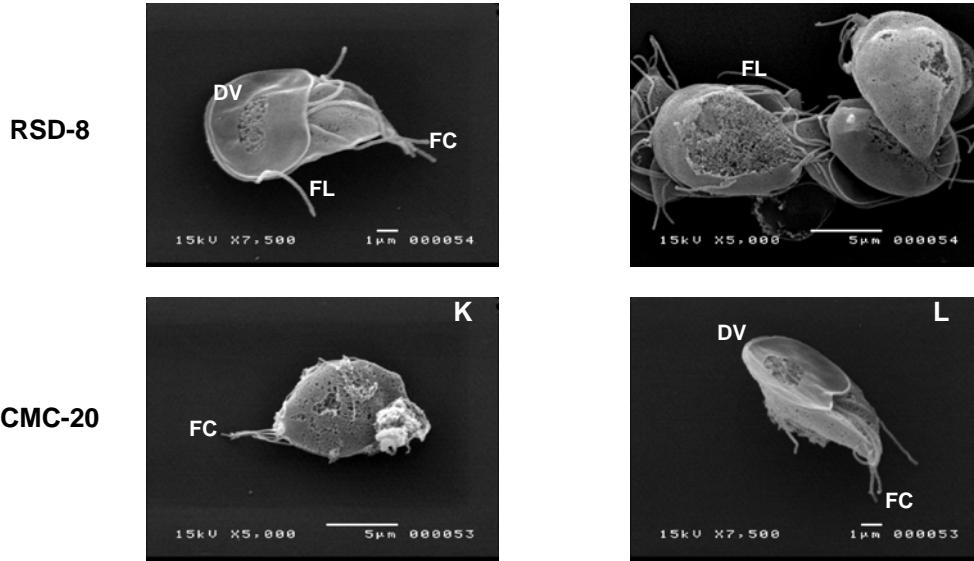


Figura 16. Microfotografía Electrónica de Barrido de trofozoítos de *G. intestinalis*. Los trofozoítos se incubaron con 3 µg/mL de los diferentes compuestos a 37°C por 24 horas. A-B, Control. C-D, MTZ. E-F, NTZ. G-H, ABZ. I-J, RSD-8. K-L, CMC-20. DV, disco ventral; FC, flagelos caudales; FL, flagelos laterales; FF, flagelos frontales.

En este caso, el compuesto es un híbrido de un bencimidazol y un nitroheterociclo, que si bien se esperarí tener un resultados similar al de estos dos grupos, este no fué del todo cierto; permitiendo pensar que el mecanismo de acción de este compuesto es diferente.

7.2.2. Análisis en 1D de las Proteínas de *G. intestinalis* con los diferentes compuestos

El lisado total obtenido de los trofozoítos de *G. intestinalis* fue cuantificado para conocer la concentración de proteínas, utilizando la técnica de Lowry modificado. El resultado de esta cuantificación se muestra en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Cuantificación de Proteínas de *Giardia intestinalis* en Diferentes Tratamientos

Compuesto	Absorbancia	Concentración (mg/mL)	Para 30 µg de proteína (en µL)
Control 24 h	0.409	3.24	9.28
MTZ	0.254	1.92	15.63
NTZ	0.323	2.61	11.48
ABZ	0.234	2.02	14.84
RSD-8	0.486	3.89	7.72
CMC-20	0.364	3.30	9.09

Una vez ealizada la cuantificación de proteínas, éstas fueron analizadas electroforéticamente (Mini-Protean 3, Bio-Rad) mediante geles de poliacrilamida al 10% bajo condiciones reductoras a 100 V durante 2 h. Los geles se cargaron con 30 µg de proteínas y después de su corrimiento electroforético, se tiñeron con Azul de Coomassie brillante para la visualización de las proteínas. El resultado final se muestra en la **Figura 17**.

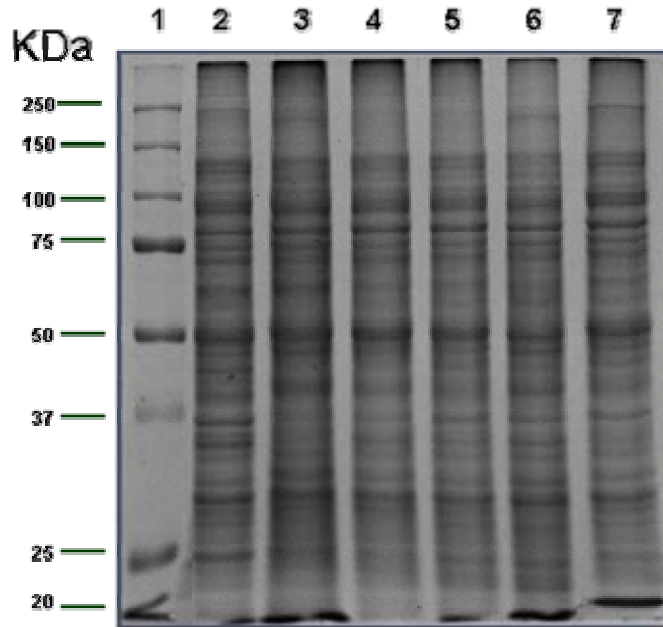


Figura 17. Análisis Electroforético de proteínas de *G. intestinalis*. 1) Marcadores de Pesos Moleculares (KDa); 2) Control 24 h; 3) MTZ; 4) NTZ; 5) ABZ; 6) RSD-8; 7) CMC-20.

En esta imagen la zona que muestra los cambios más evidentes está comprendida entre 75 y 50 kDa, donde apreciamos una disminución en la intensidad de bandas en todos los tratamientos. También hay una disminución en la intensidad de bandas entre 37 y 50 kDa. Así mismo, hay cambios tanto en la intensidad como en el número de bandas por debajo de los 37 kDa.

Para poder visualizar mejor la diferencia en cuanto a la expresión de proteínas como respuesta a los diferentes tratamientos, la imagen fue analizada con el software QuantityOne de Bio-Rad. Con este programa pudimos analizar el número de bandas, su intensidad, pesos moleculares, etc. Estos resultados se resumen en la **Tabla 10** y en la **Gráfica 3**.

Tabla 10. Número de Bandas por Muestra

Muestra	No. de Bandas
Control 24 h	40
MTZ	31
NTZ	34
ABZ	34
RSD-8	32
CMC-20	33

Como se observa en la **Gráfica 3**, para cada uno de los tratamientos a los que se sometieron los parásitos, los cuales derivan de los análisis de los perfiles proteicos de los geles de poliacrilamida, los patrones de movilidad aparentemente son semejantes en todos los casos; sin embargo, como se encontró durante las comparaciones de las separaciones electroforéticas en los geles (**Figura 17**), hay variaciones que están asociadas al tipo de tratamiento y que están localizadas en zonas de movilidad definidas y las cuales se describen como sigue:

En la comparación realizada entre el Control y la muestra tratada con MTZ, en general la cantidad de proteína disminuye, siendo más notable el cambio en la zona entre 0.2 y 0.3 de Rf (113 – 80 KDa). También hay una disminución notable de proteína a 0.5 de Rf (49.2 KDa), entre 0.6 – 0.7 (40 – 32 KDa) y a 0.9 (23 KDa).

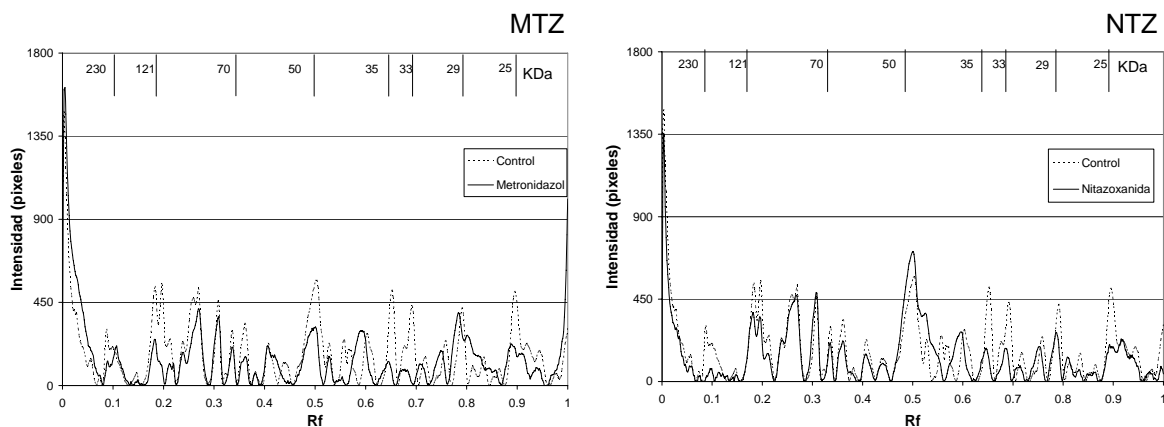
En la comparación entre Control y NTZ, se encontró que hubo una disminución de proteínas en la zona comprendida entre 0.1 a 0.2 (230 – 112 KDa), entre 0.6 – 0.8 (40 – 29 KDa) y en 0.9 de Rf (24 KDa). Sin embargo, al contrario que en MTZ, aquí se presentó un aumento en la cantidad de proteínas en la zona de 0.5 (47 KDa).

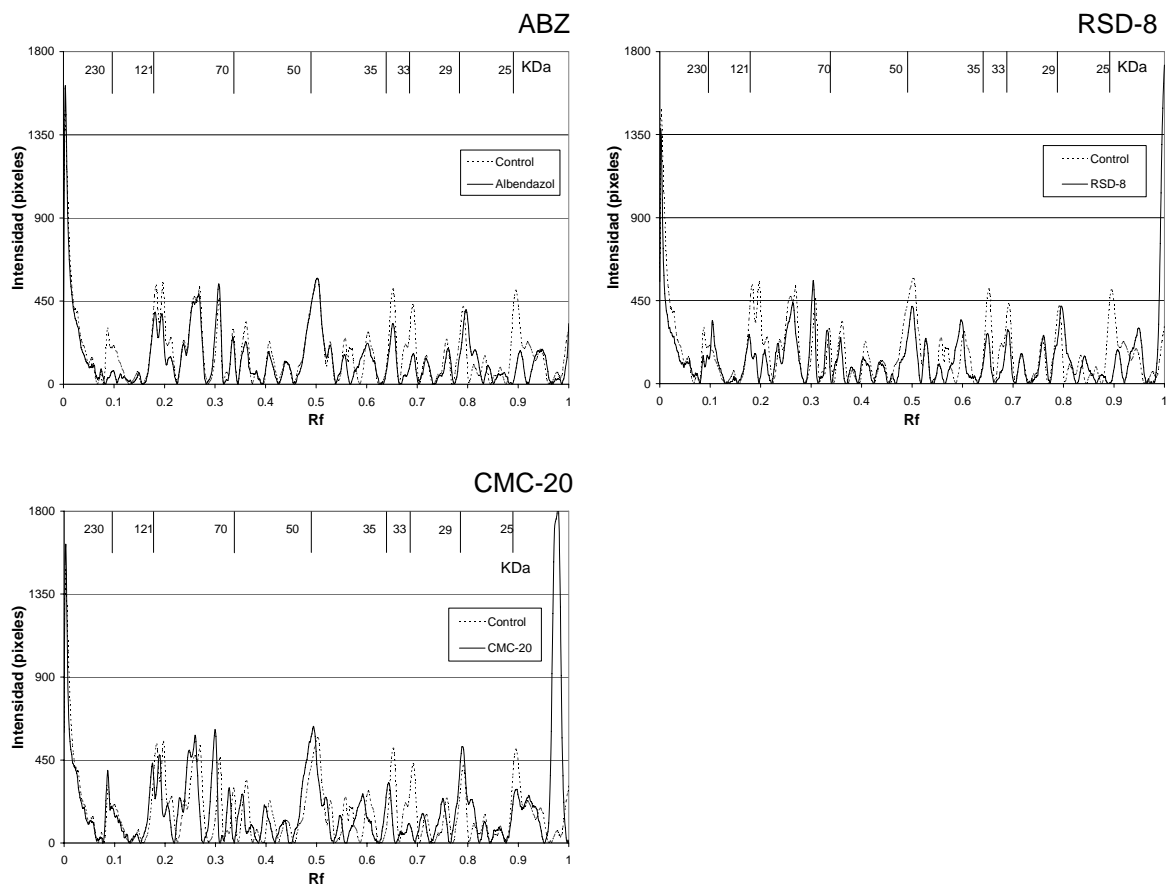
Comparando Control y ABZ, aparentemente no hubo gran variación en la cantidad de proteínas, sólo se encontró una disminución de proteínas que se deslizaron en el Rf de 0.1 (217 KDa), 0.2 (114 KDa), 0.7 (33 KDa) y en 0.9 (25 KDa).

En el caso de RSD-8 y el Control, las diferencias más notables se observan en 0.2 de Rf (115 KDa), 0.5 (49 KDa), 0.6 – 0.7 (38 – 32 KDa) y en 0.9 de Rf (24 KDa); donde hay disminución en la cantidad de proteínas.

Finalmente, en el caso del compuesto CMC-20, se observa una disminución en la cantidad de proteínas entre 0.55 y 0.7 de Rf (45 – 33 KDa), así como en 0.9 (24 KDa). Pero al igual que en el caso de NTZ, hay un aumento en la cantidad de proteínas en la región de 0.2 a 0.3 de Rf (116 – 83 KDa), así como en 0.5 (50 KDa) y 0.8 de Rf (29 KDa).

Según los resultados, el efecto de los derivados de los bencimidazoles inducen a cambios en la expresión de las proteínas y estas van desde proteínas de alto peso molecular, localizados por arriba de 110 KDa, en la región de entre 50 a 37 KDa y en proteínas de bajo peso molecular (>27 KDa). Aparentemente las variaciones en la expresión de las proteínas podrían estar relacionadas con el efecto encontrado, por la acción de los compuestos, sobre la estructura de los parásitos. De igual manera, los derivados podrían generar efectos localizados sobre los parásitos que a su vez son dependientes del compuesto que haya sido empleado. El que los compuestos hayan generado efectos definidos en los parásitos y el tipo de daño que les generaron podría ser considerado como una posibilidad de que ellos tengan una acción parasitaria específica lo cual los hace posibles candidatos como agentes antiparasitarios específicos contra *Gardia intestinalis*.





Gráfica 3. Comparación de intensidades de la muestra Control con cada uno de los tratamientos: Metronidazol (MTZ.), Nitazoxanida (NTZ), Albendazol (ABZ), RSD-8 y CMC-20.

Por los cambios en el perfil de las proteínas y los daños observados al nivel del disco suctor y en el resto del cuerpo, éstos podrían estar relacionados con alteraciones que podrían haber sufrido proteínas del citoesqueleto (tubulina 50 kDa, giardinas 29-38 kDa, etc.), enzimas para síntesis de proteínas e incluso hasta enzimas detoxificantes (23-25 kDa) para el caso de los nitroheterociclos. Sin embargo, dado que este tipo de análisis sólo permite estimar en base al peso molecular de las proteínas su identidad y su posible relación con los cambios morfológicos observados en los parásitos, se estimó conveniente llevar el análisis electroforético a uno de doble dimensión con lo que se podría estimar no sólo el peso molecular de las proteínas, sino también su punto isoeléctrico (directamente asociado a su composición de aminoácidos) y su identificación por espectrometría de masas debido a que ya ha sido publicado el genoma completo de este organismo.

7.2.3. Análisis en 2D de las Proteínas de *G. intestinalis* con los diferentes compuestos

Para la separación de las proteínas en doble dimensión y con la experiencia que ya se tenía para la separación de proteínas de *Gardia* por este proceso⁷⁵, las muestras se separaron mediante isoelectroenfoque en tiras de Immobiline™ DryStrip de pH 4-7, 7 cm (Amershan Biosciences). Posteriormente, se separaron en una electroforesis en doble dimensión en geles de gradientes discontinuos de poliacrilamida; las condiciones de

separación que se utilizaron son presentadas en el **Apéndice A**. Los resultados se muestran en la **Figura 18** que representan a las muestras Control y CMC-20.

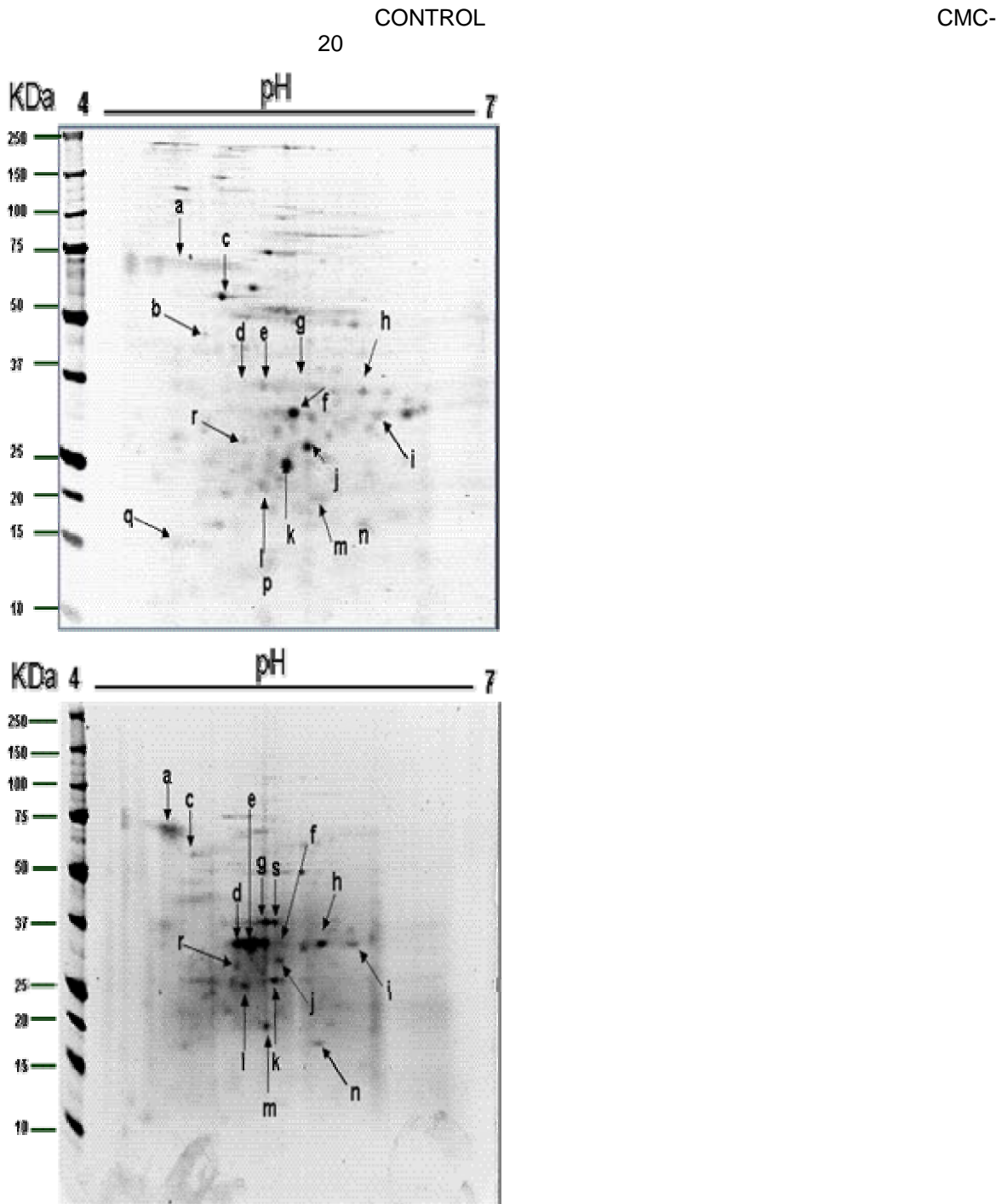


Figura 18. Análisis electroforético en 2D las proteínas de trofozoítos de *G. intestinalis* sin tratamiento (Control) y con CMC-20. 1) Marcadores de Peso Molecular; 2) Gradiente de pH de 4 a 7 Lineal; a), b), c), d), e), f), g), h), i), j), k), l), m), n), p), q), r) Proteínas comparativas entre ambas muestras.

