



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Evaluación del efecto de un nuevo derivado de bencimidazol 5-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1-*H*-bencimidazol sobre la expresión de proteínas de
Giardia intestinalis.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

LILIANA VELÁZQUEZ MÁRQUEZ

MÉXICO, D.F.

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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: **Dra. Maria Isabel Aguilar Laurents**
VOCAL: **Dr. Francisco Hernández Luis**
SECRETARIO: **Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández**
1er. SUPLENTE: **Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra**
2º SUPLENTE: **Dra. Martha Patricia Coello Coutiño**

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio “Biología del Citoesqueleto de Parásitos”
Departamento de Microbiología y Parasitología,
Edificio A, 2do piso, Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de México

ASESOR: **Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández.** _____
SUPERVISOR TÉCNICO: **Biol. Olivia Alicia Reynoso Ducoing.** _____
SUSTENTANTE: **Liliana Velázquez Márquez.** _____

UNA PULGADA A LA VEZ...

En la vida perdemos las cosas que tenemos... es parte de la vida...

Pero lo que te enseña esto, es parar... parar lo que se esta perdiendo, cuando se esta abajo en el juego de las pulgadas...

ESO ES EL FOOTBALL...

Por que en la vida como en el football...

El margen en el área es grande o pequeña...

Un paso más o un paso menos y no lo haces...

Un paso mas rápido o mas lento y no la cachas...

Por que al reunir todas esas pulgadas... esa es la diferencia entre ganar y perder...

Entre vivir y morir...

Y en este juego el que este dispuesto a morir por esa pulgada será el que la gane...

Y lo se porque yo lo hice en la vida, pelear por esa pulgada...

Por que esa es la vida...

Las cinco pulgadas que tenemos enfrente de nuestra cara...

Pero vean la cara a su compañera de al lado...

Vean les sus ojos...

Y vean que ella esta dispuesta a sacrificarse por esa pulga, por ustedes...

Ella esta dispuesta sacrificarse por esa pulgada para el equipo....

Esta dispuesta a sacrificarse por que ella sabe que tú estarás dispuesta a hacerlo también...

Ese es un equipo...

Y o sanamos como equipo ahora...

O moriremos como individuos...

Ese es el football jóvenes...

Eso es todo...

Ahora...

¿ que es lo que vas a hacer? ...

¡México, Pumas, UNIVERSIDAD!

DEDICATORIAS.

A Dios por la vida, las enseñanzas y oportunidades que me han llevado a ser.

A mi Papá mi gurú, por su apoyo incondicional y el entusiasmo que le infunde a la vida.

A mi Mamá, por sus cuidados, dedicación y empeño en que sea una mejor persona.

A mis abuelitos Carlos M. †, Carmen H., Alfonso V., Carmen G., por todo su cariño.

A todos los miembros de mi familia, por enseñarme que aun en la distancia están cerca.

A todos mis amigos que estuvieron pendientes desesperadamente por que terminara la tesis.

Por ser el motor que hizo culminar esta etapa.

AGRADECIMIENTOS.

A la UNAM, por abrirme sus puertas y enseñarme que no sólo el estudio es importante.

Al Dr. Javier Ambrosio Hernández, por el apoyo recibido durante la realización de esta tesis.

A la Bióloga Olivia Reynoso Ducoing, por todos sus consejos durante mi estancia en el laboratorio y durante la elaboración de la tesis.

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

Al CONACYT, por la beca otorgada para la realización de este trabajo, dentro del proyecto No. 43629 y a la DGAPA por el equipo, materiales y reactivos proporcionados por el proyecto No. IN216107

A la Dra. Araceli Patrón, del Departamento de Microscopía Electrónica, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

A mis compañeros de laboratorio, Kriz, Moni, Laurita, David, Yamilet, Xochitl, Rafa, Deniss Ame, Héctor, por los buenos ratos y toda la información compartida. A Don Efrén por los ratos tan agradables y esas mañanas de tamal.

A Carlos Méndez, por su ayuda y motivación durante la redacción de la tesis.

A la Facultad de Química por enseñarme que se pueden hacer 3 cosas a la vez, sin comer y dormir y disfrutarlo.

A los 9 fantásticos (como nos autonombre) Lorena, Leonardo, Diego, Diana, Violeta, Pepequique, Nessim, Pedro, por enseñarme que la levadura se puede aforar y además sirve para conocer a los amigos.

A Gaby, Juan Manuel y Mercedes porque aparte de ser mis amigos se han convertido en mis cómplices, por todo su apoyo.

A mis amigos Kike, Amalia, Rodrigo, Mariana, Alejandro, Paty, por la compañía y esos alegres momentos.

Al TOCHO donde descubrí el trabajo en equipo gracias a su filosofía y conocí a grandes amigas. Y en especial al equipo PUMAS ORO: Bistek, Canela, Chavis, Cristal, Fatimiux, Fercha, Jen, Jess, Karlita, Kika, Monse, Mila, Miriam, Sponch, Sara, Ximena, Yuvia. Les dije este año si me titulo.

A mis Coach Donkey, Moroco, Nieto, por enseñarme la disciplina del Football Americano que es más que un deporte, así como a mi Head coach Clavellina que además de técnica me enseñó el amor por mi UNIVERSIDAD.

A mis asesores Iris, Armando y Manuel, por su paciencia y perseverancia en que aprendiera Inglés.

A MK, donde conocí personas muy especiales, Bertha Romero por creer en mí antes que yo misma. Doña Margarita por su alegría de vivir. Rosy, Lau, Betty.

A Ricardo "Archi" por enseñarme que se puede ser auténtico en la vida y estar a un grado de la perfección.

A la Wendy, por soportarme ya que con tú silencio dices más que mil palabras.

Y a todos aquellos que estuvieron conmigo a lo largo de mi vida personal y académica,
por aportar a mi superación personal.

Índice

	Pág.
Introducción	1
1. Antecedentes	3
1.1. Parasitosis intestinales como problemas de salud pública a nivel mundial.	3
1.2. Giardiasis.	3
1.2.1. Morfología.	5
1.2.2. Ciclo de vida	6
1.2.3. Citoesqueleto celular.	8
1.2.4. Metabolismo.	9
1.2.5. Tratamiento	9
1.3. 5-Nitroimidazoles	10
1.3.1. Mecanismo de acción de los 5-nitroimidazoles.	10
1.4. Bencimidazoles.	12
1.4.1. Mecanismo de acción de los bencimidazoles.	13
1.5. Necesidades de desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de las parasitosis.	15
1.6. Proteómica	16
1.6.1. Definición.	16
1.6.2. Análisis proteómico.	17
1.6.3. Farmacoproteómica.	18
2. Planteamiento del problema.	21
3. Hipótesis	21
4. Objetivos	22
4.1. Objetivo general	22
4.2. Objetivos particulares	22
5. Materiales y Métodos	23
5.1. Cultivo axénico de trofozoítos de <i>Giardia intestinalis</i> .	23
5.2. Evaluación del efecto <i>in vitro</i> con MTZ y RSD-8.	23
5.3. Preparación de muestras para Microscopía Electrónica de Barrido.	23
5.4. Evaluación por Microscopía Electrónica de Barrido.	24
5.5. Obtención de proteínas.	24
5.6. Electroforesis en una dimensión.	24

5.7. Electroforesis en dos dimensiones.	25
5.8. Adquisición y análisis de geles.	25
6. Resultados.	26
6.1. Microscopía Electrónica de Barrido.	26
6.2. Separación electroforética SDS-PAGE de extractos totales de proteínas.	28
6.3. Electroforesis en una dimensión.	35
6.4. Electroforesis en dos dimensiones.	37
7. Discusión de resultados.	41
8. Conclusiones	49
Perspectivas	50
Referencias hemerobibliográficas	51
Apéndice	54
Técnica 1. Cuantificación de proteínas por el kit Protein Assay <i>DC</i> (Bio-Rad).	54
Técnica 2. Electroforesis unidimensional.	55
Técnica 3. Electroforesis bidimensional.	57
Técnica 4. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.	59

Índice de figuras.

Figura 1. Incidencia de giardiasis por edad.	4
Figura 2. Trofozoíto de <i>G. intestinalis</i> .	6
Figura 3. Ciclo de vida de <i>G. intestinalis</i>	7
Figura 4. Esquema de una parte del disco ventral de <i>G. intestinalis</i> .	8
Figura 5. Estructuras de fármacos utilizados en el tratamiento de <i>G. intestinalis</i> .	10
Figura 6. Estructuras de agentes antiprotozoarios 5-nitroimidazoles empleados en la terapéutica.	10
Figura 7. Mecanismo de acción del metronidazol.	11
Figura 8. Estructuras de agentes antiprotozoarios dencimidazólicos empleados en la terapéutica.	12
Figura 9. Microtúbulos típicos.	14
Figura 10. Desarrollo de nuevos fármacos.	16
Figura 11. Diagrama del estudio proteómico comparativo de muestras biológicas.	19
Figura 12. Observación mediante MEB de trofozoítos de <i>G. intestinalis</i> .	27
Figura 13. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas totales de <i>G. intestinalis</i> tratadas con MTZ y RSD-8.	30
Figura 14. Evaluación densitométrica de patrones electroforéticos de proteínas de <i>G. intestinalis</i> incubadas con MTZ.	31
Figura 15. Evaluación densitométrica de patrones electroforéticos de proteínas de <i>G. intestinalis</i> incubadas con RSD-8.	32
Figura 16. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de <i>G. intestinalis</i> .	33
Figura 17. Evaluación densitométrica del efecto de agentes reductores en la separación electroforética de muestras de parásitos.	33
Figura 18. Comparación de la evaluación densitométrica de proteínas de <i>G. intestinalis</i> incubados a 24 y 48 h.	34
Figura 19. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de <i>G. intestinalis</i> bajo tratamientos.	35
Figura 20. Comparación por densitometría del análisis electroforético de proteínas de <i>G. intestinalis</i> .	36
Figura 21. Mapas proteómicos de proteínas de <i>G. intestinalis</i> .	38
Figura 22. Mapas proteómicos de proteínas de <i>G. intestinalis</i> tratadas con 3 µg/mL MTZ y RSD-8 respectivamente.	39

Índice de tablas

Tabla 1. Actividad biológica <i>in vitro</i> (CI ₅₀ µM) contra <i>G. intestinalis</i> , de algunos compuestos derivados del bencimidazol.	13
Tabla 2. Análisis comparativo de proteínas de <i>G. intestinalis</i> control, y tratadas con MTZ y RSD-8.	37

Abreviaturas

2D	Doble dimensión
ABZ	Albendazol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BZ's	Bencimidazoles
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
Da	Daltones
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
Fd	Ferredoxina
IAA	Iodoacetamida
IPG	Tiras de gradiente inmovilizado de pH*
KDa	Kilodaltones
MBZ	Mebendazol
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
MTZ	Metronidazol
NADH	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido
NADPH ⁺	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido Fosfato
PFOR	Piruvato ferredoxin-oxidoreductasa
pI	Punto Isoeléctrico
PM	Peso Molecular
PSA	Persulfato de Amonio
Rf	Frente relativo*
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno*
SDS	Dodecil sulfato de sodio*
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio*
SOABZ	Sulfóxido de Albendazol
TEMED	N, N, N, N-Tetrametiletilendiamina.
β-ME	2-Mercapto Etanol

*Nota: Abreviaturas por sus siglas en ingles

Introducción.

La Organización Mundial de la Salud señala que la globalización parece haber causado cambios profundos, en las condiciones ecológicas, biológicas y sociales que favorecen las enfermedades infecciosas y las mantienen como problema de salud pública.

Las enfermedades infecciosas de origen parasitario pueden presentarse en todo el mundo, y en particular en los países en vías de desarrollo, ya que estas se asocian al comportamiento humano, prácticas de agricultura, animales domésticos y condiciones socioeconómicas complejas. En México a pesar del mejoramiento de las medidas sanitarias, aún se notifican infecciones causadas por helmintos y protozoarios. Entre las infecciones intestinales más frecuentes y sintomáticas se encuentran las producidas por *Giardia intestinalis*; el cual afecta prácticamente a todos los organismos vertebrados.

La quimioterapia sigue siendo el método más eficaz y económico para controlar casi todas las parasitosis. En el caso de infecciones causadas por protozoarios anaerobios, el metronidazol (derivado del 5-nitroimidazol) es el fármaco de elección, aunque otros fármacos derivados de bencimidazol, como el albendazol y mebendazol, también son utilizados.

Se ha demostrado que aún cuando el metronidazol es eficaz a dosis terapéuticas suele presentar efectos adversos y, en muchos casos, ha ocasionado resistencia de los parásitos, por interrupción del tratamiento o por el uso de dosis inadecuadas. Estas causas han orillado a la búsqueda de nuevos o mejores productos, para lo cual la observación clínica se sigue manteniendo como factor clave en la búsqueda de nuevos fármacos. Sin embargo, campos como la biología molecular, la visualización de la estructura tridimensional de las proteínas, la química farmacéutica, la farmacología molecular y la proteómica están mostrando su constitución como nuevas vías que permitirán conocer y descubrir nuevos blancos farmacológicos. La proteómica se ha desarrollado como una disciplina, que pretende dar una visión de conjunto que se aproxime a lo que sucede realmente *in vivo*; actualmente esta dirigida a identificar nuevas proteínas en relación con su función, revelar como está controlada su expresión dentro de redes de regulación o en respuesta a un estímulo dado como fármacos. De ahí que el diseño de fármacos, ya se ajusta a una forma racional y dirigida, para la intervención en procesos bien identificados y en los que se conocen las enfermedades.

En el presente trabajo de tesis se ha utilizado el análisis proteómico como una estrategia, para establecer si las proteínas de los parásitos resultan afectadas, en condiciones *in vitro*, frente al metronidazol (MTZ) y un nuevo derivado bencimidazólico nombrado 5-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1-*H*-bencimidazol (RSD-8). Así como hacer una correlación del efecto de los compuestos, con la observación de los parásitos a nivel ultraestructural. Según los resultados obtenidos, estas estrategias experimentales podrían ser el punto de partida en la búsqueda de proteínas blanco, lo cual permitirá sintetizar compuestos selectivos y eficaces, con el fin de mejorar el diseño la eficacia antiparasitaria de los nuevos compuestos.

1. Antecedentes

1.1. Parasitosis intestinales como problemas de salud pública a nivel mundial.

Las infecciones gastrointestinales están consideradas entre las enfermedades más frecuentes a nivel mundial y son producidas por una variedad de agentes virales, parásitos, hongos y bacterias, son la principal causa de muerte en la primera infancia¹. Las infecciones por helmintos y protozoos, están entre las infecciones más comunes alrededor del mundo. La Organización Mundial de la Salud ha estimado que cerca de 3.5 billones de personas están infectadas.² La magnitud de estas parasitosis es tan grande que en la actualidad representa el grupo más importante de infecciones sobre el planeta. Aproximadamente, el 10% de las diarreas en el ser humano son provocadas por infecciones producidas por parásitos; en el ser humano constituyen un importante problema sanitario, cuyas manifestaciones clínicas varían desde la infección asintomática a casos graves, que en raras ocasiones causan la muerte. Las infestaciones por protozoos, se producen por parásitos como: *Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum* y *Blastocystis hominis*. Los helmintos, son la siguiente causa de infecciones con casos frecuentes por *Oxiuros*, *Ascaris*, *Hymenolepis*, *Taenia* y *Echinococcus*.³

Los protozoos tienen importancia en la industria del agua, pues ésta es un vehículo para su transmisión. Entre los protozoarios patógenos que afectan la calidad del agua para el consumo humano, recreación e irrigación de vegetales frescos de consumo directo se ubican *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium parvum*. Estos patógenos pueden ser importantes causas de diarreas o incluso causar la muerte.⁴

1.2. Giardiasis.

Entre las infecciones intestinales más frecuentes se encuentra la giardiasis ocasionada por el protozoario *G. intestinalis* (sin. *G. lamblia*, *G. duodenalis*).^{5,6} La giardiasis se considera una infección con o sin manifestaciones clínicas características. La presentación sintomática aguda tiene un periodo de incubación de una a tres semanas después de la ingestión de quistes y presenta típicamente diarrea, náuseas, flatulencia, esteatorrea (cantidades excesivas de grasa en heces) y calambres abdominales. Con menor frecuencia hay inflamación abdominal, pérdida de peso y anorexia. La fase crónica puede ser de años, hay mala absorción de grasas, de vitaminas A y B₁₂, y en niños puede presentarse un retraso en el crecimiento.¹ La presencia asintomática, que predomina a nivel mundial involucra un portador sano con algún grado de

mala absorción intestinal, pocas veces detectada, y además actúan como diseminadores de quistes.⁵ En inmunodeprimidos la enfermedad es siempre sintomática y más grave con diarreas prolongadas y síndromes de mala absorción.³

Debido a las diferencias en las condiciones sanitarias, de los países desarrollados, su prevalencia es mayor que la encontrada en los países avanzados. Grandes epidemias han ocurrido por contaminación fecal de alimentos y reservorios de agua. Este parásito constituye un importante problema de salud pública global, incluso, en los EUA, se considera a *Giardia* un posible agente de bioterrorismo por su capacidad de ser transmitido por el agua, por su potencial de ser genéticamente manipulado, y por la posibilidad de reproducir totalmente su ciclo vital en el laboratorio.⁷

La Organización Mundial de la Salud estima que en el mundo hay 280 millones de infecciones anuales por *G. intestinalis*. En los países desarrollados su prevalencia varía de 2 a 5%; mientras que en los países en vías de desarrollo oscila entre 20 y 69%. En México se registra una prevalencia de 7.4 a 68.5%. La incidencia varía significativamente según la localidad.⁸ La giardiasis es una parasitosis re-emergente por su implicación en epidemias de diarrea en guarderías y potencialmente zoonótica en animales domésticos como perros, gatos y ganado, con reservorios silvestres como castores, los demonios de tasmania o los gorilas.^{5,6} Se encuentra en zonas tropicales y subtropicales, donde afecta hasta el 30% de los adultos; su distribución es endémica a nivel mundial.^{1,3} Los niveles de infección son más elevados en la población pediátrica, donde se puede presentar principalmente desde la lactancia, pero tiene sus picos máximos de incidencia en las etapas preescolar y escolar, y las tasas se abaten conforme avanza la edad del individuo como se observa en la Figura 1.

