



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Evaluación del efecto del albendazol y del derivado
bencimidazólico GNV-14 sobre el citoesqueleto de la larva
muscular de *Trichinella spiralis***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

DIEGO MAURIZIO CORIA PAREDES



**DIRECTORA DE TESIS:
Dra. LILIÁN YÉPEZ MULIA
2014**



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.

Hoja de datos del Jurado

1. Alumno: Diego Maurizio Coria Paredes
Carrera: Biología
Número de cuenta: 300147935
Modalidad: tesis
Correo electrónico: dcoria84@yahoo.com.mx
2. Presidente: Dr Javier Rolando Ambrosio Hernández
Correo electrónico: jrah@unam.mx
3. Vocal: Dr Rogelio Aguilar Aguilar
Correo electrónico: raguilar@ciencias.unam.mx
4. Secretario y tutor: Dra Lilián Yépez Mulia
Correo electrónico: lilianyepez@yahoo.com
5. Suplente: Dra. Patricia Margarita Tato Zaldívar
Correo electrónico: tato@unam.mx
6. Suplente: Dr. Luis Felipe Jiménez García
Correo electrónico: luisfelipe_jimenez@ciencias.unam.mx

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial a la Dra. Lilián Yépez Mulia, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis, por sus consejos, paciencia, confianza y por todo el apoyo brindado en los momentos que más lo requerí.

A los miembros del jurado: Dr. Javier Ambrosio, Dr. Rogelio Aguilar, Dra. Patricia Tato y Dr. Luis Felipe Jiménez, por sus valiosos consejos y por estar siempre en la mejor disposición de ayudar.

A mis compañeros de laboratorio: Chío, Luz, Félix, Toño y Gerardo, por haber hecho más amena mi estancia en el laboratorio.

Al personal del Laboratorio de Parasitología de la UIMEP-IMSS del Centro Médico Nacional Siglo XXI por el apoyo técnico para la realización de este trabajo: Jesús, Jorge, Amparito, y Dra. Samira.

A la M en C Erika Pompa y a Esteban Muñoz del Centro Médico Nacional la Raza por la ayuda en el procesamiento de datos.

Al Lic. en Diseño Gráfico José Manuel Retana por la elaboración del ciclo de vida mostrado en esta tesis.

A todos mis amigos y amigas de la carrera, por habernos conocido y por formar parte de este ciclo tan importante en mi vida.

A Rocío, por que siempre estás ahí para apoyarme.

Finalmente, agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de desarrollarme en el ámbito académico y personal, desde el CCH hasta la Facultad.

Dedicatorias

Dedico esta tesis a mi madre y a mi abuela, quienes siempre han estado conmigo en cada paso de mi vida, este logro también es suyo y sé que lo han esperado tanto como yo. ¡Gracias por todo!

A mis tíos y tías, con quienes siempre he podido contar y que gracias a su apoyo pude concluir este ciclo tan importante en mi vida.

A mis primos y primas, quienes más que primos son como mis hermanos. Gracias por soportarme.

A todas las personas que me conocen y que me han apoyado en mis estudios en la Facultad de Ciencias, UNAM.

ÍNDICE GENERAL

I	ÍNDICE DE FIGURAS	VII
II	ÍNDICE DE TABLAS	VIII
III	RESUMEN	IX
IV	ABREVIATURAS	X
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO	3
	Género <i>Trichinella</i>	3
	Clasificación taxonómica	3
	<i>Trichinella spiralis</i>	4
	Ciclo de vida	7
	Mecanismos patogénicos y manifestaciones clínicas	9
	Epidemiología	10
	Diagnóstico	12
	Tratamiento	12
	Mecanismo de acción de los bencimidazoles	14
	Resistencia a los bencimidazoles	15
	Desarrollo de nuevos derivados bencimidazólicos con actividad antiparasitaria	17
	Determinación de la actividad antihelmíntica <i>in vivo</i> de GNV-14	20
	Análisis por MEB y MET de los cambios inducidos por GNV-14 en la LM	21
	Análisis proteómico del efecto de GNV-14 sobre las LM de <i>T. spiralis</i>	24
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
4.	HIPÓTESIS	27
5.	OBJETIVO GENERAL	27
	Objetivos particulares	27
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	28
	Obtención de LM de <i>T. spiralis</i>	28
	Conteo de LM	29
	Tratamiento de las LM con GNV-14 y ABZ	29
	Obtención de extractos solubles de LM	29
	Cuantificación de extractos solubles	30
	Electroforesis en geles poliacrilamida (SDS-PAGE)	31
	Análisis de los extractos solubles por Western blot	32
	Obtención de DNA genómico	34
	Obtención de RNA total	35
	Eliminación de DNA genómico y purificación de RNA	35
	Verificación de la integridad del RNA obtenido	36
	Diseño de iniciadores específicos	36
	Análisis de la ausencia de DNA genómico por PCR	37

RT-PCR punto final	38
7. RESULTADOS	40
Obtención de extracto soluble de LM tratada y no tratada con GNV-14 y ABZ	40
Análisis electroforético de los extractos solubles	40
Reconocimiento de las proteínas del citoesqueleto de la LM de <i>T. spiralis</i> control y tratada con GNV-14 y ABZ mediante Western blot	42
α y β -tubulina	42
α -tubulina tirosinada y destirosinada	44
α -tubulina acetilada	45
Actina	45
Obtención y purificación de RNA	46
Integridad del RNA	47
Análisis de la presencia de DNA genómico en las muestras	47
RT-PCR punto final	48
α -tubulina	48
β -tubulina	49
Actina	50
8. DISCUSIÓN	51
9. CONCLUSIONES	59
10. PERSPECTIVAS	60
11. REFERENCIAS	61
Anexos	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del género <i>Trichinella</i>	4
Figura 2. Detalles morfológicos de lo organismos adultos de <i>T. spiralis</i>	5
Figura 3. Detalles morfológicos de las LM de <i>T spiralis</i>	7
Figura 4. Ciclo biológico (doméstico y silvestre) de <i>T. spiralis</i>	9
Figura 5. Estructura básica del núcleo bencimidazólico	17
Figura 6. Estructura química de GNV-14	20
Figura 7. Micrografías de barrido de LM de <i>T spiralis</i> control y tratadas con GNV-14	22
Figura 8. Micrografías electrónicas de transmisión de LM control y tratadas con GNV-14 a 1µg/mL	23
Figura 9. Perfil proteico de los extractos solubles de LM control y tratados con albendazol y GNV-14	41
Figura 10. Análisis densitométrico del perfil de proteínas de las LM de <i>T.spiralis</i> control y tratadas con GNV-14 y ABZ	42
Figura 11. Reconocimiento de α -tubulina y β -tubulina en extractos solubles de LM tratadas con GNV-14 y ABZ (1µg/mL) por los anticuerpos B-5-1-2 y KMX-1	43
Figura 12. Reconocimiento de α -tubulina tirosinada y destirosinada en extracto solubles de LM con GNV-14 y ABZ por los anticuerpos YL 1/2 y YL 1/34	45
Figura 13. Reconocimiento de actina en extracto solubles de LM y tratadas con GNV-14 y ABZ por el anticuerpo C4	46
Figura 14. Integridad de las muestras de RNA	47
Figura 15. Amplificación de GDPH en las muestras de RNA	48
Figura 16. Amplificación por RT-PCR de α -tubulina tubulina de la LM de <i>T.spiralis</i> tratada con 1µg/mL de GNV-14 y ABZ	49
Figura 17 Amplificación por RT-PCR de β -tubulina de LM de <i>T spiralis</i> tratadas con 1µg/mL de GNV-14 y ABZ	50
Figura 18 Amplificación por RT-PCR de actina de LM de <i>T spiralis</i> con 1µg/mL de GNV-14 y ABZ	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características esenciales de los fármacos empleados en la quimioterapia de la triquinelosis	14
Tabla 2. Derivados del 2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol sintetizados y su actividad <i>in vitro</i> contra la LM de <i>T. spiralis</i>	19
Tabla 3. Actividad <i>in vivo</i> de GNV-14 , GNV-14/ HPβCD y ABZ contra los adultos y LM de <i>Trichinella spiralis</i>	21
Tabla 4. Proteínas de las LM de <i>T. spiralis</i> tratadas con GNV-14 a 1μg/mL que mostraron una expresión diferencial respecto a las LM no tratadas	24
Tabla 5. Curva estándar de albúmina sérica bovina	30
Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en el análisis por Western blot	33
Tabla 7. Características de los iniciadores empleados en el análisis por RT-PCR	37
Tabla 8. Concentración de proteínas de las muestras	40
Tabla 9. Niveles de expresión (%) de α-tubulina en las muestras tratadas con GNV-14 y ABZ con respecto al control	49
Tabla 10. Niveles de expresión en (%) de β-tubulina en las muestras tratadas con GNV-14 y ABZ con respecto al control	50
Tabla 11. Niveles de expresión en (%) de actina en las muestras tratadas con GNV-14 y ABZ con respecto al control	51

RESUMEN

La triquinelosis es una zoonosis emergente y reemergente de distribución mundial causada por el nematodo *Trichinella*. El control de esta helmintiasis se realiza mediante quimioterapia con albendazol y mebendazol, sin embargo, existen reportes de falla terapéutica. Con la finalidad de contar con tratamientos alternativos, nuestro grupo de investigación sintetizó el derivado bencimidazólico **GNV-14**, el cual tuvo actividad *in vitro* e *in vivo* superior a la del albendazol, indujo decrementos en la expresión de proteínas del citoesqueleto de la larva muscular de *T. spiralis* y daño a nivel de cutícula e intestino, similar al reportado para el albendazol. El objetivo de este estudio fue evaluar mediante Western blot y RT-PCR si **GNV-14** actúa sobre las proteínas del citoesqueleto o si lo hace a nivel de RNAm. Además, el efecto ocasionado por **GNV-14** se comparó con el del albendazol. Para el ensayo por Western blot se transfirieron a membranas de PVDF los extractos proteicos de los parásitos sin tratamiento o tratados con **GNV-14** o albendazol (1ug/mL). Las tiras se revelaron con anticuerpos monoclonales que reconocen a las proteínas α -tubulina, α -tubulina tirosinada y destirosinada, α -tubulina acetilada, β -tubulina y actina. El análisis densitométrico empleando el programa Quantity One versión 4.6.3 (Bio Rad), mostró que **GNV-14** no afecta los niveles de α -tubulina, pero induce un incremento significativo de β -tubulina y una disminución de actina con respecto al control ($p < 0.05$). Albendazol redujo significativamente los niveles de α -tubulina y β -tubulina y aumentó significativamente la actina ($p < 0.05$). En cuanto a las proteínas modificadas postraduccionalmente, los anticuerpos YL 1/2 y YL 1/34 reconocieron en el control dos bandas de 61 y 47 kDa. **GNV-14** redujo significativamente la expresión de las dos bandas reconocidas por el anticuerpo anti- α -tubulina tirosinada en tanto que aumentó las de α -tubulina destirosinada ($p < 0.05$). En relación con el albendazol, no se detectó con los dos anticuerpos usados la banda de 61kDa y la de 47kDa, su nivel de reconocimiento se redujo significativamente. No se detectó α -tubulina acetilada en la larva muscular de *T. spiralis*. Con el RNA íntegro y puro obtenido de los parásitos sin tratamiento y tratados con **GNV-14** y albendazol, se amplificaron por RT-PCR con el kit RT-PCR One Step (QIAGEN) los genes de α , β -tubulina, actina y GPDH; éste último se incluyó como gen constitutivo para normalizar los genes amplificados. El análisis densitométrico demostró que **GNV-14** indujo un ligero incremento en los transcritos de α y β -tubulina, mientras que no afectó los de actina. Por su parte, el albendazol redujo significativamente los niveles de α y β tubulina, en tanto que incrementó los de actina ($p < 0.05$). Los resultados obtenidos sugieren que **GNV-14** y albendazol tienen mecanismos de acción diferentes, y que el efecto de **GNV-14** sobre la actina es a nivel de proteína. Estudios de modelado molecular ayudarán a esclarecer la interacción de **GNV-14** con la actina del parásito.

ABREVIATURAS

ABS	Albúmina sérica bovina
ABZ	Albendazol
ATP	Adenosín trifosfato
cDNA	DNA complementario
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzima
GDPH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GNV-14	5-(2,3-Diclorofenoxi)-1-metil-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol
kDa	Kilodaltones
LM	Larva muscular
LRN	Larva recién nacida
MEB	Microscopia electrónica de barrido
MET	Microscopia electrónica de transmisión
MBZ	Mebendazol
MDCK	Células epiteliales de riñón canino Madin-Darby
MTT	Bromuro de 3-(4,5dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pI	Punto isoeléctrico
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensajero
RNA_r	RNA ribosomal
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa reverso transcriptasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
TAE	Amortiguador de tris-acetato EDTA
TBZ	Tiabendazol
TIF	Tipo inspección federal
TLCK	Tosil-L-lisina-clorometil-cetona
TPCK	Tosil-L-fenilalanina-clorometil-cetona
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1.3-diol

1. INTRODUCCIÓN

Las helmintiasis constituyen un importante problema de salud tanto en medicina humana como en veterinaria. Por razones sociales, demográficas y biológicas, la prevalencia de estas parasitosis es más elevada en países en vías de desarrollo donde la mayor parte de la población carece de servicios de salud y condiciones sanitarias apropiadas (Bush et al, 2001).

El control de estas parasitosis se realiza mediante quimioterapia principalmente con compuestos bencimidazólicos del tipo del albendazol (**ABZ**) y mebendazol (**MBZ**). A pesar de su baja toxicidad y su amplio espectro antiparasitario, los bencimidazoles presentan baja solubilidad y absorción, lo que ha conducido a problemas de falla terapéutica ya que la concentración plasmática de los fármacos en el hospedero es baja e impide que una cantidad suficiente del medicamento llegue a su sitio blanco en el interior de los parásitos (Álvarez et al., 2010), por lo que estos antihelmínticos son efectivos principalmente a nivel enteral. Además, su uso indiscriminado ha provocado la selección de helmintos resistentes a los tratamientos. Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de contar con nuevas alternativas terapéuticas para el control de estas parasitosis. Sin embargo, una limitante en el desarrollo de nuevos antihelmínticos es la falta de un modelo animal que facilite la evaluación de la actividad de estos compuestos a nivel enteral y sistémico.

A este respecto, *Trichinella spiralis* es un nematodo que representa un excelente modelo experimental para evaluar nuevos compuestos pues su ciclo de vida es fácil de mantener en animales de laboratorio y presenta dos fases:

una fase intestinal y otra sistémica, lo que permite evaluar la efectividad de nuevos compuestos en estos dos niveles.

Con el interés de contar con nuevas alternativas en el tratamiento de las helmintiasis se sintetizó en la Facultad de Química de la UNAM el compuesto 5-(2, 3- diclorofenoxi)-1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol, denominado **GNV-14**. Dicho compuesto es un derivado bencimidazólico con actividad *in vitro* e *in vivo* contra la larva muscular (**LM**) de *T. spiralis*, superior a la del **ABZ** (Navarrete, 2004; Antonio, 2006). En estudios proteómicos se determinó que **GNV-14** induce una expresión diferencial de proteínas del metabolismo energético y una disminución en la expresión de proteínas del citoesqueleto de la **LM** de *T. spiralis*. Además, estudios de ultraestructura mostraron daño importante a nivel de cutícula, hipodermis e intestino del parásito (Matadamas-Martínez et al., 2013). Los resultados obtenidos sugirieron que **GNV-14** tiene un mecanismo de acción similar al **ABZ**.