Los geles obtenidos para la muestra Control y CMC-20 se analizaron mediante el software PDQuest de Bio-Rad. Con este programa se calculó el peso molecular, punto isoeléctrico e intensidad (medida en píxeles), para cada uno de los puntos señalados. Estos puntos o proteínas se eligieron debido a que presentaban una mayor resolución e intensidad. Además de que variaban significativamente de una muestra a otra. Estos datos se presentan en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Características de las Proteínas de las Muestras Control y CMC-20 analizados en 2D.

Proteína	Punto Isoeléctrico	Control Peso Molecular (KDa)	Intensidad (píxeles)	Punto Isoeléctrico	CMC-20 Peso Molecular (KDa)	Intensidad (píxeles)
a	4.82	75	3770	4.49	70	3586
b	4.9	64.1	3634	n.e.	n.e.	0
c	5.09	67.4	3719	4.68	58.6	3159
d	5.27	37.1	3378	5.07	32	3992
e	5.36	37	3992	5.19	33.2	3992
f	5.52	36.3	3132	5.29	32	3992
g	5.5	42	3389	5.32	37.1	3992
h	6.01	36	2901	5.77	32	3943
i	6.22	35.7	3459	6.01	32	3451
j	5.64	32.4	3012	5.42	28.7	3847
k	5.48	30.3	3685	5.27	26.7	3678
l	5.32	27	3850	5.13	24	3945
m	5.58	22.1	3111	5.29	18.4	3890
n	5.89	18.8	3197	5.77	16.4	3332
p	5.14	14.6	3092	n.e.	n.e.	0
q	4.9	18	2925	n.e.	n.e.	0
r	5.27	32.7	2909	4.86	27.8	3704
s	n.e.	n.e.	0	5.35	37.1	3677

n.e. = no encontrado

Cómo se observa en **Figura 18**, aún cuando se observó que en ambos mapas proteómicos la cantidad de proteínas reveladas era menor que las obtenidas mediante electroforesis en una dimensión (**Figura 17**), se encontraron diferencias claras entre varios puntos del grupo de parásitos tratados con CMC-20 que aparecerían o desaparecerían con respecto a los del grupo control. La diferencia entre la cantidad de proteínas obtenidas para los análisis en 2D y de una dimensión, podría estar relacionado con el hecho de que para la primera, las proteínas necesitan ser procesadas previo a la electroforesis y no todas ellas pueden ser incluidas en los análisis debido a las limitantes de la técnica para proteínas de alto peso molecular, grado de hidrofobicidad y cantidad de extracción que se logra con cada una de ellas.

La mayoría de las proteínas bien resueltas se concentraron en el intervalo de PM de 75 a 20 KDa y con un pI aproximado de 5 a 6. Es posible que la ubicación de las proteínas esté relacionada con el hecho de que *G. intestinalis* habita predominantemente en un medio ambiente ácido-básico, como lo es el intestino humano, y por ello, las proteínas con actividad enzimática que se encuentren en esa zona mantienen las características que les permite su separación electroforética con las que se analizaron.

En la **Tabla 11** se puede apreciar que las proteínas seleccionadas tienen una expresión diferencial dependiente del tratamiento al que se hayan sometido a los parásitos; destaca que para el tratamiento con CMC-20 hubo tres proteínas que desaparecieron y una que apareció debido al tratamiento. Los resultados obtenidos muestran claramente que en estos primeros análisis de electroforesis 2D, los mapas proteómicos obtenidos permiten una evaluación del efecto que producen los compuestos en los parásitos.

Posteriormente, dado que el proceso de separación de las proteínas por electroforesis en 2D mostraba que era adecuado para la evaluación del efecto de los compuestos, además de que se logró establecer una colaboración con el grupo del Dr. F. Bolás en la Universidad Complutense de Madrid (UCM), se estandarizó el análisis electroforético en 2D que este grupo hacía con la idea de llegar a identificar a las proteínas mediante análisis por espectrometría de masas. Se procedió a escalar esta técnica en Tiras Immobiline™ DryStrip de pH 4-7 de 18 cm (Amershan Biosciences). Con la fin de observar más proteínas y con mejor resolución para obtener un mapa proteómico más completo. De estos mapas se obtuvieron las proteínas para analizarlas por Espectrometría de Masas y determinar su identidad. Los resultados se muestran en la **Figura 19**.

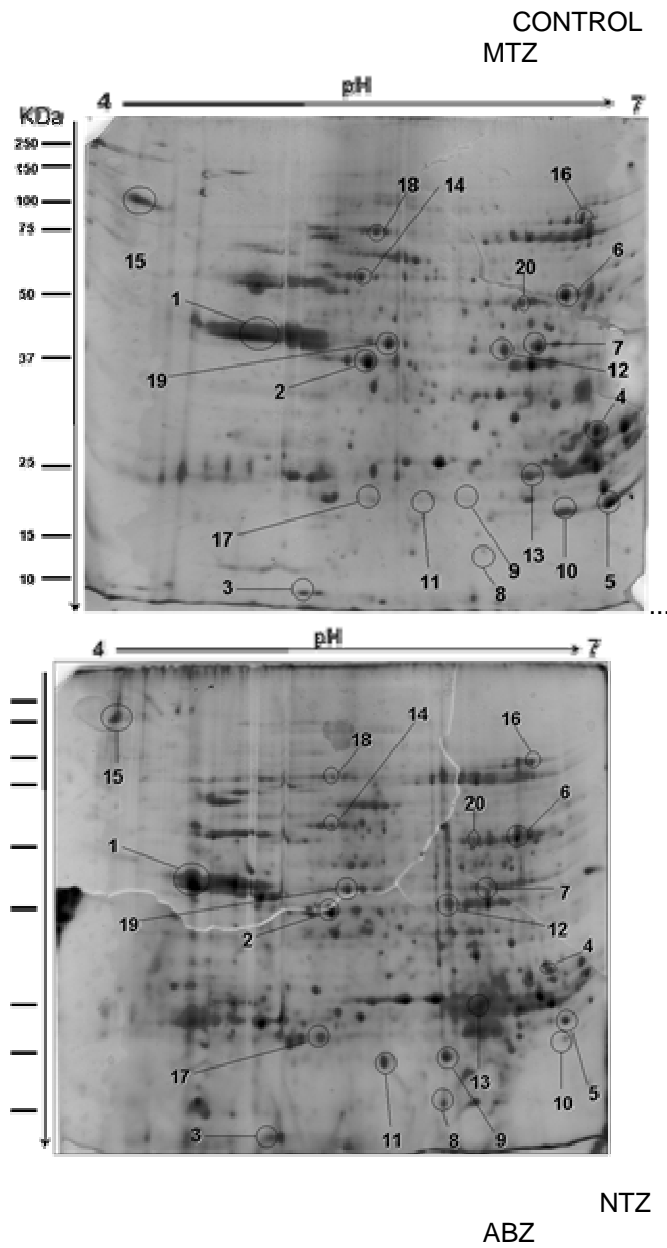
En la figura se observa en la muestra Control una mayor resolución y mayor cantidad de proteínas en los geles de 18 cm con respecto a los geles de 7 cm. Las modificaciones realizadas de acuerdo a Dea y colaboradores⁴² en la cual se utilizó urea en una concentración de 7M y tiourea 2M en el buffer de solubilización; lo que permitió solubilizar una mayor cantidad de proteínas reflejándose en un aumento de las mismas en el gel. Por medio de esta técnica se obtuvieron 129 proteínas, a las cuales se les determinó su punto isoeléctrico, peso molecular e intensidad a través del programa PDQuest de Bio-Rad.

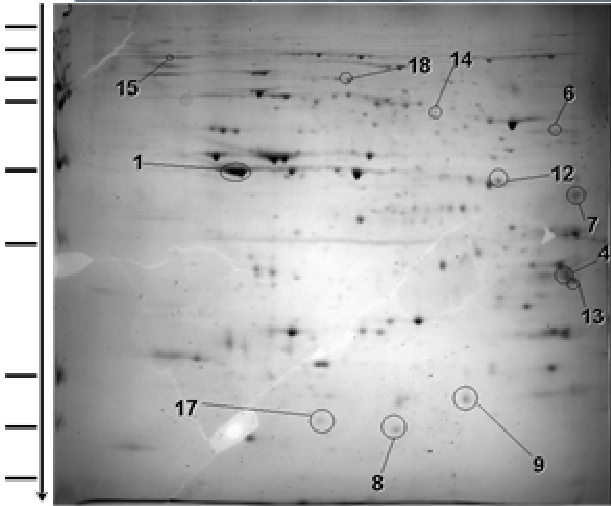
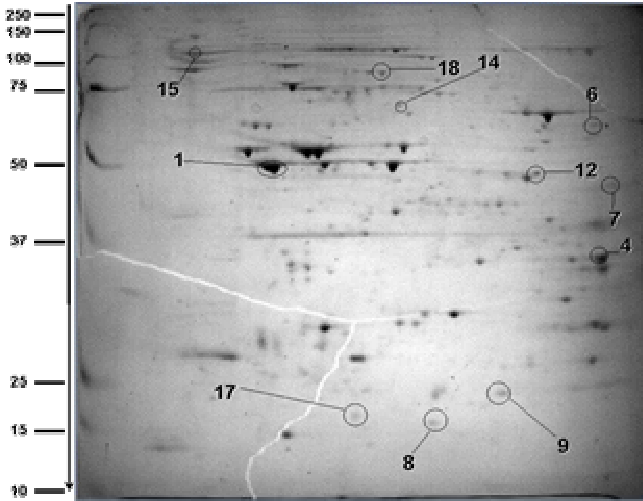
La observación global de los mapas proteómicos obtenidos para los diferentes tratamientos a los que fueron sometidos los parásitos, muestran que los patrones son semejantes en términos generales; Los puntos con mayor cantidad de proteína se encontraron para el grupo control y los tratados con MTZ, RSD-8 y CMC-20: entre los 100 y 75 kDa, en el intervalo de pI de 4 a 7; entre los 50 y 37 kDa, así como entre el intervalo de pI de 4.8 a 6.5; al nivel de los 25 kDa en el intervalo de pI de 5.3 a 6.7. Entre el grupo control y los tratados con NTZ y ABZ se observó que hubo una menor cantidad de puntos y que las proteínas que se encontraron semejantes para los otros tratamientos no estuvieron presentes en estos geles.

Es posible, que debido a que llevó a cabo la separación electroforética en la UCM para las muestras del grupo control y los tratados con MTZ, RSD-8 y CMC-20, las diferencias encontradas para las muestras tratadas con ABZ y NTZ podrían deberse a que éstas últimas, se procesaron en la FM de la UNAM. Las muestras para su análisis en la UCM tuvieron que ser enviadas por correo luego de haber sido liofilizadas, lo cual no se hizo para las muestras procesadas en México. Luego entonces, cabría la posibilidad de que la liofilización, dado que toda la preparación de las proteínas sólo se diferenció en este aspecto experimental, es un factor que determina que se tengan mas proteínas durante su análisis en 2D. Para corroborar ello se tendría que seguir el mismo procedimiento, incluyendo la liofilización de las muestras, para su comparación con lo obtenido en la UCM.

La muestra de MTZ muestra un mapa proteómico similar al Control. La diferencia es que presenta un mayor número de proteínas, dando un total de 150. Esto puede deberse a la

acción del fármaco sobre las proteínas, ya sea que haya propiciado la ruptura de las mismas por un lado; por otro lado favoreciendo la expresión de otras proteínas, de entre las cuales se destacan las marcadas con el número 8, 9, 11 y 17 de la **Figura 19**, similares a las encontradas en el tratamiento con RSD-8. Las características de cada proteína se asignó mediante el software antes mencionado.





RSD-8
CMC-20

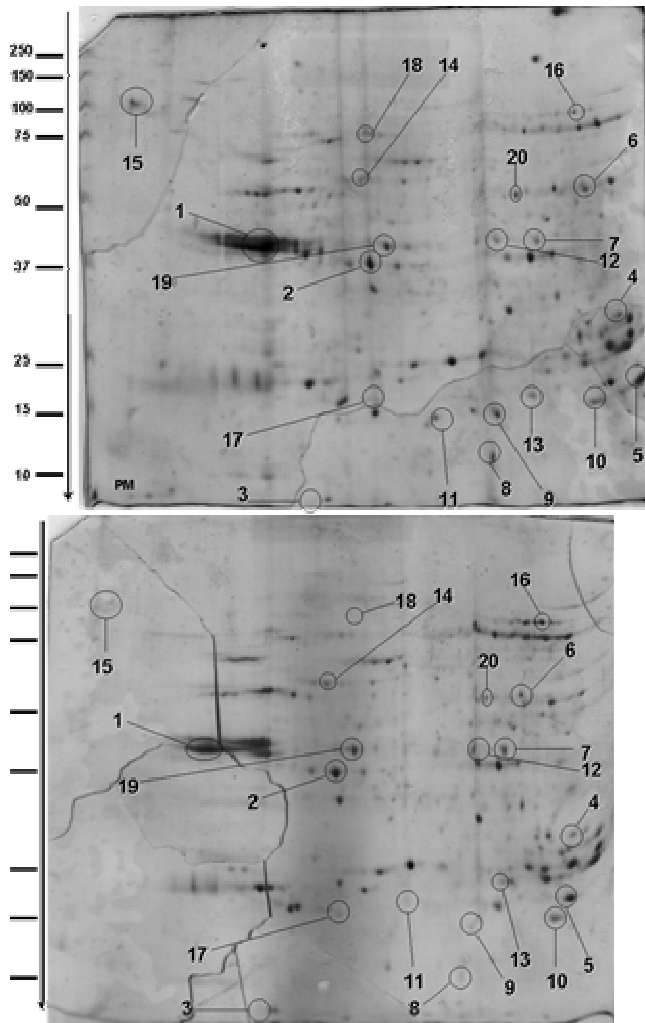


Figura 19. Análisis electroforético en 2D las proteínas de trofozoítos de *G. intestinalis* sin tratamiento (Control) y con los tratamientos Metronidazol (MTZ), Nitazoxanida (NTZ), Albendazol (ABZ), RSD-8 y CMC-20.

En el mapa proteómico del tratamiento con NTZ, el patrón de distribución de proteínas es similar al del tratamiento con MTZ, puesto que se observa un mayor número de proteínas, alrededor de 185. Igual que en el caso anterior, algunas de estas proteínas tienen una intensidad tan baja, que se descartaron. Por el momento, este estudio se centra en las diferencias más grandes. La NTZ sigue un mecanismo similar al del MTZ por el grupo nitro que poseen, generando especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés),⁴³ que causan daños en las proteínas.

Para el caso del mapa proteómico de *G. intestinalis* tratada con ABZ, muestra un patrón similar en la distribución de proteínas con respecto a las otras muestras. Se pudo cuantificar cerca de 176 proteínas, mayor a las detectadas en el Control. Sin embargo, aunque la mayoría de estas proteínas tuvieron buena resolución y el equipo de detección las pudo cuantificar, algunas de ellas presentaban valores de intensidad bajos, por lo que se descartaron para fines prácticos. A pesar de este detalle técnico, el ABZ muestra una alta actividad para inhibir el crecimiento de este protozooario suprimiendo la expresión de ciertas proteínas; así como promoviendo la expresión de otras (marcadas con los números 8, 9 y 17). En trabajos anteriores (15, 23, 26, 31, 33, 71), se ha demostrado que

el ABZ actúa sobre la polimerización de la tubulina, específicamente sobre la β -tubulina. Este efecto no es posible verlo de manera directa con este estudio, ya que aquí se presenta la cantidad total de tubulina desnaturalizada presente en el parásito. Pero como se verá más adelante, pudo determinarse su concentración de manera semicuantitativa, lo que sirvió como patrón de comparación entre los diferentes tratamientos.

El gel correspondiente a la muestra de *G. intestinalis* tratada con RSD-8 muestra una distribución de proteínas similar a la de la muestra Control. Por la acción del compuesto observamos la ausencia de varias de estas proteínas, dando un total de 103. A pesar de esta disminución, entre este número se encontró la expresión de otras proteínas que no estaban presentes en el Control, como fue el caso de las proteínas 8, 9 y 11 marcadas en la **Figura 19**. Así mismo, en algunas de las proteínas presentes se observó una disminución en la intensidad; indicando que la expresión de estas proteínas se ve disminuida por la acción del compuesto, ya sea de manera directa o indirecta. A cada proteína se le asignó su correspondiente punto isoeléctrico, peso molecular e intensidad.

En la muestra CMC-20, se observa una distribución de proteínas similar a la de todos los geles anteriores. Sin embargo, se observó la expresión de 116 proteínas, un poco menos al del control, pero al igual que los casos anteriores presenta expresión de otras proteínas (marcadas como 8, 9 y 11). Este hecho pudo deberse a la acción del fármaco, posiblemente a su mecanismo de acción disminuye la cantidad de proteínas y promueve la expresión de otras. Recordando que posee un grupo nitrotiazólico, que actúa de forma similar al de la NTZ y el MTZ. También puede atribuirse al hecho de que el fármaco degrada tanto las proteínas que disminuye mucho su peso molecular, tanto que no pudo ser visto en el gel, reflejándose en la intensidad de las proteínas, variando mucho con respecto al control.