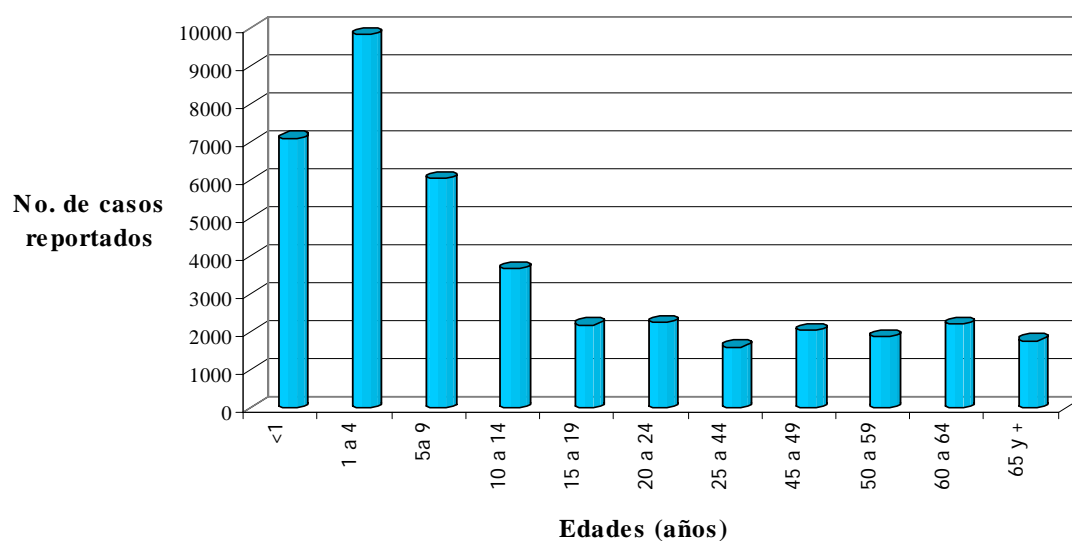


Figura 1. Incidencia de giardiasis por edad. (Población general, año 2006).⁹

Fuente: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología/SSA

En México, el impacto de la giardiasis es muy alto, resulta como consecuencia de hábitos higiénicos y alimentarios deficientes, condiciones sanitarias malas y fecalismo al aire libre. El parasitismo intestinal en los menores de dos años, es el reflejo de las condiciones materiales, el acceso a servicios sanitarios y la educación de la madre. Los estudios en niños menores de 2 años, han estimado que la lactancia materna disminuye los episodios sintomáticos de giardiasis debido a que la leche materna contiene anticuerpos en contra de *G. intestinalis*, mientras que, los estudios de cohorte, muestran que el pico de infección coincide con el inicio de la alimentación complementaria.¹⁰

1.2.1 Morfología.

Giardia intestinalis presenta dos fases morfológicas: el trofozoíto, cuya forma trófica o vegetativa produce las manifestaciones clínicas, y el quiste, la estructura de resistencia y transmisión. El quiste tiene forma ovoide mide de 8 a 12 μm de longitud y de 7 a 10 μm de ancho. El quiste es poco resistente a la desecación o al calor, pero se mantienen en almacenes de agua potable fría almacenada, (tinacos o cisternas). Son resistentes a los métodos habituales de cloración del agua, aunque se eliminan mediante ebullición y filtración.^{1,6,11,12}

El trofozoíto mide 12 a 15 μm de longitud, 5 a 9 μm de ancho y de 1 a 2 μm de espesor; es piriforme con simetría bilateral, una región dorsal convexa. Su región ventral es cóncava y posee un disco de succión o adhesivo de gran tamaño, nombrado disco ventral, el cual funciona de manera semejante a una ventosa, tiene una profundidad máxima de 0.4 μm , a partir de la cual se cierra hacia los extremos formando una cresta lateral, que es la única zona del disco que realmente tiene una interacción física con la célula blanco o las superficies adherentes,⁵ por lo que parece ser el órgano más importante para el enlace con la mucosa intestinal del hospedero. Al nivel del disco los trofozoítos tienen dos núcleos idénticos y ovalados, al parecer con la misma cantidad de ADN, activos desde el punto de vista de la transcripción,¹ no se le han encontrado nucleolos y presentan una enorme masa de cromatina central que semeja perfectamente unos ojos, cerca de la línea media y anteroventral de los núcleos, se encuentran los cuerpos basales que semejan la boca, lo cual produce la impresión de una cara (Figura 2). Intracelularmente forma un par de estructuras llamados cuerpos medios, quienes tienen la forma de uña de martillo; característica morfológica que se emplea para diferenciar especies de *Giardia*. También posee cuatro pares de flagelos: anterolaterales, posterolaterales, ventrales y caudales, los cuales son importantes para su desplazamiento. En

su citoplasma se reconocen vacuolas lisosómicas, ribosomas y depósitos de glucógeno. Otro organelo, el aparato de Golgi, se ha encontrado solo en trofozoítos que están en proceso de enquistamiento.^{1,12} Durante mucho tiempo se considero carente de mitocondrias, sin embargo, actualmente se han identificado estructuras subcelulares llamadas mitosomas, las cuales contienen proteínas encargadas de la biosíntesis de enzimas con sitios catalíticos [Fe-S], que son importantes en el metabolismo energético de organismos amitocondriales (p.e. PFOR, Fd, hidrogenasa). Como es el caso de la desulfurasa de cisteína (IscS), la cual filogenéticamente se ubica dentro de las mitocondrias.^{13,14,15}

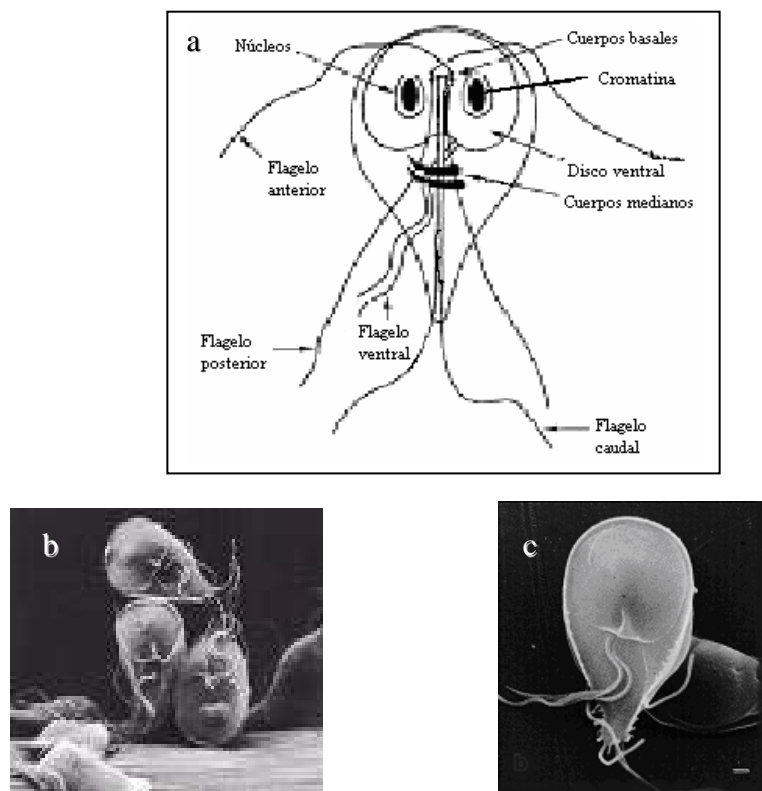


Figura. 2. Trofozoíto de *G. intestinalis*. Esquema de trofozoíto de *G. intestinalis* indicando su morfología (a). Micrografías observadas por MEB, vista ventral del parásito (c) y trofozoítos agrupados (b).^{16,17}

1.2.2 Ciclo de vida

El quiste constituye la fase inféctante cuando es ingerido por un huésped, la exposición al ácido gástrico activa el desenquistamiento y emerge el parásito como trofozoíto en el intestino delgado, en donde se desplaza activamente con los flagelos. Se localizan en el borde de las microvellosidades epiteliales del yeyuno-medio.¹² Cuando están en contacto con la mucosa se adhieren firmemente mediante su disco ventral y dejan lesiones circulares en la

pared; se ha postulado que esta adherencia irrita el intestino e induce diarrea.¹ Una vez que se fija al intestino se divide asexualmente por fisión binaria y ahí vive hasta que es arrastrado por el agua y los movimientos peristálticos hacia el colón, donde las sales biliares (glicolato), los ácidos grasos (ácido mirístico a un pH ligeramente alcalino) y un ambiente pobre en colesterol promueven la formación de quistes, salen con las heces al medio externo (Figura 3). Este enquistamiento es esencial para que el parásito pueda sobrevivir fuera del intestino del hospedero, ya que los trofozoítos son sumamente sensibles a los cambios de temperatura, humedad y a la presencia de agentes químicos, la sobrevivencia del quiste en estas condiciones depende de la temperatura, a 10°C pueden sobrevivir 77 días y a 20°C disminuye su viabilidad hasta sólo 3 días.^{4,7}

La infección se puede adquirir con la ingestión de por lo menos 10 quistes. El periodo de incubación es de 12 a 19 días, la duración de este periodo está relacionada con el tamaño del inóculo. La duración de la infección puede oscilar entre algunas semanas y/o varios meses.^{1,4,6}

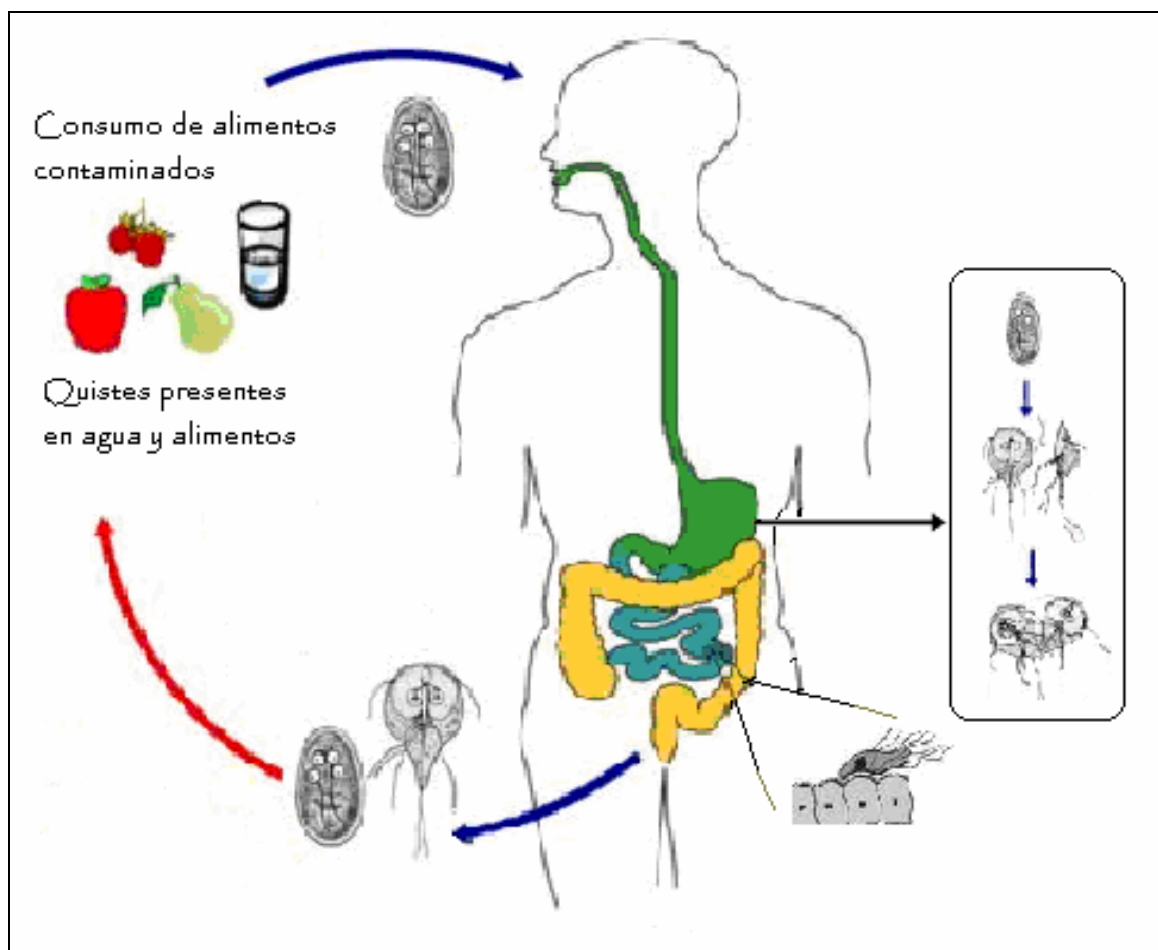


Figura 3. Ciclo de vida de *G. intestinalis*
www.cve.saude.sp.gov.br/hm/hidrica/Giardiose.htm

1.2.3 Citoesqueleto celular.

Varias de las estructuras del citoesqueleto de *Giardia* están constituidas por microtúbulos: el disco ventral, flagelos, cuerpo medio y funis. El disco contiene proteínas contráctiles actina, α -actina, miosina y tropomiosina. Este disco está integrado ultraestructuralmente, por microtúbulos y microcintas que contienen giardina y tubulina. Por localización inmunológica con anticuerpos anti-giardina y anti-tubulina se ha encontrado que las giardinas están situadas a lo largo de los bordes interiores y exteriores de las microcintas, mientras que la tubulina está presente solamente en los microtúbulos entre las microcintas y la membrana plasmática (Figura 4). Además, una región del centro de las microcintas contiene menos giardina que en los bordes, y las giardinas al parecer, están ausentes del microtúbulo y de los puentes.¹⁸

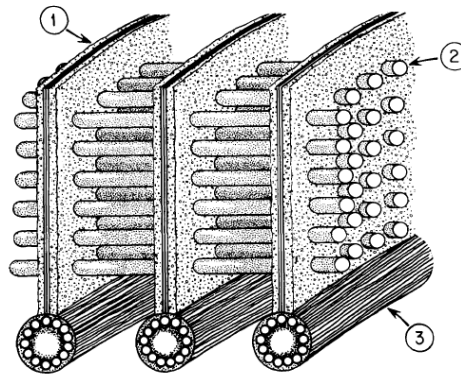


Figura 4. Esquema de una parte del disco ventral de *G. intestinalis*. Se señalan tres estructuras básicas: (1) microcintas, (2) puentes de cruce o enlace, y (3) microtúbulos.¹⁸

Las giardinas son las proteínas principales de las microcintas del disco, la tubulina está presente en el disco y los microtúbulos flagelares. Probablemente la α -giardina está implicada en la integridad estructural del disco y las interacciones con otras proteínas en las microcintas o los puentes de cruce.¹⁸

Los cuatro pares de flagelos se originan de un cuerpo basal, el centro del flagelo llamado axonema contiene un conjunto de microtúbulos que se ubica en sentido longitudinal por todo el organelo. Intracelularmente *Giardia* forma un par de estructuras llamadas cuerpos medianos, se localizan en la línea media dorsal a los flagelos caudales y están formados por un sistema irregular de microtúbulos, que le confiere soporte al trofozoíto.¹⁹ Los funis son estructuras compuestas de hojas de microtúbulos que siguen los axonemas del flagelo caudal, los cuales se anclan a barras densas que funcionan paralelas a los flagelos posterolaterales.²⁰

1.2.4. Metabolismo.

G. intestinalis es un microorganismo microaerófilo, cuyo metabolismo es glicolítico y fermentativo, emplea como fuente de carbono la glucosa, sin embargo, a bajas concentraciones de esta produce como metabolitos: etanol, acetato y dióxido de carbono. Respecto a la formación de etanol, este se produce a partir de la enzima alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH^+ . Uno de los principales complejos enzimáticos de su metabolismo es la PFOR acoplada a la Fd I, NADH oxidoreductasa y NADH oxidasa. La PFOR cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato y durante este proceso se genera Acetil coenzima A, coenzima A reducida, CO_2 y agua.^{8,12} No sintetiza aminoácidos ni nucleótidos cuando los necesita los adquiere del medio. Para la producción de energía, además de la glucosa, utiliza aspartato, alanina y arginina. La cisteína la toma del medio para proteger su membrana de los radicales libres. Además, compete con el hospedero por los micronutrientes como el zinc y el hierro, entre otros.¹² El trofozoíto posee en su superficie e interior numerosos grupos reductores tipo tiol, especialmente cisteína y proteinasas dependientes de cisteína, los cuales le otorgan una protección parcial ante la presencia de O_2 . Algunos estudios han demostrado múltiple actividad de proteasas en el parásito. Las enzimas que parecen ser las más abundantes de protozoarios son proteasas de cisteína, predominantes en lisados de trofozoítos de *G. intestinalis*.²¹

1.2.5. Tratamiento.

El tratamiento que se prescribe en pacientes con giardiasis aguda o crónica, se basa en el uso de fármacos principalmente sintéticos, dirigidos hacia la fase de trofozoítos. Sin embargo, el principal recurso de control de los efectos de esta parasitosis, posee principios activos que no son altamente eficaces, pueden presentar un gran número de efectos secundarios y ya se han presentado cepas de *Giardia* resistentes a los mismos. Además, es frecuente la re-infección luego del tratamiento, debido a que los individuos no generan mecanismos de defensa eficaces para eliminar el parásito.⁷

Los fármacos administrados para el tratamiento de la giardiasis son derivados de la naranja de acridina, nitroimidazoles, nitrofuranos, nitrotiazoles y bencimidazoles. Los fármacos empleados con más frecuencia son: tinidazol, furazolidona, nitaxozanida, quinacrina, albendazol, y metronidazol (Figura 5). Aunque la terapia con estos fármacos es usualmente efectiva, su uso tiene limitaciones, porque todos ellos exhiben efectos indeseables,

como náuseas, vómito, diarrea, molestias abdominales, anorexia entre otros. En algunas ocasiones se presentan fallas en el tratamiento, requiriéndose repetir dicha terapia.⁸

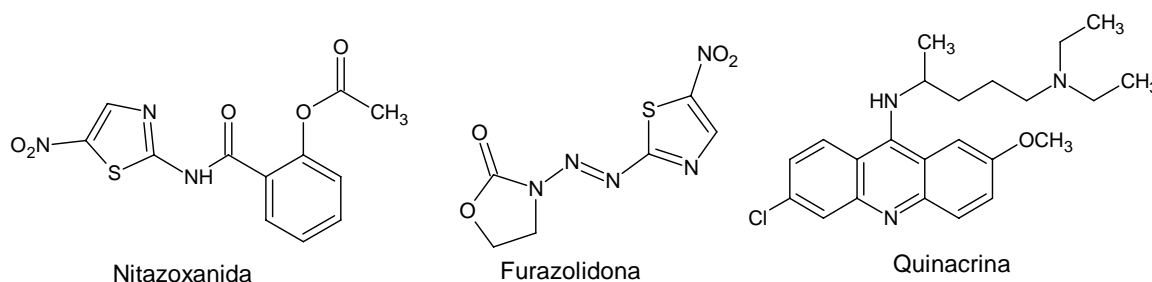


Figura 5. Estructuras de fármacos utilizados en el tratamiento de *G. intestinalis*.

1.3. 5-Nitroimidazoles

Los 5-nitroimidazoles se utilizan comúnmente en el tratamiento de infecciones causadas por una amplia gama de bacterias anaerobias y protozoarios. Poseen una estructura heterocíclica consistente de un núcleo de imidazol con un grupo nitro en posición 5. Los 5-nitroimidazoles más usados son el metronidazol, y tinidazol, recientemente se han empleado otros agentes como el ornidazol y nimorazol (Figura 6).²²

La actividad antiprotozoaria del MTZ fue reconocida a finales de los años 50 en el tratamiento contra *T. vaginalis*. Mas adelante, se encontró que era eficaz contra otros protozoarios anaerobios, tales como *E. histolytica* y *G. intestinalis*.²³

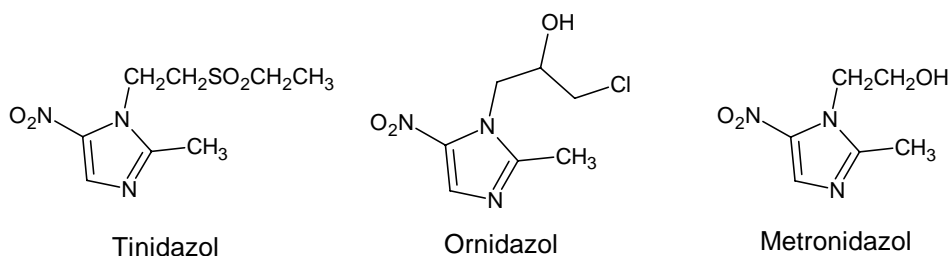


Figura 6. Estructuras de agentes antiprotozoarios 5-nitroimidazoles empleados en la terapéutica.

1.3.1 Mecanismo de acción de los 5-nitroimidazoles.

El mecanismo de acción del MTZ se basa en las características bioquímicas de los organismos anaerobios, de las que carecen las células aerobias de los anfitriones eucarióticos, lo que refleja su citotoxicidad selectiva, haciéndolo un fármaco atractivo para la terapia antiparasitaria.²³ El MTZ puede ser considerado como un profármaco, porque necesita activación metabólica por parte de microorganismos sensibles como son los parásitos

anaerobios. Una vez que el MTZ ha difundido al interior de las células, el grupo nitro de los compuestos nitroimidazólicos es activado dentro de los mitosomas (organelos en los que se lleva a cabo el transporte de electrones), la PFOR cataliza la descarboxilación del piruvato a Acetil-CoA y CO_2 , de modo paralelo, reduce la Fd, enzima captadora de electrones en vía normal. El MTZ reemplaza a los protones como captadores de electrones y reduce el grupo 5-nitro formándose un radical nitroanión libre, tóxico para el parásito. Este radical rompe los puentes disulfuro y causa la ruptura de las cadenas de ADN dando lugar a la pérdida de la estructura, lo que ocasiona daños celulares múltiples y ejerce así un efecto letal sobre el parásito (Figura 7).^{24,25}

Uno de los problemas que se han encontrado con el uso del MTZ es su posible actividad carcinogénica, debido a sus características mutágenas en bacterias, así como a la alta incidencia de tumores en animales tratados a largo plazo; sin embargo, estudios recientes en pacientes que reciben terapia convencional de corto curso, han demostrado que el riesgo de cáncer es insignificante, esto no garantiza que no exista riesgo en casos que se requiera prolongar la terapia repetida. Otro problema por el uso del MTZ, es la resistencia de *G. intestinalis* hacia este compuesto nitroimidazólico, ello se ha asociado con una disminución en la actividad de las enzimas PFOR y Fd I.²³

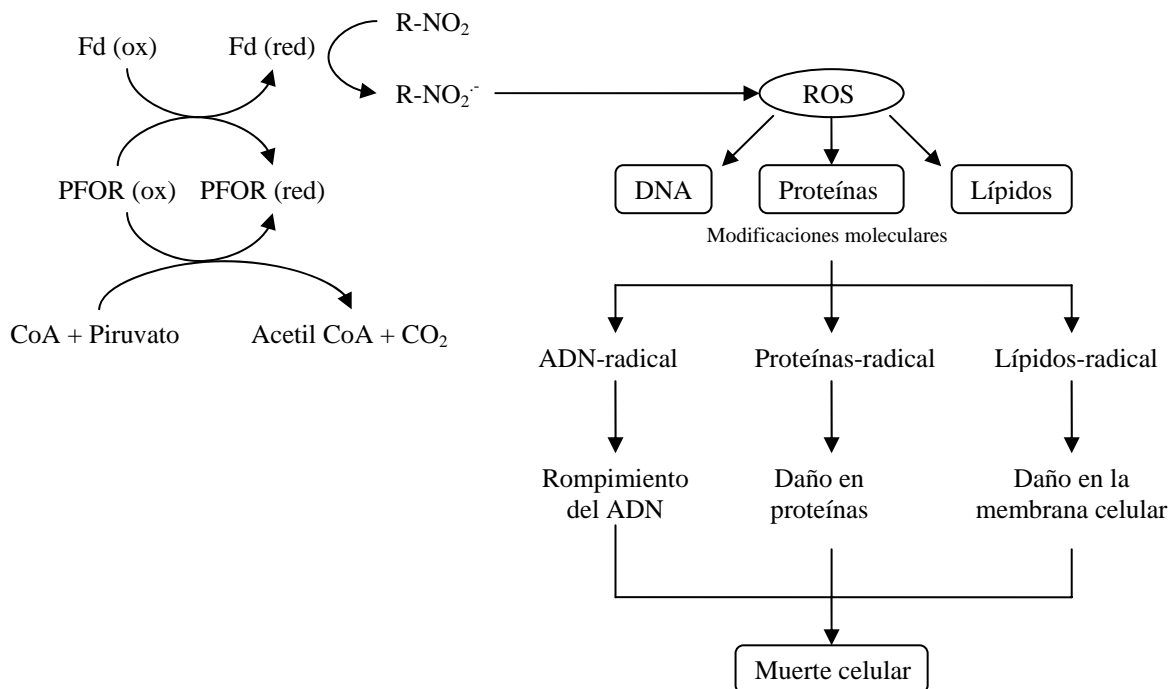


Figura 7. Mecanismo de acción del metronidazol (R-NO_2 representa al MTZ, $\text{R-NO}_2^{\cdot-}$ representa al radical nitroanión tóxico).^{23,24}

1.4. Bencimidazoles.

Desde 1961, debido al descubrimiento del tiabendazol, el cual poseía una potente actividad contra helmintos gastrointestinales se hizo evidente el potencial terapéutico de los compuestos bencimidazólicos. Sin embargo, este compuesto presentaba una vida media corta, ya que se oxidaba rápidamente a un metabolito inactivo, lo cual limitó su eficacia clínica. Tal descubrimiento estimuló el diseño y síntesis de otros BZ's para tratar de optimizarlos.²⁶ Los BZ's que han sido utilizados ampliamente contra parásitos intestinales en el humano son ABZ y MBZ (Figura 8).²² El ABZ es tan efectivo como el MTZ para el tratamiento de la giardiasis.