A la fecha, no se sabe si **GNV-14** actúa directamente a nivel de las proteínas, o si ejerce su acción a nivel transcripcional. El presente trabajo tiene como objetivos evaluar el efecto de **GNV-14** sobre α -tubulina, β -tubulina y actina de la **LM** de *T. spiralis* a nivel de proteína y de RNAm mediante las técnicas de Western blot y RT-PCR y comparar su efecto con el del **ABZ**. También por Western blot se analizó el efecto de ambos compuestos sobre la expresión de las isoformas de α -tubulina acetilada, tirosina y destirosinada.

2. MARCO TEÓRICO

Género *Trichinella*

La triquinelosis es una zoonosis ocasionada por el nematodo *Trichinella*, el cual infecta a un gran número de animales domésticos y silvestres. Esta enfermedad se transmite al humano por la ingestión de carne cruda o insuficientemente cocida procedente de animales infectados (Pozio et al, 2009). En 1835 Richard Owen, descubridor del género *Trichinella*, consideró que éste era monoespecífico. A la fecha, se ha demostrado la existencia de nueve especies y tres genotipos (cuya posición filogenética se encuentra en revisión) (Figura 1), divididos en dos clados: uno encapsulado en la estructura conocida como célula nodriza, con formación de una cápsula de colágeno, y otro no encapsulado que, como su nombre lo indica, no forma cápsula (Krivokapich et al, 2012; Pozio y Zarlenga 2013). Todas las especies son capaces de causar enfermedad en el humano, pero la que con mayor frecuencia lo infecta es *T. spiralis* (Bruschi y Murrell, 2002).

Clasificación taxonómica

Reino: Animal

Phylum: Nematoda (=Nemata)

Clase: Aphasmida (Adenoforea)

Orden: Enoplida

Superfamilia: Trichinelloidea

Familia: Trichinellidae

Género: *Trichinella*

Especie: *Trichinella spiralis* (Owen, 1835; Railliet, 1895).

Distribución geográfica de *Trichinella* spp y sus genotipos

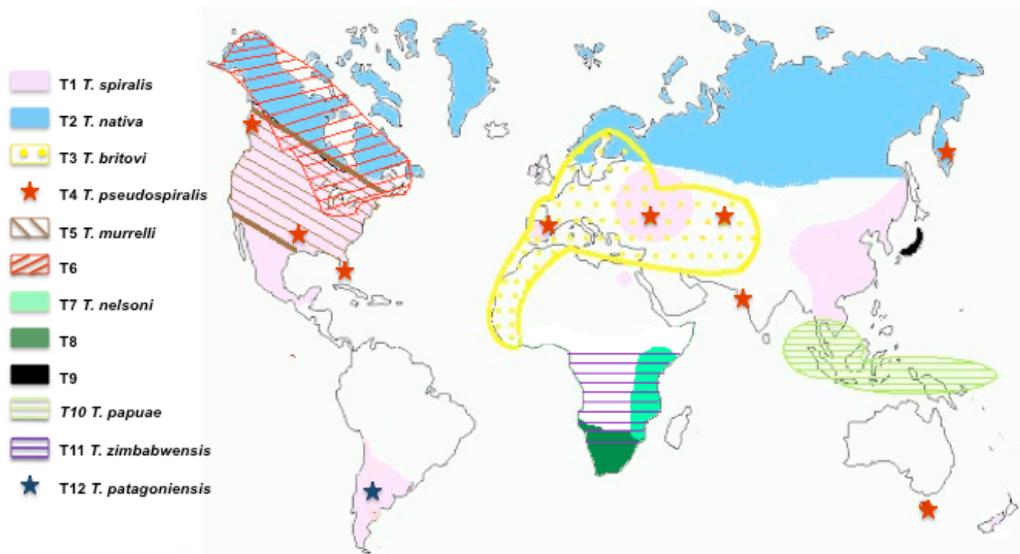


Figura 1. Distribución del género *Trichinella*. (Modificado de Pozio y Zarlenga, 2013).

Trichinella spiralis

T. spiralis es un nematodo dioico, posee un cuerpo cilíndrico y filiforme con el extremo anterior ligeramente más angosto que el posterior; presenta tres estadios principales de desarrollo: adultos, larva recién nacida (**LRN**) y larva muscular (**LM**) (Despommier et al, 2005).

Los organismos adultos representan la fase enteral de *T. spiralis*, presentan dimorfismo sexual siendo los machos más pequeños que las hembras. Estos miden 1.4-1.6 mm de longitud por 40 μ m de diámetro. El aparato reproductor de los machos presenta un testículo que produce espermatozoides no flagelados, y continúa por un conducto espermático que a su vez forma un conducto eyaculador el cual desemboca en una cloaca en el extremo terminal, justo en medio de un par de apéndices copuladores. No poseen espícula

copulatriz, en lugar de ello las paredes de la cloaca se evaginan y actúan como órgano copulador.

Las hembras, miden de 3 a 4 mm de longitud por unos 60 µm de diámetro. El aparato genital es prodelfo, con el único ovario ubicado en la región caudal, seguido por el útero lleno de huevos que se desarrollan progresivamente a medida que avanzan por el útero, éste se prolonga a la vagina situada delante de la mitad del esticosoma y desemboca finalmente en la vulva, a través de la cual la hembra da a luz a las **LRN**. El extremo posterior de las hembras es romo y redondeado, lo que contrasta con el extremo posterior de los machos (Figura 2).

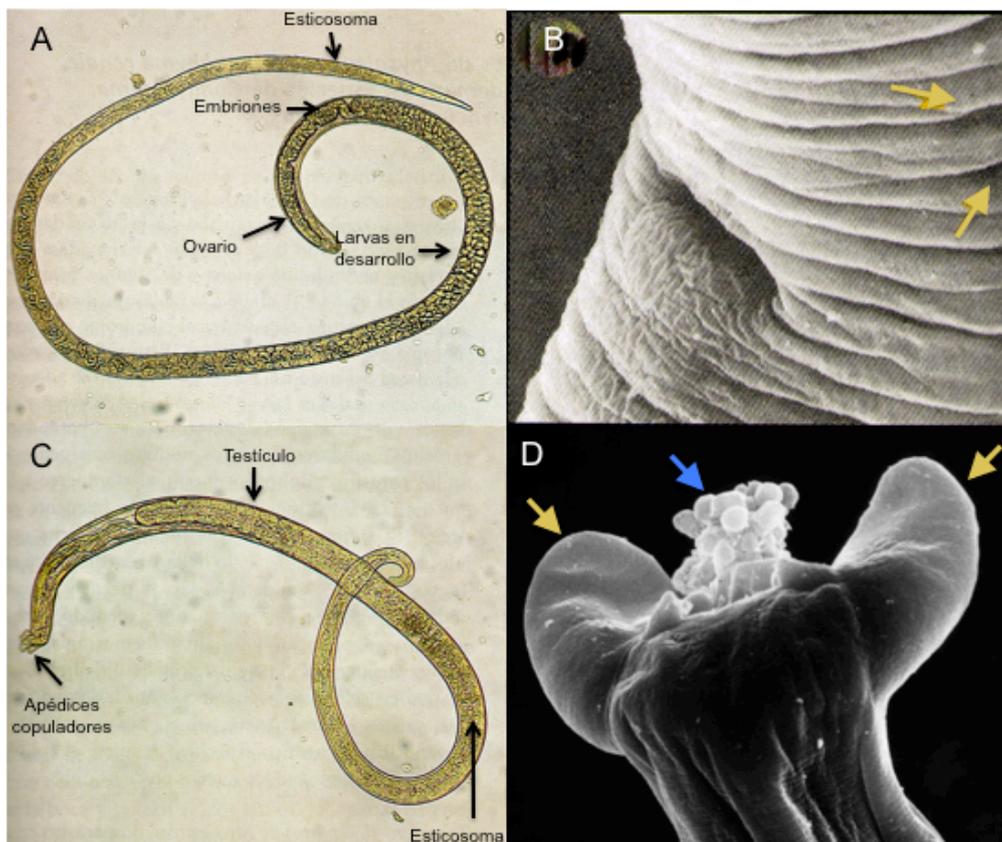


Figura 2. Detalles morfológicos de los organismos adultos de *T. spiralis* observados por microscopia de luz (**A** y **C**) y microscopia de barrido (**B** y **D**). **A**) hembra; **B**) vulva de la hembra, en la extrema derecha se observan poros laterales (flechas). **C**) macho; **D**), extremo posterior de un macho en el que se observa la campana copuladora (flecha azul) y el par de apéndices copuladores (flechas amarillas). **A** y **C** modificadas de Ash y Orihel, 2007. **B** modificada de Kim y Ledbetter, 1980. **D** tomada de <http://www.trichinella.org/gallery/DDD-HQ-Main.htm>

b) Las **LRN** miden unos 120 μm de longitud por unos 7 μm de diámetro, representan la fase que invade al miocito durante la fase parenteral de la infección. No presentan una diferenciación organográfica clara. Poseen un pequeño estilete en la cavidad bucal el cual utilizan para penetrar las células musculares de sus hospederos (de la Rosa y Gómez, 2011).

c) Las **LM** representan la fase de desarrollo sistémica de *T. spiralis*, se hallan enrolladas en espiral en el interior de las fibras musculares esqueléticas de sus hospederos dentro de una estructura especial llamada célula nodriza. Miden 1.2 mm de longitud por 40 μm de diámetro y constituyen la fase infectiva del parásito. Las **LM** presentan cutícula, anillo nervioso y primordio genital. Presentan en la parte anterior del cuerpo un esófago muscular el cuál se va ensanchando hacia la parte posterior donde es rodeado por células individuales que poseen gránulos secretores y que reciben el nombre de esticocitos. Esta estructura se denomina esticosoma y está especializada en la secreción de productos antigénicos hacia la luz del esófago y de ahí hacia el exterior del parásito. Los esticocitos presentan 5 subtipos de gránulos secretores (α_0 , α_1 , α_2 , β y γ), que se diferencian en tamaño, forma, localización en el esticosoma y por el tipo y peso molecular de los productos antigénicos que descargan (Takahashi et al, 1989) (Figura 3).

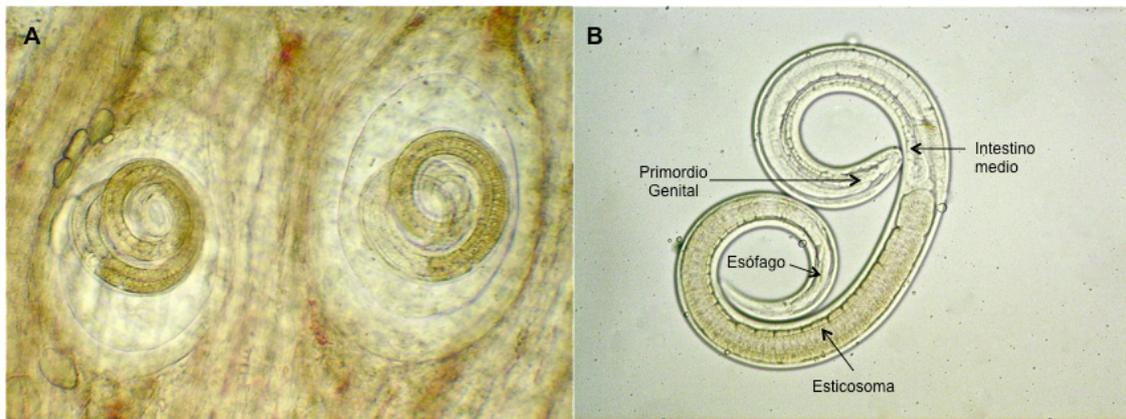


Figura 3. Detalles morfológicos de las LM de *T. spiralis*. **A)** La LM se encuentra dentro de la célula nodriza en diafragma de rata (*Rattus norvegicus*). **B)** LM liberada de la célula nodriza mediante digestión artificial.

Ciclo de vida

T. spiralis completa su ciclo de vida en un solo hospedero. Casi cualquier especie de mamífero puede infectarse, sin embargo, los humanos, los cerdos, los roedores y los caballos son los hospederos más importantes desde el punto de vista médico y veterinario. Se transmite por carnivorismo entre animales domésticos o peridomésticos que constituyen el ciclo doméstico de transmisión y entre animales salvajes que constituyen el ciclo silvestre (Pozio, 2000). El ciclo biológico presenta dos fases, la fase entérica y la fase parenteral (Figura 4).

a) Fase entérica: se inicia cuando un hospedero ingiere carne cruda o insuficientemente cocida infectada con **LM** viables del nematodo. En el estómago, los jugos gástricos degradan las paredes de la célula nodriza liberando a las **LM**, las cuales se reactivan y llegan al intestino delgado, particularmente al duodeno donde penetran la lámina propia de las microvellosidades y mudan cuatro veces (L2-L5) en un periodo de tiempo que oscila entre 30 a 32 horas hasta alcanzar el estadio adulto (Despommier,

1990). Machos y hembras maduran y la cópula ocurre entre el día 1 y 2 después de la infección; las hembras liberan a las **LRN** las cuales atraviesan el duodeno iniciando la fase parenteral de la infección.

b) Fase parenteral: las **LRN** llegan al hígado vía vena porta, de ahí alcanzan la circulación sanguínea que las transporta al ventrículo derecho del corazón, pulmones y sistemas linfático y arterial, que las distribuye a casi cualquier órgano y tejido del cuerpo, aunque sólo las larvas que llegan a músculo esquelético son capaces de continuar su desarrollo exitosamente (Bruschi y Murrell, 2002). Las **LRN** que llegan a músculo penetran las miofibrillas gracias a la acción de proteasas y por el uso de su estilete bucal; dentro del miocito las **LRN** maduran a **LM** y los productos de secreción/excreción producidos por el esticosoma desencadenan un proceso de remodelación de la fibra muscular convirtiendo al miocito en una unidad especializada conocida como célula nodriza, la cual satisface todos los requerimientos metabólicos del parásito (Ko et al 1994; Lee et al 1991).

El miocito infectado pierde sus elementos contráctiles, su núcleo sufre un alargamiento físico y ocurre la interrupción del ciclo celular suprimiendo el programa normal de expresión génica del músculo (Jasmer, 1993), las mitocondrias degeneran y ocurre la sobreproducción de colágenos tipos IV y VI, los cuales forman una malla que encapsula a la célula nodriza. Finalmente, se secreta una gran cantidad del factor de crecimiento endotelial vascular (**VEGF**) lo que conduce a un proceso de angiogénesis y a la formación de un plexo de vasos sanguíneos altamente permeables que envuelven a la célula

nodriza y que sirven como medio para transportar alimentos y desechos (Despommier, 1998). Todos estos cambios se completan en unos 20 días después de la penetración.