Una vez que se obtuvieron los mapas peptídicos de las muestras analizadas y habiendo comparado los geles con el obtenido para el grupo control, las proteínas teñidas con el azul de Coomassie que se observaban con mas intensidad, pero que no estaban en los grupos tratados, se consideraron como las candidatas a identificar por la EM en la unidad de Proteómica de la UCM. De la misma manera, aquellas proteínas que se observaron presentes en los tratamientos, pero no en los mapas proteómicos de los controles, se consideraron también como candidatos a ser identificados. Por estas causas se seleccionaron 16 proteínas de las muestras control (Puntos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19 y 20); una del RSD-8 (puntos 8); 3 del MTZ (puntos 9, 11 y 17). No selección de las muestras tratadas con el CMC-20 porque las mismos puntos se encontraron para los otros tratamientos y el control. Los puntos seleccionados se recortaron y se colocaron en agua MilliQ para su posterior análisis.

Los resultados obtenidos, que se muestran en la tabla 14, indican que de los 20 puntos que se metieron al análisis, 6 de ellos (puntos 3, 5, 10, 11, 19 y 20) no pudieron ser identificados. El motivo de ello podría obedecer a que estas proteínas sufrieron algún tipo de modificación postransduccional tal como oxidación, metilación, etc., debido al tratamiento con los compuestos o bien, a la forma en que se prepararon las muestras. Por lo consiguiente, en la **Tabla 12** sólo se muestran a los 14 puntos identificados y correspondientes a los geles mostrados en la **Figura 19**. En esta tabla se presentan a los puntos numerados en el orden que fueron indicados en la figura correspondiente, el valor del "Score" obtenido para la identificación de acuerdo al análisis MASCOT, el PM en Da, el valor de pI, la identidad de los puntos y la función conocida para las proteínas identificadas.

Tabla 12. Identificación de Proteínas por MALDI-TOF-MS/MS

Proteína	Score	Peso Molecular (Da)	Punto Isoeléctrico	Identidad	Función
1	157	50701	4.87	β -Tubulina [Giardia lamblia ATCC 50803]	Estructura del citoesqueleto
2	317	48816	5.51	Enolasa [Giardia intestinalis]	Enzima del Metabolismo de la glucosa. Cataliza la conversión de Glicerato 2-Fosfato a Fosfoenolpiruvato
4	367	34717	6.73	UPL-1 [Giardia intestinalis]	Enzima que incorpora uridina exógena
6	549	65003	6.55	Arginina deiminasa (EC 3.5.3.6) [validated] - Giardia intestinalis	Enzima de la Ruta Arginina Dihidrolasa. Cataliza la conversión de Arginina a Citrulina
7	183	45815	6.41	Factor de Elongación de Traducción	Factor de Elongación de Traducción
8	151	22924	5.64	Tiorredoxin peroxidasa	Protección contra ROS. Reducción de Peróxidos a agua.
9	162	22924	6.43	Tiorredoxin peroxidasa	Protección contra ROS. Reducción de Peróxidos a agua
12	203	45815	6.24	Factor de Elongación de Traducción	Factor de Elongación de Traducción
13	117	33513	6.38	α -7.1 giardina [Giardia intestinalis]	Proteína estructural asociada a membrana plasmática y pared de quiste. Letal al parásito.
14	229	65548	5.46	GLP_113_15656_17419 [Giardia lamblia ATCC 50803]	Proteína Hipotética GLP_113_15656_17419
15	160	116239	4.28	Proteína asociada a axonema	Proteína asociada a Axonema. Estructura básica de cilios y flagelos.
16	370	91395	6.62	Factor de elongación 2 [Giardia intestinalis]	Enzima en Síntesis de Proteínas
17	314	29866	5.37	SALP-1 [Giardia intestinalis]	Proteína estructural asociada con el cuerpo basal en protozoarios flagelados.
18	506	97154	5.54	GLP_762_31096_33708 [Giardia lamblia ATCC 50803]	Proteína Hipotética GLP_762_31096_33708

Como se puede apreciar en la tabla, los péptidos generados de las proteínas identificadas tuvieron valores de “score” alto, por arriba de 150, contra lo reportado para componentes semejantes de proteínas referidas al genoma de *G. lamblia* y ello es un parámetro de confiabilidad con la cual se obtuvo la identificación de las proteínas (en la identificación de proteínas por huella peptídico, un valor de “store” por arriba de 100 se asocia con una alta identidad de la proteína); entre las proteínas identificadas se encontraron algunas del citoesqueleto como la cadena beta de la tubulina, giardina alfa 7.1, una proteína asociada a axonema y una proteína asociada al cuerpo basal de protozoarios flagelados; enzimas que participan en los procesos de obtención de energía tales como la enolasa y la arginina desiminasa; dos isoformas de proteínas de protección contra radicales libres como las tioredoxina peroxidasa de pI=5.64 y pI=6.43; proteínas que participan en fenómenos de síntesis de proteínas como las isoformas de los factores de elongación de traducción de pI=6.41 y pI=6.24 y el factor de elongación II y, finalmente, una proteína que incorpora Uridina exógena denominada UPL-1. Otras proteínas sólo se identificaron como hipotéticas ya que no se les conoce su función pero están representadas por sus genes en el genoma de estos parásitos.

La expresión de las proteínas en las muestras tratadas se cuantificaron mediante el programa PD Queso, dando los resultados por la cantidad de píxeles con que se midió la expresión de todas las proteínas identificadas, como se muestra en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Comparación de la intensidad de la expresión de proteínas en los diferentes tratamientos

Spot	Intensidad (Píxeles)					
	Control	RSD8	MTZ	CMC20	ABZ	NTZ
1	412906	160836	527830	250810	194085	107435
2	166281	69492	175699	84369	0	0
4	166872	26830	40923	11793	18377	45421
6	164754	35518	101548	19006	1260	2043
7	121434	19967	22829	32540	12951	4306
8	0	21459	47442	4968	2095	3780
9	0	25982	123438	8974	3438	9285
12	24878	14251	17411	31318	16001	14523
13	70031	9004	13956	20824	20910	0
14	71272	14325	50568	19791	638	4426
15	182787	46852	123523	0	7088	11060
16	21999	4564	50872	22682	0	0
17	0	0	66708	4839	3044	4762
18	57828	5193	19645	0	4040	4583

Con la finalidad de determinar que proteínas resultaron afectadas de acuerdo al tratamiento, se utilizó un diagrama de Venn (**Figura 20**) con el fin de comprender mejor los efectos de los diferentes tratamientos. El diagrama muestra que MTZ, RSD-8 y CMC-20 modifican las proteínas 2 y 16. MTZ, CMC-20, ABZ y RSD-8 modifican la proteína 13. RSD-8, NTZ, ABZ y MTZ modifican las proteínas 15 y 18. El resto de las proteínas se modificaron por los cinco tratamientos en menor o mayor grado de expresión.

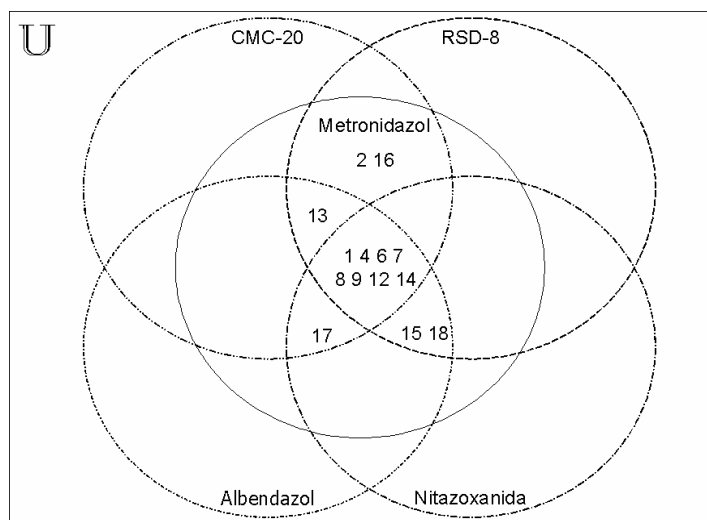


Figura 20. Diagrama de Conjuntos de las Proteínas Identificadas.

La proteína 1 se identificó como β -tubulina, la cual es una subunidad proteica que forma parte del dímero de tubulina, el mayor componente de la estructura del citoesqueleto de *G. intestinalis*. En el gel Control se observa un punto amplio e intenso correspondiente a la β -tubulina. El comportamiento de los análogos de bencimidazol (ABZ y CMC-20) es debido a que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina, específicamente uniéndose a la subunidad beta tanto en helmintos como en protozoarios⁴⁴. Efecto reflejado en la disminución de la proteína como consecuencia de este tratamiento. Esto conlleva a la disminución de funciones del protozoario asociado al transporte intracelular, secreción celular, absorción de nutrientes, movilidad y mantenimiento de la forma celular. Lo que podría corresponder con la forma irregular de los trofozoítos mostrados en las fotografías de microscopía electrónica.

Con MTZ y CMC-20 esta proteína presentó un patrón de fragmentación, además de que con MTZ hubo un aumento en su expresión, viéndose reflejado en una mayor intensidad de la proteína. Este efecto puede explicarse debido a que el MTZ libera especies ROS, que actúan degradando proteínas,^{43,45} entre ellas puede que este afectando también a la tubulina.

Para el caso de NTZ muestra el efecto contrario, es el compuesto que más disminuye la expresión de β -tubulina. A pesar de que sigue un mecanismo similar al del MTZ, es posible que esté actuando con mayor velocidad, retrasando la producción de la proteína y por lo tanto produciendo un mayor daño. Como lo demuestran las fotografías de la **Figura 16**, el daño es mayor con NTZ que con MTZ.

La proteína 2 ha sido identificado como enolasa, una enzima que participa activamente en la producción de energía del parásito. Esta enzima cataliza la conversión de Glicerato-2-fosfato a Fosfoenolpiruvato, como se aprecia en el **Esquema 2**.⁶ En este caso, la actividad los compuestos en esta enzima esta reflejada en la disminución de su expresión para el caso de los compuestos RSD-8 y CMC-20. La interrupción del metabolismo de la glucosa y la eventual producción de energía, termina por provocar un bloqueo importante en el proceso energético del parásito, lo que conlleva a la muerte del parásito.

En el caso de ABZ y NTZ no pudo localizarse la expresión de esta proteína por punto isoeléctrico y peso molecular. Lo que no quiere decir que no este presente o que se haya inhibido por completo su expresión. Solo indica que debe determinarse mejor su ubicación en estos mapas, identificando alguna proteína cercana por espectrometría de masas y compararlas con el resto de los tratamientos.

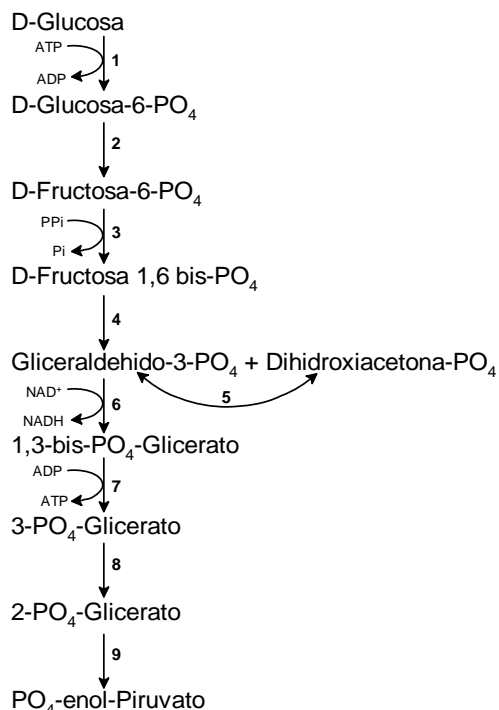
La proteína 4 se identificó como UPL-1, la cual posee una actividad similar de la uridin/timidin fosforilasa.⁴⁶ *G. intestinalis* incorpora nucleobases de pirimidina exógena y la uridina es incorporada vía la actividad de la enzima dependiente de fosfato, la uridin/timidin fosforilasa.. En este caso, todos los tratamientos disminuyen considerablemente la expresión de esta proteína, especialmente con el compuesto CMC-20. Lo que afecta enormemente la incorporación de uridina exógena, lo que lleva como consecuencia la falla en procesos como la síntesis de proteínas.

La proteína 6 es la Arginina Deiminasa, una enzima que está involucrada en la ruta metabólica de la Arginina dihidrolasa de *G. intestinalis*, obteniendo como ganancia CO₂, NH₄ y ATP (**Esquema 3**).⁶ Participa catalizando la conversión de Arginina en Citrulina. Una vez más se observa un efecto sobre la producción de energía del parásito, esta vez actuando sobre una enzima diferente, pero esencial en la obtención de ATP. Todos los tratamientos disminuyeron su expresión, en especial los compuestos ABZ y NTZ, a pesar de que poseen mecanismos diferentes. Es posible que estas dos enzimas (enolasa y arginina deiminasa) resultan afectadas directamente o como consecuencia de efectos secundarios de los fármacos. Pero eso tendrá que comprobarse con otros estudios más específicos

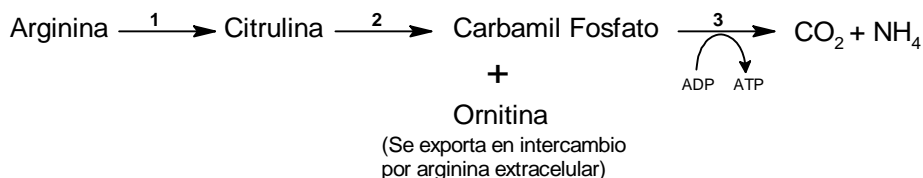
Las proteínas 7 y 12 fueron identificados como isoformas de un factor de elongación de la traducción, lo que deriva en la síntesis de proteínas. Estas proteínas vieron disminuida su intensidad de expresión por la presencia de todos los compuestos de estudio. Este hecho pudo haberse dado por una interacción entre el sitio de unión de estas proteínas y los compuestos, afectando su reconocimiento con la secuencias de síntesis de la proteínas. Esto conllevaría a la disminución de la intensidad de estas proteínas. Para el caso de MTZ y NTZ, la disminución se debe al efecto de los radicales libres, que atacan tanto a la proteína como al ADN, dañando la secuencia de bases para su producción; siendo más notorio el daño con NTZ que con MTZ. De aquí que esto pueda deberse a la mayor eficacia de NTZ con respecto a MTZ.

Para el caso de las proteínas 8 y 9, ambos fueron identificados como Tiorredoxin peroxidasas, pero debido a que presentaban diferente punto isoeléctrico y peso molecular, pudieran ser isoformas o bien una proteína dimérica que se desnaturalizó por el procedimiento. Tal como es el caso de la tiorredoxin reductasa de *G. intestinalis*, reportada previamente como dimérica con diferentes pesos moleculares.⁴⁷ Aunque no es la misma proteína a la reportada, éstas poseen una función en común: eliminar especies ROS que son peligrosos para el protozooario.⁴³ Mismas que son producidas como consecuencia de las reacciones redox que sufre el grupo nitro de los compuestos MTZ, NTZ y tal vez de CMC-20, siendo más activa en presencia de MTZ. Dada la diferencia que existe en la interacción entre MTZ y NTZ con la PFOR²², puede deberse la diferencia en la producción de ROS y en la expresión de esta proteína destoxicante, permitiendo mayor actividad de los ROS o no dando tiempo a que el parásito la produzca en gran cantidad para protegerlo del daño. En las fotografías de la **Figura 16** se observa que el daño que sufren los trofozoitos es mayor con NTZ y CMC-20, que con MTZ. Sin embargo esta no es evidencia suficiente de el CMC-20 tenga un mecanismo similar al de los nitroheterociclos.

Metabolismo de la Glucosa



Esquema 2. Metabolismo de la Glucosa a Fosfoenolpiruvato. Las enzimas se numeran como sigue: 1) hexocinasa; 2) glucosa fosfato isomerasa; 3) Fosfofructocinasa dependiente de Pirofosfato; 4) Fructuosa bifosfato aldolasa; 5) Triosafofosfato isomerasa; 6) Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa; 7) Fosfoglicerato cinasa; 8) Fosfogliceromutasa; 9) Enolasa.



Esquema 3. Ruta de la Arginina Dihidrolasa. Las enzimas se numeran como sigue: 1) Arginina deiminasa; 2) Ornitina transcarbamoilasa; 3) Carbamato cinasa.

En el caso de ABZ se produce muy poca cantidad de esta proteína debido a que no posee el potencial redox ni el grupo nitro para este tipo de reacciones. Sin embargo, el RSD-8 sí expresa esta proteína, tal vez como consecuencia de que posee el potencial redox necesario para producir ROS y esto, a su vez, inducir la producción de tiorredoxinas. Otra opción es la que el compuesto RSD-8 pudo haber alterado las diferentes rutas metabólicas del parásito, incrementando los niveles de oxígeno o promoviendo la formación de peróxidos, agua y radicales libres, permitiendo la síntesis de estas enzimas de protección para evitar un daño mayor en el parásito. Esto se comprueba con las microfotografías de la **Figura 16**, donde se muestra un daño similar al de los nitroheterociclos.

La proteína 13 fue identificada como α -giardina 7.1, también fue asociada a α -giardina 7.2 según el análisis realizado por Espectrometría de Masas, debido a la estrecha analogía entre una y otra. Todos los compuestos disminuyen la expresión de esta proteína, especialmente el RSD-8 y a excepción de NTZ, que no pudo ser identificada en su mapa proteómico. Las giardinas son proteínas estructurales únicas de *Giardia*, presente en sus diferentes isoformas en todo el cuerpo y flagelos.⁴⁶ Aunque tienen cierta homología con tubulina, no se había podido demostrar completamente que sean afectadas por análogos de bencimidazol. Sin embargo, en este estudio se comprueba que su concentración sí se ve afectada por la acción de estos compuestos. Esto se ve tanto en las microfotografías, donde se muestra daño en el disco ventral, los flagelos y la forma del protozoario; como en el mapa proteómico, donde ésta y otras giardinas más ven afectada su concentración.