A pesar del uso generalizado de los BZ's por su amplio espectro antiparasitario, tienen pobre absorción intestinal, baja toxicidad y su eficacia se ve limitada por su baja solubilidad en agua, por lo que sólo se les emplea en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. También se les ha utilizado en el tratamiento de infecciones sistémicas, pero se requieren altas dosis y largos tratamientos.

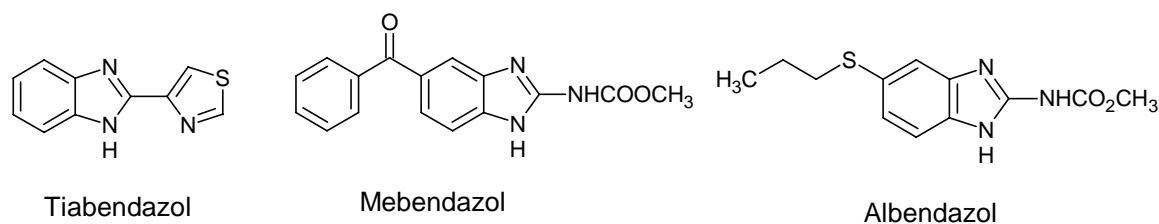
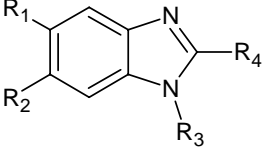


Figura 8. Estructuras de agentes antiprotozoarios bencimidazólicos empleados en la terapéutica.

Se ha demostrado que los compuestos bencimidazólicos 2-sustituídos, halogenados en el anillo bencenoide, dan como resultado derivados con un alto índice de actividad contra protozoarios. De igual forma, la introducción de un grupo metilo en posición 1 mejoró la actividad antiprotozoaria con respecto a los análogos 1H-bencimidazólicos.^{27,28}

Los estudios realizados en la presente tesis están basados en ampliar y evaluar el desarrollo de nuevos derivados bencimidazólicos, los cuales han sido diseñados a partir de estudios de relación estructura-actividad. Estos compuestos fueron sintetizados por el grupo de investigación en colaboración de la Facultad de Química, UNAM. En la Tabla 1 están algunos de los compuestos sintetizados, así como los resultados obtenidos al evaluar su actividad biológica *in vitro* contra *G. intestinalis* determinada por la inhibición de crecimiento

(CI_{50} μ M) de los parásitos. Como se observa en la tabla el compuesto RSD-8 resultó ser el más activo contra *Giardia*, en comparación con el MTZ y el ABZ. De ahí que se eligió este nuevo derivado bencimidazólico como objeto de estudio para evaluar su efecto sobre la expresión de proteínas de *Giardia*.^{29,30}

Tabla 1. Actividad biológica <i>in vitro</i> (CI_{50} μ M) contra <i>G. intestinalis</i> , de algunos compuestos derivados del bencimidazol. ^{29,30}					
Compuesto	Sustituyente				CI_{50} (μ M) <i>G. intestinalis</i>
		R ₁	R ₂	R ₃	
RSD-7	Cl	H	CH ₃	SH	0.045
RSD-8	Cl	H	CH ₃	SCH ₃	0.028
JVG-9	Cl	H	H	SH	0.081
JVG-15	Cl	Cl	H	SH	0.078
G2	Cl	Cl	H	CF ₃	0.078
G6	Cl	H	CH ₃	CF ₃	0.042
ABZ					0.037
MTZ					1.228

1.4.1 Mecanismo de acción de los bencimidazoles.

Se ha descubierto que los BZ's ocasionan muchos cambios bioquímicos en parásitos sensibles, por ejemplo, la inhibición de la fumarato reductasa de las mitocondrias, se considera como la inducción de un corto circuito en el proceso energético de los protozoarios, lo que provoca su parálisis, ya que esta enzima es única en los parásitos, lo que la hace un excelente blanco para quimioterapia. Otras modificaciones debidas a los BZ's, son la disminución del transporte de glucosa, la síntesis de ATP, la descarga de protones transmembrana, y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. A pesar de los efectos mencionados, los estudios indican que el principal mecanismo de los BZ's es la inhibición de la polimerización de microtúbulos por su unión a la β -tubulina.²²

La importancia de los microtúbulos se debe a que son componentes importantes de células eucarióticas, involucrados en procesos fisiológicos que se basan en su capacidad para polimerizarse y despolimerizarse, como es la formación del huso acromático en la división celular, transporte intracelular, secreción celular, parte del mantenimiento de la forma celular y absorción de nutrientes.³¹

Los microtúbulos son estructuras tubulares huecas, su pared esta formada por proteínas globulares dispuestas en hileras longitudinales, conocidas como protofilamentos. Cada uno de ellos se ensambla a partir de bloques diméricos de construcción consistentes en una subunidad tubulina α y β . Los dímeros de tubulina se organizan en un patrón lineal a lo largo de cada protofilamento, como se muestra en la figura 9. Estas estructuras existen en equilibrio dinámico de polimerización/despolimerización, el cual se puede alterar, *in vivo* e *in vitro*, por las sustancias exógenas conocidas como inhibidores de microtúbulos, estos ejercen su acción uniéndose con el microtúbulo lo que impide el ensamblaje de nuevos dímeros, mientras que la despolimerización continua en el extremo opuesto (fig. 9).^{22, 26, 31}

La causa de que los BZ's sean específicos en su acción contra tubulina de parásitos, podría ser explicada por lo que sucede en nemátodos, a pesar de la cerrada secuencia homóloga, la β -tubulina de los mamíferos y la de los nemátodos son diferentes en su respuesta a los inhibidores de la tubulina, la de estos últimos se une a los BZ's más fuertemente que la de los mamíferos, de ahí su toxicidad selectiva. La unión del BZ a la tubulina del nemátodo altera el equilibrio tubulina/microtúbulos y causa su despolimerización. Cuando la alta afinidad por la tubulina se pierde, aparece la resistencia.³²

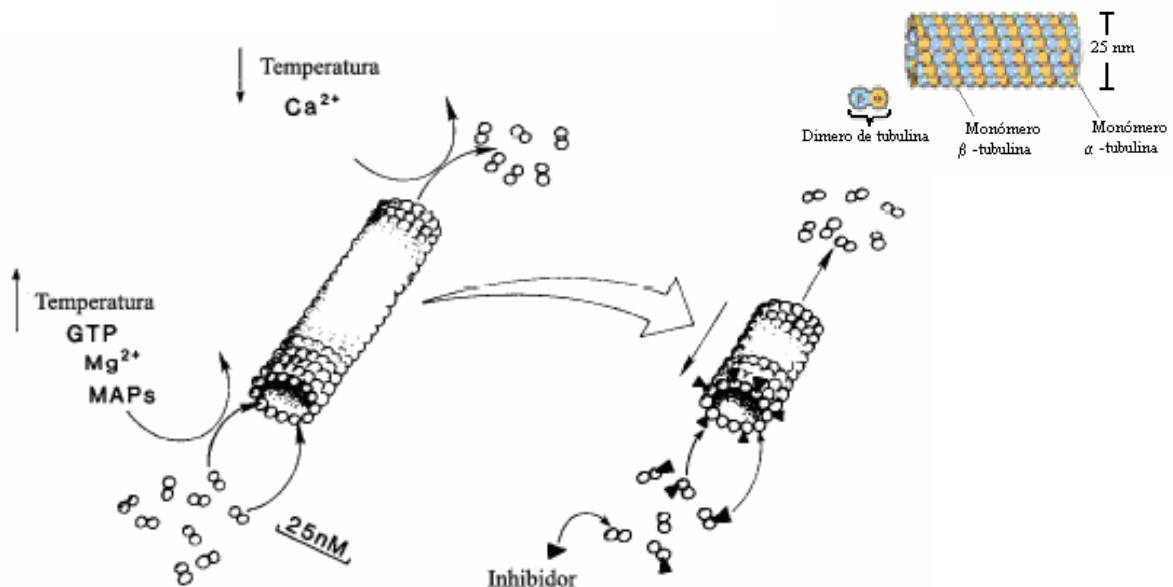


Figura 9. Microtúbulos típicos adquieren un equilibrio dinámico con tubulina, controlado por concentraciones endógenas de cofactores tales como GTP, Mg^{2+} , proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), Ca^{2+} y calmodulina. La regulación *in vitro* se da por el aumento de la temperatura, lo que promueve la polimerización, mientras que su disminución induce la despolimerización. La adición de inhibidores detiene la polimerización, continuando únicamente la despolimerización, llegando incluso a la pérdida de la estructura del microtúbulo.³²

1.5. Necesidades de desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de las parasitosis.

En la actualidad la quimioterapia sigue siendo el método más eficaz, barato y de corto alcance para controlar casi todas las parasitosis. Los antiparasitarios deben ser sustancias inocuas y eficaces en los enfermos. Los usos terapéuticos de esta categoría de productos son complejos y sometidos a variaciones que son originadas por factores del huésped, del parásito y del ambiente. Los fármacos disponibles son especialmente útiles para tratar las infecciones en seres humanos causadas por parásitos intestinales; sin embargo, se necesitan nuevos o mejores productos para combatir infecciones sistémicas como la cisticercosis, filariasis, leishmaniasis, triquinelosis y tripanosomiasis, y que se anule la aparición de resistencia a fármacos, que surge sobre todo en parásitos del paludismo y otros protozoos. En el caso de protozoarios, casi todos los medicamentos que se han utilizado desde hace años es debido a que no ha habido otros mejores que los sustituyan. Aun más, los productos antiprotozoarios eficaces suelen ser tóxicos a dosis terapéuticas y, en muchos casos, su amplio empleo ha ocasionado mayor resistencia de los parásitos.²² A pesar de los muchos medicamentos disponibles para el tratamiento de la giardiasis, ninguno de ellos es totalmente satisfactorio, ya que se han presentado casos de resistencia. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas sustancias con actividad anti-giardicida parece ser una prioridad.³³

Para la industria farmacéutica el descubrimiento de fármacos es un proceso complejo, costoso y riesgoso; alrededor de 10 moléculas que entran en la fase de experimentación clínica, sola una tendrá éxito en el mercado, como se simboliza en la figura 10. Para tener un candidato a medicamento dentro de la humanidad, los investigadores tendrán que evaluar dentro de centenares de millones de compuestos en fase preclínica. En aproximadamente el 30 % de los casos, el candidato (prototipo) demuestra ausencia de eficacia terapéutica, problemas de biodisponibilidad y de farmacocinética que constituyen otra causa de abandono (40% de los casos). Dentro del 20 % de los casos, el producto puede ser tóxico o presentar efectos secundarios. El investigador debe saber cuales son los receptores o enzimas implicadas, cuales son las cascadas metabólicas en juego dentro de la célula y que él deberá modular. Estos aspectos en el desarrollo de fármacos, dependen de la implementación de tecnología de vanguardia, así como de sistemas de evaluación.³⁴

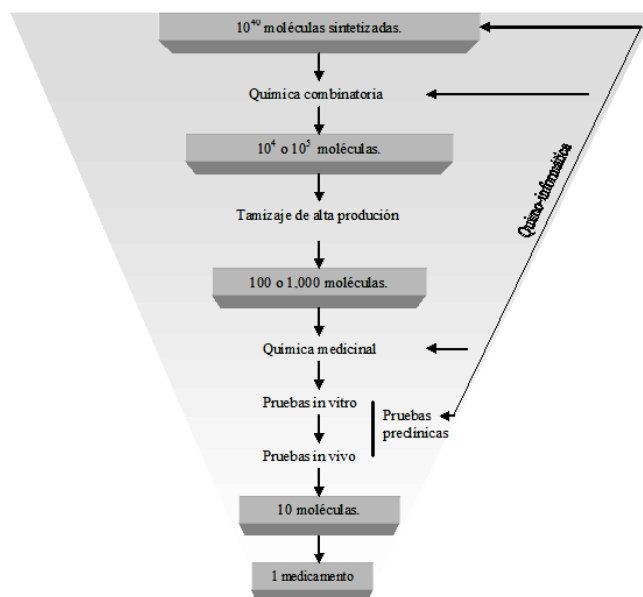


Figura 10. Desarrollo de nuevos fármacos. Etapas del descubrimiento y optimización de un medicamento.³⁴

1.6. Proteómica.

1.6.1. Definición

La proteómica es una serie de métodos y técnicas destinadas a estudiar el conjunto de proteínas, que se expresan en una célula o tejido bajo condiciones dadas, lo obtenido se conoce como proteoma, complemento del genoma. El proteoma puede ser definido como la serie de proteínas en una célula, tejido u organismo en un punto dado en el tiempo.⁴⁰ El amplio campo de la proteómica tiene como su principal meta el entendimiento de la estructura, función, expresión, localización celular, interacciones y regulación de cada proteína producida desde un genoma completo. La proteómica está formada por un campo multidisciplinario, lo que hace necesario el uso de química orgánica, biología celular, bioquímica y espectrometría de masas.^{35,36}

La electroforesis de 2D fue desarrollada por O'Farrell en 1975 para fraccionar mezclas complejas de proteínas con el uso de dos propiedades de las moléculas.³¹ Las proteínas se separan primero por su punto isoeléctrico con una técnica denominada enfoque isoeléctrico, seguido, por la separación electroforética en geles de poliacrilamida en presencia de detergente SDS-PAGE, donde se separan de acuerdo a su masa molecular. En la técnica original, la separación de la primera dimensión se realiza en tubos capilares, que contenían un gel de poliacrilamida portador de anfólitos, los cuales se han substituido por gradientes

inmovilizados de pH, adheridos a un soporte plástico, lo que da una mejor separación y reproducibilidad.³⁷

La separación de proteínas tiene como propósito en proteómica, de simplificar mezclas complejas de proteínas resolviéndolas en proteínas individuales o grupos pequeños, que permite evidenciar las diferencias en niveles de proteína, lo cual puede ser útil para comparar entre dos muestras tratadas bajo diferentes condiciones, las separaciones analíticas de proteínas permiten que se hagan selecciones específicas para su posterior análisis.³⁸

1.6.2. Análisis proteómico

Durante el análisis proteómico el primer paso crucial es la obtención y manejo de la muestra. Un genoma completo tiene cerca de 100,000 genes, pero una línea celular sólo puede expresar cerca de 10,000; un número más alto es expresado en tejidos; sin embargo, el rango dinámico de abundancia de proteínas puede ser tan alto como 1×10^6 , en muestras biológicas. Después de obtener la fracción de la proteína, el método de opción para los estudios proteómicos son los geles de electroforesis de una o dos dimensiones. Las ventajas de la electroforesis unidimensional, como método de preparación, es que virtualmente todas las proteínas son solubles en SDS, se puede analizar un rango de masa molecular relativa de 10,000 a 300,000 Da, así como las proteínas que son extremadamente ácidas y/o básicas se visualizan fácilmente.^{35,39}

Debido a que en la 2D se obtiene un orden visual de proteínas, es posible detectar cambios en la abundancia de proteínas y cambios causados por estados postranslacionales, ya sea por transfección de genes o producir objetivos potenciales para los fármacos.³⁷ Muchos estudios proteómicos tienen como objetivo detectar cambios en la expresión genética bajo la influencia de factores ambientales.⁴⁰ Además, las técnicas proteómicas permiten estudiar los cambios postraduccionales que sufren las proteínas y las interacciones que se producen entre estas, y con otras moléculas; tales modificaciones no pueden ser inferidas desde los genomas y con frecuencia juegan un papel fundamental en la regulación de la actividad.³⁵

A pesar de lo exitosa que es la proteómica, aun hay varios desafíos técnicos: las proteínas grandes e hidrofóbicas no se incorporan generalmente en los geles de doble dimensión, solo se observan las proteínas más abundantes; los mejores geles de dos

dimensiones, pueden resolver rutinariamente no más de 1000 proteínas³⁹; no resuelve proteínas con un amplio número de dominios transmembranales o una gran masa molecular o un punto isoeléctrico extremo;³⁷ particularmente, en fluidos corporales como suero y líquido cerebrospinal, más del 99% del complemento proteico es albúmina del suero y globulinas. Debido a la variación biológica inherente en estas muestras, es difícil definir los patrones normales de expresión que se pueden comparar con los de la enfermedad.³⁹

A pesar de las dificultades descritas, varios son sus usos. Por ejemplo, Celis et al. (1999) han encontrado un supuesto marcador urinario, el psoriasin, que se utiliza para dar seguimiento a pacientes con carcinomas de células escamosas de vejiga.³⁹

1.6.3 Farmacoproteómica.

La proteómica es una técnica de gran alcance para investigar perfiles de expresión de proteínas en sistemas biológicos y sus modificaciones en diversas condiciones fisiológicas o en respuesta a un estímulo dado, como fármacos o parámetros ambientales. Es por lo tanto, una técnica óptima para la evaluación del modo de acción de un fármaco, efectos secundarios, toxicidad y la resistencia que producen. También es una herramienta de gran alcance para el estudio de los efectos biológicos durante el desarrollo preclínico. Su uso para el descubrimiento de nuevos blancos de fármacos es tan importante que ha dado origen a un campo asociado a la farmacología que se llama farmacoproteómica,⁴¹ la cual tiene dentro de sus objetivos apoyar los estudios toxicológicos para entender el mecanismo de acción de una droga o para identificar sus blancos.³⁹ Lo anterior tiene explicación porque las proteínas que se expresan en un tipo celular o en un tejido concreto, actúan de modo coordinado para responder ante un estímulo dado como, por ejemplo, la presencia de un fármaco, por lo que estudiar estos cambios globales, desde el punto de vista del proteoma (Figura. 11), es el propósito de la proteómica.³⁵ Dado que la proteómica es complementaria a la genómica, ya que se centra en los productos del gen, que son los agentes activos en las células. Por esta razón, la proteómica contribuye directamente al desarrollo de fármacos debido a que casi todos los fármacos se dirigen contra las proteínas.³⁹

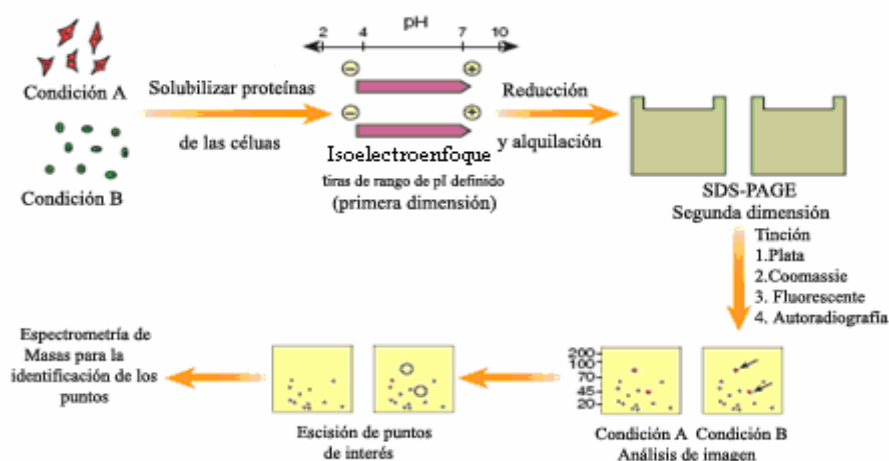


Figura 11. Diagrama del estudio proteómico comparativo de muestras biológicas.³⁹

La 2D ha sido usada para el análisis proteómico selectivo de *Plasmodium* y otros parásitos humanos intracelulares. Juntando la secuencia de la información de *Plasmodium* con bioinformática, proteómica y transcripción de la expresión del RNA, obteniendo información sin precedentes abriendo oportunidades para explotar nuevas estrategias del control de la malaria. La información de la secuencia genómica provee la creación de modernos estudios proteómicos, llevados por la necesidad del control de la malaria a través del desarrollo de una vacuna y de nuevos fármacos.³⁷

Otra ventaja que trae el análisis proteómico es que los parásitos genéticamente modificados de la misma cepa pueden ser comparados. Mientras se intenta por ejemplo comparar los proteomas específicos entre la cepa cloroquin-sensible y cloroquin-resistente en campos aislados. El contenido proteómico de los parásitos puede ser variable debido a las diferencias en la clonación que son detectables en 2D que puede hacer mucho más complicada la identificación de los cambios directamente asociados en el fenómeno de resistencia a los fármacos.³⁷

El acercamiento farmacoproteómico podría ser particularmente útil para la identificación de las alteraciones moleculares implicadas en la diabetes de tipo 2 y para la caracterización adicional de fármacos existentes o nuevos. En oncología, la proteómica se utiliza extensamente para la identificación de marcadores de proteína tumor-específicos, y la farmacoproteómica se utiliza para la evaluación de la quimioterapia, particularmente para la

caracterización de los mecanismos de resistencia de los fármacos. La gran cantidad de datos generados por la investigación farmacoproteómica requiere el uso de herramientas bioinformáticas que aseguren una interpretación pertinente en bases de datos.⁴¹ Actualmente el número de bases de datos va creciendo a medida que avanzan los proyectos proteómicos.