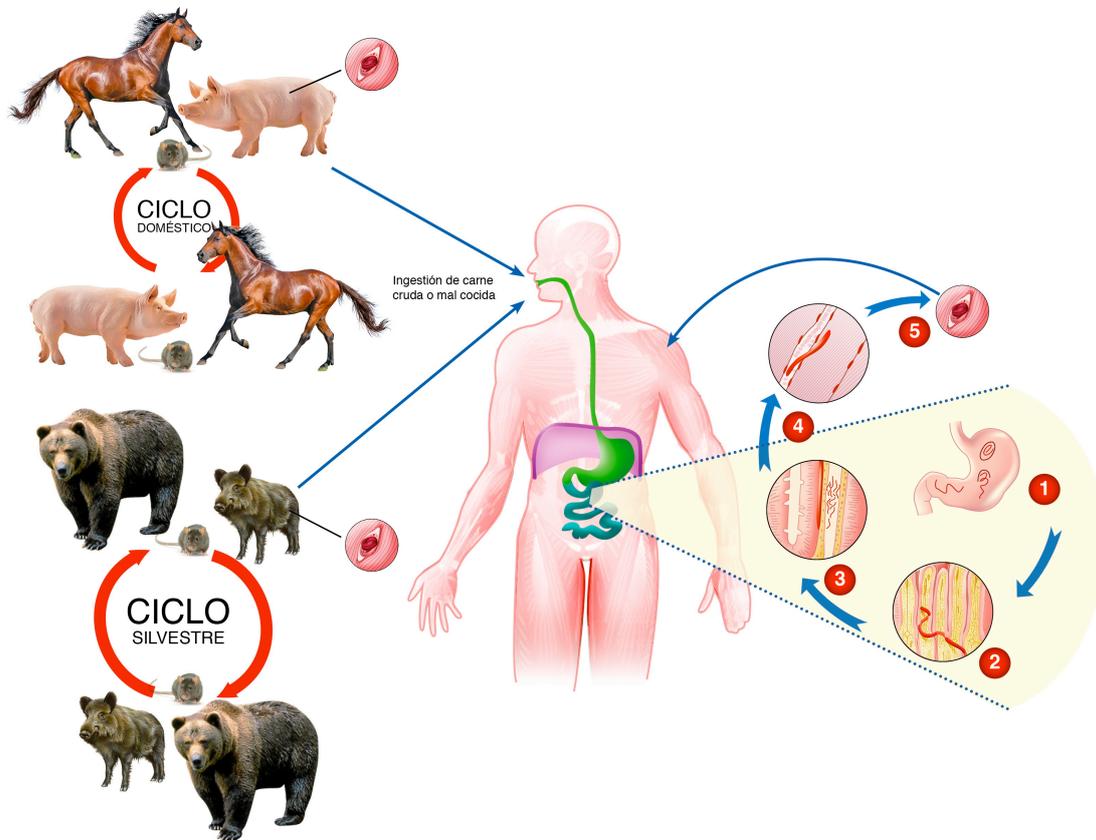


Figura 4. Ciclo biológico (doméstico y silvestre) de *Trichinella spiralis*. **1-3 fase entérica:** 1, liberación de las LM por acción de los jugos gástricos. 2, penetración de la lámina propia del duodeno y mudas. 3, cópula y larvipostura. **4-5 fase parenteral:** 4, penetración de tejido muscular por las LRN. 5, desarrollo de la LM y la célula nodriza. Este parásito tiene en el cerdo doméstico a su hospedero más importante, aunque también ha sido detectado en otros carnívoros, e incluso herbívoros como el caballo. (Imagen creada por el Lic en Diseño Gráfico José Manuel Retana).

Mecanismos patogénicos y manifestaciones clínicas de la triquinelosis.

Las manifestaciones clínicas de esta parasitosis son variadas y dependen de la cantidad de larvas ingeridas al comienzo de la infección (Yépez-Mulia y Ortega-Pierres, 1994). Durante la fase intestinal, las LM en su desarrollo al estadio

adulto penetran la mucosa intestinal alterando las microvellosidades intestinales, la lámina propia y el músculo liso del duodeno lo que provoca mala absorción, diarrea, náuseas, vómito, escalofrío e inflamación intestinal, signos y síntomas semejantes a los de una intoxicación alimenticia aguda.

Durante la fase parenteral se desencadenan reacciones alérgicas e inflamatorias asociadas a la ruptura de tejidos durante la migración de las **LRN** lo que da lugar a fiebre intermitente, edema periorbital e inflamación de los ganglios linfáticos. También se observa dolor muscular (mialgias), adinamia, malestar general, dolor de cabeza y fiebre. Finalmente, la encapsulación de la **LM** en los músculos provoca mialgias, sobre todo en los músculos más parasitados. En infecciones severas puede haber miocarditis, encefalitis, disnea, lesiones oculares, coma y muerte (Dupoy-Camet, et al 2002).

Epidemiología

La triquinosis es una zoonosis emergente o reemergente debido a los cambios en las tendencias alimenticias humanas y a la falta de un control sanitario apropiado en la producción de carne de cerdo y sus derivados (Pozio, 2001; Vorou et al., 2007). Esta parasitosis se ha reportado en 55 países, de 1986 a 2009 se registraron 65,818 casos, 87% de los cuales se presentaron en Europa siendo la región oriental la más afectada. Los países más afectados fueron Rumania con el 50% de los casos de toda la región, Lituania, Latvia y Estonia (Murrell y Pozio, 2011; Malakauskas et al, 2007). Hay reportes de brotes ocasionados por nuevas fuentes de infección como el consumo de carne importada de caballo en Italia y Francia (Pozio, 2001).

En América, la triquinelosis es considerada un problema de salud pública en Argentina y Chile; su presencia también se ha detectado en México, Uruguay, Bolivia y Estados Unidos (Riva et al, 2007). En México, el estudio de esta parasitosis inició en 1891 con el hallazgo de la **LM** en cadáveres humanos durante autopsias de rutina efectuadas en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (**UNAM**). Desde entonces, se han realizado algunos estudios epidemiológicos como el efectuado por Martínez-Marañón (1974) con biopsias de 1000 cadáveres humanos, encontrando una frecuencia de triquinelosis del 4.2%. De 1952 a 1997 se registraron 45 brotes de triquinelosis distribuidos por todo el territorio mexicano involucrando a 766 personas de las cuales 14 murieron.

Los estados más afectados han sido Zacatecas, Estado de México, Durango, Sonora, Chihuahua, Jalisco, Michoacán y Ciudad de México (Ortega Pierres et al., 2000). Chihuahua registra el mayor brote de triquinelosis en nuestro país con 166 casos, siendo la carne de cerdo en forma de chorizo la causa de infección (Hernández et al., 1992).

La ingesta de carne de cerdo infectada es la principal fuente de infección en México, sin embargo, un estudio serológico realizado a 170 muestras de caballos procedentes de dos tipos de mataderos, uno rural y el otro tipo inspección federal (**TIF**), analizadas por **ELISA**, demostró la presencia del parásito en caballos de nuestro país al detectar anticuerpos de tipo IgG en un 17% de las muestras de mataderos rurales y 7% de mataderos TIF, mientras

que por **PCR**, el 15 % de las muestras de mataderos rurales y el 2% de mataderos **TIF** fueron positivas para *T. spiralis* (Viveros et al., 2001).

Diagnóstico

Se realiza mediante la detección directa e indirecta del parásito. La triquinoscopia es un método directo que detecta las **LM** en tejido muscular pero tiene el inconveniente de ser poco sensible en infecciones con poca carga parasitaria (Dupoy Camet et al., 2002). Entre los métodos indirectos se incluye la detección de anticuerpos contra antígenos de secreción/excreción de *T. spiralis* en el suero de pacientes mediante **ELISA** y la amplificación de fragmentos específicos de DNA del parásito mediante la reacción en cadena de la polimerasa (**PCR**) (Bruschi y Murrell, 2002). También se ha utilizado el Dot blot y el Western blot.

La eosinofilia es un criterio clínico valioso en el diagnóstico ya que se presenta antes de la aparición de signos y síntomas clínicos. Llega a alcanzar el 40, 60 y 70% en cifras relativas y de 1500 o más en cifra absoluta. Además hay un incremento en los niveles de las enzimas musculares lactato deshidrogenasa y creatina fosfoquinasa (Kociecka, 2000).

Tratamiento

La quimioterapia sigue siendo el método más económico y eficaz para controlar la triquinelosis. Los fármacos que se emplean en sus fases enteral y parenteral son los derivados bencimidazólicos, **ABZ**, **MBZ** y en menor medida

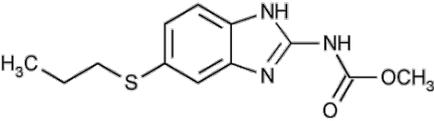
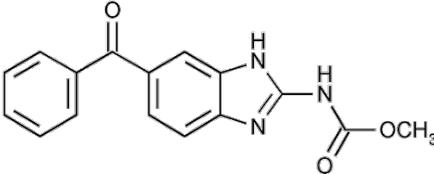
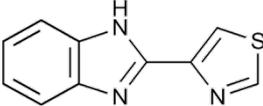
el tiabendazol (**TBZ**) (Dupoy-Camet et al., 2002; Gottstein et al., 2009). En la Tabla 1 se describen algunas características de estos fármacos.

El **TBZ** fue el primer bencimidazol utilizado para tratar esta parasitosis pero dejó de producirse para su uso en humanos debido a que provocaba reacciones secundarias graves, entre ellas: vértigo, hipotensión, bradicardia, urticaria, mareos y dolor de cabeza (Cabié et al., 1996). Además, la vida media de este fármaco dentro del hospedero es corta debido a su rápida hidroxilación en el hígado (Webster, 1991).

El **MBZ** tiene un espectro de acción similar al tiabendazol y también ha demostrado ser muy eficaz contra céstodos. A diferencia del **TBZ**, el **MBZ** no es bien absorbido en la luz intestinal, por lo que su efectividad radica en las altas concentraciones del fármaco en los organismos adultos que habitan en la lámina propia del duodeno (Chung et al., 2001).

El **ABZ** tiene un espectro un poco más amplio que el **MBZ**, sin embargo, el efecto del **ABZ** a nivel sistémico es reducido debido a su baja solubilidad acuosa, por lo que se absorbe poco (<5%) lo que ocasiona una baja biodisponibilidad. La célula nodriza actúa como una barrera que protege a las larvas de la acción de los fármacos, lo que ha conducido a problemas de falla terapéutica (Pozio et al., 2001), incrementando la probabilidad de que el paciente albergue **LM** viables durante años (Casulli et al., 2006).

Tabla 1. Características esenciales de los fármacos utilizados en la quimioterapia de la triquinelosis*.

Fármaco	Dosis en adultos*	Ventajas	Desventajas	Estructura química
ABZ	400mg/día durante 8-14 días.	Antihelmíntico de amplio espectro efectivo contra infecciones intestinales y sistémicas.	Se requieren dosis múltiples. Poco soluble en agua y por tanto su absorción es baja. Baja biodisponibilidad.	
MBZ	200-400 mg/día por 3 días.	Antihelmíntico de amplio espectro, efectivo contra infecciones intestinales y sistémicas.	Poco soluble en agua, baja absorción y baja biodisponibilidad.	
TBZ	50mg/día por 5 días.	Antihelmíntico de amplio espectro. Muy efectivo contra helmintiasis gastrointestinales.	Graves efectos secundarios, se metaboliza rápidamente.	

* Bruschi y Murrell, 2002.

Mecanismos de acción de los bencimidazoles

Los bencimidazoles ejercen su efecto antihelmíntico mediante 3 mecanismos principales:

a) Inhibiendo la polimerización de los microtúbulos citoplasmáticos mediante la unión selectiva y altamente afín a la β -tubulina de las células tegumentarias e

intestinales de nematodos, tremátodos y céstodos, interfiriendo procesos celulares clave como el tráfico vesicular intracelular, así como el movimiento de los cromosomas durante la división celular (Köhler, 2001).

b) Inhibición del metabolismo de la glucosa: la fumarato reductasa es una enzima mitocondrial clave de los helmintos, su inhibición produce bloqueo irreversible de la captación de glucosa en gusanos adultos y en etapa larvaria, ocasionando el agotamiento de glucógeno, interrupción de la síntesis de ATP, parálisis y muerte de los helmintos (Borrowman et al., 1984).

c) Inhibición de la incorporación de glucosa: los bencimidazoles interfieren con el transporte transmembranal de glucosa exógena alterando severamente el gradiente transmembranal de protones, interfiriendo la producción de energía celular (ATP), indispensable para llevar a cabo las funciones vitales de los parásitos, provocándoles la muerte (Sharma, 1997).

Resistencia a los bencimidazoles

Los bencimidazoles han sido ampliamente utilizados tanto en medicina humana como en veterinaria gracias a su amplio espectro antiparasitario, baja toxicidad hacia el hospedero y bajo costo. Sin embargo, su uso indiscriminado ha propiciado el surgimiento de parásitos resistentes a estos fármacos ya que en cada tratamiento sobrevive un porcentaje pequeño de parásitos. Luego de varias desparasitaciones, la población de parásitos resistentes al bencimidazol utilizado se hace dominante. Este fenómeno fue detectado por primera vez en

nematodos parásitos de rumiantes a principios de la década de 1960 (Kelly y Hall, 1983).

En México, Campos (1990) reportó la presencia de las primeras poblaciones de nematodos resistentes a los bencimidazoles en ovinos infectados con el nematodo hematófago *Haemonchus contortus*. Dos años después, se hallaron 3 nuevas poblaciones de nematodos resistentes al **ABZ**, al febendazol, al febantel y al oxfendazol en borregos (Campos et al., 1992).

Reportes experimentales han mostrado que la principal causa de resistencia a los bencimidazoles se debe a cambios en la secuencia de aminoácidos en los dominios N-terminal e intermedio de la β -tubulina, lo que conlleva a la pérdida de la afinidad de los bencimidazoles por la tubulina de los parásitos. Las sustituciones más comunes son fenilalanina por tirosina en posición 167 (F167Y), glutamato por alanina en posición 198 (E198A) y fenilalanina por tirosina en posición 200 (F200Y) (Beech et al, 2010). En términos estructurales, el cambio en esos aminoácidos impide la formación de complejos estables β -tubulina-bencimidazol, ya sea por que la sustitución de residuos (F200Y) da lugar a la formación de nuevas interacciones intracatenarias entre diferentes regiones del polipéptido de la tubulina impidiendo la interacción de la tubulina con el bencimidazol (Robinson, 2004), o por que los nuevos residuos impiden la formación de puentes de hidrógeno que estabilizan a los bencimidazoles dentro de las tubulinas (Aguayo et al., 2013).

Desarrollo de nuevos derivados bencimidazólicos con actividad antiparasitaria.

Considerando la problemática que existe en el uso de compuestos bencimidazólicos para el control de las helmintiasis y en particular de la triquinelosis, es de gran importancia contar con nuevas alternativas para el tratamiento de estas parasitosis a corto y mediano plazo. Los bencimidazoles (Figura 5), son compuestos heterocíclicos muy importantes en la química medicinal gracias a su versatilidad y a su amplio espectro de actividad biológica (antihelmíntica, antioxidante, antibacteriana, antifúngica, anticancerígena, antiinflamatoria, antihipertensiva, antiulcerosa, insecticida y antialérgica) (Gurvinder et al., 2013).

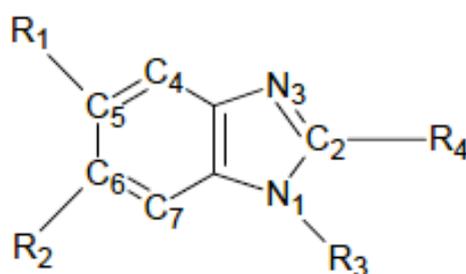


Figura 5. Estructura básica del núcleo bencimidazólico. La estructura de este tipo de fármacos consiste en un anillo benceno unido a un grupo imidazol en sus posiciones 4 y 5. Se observa la numeración dada a cada uno de sus átomos.