Para el caso de la α -giardina 7.1 no se ha podido comprobar su función, ya que en estudios previos, su presencia era letal para *Giardia*.⁴⁸ Para el caso de la α -giardina 7.2, se encuentra presente en el protozoario distribuida en la membrana plasmática, así como en la pared del quiste de *G. intestinalis*. Por esta razón se ven cambios en la forma del trofozoíto, daño en la membrana y en los flagelos que se aprecian en las fotografías de microscopía electrónica. La intensidad de la proteína es menor para todos los compuestos de tipo bencimidazólicos.

Las proteínas 14 y 18 se definieron como las proteínas GLP_113_15656_17419 y GLP_762_31096_33708, respectivamente. Sin embargo, ninguna de ellas tiene una función definida según las bases de datos consultadas. A pesar de esto, tuvieron relevancia durante este estudio, ya que en el caso de la proteína 14 su expresión disminuyó como consecuencia de los tratamientos. Al igual que en la proteína 18, esta proteína se expresa muy poco como función del efecto de los tratamientos, a excepción de CMC-20, donde ni siquiera se expresa. A estas proteínas se les tendrían que realizar más estudios y analizarlas por otras técnicas, esto con el fin de poder asignarles una función, así como poder definir su importancia dentro del mecanismo de acción de estos fármacos.

La proteína 15 fue identificado como una Proteína Asociada a Axonema, es decir, a proteínas asociadas a microtubulos que forman el axonema, dando el sostén y movilidad a la *Giardia*. En la **Tabla 13** se observa que la intensidad de esta proteína se reduce enormemente, sobre todo con el compuesto CMC-20, donde ni siquiera es expresada. De esta manera dichas estructuras resultan completamente dañadas, perdiendo la forma característica del trofozoíto, acortamiento de los flagelos, daño en el disco ventral y desprendimiento de la membrana del trofozoíto. Tal como se observa el enorme daño que sufre el trofozoíto mostrado en las microfotografías de la **Figura 16**. Nos hace suponer que la estructura del compuesto CMC-20 puede, ya sea interrumpir la unión de esta proteína a los axonemas; o que interfiera en la síntesis de esta proteína a nivel de ADN, característico de los compuestos nitrados.²¹

La proteína 16 es una proteína que participa en la síntesis de proteínas, identificada como Factor de Elongación 2, involucrada en el proceso de regulación de la traducción. Su expresión es afectada de diferentes maneras por los diferentes tratamientos. Disminuye con RSD-8, tal vez como consecuencia de la unión de esta molécula con el sitio activo de la proteína, impidiendo que ejerza su función de manera adecuada. Para el caso del MTZ, su expresión aumenta, quizás como consecuencia del daño que provocan los radicales libres, se tienen que estar sintetizando constantemente las proteínas de desintoxicación y

RSD-8 no produce ROS directamente. También puede ser que el parásito tiene que recuperar las proteínas que pierde. Finalmente, con el compuesto CMC-20 no hay una diferencia significativa con el Control, tal vez porque su estructura no le permite interactuar con esta proteína o está muy lejos de su sitio de acción. En los mapas de NTZ y ABZ no pudo encontrarse coincidencia de ésta con alguna de sus proteínas.

Por último, la proteína SALP-1 (17) es una proteína asociada con el cuerpo basal de protozoarios flagelados. Esta proteína se expresó sólo en presencia de MTZ, CMC-20, NTZ y en menor medida en presencia de ABZ. Puede deberse a que conforme se afectan las estructuras del citoesqueleto como tubulina y giardinas, *Giardia* trata de compensar esta pérdida para reestablecer sus funciones normales. Posiblemente CMC-20 y NTZ actúan tan rápido afectando al trofozoíto que no permite que *Giardia* exprese la proteína en cantidades suficientes para reestablecer sus funciones normales.

Las proteínas 3, 5, 10, 11, 19 y 20 no pudieron ser identificados por Espectrometría de Masas. Esto posiblemente se debió a modificaciones tales como oxidaciones, metilaciones, etc., que sufrieron las proteínas por efecto del tratamiento o del método de preparación de las muestras.

En general, la exposición de *G. intestinalis* a los diferentes tratamientos causaron cambios ultraestructurales en el trofozoíto, lo cual debe estar relacionado con cambios en la expresión de ciertas moléculas. Sin embargo, por microscopia electrónica de barrido, los cambios más evidentes se observaron a nivel membrana, flagelos y parte central del disco ventral.

Además, dependiendo del compuesto analizado, se observaron estos cambios en mayor o menor grado. De manera particular, con el ABZ, fue más evidente la pérdida de la morfología del trofozoíto, directamente relacionado con el mecanismo de acción de este bencimidazol (unión a β -tubulina).

Para el caso de MTZ, éste aumentó el número de proteínas como consecuencia del tratamiento. Por una parte detectamos enzimas que se expresan por efecto de los radicales libres, generados por el grupo nitro del MTZ. Inclusive pueden ser proteínas defectuosas ocasionadas por una mala transcripción, causado por el daño al ADN ocasionado por los radicales del grupo nitro. Lo que también explicaría la disminución en concentración de la mayoría de las proteínas, así como la aparición de spots debajo de los spots más grandes.

La intensidad de la tioredoxina con NTZ es bastante lógica y llama la atención, ya que se menciona que la NTZ se reduce y tiene un mecanismo similar a MTZ.

Con el compuesto CMC-20 se observaron algunas similitudes con la acción de RSD-8, MTZ y NTZ. Sin embargo, la mayoría de las alteraciones en las proteínas analizadas concuerdan con el RSD-8, algunas con NTZ y poco con MTZ. Esto no significa que predomina la acción de los análogos de bencimidazoles, posiblemente el grupo bencimidazólico del compuesto híbrido está actuando primero. Aunque finalmente su actividad se deba a la reducción del grupo nitro para generar ROS, no se descarta la posibilidad de que hubiese otros efectos más importantes. Como lo demuestra una menor cantidad y menor intensidad de las proteínas presentes en el gel de 2D con respecto al resto de los otros tratamientos. Quizás en este punto habría que aumentar la concentración de proteínas para poder observar con mayor cantidad las proteínas expresadas.

Por otro lado, sería factible poder realizar un estudio de efecto del compuesto contra tiempo sobre el crecimiento de los trofozoítos de *Giardia*. Lo que nos proporcionaría más información acerca del daño causado por el compuesto en función del tiempo. Así podríamos determinar si efectivamente, el daño causado por CMC-20 es tan rápido para no poder observar con más detalle las proteínas de expresión, ya que la CI_{50} de este compuesto es de $0.005 \mu\text{M}$, que comparada con la de ABZ ($0.037 \mu\text{M}$), MTZ ($1.228 \mu\text{M}$), NTZ ($0.013 \mu\text{M}$) y RSD-8 ($0.122 \mu\text{M}$), es mucho menor y resultó ser más efectivo.

Por supuesto que esto es solo un primer paso para determinar posibles mecanismos de acción. Además de que quedan por identificar el resto de las proteínas por Espectrometría de Masas. Sin embargo, con todo este trabajo pudimos obtener el mapa proteómico completo de *G. intestinalis*, con cada una de las proteínas identificadas, con puntos isoeléctricos y pesos moleculares bien definidos. Esto es tan solo el comienzo de posteriores análisis, ya sea con otros fármacos o para corroborar con ensayos más especializados. Como lo es la Microscopía Electrónica de Transmisión para observar mejor el efecto sobre el citoesqueleto; o tratar de evaluar la actividad de los compuestos en rutas metabólicas particulares, etc. Así podemos en un futuro obtener más y mejores fármacos.

8. CONCLUSIONES

- La nitazoxanida obtenida por esta nueva ruta de síntesis es de mejor calidad que la obtenida comercialmente. El proceso no deja residuos tóxicos para el medio ambiente. Sin embargo, el rendimiento de esta ruta alterna de síntesis es menor, comparado con el de la patente. Cabe mencionar que estos ensayos son preliminares y que podrían optimizarse en estudios posteriores.
- Las técnicas espectroscópicas y espectrométricas permitieron identificar la similitud entre la nitazoxanida comercial y la sintetizada, comprobando la identidad del producto deseado.
- Las microfotografías por MEB de trofozoitos de *G. intestinalis*, mostraron un mayor daño por parte de los compuestos CMC-20, RSD-8 y nitazoxanida; así como cierta similitud de efecto entre estos compuestos.
- La mayor resolución en los mapas proteómicos de *G. intestinalis* se obtuvo empleando tiourea para solubilizar proteínas, al igual que el empleo de tiras Immobiline de 18 cm para mejorar la visualización de todas las proteínas para cada uno de los tratamientos.
- El análisis de las proteínas por SDS-PAGE reveló pocas diferencias en la expresión de proteínas para cada uno de los tratamientos. Fue de gran ayuda para identificar las zonas que presentaron cambios.
- El análisis en 2D reveló una notable alteración en la expresión de proteínas, características de cada tratamiento, que pudieron ser identificadas mediante el análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF-MS/MS.
 - ◆ Se indujo a la expresión de las proteínas tioredoxin peroxidasas como respuesta al tratamiento con MTZ, NTZ, RSD-8 y CMC-20, proteínas de defensa contra radicales libres de oxígeno.
 - ◆ La producción de energía se vio interrumpida por la disminución de las proteínas arginina deiminasa y enolasa, principalmente por los compuestos RSD-8, NTZ y CMC-20.
 - ◆ La estructura del citoesqueleto de *G. intestinalis* se vio alterada por la disminución de las proteínas β -tubulina, α -7.1 giardina y proteína asociada al axonema, que son esenciales para mantener la forma del cuerpo y flagelos, como se observó en el caso de ABZ, RSDO y CMC-20.
 - ◆ NTZ indujo la mayor expresión de proteínas con respecto al control, en cambio el CMC-20 presentó la menor intensidad en las proteínas expresadas en el control.
- NTZ fue más potente que MTZ, dado el daño visible por microscopía electrónica y la disminución en la expresión de proteínas.

- El compuesto CMC-20 mostró un patrón de efecto sobre las proteínas similar al de NTZ, dado que posee un grupo nitro cuyo mecanismo de acción está involucrado con la producción de radicales de oxígeno.

El compuesto CMC-20 mostró un comportamiento similar sobre proteínas de citoesqueleto, como se vio con ABZ, teniendo un mecanismo similar a éste por su estructura bencimidazólica.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Monografías.com. <http://www.monografias.com/trabajos12/enfin/enfin.shtml>
2. Boletín de Vigilancia Epidemiológica del IMSS, **2006**. <http://www.dgepi.salud.gob.mx>
3. <http://www.parasitosis.galeon.com>
4. Ximénez, G. C.; Las Parasitosis Intestinales en México. Cuadernos Funsalud No. 36. Fundación Mexicana para la Salud; **2002**; <http://www.funsalud.org.mx>.
5. Botero, D.; Restrepo, M.; Parasitosis Humanas; Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas; Colombia; 3ª. Edición, **1999**; pp. 61-70.
6. Adam, R.; Biology of *Giardia lamblia*; *Clinical Microbiology Reviews*; **2001**, *14*(3); 447–475.
7. <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx>
8. Cedillo, R.; Chávez, B.; González, A.; Tapia, A.; Yépez, L.; *In vitro* effect of Nitazoxanide against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis* trophozoites; *Journal Eukaryot Microbiology*; **2002**, *49*(3); 201-208.
9. Goodman and Gilman; Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica Vol. II; Ed. McGraw-Hill Interamericana; México, **1996**, 9ª. Edición; pp. 1017-1088.
10. López Nigro, M.; Palermo, A.; Mudry, M.; Carballo, M.; Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives; *Toxicology in Vitro*; **2003**, *17*; 35-40.
11. Sangster, N.; Batterham, P.; Chapman, D.; Duraisingh, M.; Jambre, L.; Shirley, M.; Upcroft, J.; Upcroft, P.; Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis; *International Journal of Parasitology*; **2002**, *32*; 637-653.
12. Navarrete-Vázquez, G.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A.; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Valdez, J.; Morales, R.; Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R.; Synthesis and antiparasitic activity of 2-(trifluoromethyl)-benzimidazole derivatives; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; **2001**, *11*; 187-190.
13. Reynoldson, J.; Behnke, M.; Gracey, M.; Horton, R.; Spargo, R.; Hopkins, R.; Constantine, C.; Gilbert, F.; Stead, C.; Hobbs, R.; Thompson, R.; Efficacy of Albendazole against *Giardia* and hookworm in a remote Aboriginal community in the north of Western Australia; *Acta Tropica*; **1998**, *71*; 27-44.
14. Bharti, N.; Husain, K.; Gonzalez, M.; Cruz-Vega, D.; Castro-Garza, J.; Mata-Cardenas, B.; Naqvi, F.; Azam, A.; Synthesis and *in vitro* antiprotozoal activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; **2002**, *12*; 3475-3478.
15. López, M.; Gadano, A.; Carballo, M.; Evaluation of genetic damage induced by a nitroimidazole derivative in human lymphocytes: Tinidazole (TNZ); *Toxicology in Vitro*; **2001**, *15*; 209-213.

16. Daxón, Nitazoxanida. Monografía. Lanac, Columbia.
17. Rossignol, J. F.; Maisonneuve, H.; Cho, Y.; Nitroimidazoles in the treatment of trichomoniasis, giardiasis and amebiasis; *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*; **1984**, 22; 6372.
18. Inventores: Rossignol, J.; Cavier, R.; Patente 1 437 800. The Patent Office London. 3 de Junio de 1976.
19. Petri Jr, W.; Therapy of intestinal protozoa; *Trends in Parasitology*; **2003**, 19(11); 523-526.
20. Liu, S.; Brown, D.; O'Donoghue, P.; Upcroft, P.; Upcroft, J.; Ferredoxin involvement in Metronidazole resistance of *Giardia duodenalis*; *Molecular and Biochemical Parasitology*; **2000**, 108; 137-140.
21. Upcroft, J.; Upcroft, P.; Future therapeutic alternatives for combating anaerobic protozoa; *Parasitology Today*; **1998**, 6(14); 212-214.
22. Gilles, H.; Hoffman, P.; Treatment of intestinal parasitic infections: a review of nitazoxanide; *TRENDS in Parsitology*; **2002**, 18(3); 95-97.
23. Valdez, J.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A.; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Navarrete-Vázquez, G.; Tapia, A.; Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R.; Synthesis and antiparasitic activity of 1*H*-benzimidazole derivatives; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; **2002**, 12; 2221-2224.
24. Andrzejewska, M.; Yopez-Mulia, L.; Tapia, A.; Cedillo-Rivera, R.; Laudy, A.; Starosciak, B.; Kazimierczuk, Z.; Synthesis, and antiprotozoal and antibacterial activities of S-substituted 4,6-dibromo- and 4,6-dichloro-2-mercaptobenzimidazoles; *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; **2004**, 21; 323-329.
25. Anand, N.; Approaches to design and synthesis of antiparasitic drugs; Ed. Elsevier; Holanda, 1997, 1a. Edición; pp 195-225.
26. Horton, R.J.; Benzimidazoles in a Wormy World; *Parasitology Today*; **1990**, 6; 106.
27. Kus, C.; Göker, H.; Altanlar, N.; Synthesis and antimicrobial activities of 5-fluoro-1,2,6-trisubstituted benzimidazole carboxamide and acetamide derivates; *Archiv der Pharmazie Pharmaceutical and Medicinal Chemistry*; **2001**; 334; 361-365.
28. Sánchez Díaz, M.; Tesis de Maestría. Síntesis de derivados del 1-metilbencimidazol con actividad antihelmíntica potencial. Facultad de Química, UNAM, México, D.F.; 1999.
29. Méndez-Cuesta, C.; Tesis de Licenciatura. Síntesis y actividad antiparasitaria del 6-cloro-2-(metiltio)-*N*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida y sus derivados 1-metilados. Facultad de Química, UNAM.; México, D.F., 2005.

30. Kunishima, M.; Kawachi, C.; Hioki, K.; Terao, T.; Tani, S.; Formation of carboxamides by direct condensation of carboxylic acids and amines in alcohols using a new-alcohol and water-soluble condensing agent: DMT-MM; *Tetrahedron Letters*; **2001**, 57; 1551-1558.
31. Mc.Murry; Química Orgánica; 1999; Ed. Iberoamericana; pp. 781-793.
32. Solomons, G.; Fundamentos de Química Orgánica; Ed. Limusa, México, 1990.
33. Pine, S.; Hedrickson, J.; Cram, D.J.; Hammond, G.S.; Química Orgánica, 4ª. Edición; Ed. McGrawHill; pp. 346-348.
34. Staab, H. A.; Shyntesen mit heterocyclischen amiden (Azoliden); *Angew Chemistry*; **1962**, 12; 407-423.
35. Smith, M.; March, J.; March's Advanced Organic Chemistry; Ed. Wiley-Interscience Publication John Wiley and Sons, Inc.; Canada, 2001, 5ª Edición; pp. 696-698.
36. Pandey, A.; Mann, M.; Proteomics to study genes and genomes; *Nature*; **2000**, 405; 837-846.
37. Ashton, P.; Curwen, R.; Wilson, A.; Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins; *TRENDS in Parasitology*; **2001**, 17(4); 198-202.
38. Cooper, R.A.; Carucci, D.J.; Proteomic Approaches to Studying Drug Targets and Resistance in Plasmodium; *Current Drug Targets – Infectious Disorders*; **2004**, 4; 41-51.
39. Hewick, R.; Lu, Z.; Wang, J.; Proteomics in Drug Discovery; *Advances in Protein Chemistry*; **2003**, 65; 309-342.
40. Ambrosio, J. R.; Reynoso-Ducoing, O.; Hernández-Sánchez, H.; Correa-Piña, D.; González-Malerva, L.; Cruz-Rivera, M.; Flisser, A.; Actin expression in *Taenia solium* cysticerci (cestoda): tisular distribution and detection of isoforms; *Cell Biology International*; **2003**, 27; 727-733.
41. Aly, N.; Hiramoto, A.; Sanai, H.; Hiraoka, O.; Hiramoto, K.; Kataoka, H.; Wu, J.; Masuyama, A.; Nojima, M.; Kawai, S.; Kim, H.; Wataya, Y.; Proteome analysis of new antimalarial endoperoxide against *Plasmodium falciparum*; *Parasitology Research*; **2007**, 100; 1119-1124.
42. Dea-Ayuela, M. A.; Rama-Lñiguez, S.; Bolas-Fernández, F.; Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes; *Proteomics*; **2006**, 6(14); 4187-4194.
43. Upcroft, P.; Upcroft, J.; Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa; *Clinical Microbiology Reviews*; **2001**, 14(1); 150-164.
44. MacDonald, L.; Armson, A.; Thompson, A.; Reynoldson, J.; Characterisation of benzimidazole binding with recombinant tubulin from *Giardia duodenalis*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Cryptosporidium parvum*; *Molecular & Biochemical Parasitology*; **2004**, 138; 89-96.