2. Planteamiento del problema.

La Organización Mundial de la Salud ha considerado que hay necesidad de diseñar o rediseñar mejores fármacos antiparasitarios, en específico contra aquellas enfermedades parasitarias que afectan a los países subdesarrollados. Con base al conocimiento de que los derivados de BZ's utilizados en la terapia antiparasitaria son efectivos y baratos, y que actualmente se han generado problemas de resistencia; se ha considerado que con el empleo de la química farmacéutica, que diseña y sintetiza nuevos derivados bencimidazólicos, se optimizara la actividad farmacológica, a fin de generar sustancias con mejor farmacocinética, mayor selectividad y menores efectos adversos. De los derivados sintetizados, uno de ellos, el denominado 5-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1-*H*-bencimidazol (RSD-8), resultó ser más activo que el metronidazol (MTZ) bajo condiciones *in vitro*. Este último es considerado el fármaco de elección en el tratamiento de la giardiasis, por lo cual se decidió evaluar su efecto sobre la expresión de las proteínas del parásito por medio de análisis proteómicos, en geles de doble dimensión, y comparar el efecto entre el MTZ y el RSD-8. Así como el posible daño estructural a nivel de MEB.

3. Hipótesis.

Si el patrón en la expresión de proteínas de *G. intestinalis* se modifica ante la presencia de los compuestos giardicidas, RSD-8 y MTZ, entonces estos compuestos afectaran su estructura y la expresión de proteínas.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar el efecto *in vitro* del RSD-8 y del MTZ en trofozoítos de *G. intestinalis* a nivel de expresión de proteínas y modificaciones estructurales.

4.2 Objetivos particulares

- ♦ Observar la morfología de los trofozoítos tratados y no tratados con los compuestos por MEB.
- ♦ Caracterizar bioquímicamente por SDS-PAGE las proteínas de trofozoítos de *G. intestinales*.
- ♦ Evaluar la relación de tiempo de incubación y concentración de los compuestos por SDS-PAGE.
- ♦ Establecer los cambios en el patrón electroforético de los parásitos tratados *in vitro* con MTZ y RSD-8, con respecto al control.
- ♦ Obtener mapas proteómicos de las proteínas de los trofozoítos de *G. intestinales*.
- ♦ Obtener mapas proteómicos de *G. intestinales* en presencia de MTZ y RSD-8
- ♦ Determinar los diferentes patrones de expresión en los mapas proteómicos por el tratamiento, con respecto al control.
- ♦ Caracterizar las proteínas que resulten modificadas en su expresión, como respuesta a los tratamientos.

5. Materiales y Métodos.

5.1. Cultivo axénico de trofozoítos de *Giardia intestinalis*.

El crecimiento, mantenimiento, la inducción a la confluencia *in vitro* de los trofozoítos y los experimentos de evaluación de los compuestos se llevaron a cabo en la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del IMSS, Centro Médico Siglo XXI, bajo la supervisión de la Dra. Lilian Yépez. Para estos ensayos se siguió el método descrito por Cedillo-Rivera y Muñoz (1992),^{17, 43} los trofozoítos de *G. intestinalis* cepa WB se cultivaron axénicamente en medio TYI-S-33 modificado, complementado con 10% de suero de ternera y 10,000 U/ μ g/mL de una mezcla de penicilina-estreptomicina.

5.2. Evaluación del efecto *in vitro* con MTZ y RSD-8.

Un inóculo de 2×10^6 trofozoítos/mL en medio TYI-S-33, se incubó con el compuesto a evaluar a 3 y a 5 μ g/mL, a dos tiempos de incubación 24 y 48 h a 37°C. Para el control se incorporó el inóculo correspondiente a 2×10^6 trofozoítos/mL en DMSO. Transcurrida la incubación, los tubos se colocaron en hielo por 30 min y se centrifugaron a 1000 g, durante 30 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante por decantación, el paquete celular obtenido se lavó tres veces con PBS por centrifugaciones de 10 min. Se resuspendió en 1mL de agua desionizada, con 2 % de inhibidores de proteasas (COMPLETE, ROCHE). Posteriormente, los trofozoítos se lisaron con 7 ciclos de congelamiento-descongelamiento (-70 °C por 5 min / 37 °C por 5 min). Los extractos obtenidos se conservaron a -70°C hasta su uso.

5.3. Preparación de muestras para Microscopía Electrónica de Barrido.

Se incubaron 2×10^6 trofozoítos/mL con 3 μ g/mL de cada compuesto a evaluar a 37°C por 48 h. Se centrifugaron a 1000 g durante 30 min, se decantó el sobrenadante y el paquete celular se lavo 3 veces al adicionar 1 mL de PBS y centrifugaciones a 3 g por 5 min. Al final, se decantó el sobrenadante y el botón se fijó con glutaraldehído al 3% a temperatura ambiente durante 2 h; los parásitos se almacenaron a 4 °C para ser observados por MEB.

5.4. Evaluación por Microscopía Electrónica de Barrido.

Las observaciones se llevaron a cabo en el Departamento de Microscopía Electrónica, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM bajo la dirección de la Dra. Araceli Patrón. Se tomó una alícuota de cada muestra se colocó sobre cubreobjetos, previamente cubiertos con poli-L-lisina, y se lavaron con PBS. Se fijó con 1% de OsO₄ por 30 min en 0.1 M de buffer de cacodilato de sodio (pH 7.2), se deshidrató con etanol, se secó a punto crítico CO₂. Las muestras fueron cubiertas con oro y observadas en un microscopio electrónico de barrido JOEL JSM-5410 LV, se usó una transmisión de 15 kV a un aumento de 5000X y 7500X. Las imágenes se editaron con un paquete de cómputo (Adobe Photoshop V. 6.0).

5.5. Obtención de proteínas.

Para la recuperación de las proteínas, los extractos se descongelaron y se sonicaron con un equipo VibraCell (SONICS & MATERIALS INC.) durante 4 ciclos a 50 decibeles de 30 seg con intervalos de descanso de 1 min a 4°C⁴⁴. Se determinó la concentración de proteínas de cada extracto mediante el método modificado de Lowry (Apéndice Técnica 1). Posteriormente las suspensiones se fraccionaron en alícuotas, que se congelaron a -70 °C hasta su uso.

5.6. Electroforesis en una dimensión.

La separación de proteínas se llevó a cabo en geles de poliacrilamida de acuerdo a lo establecido por Laemmli, 1970. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% con 0.1% de SDS (Apéndice Técnica 2). Se colocó por carril 30 µg de proteína, que fue solubilizada en una solución amortiguadora de Laemmli (2X, Sigma) en condiciones reductoras en una proporción 2:1, se incubó en baño María por 5 min.⁴⁵ Se utilizó una cámara mini-Protean 3 (Bio-Rad). El voltaje aplicado fue de 80 V por 2 h. Se utilizaron marcadores de pesos moleculares preteñidos (Precision Plus, Bio-Rad). Los geles se tiñeron con Azul de Commassie y/o Sypro Ruby (Apéndice Técnica 4).

5.7. Electroforesis en dos dimensiones.

Se solubilizaron 50 µg de proteína por cada tira, en una solución amortiguadora de rehidratación con un volumen total de 125 µl. La muestra solubilizada se puso en contacto con las tiras de gradiente inmovilizado de pH (IPG), de 7 cm de longitud y se emplearon dos rangos de pH: 3-10 NL y de 4-7 L. Después de 16 h de rehidratación, las tiras se colocaron en la unidad Protean IEF para el isoelectroenfoco bajo las condiciones mencionadas en el Apéndice (Técnica 3). Las tiras de IPG se equilibraron en dos soluciones amortiguadoras de equilibrio, una con 0.13 M DTT y 0.32 M IAA. Se colocaron sobre geles prehechos de poliacrilamida en gradiente de 4-12 % (Invitrogen) y sellados con agarosa al 5 %. La separación electroforética se llevó a cabo en una mini-cámara XCell Sure (Invitrogen) a 200 V por 1 h a temperatura ambiente. Los geles obtenidos se recuperaron y se tiñeron mediante la técnica de Sypro Ruby (Apéndice Técnica 4).

5.6. Adquisición y análisis de geles.

Los geles se capturaron en un fotodocumentador Chemidoc XRS (Bio-Rad), analizadas mediante el programa Quantity One V 4.6 para una dimensión, con lo que se determinaron, PM, Rf, número de bandas producidas y su concentración por la intensidad de píxeles. Para la doble dimensión se utilizó el programa PDQuest V 7.4.0. (Bio-Rad) con el que se determinó PM, pI, número de puntos e intensidad de píxeles. Para el registro de los geles, se imprimieron en una impresora térmica (SONY). Los geles se secaron a temperatura ambiente en monturas de acrílico.

Condiciones de captura		
Tinción	Coomassie	Sypro Ruby
Sensibilidad	30-300 ng	1-2 ng / banda
Filtro	Ambar Filter 3004	630BP30
Select application	White Transillumination	UV Transillumination
Luz del equipo	Trans UV	Trans UV
Fondo	Blanca	Negra

6. Resultados

6.1. Microscopía Electrónica de Barrido.

En la Figura 12A y 12B se observan trofozoítos de *G. intestinalis* del grupo control, que presentaron su morfología clásica;^{17,19,46} cuerpo en forma de media pera, un disco adhesivo en la región ventral anterior de la célula y los cuatro pares de flagelos (anterior, posterior-lateral, caudal, y ventral).

En el caso de los parásitos incubados durante 48 h en presencia de 3µg/mL de MTZ y de RSD-8 hubo cambios morfológicos. Después de la exposición al MTZ (Figuras 12C-E), los parásitos tuvieron cambios en su forma característica, presentaron daño en su superficie que produjo pérdida de su integridad en comparación con los parásitos del grupo control, lo cual expuso parte del interior de los parásitos. Hubo una disminución en la longitud de los flagelos caudales; en el disco ventral se observó daño en el centro, en donde esta la unión del disco al resto del cuerpo. Todos los parásitos observados bajo el tratamiento con el MTZ presentaron el mismo tipo de daño. En el caso del compuesto RSD-8 (Figuras 12 F-H), se encontró que hubo un daño más severo: los parásitos perdieron la estructura piriforme, tuvieron daños en su superficie, localizados en las mismas áreas observadas en los parásitos tratados con MTZ pero con un deterioro más extenso. En el caso de los flagelos caudales, se presentaron con una disminución de su longitud. Se observaron mayores daños en el disco ventral, con respecto al tratamiento con MTZ, así como en otras áreas que abarcaron tanto el centro como los alrededores del disco. En la imagen F de la Figura 12 se observó que la membrana superficial interna del disco ventral tuvo una alteración en su constitución, aparentemente se presentó con una estructura más laxa a diferencia de lo que se encontró en los discos de los otros parásitos. Una característica de los parásitos tratados es que en el momento de su observación al MEB se les encontró habitualmente en forma de racimos, como se presentan en las imágenes 12E y 12H.

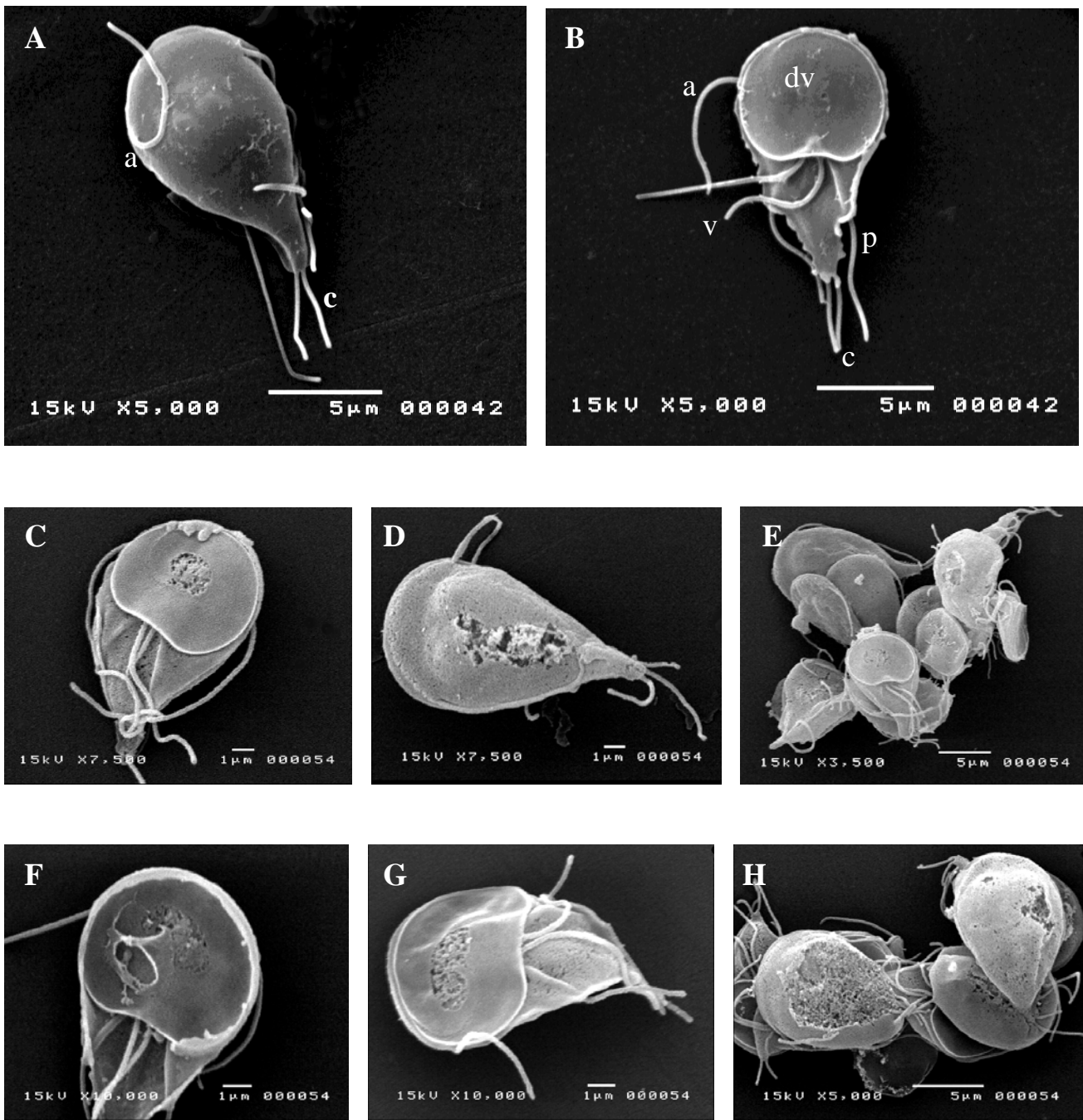


Figura 12. Observación mediante MEB de trofozoítos de *G. intestinalis*. Se comparan tres condiciones: en el primero los parásitos no recibieron tratamiento alguno. Se presenta una vista dorsal (A) y una vista ventral (B), en la que destaca el disco (dv), d y los flagelos: anterior (a); posterior-lateral (p); ventral (v) y caudal (c). Parásitos tratados con MTZ (C-E) y con RSD-8 (F-H) en ambos casos a una concentración de [3 µg/mL] por 48 h.

6.2. Separación electroforética SDS-PAGE de extractos totales de proteínas.

Los análisis electroforéticos se hicieron bajo condiciones reductoras, así como no reductoras, empleando el mismo volumen de muestra para todos los casos. Se encontró, que la resolución del patrón electroforético es mejor en condiciones reductoras que en ausencia de β -ME y por este motivo que las comparaciones posteriores se hicieron bajo tales condiciones (Figura 13).

La comparación entre el patrón electroforético de las proteínas de las muestras incubadas a 24 y 48 h, mostró algunas variaciones; en el caso del MTZ, se observaron modificaciones en la intensidad de las bandas situadas en el intervalo de PM de 250 a 75 kDa. Mientras que, para el caso de las muestras tratadas con el RSD-8, las diferencias fueron más notorias a las 48 h, aparentemente hubo mayor cantidad de proteínas. La comparación a simple vista de los perfiles proteicos, bajo las dos concentraciones de compuestos, no mostró diferencia alguna entre los compuestos.

Los geles se capturaron, analizaron y compararon con el paquete computacional Quantity One encontrándose diferencias cuantitativas que se graficaron en función de la intensidad de pixeles de cada una de las bandas contra la distancia recorrida a lo largo de los geles (Rf). Se hicieron comparaciones tanto de las concentraciones por compuesto como de los tiempos de incubación. Como se observa en las Figuras 14 y 15, gráficas A y B, no se presentaron diferencias en los patrones independientemente de la concentración de compuesto que se haya empleado; no obstante, el análisis computacional mostró que hubo regiones en los gráficos que no pudieron ser empalmadas por diferencias encontradas por este tipo de análisis. De igual forma se obtuvieron los densitogramas al comparar los tiempos de incubación (Figuras 14 y 15 gráficas C y D), donde se observó que además de las diferencias en concentración de cada banda detectada se presentó una variación en el patrón que dio evidencia cuantitativa de las variaciones que acarrearán el tiempo de incubación en las proteínas de la muestra.

Con la finalidad de obtener las condiciones que proporcionaran una mejor resolución en la separación electroforética, se hizo un análisis del efecto de diferentes sustancias reductoras así como la comparación en ausencia, sobre el patrón electroforético de las muestras de parásitos no tratados (control). Como se observa en la Figura 16, la falta de un

agente reductor (carril 1) no favorece la adecuada separación electroforética de las proteínas; mientras que la adición del β -ME, como se muestra en los carriles 2 y 3, contribuye a una adecuada desnaturalización de las proteínas y de esta forma una mejor separación durante la electroforesis. La diferencia entre las condiciones reductoras, se debe a que se emplearon dos soluciones amortiguadoras: en el carril 2 se observa el efecto de la solución amortiguadora preparada en el momento que se emplea (1X), mientras que en el carril 3 se observa la misma solución amortiguadora pero elaborada comercialmente (2X), ajustadas a la misma concentración. Esta última condición de separación electroforética generó mejores separaciones electroforéticas y la mejor resolución de las proteínas de la muestra como se observa en la Figura 16 y en el análisis densitométrico (Figura 17).