El primer bencimidazol empleado para tratar las helmintiasis en humanos fue el tiabendazol, introducido en 1961 (Lacey, 1988). Como se mencionó anteriormente, el **TBZ** presentaba algunas desventajas. Este hecho estimuló el diseño y la síntesis de nuevos bencimidazoles con el objetivo de optimizarlos. El **TBZ** ha sido el fármaco prototípico a partir del cual surgió una nueva generación de antihelmínticos gracias a diversas modificaciones estructurales

efectuadas en las posiciones R1, R2, R3 y R4 del anillo bencimidazólico, lo que ha permitido obtener fármacos con mejor actividad antiparasitaria, más estables a la degradación metabólica, más solubles en medio acuoso, con mayor biodisponibilidad y de amplio espectro (Townsend et al., 1990).

Con el interés de contar con nuevas alternativas en el tratamiento de las helmintiasis, el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la **UNAM** ha diseñado y sintetizado nuevos compuestos a partir de modificaciones estructurales al anillo bencenoide del 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol, para que sean más selectivos, menos tóxicos y más accesibles para la población en general. De los compuestos sintetizados hasta ahora, se obtuvo una serie de 21 nuevos derivados bencimidazólicos (Tabla 2). Para evaluar la actividad antihelmíntica *in vitro* de los nuevos compuestos, se escogió a *T. spiralis* como modelo de helminto, ya que como se mencionó anteriormente, su ciclo de vida es fácil de mantener en animales de laboratorio y permite la evaluación de la actividad de nuevos compuestos a nivel enteral y sistémico. La evaluación de la actividad *in vitro* contra la **LM** de *T. spiralis* de los derivados bencimidazólicos se realizó mediante el método colorimétrico del **MTT**, que se basa en la reducción de la sal de tetrazolio a formazán. En la Tabla 2 se presenta la actividad antihelmíntica de los compuestos.

Tabla 2. Derivados del 2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol sintetizados y su actividad <i>in vitro</i> contra la LM de <i>T. spiralis</i>					
Serie	Compuesto [1.8 μ M]	R ₁	R ₂	R ₃	Porcentaje de reducción metabólica <i>in vitro</i> contra la LM de <i>T. spiralis</i>
2,5(6)-disustituido	GNV1	Propiltio	H	H	38.3
	GNV2	Propisulfinilo	H	H	45.6
	3	Feniltio	H	H	35.5
	4	Fenilsulfinilo	H	H	53.3
	5	Benzoílo	H	H	45.8
	6	CF ₃	H	H	46.4
	7	2,3-Diclorofenoxi	H	H	28.9
1,2,5-trisustituido	8	Propiltio	H	CH ₃	48.0
	9	Propisulfinilo	H	CH ₃	42.6
	10	Feniltio	H	CH ₃	49.3
	11	Fenilsulfinilo	H	CH ₃	32.9
	12	Benzoílo	H	CH ₃	36.7
	13	CF ₃	H	CH ₃	39.8
	14	2,3-Diclorofenoxi	H	CH ₃	80.3
1,2,6-trisustituido	15	H	Propiltio	CH ₃	56.0
	16	H	Propisulfinilo	CH ₃	32.6
	17	H	Feniltio	CH ₃	60.3
	18	H	Fenilsulfinilo	CH ₃	50.3
	19	H	Benzoílo	CH ₃	31.8
	20	H	CF ₃	CH ₃	37.3
	21	H	2,3-Diclorofenoxi	CH ₃	66.8
ABZ					67.6

Tomado de Navarrete, 2004.

De los compuestos obtenidos destacó **GNV-14** (Figura 6), que redujo 80.3% la actividad metabólica del parásito, contra 67.6% de reducción que presentó el **ABZ**.

Al evaluar el efecto citotóxico de **GNV-14** sobre la línea celular MDCK mediante la técnica colorimétrica del **MTT**, no se observó citotoxicidad a concentraciones de 0.3-10 µg/ mL (Parcero, 2009).

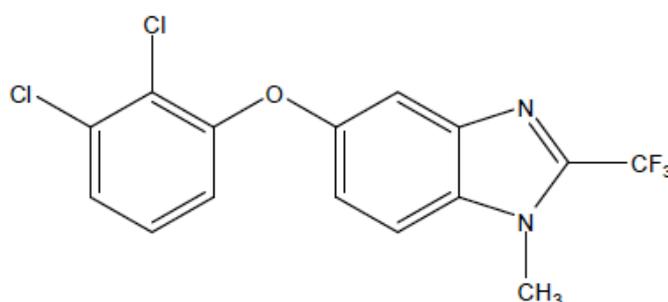


Figura 6. Estructura química de **GNV-14**. El grupo trifluorometil en R4 incrementa su lipofilicidad y estabilidad frente a la degradación metabólica.

Determinación de la actividad antihelmíntica *in vivo* de GNV-14

Los resultados *in vitro* y de citotoxicidad de **GNV-14** alentaron la evaluación de su efectividad *in vivo* en un modelo de triquinelosis murina. En estudios iniciales se observó que **GNV-14** es poco soluble en medio acuoso y por consiguiente tuvo una baja actividad a nivel sistémico contra la **LM**. Para contrarrestar esta limitante, se incorporó el compuesto a un transportador molecular de fármacos conocido como hidroxipropil-β-ciclodextrina (**HPβCD**). La **HPβCD** está compuesta por glucosacáridos de D-glucopiranososa; posee una forma cónica con una cavidad central hidrofóbica y una cubierta hidrofílica lo que le confiere la capacidad para formar complejos de inclusión que facilitan la solubilización de los fármacos, aumentando su velocidad de absorción y

disolución (Loftsson, 2004). Tomando en cuenta estas consideraciones, se formó el complejo **GNV-14/ HP β CD** y se evaluó su actividad antihelmíntica en relación al **GNV-14** sólo y al **ABZ** en dosis equimolar de 15 mg/kg contra los organismos adultos y la **LM** de *T spiralis* (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad in vivo de GNV-14, GNV-14/ HP β CD y ABZ contra los adultos y LM de <i>Trichinella spiralis</i>		
Compuestos*	Porcentaje de reducción de la carga parasitaria de adultos	Porcentaje de reducción de la carga parasitaria de LM
GNV-14	31	28
GNV-14/ HPβCD	87	84
ABZ	44	31

*Compuestos administrados a dosis equimolar de 15 mg/kg (Tomado de Matadamas-Martínez et al., 2013)

Los resultados indican que el complejo **GNV14/HP β CD** contribuyó a incrementar la solubilidad y la biodisponibilidad a nivel sistémico de **GNV-14** (Matadamas-Martínez et al., 2013).

Análisis por microscopia electrónica de barrido (MEB) y microscopia electrónica de transmisión (MET) de los cambios inducidos por GNV-14 en la LM.

El efecto a nivel ultraestructural de **GNV-14** sobre las **LM** de *T. spiralis* se analizó mediante microscopia electrónica de barrido (MEB). Se observó que **GNV-14** ocasionó daño a la cutícula del parásito, observándose la aparición

de bordes y hendiduras sobre la superficie de las larvas (Figura 7) (Matadamas-Martínez et al., 2013).

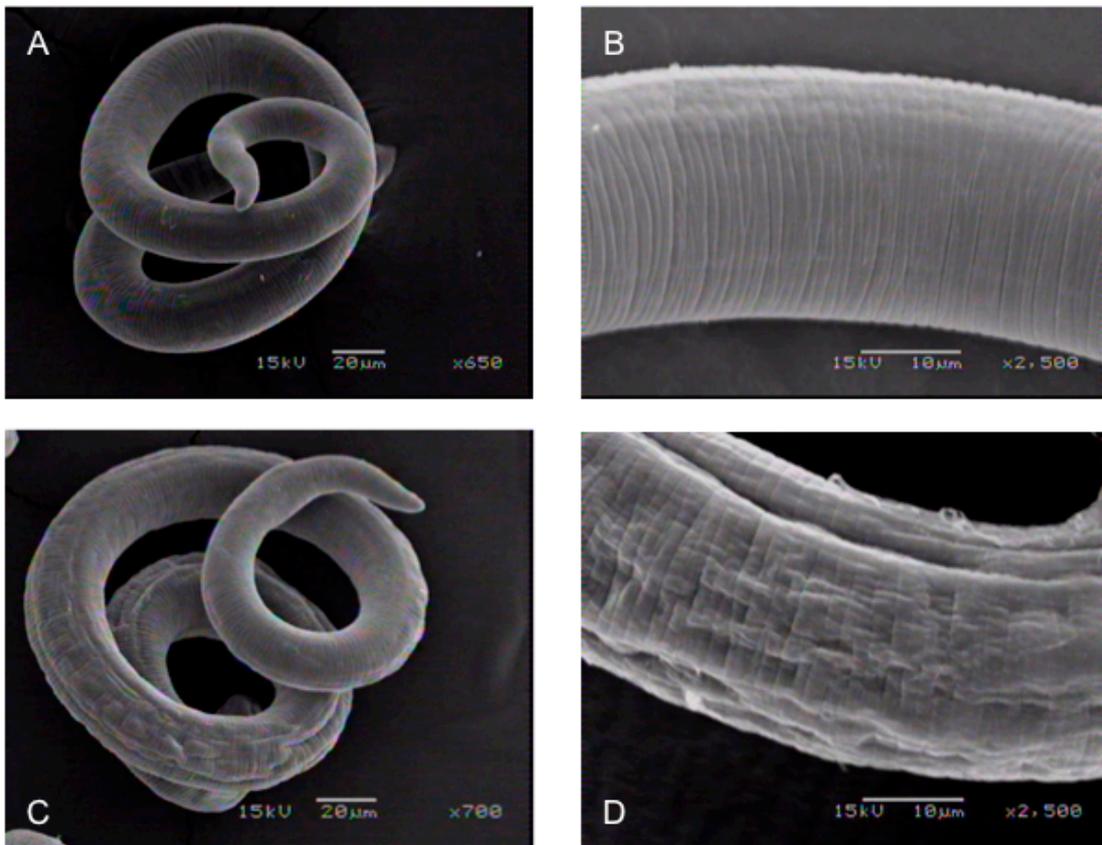


Figura 7. Micrografías de barrido de LM de *T. spiralis*. Control (A y B) y tratadas con **GNV-14** (C y D) a $1\mu\text{g/mL}$ evidenciando el daño a la superficie del parásito (modificado de Matadamas-Martínez et al., 2013).

Mediante microscopia electrónica de transmisión (MET) de las LM tratadas con **GNV-14** y no tratadas se observó que **GNV-14** ocasionó la pérdida de conexión entre la cutícula y la hipodermis, un incremento en vacuolas intracelulares y depósitos de lípidos y daño importante en el epitelio intestinal del parásito (Figura 8). Los efectos ocasionados por **GNV-14** a la LM de *T. spiralis* son similares a los descritos para el **ABZ**.

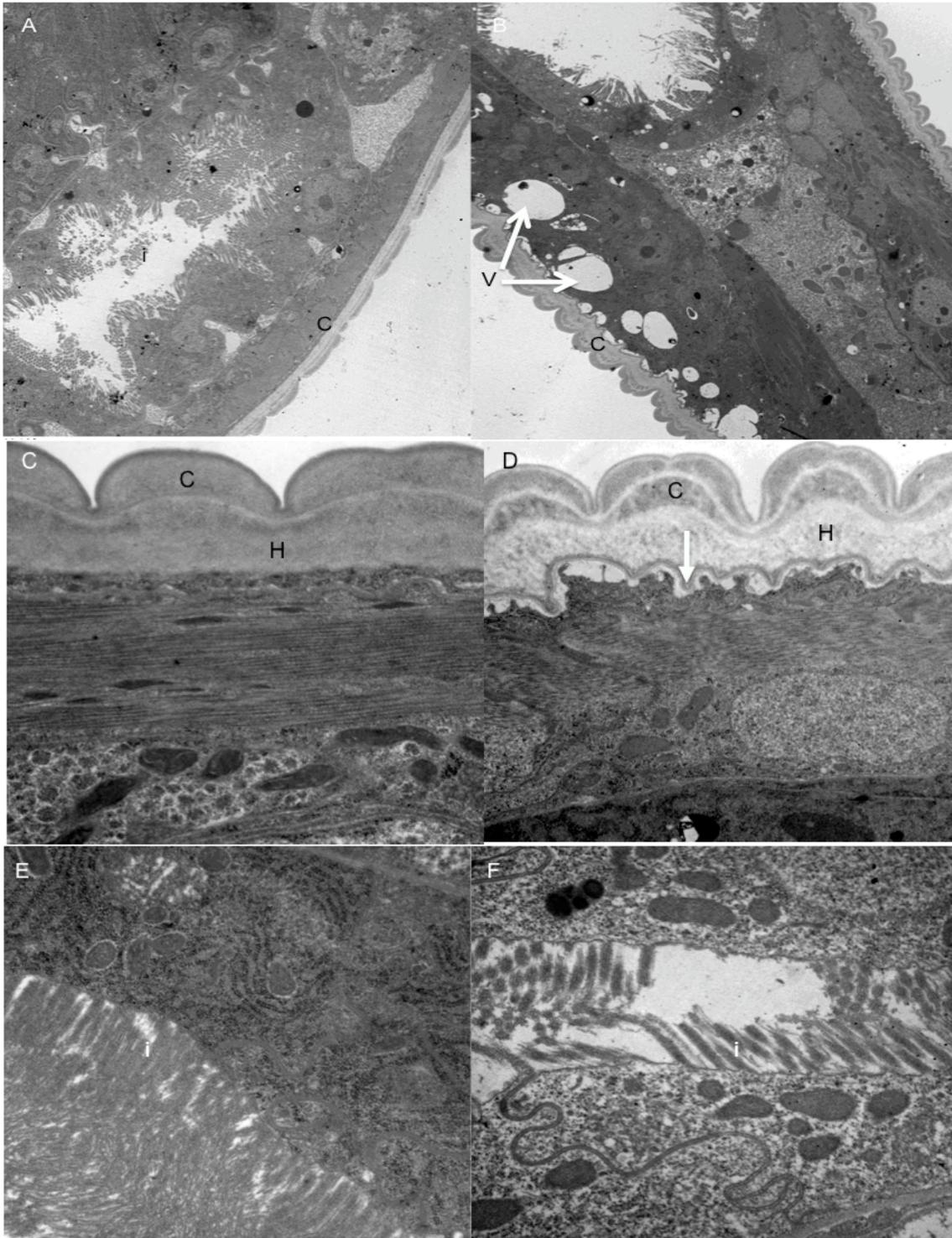


Figura 8. Micrografías electrónicas de transmisión de **LM** de *T. spiralis*, control (**A**, **C** y **E**) y tratadas con **GNV-14** a 1µg/mL (**B**, **D** y **F**). En **B** se muestra una sección de intestino de la **LM** en la que se observa un incremento en el número de vacuolas citoplásmicas (**v**) y daño a la cutícula (**c**). En **D** se observa una pérdida de conexión entre la cutícula y la hipodermis (**H**); mientras que en **F** se muestran las vellosidades intestinales (**i**) del parásito afectadas por el tratamiento con **GNV-14** (modificado de Matadamas-Martínez et al., 2013).

Análisis proteómico del efecto de GNV-14 sobre la LM de *T. spiralis*.