45. Raether, W.; Hânel, H.; Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity; *Parasitology Research*; **2003**, *90*; 19-39.
46. Palm, J. E.; Weiland, M.; Griffiths, W.; Ljungström, I.; Svârd, S.; Identification of immunoreactive proteins during acute human Giardiasis; *The Journal of Infectious Diseases*; **2003**, *187*; 1849-1859.
47. Brown, D.; Upcroft, J.; Upcroft, P.; A thioredoxin reductase-class of disulphide reductase in the protozoan parasite *Giardia duodenalis*; *Molecular and Biochemical Parasitology*; **1996**, *83*; 211-220.
48. Weiland, M.; McArthur, A.; Morrison, H.; Sogin, M.; Svârd, S.; Annexin-like alpha giardins: a new cytoskeletal gene family in *Giardia lamblia*; *International Journal for Parasitology*; **2005**, *35*; 617-626.
49. Dagci, H.; Ustun, S.; Taner, M.; Ersoz, G.; Karacasu, F.; Budak, S.; Protozoon infections and intestinal permeability; *Acta Tropica*; **2002**, *81*; 1-5.
50. Youssef, M.; Shurman, A.; Bougnoux, M.; Rawashdeh, M.; Bretagne, S.; Strockbine, N.; Bacterial, viral and parasitic enteric pathogens associated with acute diarrhea in hospitalized children from northern Jordan; *FEMS Immunology and Medical Microbiology*; **2000**, *28*; 257-263.
51. Crompton, D. W. T.; How much human helminthiasis is there in the world?; *Journal of Parasitology*; **1999**, *85*; 397-403.
52. Katzung, Bertram G.; Farmacología Básica y Clínica; Ed. El Manual Moderno; México, 1994, 5ª Edición; pp. 925-961.
53. O'Handley, R.; Buret, A.; McAllister, T.; Jelinski, M.; Olson, M.; Giardiasis in dairy calves: effects of Fenbendazole treatment on intestinal structure and function; *International Journal for Parasitology*; **2001**, *31*; 73-79.
54. Korolkovas, A.; Essentials of Medicinal Chemistry; Ed. Wiley-Interscience Publication; EUA, 1988; 2ª Edición; pp. 67-76.
55. Townsed, L.; Wise, D.; The synthesis and chemistry of certain antihelminthic benzimidazoles, *Parasitology Today*; **1990**, *6*(4);107.
56. Sharma, S.; Design new drugs for helminth diseases: lead optimization in benzimidazoles, *Advances in Drug Research*; **1994**, *25*; 105-163.
57. Sharma, S.; Abuzar, S.; The benzimidazole antihelminthics – chemistry and biological activity; *Advances in Drug Research*; **1982**; 85-161.
58. Lacey, E.; The role of the cytoskeletal protein, tubulin in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles; *International Journal for Parasitology*; **1998**, *18*(7); 885.

59. Boray, J.; Crowfoot, P.; Strong, M.; Schellenbaum, M.; Vonorelli, M.; Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with Triclabendazole; *Veterinary Record*, **1983**, 113; 315-317.
60. Turner, K.; Armour, J.; Richards, R.; Anthelmintic efficacy of Triclabendazole against *Fasciola hepatica* in sheeps; *Veterinary Record*, **1984**, 114; 41-42.
61. Hernández Campos, A.; Ibarra velarde, F.; Vera Montenegro, Y.; Rivera Fernández, N.; Castillo, R.; Synthesis and fasciolicidal activity of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole; *Chemical Pharmaceutical Bulletin*; **2002**, 50(5); 649-652.
62. Gupta, S.; Khan, A.; Jain, M.; katiyar, J.; Anthelmintic profile of methyl 5(6)-(4-methylpiperidin-1-yl)carbonylbenzimidazole-2-carbamate in experimental helminthiasis; *Indian Journal of Experimental Biology*; **1990**, 28; 475.
63. Hernández Campos, A.; Castillo R.; Hernández, F.; González, M.; Yépez, L.; Cedillo, R.; Synthesis and anthelmintic activity of novel 5-(aminocarbonyl)benzimidazole derivatives; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; **2002**, 12; 2221.
64. Grimmett, R.; Imidazole and Benzimidazole Synthesis; Ed. Academic Press; Inglaterra, 1997, 1ª Edición; pp. 19-32.
65. Katritzky, A. R.; Rachwal, S.; New routes to selectively methylated benzimidazoles; *Journal Heterocyclic Chemistry*; **1994**, 31; 775.
66. Middleton, R. W.; Monney, H.; N-Methylation of Heterocycles with Dimethylformamide Dimethyl Acetal; *Synthesis Communications*; **1984**; 740-743.
67. Kasturi. T. R.; Jois, H. R.; Mathew, L.; A novel transformation of 3-alkoxyisoquinolines to 3-chloroisoquinolines and a unusual decyanation of 1,3-dialkoxy-4-cyano-5,6,7,8-tetrahydroisoquinolines under Vilsmeier-Haack Conditions; *Synthesis Communications*; **1987**; 708-715.
68. Fox, M.; Whitesell, J.; Química Orgánica; Ed. Pearson Educación; México, 2000, 2ª. Edición; pp. 504-505.
69. Basilio-Espeites, P. Tesis de Licenciatura. Evaluación de la actividad biológica de compuestos derivados del Triclabendazol empleando a *T. spiralis* como modelo experimental. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México, D.F., 1998.
70. Towson, D. H. & Morris, D. L.; *Onchocerca gutturosa* and *O. volvulus*: studies on the viability and drug responses of cryopreserved adult worms *in vitro*; *Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine & Hygiene*; **1989**, 83; 664-669.
71. Leonard, L. P.; Advanced Practical Organic Chemistry; Ed. Blackie Academic & Professional; 2ª Edición; 204-223.
72. Sandoval Rivera, E.; Tesis de Licenciatura. Síntesis de carboxamidas 1-metilbenzimidazólicas con potencial actividad antiparasitaria. Facultad de Química, UNAM.; México, D.F., 2003.

73. Rodríguez Morales, S.; Tesis de Maestría. Síntesis y actividad biológica de *N*-fenilcarbamatos de metilo 4-sustituidos como antihelmínticos y herbicidas. Facultad de Química, UNAM.; México, D.F., 1998.
74. Islas Fonseca, Y.; Tesis de Licenciatura. Síntesis alterna de dos 1-metil-6-carboxamidas con potencial actividad antiparasitaria. Facultad de Química, UNAM.; México, D.F., 2003.
75. López Balbiaux, N.; Tesis de Licenciatura. Síntesis y actividad antiparasitaria de nuevos derivados bencimidazólicos 1-metilados. Facultad de Química, UNAM.; México, D.F., 2003.
76. González-Malerva, L.; Cruz-Rivera, M.; Reynoso-Ducoing, O.; Retamal, C.; Flisser, A.; Ambrosio, J. R.; Muscular myosin isoforms of *Taenia solium* (Cestoda); *Cell Biology International*; **2004**, *28*; 885-894.
77. Ambrosio, J.; Cruz-Rivera, M.; Allan, J.; Morán, E.; Ersfeld, K.; Flisser, A.; Identification and partial characterization of myosin-like protein from cysticerci and adults of *Taenia solium* using a monoclonal antibody; *Parasitology*; **1997**, *114*; 545-553.
75. Vázquez-Márquez, L.; Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.; México, D.F., 2007, en proceso.

APÉNDICE A: PARTE EXPERIMENTAL

PARTE QUÍMICA

A.a. INSTRUMENTACIÓN

- Los puntos de fusión (pf) se determinaron en un aparato Büchi Modelo B-540, utilizando capilares de vidrio y no están corregidos.
- La concentración de las soluciones se llevó a cabo en un rotaevaporador marca Büchi Modelo R-144 con vacío generado con bomba de vacío marca GAST modelo 0523-V4F y compresora VWR Scientific Modelo 1107.
- Los espectros de masas por Impacto Electrónico (IE) se determinaron por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM), por Introducción Directa de la muestra (ID) o mediante la técnica de FAB+1, en un aparato marca Jeol Modelo JMS-SX102A. La simbología utilizada es M^+ = ion molecular, m/z = relación masa/carga y pb = pico base.
- Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier, marca Pekín Elmer Modelo 1605, en pastilla de bromuro de potasio. Las señales se reportan en cm^{-1} .
- Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN ^1H), de 300 MHz se determinaron en un equipo Varian Modelo VRX-300 MHz utilizando como disolvente sulfóxido de dimetilo deuterado ($\text{DMSO}-d_6$). Como referencia interna se utilizó tetrametilsilano (TMS). Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm). La simbología empleada es: s = singulete, d = doblete, sd = singulete doblete, sa = singulete amplio, dd = doble de dobles, m = multiplete.

A.b. CROMATOGRAFÍA

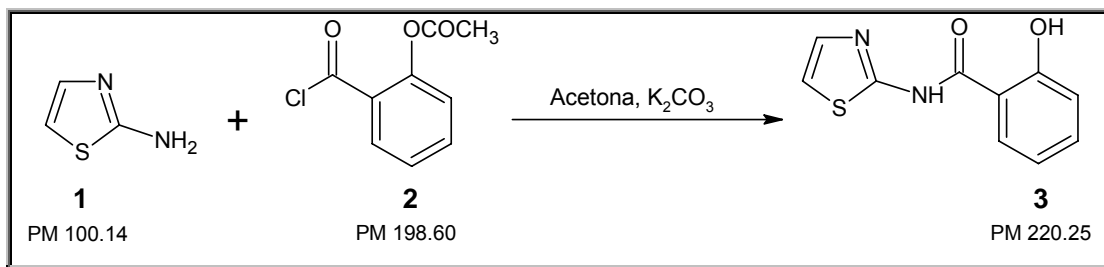
- El avance de las reacciones y la pureza de los compuestos se analizó por cromatografía en capa fina (ccf), utilizando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60, GF-254 (Merck). Los compuestos orgánicos se visualizaron con luz ultravioleta (UV) y/o por exposición a vapores de yodo. El sistema de elución utilizado fue el siguiente:

Cloroformo-Acetona, 75:25

A.c. TÉCNICAS PARA LA PREPARACIÓN DE INTERMEDIARIOS Y PRODUCTOS FINALES

2-Hidroxi-N-1,3-tiazol-2-ilbenzamida (3)

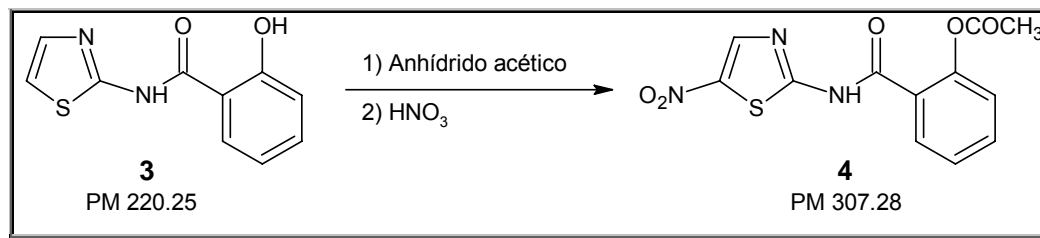
Sustitución



En un matraz "Kontes Taper" de 250 mL con tres bocas, provisto de termómetro; refrigerante en posición de reflujo, acondicionado con una trampa anhidra, embudo de adición, agitación magnética y sumergido en un baño de aceite, se colocaron 2.25 g (0.0252 mol) de 2-aminotiazol y 4.17 g (0.0302 mol, 1.2 equivalentes,) de K₂CO₃ disueltos en 25 mL de acetona. Posteriormente, se adicionó, gota a gota y con agitación, una solución de 5 g (0.0252 mol) del cloruro de acetilsaliciloilo disueltos en 50 mL de acetona. La mezcla se calentó a 50-55 °C por 5 horas. Después de este tiempo, una ccf indicó la ausencia de materia prima y se procedió al aislamiento del producto formado. La mezcla de reacción se separó por filtración al vacío, se lavó con acetona fría y se dejó secar al aire. El producto crudo se resuspendió en agua para eliminar el excedente de carbonato de potasio, la suspensión se filtró al vacío, se lavó con agua y se secó al aire dando 4.3210 g (65.45%) de un sólido color blanco, que analizado por ccf presentó una mancha con R_f 0.37. Una parte del producto crudo se recrystalizó de Etanol/DMF dando un sólido fino blanco con un rendimiento de 56.02%. El pf determinado fue de 253.8-254.9°C.

2-[[5-nitro-1,3-tiazol-2-il)amino]carbonil]fenil acetato (Nitazoxanida) (4)

Nitración con nitrato de acetilo



En un matraz "Kontes Taper" de 50 mL, equipado con termómetro; refrigerante en posición de reflujo, acondicionado con una trampa anhidra, embudo de adición, agitación magnética y sumergido en un baño de aceite, se colocaron 3 g (0.0136 mol) del compuesto **3** y se adicionaron 25 mL de anhídrido acético, la mezcla se calentó hasta la disolución total de la materia prima (70 °C). Posteriormente, la mezcla se llevó a 5°C con un baño de hielo-sal y se le adicionaron, poco a poco, 1.15 mL (0.0272 mol, 2 equivalentes) de ácido nítrico fumante. Al término de la adición, se retiró el baño hielo-sal y se dejó a temperatura ambiente por aproximadamente 30 min. Una ccf mostró la formación del producto de reacción, así como una pequeña cantidad del producto de hidrólisis menor al 5%. Seguidamente, la mezcla se filtró al vacío, primero se lavó con metanol frío y luego con agua, dejándolo secar. De esta forma se obtuvieron 1.76 g de un sólido blanco grisáceo (42.30%). El producto se recrystalizó de Metanol dando unos cristales de color blanco grisáceos que pesaron 1.1493 g (65.30%) y con un R_f 0.58. El pf determinado fue de 195.3-197.5 °C.

PARTE BIOLÓGICA

A.d. INSTRUMENTACIÓN

- Los procesos de centrifugación se hicieron con una Centrifuga Mikro 200R, marca Hettich Zentrifugen.
- El corrimiento electroforético en acrilamida se realizó en una cámara de electroforesis Bio-Rad, Mini Protean 3 System; utilizando un fuente de poder Bio-Rad, Power/Pac 3000.

- Las proteínas se sonicaron con un sonicador VibraCell Ultrasonic Processor.
- Las hidratación de las tiras se llevaron a cabo en una charola de hidratación de 12 carriles para tiras de 7 cm Amershan Biosciences; Immobiline™ Dry Strip, pH 4-7, NL; Cat: 17-6001-10.
- La separación isoelectroforética de las proteínas en tiras de 7 cm se realizó en un equipo Protean IEF Cell de BIO-RAD, Cat: 165-4000.
- La separación de proteínas en 2D para las tiras de 7 cm se hizo en una cámara de electroforesis XCell Sure Lock™ Mini-Cell de 7x8 cm de Invitrogen; utilizando geles de acrilamida prehechos de NuPAGE 4-12% Bis-Tris ZOOM™ Gel 1.0 mm X IPG well; Cat: NP0330BOX de Invitrogen.
- La separación isoelectroforética de las proteínas en tiras de 18 cm se realizó en un equipo IPGphor-Isoelectric Focusing Unit, Cod: 80-6414-02 de Amersham-Bioscience.
- La separación de proteínas en 2D para las tiras de 18 cm se hizo en una cámara de electroforesis Hoefer SE 660 Ruby Estándar Dual Cooled Vertical Unit Vertical Electrophoresis; Cat: 80-6479-38 de Amersham Biosciences.
- La captura de las imágenes de los geles se realizó mediante un fotodocumentador ChemiDoc XRS de Bio-Rad, evaluándolas mediante el programa de cómputo Quantity One Versión 4.6 y PDQuest Versión 7.4.
- Las imágenes de microscopía electrónica se obtuvieron mediante un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-5410 LV, usando una transmisión de 15 kV y a los aumentos de 5000x y 7500x.
- Para la identificación de proteínas se utilizó un Digestor Multiple probe 215 liquid handler y Turbo Vap 96 Workstation de Amersham Bioscience. La espectrometría de masas se realizó por MS-MS en un Espectrómetro de Masas 4700 Proteomics Analyzer con TOF/TOF™, con fuente de ionización tipo MALDI y dos analizadores tipo tiempo de vuelo en tandem y cámara de colisión (CID) para fragmentación de iones de Applied Biosystems.

A.e. TÉCNICAS PARA LA OBTENCIÓN DE LOS MAPAS PROTEÓMICOS

I) Obtención de proteínas totales de trofozoítos de *G. intestinalis*

1. Se sembraron 20×10^6 trofozoitos en medio a 37°C por 24 horas.
2. Se realizó un conteo en una cámara de Newbauen para resembrar la cantidad de trofozoitos inicial, se adicionó 3 µg/mL del compuesto a probar y se incubó a 37°C por 24 horas.
3. Al término de este tiempo, el cultivo se enfrió en hielo por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 1000 g x 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó, los trofozoitos se lavaron 3 veces con PBS y se volvió a centrifugar a 1000 g x 10 minutos a 4°C.
4. Se les agregó agua desionizada, se resuspendió y se centrifugó a 1000 g x 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó, se adicionó 1 mL de EDTA (40 µL de EDTA en 960 µL de agua desionizada) y se agitó en vortex.

5. Finalmente se realizaron 7 ciclos de congelamiento y calentamiento (-70°C – 37°C). Las muestras se conservaron finalmente a -70°C.

II) Obtención de trofozoítos para microscopia electrónica de barrido.

1. A un cultivo de *G. intestinalis* con 20×10^6 trofozoitos se le adicionaron 3 µg/mL del compuesto a probar. Se incubó 24 horas a 37°C.

2. Se centrifugó 5 minutos a 3 g. Se decantó el sobrenadante, se adicionó 1 mL de PBS, se resuspendió y se centrifugó a 3 g x 5 minutos. Este proceso se repitió 3 veces más.

3. Finalmente se decantó el sobrenadante, se adicionó glutaraldehído al 3% y se conservó a 4°C hasta el momento de uso.

III) Cuantificación de Proteínas por el kit Assay DC (Microplaca) que es una modificación de Lowry.