Con la intención de establecer que las diferencias, indicadas para las Figuras 13 a 15, se debían al efecto del compuesto y no al tiempo de incubación de los parásitos, se hicieron separaciones electroforéticas de proteínas de parásitos incubados a 24 y 48 h (datos no mostrados). El análisis densitométrico mostró (Figura 18) que tuvieron la misma tendencia que incluso se sobrepuso, debido a esto se evaluó el efecto de los compuestos a tiempo de incubación 48 h. Se presentaron diferencias con una clara resolución, además de ser éste el tiempo de incubación empleado para determinar la CI_{50} , ensayo que se llevó a cabo para determinar la eficacia del compuesto.²⁹

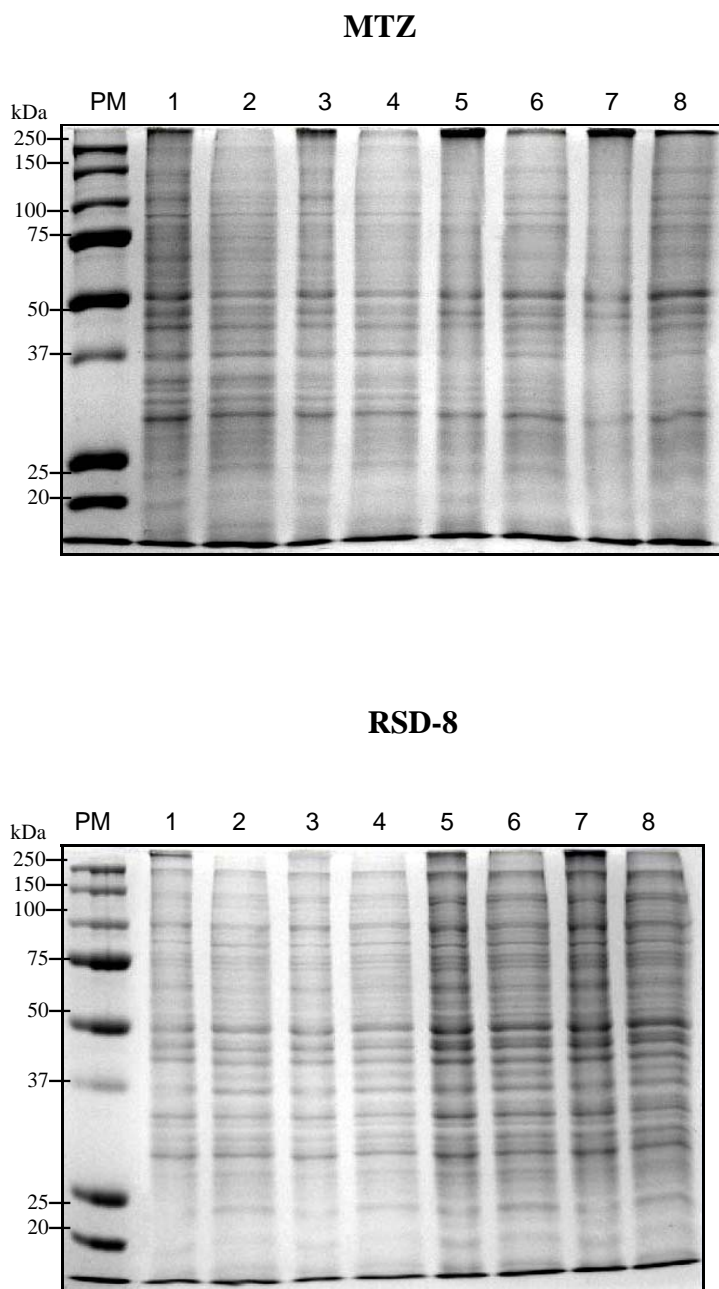


Figura 13. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas totales de *G. intestinalis* tratadas con MTZ y RSD-8. Geles al 10% con 10 μ L de muestra por carril. Analizadas en ausencia de agente reductor (carriles 1, 3, 5, 7) y con agente reductor β -ME (carriles 2, 4, 6, 8). Los parásitos fueron tratados *in vitro* con 3 μ g/mL durante 24 h (carriles 1, 2); 5 μ g/mL durante 24 h (carriles 3, 4); 3 μ g/mL durante 48 h (carriles 5, 6); 5 μ g/mL durante 48 h (carriles 7, 8). Como estándar se emplearon pesos moleculares preteñidos (PM) Teñido con azul de coomassie.

MTZ

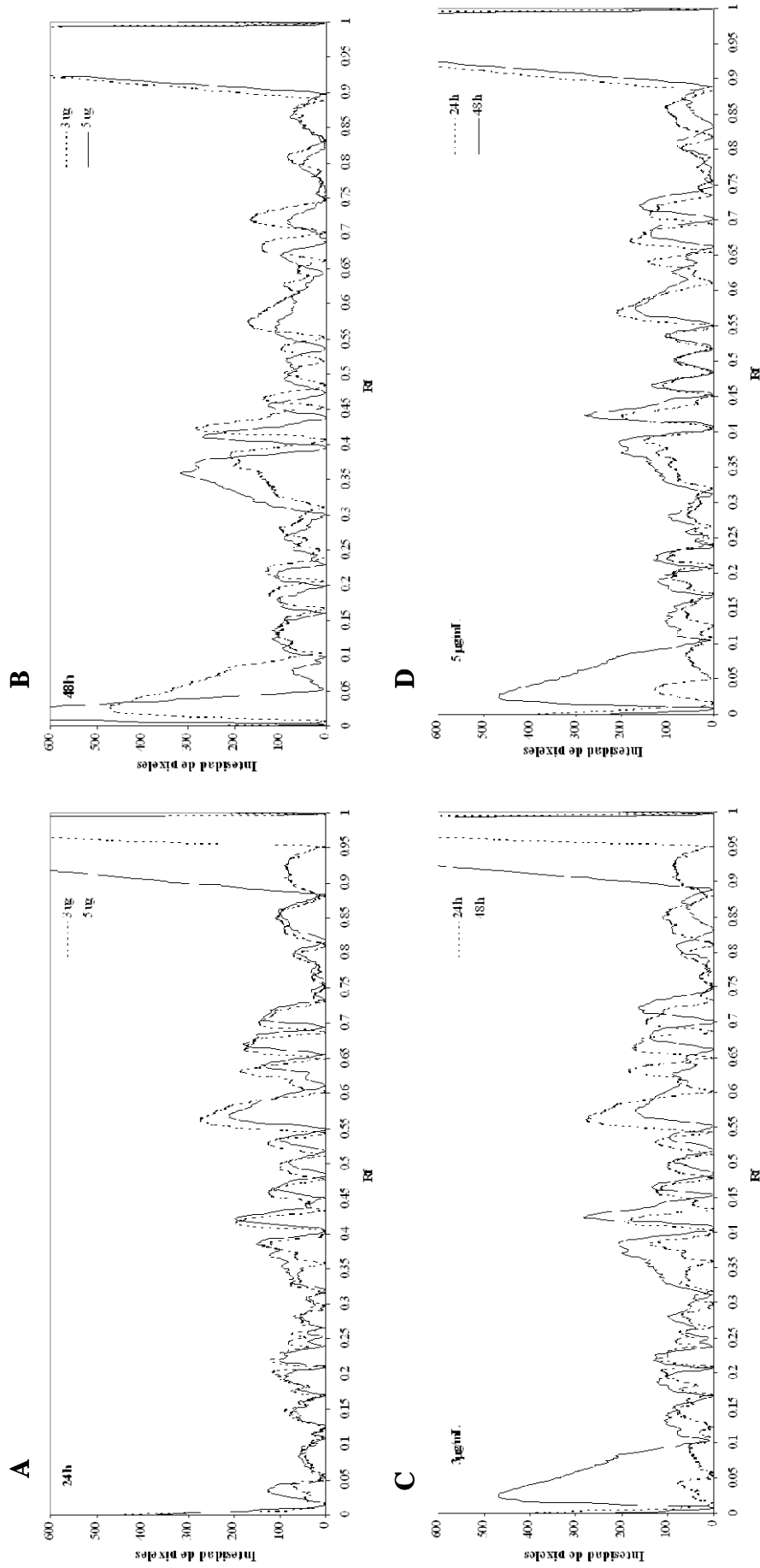


Figura 14. Evaluación densitométrica de patrones electroforéticos de proteínas de *G. intestinalis* incubadas con MTZ. En A y B, se muestra el efecto producido por la exposición a MTZ a 3 y 5 µg/mL durante 24 y 48 h respectivamente. En C y D, se compara el efecto del tiempo de incubación 24 y 48 h. En el eje de las abscisas se muestra el movimiento de las proteínas desde el inicio hasta el frente del gel (Rf), mientras que en las ordenadas se gráfico la densidad óptica, medida en píxeles.

RSD-8

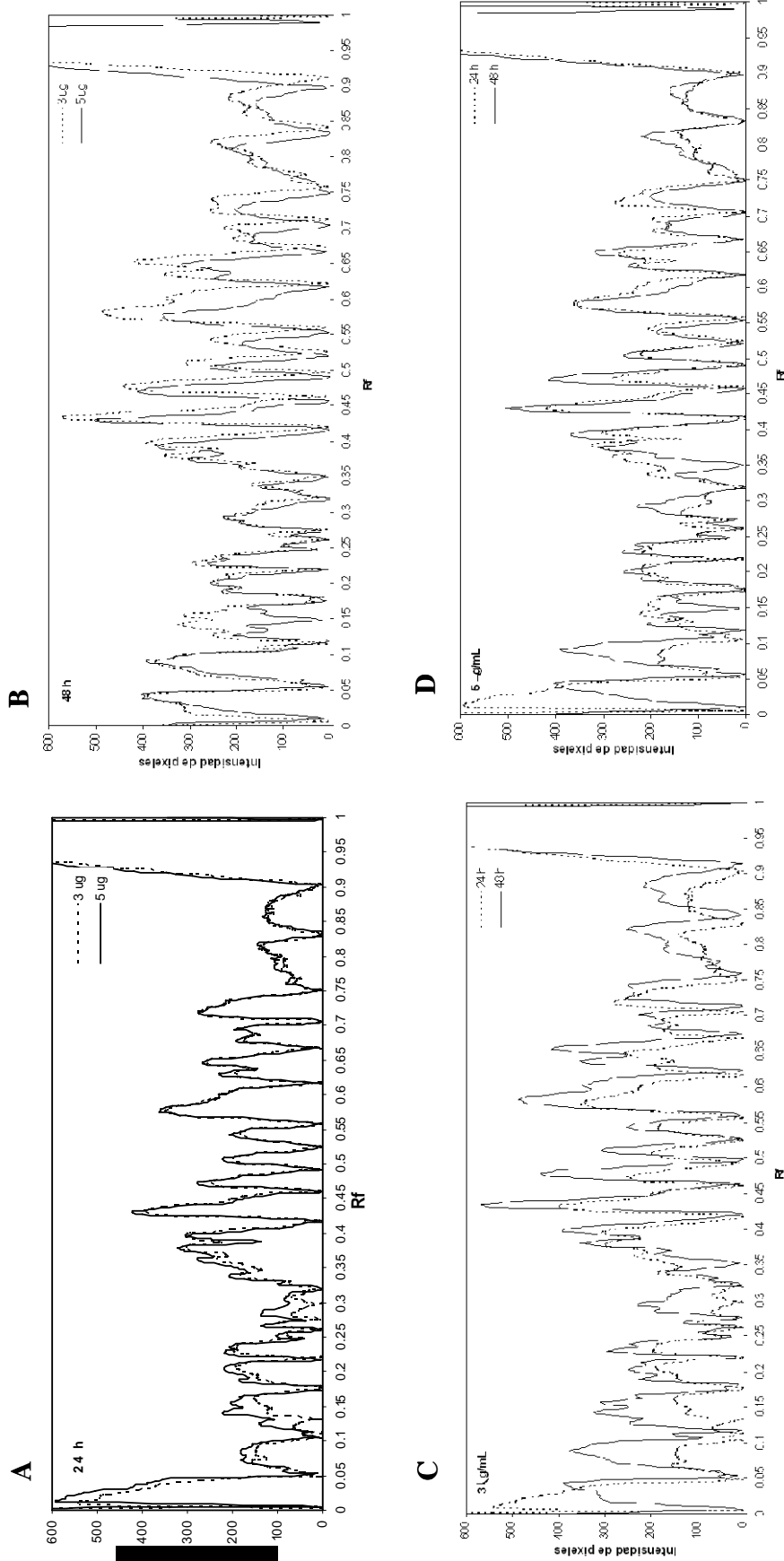


Figura 15. Evaluación densitométrica de patrones electroforéticos de proteínas de *G. intestinalis* incubadas con RSD-8. En A y B, se muestra el efecto producido por la exposición a RSD-8 a 3 y 5 µg/mL durante 24 y 48 h respectivamente. En C y D, se compara el efecto del tiempo de incubación 24 y 48 h. En el eje de las abscisas se muestra el movimiento de las proteínas desde el inicio hasta el frente del gel (Rf), mientras que en las ordenadas se gráfico la densidad óptica, medida en píxeles.

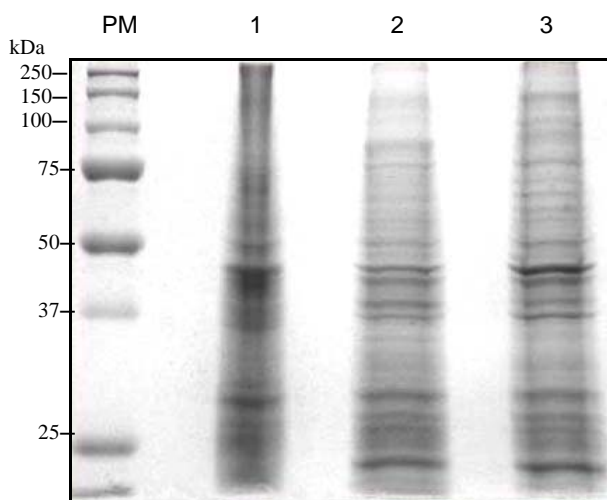


Figura 16. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de *G. intestinalis*. Comparación en un gel de una dimensión con 40 μ L de suspensión de lisado de trofozoítos de *G. intestinalis*, en ausencia de tratamiento carril 1, tratamiento con agente reductor preparado al momento de usarse (1X), tratamiento con agente reductor comercial (2X). Pesos moleculares predefinidos. Teñido con Azul de Coomassie.

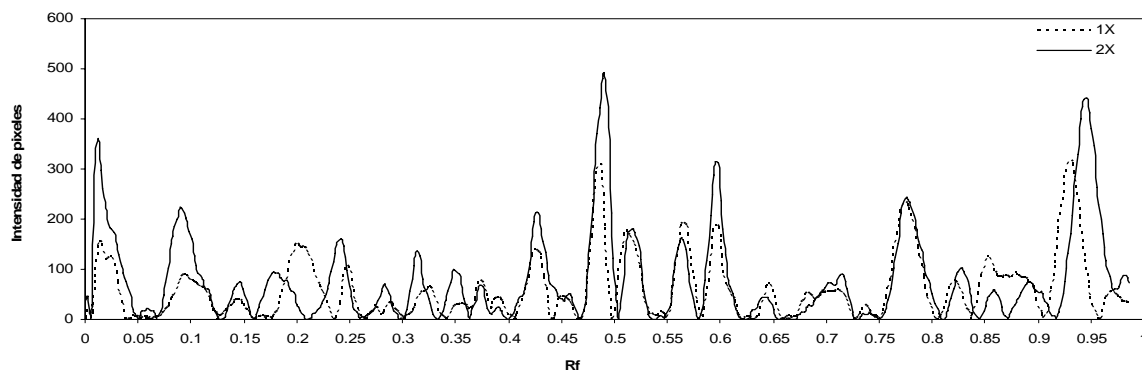


Figura 17. Evaluación densitométrica del efecto de agentes reductores en la separación electroforética de muestras de parásitos. Comparación de la separación de proteínas de *G. intestinalis* tratado bajo dos agentes reductores: preparado en el momento de uso (1X) y preparado por el fabricante (2X).

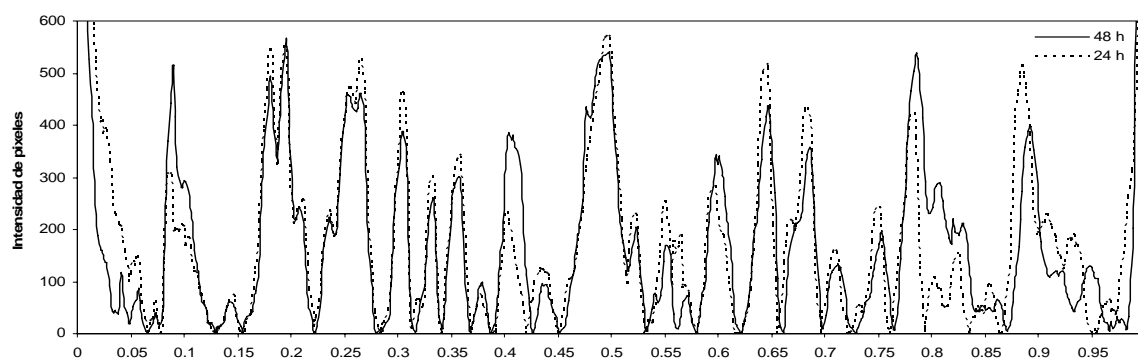


Figura 18. Comparación de la evaluación densitométrica de proteínas de *G. intestinalis* incubadas a 24 y 48 h.

6.3. Electroforesis en una dimensión.

El fraccionamiento electroforético de las muestras control (Figura 19) reveló la separación de 31 bandas con un intervalo de PM de 220 a 12 kDa semejante a lo reportado en la literatura;^{18,47,48} mientras que las proteínas que presentaron mayor intensidad estuvieron localizadas entre los 50 kDa, otras, también intensas, estuvieron alrededor de los 30 kDa. En esta misma figura se muestran los patrones electroforéticos de las proteínas de parásitos tratados, con MTZ, RSD-8, así como el control; las comparaciones globales de los patrones electroforéticos de las proteínas mostraron variaciones dependientes del tratamiento empleado. Luego del análisis de los geles mediante el paquete computacional comercial Quantity One se comprobaron los intervalos de PM donde las diferencias entre las proteínas fueron localizadas en los intervalos de 220 a 160 kDa, 93 a 55 kDa, 50 a 43 kDa y 33 a 24 kDa señalados en la Figura 19.

Se encontraron diferencias en común en los tratamientos en bandas de proteínas, localizadas en el intervalo de PM de 163, 24 y 14 kDa, que aparentemente no se expresan en los tratamientos, así como una proteína que se expresó para ambos tratamientos y que no fue localizada en el control a 120 kDa. En el intervalo de PM de 65 a 30 kDa se encontró una reducción en la expresión de proteínas, mucho menor durante el tratamiento con MTZ; los resultados indican que en este intervalo de PM se encontraron los mayores efectos sobre la expresión de las proteínas luego de los tratamientos con los compuestos. Se encontraron variaciones que podrían ser exclusivas del tratamiento al que se sometieron los parásitos. En comparación con las proteínas del grupo control se encontró que para el MTZ, hubo

desaparición de bandas a los 194 y 45 kDa, mientras que, para el RSD-8, lo fue a los 227 y 206 kDa. De acuerdo a los densitogramas obtenidos, para cada uno de los tratamientos, en donde se realizó la comparación con los perfiles de las proteínas en el control (Figura 20) destacan las siguientes observaciones: En general, hay un patrón similar. Para las muestras de los parásitos tratados con MTZ es notoria la disminución en la cantidad de proteína detectada, no así para el RSD-8 en el que la cantidad de proteína aparentemente está en cantidades similares a las del grupo control. Hay cambios notables, para ambos tratamientos, en las zonas correspondientes a los valores de Rf de 0.1 (140 kDa), 0.3 (60kDa), 0.5 (35kDa) y, solo para el tratamiento con MTZ, en 0.55 (31kDa). En el intervalo de Rf de 0.65-0.7 (28-25 kDa) hay un aumento de la expresión de proteínas relacionadas con los tratamientos de los parásitos con los compuestos.

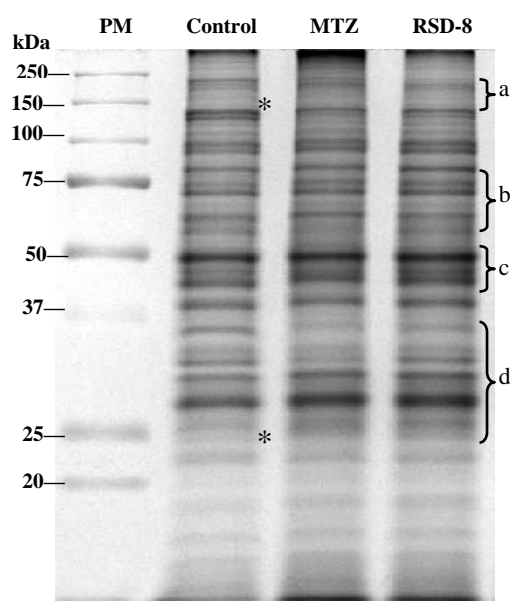


Figura 19. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de *G. intestinalis* bajo tratamientos. En geles al 10%, se fraccionaron electroforéticamente 30 µg de proteína, bajo condiciones reductoras. Las muestras control y las tratadas con 3 µg/mL de MTZ y 3 µg/mL de RSD-8. a: 220-160, b: 82-57, c: 50-43 y d: 33-24 kDa.