Con el objeto de obtener información acerca del mecanismo de acción de **GNV-14** sobre la **LM** de *T. spiralis* se realizó el análisis proteómico de las larvas tratadas con dicho compuesto a una concentración de 1µg/mL. Este estudio demostró que **GNV-14** indujo la expresión diferencial de al menos 24 proteínas en relación a los parásitos sin tratamiento. De esas 24 proteínas, 18 se identificaron por espectrometría de masas (Tabla 4).

Tabla 4. Proteínas de las LM de <i>T. spiralis</i> tratadas con GNV-14 a 1µg/mL que mostraron una expresión diferencial respecto a las LM no tratadas.					
Punto	Identificación por LC/MS/MS*	% de cambio en la expresión respecto al control	PM (KDa)/pI	Número de acceso en el NCBI	Score
1	Fosfoenolpiruvato carboxicinasa	46↓	72/6.51	316970478	1492
2	Fosfoglicerato cinasa	68↓	59/9.06	316966596	708
3	Fosfoglicerato cinasa	56↓	59/9.06	316966596	1154
4	Proteína de 32 KDa-galactosidasa de unión a lectinas	61↑	55/9.04	316970057	663
8	Filamentos intermedios Infa-1	89↑	73/5.96	316973417	80
9	Filamentos intermedios Infa-1	16↑	73/5.96	316973417	1198
10	Proteína de choque térmico A	67↓	11/6.41	316972704	1497
11	Fosfoglucmutasa	77↓	73/6.64	316968510	829
12	β-tubulina	50↓	50/4.84	316966293	1297
13	α-tubulina	58↓	53/5.43	316974594	878
14	Proteasa de serina	41↓	35/5.97	168805931	366
15	Precursor de una proteína con múltiple dominio tipo cistanina	65↓	46/5.53	111183175	887
16	Proteína hipotética conservada	50↓	40/4.97	316976052	545
17	Actina hipotética	34↓	38/5.08	316978786	900

18	Proteína 14-3-3	100↓	28/4.83	257219670	860
19	Proteína 14-3-3	23↓	28/4.83	257219670	1008
20	Proteína pequeña de choque térmico	54↓	18/6.32	116090563	427
21	Proteína hipotética conservada	38↓	13/4.54	316966355	278

* Sistema Nano-LC-ESI-MS-MS.

Algunas de las proteínas identificadas participan en la respuesta al estrés oxidativo y señalización. La mayor parte pertenece a la maquinaria metabólica del parásito y al citoesqueleto. Dentro de éstas últimas se encontró que **GNV-14** induce una disminución en la expresión de α -tubulina, β -tubulina y una actina hipotética (Matadamas-Martínez et al., 2013). Estas proteínas desempeñan papeles clave en procesos biológicos importantes para el mantenimiento de la homeostasis celular ya que le permiten a la célula cambiar de forma, mover partículas y organelos dentro de su citosol, y llevar a cabo la división celular (Lodish et al, 2005). A la fecha, no se sabe si el efecto de **GNV-14** sobre estas proteínas es a nivel transcripcional o si actúa directamente sobre la proteína, tal como lo hace el albendazol sobre la β -tubulina, inhibiendo su polimerización.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La quimioterapia sigue siendo la mejor herramienta para el control de las infecciones causadas por helmintos, basada principalmente en el uso del **ABZ** y **MBZ**. Sin embargo, existen varias limitantes en su uso como: baja biodisponibilidad, falla terapéutica y el desarrollo de resistencia de poblaciones de helmintos a dichos fármacos.

Con la finalidad de contar con alternativas en el tratamiento de las helmintiasis se sintetizó el derivado bencimidazólico 5-(2,3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (**GNV-14**). Para la evaluación de la actividad de **GNV-14** se empleó como modelo al nematodo *T. spiralis*. Los ensayos *in vitro* e *in vivo* demostraron que **GNV-14** tiene mayor actividad que el **ABZ** contra la **LM** de *T. spiralis*. El análisis proteómico de las **LM** tratadas con **GNV-14** demostró la expresión diferencial de proteínas del metabolismo energético y del citoesqueleto de las larvas, y por MET y MEB se demostró que **GNV-14** ocasionó en la **LM** pérdida de conexión entre la cutícula y la hipodermis, un incremento en vacuolas intracelulares y depósitos de lípidos y daño importante en el epitelio intestinal del parásito, daños similares a los descritos para el **ABZ**.

Para definir el nivel al que **GNV-14** afecta la expresión de las proteínas del citoesqueleto, α y β tubulina y actina, en el presente trabajo se analizó la expresión de estas proteínas del citoesqueleto del parásito mediante las técnicas de Western blot y RT-PCR punto final. Además, se analizó el efecto de **GNV-14** sobre isoformas de α -tubulina modificada post-traduccionalmente, ya que se sabe que algunas de estas isoformas se encuentran en microtúbulos más estables, como es el caso de α -tubulina acetilada y α -tubulina tirosinada.

Finalmente, tomando en cuenta que el daño ocasionado por **GNV-14** a cutícula e intestino del parásito es similar al reportado para el **ABZ**, se hizo un análisis comparativo del efecto de estos dos compuestos sobre las proteínas del citoesqueleto del parásito.

4. HIPÓTESIS

GNV-14 actúa directamente sobre las proteínas del citoesqueleto de la **LM** de *T. spiralis*. El efecto de **GNV-14** y **ABZ** sobre las proteínas del citoesqueleto de la **LM** de *T. spiralis* es similar.

5. OBJETIVO GENERAL

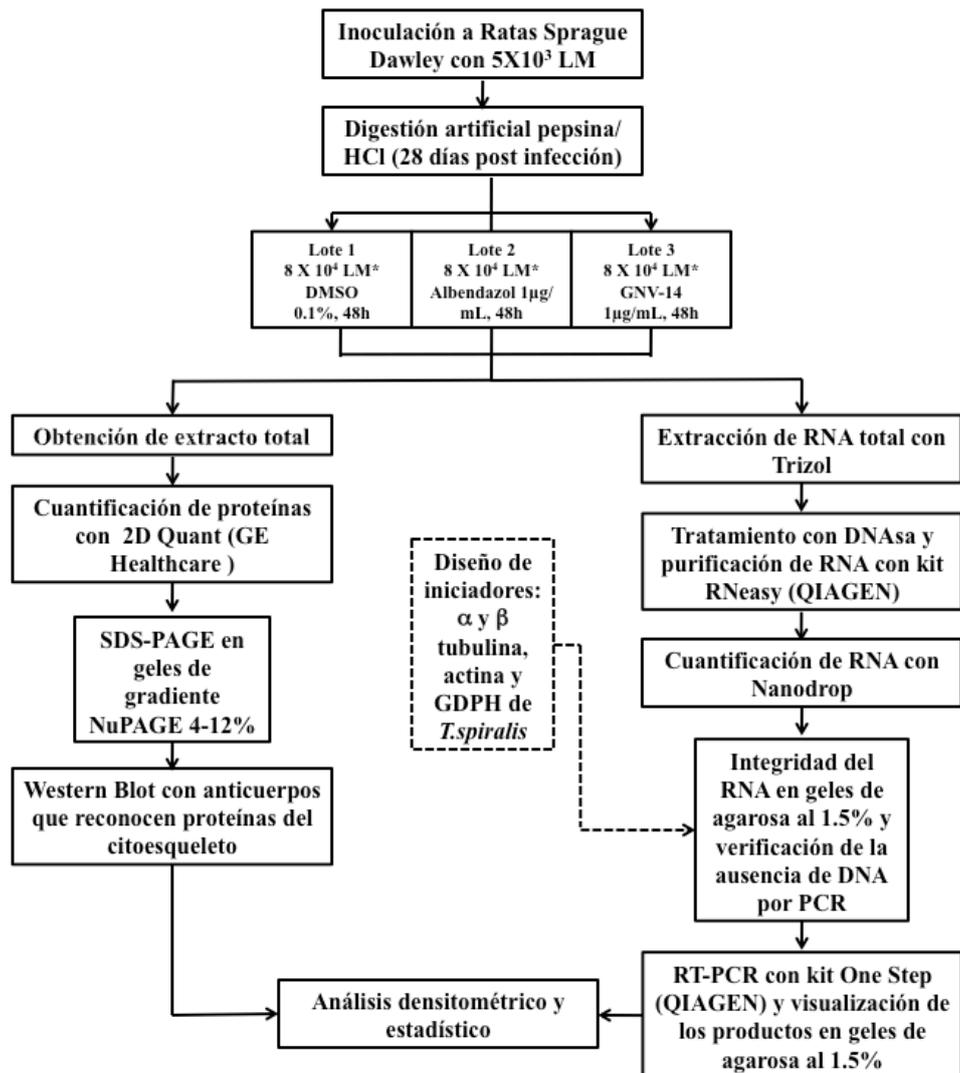
- Evaluar el efecto de **GNV-14** sobre la expresión de las proteínas del citoesqueleto, α -tubulina, β -tubulina y actina, de la **LM** de *T. spiralis* mediante Western blot y RT-PCR punto final.

Objetivos particulares

- Comparar el efecto de **GNV-14** y **ABZ** sobre la expresión de las proteínas del citoesqueleto, α -tubulina, α -tubulina tirosinada, α -tubulina destirosinada, α -tubulina acetilada, β -tubulina y actina de la **LM** de *T. spiralis* mediante Western blot.
- Comparar el efecto de **GNV-14** y **ABZ** sobre los niveles de transcripción de α -tubulina, β -tubulina y actina de la **LM** de *T. spiralis* mediante RT-PCR punto final.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

La metodología general se presenta en el siguiente diagrama de flujo:



* 2×10^4 LM para los ensayos de RT-PCR

Obtención de LM de *Trichinella spiralis*

Las larvas se obtuvieron de ratas macho Sprague Dawley de 250 ± 20 g de peso previamente infectadas con 5×10^3 LM de la cepa MSUS/MEX/91/CM-91 conforme a lo indicado por Dennis et al. (1970). Para esto, las ratas se sacrificaron a los 28 días post-infección con cloruro de etilo, retirando piel, extremidades y vísceras. El tejido muscular (incluido el diafragma) fue molido en una picadora hasta obtener una masa pastosa. El material obtenido se

incubó 3h a 37°C en una solución de pepsina-HCl al 1% con agitación a 250 rpm. El tejido digerido fue filtrado a través de un aparato de Baermann modificado, colectando las larvas en una probeta. Las **LM** obtenidas se lavaron 5 veces con PBS estéril.

Conteo de LM

Se tomó una alícuota de 10µL de **LM** recuperadas y se resuspendieron en 1mL de bactoagar al 0.2%. Se tomaron 30 alícuotas de 10 µl cada una y se determinó directamente el número de larvas con un microscopio óptico. Se obtuvo el promedio de los conteos realizados y el número obtenido de larvas.

Tratamiento de las LM con GNV-14 o ABZ

Los ensayos se realizaron en condiciones de esterilidad. Tanto el **ABZ** como el **GNV-14** se solubilizaron previamente en Dimetil Sulfoxido (**DMSO**) a una concentración de 5mg/mL. Se formaron 3 lotes de 8×10^4 **LM** en cajas Petri que contenían 20mL de medio RPMI-1640 con Bicarbonato de Sodio (2g/L) y antibióticos (estreptomina 100µg/mL, penicilina 100U/mL). Al primer y segundo lote se les adicionó **GNV-14** o **ABZ** a 1µg/mL, respectivamente, y se incubaron 48h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% con cambio de medio más compuestos a las 24h. El tercer lote de **LM** se usó como control negativo adicionando sólo **DMSO** al 0.1%.

Obtención de extracto soluble de LM

Pasadas las 48h de incubación, se obtuvieron los extractos solubles de los parásitos de los 3 lotes. Se separaron las larvas del medio de cultivo por

sedimentación y se lavaron 3 veces con PBS estéril, se transfirieron por separado a un homogeneizador de tejidos agregando 1 mL de PBS pH 7.4 complementado con MgCl₂ 1mM, KCl 0.04 mM e inhibidores de proteasas (100µL de TPCK y de TLCK a 1 mg/mL). Las **LM** se trituraron en baño de hielo hasta obtener una solución turbia la que se clarificó centrifugando a 12,000 rpm durante 20 minutos a 4°C (centrífuga Mikro 22R con rotor de 9cm de diámetro). Se colectó la fase acuosa y se congeló a -70°C hasta su uso.

Cuantificación de los extractos solubles de las LM

La cuantificación de proteína total de los extractos se realizó con el kit comercial 2-D Quant (GE Healthcare®) cuyo principio se basa en la unión específica de iones de cobre a las proteínas previamente precipitadas, y la medición espectrofotométrica del cobre restante en solución. Se preparó por triplicado una curva estándar utilizando la solución patrón de albúmina a 2µg/mL incluida en el kit (Tabla 5).

Tabla 5. Curva estándar de albúmina sérica bovina				
Número de tubo	1	2	3	4
Vol. BSA (µL)	0	2.5	5	7.5
Concentración de BSA (µg)	0	5	10	15

La cuantificación de los extractos también se hizo por triplicado. Se transfirieron 3 µL de cada muestra a tubos eppendorf y se agregaron 100 µL de

solución precipitante, 100 μ L de solución co-precipitante y se centrifugaron todos los tubos a 12,000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se añadieron 20 μ L de solución de cobre y 80 μ L de agua desionizada. Finalmente, se añadieron 200 μ L de reactivo de color y se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se transfirió el contenido de los tubos a una placa de poliestireno de 96 pozos, midiendo la densidad óptica en un espectrofotómetro para microplacas a 480 nm. La concentración de proteínas se obtuvo mediante el método de regresión lineal con base en la curva patrón obtenida.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para verificar la integridad de las proteínas contenidas en los extractos se realizó la separación de éstas en condiciones reductoras con 2- β -mercaptoetanol y SDS al 10% de acuerdo a lo indicado por Laemmli (1970). Se tomaron 30 μ g de proteína total y se les añadió amortiguador de muestra (Tris-HCl 0.5M pH 6.8, glicerol, SDS al 10%, 2- β -mercaptoetanol al 0.05% v/v y azul de bromofenol al 0.05% p/v) en proporción 1:2. Cada muestra se cargó en geles de poliacrilamida con el gel concentrador al 5% y el gel separador al 10% en una cámara de electroforesis Mini Protean II (Bio Rad[®]) con amortiguador de electroforesis (Tris-Glicina-SDS) 1X a 80 volts durante 15 minutos y posteriormente a 100 Volts por 2 horas. Se empleó un marcador de peso molecular con rango entre 209 y 7 KDa (Prestained SDS-PAGE Broad Range Bio Rad[®]). Los geles se tiñeron 2 horas con azul de Coomassie G-250 al 0.06% y se destiñeron con una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10%.

Análisis de los extractos solubles de LM por Western Blot

El análisis por Western blot de los extractos solubles se realizó siguiendo la metodología descrita por Towbin (1979). Las proteínas (500 µg) se separaron electroforéticamente en geles de gradiente prehechos NuPAGE 4-12% Bis-Tris de 1mm (Invitrogen®) utilizando como amortiguador de muestra pironina Y (0.05% p/v) en proporción 1:1. Las muestras se corrieron durante 2 horas a 100 Volts constantes empleando el amortiguador de electroforesis incluido en el kit y el marcador de peso molecular preteñido indicado previamente.