Esta técnica es un ensayo colorimétrico para medir la concentración de proteínas que se solubilizan en detergente. La reacción es similar al bien documentado ensayo de Lowry,¹ pero con las siguientes mejoras. La reacción alcanza el 90% de su máximo desarrollo de color en 15 minutos lo que ahorra tiempo, y el color no cambia mas del 5% en 1 hora o 10% en 2 horas después de la adición de los reactivos. Es una técnica que solamente requiere de 5 µL de la muestra y cuantifica hasta 0.1 µg/mL de proteína.

Reactivo A: Solución alcalina de tartrato de cobre.

Reactivo B: Reactivo de Folin diluido (mezcla).

Reactivo S: Detergente SDS.

1. La curva patrón fue a base de una solución stock de 10 mg/mL de Albúmina Sérica Bovina (BSA, Cat: A-6918, Sigma Chemical Co.). Se hicieron las diferentes concentraciones por triplicado:

Sol. 10 mg/mL De BSA (µL)	Agua MilliQ (µL)	Conc. (mg/mL)
0	200	0
10	190	0.5
20	180	1
40	160	2
60	140	3
100	100	5

2. Preparación del reactivo de trabajo.

20 µL del reactivo S por cada mL de reactivo A = A'

(A' es estable por una semana aunque se forme precipitado 1 día después; si el precipitado se forma calentar la solución y agitar en vortex)

3. Adicionar 5 µL del estándar y la muestra en cada uno de los pozos. Si la muestra no contiene detergente se puede omitir el paso 1 y simplemente adicionar el reactivo A.

4. Adicionar 25 µL de reactivo A o A' en cada pozo.

5. Agregar 200 μ L de reactivo B en cada pozo. Agitar suavemente la placa con la mezcla de reactivos. Si se forman burbujas, eliminarlas con la punta de una pipeta seca y limpia. Evitar la contaminación cruzada de las muestras entre los pozos.
6. Esperar 15 minutos, leer la absorbencia a 750 nm. El cambio de color disminuye un 5% en 1 hora, 10% 2 horas después de la adición de los reactivos.

Albumin, Bovine 98-99% Albumin 100 g Cat: A-6918 Sigma Chemical Co.	Bio-Rad DC Protein Assay. Cat: 500-0116 Incluye: 250 mL Reactivo A, solución alcalina de tartrato de cobre. 2000 mL Reactivo B, reactivo de Folin diluido. 5 mL Reactivo S.
---	---

IV) Preparación de la muestra para análisis electroforético SDS-PAGE

1. Por cada carril se corrieron 30 μ g de proteína en condiciones reductoras (buffer de Laemmli Bio-Rad, Cat: 161-0737 bajo condiciones reductoras contiene el 5% de β -mercaptoetanol Bio-Rad, Cat: 161-0710).
2. Las muestras fueron: Control, MTZ, NTZ, ABZ, RSD-8 y CMC-20. El gel SDS-PAGE constaba de dos partes: un gel separador al 10% y un gel concentrador al 4% de acrilamida.
3. La cámara de electroforesis (Bio-Rad, Mini Protean 3 System) se arma de tal forma que los geles, previamente preparados, tengan el vidrio mas corto sobre los electrodos. Se adiciona buffer de corrida 0.03M de Tris-Base pH = 8.3 en el centro hasta que tape los pozos. De la misma forma se adiciona en el resto de la cámara, hasta la mitad de los geles.
4. Se adicionaron marcadores de pesos moleculares (PM, BIO-RAD, Precision Plus Protein Standard 250KDa-10KDa, Cat: 161-0373) junto con las muestras.
5. Se conectó a la fuente de poder (Bio-Rad, Power/Pac 3000), se programó a 80 V hasta que la muestra pasara del gel concentrador hasta el gel separador. Después se aumentó el voltaje a 100 V hasta que el frente de la muestra llegó al final del gel.
6. Al término de la corrida, el gel se tiñó con 25 mL de azul de Coomassie (Pharmacia, Phast Gel™ Blue R, Cat: 17-0518-01), se tapó y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 1 hr.
7. Se retiró el azul de Coomassie, se adicionaron 25 mL de solución de desteñido rápido junto con una esponja y se mantuvo en agitación por 1 hr. Se realizó el mismo cambio pero ahora se adicionaron 12.5 mL de solución de desteñido rápido y 12.5 mL de agua destilada. Se mantuvo en agitación.
8. Se realizaron cambios subsecuentes de la misma forma hasta eliminar lo mejor posible el fondo en el gel y obtener una buena resolución de las bandas.
9. Se capturó la imagen por medio de una fotodocumentador (Bio-Rad, ChemiDoc XRS), con un filtro con luz UV Epi White, y se analizó con el software Quantity One (Bio-Rad, Versión 4.6).

V) Isoelectroenfoco en Tiras de Gradiente Inmovilizado (IPG) de pH = 4-7 de 7 cm de longitud

V.i) Preparación de la muestra

1. Para hidratar tiras de Immobiline™ DryStrip de pH = 4-7 de 7 cm, se necesitaron 125 µL de muestra preparada con 50 µg de proteína de la muestra a analizar.
2. A 50 µg de proteína se le adicionó urea 8M, Chaps 2%, IPG-Buffer pH = 4-7 2% y DTT 20mM. Se mezclaron hasta su disolución y se aforó con Solución de Rehidratación hasta 125 µL

V.ii) Hidratación de las Tiras de Gradiente

1. En una charola de hidratación de 7 cm (Amershan Biosciences; Immobiline™ Dry Strip, pH 4-7, NL; Cat: 17-6001-10), se colocaron 125 µL de cada muestra a lo largo de un carril por triplicado.
2. Se seleccionaron IPG con gradiente 4-7 L de 7 cm (almacenadas a -20°C); se le quitó la protección de plástico y se colocó una tira por carril de muestra, con el gel hacia abajo para estar en contacto con la muestra.
3. Se adicionó 1 mL de aceite mineral (Bio-Rad, Cat: 163-2129) sobre cada tira, se tapó la charola y se incubó por 16 hrs.

V.iii) Isoelectroenfoco

1. A la charola de corrida de 7 cm se le colocaron por carril dos puentes de papel filtro sobre cada electrodo y se le adicionó 8 µL de agua MilliQ.
2. Las tiras previamente hidratadas se retiraron del aceite y se colocaron en la charola de corrimiento, con el gel hacia abajo y en contacto con los puentes mojados.
3. Se adicionó 1 mL de aceite mineral a cada carril ocupado. Se corrió en el equipo Protean IEF (BIO-RAD, Protean IEF Cell, Cat: 165-4000).

Las condiciones de corrida fueron:

Paso 1: 100 V, 30 min, rápido.

Paso 2: 3000 V, 3 hrs., lineal.

Paso 3: 4000 V, rápido.

Paso 4: 50 V, 16 hrs.

4. Los puentes se cambiaron aproximadamente a las 2 horas de iniciada la corrida, una vez que el colorante migró hacia ellos. Los puentes nuevos se impregnaron previamente con 8 µL de agua MilliQ.

5. Al término de la corrida, las tiras se mantuvieron en refrigeración a -70°C hasta su uso.

V.iv) Electroforesis SDS-PAGE, 2D

1. Para correr la electroforesis en 2D, las tiras se retiraron del congelador, se procesaron cada una por separado en 5 mL de buffer de equilibrio con 0.13 M de DTT (Amersham Biosciences; PlusOne DTT; Cat: 17-1318-01) por 15 minutos en agitación constante.
2. Después se sacaron y se incubaron en 5 mL de buffer de equilibrio con 0.32 M de yodoacetamida (Sigma, Cat: I-1149) por 15 minutos en agitación constante. Finalmente se lavaron con agua MilliQ y se dejaron secar en papel filtro con el gel hacia arriba.
3. Se utilizó la cámara de electroforesis XCell Sure Lock™ Mini-Cell de 7x8 cm (Invitrogen), se usaron geles de acrilamida prehechos preparativos (NuPAGE 4-12% Bis-Tris ZOOM™ Gel 1.0 mm X IPG well; Cat: NP0330BOX; Invitrogen). Los geles se sacaron del empaque, se les retiró el peine y la cinta adhesiva en la parte inferior. Primero se lavaron con agua MilliQ y después con Buffer de Corrida 1x (NuPAGE MES-SDS, Cat: NP0002-02).
4. Posteriormente, las tiras se colocaron en el carril preparativo con el cátodo junto al pozo de los pesos moleculares. Se adicionaron 200 µL de agarosa al 0.5% (Bio-Rad; Overlay Agarose 0.5%, Cat: 163-2111). Los geles se colocaron en la cámara y se dejó gelificar la agarosa.
5. La cámara media se llenó con 200 mL de Buffer de Corrida 1x. En la cámara externa se agregaron 300 mL del mismo buffer. Se colocaron 3 µL de marcadores de Pesos Moleculares (Bio-Rad; Precision Protein™ Standards, Unstained, Broad Range; Cat: 161-0362), en el pozo destinado para este fin.
6. La cámara se colocó dentro de un refrigerador a 4°C. Se conectó a la fuente de poder (Bio-Rad, Power/Pac 3000). Se programó a 200 V x 45 minutos, tiempo estimado para el frente de corrida llegue hasta el final del gel.
7. Terminado el corrimiento, los geles se tiñeron por Sypro (Molecular Probes, SYPRO® Ruby Protein Gel Satín, Cat: S-12001).

V.v) Tinción con Sypro Ruby

1. El gel se fijó por 15 minutos en solución para fijar. Se desechó la solución y se repitió el proceso.
2. Se agregaron 60 mL de Sypro Ruby. Se calentó durante 15 segundos en el microondas, sin que hirviera. El recipiente se envolvió en papel aluminio y se mantuvo en agitación por 5 minutos. Se repitió este procedimiento 2 veces más. Después se mantuvo en agitación por 15 minutos.
3. Al finalizar este tiempo, el Sypro Ruby se retiró.
4. Se agregaron 100 mL de solución de lavado, sin dejar pasar la luz y se agitó por 30 minutos.
5. Finalmente, se desechó la solución y se realizaron 2 lavados con 50 mL de agua MilliQ por 5 minutos.
6. La imagen se capturó por medio de un fotodocumentador (Bio-Rad, ChemiDoc XRS), con un filtro con luz UV transillumination, y se analizó con el software PDQuest (Bio-Rad, Versión 7.4).

VI) Isoelectroenfoco en Tiras de Gradiente Inmovilizado (IPG) de pH = 4-7 de 18 cm de longitud

VI.i) Preparación de la muestra

1. Las muestras se liofilizaron y para hidratarlas se les agregó 750 μL de agua MilliQ, se les adicionó 750 μL de una solución de TCA al 10% y 20 mM de DTT en acetona a -20°C . Las muestras se sonicaron por 10 segundos a 30 decibeles. Se incubaron a -20°C por 2 hrs. Esto se hizo con la finalidad de precipitar proteínas sin sales.
2. Los tubos de centrifugaron a 10,000 rpm x 15 min a 4°C . Se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de solución 20 mM de DTT en acetona previamente enfriada a -20°C . Se agitaron en vortex y se centrifugaron a 6,250 rpm x 15 min a 4°C .
3. Se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 50 μL de buffer de solubilización (Urea 7M, Tiourea 2M, Chaps 4%, DTT 60 mM, IPG-Buffer pH = 4-7 2%, K_2CO_3 5mM).
4. Las muestras se agitaron en vortex. Se adicionaron 340 μL del buffer de rehidratación (Urea 7M, Tiourea 2M, Azul de Bromofenol 0.002%) con 0.018M de DTT y 0.72% de IPG-Buffer pH = 4-7
5. La muestra se homogeneizó con ayuda de un vortex y se sometió a sonicación por 10 segundos a 50 decibeles. Se mantuvo en agitación por 1 h a temperatura ambiente para favorecer la solubilización de la muestra.
6. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm x 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante, que eran aproximadamente 340 μL , se colocó en sarcófagos, donde también se colocaron puentes de papel filtro con 10 μL de agua MilliQ.

VI.ii) Isoelectroenfoque

1. Las tiras de 18 cm de pH 4-7 (Amersham-Bioscience, Cat: 17-6001-88) se colocaron a lo largo del sarcófago sobre la muestra. Se les adicionaron 2 mL de aceite mineral (DryStrip CoreFluid Cat: 17-1335-01, Pharmacia Biotech). Se taparon y se colocaron en el equipo de IEF (IPGphor-Isoelectric Focusing Unit; Cod: 80-6414-02; Amersham-Bioscience).
2. Las condiciones de corrida fueron las siguientes:

Paso 1: 12 hrs – 50 V – Rehidratación

Paso 2: 2 hrs – 150 V

Paso 3: 1 hr – 500 V

Paso 4: 1 hr – 1000 V

Paso 5: 1 hr – 2000 V

Paso 6: 6 a 7 hrs – 8000 V

VI.iii) Electroforesis SDS-PAGE, 2D

1. Al término del isoelectroenfoque, las tiras se retiraron del equipo. Se lavaron con agua MilliQ y se trabajaron de forma independiente al colocar en 9 mL de Buffer de Equilibrio (Tris-HCl 50 mM, Urea 6M, Glicerol 30%, SDS 2%, Azul de Bromofenol 0.002%), con 0.065 M de DTT en agitación por 30 minutos.
2. Posteriormente, la tira se lavó con agua MilliQ y se colocó en 9 mL de Buffer de Equilibrio con 0.16 M de IAA, se agitó por 30 minutos. Se lavó con agua MilliQ y se colocó la tira sobre el gel de

acrilamida 10% recortando los extremos para que ésta pudiera entrar bien. Del lado positivo de la tira se colocó un trozo de papel filtro impregnado con 3 μ L de marcadores de pesos moleculares (Bio-Rad; Precision Protein™ Standards, Unstained, Broad Range; Cat: 161-0362).

3. Se colocaron los geles en el equipo Hoefer SE 660 (Ruby Estándar Dual Cooled Vertical Unit Vertical Electrophoresis; Cat: 80-6479-38; Amersham Biosciences), el cual contenía 2 L de buffer de corrida (0.03M de Tris-Base pH = 8.3), encima del equipo se colocó 250 mL del mismo buffer. Se programó la fuente de poder, primero a 30 mA hasta que el frente salió de la tira. Inmediatamente después, se cambio el amperaje a 80 mA hasta que el frente estuviera a 2 cm del final.

4. Una vez finalizada la corrida, el equipo se apagó completamente. Se retiraron los geles de los vidrios y se tiñeron por azul de Coomassie coloidal (Coomassie Brilliant Blue G-250; Cat: 161-0406; Bio-Rad).

VI.iv) Tinción por Azul de Coomassie Coloidal

1. A los geles se les adicionó 250 mL de solución de fijación (Etanol 50%, Ácido orto-Fosfórico 2%)

2. Se mantuvo en agitación por una noche. Posteriormente, esta solución se desechó. Se lavó con agua MilliQ 3 veces cada uno de 5 minutos. Enseguida se adicionó 250 mL de una mezcla de sulfato de amonio 16.7% p/v, ácido orto-fosfórico 2.94% y metanol 32.35%.

3. Se mantuvo en agitación por 1 hora. Posteriormente se adiciono azul de Coomassie coloidal al 6.6% p/v en metanol.

4. Se mantuvo en agitación por una noche. Después, se hicieron lavados con agua MilliQ hasta obtener la resolución deseada.

5. La imagen se capturó por medio de un fotodocumentador (Bio-Rad, ChemiDoc XRS), con un filtro con luz UV transillumination, y se analizó con el software PD QUEST (Bio-Rad, Versión 7.4).

A.f. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

1. Buffer de Corrida 0.03M Tris-Base pH = 8.3

Componente	Concentración Final	Cantidad	Cantidad
Tris-Base	0.124M	9 g	15 g
Glicina	0.96M	43.2	72 g
SDS	0.5%	3 g	5 g
H ₂ O destilada		cbp 600 mL	cbp 1 L

Ajustar el pH a 8.3 con HCl concentrado. Para preparar buffer 0.03M se toman 250 mL del buffer 0.124M y se afora a 1L con agua destilada. No ajustar el pH después.