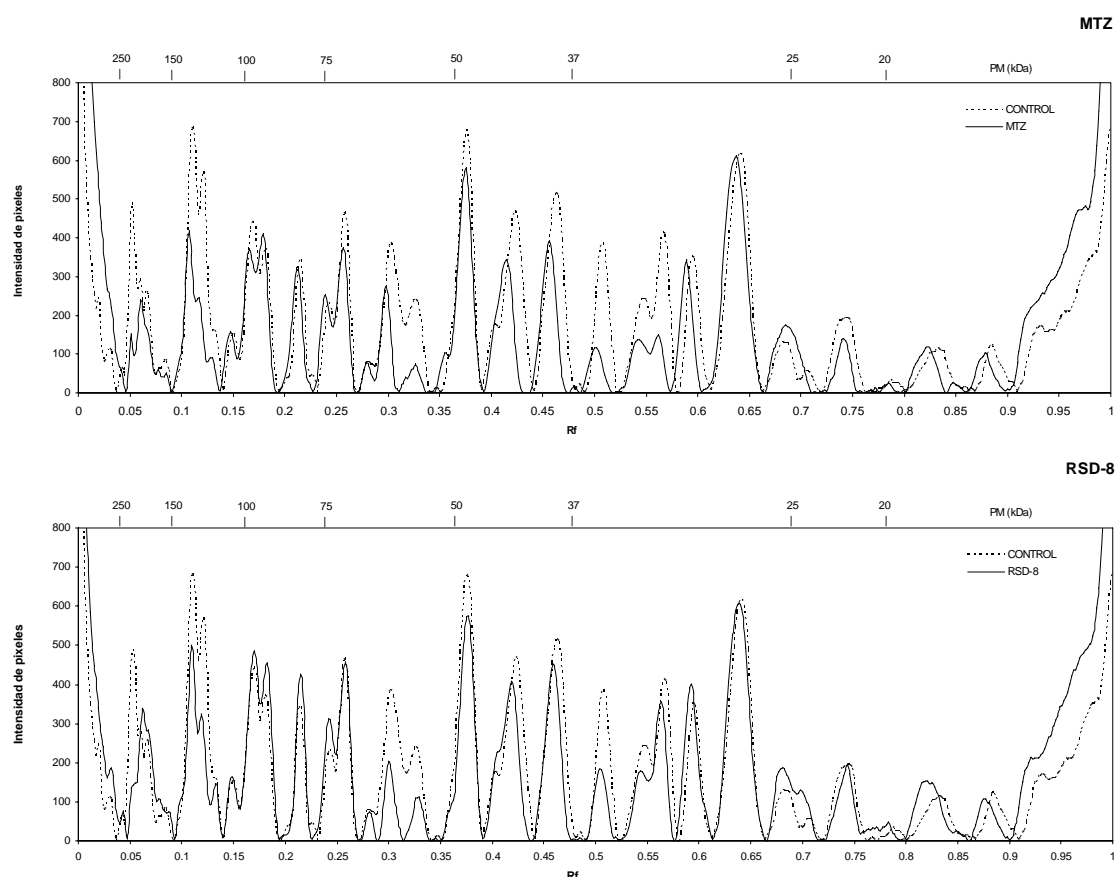


Figura 20. Comparación por densitometría del análisis electroforético de proteínas de *G. intestinalis*. Los densitogramas se obtuvieron mediante Quantity One a partir de la imagen de la figura 19. Se comparó el patrón electroforético dado por las muestras de los parásitos control y los tratados con MTZ y RSD-8.

6.4. Electroforesis en dos dimensiones.

En la Figura 21A se presentan mapas proteómicos de extractos obtenidos de trofozoítos de *G. intestinalis*. El cual se logró luego del isoelectroenfoque de las proteínas en tiras IPG de pH 3-10 no lineales, de 7 cm y de su separación electroforética en segunda dimensión en geles de gradiente comerciales; las condiciones de separación se describen en el Apéndice (Técnica 3). En el mapa proteómico 21A se observó que la mayoría de las proteínas presentan una naturaleza ácida que van en un intervalo de pI de 4 a 6.8 y se registró un promedio de 108 proteínas. Debido al intervalo donde se localizaron y con la finalidad de lograr una mejor separación de éstas, se decidió obtener mapas proteómicos aplicando el isoelectroenfoque con tiras de pH 4-7 lineal, de 7 cm. Uno de los geles resultantes teñidos por Sypro Ruby con proteínas del control se muestra en la Figura 21B. Se logró mejorar la resolución y enfoque de las proteínas bajo estas últimas condiciones y en lo sucesivo se

utilizaron tiras de pH 4-7 para efectuar las comparaciones de los mapas proteómicos de los parásitos tratados luego de su tratamiento con MTZ y RSD-8. En la Figura 22 se muestran los mapas proteómicos obtenidos de las proteínas de trofozoítos tratados con MTZ y RSD-8; tuvieron un promedio de 102 y 119 proteínas respectivamente. Con la finalidad de apreciar mejor cuáles proteínas presentaron cambios en su expresión, en comparación con las proteínas del control, se empalmaron los geles. Para lograr una mejor comparación y apreciación de los cambios en las proteínas detectadas en los geles, éstos se dividieron en 8 regiones, se seleccionaron por los cambios más evidentes en la expresión de las proteínas y que presentaban una mayor resolución e intensidad, además de que variaban significativamente de un tratamiento con respecto al otro. La localización de proteínas, con base a su PM y pI, se muestran en la Tabla 2. El número de proteínas detectadas fue con base en la interpretación del análisis de los mapas proteómicos mediante el software PDQuest.

Tabla 2. Análisis comparativo de proteínas de <i>G. intestinalis</i> control, y tratadas con 3 µg/mL de MTZ y RSD-8. Se muestran PM, pI y número de proteínas encontradas en los proteomas.				
Región	PM, pI	Control	MTZ	RSD-8
A	90.4-79.2, 4.91-4.59	-	7	15
B	~70, 4.82-5.02	4	4	4
C	57-54, 5.44-5.26	3	5	3
D	53-50, 5.92-5.64	6	5	2
E	33.6-26(~33), 6.0-5.0	9	10	10
F	37.7-29, 7.0-5.87	10	10	6
G	24-15.5, 6.4-5.87	7	7	5
H	46.1-22.2, 4.82-4.4	15	1	10
Numero de proteínas totales.		96	102	119

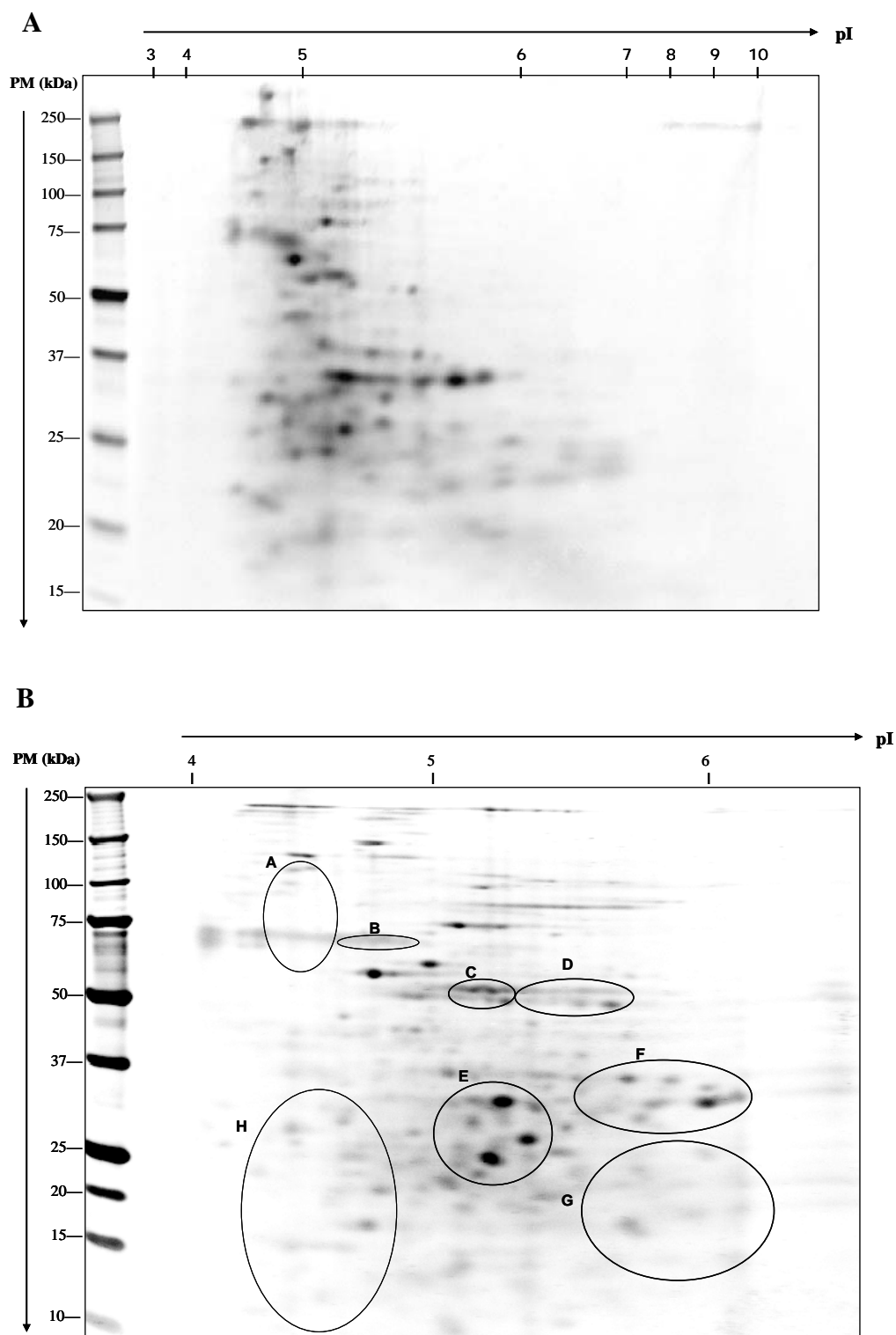


Figura 21. Mapas proteómicos de proteínas de *G. intestinalis*. Las proteínas se procesaron por isoelectroenfoque en tiras IPG 7cm. Posteriormente las proteínas se fraccionaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida en gradiente de 4-12%. Finalmente los geles se tiñeron con Spro Ruby. Las imágenes se analizaron mediante el software PDQuest. En A se muestran las proteínas separadas por isoelectroenfoque en tiras IPG pH 3-10 NL y en B, en tiras IPG de pH 4-7. En el carril individual se colocaron marcadores de PM no teñidos.

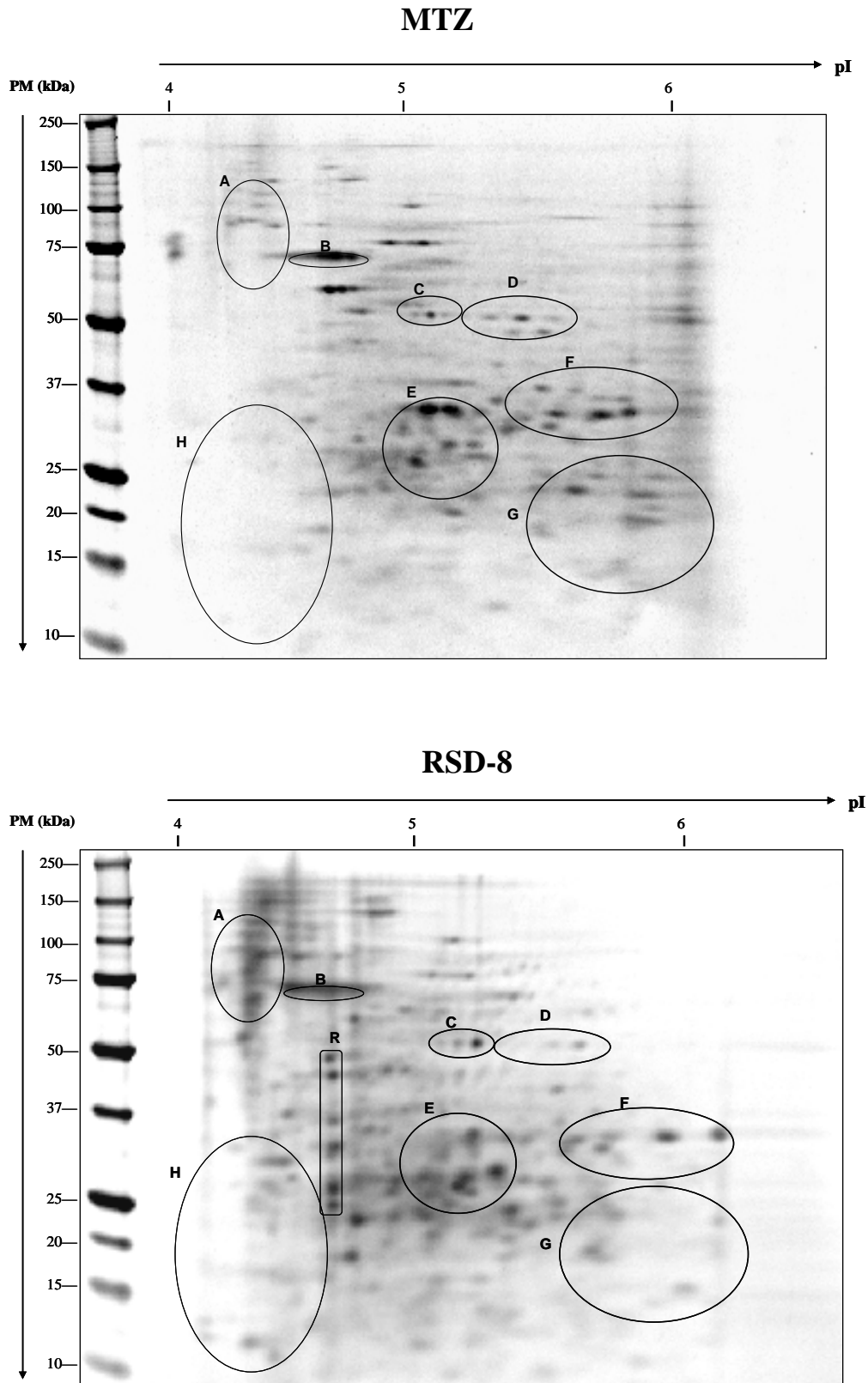


Figura 22. Mapas proteómicos de proteínas de *G. intestinalis* tratadas con 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MTZ y RSD-8 respectivamente. Proteínas separadas por isoelectroenfoque en tiras IPG pH 4-7 lineal. En el carril individual se colocaron marcadores de PM no teñidos.

Región A. En esta región no hubo expresión de proteínas para el control a diferencia de los parásitos tratados, que presentaron un número mayor de proteínas asociadas al tratamiento con RSD-8 y con MTZ 15 y 7 respectivamente.

Región B. Se localizaron 4 proteínas en los 3 casos; en el control con una baja expresión, en el caso del MTZ, fue la más clara expresión de las cuatro proteínas.

Región C. Se observaron 3 proteínas, que dependiendo del tratamiento, se expresaron con diferente intensidad; en el control y el RSD-8 hubo 3 proteínas, variando la intensidad de estas, en el caso del MTZ se observó la expresión de 5 proteínas, una de ellas tuvo la mayor expresión de todas. Las proteínas con mayor expresión en cada caso fueron diferentes como se observa en el PM y el pI.

Región D. Se encontró la expresión de 6 proteínas en el control; para el caso del RSD-8 disminuyeron a 2 de los cuales una presentó mayor intensidad. En el caso del MTZ se encontraron 5 proteínas, en donde una de ellas tuvo la mayor expresión con respecto a todas las observadas bajo este tratamiento.

Región E. Se detectó a esta región como la que podría ser la característica de los mapas proteómicos. Se encontraron 9 proteínas en el control, la distribución de las proteínas de mayor expresión (31 kDa y 5.3 pI; 27 kDa y 5.4 pI; 25 kDa y 5.2 pI) podría estar situada en los vértices de un triángulo imaginario. En el caso de la proteína de 31 kDa, se observan 4 proteínas con el mismo PM que podrían corresponder a isoformas. Para el MTZ, las isoformas mencionadas varían en intensidad y resaltan dos de ellas teniendo una un aumento en su expresión en comparación con las encontradas en el control. En el caso de RSD-8, aunque la distribución es semejante a la observada en el control, se encontró que la proteína de 25 kDa y pI 5.2 podría aparentemente haber dado origen a dos proteínas, las cuales pudieran corresponder a productos de degradación o de modificación.

Región F. Se encontraron hasta 10 proteínas, las cuales fueron semejantes en número tanto para el control como para el tratado con MTZ, pero con diferencias en su expresión, localización e intensidad. En los parásitos tratados con MTZ se encontró un aumento en la expresión de las proteínas de menor peso molecular, mientras que en el caso del RSD-8, aparte de que disminuyó el número de 10 a 6, se expresaron con mayor intensidad las de mayor peso molecular.

Región G. Se encontraron 7 proteínas, el número de ellas no cambió entre el control y los tratados con MTZ, no obstante, la intensidad de algunas proteínas aumentó y su localización se modificó con el tratamiento; mientras que en el caso del RSD-8 disminuyó a 5 al igual que la intensidad y sólo tres de ellas tuvieron una mayor expresión que las observadas para el grupo control.

Región H. Se encontró la expresión de hasta 15 proteínas en el control, y sólo una en el tratamiento con MTZ y 10 con el RSD-8; las proteínas del grupo control, comparadas con las del grupo tratado con RSD-8, tuvieron una expresión diferencial tanto en cantidad como en localización en los mapas proteómicos.

Otra región señalada, característica para el proteoma tratado con RSD-8. **Región R.** son 6 proteínas ubicadas en el mismo pI con diferente PM en un rango de 50 a 25 kDa.

7. Discusión de resultados.

En lo que se refiere a la morfología de los parásitos, se encontró que hay un efecto semejante de los compuestos ensayados sobre los trofozoítos; los daños fueron visibles a nivel ultraestructural de los parásitos, ya que afectaron la superficie, los flagelos y el centro del disco ventral; según las observaciones en la Figura 12, los parásitos tratados con RSD-8 presentaron daños más severos que con MTZ. Llama la atención que aunque los compuestos tienen una estructura molecular distinta (el MTZ es un 5-nitroimidazol y el RSD-8 es un bencimidazol) y por lo tanto un mecanismo de acción diferente, generaron daños semejantes, aunque el hecho de que el RSD-8 haya producido más daño, podría estar relacionado con su estructura bencimidazólica. Por las observaciones hechas en microscopía electrónica de barrido no hay posibilidad alguna de establecer cuáles proteínas podrían estar involucradas en el daño a los parásitos; sin embargo, a través de estudios inmunoquímicos se ha demostrado que *Giardia* tiene tubulina, presente en el disco ventral, en los microtúbulos flagelares y en la membrana plasmática; así como giardinas, que en sus diferentes isoformas, forman parte del citoesqueleto, y son la principal proteína del disco, con excepción de la región central formada por tubulina. Por el deterioro en el citoesqueleto y en el centro del disco posiblemente la proteína dañada fue la tubulina.^{18,47} En la Figura 12F, se observó daño en el disco por lo que cabría la posibilidad de que otras de las proteínas dañadas por el RSD-8 fueran las giardinas, únicas proteínas del citoesqueleto en el disco ventral,^{18,46,47} por lo que se produce su fragmentación.

En estudios anteriores⁴⁹ se sugirió que el ABZ (un derivado del bencimidazol) puede tener su efecto primario en *G. intestinalis* por unión a las proteínas del citoesqueleto, ya que pierde su capacidad de adherirse a las microvellosidades intestinales y de obtener nutrientes, lo que causa la muerte del parásito. Parece que el ABZ puede tener una alta toxicidad en *G. intestinalis* porque afecta estructuras del citoesquelético del disco ventral (tubulina y/o giardina). En este mismo sentido la evidencia obtenida de estudios ultraestructurales apoya la teoría actual de que el MTZ afecta a los protozoos al romper las membranas internas de la célula, vía la generación de radicales libres por la reducción del grupo nitro de la molécula.⁴⁹

En relación a la formación de agregados de parásitos (Figuras. 12E y 12H), pudieran tener relación con el efecto que los tratamientos producen sobre algunos componentes de la superficie de los trofozoítos, como pudieran ser los carbohidratos o las proteínas variables de

superficie (VPS), debido a su que expresión se altera luego del tratamiento con compuestos como la NTZ y el MTZ, ⁵⁰ lo cual pudiera ser el motivo de que ellos se adhieran unos con otros; debido a que en ausencia de tratamiento, los parásitos se pueden adherir uno con otro, pero nunca en agregados. Esto puede explicar las dificultades que se tuvieron al inicio del proyecto en relación a la cuantificación de proteínas; ya que no era posible la homogenización de las muestras y la única forma para obtener una suspensión homogénea de las muestras fue la ultrasonicación. Este método permitió una mejor ruptura celular, la desagregación entre parásitos y por lo consiguiente, se obtuvo una adecuada homogenización de las muestras, como lo realizado en otros trabajos.⁴⁴

Al comparar estos resultados con los estudios realizados por Cedillo-Rivera en el año 2002,¹⁷ donde trofozoítos tratados con nitazoxanida presentaron a nivel de MEB, alteraciones morfológicas semejantes a las encontradas en el presente trabajo como modificaciones en la morfología, degradación en la membrana así como en el disco ventral. También se observó disminución en la longitud de los flagelos. Estas observaciones podrían corresponder a los efectos de compuestos nitroheterociclos que producen en los trofozoítos de *Giardia*. Con esto se comprobó que este estudio presenta resultados congruentes y sustentados con la literatura, que nos permiten entender mejor el mecanismo de acción de los compuestos.