Terminada la separación de las proteínas, los geles fueron incubados 1 hora a 4°C en amortiguador de transferencia (Tris 0.025M, glicina 0.192M, metanol al 20% v/v, pH 8.3) para eliminar los restos de SDS, haciendo un cambio de amortiguador a los 30 minutos. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF en una cámara Mini Trans-Blot Electroforetic Cell (Bio Rad®) con una corriente constante de 100 Volts durante 1 hora. Una vez realizada la transferencia, se cortó la parte que contenía el marcador de peso molecular, y una tira de 3mm de grosor la cual fue teñida con amido negro por 1 minuto y desteñida con una solución de isopropanol al 25% y ácido acético al 10% para verificar la transferencia de las proteínas a la membrana. El resto de la membrana se bloqueó toda la noche con PBS/Albúmina sérica bovina (ABS) al 3% con agitación a 4°C. Luego del bloqueo, se cortó la membrana en tiras de 3 mm de grosor, se lavaron tres veces con PBS estéril. En la Tabla 6 se presentan los anticuerpos primarios y secundarios empleados, así como su dilución. Las tiras se incubaron con los anticuerpos primarios dirigidos contra proteínas del citoesqueleto por tres horas a 37°C, posteriormente se realizaron

tres lavados con PBS estéril y se incubaron con los anticuerpos secundarios por dos horas a 37°C. Las tiras se revelaron con 4-cloro-1-naftol en presencia de H₂O₂. Las imágenes se capturaron con un fotodocumentador Quantum ST4 (Vilber Lourmat®) y se realizó un análisis densitométrico con el programa Quantity One 4.6.3 (Bio Rad®).

Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en el análisis por Western blot				
Clona del anticuerpo primario/ (marca)	Proteína que reconoce	Dilución	Anticuerpo secundario/ (marca)	Dilución
B-5-1-2 (Sigma)	α -Tubulina	1:1500	Goat anti mouse conjugado a HRP (Millipore)	1:1000
YL 1/2 (Millipore)	α -tubulina tirosinada	1:1000	Goat anti rat conjugado a HRP (Millipore)	1:500
YL 1/34 (Sigma)	α -tubulina destirosinada	1:100	Goat anti rat conjugado a HRP (Millipore)	1:500
6-11B-1 (Sigma)	α -tubulina acetilada	1:50	Goat anti rat conjugado a HRP (Millipore)	1:100

KMX-1 (Millipore)	β -tubulina	1:500	Goat anti mouse conjugado a HRP (Millipore)	1:1000
C4 (Millipore)	Actina	1:500	Goat anti mouse conjugado a HRP (Millipore)	1:1000

Obtención de DNA genómico

Para la extracción del DNA de las **LM** se siguió la metodología descrita por Andrade (2011). 2×10^4 **LM** se lavaron tres veces con PBS 1X y se incubaron durante tres horas a 55°C en solución de lisis (EDTA 0.1M, NaCl 0.15M, SDS al 1%) adicionada con proteinasa K a 1mg/mL. Terminada la incubación se agregó RNAsa de páncreas de bovino a 100µg/mL y se incubó la muestra durante una hora a 50°C en agitación. El DNA se extrajo mediante una serie de extracciones con fenol, fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), recuperando siempre la fase acuosa y transfiriéndola a un tubo nuevo de 1.5 mL. Para eliminar los restos de cloroformo se realizó una extracción con éter etílico, recuperando en este caso la fase inferior de la muestra. El DNA se precipitó agregando una décima parte de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de alcohol etílico absoluto (con respecto al volumen obtenido de DNA) y se guardó toda la noche a -20°C. Finalmente, se centrifugó la muestra a 10,000 rpm durante 30 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se lavó el botón de DNA con alcohol etílico al 75%. Se resuspendió el DNA en 30µl de agua inyectable y se determinó la concentración y la pureza mediante espectrofotometría a 230, 260 y 280 nm

utilizando un Nanodrop (Spectrophotometer ND-100[®]), y se almacenó a -20°C hasta su posterior uso en ensayos de la reacción en cadena de la polimerasa **(PCR)**.

Obtención de RNA total

Una vez transcurrido el tiempo de los tratamientos con **GNV-14** y **ABZ**, además de la muestra control descritos previamente, los parásitos se lavaron tres veces con PBS 1X y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos para remover los restos de medio de cultivo, posteriormente se transfirieron a tubos eppendorf estériles. Cada lote de larvas fue congelado con nitrógeno líquido y triturado con homogeneizadores de plástico hasta obtener una masa homogénea. Se agregó 1 mL de Trizol (invitrogen) y se agitó con vórtex durante 10 segundos, dejando reposar la muestra 15 minutos en hielo para completar la lisis tisular. En seguida se agregaron 200 µL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa de cada lote y se adicionaron 500 µL de isopropanol para precipitar el RNA. Nuevamente se centrifugó a las mismas condiciones, se decantó el isopropanol y se agregó 1 mL de alcohol etílico al 70%. Finalmente, se centrifugó y se decantó el etanol dejando evaporar los restos de alcohol a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se resuspendió el RNA en 50 µL de agua libre de RNAsas. La concentración y la pureza se determinaron espectrofotométricamente a 260 y 280 nm con Nanodrop.

Eliminación de DNA genómico y purificación del RNA

Con el objetivo de obtener muestras completamente libres de DNA, se tomaron 10 µg de RNA total y se trataron durante 15 minutos a 37°C con DNAsa (Promega®) a 1U/µg de RNA. Posteriormente, el RNA fue purificado con el kit RNeasy (QIAGEN®). Las muestras de RNA con DNAsa fueron colocadas en las columnas de sílice incluidas en el kit, agregando 500 µl de amortiguador RPE®. Se centrifugó durante 15 segundos a 11,000 rpm y se descartó el filtrado. Nuevamente se agregaron 500 µl de amortiguador RPE y se centrifugó la muestra esta vez durante 2 minutos a 11,000 rpm. Se descartó el filtrado y se colocó la columna en un tubo colector nuevo de 1.5 mL. Se agregaron 30 µl de agua libre de RNAsas al centro de las columnas y se centrifugó a 11,000 rpm durante 1 minuto para eluir el RNA. Finalmente, se cuantificó el RNA purificado con Nanodrop.

Verificación de la integridad del RNA obtenido

Para verificar la calidad del RNAm de los parásitos tratados y sin tratamiento, se tomaron 500 ng de cada muestra y se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% en condiciones nativas, teñidos con bromuro de etidio. El gel se corrió en una cámara de electroforesis (HORIZON® 58, LIFE TECHNOLOGIES) a 70 Volts durante 90 minutos empleando amortiguador TAE 1X frío preparado con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.01% y se observó en un transiluminador Quantum ST4 con luz ultravioleta.

Diseño de iniciadores específicos

Para realizar la **RT-PCR** se diseñaron iniciadores específicos para cada gen de interés (Tabla 7). Esto se realizó con el programa PrimerBlast® (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Gen	Tamaño esperado del producto (pb)	T _m (°C)	%GC	Primer	Secuencia (5' → 3')
α -Tubulina	862	59.04	50	F	ACAAAGAGTCGCTCGGTGTA
		60.04	55	R	TTCGGGACAACATCACCTCG
β -Tubulina	640	59.97	60	F	GGGCACTATACGGAAGGAGC
		59.96	50	R	AGATCGCAGCCACTGTCAA
Actina	849	57.97	55	F	CTTCCCACACAGGCAGTATC
		57.97	50	R	AGCATCTTCACCGACCAATC
GDPH*	570	55.37	40	F	TTAATGTTCGTGGCTGTGAAT
		56.39	50	R	CCAGTAGAAGCAGGGATGAT

*iniciadores reportados por Wang y cols (2013). Gen constitutivo.

Análisis de la ausencia de DNA genómico en las muestras de RNA por PCR

Para verificar que el RNA obtenido se encontrara completamente libre de DNA, se preparó una **PCR** para amplificar el gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (**GDPH**) de *T. spiralis*, empleando los iniciadores reportados por Wang et al. (2013) (Tabla 7).

La mezcla de reacción se preparó agregando a un tubo de PCR 45µl de agua inyectable, 6.6µl de amortiguador de reacción 10X, 3.3µl de cloruro de magnesio, 15 µM de la mezcla de dNTP's y 0.65µl de la enzima amplificasa[®], que es la DNA polimerasa termorresistente que lleva a cabo la síntesis de DNA. Se agregaron 100 ng de las muestras purificadas de RNA de los parásitos tratados y sin tratar y 0.6 µM de los iniciadores F y R de **GDPH**. Como control positivo se agregó a otro tubo 100 ng de DNA del parásito. El volumen de reacción fue de 15 µl. Las muestras se colocaron en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf[®]). Las condiciones utilizadas en el PCR fueron las siguientes:

Desnaturalización	94°C por 30 segundos
Alineamiento	57°C por 30 segundos
Extensión	72°C por 1 minuto

Finalmente, se programó un paso de extensión final a 72°C con duración de 10 minutos. Los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5% preparado con amortiguador TAE 1X y teñido con bromuro de etidio. Como marcador de peso molecular se empleó la escalera de 100 pb (Axygen[®]) con un rango de 3.0 a 0.1 kb.

Reacción en cadena de la polimerasa reverso transcriptasa (RT-PCR) punto final

Las muestras de RNA íntegras y libres de DNA se emplearon para realizar la **RT-PCR** punto final con el kit RT-PCR One Step (QIAGEN[®]), el cual contiene enzimas que permiten realizar la síntesis de cDNA y el PCR en un solo paso. El

volumen de reacción se optimizó a 15 μ l. Se incluyó como gen constitutivo a la GDPH. A continuación se presentan las cantidades (volumen) de cada uno de los componentes empleados en la reacción.

Componente	Cantidad (μL)
Agua libre de RNAsas	Variable
Amortiguador 5x	3
Solución Q	3
dNTP's	0.6
Oligonucleótidos	0.6 μ M*
Mezcla de enzimas	0.6
RNA libre de DNA	50ng

*0.1 μ M para los iniciadores de β -tubulina .

Los productos obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% preparado con amortiguador TAE 1X y agua tratada con DEPC al 0.01%, excepto para el gen de la β -tubulina, donde los amplicones se analizaron en geles al 2.0%. El corrimiento electroforético se realizó en 90 minutos a 70 Volts. Los geles fueron documentados con un equipo Quantum ST4 y se realizó el análisis densitométrico con el programa ImageJ v1.47 (National Institutes of Health, USA). Las muestras se normalizaron respecto a GDPH tomando como el 100% de expresión los amplificadores de las muestras control. Se realizó una prueba de ANOVA ($p=0.05$) para detectar diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al control (larvas no tratadas).

7. RESULTADOS

Obtención de extractos solubles de LM no tratada o tratada con GNV-14 o ABZ

Las proteínas fueron obtenidas por maceración de las larvas tratadas o no tratadas con **ABZ** y **GNV-14** y su concentración se obtuvo mediante cuantificación con el kit 2D-Quant. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentración de proteínas de las muestras	
Muestra	Concentración de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Control	8.52
ABZ	7.96
GNV-14	8.28

Análisis electroforético (SDS-PAGE) de los extractos solubles de las LM control o tratadas con GNV-14 o ABZ

Para verificar la integridad de los extractos proteicos se tomaron 30 μg de cada muestra y se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras (Figura 9). De manera general, se puede observar la integridad de las muestras con presencia mayoritaria de proteínas localizadas entre 115 y 30 kDa.

El análisis densitométrico reveló un patrón de bandeo muy similar en las tres muestras, sin embargo, se observaron niveles diferentes en la expresión de algunas proteínas entre los tratamientos (Figura 10). En las muestras obtenidas de **LM** tratadas con **GNV-14** o **ABZ** se observó un incremento en la expresión de bandas con pesos aproximados de 200, 150, 30, 17, 14 kDa, con respecto al control. En el extracto de **GNV-14** las bandas correspondientes a 77, 45, 30, 26 y 11 presentaron menor intensidad con respecto al control. En su caso, **ABZ** redujo la expresión de 5 bandas con pesos de 70, 49, 32, 26 y 23 kDa.

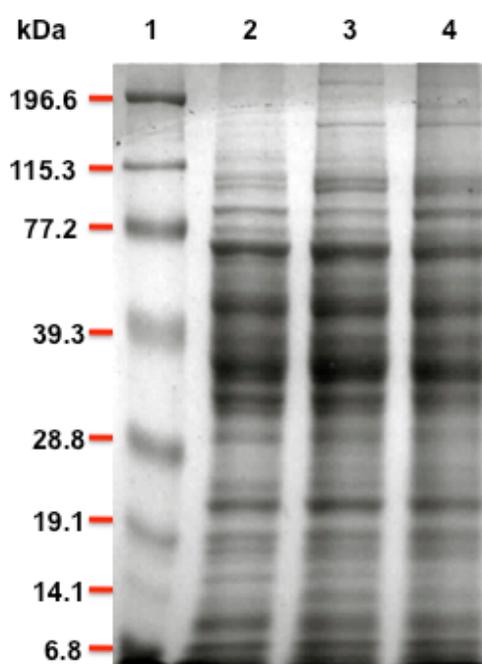


Figura 9. Perfil proteico de los extractos solubles de **LM** control (carril 2) y de **LM** tratadas con **ABZ** (carril 3) o **GNV-14** (carril 4). El gel fue cargado con 30 µg de proteínas de cada muestra y teñido con azul de Coomassie G-250. Se utilizaron marcadores preteñidos de peso molecular de amplio rango (BioRad). La imagen se obtuvo con un fotodocumentador Quantum ST4.

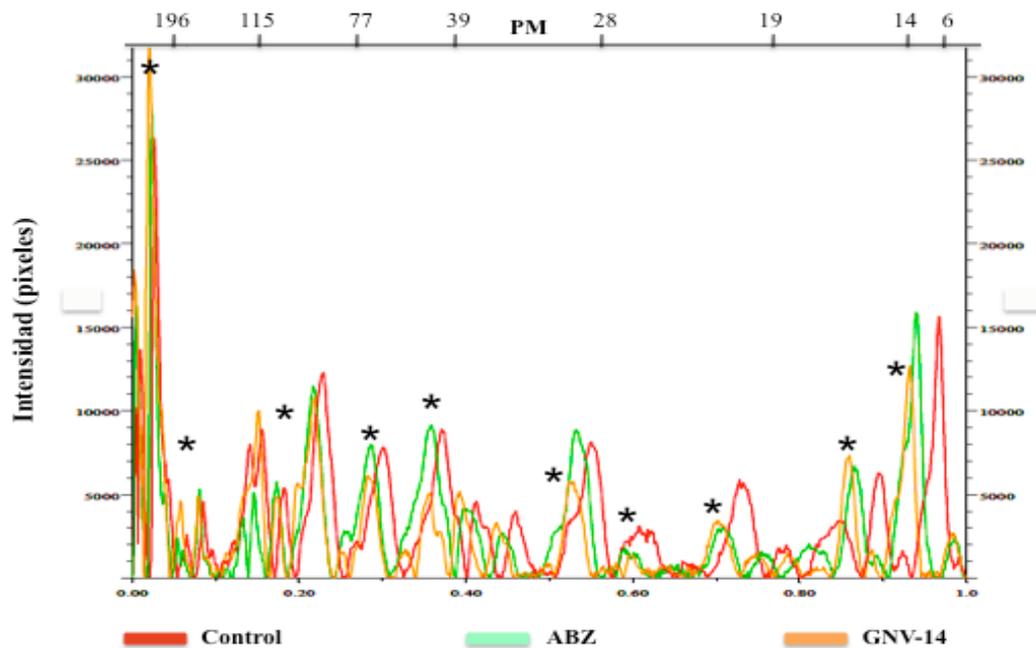


Figura 10. Análisis densitométrico del perfil de proteínas de las **LM** de *T. spiralis* control (línea roja), tratadas con **GNV14** (línea naranja) o **ABZ** (línea verde), empleando el software Quantity One 4.6.3. En el eje vertical se presenta la intensidad de las líneas en pixeles, mientras que en la línea horizontal se muestra la movilidad relativa de las bandas en valores de Rf. Los asteriscos representan bandas con expresión diferencial respecto al control.