2. Solución para Tinción con Azul de Coomassie 0.2%

Componente	Concentración Final	Cantidad
PhastGel Blue R	0.2%	1 Tableta
Metanol	60%	120 mL
Agua destilada		80 mL

3. Solución de Desteñido Rápido

Componente	Concentración Final	Cantidad
Ácido Acético	10%	200 mL
Metanol	50%	1000 mL
H ₂ O destilada		800 mL

4. Solución de Rehidratación Tiras de Gradiente Inmovilizado (IPG) de pH = 4-7 de 7 cm de longitud

Componente	Concentración Final	Cantidad
Urea	8M	0.6 g
CHAPS	2%	0.025 g
IPG Buffer	2%	25 µL
Azul de Bromofenol 0.02%	0.00004%	2.5 µL
H ₂ O MilliQ		cbp 1.25 mL

5. Buffer de equilibrio Tiras de Gradiente Inmovilizado (IPG) de pH = 4-7 de 7 cm de longitud

Componente	Concentración Final	Cantidad
Tris-Base pH = 8.8 0.124M	0.004M	0.835 mL
Urea	8M	9.005 g
Glicerol 30%	10.35%	8.625 mL
SDS	2%	0.5 g
Azul de Bromofenol 0.02%	0.00001%	12.5 µL
H ₂ O MilliQ		cbp 25 mL

6. Solución para Fijar en Tinción con Sypro Ruby

Componente	Concentración Final	Cantidad
Metanol	50%	50 mL
Ácido Acético	7%	7 mL
Agua MilliQ		43 mL

7. Solución de Lavado en Tinción con Sypro Ruby

Componente	Concentración Final	Cantidad
Metanol	10%	10 mL
Ácido Acético	7%	7 mL
Agua MilliQ		83 mL

8. Solución de Rehidratación Tiras de Gradiente Inmovilizado (IPG) de pH = 4-7 de 18 cm de longitud

Componente	Concentración Final	Cantidad
Urea	7 M	0.420 g
Tiourea	2 M	0.152 g
Chaps	4%	40 mg
DTT	60 mM	9.25 mg
IPG-Buffer	2%	20 μ L
K ₂ CO ₃ 0.1M	5 mM	2.5 μ L
Agua MilliQ		cbp 1mL

9. Buffer de equilibrio Tiras de Gradiente Inmovilizado (IPG) de pH = 4-7 de 18 cm de longitud

Componente	Concentración Final	Cantidad
Tris-HCl pH 8.8 0.123M	50 mM	10 mL
Urea	6 M	72.07 g
Glicerol (87% v/v)	30%	69 mL
SDS	2%	4 g
Azul de Bromofenol 1%	0.002%	400 μ L
Agua MilliQ		cbp 200 mL

10. Gel de Acrilamida/BIS 10% para Tiras de Gradiente Inmovilizado (IPG) de pH = 4-7 de 7 cm de longitud

Componente	Gel Separador 10%	Concentración Final	Gel Concentrador 4%	Concentración Final
Acrilamida/BIS 30%	10 mL	10%	1.33 mL	4%
Tris-Base pH 8.8 1.5M	7.5 mL	0.375M		
Tris-Base pH 6.8 0.5M			2.5 mL	0.125M
SDS 10%	300 μ L	0.1%	100 μ L	0.1%
Agua MilliQ	12.05 mL		6.1 mL	
Persulfato de Amonio 10%	150 μ L	0.05%	50 μ L	0.05%
TEMED	15 μ L	0.05%	10 μ L	0.1%

11. Gel de Acrilamida 10% para Tiras de Gradiente Inmovilizado (IPG) de pH = 4-7 de 18 cm de longitud

Componente	Concentración Final	Vf = 30 mL	Vf = 60 mL
Acrilamida 30%	10%	9.93 mL	19.86 mL
Piperazina 2%	0.16%	2.45 mL	4.90 mL
Tris-Base pH 8.8 0.124M	0.04M	9.63 mL	19.26 mL
SDS 10%	0.1%	300 μ L	600 μ L
Agua MilliQ		7.5 mL	15 mL
Persulfato de Amonio 10%	0.05%	150 μ L	300 μ L
TEMED	0.11%	33.3 μ L	66.6 μ L
Tiosulfato de Sodio 10%	0.04%	125 μ L	250 μ L

12. Solución de Fijación para Tinción con Azul de Coomassie Coloidal

Componente	Concentración Final	Cantidad
Etanol	50%	125 mL
Ácido Fosfórico	2%	5 mL
Agua MilliQ		120 mL

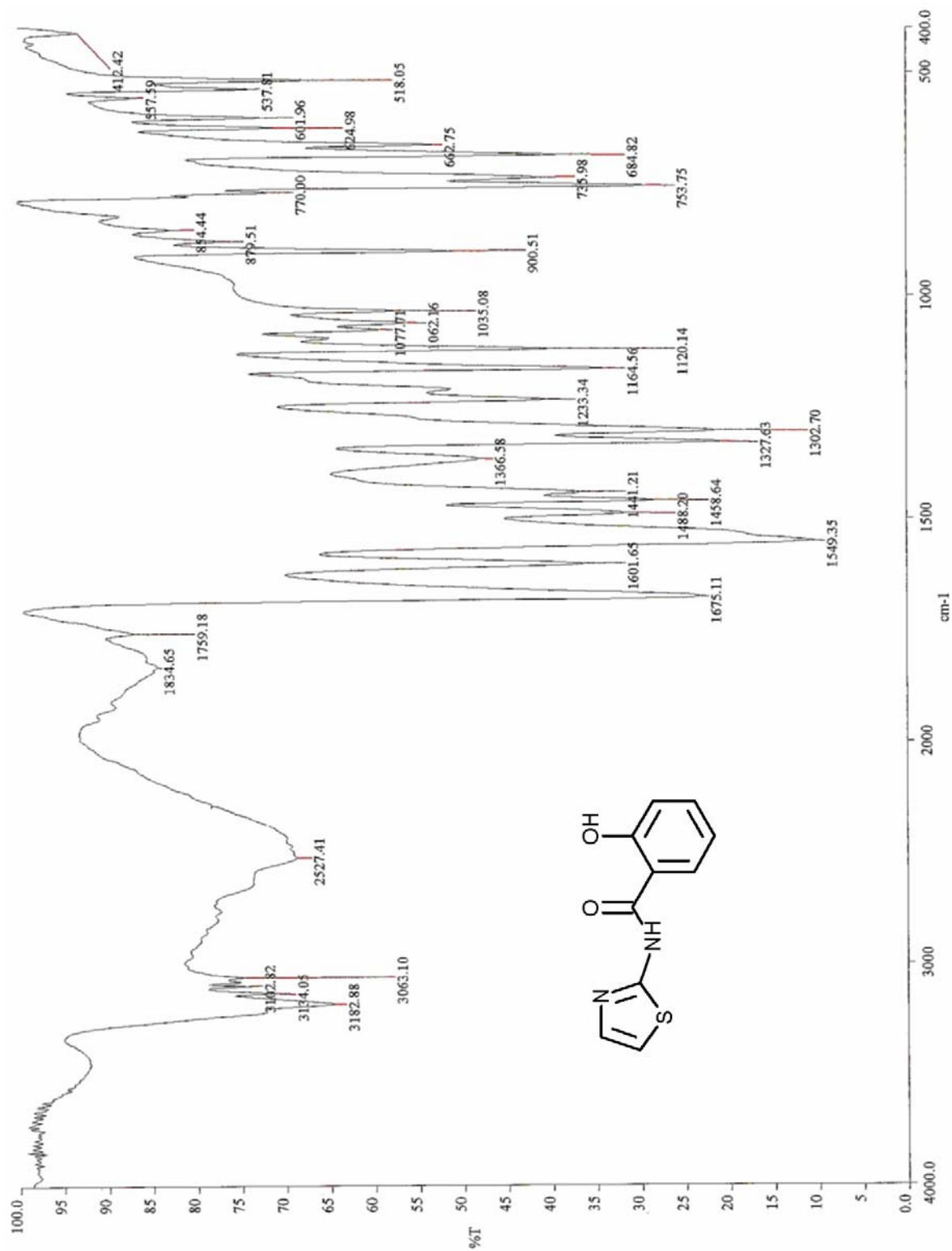
13. Solución de Desarrollo para Tinción con Azul de Coomassie Coloidal

Componente	Concentración Final	Cantidad
Sulfato de Amonio	16.67%	42.5 g
Ácido Fosfórico	2.94%	7.5 mL
Agua MilliQ		165 mL
Metanol	32.35%	82.5 mL

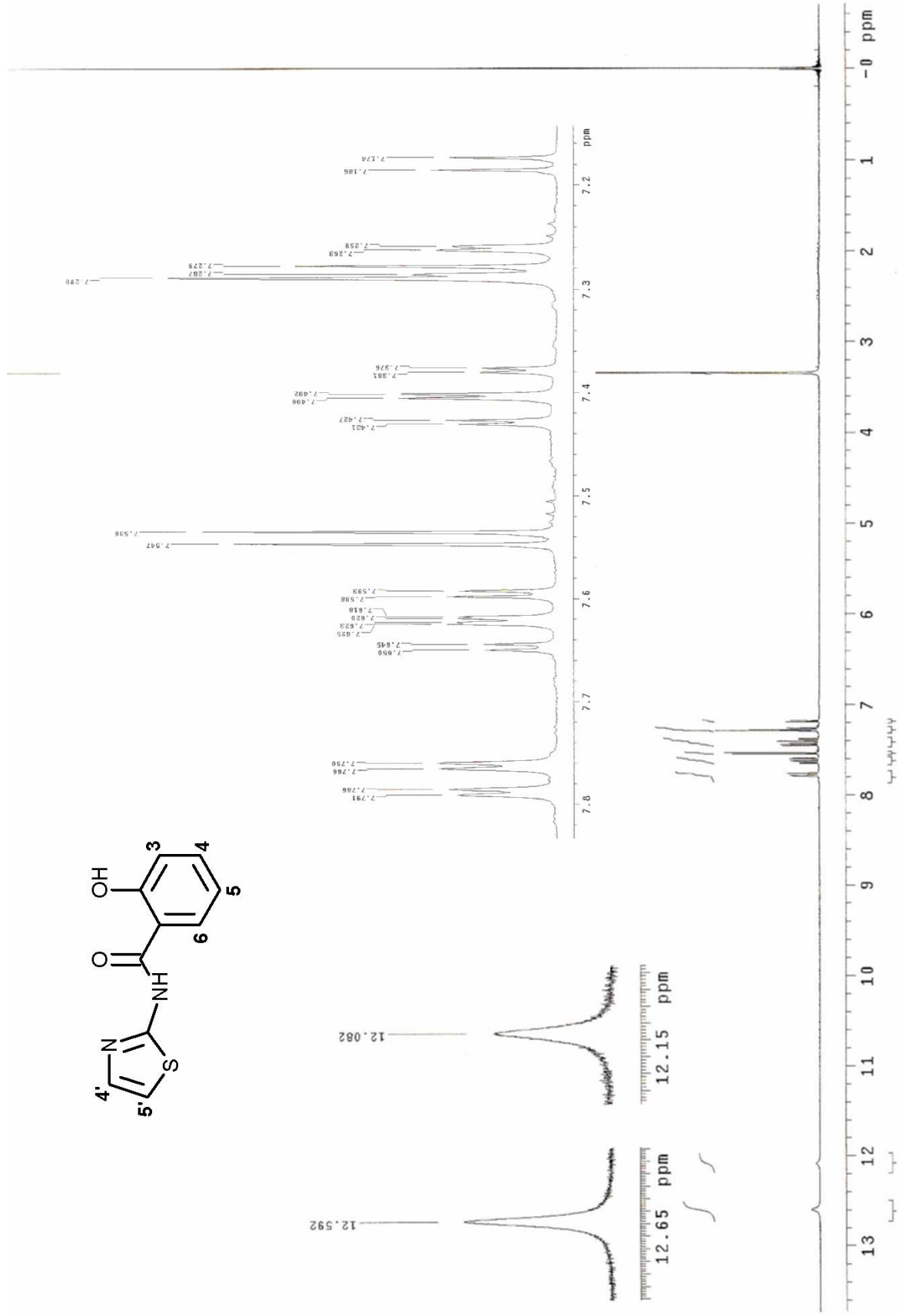
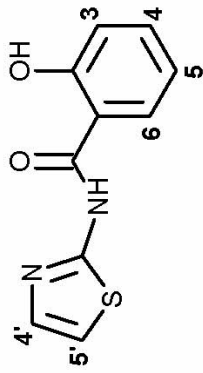
14. Solución de Azul de Coomassie Coloidal

Componente	Concentración Final	Cantidad
Coomassie Blue G-250	6.6%	165 mg
Metanol		2.5 mL

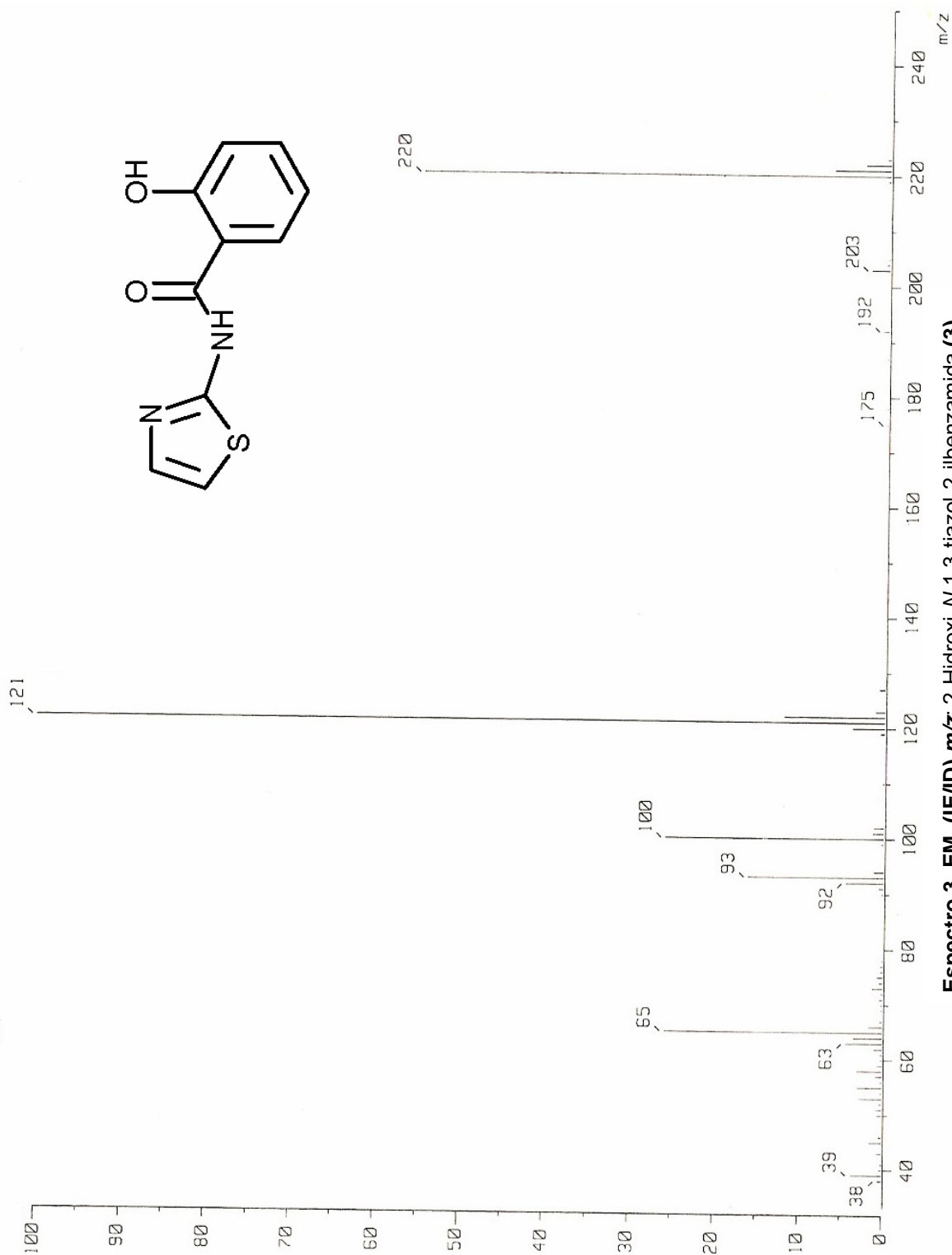
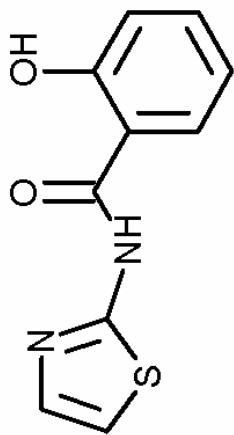
APÉNDICE B: ESPECTROS



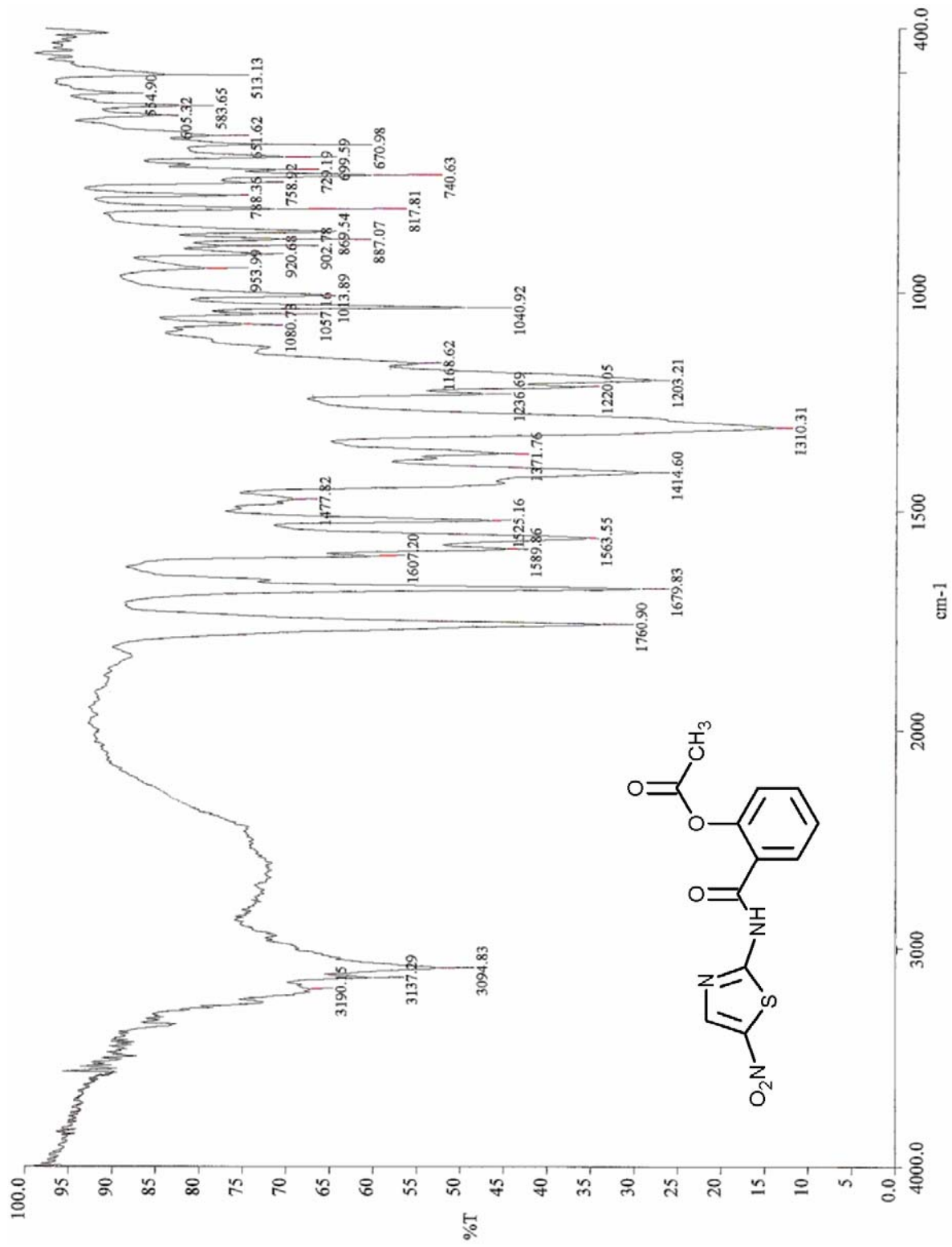
Espectro 1, IR: Pastilla (KBr) cm⁻¹: 2-Hidroxi-N-1,3-tiazol-2-ilbenzamida (3).