Luego de haber observado las alteraciones morfológicas que produjeron los compuestos en los parásitos, se continuó con la evaluación de la expresión de proteínas, para lo cual se hizo una electroforesis como se observa en la Figura 13. Con la finalidad de estandarizar el análisis electroforético primero se determinó el comportamiento de las proteínas bajo condiciones reductoras y no reductoras, para ello se empleó el β -ME (un agente reductor) para comparar las muestras sin tratar y tratadas con dicho agente. En general, se encontró que la mejor separación se lograba cuando las muestras eran tratadas con el agente reductor.

Una vez que las imágenes se adquirieron con el fotodocumentador, se llevó a cabo el análisis densitométrico de los carriles de cada uno de los geles, el cual se muestra en las Figuras 14 y 15. Se observó que no hay diferencias entre las muestras tratadas con las dos concentraciones distintas de los compuestos, no así cuando se evaluaron con tiempos de incubación de 24 y 48 h (Figuras 14 y 15 Gráficas. C-D). Con los resultados de los patrones electroforéticos de las proteínas después de los tratamientos, se encontró que el efecto de los compuestos era independiente de su concentración.¹⁷ Por esta razón se decidió realizar el resto

de los ensayos empleando la concentración de 3 µg/ml. Considerando que esta concentración era suficiente para evaluar el efecto de los compuestos, además de poder aprovechar al máximo la cantidad de compuesto disponible. Por otro lado se encontró que el patrón proteico obtenido de la separación electroforética de las muestras es dependiente del tiempo de incubación de los parásitos con los compuestos, por lo que al prolongar el tiempo de exposición, el daño a nivel de proteínas fue mayor.

Ya que se determinó el tipo de efecto del agente reductor en la separación electroforética y con la intención de obtener la mejor resolución de la separación, se evaluó el efecto del agente reductor, ya sea preparado en el laboratorio o del comercial (Figura 16). Según lo obtenido, la mejor resolución en la separación de las proteínas se logró con el reactivo comercial, lo cual podría deberse a la forma en que se preparó el reactivo (Figura 17).

Una de las principales complicaciones durante el desarrollo del trabajo experimental, se dio al efectuar la cuantificación de proteínas de las muestras de los parásitos. En un principio, se considero que las muestras proteicas tenían propiedades semejantes a las que se venían manejando en el laboratorio, se decidió emplear el método de Bradford mediante reactivos comerciales, pero al procesar diluciones seriadas y determinar los valores de absorbencia, se encontró que había variabilidad en las mediciones; además de que se observó que el colorante se precipitaba. Esto se explico a lo descrito en la literatura en relación al reactivo comercial que se estaba utilizando;⁵¹ donde se establece que si la muestra contiene sustancias que puedan ser incompatibles con el método de ensayo de proteínas, como por ejemplo algún surfactante, se produce la precipitación del reactivo y con ello una disminución en el valor real de la concentración de proteínas presente en la muestra. Por esta razón, se consideró que de acuerdo a la forma particular en que habían sido obtenidas las muestras de proteínas de los parásitos podrían haberse acarreado sustancias que interfirieran con la cuantificación y por ello producir precipitados. Ante esta situación se decidió utilizar otro sistema que tuviera un fundamento diferente para cuantificar proteínas. Por lo consiguiente se utilizó el ensayo modificado de Lowry comercial (*DC Protein Assay*, Bio-Rad), el cual no generó interferencia alguna al llevar a cabo las determinaciones. Sin embargo, aún cuando inicialmente se obtuvieron resultados positivos, no fue posible tener repeticiones confiables y ello motivó a seguir buscando otras estrategias de cuantificación. Se recurrió a la estrategia de cuantificación basada en la técnica original de Lowry, la cual requirió que todos los reactivos fueran preparados en el laboratorio, así como de otro sistema comercial (*2-D Quant Kit*) en el que se utilizaron urea, CHAPS y DTT; ya que estos reactivos mejoran la solubilidad de las muestras para la cuantificación y nuevamente, en ninguno de los casos se lograron obtener

resultados confiables. Con la finalidad de eliminar errores técnicos durante los ensayos (empleando una proteína comercial: albúmina sérica bovina), tuvieron que ser repetidos en varias ocasiones, llegando a la conclusión de que las muestras proteicas estaban implicadas en los errores de medición.

Ante la ineficacia de cuantificación de los métodos empleados, se decidió hacer una estimación de la concentración de las proteínas de forma cualitativa, comparando las separaciones electroforéticas de las muestras con las de las diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina. El gel resultante de la electroforesis mostró un patrón semejante a una curva de valoración visual de la concentración de proteínas y con base en ella se hizo una comparación de las muestras. Esta estrategia permitió tener un estimado de la concentración de proteínas en las muestras, gracias a ello se pudo iniciar el análisis electroforético con concentraciones conocidas de las muestras. Al mismo tiempo que se iniciaron los análisis electroforéticos de todas las muestras, se continuó buscando alguna estrategia de cuantificación que permitiera obtener resultados confiables y reproducibles.

Por los problemas encontrados, se consideró que durante el procesamiento de las muestras debían tenerse en cuenta la variabilidad de un lote de muestras a otro. Esto se consideró porque durante los análisis electroforéticos, en algunas ocasiones las muestras parecían tener aglomerados en los que las partículas eran difíciles de disgregar; ante esto, revisando la literatura, se decidió aplicar lo publicado por Guimaraes (2003)⁴⁴. En este trabajo, con la finalidad de obtener suspensiones homogéneas de muestras de extractos de parásitos, se estableció que era necesario aplicar una ultrasonificación. La intensa agitación producida destruye las membranas celulares, asimismo las estructuras subcelulares e incluso solubilizar complejos proteicos. Se aplicó en frío para evitar el sobrecalentamiento de las muestras que podría provocar la desnaturalización de las proteínas.⁵²

A partir de la aplicación de esta estrategia de disgregación se lograron obtener suspensiones homogéneas, las cuales podían ser cuantificadas exitosamente mediante el kit comercial “DC Protein Assay”, ya antes empleado.

Durante el análisis electroforético de 2D se consideró que una de las causas más frecuentes de interferencia en los análisis, fue la presencia de sales en las muestras.^{53,54} Por esta razón, una de las estrategias utilizadas fue el empleo de las columnas cromatográficas comerciales Micro Bio-Spin. Sin embargo, se encontró que la concentración de las proteínas disminuyó en las muestras desalinizadas; la evaluación de las columnas con otras muestras diferentes mostró que no eran las muestras de *Giardia* las que estaban produciendo el

problema de la pérdida de proteínas, sino que eran las columnas quienes retenían a las proteínas durante la desalinización. Pero al observar que en los geles unidimensionales no hubo diferencia entre el patrón electroforético de la muestra dializada y sin dializar, indicando que la concentración de sales en este caso no afecta el corrimiento electroforético. Por lo que se decidió utilizar las muestras sin dializar para su análisis.

Una vez que se establecieron las condiciones electroforéticas, se continuó con el análisis unidimensional comparando el patrón electroforético de las muestras tratadas con el control. Un gel representativo de ello se muestra en la Figura 19 y su respectivo análisis densitométrico (Figura 20). Los cambios más notorios se presentaron en 50 kDa donde están localizadas las tubulinas y el grupo de proteínas alrededor de 30 kDa (Figura 19 Región D) en las cuales están unas proteínas nombradas giardinas.¹⁸ Estudios realizados por el grupo de Clark y Holberton en 1988 encontraron que estas proteínas estaban definidas en 5 bandas en electroforesis SDS-PAGE.⁴⁷ Con estos resultados se consideró que ya estaban las condiciones de evaluación de las muestras mediante electroforesis bidimensional.

Para el análisis en 2D, una de las primeras decisiones que se tomaron consistió en aplicar el isoelectroenfoco en tiras IPG con un intervalo de pH amplio 3-10 NL, con lo que se consideró que se lograría separar eficientemente a todas las proteínas que estuvieran presentes en el extracto de *G. intestinalis*. Uno de los mapas proteómicos obtenidos bajo esta estrategia se muestra en la Figura 21A. Observamos que en comparación con los geles obtenidos en una dimensión, hay una menor cantidad de proteínas reveladas luego de la tinción con Sypro Ruby. Esto se debe a que no todas las proteínas contenidas en las muestras logran ser incluidas en los análisis en 2D, debido a las limitantes de la técnica como son: alto peso molecular y grado de hidrofobicidad de las proteínas,³⁹ cantidad de proteína empleada y tipo de tinción usada.⁴⁷

En los mapas proteómicos obtenidos se encontró que las proteínas se concentraron dentro de los intervalos de PM de 75 a 20 kDa y de pI de 4 a 6. Una explicación de porque la mayoría de las proteínas están localizadas dentro de estos intervalos, podría tener relación con que los trofozoítos de *G. intestinalis* se encuentran en el intestino humano que brinda un ambiente de pH 4-7 y por esto las proteínas mantienen estas características encontradas en los geles.⁵⁵ El patrón de separación de las proteínas por 2D fue similar a lo presentado en un trabajo de investigación publicado bajo condiciones semejantes.⁴⁷

Debido a que en los mapas proteómicos iniciales se encontró que la mayoría de las proteínas estaban localizadas en el intervalo de pH de 4 a 6, se decidió emplear tiras IPG con

un intervalo de pH 4-7, con la finalidad de ampliar la ventana en la que se estaban visualizando las proteínas para mejorar los perfiles proteicos. Esto se muestra en la Figura 21B, donde se observó una mejor resolución de las proteínas en estudio, mostrando semejanzas a lo ya publicado.⁴⁷ Los resultados obtenidos bajo estas condiciones se consideraron los óptimos para llevar a cabo los mapas proteómicos de las muestras y la comparación del efecto que pudieran tener los compuestos en la expresión de las proteínas.

Luego de su tinción con Sypro Ruby y el empleo del programa computacional PDQuest, se encontró que en los mapas proteómicos finales se detectaron aproximadamente 96 proteínas. Se puso especial interés en un grupo de proteínas situadas ~30 kDa y pI entre 5 a 6.5 (Figura 21A, Región E). Estas proteínas se encontraron expresadas de forma abundante, que por las características mencionadas podrían corresponder a giardinas, proteínas del citoesqueleto exclusivas en este tipo de parásitos, localizadas en las microcintas dentro del disco ventral.^{18,47,56} La α -giardina está implicada en la integridad estructural del disco por sus interacciones con otras proteínas en las microcintas o los puentes de enlace.¹⁸ Se plantea que las giardinas podrían mantener la estructura del disco, el cual se une al epitelio intestinal del hospedero, por lo consiguiente cualquier situación que desestabilice su estructura o su expresión puede impedir la adherencia del parásito.⁵⁵ Otro grupo de proteínas hacia las que se puso atención fueron las tubulinas, proteínas localizadas en el intervalo de 50-60 kDa, presentan un pI de 5. Por las características indicadas, podrían corresponder a las incluidas en la región C (Figura 21B). Las tubulinas constituyen a los microtúbulos y en los parásitos en estudio se les ha encontrado que forman parte del disco ventral, de los cuerpos medios y de los flagelos.⁴⁷ Es conocido que cualquier fenómeno que altere la estructuración de los microtúbulos, como la presencia de agentes físicos o químicos, produce que las células o los organismos pierdan su soporte mecánico, ya que participan en el mantenimiento de la forma celular; también se cree que forman parte en la organización interna de las células, son considerados agentes de motilidad intracelular por lo que el transporte de materiales de un compartimiento de membrana a otro depende de la presencia de microtúbulos y la interrupción específica de estos elementos citoesqueléticos detiene los movimientos.³¹ De acuerdo con las comparaciones entre los mapas proteómicos obtenidos y lo reportado en la literatura para las proteínas mencionadas, es posible que algunas de las proteínas estén incluidas en las regiones de los mapas proteómicos indicados; sin embargo, la adecuada identificación de las proteínas tendría que ser llevada a cabo mediante inmunquímica o espectrometría de masas.^{57,58}

Con las condiciones establecidas para la electroforesis en 2D y la distribución de las proteínas en los mapas proteómicos del control, se obtuvieron los proteomas de las muestras tratadas con MTZ y RSD-8. La buena resolución de los mapas, permitió establecer que el patrón proteico encontrado era diferente para algunas proteínas, luego de su comparación con los mapas proteómicos del grupo control, por lo que se supuso que se debían al efecto que los compuestos podrían tener en la expresión de las proteínas.

En el caso de las muestras tratadas con MTZ se encontró que sus proteomas tenían una distribución similar al del grupo control. Sin embargo, una de las diferencias más notables fue el número de proteínas, ya que se encontraron alrededor de 102 contra las 96 del grupo control. Es posible que el compuesto haya producido cambios en la expresión de las proteínas, tanto que haya propiciado la ruptura de algunas de ellas o bien, que haya inducido a la expresión de otras proteínas, como las que se destacan en la región A de la Figura 22. Las cuales fueron encontradas bajo las mismas características de expresión y localización que las tratadas con RSD-8 (Figura 22). Se ha establecido que el mecanismo de acción del MTZ es por medio de su grupo nitro, el cual sufre reacciones redox al interactuar con la PFOR generando especies reactivas de oxígeno “ROS”, causando daños en las proteínas del parásito, lo que a la postre lo lleva a la muerte.²⁴ Uno de los mecanismos de defensa de los organismos contra tales sustancias reactivas, es por medio de la producción de proteínas como la tiorredoxin reductasa y peroxidasa, las cuales tienen como función eliminar especies ROS.⁵⁹ Pudiera ser que la cantidad de especies ROS producidas por el MTZ permite una mayor actividad de éstos o bien, no permite que el parásito la produzca en gran cantidad para protegerlo del daño.

En lo referente a los proteomas de las muestras tratadas con el compuesto RSD-8, se encontró que la distribución de las proteínas también es semejante a las encontradas en los mapas proteómicos de las muestras control. Al igual que con el MTZ se encontraron más proteínas (119 de 96 del control). Según lo que se observa, bajo el tratamiento con RSD-8, el alto deterioro de los parásitos se correlaciona con la supresión e inducción de la expresión de ciertas proteínas; estas últimas se aprecian en la región R de la Figura 22, las cuales sólo se encontraron expresadas en los proteomas de las muestras tratadas con RSD-8. No hay evidencia actual de cómo es que el compuesto RSD-8 podría estar afectando a las proteínas; ya que dicho compuesto se diseñó como parte de una generación de bencimidazoles con modificaciones estructurales cuyo principal objetivo es optimizar su actividad farmacológica,

a fin de disponer de fármacos más selectivos, menos tóxicos, con mejor farmacocinética y disminuir problemas de formulación debidos a su solubilidad o estabilidad inadecuadas.⁶⁰

Debido a su estructura bencimidazólica se propone que el RSD-8 podría utilizar un mecanismo de acción semejante al Sulfóxido de Albendazol (SOABZ) ya que ambos compuestos son análogos del bencimidazol. El SOABZ es un benzimidazol que evita la polimerización de la tubulina, específicamente por su interacción con la β -tubulina.^{61,62}

Bajo estos análisis no es posible establecer cual podría haber sido la causa del aumento en el numero de proteínas, ni si tal efecto fue de manera directa o indirecta mediante la modificación de alguna ruta metabólica, que indujera la síntesis de algunas proteínas de protección.

Es necesario aclarar que durante las comparaciones entre los proteomas de las muestras de parásitos tratados y control, se compararon las proteínas que presentaron los cambios más claros, mientras que las proteínas que se encontraron con una baja intensidad de expresión se descartaron para su análisis.

Por los resultados de los análisis de las proteínas sometidas al efecto de los compuestos, es claro que la estrategia experimental realizada (análisis de ultraestructura, evaluación electroforética en una y dos dimensiones), emplea herramientas eficientes que ayudan a evaluar el efecto de cualquier compuesto en parásitos. Esto permite conocer cuáles son las proteínas blanco involucradas, cuando los estudios se continúan con sistemas de identificación, como lo es la espectrometría de masas. Estas estrategias han venido siendo consideradas como de vanguardia en el estudio de fármacos o sustancias con potencial farmacológico, ya que brindan la oportunidad de establecer los blancos de acción de las sustancias en estudio.^{41,42} Por lo anterior, el presente trabajo de tesis abre un mundo de oportunidades para efectuar estudios semejantes en diferentes parasitosis en los que se busquen evaluar posibles nuevos fármacos.

8. Conclusiones

1. El patrón en la expresión de proteínas de *G. intestinalis* se modificó ante la presencia de compuestos giardicidas, RSD-8 y MTZ, afectando su estructura y la expresión de proteínas, por lo tanto se acepta la hipótesis.
2. Se observaron alteraciones en la morfología de los trofozoítos a nivel de MEB, después del tratamiento con los compuestos, los cuales estuvieron principalmente localizados en la membrana, los flagelos y la región del disco ventral, para ambos compuestos.
3. El compuesto RSD-8 demostró tener mayor daño sobre la estructura de los trofozoítos con respecto al MTZ.
4. Los patrones electroforéticos de los extractos totales de los parásitos demostraron que son útiles para evaluar si hay efecto en la expresión de proteínas, luego del tratamiento *in vitro* con los compuestos.
5. En los análisis electroforéticos en una dimensión se encontró que mientras mayor sea el contacto de los parásitos con los compuestos, mayor es el efecto producido. En el caso de las concentraciones utilizadas de los compuestos éstas no influyeron en las alteraciones de los patrones electroforéticos.
6. Hubo diferencias en el patrón electroforético de los extractos de parásitos que se trataron con MTZ y RSD-8, comparados con el control.
7. Se obtuvieron los mapas proteómicos de extractos totales de trofozoítos de *G. intestinalis* dentro de un intervalo de pH de 3-10 NL, en tiras de 7 cm, y se encontró que la mayoría de las proteínas son de naturaleza ácida situadas en el intervalo de pI de 4 a 6.
8. Se observó un mayor número de modificaciones en las muestras tratadas con el RSD-8, en comparación con las producidas por el MTZ.
9. Se encontraron regiones que en base a su peso molecular y punto isoeléctrico, que concordaban con proteínas de citoesqueleto, tales como la β -tubulina y las α -giardinas, las cuales fueron modificadas por los tratamientos.

Perspectivas.

Debido a que algunas proteínas sufrieron cambios en su expresión por efecto de los compuestos, éstas se podrían identificar mediante la técnica de espectrometría de masas. Con base en los resultados obtenidos, se podría determinar el tipo de proteínas y cuáles son sus funciones en el parásito. Con ello, cabría la posibilidad de relacionarlas con un posible mecanismo de acción del derivado estudiado. Por otro lado, con el empleo de la microscopía electrónica de transmisión se podría establecer cuál es el daño que se produce sobre el disco ventral y el interior del cuerpo del parásito, así como alteraciones en núcleos, microtúbulos, microcintas, etc. Las evaluaciones bioquímicas e inmunoquímicas, podrían ayudar a establecer la localización de los cambios que se inducen en las proteínas, ya sea por el efecto directo o indirecto de los compuestos. Es posibilidad, que se pudiese determinar el mecanismo de acción de los compuestos, así como detectar exactamente a la proteína blanco o bien, con base a la interacción con las proteínas, los compuestos podrían ser rediseñados bajo un esquema de diseño racional de fármacos que permitiese encontrar un agente farmacológico más eficiente, de los que existen actualmente en el mercado.

Referencias hemerobibliográficas.