Reconocimiento de las proteínas de citoesqueleto de la LM de *T. spiralis* control y tratadas con GNV-14 o ABZ mediante Western blot

El efecto de **GNV-14** y **ABZ** sobre la expresión de las proteínas de citoesqueleto, α y β -tubulina, α -tubulina acetilada, tirosinada y destirosinada y actina de la **LM** se analizó empleando anticuerpos primarios específicos contra estas proteínas.

α y β -tubulina

El reconocimiento de α y β -tubulina por los anticuerpos B-5-1-2 y KMX-1, respectivamente, se presenta en la Figura 11A-B. Ambos anticuerpos reconocieron una banda de 55 kDa tanto en la muestra control como en las

tratadas con **ABZ** y **GNV-14** (carriles 1, 2 y 3). Sin embargo, en la muestra tratada con **ABZ** se observa una disminución importante en el reconocimiento de la banda correspondiente a α -tubulina (Figura 11A carril 2) y en el caso de β -tubulina, la banda correspondiente no es visible (Figura 11B, carril 2). El análisis densitométrico reveló que el tratamiento con **GNV-14** no afecta la expresión de α -tubulina (Figura 11C), pero sí induce un incremento del 42% en la expresión de β -tubulina, con respecto al control ($p \leq 0.05$) (Figura 11D). En relación con el tratamiento con **ABZ**, por densitometría se demostró que la expresión de α -tubulina y β -tubulina disminuyó 57% y 100% respectivamente, con respecto al control ($p \leq 0.05$), (Figura 11C y D).

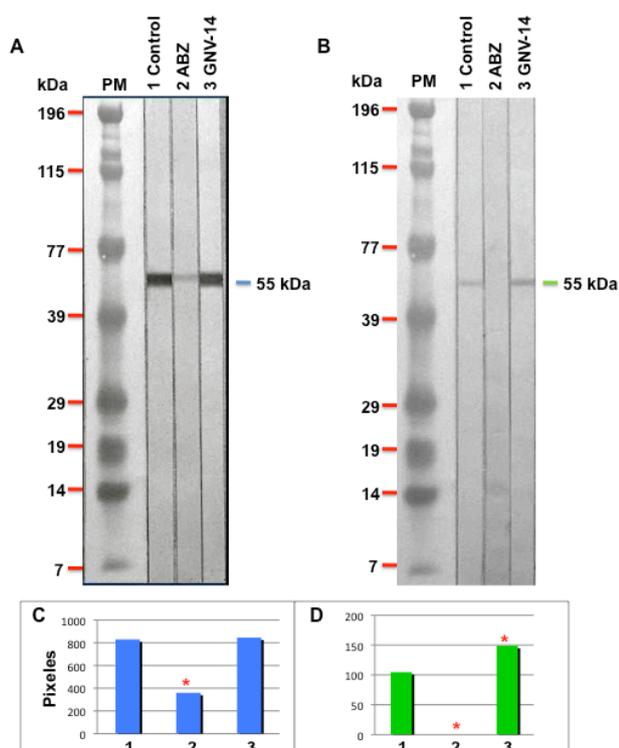


Figura 11. Reconocimiento de α -tubulina (**A**) y β -tubulina (**B**) en extractos solubles de **LM** tratadas con **GNV-14** y **ABZ** ($1\mu\text{g}/\text{mL}$), por los anticuerpos monoclonales B-5-1-2 y KMX-1, respectivamente. **Control** (carril 1), **ABZ** (carril 2) y **GNV-14** (carril 3). Las bandas reconocidas por ambos anticuerpos tuvieron un tamaño de 55 kDa. Análisis densitométrico del reconocimiento de α -tubulina (**C**) y β -tubulina (**D**). Se muestran las intensidades de las bandas en pixeles, obtenida mediante el análisis densitométrico con el programa Quantity One 4.6.3 (Bio Rad). * $p \leq 0.05$.

α -tubulina tirosinada y destirosinada

Para el reconocimiento de α -tubulina tirosinada y destirosinada se emplearon los anticuerpos YL 1/2 y YL 1/34, respectivamente (Figura 12A y B). Ambos anticuerpos reconocieron en la muestra control y en la tratada con **GNV-14**, dos bandas con pesos moleculares aproximados de 61 y 47 kDa (Figura 12 A y B, carriles 1 y 3). Sin embargo, en la muestra tratada con **ABZ**, los anticuerpos solo reconocieron la banda de 47 kDa (Figura 12A y B carril 2) y en el caso de la α -tubulina destirosinada, se reconoció una banda extra de 28 kDa (Figura 12B, carril 2).

El análisis densitométrico mostró en la muestra tratada con **GNV-14** una disminución en la expresión de las dos bandas reconocidas con el anticuerpo dirigido contra α -tubulina tirosinada, del 37% y 35%, significativamente diferente con respecto al control ($p \leq 0.05$)(Figura 12C), mientras que para α -tubulina destirosinada, la expresión de estas dos bandas aumentó significativamente 31%, y 62%, respecto al control ($p \leq 0.05$) (Figura 12D). En relación con **ABZ**, por densitometría se evidenció que la única banda reconocida de 47 kDa disminuyó significativamente su expresión (54%) en la muestra de α -tubulina tirosinada, y 29% en la muestra de α -tubulina destirosinada ($p \leq 0.05$) (Figura 12 C-D).

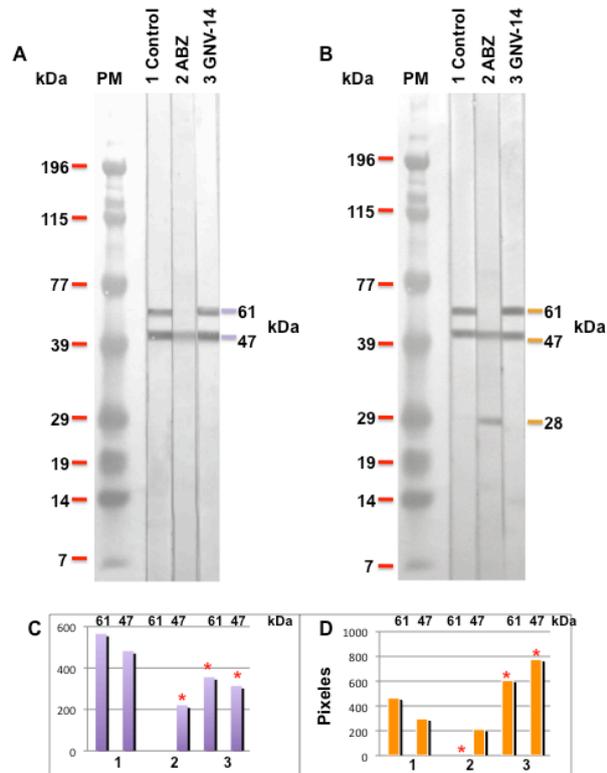


Figura 12. Reconocimiento de α -tubulina tirosinada (A) y destirosinada (B) en extractos solubles de LM tratadas con GNV-14 (carril 3) y ABZ (carril 2) por los anticuerpos YL 1/2 y YL 3/4, respectivamente mediante Western blot. Análisis densitométrico del reconocimiento de α -tubulina tirosinada (C) y α -tubulina destirosinada (D). Se muestran las intensidades de las bandas en pixeles, obtenida mediante el análisis densitométrico con el programa Quantity One 4.6.3 (Bio Rad). *p \leq 0.05.

α -tubulina acetilada

No se observó reconocimiento de α -tubulina acetilada de *T. spiralis* en ninguno de los dos ensayos independientes que se realizaron con el anticuerpo 6-11B-1.

Actina

El reconocimiento de actina por el anticuerpo monoclonal C4 se presenta en la Figura 13. En la muestra control y en las tratadas con GNV-14 y ABZ se reconoció una banda de aproximadamente 40 kDa (Figura 13, carriles 1-3), sin embargo, con GNV-14 se observó una disminución importante en el intensidad de reconocimiento de la proteína (Figura 13 carril 3). En la muestra

tratada con **ABZ** se detectó un aumento en el reconocimiento de actina con respecto al control. El análisis densitométrico mostró que la expresión de actina en la muestra tratada con **GNV-14** se redujo 77% con respecto al control ($p \leq 0.05$) y en la tratada con **ABZ** aumentó 211%, con respecto al control ($p \leq 0.05$).

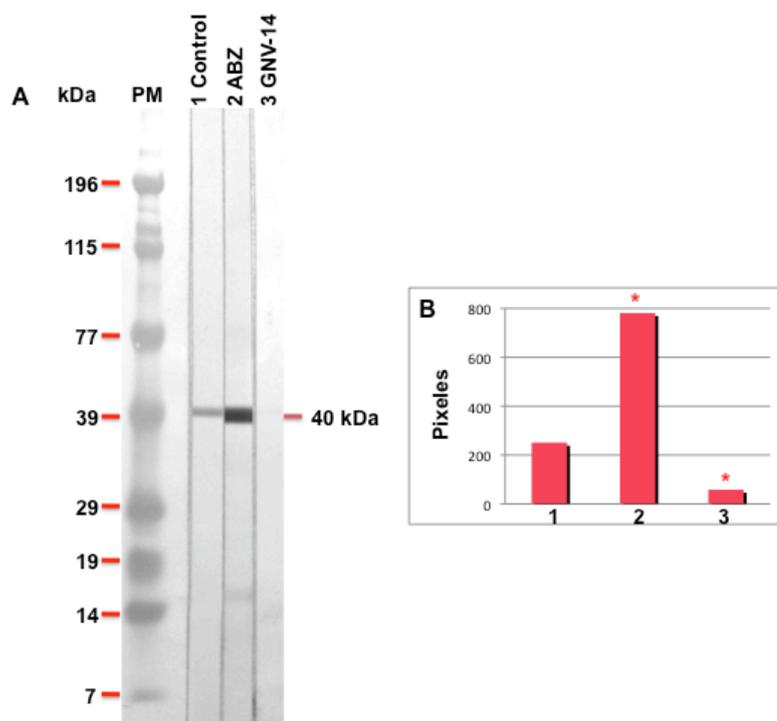


Figura 13. (A) Reconocimiento de actina en extractos solubles de **LM** control (carril 1) y tratadas con **GNV-14** (carril 3) y **ABZ** (carril 2) por el anticuerpo C4. (B) Se muestran las intensidades de las bandas en pixeles, obtenida mediante el análisis densitométrico con el programa Quantity One 4.6.3 (Bio Rad). * $p \leq 0.05$.

RT-PCR

Obtención y purificación de RNA

El RNA de las larvas tratadas con **GNV-14** o **ABZ**, así como el control sin tratamiento, se obtuvo mediante lisis con Trizol, se trató con DNAsa y se purificó con el kit RNeasy. La cantidad obtenida de RNA osciló entre 98.8 y 106.1 ng/ μ L con alto grado de pureza con valores entre 1.97 y 2 (determinada por el cociente 260/280).

Integridad del RNA

En la Figura 14 se pueden apreciar los RNAr de *T. spiralis* con un peso aproximado de 2300 y 2000 pb (Ovando, 1988) además de varias bandas de RNAm, lo que sugiere la integridad de la muestra.

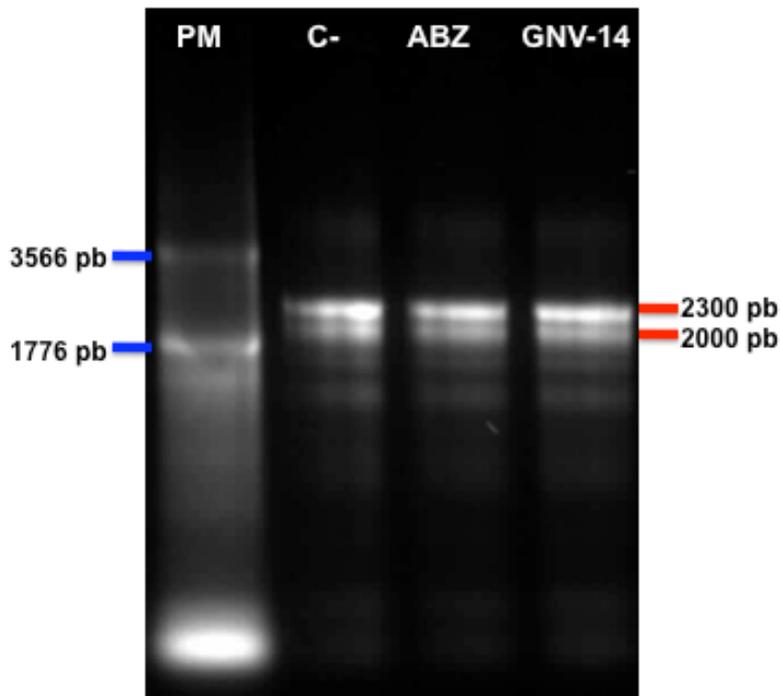


Figura 14. Integridad de las muestras de RNA. Las muestras de RNA (500 ng) obtenidas de los parásitos tratados con **GNV14** o **ABZ** así como del control se corrieron en geles de agarosa al 1.5% en condiciones nativas. Como marcador de peso molecular se empleó el RNAr 16s y 23s de *E. coli*, que corresponden a 1776 y 3566 pb.

Análisis de la presencia de DNA genómico en las muestras de RNA

Para verificar que las muestras de RNA control y tratadas con **GNV-14** o **ABZ** estuvieran libres de DNA genómico se procedió a amplificar el gen constitutivo GDPH de *T. spiralis*. En la Figura 15 se puede observar que sólo en la muestra control (DNA genómico del parásito) se amplificó el fragmento esperado de 570 pb, indicando que las muestras de RNA están libres de DNA genómico.

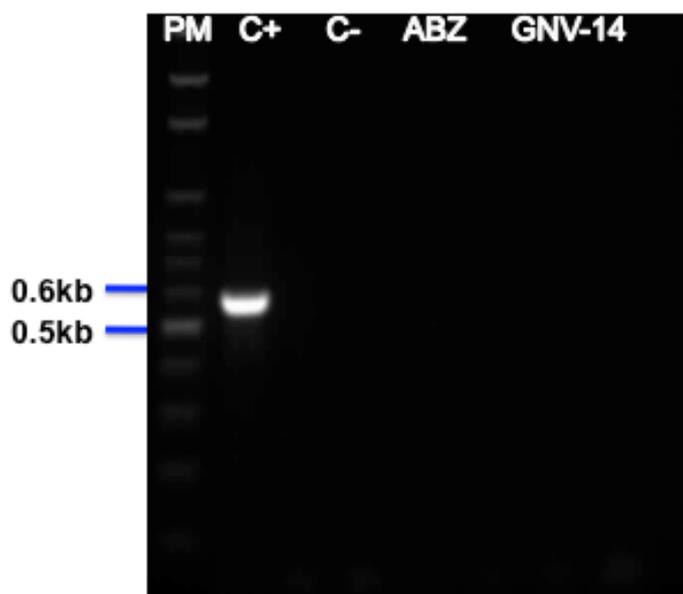


Figura 15. Amplificación de GDPH en las muestras de RNA. Como control positivo (C+) se utilizó DNA del parásito, amplificando un producto de 570 pb. En las muestras de RNA control (C-), **ABZ** y **GNV-14** no se observó amplificación de GDPH.