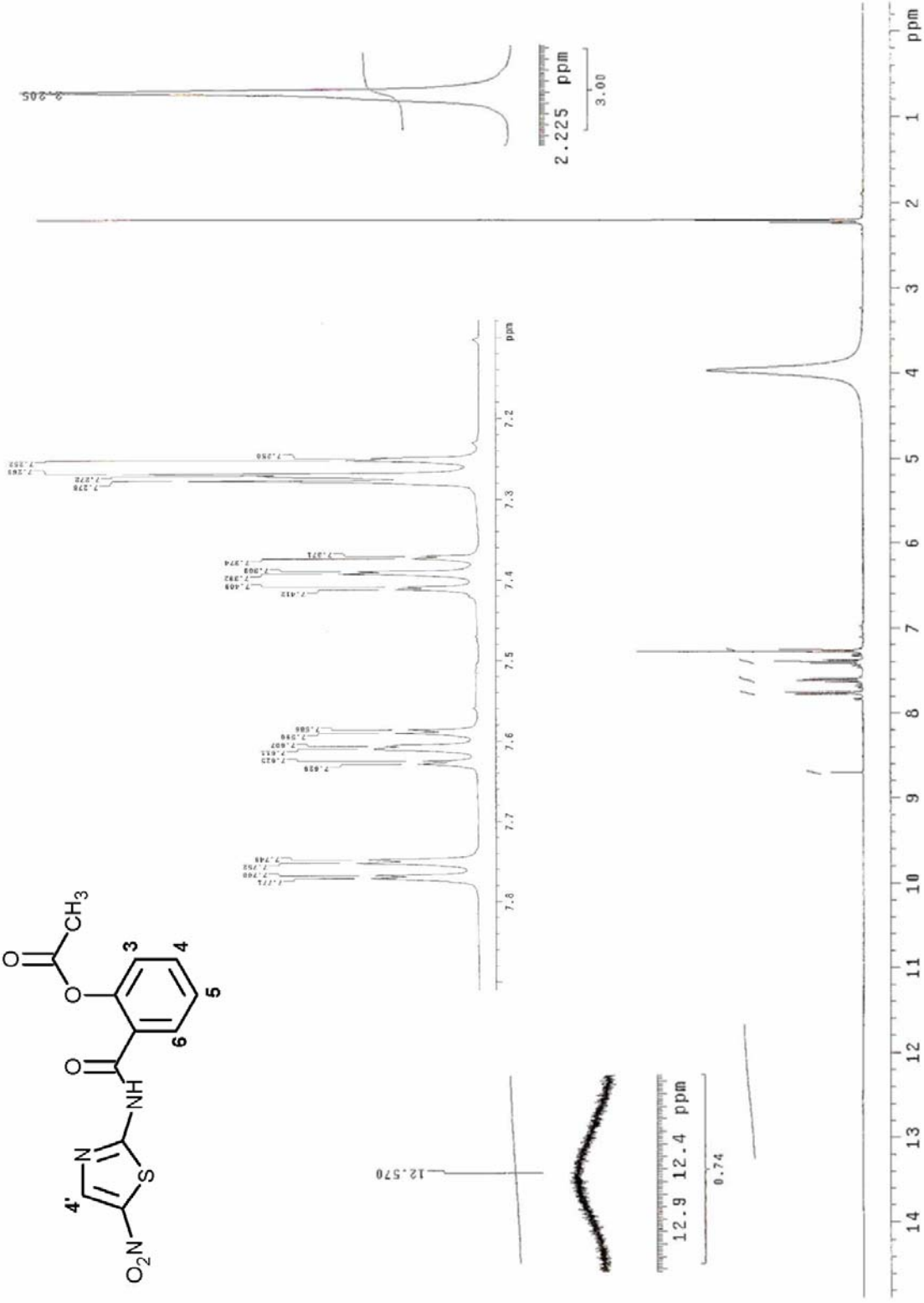
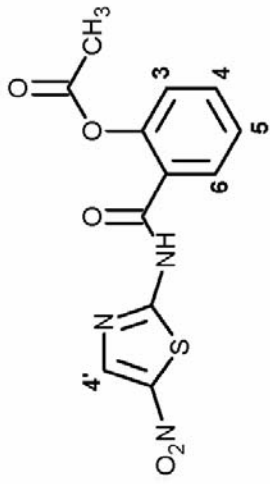
Espectro 2, RMN¹H. (TMS, DMSO-d₆) ppm: 2-Hidroxi-N-1,3-tiazol-2-ilbenzamida (3).



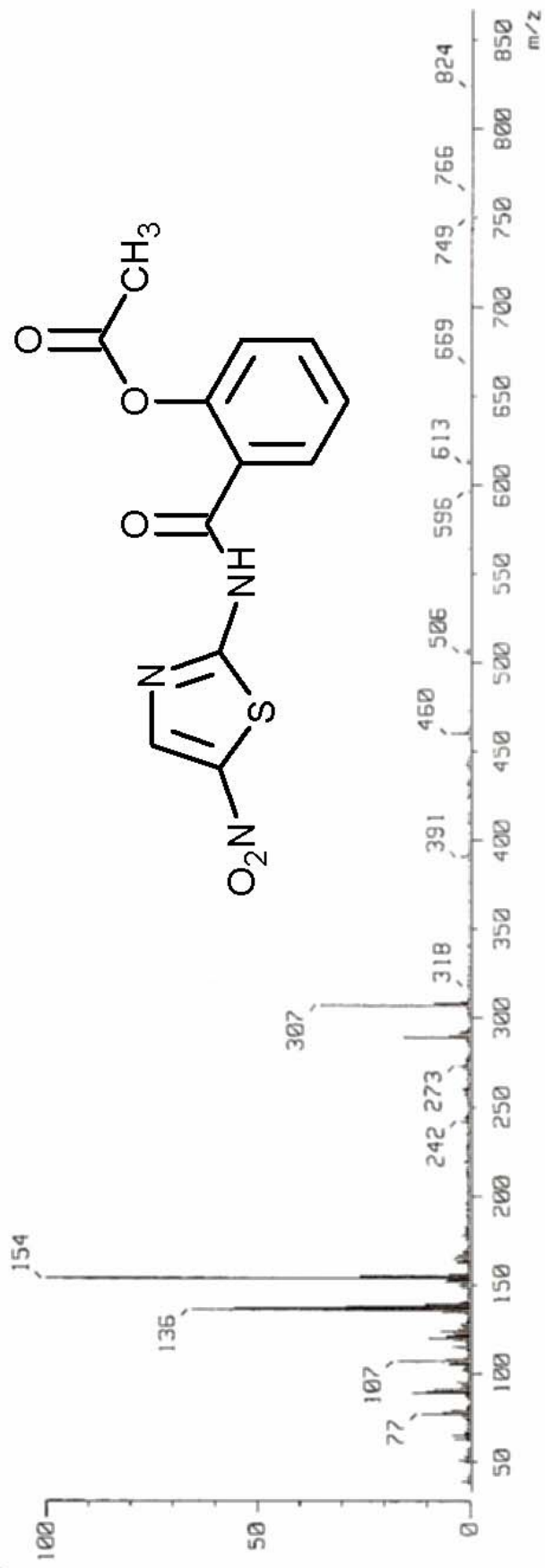
Espectro 3, EM. (IE/ID) m/z. 2-Hidroxi-N-1,3-tiazol-2-ilbenzamida (3).



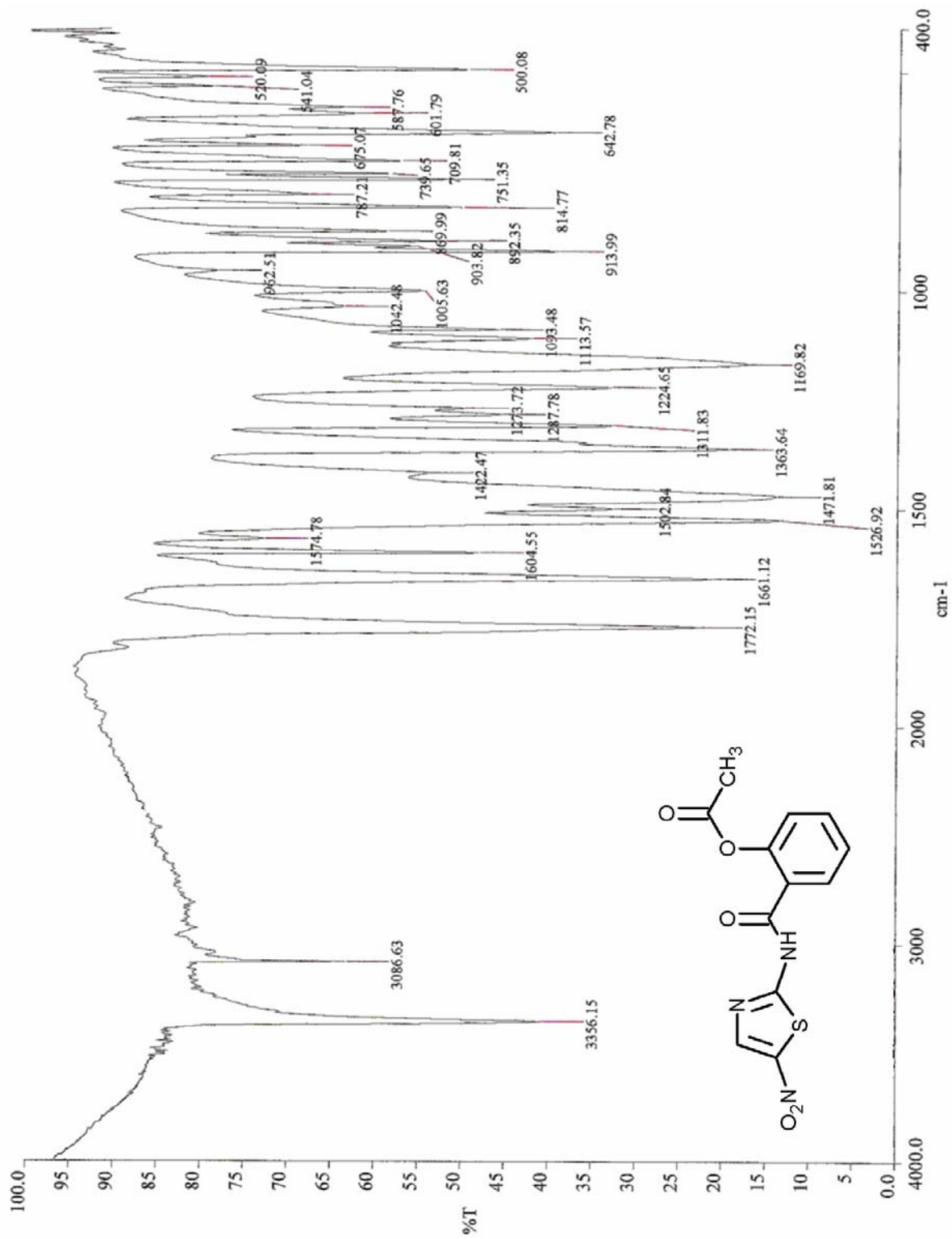
Espectro 4, IR: Pastilla (KBr) cm⁻¹: 2-[(5-nitro-1,3-tiazol-2-yl)carbamoyl]fenil acetato (4).



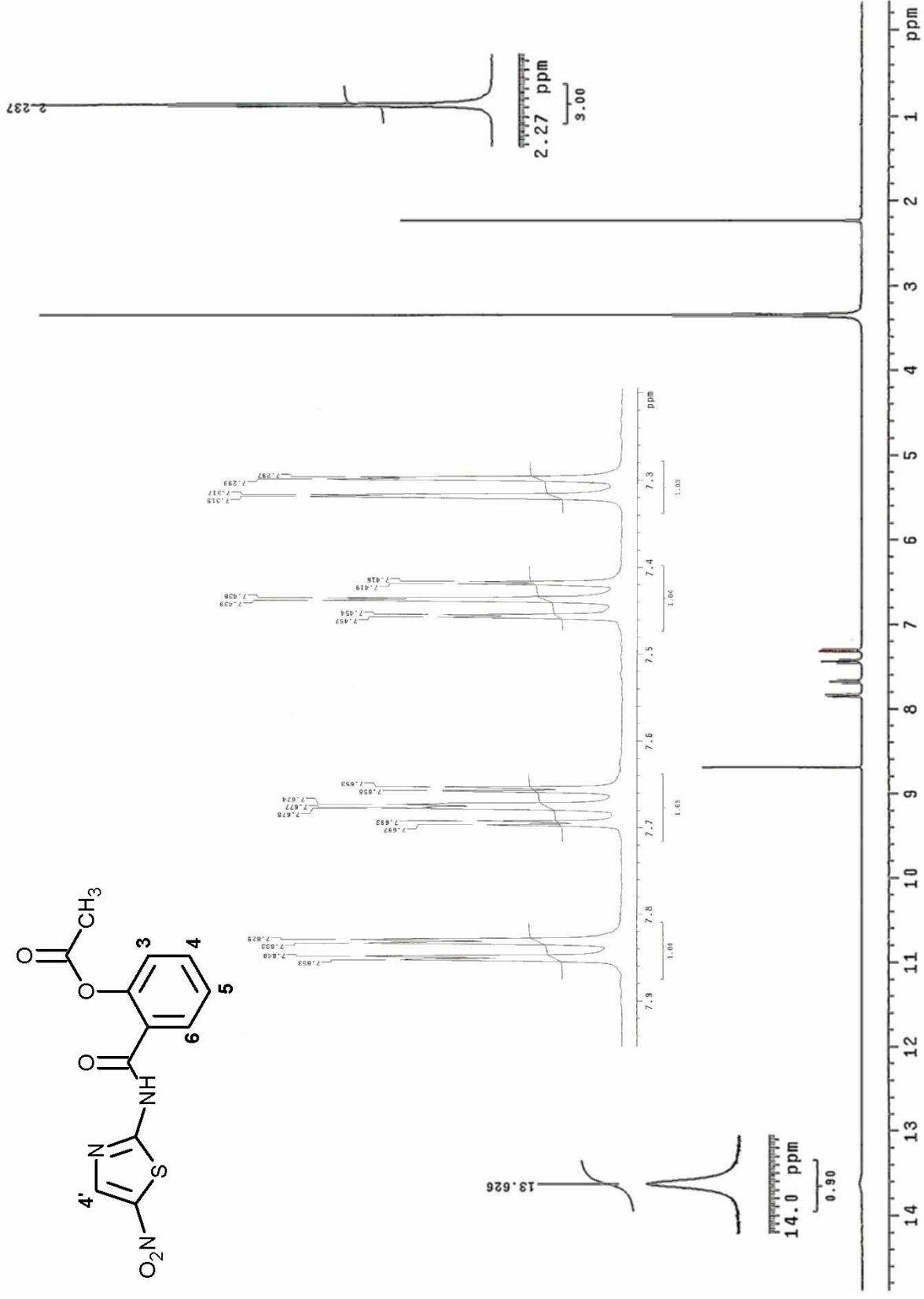
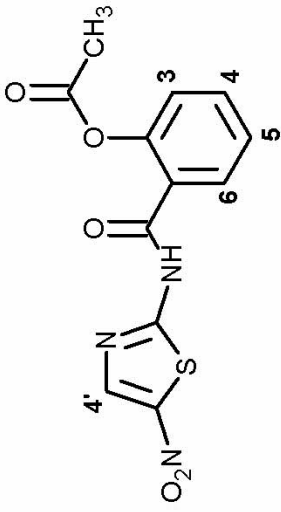
Espectro 5, RMN¹H. (TMS, DMSO- d_6) ppm: 2-[(5-nitro-1,3-tiazol-2-yl)carbamoyl]fenil acetato (4).



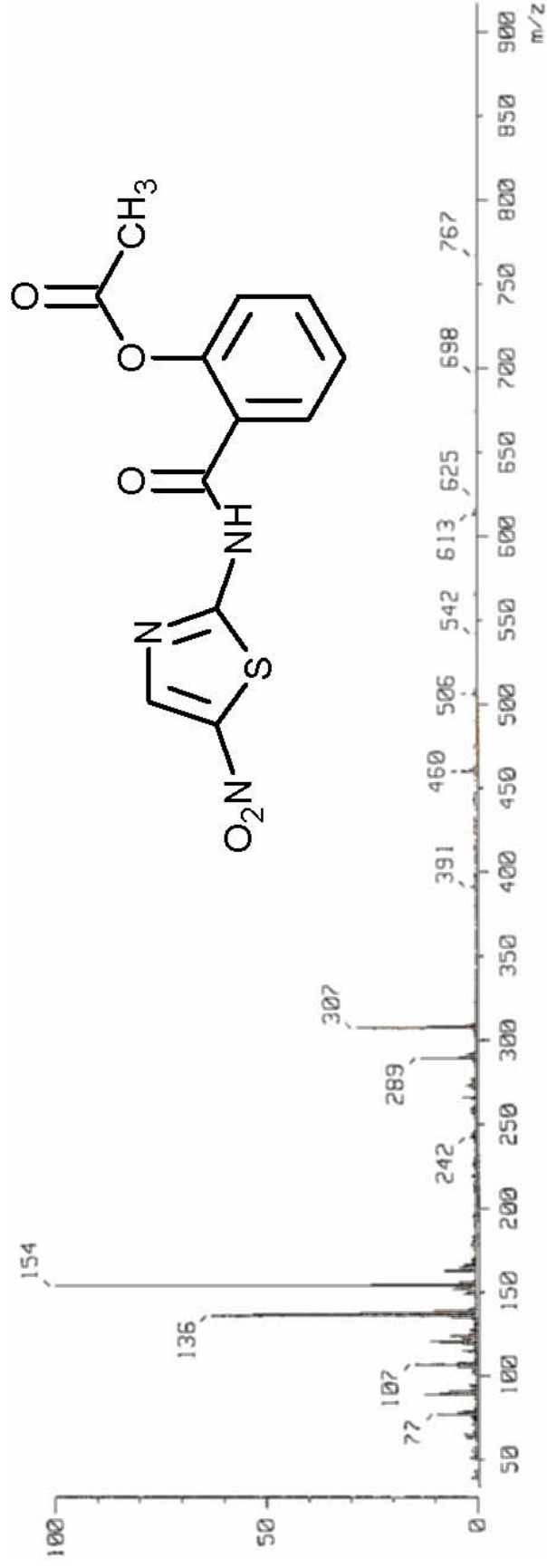
Espectro 6, EM. (FAB+1) m/z: 2-[(5-nitro-1,3-tiazol-2-yl)carbamoyl]fenil acetato (4).



Espectro 7, IR: Pastilla (KBr) cm⁻¹: Nitazoxanida Comercial.



Espectro 8, RMN¹H. (TMS, DMSO-*d*₆) ppm: Nitazoxanida Comercial.



Espectro 9, EM. (FAB+1) *m/z*: Nitazoxanida Comercial.