1. Rivera M, Hurtado P, Magaldi L, Collazo M. Intestinal giardiasis. Mini-review, *Invest Clin*. 2002; 43(2):119-28.
2. Arena Sánchez, Ernesto Zorrilla, Enfermedades infecciosas, México.
<http://www.monografias.com/trabajos12/enfin/enfin.shtml>
3. Gómez JA, Rodríguez R, González MI. Parasitosis intestinales frecuentes. Protocolos diagnósticos y terapéuticos en pediatría. 2000.
<http://www.aeped.es/protocolos/infectologia/28-Parositosisintestinales.pdf>
4. Solarte Y, Peña M, Madera C. Transmisión de protozoarios patógenos a través del agua para consumo humano, *Colomb Med*. 2006; 37(1): 74-83.
5. Flisser A, Pérez RT. Aprendizaje de la parasitología basado en problemas, México, 1ª edición, Editores de textos mexicanos, 2006, Cap. 40 Giardiosis. 381-391.
6. Becerril MA, Romero R. Parasitología Médica de las moléculas a la enfermedad, México, Mc Graw Hill, 2004, 49-57.
7. Lujan HD. *Giardia* y giardiasis. *Medicina (B. Aires)*. 2006; 66 (1):70-74.
8. Upcroft P, Upcroft JA. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa, *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14(1):150-64.
9. Dirección general de epidemiología. Boletín Epidemiología. Semana 1-52, 2006.
<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2007/sem01/index.htm>
10. Alvarado BE, Vásquez LR. Determinantes sociales, prácticas de alimentación y consecuencias nutricionales del parasitismo intestinal en niños de 7 a 18 meses de edad en Guapi, *Biomédica*. 2006; 26(1):82-94
11. Hausen MA, Freitas JM, Monteiro LL, The effects of metronidazole and furazolidone during *Giardia* differentiation into cysts, *Exp Parasitol*. 2006; 113(3):135-41.
12. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*, *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14(3): 447-475.
13. Dolezal P, Smid O, Rada P, Zubáková Z, Bursác D, Suták R, Nebesárová J, Lithgow T, Tachezy J. *Giardia* mitosomes and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proc Natl Acad Sci*. 2005; 102 (31):10924-9.
14. Tovar J, León-Avila G, Sánchez LB, Sutak R, Tachezy J, van der Giezen M, Hernández M, Müller M, Lucocq JM. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*. 2003; 426(6963):172-6.
15. Hehl AB, Regos A, Schraner E, Schneider A. Bax function in the absence of mitochondria in the primitive protozoan *Giardia lamblia*. *PLoS ONE*. 2007; 30;2:e488.
16. Faubert G. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev*. 2000; 13(1):35-54.
17. Cedillo-Rivera R, Chávez B, González-Robles A, Tapia A, Yepez-Mulia L. *In vitro* effect of nitazoxanide against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *J Eukaryot Microbiol*. 2002; 49(3):201-208.
18. Peattie DA, Alonso RA, Hein A, Caulfield JP. Ultrastructural localization of giardins to the edges of disk microribbons of *Giardia lamblia* and the nucleotide and deduced protein sequence of alpha giardina. *J Cell Biol*. 1989; 109 (5): 2323-35.
19. Piva B., Benchimol M. The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. *Biol Cell*. 2004; 96(9):735-46.
20. Benchimol M, Piva B, Campanati L, de Souza W. Visualization of the funis of *Giardia lamblia* by high-resolution field emission scanning electron microscopy-new insights. *J Struct Biol*. 2004; 147(2):102-15.
21. Guimaraes S, Sogayar MI, Franco M. Analysis of proteins from membrane and soluble fractions of *Giardia duodenalis* trophozoites of two Brazilian axenic strains; *Rev Inst Med Trop*. 2002; 44(5):239-44.

22. Goodman LS, Gilman A, Bruton LL, Lazo J, Parker KL. Goodman & Gilman The Pharmacological basis of therapeutics, Ed. McGraw-Hill Medical Publishing; New York, México City, 2006, 11ª Edición, 1049-1069.
23. Johnson PJ. Metronidazole and drug resistance. *Parasitol Today*. 1993; 9(5):183-6.
24. Kehrer JP. Cause-effect of oxidative stress and apoptosis. *Teratology*. 2000; 62(4):235-6.
25. Upcroft JA, Dunn LA, Wright JM, Benakli K, Upcroft P, Vanelle P. 5-Nitroimidazole drugs effective against metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(1):344-7.
26. Townsend LB, Wise DS. The synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles. *Parasitol Today*. 1990; 6(4):107-12.
27. Navarrete G, Cedillo R, Hernández A, Yépez L, Hernández L, Valdez J, Morales R, Cortés R, Hernández M, Castillo R. Synthesis and Antiparasitic Activity of 2-(trifluoromethyl)-bencimidazole derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*. 2001 ;11(2):187-90.
28. Valdez J, Cedillo R, Hernández A, Yépez L, Hernández L, Navarrete G, Tapia A, Cortés R, Hernández M, Castillo R. Synthesis and Antiparasitic Activity of 1H-Bencimidazole Derivates, *Bioorg Med Chem Lett*. 2002; 12(16):2221-4
29. Sánchez R. Tesis de Maestría. Síntesis de derivados del 1-metilbencimidazol con actividad antihelmintica potencial. Facultad de Química, UNAM, México, 1999.
30. Valdez JG. Tesis de Maestría. Diseño, síntesis y actividad biológica de 1H-Bencimidazoles, Facultad de Química, UNAM, México, 2000.
31. Karp G. Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos, 4ª Edición Mc Graw Hill Interamericana, USA, 2005
32. Lacey E. Mode of action of Bencimidazoles, *Parasitology Today*. 1990; 6(4):112-115
33. Busatti H G. N. O., Gomes MA. A simple colourimetric method to determine anti-giardial activity of drugs, *Parasitol Res*, 2007, 101:819–821
34. Callad D.D., Pasiéka A., King-Holmes J. La révolution du Médicament, *Science & Vie Hors*. 2002; 218, 20-26
35. García G., Fajardo I. Aproximaciones proteómicas a los sistemas biológicos. 2005 <http://www.encuentros.uma.es/encuentros105/proteomica.htm>
36. Jeffery DA, Bogyo M. Chemical proteomics and its application to drug discovery. *Curr Opin Biotechnol*. 2003; 14(1):87-95.
37. Cooper RA, Carucci DJ, Proteomic Approaches to Studying Drug Targets and Resistance in Plasmodium. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2004; 4(1), 41-51
38. Liebler DC. Introduction to Proteomics. Tools for the New Biology Humana Press, 2002, 3-29
39. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *NATURE*. 2000; 405(15):837-845
40. Casado J. Aproximación proteómica al estudio de podredumbre apical, 2003, España http://descargas.cervantesvirtual.com/servlet/SirveObras/01604074325695063002257/013113_5.pdf
41. Chapala N, Molina M, Molina F, Laplanche M, Paub B, Petit P. Pharmacoproteomic approach to the study of drug mode of action, toxicity, and resistance: applications in diabetes and cancer. *Fundam Clin Pharmacol*. 2004; 18(4): 413–422
42. Steiner S, Anderson NL. Pharmaceutical Proteomics. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 919:48-51.
43. Cedillo R, Muñoz O. *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents, *J Med Microbiol*. 1992; 37(3):221-224.
44. Guimaraes S, Sogayar MI, Franco MF. Protease activity in *Giardia duodenalis* trophozoites of axenic strains isolated from symptomatic and asymptomatic patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 98(1):77-81.

45. González L, Tesis de licenciatura. Comparación del reconocimiento de dos anticuerpos monoclonales producidos contra parásitos adultos de *T. solium*, hacia diferentes miosinas. Facultad de Química, UNAM. 1998.
46. Mariante RM, Vancini RG, Melo AL, Benchimol M. *Giardia lamblia*: evaluation of the *in vitro* effects of nocodazole and colchicines on trophozoites. *Exp Parasitol.* 2005;110(1):62-72.
47. Hernández PC, Caldas ML, Wasserman M. Enquistación *in vitro* de *Giardia lamblia* análisis por electroforesis bidimensional de proteínas expresadas diferencialmente; *Biomédica*, 2002; 22 (3): 253-62.
48. Tay JZ, Velasco OC, Lara RA, Gutiérrez MQ, Parasitología Médica. Méndez Editores, 7ª Edición, México, 2002, 87-93
49. Oxberry ME, Thompson RC, Reynoldson JA. Evaluation of the effects of albendazole and metronidazole on the ultrastructure of *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Spironucleus muris* using transmission electron microscopy. *Int J Parasitol.* 1994; 24(5):695-703.
50. Mueller J, Sterk M, Hemphill A, Mueller N. Characterization of *Giardia lamblia* WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60(2):280-7.
51. Krohn RI. The colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein , *Current Protocols in Cell Biology*, 2002,A3H.1-A.3h.28.
52. Técnicas de fragmentación y separación de los componentes de las células 2003 <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/fraccionamiento.htm>
53. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics.* 2004; 4(12): 3665–85
54. Görg A. 2-D Electrophoresis Principles and Methods Handbooks from GE Healthcare, Germany,2004. Germany. http://biology.mcgill.ca/CIAN/PDFs/2D_manual.pdf
55. Romero RC, Microbiología y Parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas. Editorial Médica Panamericana, 2001, 1ª Edición, México, Editorial Médica Panamericana, 604-607.
56. Heyworth MF, Foell JD, Sell TW. *Giardia muris*: evidence for a β -Giardin homologue. *Exp Parasitol.* 1999; 91(3):284-7.
57. Hamady M, Cheung TH, Resing K, Cios KJ, Knight R. Key challenges in proteomics and proteoinformatics. *Progress in proteins. Eng Med Biol Mag.* 2005; 24(3):34-40.
58. Barret J, Brophy PM, Hamilton JV. Analysing proteomic data. *Int J Parasitol.* 2005; 35(5): 543-53
59. Brown DM, Upcroft JA, Upcroft P. A thioredoxin reductase-class of disulphide reductase in the protozoan parasite *Giardia duodenalis*, *Mol Biochem Parasitol*, 1996; 83(2):211-20.
60. Avendaño LC. Introducción a la Química Farmacéutica, 2ª edición, Mc Graw Hill Interamericana, España, 2001.
61. Robinson MW, McFerran N, Trudgett A, Hoey L, Fairweather I. A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *J Mol Graph Model.* 2004; 23(3):275-84.
62. Lacey E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol.* 1988; 18(7):885-936.
63. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Pretein Measurement with the Folin Phenol Reagent”, *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-75.
64. BIO-RAD (2000). DC Protein Assay. Instruction Manual. Bio-Rad Laboratories. USA

Apéndice.**Técnica 1.** Cuantificación de proteínas por el kit Protein Assay DC (Bio-Rad).

Es una técnica modificada de Lowry.^{63,64}

Protocolo para microensayo en placa (NUNC Apogent de 96 pozos de fondo plano).

Reactivo A: Solución alcalina de tartrato de cobre.

Reactivo S: SDS.

Reactivo A': 20 μ L S + 1mL A*

Reactivo B: Reactivo de Folín diluido.

Proteína estándar: ASB fracción V (SIGMA).

*Preparar en el momento de usarse.

- A. Se preparó una solución stock de 10 mg/ml de albúmina (Sigma) diluida en el mismo buffer que la muestra a cuantificar. Se realizó una curva patrón como se menciona a continuación.

(μ L) Sol. stock 10mg/mL de ASB	(μ L) Buffer de la muestra.*	Conc. mg/mL
0	200	0
10	190	0.5
20	180	1
40	160	2
60	140	3
100	100	5

*Si se desconoce el buffer de la muestra se emplea agua Milli-Q.

- B. Se preparó el reactivo de trabajo al adicionar 20 μ L del reactivo S por cada mL de reactivo A

C. Determinación.

1. En una placa, se depositaron 5 μ L por duplicado de cada concentración de la curva estándar y de las muestras experimentales a analizar.
2. Se adicionaron 25 μ L de reactivo A se agregaron 200 μ L de reactivo B por pozo. Se agito suavemente la placa.
3. Se incubó 15 min a temperatura ambiente y se leyó a 750 nm en el lector BIO-TEK instruments Microplate EL 307C.

Técnica 2. Electroforesis unidimensional.

Geles de poliacrilamida al 10% con 0.1% de SDS, de 8 X 5.5 cm.

Preparación de geles.

1. Se prepararon por separado por separado las mezclas del gel separador y concentrador como se indica en la tabla 1.
2. Se depositó primero el gel separador y al polimerizar la solución concentradora al 4% se coloca el peine.

Tabla 1. Soluciones requeridas para la preparación de los geles de poliacrilamida.

Soluciones	Gel concentrador	Gel separador
Concentración del gel †	4%	10%
Acrilamida-bisacrilamida 30%	1.33 mL	10 mL
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	2.5 mL	-----
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	-----	7.5 mL
SDS 10 %	100 µL	300 µL
H ₂ O Milli-Q	6.1 mL	12.05 mL
Adicionar hasta el momento de hacer el gel.		
TEMED	10 µL	15 µL
PSA 10 %	50 µL	150 µL

† Cantidades necesarias para preparar 4 mini-geles.

Corrimiento electroforético.

1. Colocar los geles en la cámara de electroforesis Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell, de 12 x 16 x 18 cm (Bio-Rad). Llenar con la solución amortiguadora de corrida necesaria para cubrir los geles.
2. Preparación de la muestra. La muestra se descongeló a temperatura ambiente y se tomó una alícuota equivalente a 30 µg de proteína, posteriormente se solubilizó en una proporción 2:1 en una solución amortiguadora comercial de Laemmli 2X (Bio-Rad). Inmediatamente se colocaron las muestras en ebullición en baño María por 5 min.
3. Enseguida, las muestras se aplicaron en el gel. Se utilizó una fuente de poder Power Pack 1000 (Bio-Rad), se aplicaron 50 V el tiempo necesario para que las muestras entren en el gel concentrador. Para la separación de las proteínas se ajustaron las condiciones de fraccionamiento a 80 V durante 2 h aproximadamente.
4. El seguimiento de la electroforesis se hizo mediante la visualización del corrimiento del azul de bromofenol, se detuvo hasta que el frente de la muestra llegó a 0.5 cm del borde inferior del gel.

Solución amortiguadora de almacenamiento

	Cantidad
Tris base	18.15 g
H ₂ O destilada	100 mL
Ajustar a pH 8.8	
SDS 10%	4 mL
H ₂ O destilada	400 mL

Solución amortiguadora de corrida 5X

	Cantidad
Tris base	9 g
Glicina	43.2 g
SDS	3 g
H ₂ O destilada	1 L

Técnica 3. Electroforesis bidimensional.

1. Preparación de la muestra.

Se tomo una alícuota equivalente a 50 μg de proteína, según lo recomendado por el fabricante. La muestra se resuspendió en una solución amortiguadora de rehidratación, para solubilizar las proteínas, evitar la agregación, promover la desnaturalización, y reducción de todas las proteínas en la muestra.

2. Primera dimensión.

PASO 1. Hidratación en tiras IPG.

1. Se depositaron 125 μL de la mezcla que contiene la muestra (Solución A) a lo largo de un carril de una charola de hidratación de 7 cm de longitud.
2. Se colocó cuidadosamente la tira, con el gel hacia abajo en el carril que contenía la muestra.
3. Cada se cubrió con 1 mL de aceite mineral y se incubó 16 h a temperatura ambiente.

PASO 2. Isoelectroenfoque.

1. Se empleó una charola de isoelectroenfoque de 7 cm; se colocó un puente de papel filtro sobre cada electrodo de platino que corresponden al ánodo y cátodo del carril a utilizar. Se impregno cada puente con 8 μL de agua Milli-Q.
2. Se sacaron de la charola de rehidratación las tiras se colocaron en la charola de isoelectroenfoque con el gel hacia abajo. El gel debe hacer contacto con el puente y el electrodo correspondiente. Se cubrió cada tira con 1 mL de aceite mineral.
3. La unidad IEF se programó con las siguientes condiciones. La temperatura base de la unidad es 20°C. La corriente máxima por tira fué de 50 μA .

Paso 1: 100 V, 30 min rápido

Paso 2: 3000 V, 3 h lineal

Paso 3: 4000 V, 65000 V/h rápido

Paso 4: 50 V, 16 h rápido

4. Los puentes se cambiaron entre los 60-120 min, después de iniciada la corrida.

Si no se podía continuar con el procedimiento terminada la corrida, las tiras se almacenaron a -70°C.

Paso 3. Equilibrio de la primera dimensión.

1. Se removió la tira de la charola de isoelectroenfoque y se colocó sobre papel filtro con el gel hacia arriba.
2. Solución amortiguadora de equilibrio (Solución B). 50 mg de DTT con 5 mL de solución amortiguadora de equilibrio y se incubó la tira por 15 min en agitación. Al terminar se incubó con 125 mg de IAA en 5 mL de solución amortiguadora de equilibrio, 15 min en agitación. Se retiró la tira y enjuagó por ambos lados con agua Milli-Q.

3. Segunda dimensión SDS-PAGE.

1. En la cámara XCell Sure Lock Mini-Cell (Invitrogen) se corrió la segunda dimensión en geles prehechos comerciales Gel casete NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris ZOOM, 1.0 mm (Invitrogen).
2. Se colocó la tira en el pozo grande del gel con el lado (+) junto al pozo de los PM, se selló el canal con 200 μL de agarosa de bajo punto de fusión, líquida 0.5%. Se esperó a que solidifique.
3. En el pozo pequeño se colocaron 3 μL de pesos moleculares no teñidos (Bio-Rad).

4. Se adiciono entre los 2 geles solución amortiguadora de corrida comercial MES-SDS NuPAGE (Invitrogen), suficiente para cubrir los pozos
5. Las condiciones de corrida de los geles fueron: Paso 1: 50V, 30 min., Paso 2: 200 V, 1 h. El seguimiento de la electroforesis se hizo mediante la visualización del corrimiento del azul de bromofenol presente en la agarosa.

*Solución de rehidratación.		
	Concentración final	Cantidad requerida
Urea	8 M	0.6 g
CHAPS	2 %	0.025 g
Azul de bromofenol	0.002 %	2.5 µL
H ₂ O Milli-Q	Aforar a	1.25 mL

A. Solución amortiguadora de rehidratación con la muestra.		
	Concentración final	Cantidad requerida
Urea ¹	8 M	0.0096 g
CHAPS	2 %	0.0004 g
Muestra ²	50 µg proteína	20 µL
DTT (stock 132.8mg/mL)	1.3 %	2.6 µL
Buffer IPG ³	2 %	2.5 µL
Solución de rehidratación*.	Aforar a	125 µL V _T por tira

¹La urea aumenta el volumen de la muestra por lo que se debe aforar hasta que se encuentre totalmente disuelta.

²Ejemplo para una muestra de concentración 2.5µg/µL. La cantidad de muestra a poner debe contener 50µg de proteína.

³El buffer IPG a emplear será en relación al tipo de tira que se utilice (3-10NL, 4-7).

B. Solución amortiguadora de equilibrio.		
	Concentración final	Cantidad requerida
1.5 M Tris base, pH 8.8 ¹	50 mM	1.173 mL
Urea ²	6 M	12.612 g
Glicerol ³	30 %	12.075 mL
SDS	2 %	0.7 g
Azul de bromofenol	0.002 %	70 µL
H ₂ O Milli-Q	Aforar a	35 mL

¹Pesar 18.15g diluir en 50 mL de agua Milli-Q ajustar el pH a 8.8, aforar a 100 mL y filtrar a través de 0.22 µm.

²La urea aumenta el volumen de la muestra por lo que se debe aforar hasta que se encuentre totalmente disuelta.

³Se emplean 5.17 mL de glicerol al 87 % para preparar 15 mL de glicerol al 30 %.

Agarosa 0.5%. Disolver 500 mg de agarosa de bajo punto de fusión en 10 mL de buffer de corrida 10X adicionar 20 µL de azul de bromofenol y aforar a 10 mL con agua Milli-Q.

Técnica 4. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.

1. Tinción con Azul de Coomassie.

Procedimiento:

1. Se colocó el gel 1 o 2 h en una solución al 0.2% de azul de Coomassie (Tabletas Phast Gel Blue R-350, Pharmacia,).
2. Para eliminar el exceso de colorante se colocó el gel en una solución de desteñido que finalizó cuando las proteínas eran visibles y el fondo del gel transparente.

Solución de desteñido	
Agua	250 mL
Metanol	200 mL
Ácido acético	50 mL

2. Tinción con Sypro-Ruby.

Protocolo rápido.

Fijar

1. El gel se colocó en un recipiente apto para calentar en microondas.
2. Se agregaron 100 mL de solución para fijar, se agitó moderadamente por 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Posteriormente se desechó la solución y se agregaron 60 mL de Sypro Ruby. El recipiente se cubrió de la luz.
4. Se calentó 15 segundos en microondas y se agitó por 5 minutos a temperatura ambiente. Repetir dos veces más, durante 10 segundos en el microondas.
5. Se agitó moderadamente 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Se retiró el Sypro Ruby y se lavó.

Lavar

7. Se pasó el gel a un recipiente con 100 mL de solución de lavado por 30 min y se cubrió de la luz.
8. Al finalizar se lavó con agua Milli-Q 2 veces por 5 min.

Solución fijadora (200 mL)*		Solución de lavado (100 mL)*	
Metanol	100 mL	Metanol	10 mL
Ácido acético	14 mL	Ácido Acético	7 mL
Agua destilada	cbp.	Agua destilada	cbp.
*Volumen empleado para geles chicos 8 X 6.7 cm.			