RT-PCR punto final

Para evaluar el efecto de **GNV-14** y **ABZ** sobre los niveles de expresión de las proteínas del citoesqueleto, α -tubulina, β -tubulina y actina, de la **LM** de *T. spiralis*, se realizó un ensayo de RT-PCR utilizando el kit OneStep (QIAGEN). Se amplificó en cada muestra además del gen de interés, el gen de GDPH, como gen constitutivo, que permitió normalizar las muestras.

α -tubulina

En la Figura 16 se muestran los productos de amplificación obtenidos para α -tubulina en las muestras control y tratadas con **GNV-14** y **ABZ**. En todos los casos se obtuvo el producto de amplificación esperado para α -tubulina de aproximadamente 862 pb y el de 570 pb correspondiente a la GDPH. En el caso de la muestra tratada con **GNV-14** se observó un ligero incremento en el producto amplificado para α -tubulina, mientras que para el **ABZ** se observa un

decremento evidente en el amplificado. El análisis densitométrico (Tabla 11) mostró que **GNV-14** aumentó 25% los niveles del RNAm específico para la proteína con respecto al control ($p \leq 0.05$), mientras que **ABZ** los redujo 17% ($p \leq 0.05$). Los productos de amplificación se normalizaron con respecto a la GDPH.

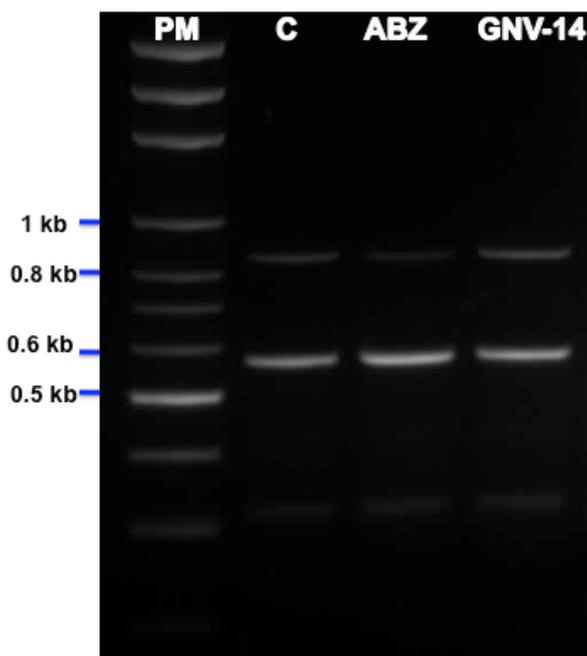


Figura 16. Amplificación por RT-PCR de α -tubulina de la **LM** de *T. spiralis* tratadas con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de **GNV-14** o **ABZ**. El RT-PCR se realizó con 50 ng de RNA de las muestras, de acuerdo a lo descrito en la metodología. Los productos se corrieron en geles nativos al 1.5 % de agarosa, obteniéndose los productos esperados de 570 pb (gene constitutivo) y 862 pb (α -tubulina). Gel representativo de 2 experimentos. PM: marcador de pesos moleculares escalera de 100pb (Axygen).

Tabla 9. Niveles de expresión (%) de α -tubulina en las muestras tratadas con **GNV-14** y **ABZ** con respecto al control.

	Control	ABZ	GNV-14
α-tubulina	100%	83%*	125%*

* $p \leq 0.05$

β -tubulina

En las muestras control y tratadas con **GNV-14** o **ABZ** se amplificaron dos productos de 640 pb y de 570 pb correspondientes a la β -tubulina y GDPH, respectivamente (Figura 17). El análisis densitométrico mostró que los niveles

de RNAm para β -tubulina en las **LM** tratadas con **GNV-14** aumentó un 11 % con respecto al control y disminuyó significativamente 13% en las tratadas con **ABZ** ($p < 0.05$) (Tabla 12).

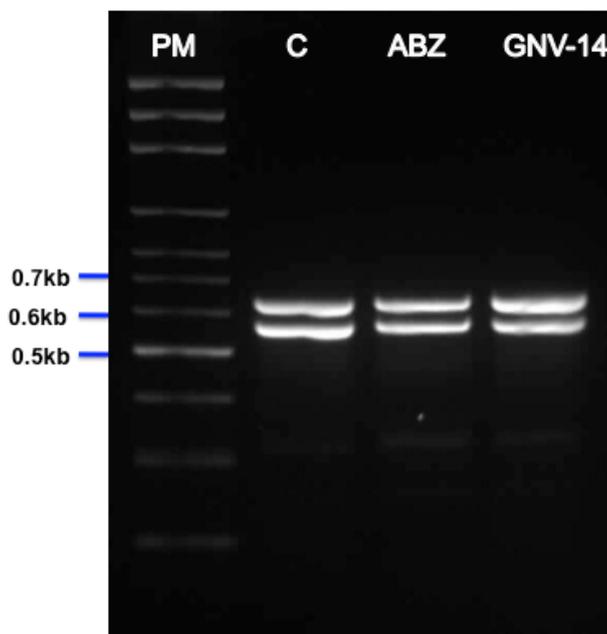


Figura 17. Amplificación por RT-PCR de β -tubulina de **LM** de *T. spiralis* tratadas con 1 μ g/mL de **GNV-14** o **ABZ**. El RT-PCR se realizó con 50 ng de RNA de las muestras, de acuerdo a lo descrito en la metodología. Los productos se corrieron en geles nativos al 1.5 % de agarosa, obteniéndose los productos esperados de 570 pb (gene constitutivo) y 640 pb (β -tubulina). Gel representativo de 2 experimentos. PM: marcador de pesos moleculares escalera de 100pb (Axygen).

Tabla 10. Niveles de expresión (%) de β -tubulina en las muestras tratadas con **GNV-14** y **ABZ**.

	Control	ABZ	GNV-14
β-tubulina	100%	87%*	111%

* $p \leq 0.05$

Actina

En las muestras analizadas se amplificó un producto de 849 pb que corresponde al tamaño esperado para actina y uno de 570 pb que corresponde al gen constitutivo (Figura 18). Se observa un aumento en la expresión del RNAm para actina en la muestra tratada con **ABZ**, que por densitometría se determinó del 67% ($p \leq 0.05$) (Tabla 13).

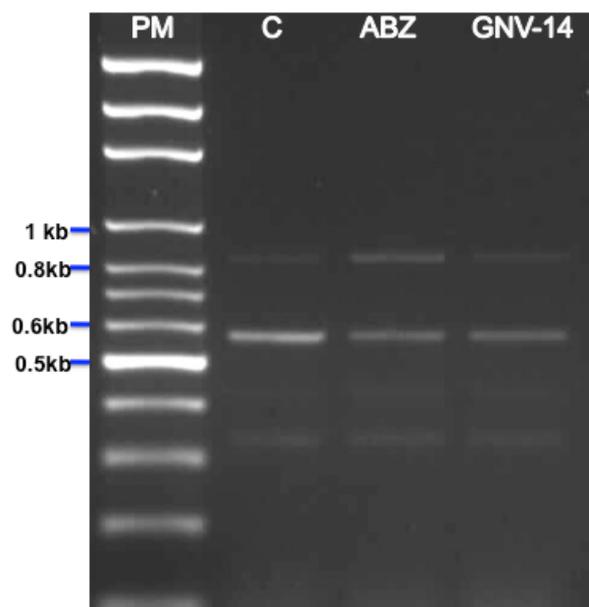


Figura 18. Amplificación por RT-PCR de actina de **LM** de *T. spiralis* tratadas con 1 µg/mL de **GNV-14** o **ABZ**. El RT-PCR se realizó con 50 ng de RNA de las muestras, de acuerdo a lo descrito en la metodología. Los productos se corrieron en geles nativos al 1.5 % de agarosa, obteniéndose los productos esperados de 570 pb (gene constitutivo) y 849 pb (actina). Gel representativo de 2 experimentos. PM: marcador de pesos moleculares escalera de 100pb (Axygen).

Tabla 11. Niveles de expresión (%) de actina en las muestras tratadas con **GNV-14** y **ABZ**.

	Control	ABZ	GNV-14
Actina	100%	167%*	102%

*p≤ 0.05.

8. DISCUSIÓN

Estudios previos han demostrado la actividad antihelmíntica del derivado bencimidazólico **GNV-14** tanto *in vitro* como *in vivo* empleado como modelo al nematodo *Trichinella spiralis* (Navarrete, 2004; Matadamas-Martínez et al., 2013). Mediante el empleo de dos potentes herramientas como son la proteómica y la microscopia electrónica de barrido y transmisión se ha analizado el mecanismo de acción de **GNV-14**. Los estudios de microscopia electrónica sugieren que **GNV-14** posee un mecanismo de acción similar al **ABZ**, induciendo cambios importantes a nivel de cutícula, hipodermis y células intestinales del parásito. El análisis 2D mostró una expresión diferencial de

proteínas del metabolismo energético y una disminución en la expresión de las proteínas del citoesqueleto α -tubulina, β -tubulina y actina de las **LM** (Matadamas-Martínez et al., 2013).

El interés del presente estudio es analizar en detalle si el decremento en la expresión de las proteínas del citoesqueleto de la **LM** se debe a la acción de **GNV-14** sobre la proteína, o si está relacionada con un cambio en la expresión de sus respectivos RNAm, empleando Western blot y RT-PCR, respectivamente. Además, se realizó un análisis comparativo con el **ABZ**.

Los extractos totales de proteína de los parásitos tratados y no tratados con los que se realizó el análisis por Western blot se obtuvieron a una buena concentración y con alto grado de integridad. Con respecto a la purificación del RNAm de los parásitos no tratados y tratados con **GNV-14** o **ABZ**, éste se obtuvo en todos los casos con alto grado de integridad y pureza, como lo indicó el coeficiente 260/280, el cual fue cercano o igual a 2.0. La ausencia de DNA genómico en las muestras de RNAm se constató mediante la amplificación por PCR del gen GDPH de *T. spiralis*. En este caso, únicamente en la muestra control de DNA se obtuvo el amplificado esperado de 570 pb correspondiente al gen constitutivo. El empleo del kit RT-PCR One Step (QIAGEN®) hizo más eficiente el ensayo, pues al añadir desde el inicio todos los reactivos necesarios tanto para la transcripción inversa, como para la amplificación del cDNA se redujeron las posibilidades de degradación de las muestras. Los productos de amplificación obtenidos por RT-PCR siempre correspondieron a los tamaños esperados.

Analizando de manera conjunta los resultados obtenidos por Western blot y RT-PCR para cada proteína tenemos lo siguiente:

Los niveles de RNAm específicos para α -tubulina aumentaron en la muestra tratada con **GNV-14** aproximadamente 25% con respecto al control, sin embargo a nivel de la proteína, el análisis densitométrico no demostró cambios importantes. En el caso de β -tubulina, tanto por Western blot como por RT-PCR se determinaron aumentos en la expresión de la proteína con respecto al control.

Es importante mencionar que el análisis proteómico de la **LM** tratada con **GNV-14** mostró disminución en la expresión de α y β tubulina (Matadamas-Martínez et al., 2013). Los resultados obtenidos en este estudio no reflejan una disminución ni a nivel transcripcional ni a nivel de las proteínas mismas. Lo anterior pudiera deberse a que el spot que se seleccionó del gel 2D representa un isotipo o isoforma de α y β -tubulina, que en los estudios de RT-PCR y Western blot no se está detectando, considerando que por un lado la secuencia es muy conservada y por otro que en el caso de Western blot la separación electroforética se realizó en geles 1D y los anticuerpos empleados reconocen epítopes altamente conservados. Para detectar posibles cambios en la presencia de isoformas de α y β -tubulina en *T. spiralis*, es conveniente realizar la separación 2D de las proteínas del parásito y transferirlas a membranas de PVDF para su inmunodetección y posterior secuenciación.

En relación al **ABZ**, tanto por RT-PCR como por Western blot, la expresión de α y β tubulina se vio significativamente reducida, observándose el mayor efecto sobre β tubulina. La disminución de α -tubulina evidenciada por Western blot, pudiera deberse a que al tener el **ABZ** alta afinidad por la β tubulina, afecta su polimerización y como resultado las tubulinas (α y β) no polimerizadas son degradadas. Este mecanismo ha sido descrito para el compuesto T0070907 que interfiere con la función de los microtúbulos a través de disminuir reversiblemente los niveles de α y β tubulina en líneas celulares de cáncer colon-rectal (Harris et al, 2009).

Con respecto al efecto de **GNV-14** sobre la actina de la **LM** de *T. spiralis*, el ensayo de RT-PCR no mostró cambios importantes en los niveles del transcrito. Por otro lado, en el análisis por Western blot, el anticuerpo C4 reconoció en el control y en la muestra tratada con **GNV-14** una banda de aproximadamente 40kDa, sin embargo, **GNV-14** redujo 77% el reconocimiento de la actina con respecto al control. En el estudio proteómico se demostró que **GNV-14** disminuyó la expresión de una actina hipotética de *T. spiralis*. Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que efectivamente **GNV-14** disminuye la expresión de la actina. Es importante determinar si el efecto de **GNV-14** sobre la actina es directo, o si la afecta indirectamente actuando sobre proteínas de unión a la actina. Un estudio que pudiera aportar información es el modelado molecular, a través de éste se podría analizar la interacción de **GNV-14** con la actina del parásito. Las observaciones obtenidas mediante MET de las **LM** tratadas con **GNV-14** (Matadamas-Martínez et al., 2013), revelan alteraciones a nivel de cutícula, hipodermis e

intestino de las **LM**. Es posible que **GNV-14** provoque la desorganización de las redes de actina que forman parte del citoesqueleto cortical de las células que contribuye a la estabilización y unión de los tejidos de los organismos multicelulares mediante la interacción de la actina con proteínas de la matriz extracelular (Lodish et al, 2005). Estudios de inmunofluorescencia ayudarían a observar los cambios en la distribución de actina en las células y tejidos de las **LM** tratadas con **GNV-14**.

En el nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* se ha demostrado la importancia que tiene la red de filamentos de actina en el proceso de ovulación y en la embriogénesis del parásito (Ono et al., 2011; Ono y Ono, 2014). Por lo anterior, resulta de gran interés el evaluar el efecto de **GNV-14** en la ovulación y desarrollo embrionario de la **LRN** en la hembra adulto de *T. spiralis*.

Por otro lado, el **ABZ** de manera opuesta a lo observado con **GNV-14**, indujo un aumento en la expresión de actina a nivel del transcrito (67%) y de proteína (211%) con respecto al control. No hay información de la que tengamos conocimiento de algún efecto del **ABZ** sobre la actina de helmintos, aspecto de gran interés que debe ser estudiado.

Para analizar el efecto de **GNV-14** sobre la α -tubulina tirosinada y destirosinada se emplearon los anticuerpos monoclonales YL 1/2 y YL 1/34, respectivamente. En la muestra control y tratada con **GNV-14** ambos anticuerpos reconocieron dos bandas con pesos moleculares de 61 y 47kDa. No existen reportes de isoformas de tubulina con peso molecular superior a 60 kDa. Es probable que algún complejo supramolecular que involucre a la

tubulina no se haya disgregado y, por ello, el anticuerpo detectó una banda extra de 61 kDa. Es de notar que la banda de 61kDa no se detectó con el tratamiento del parásito con albendazol.

En el caso de **GNV-14**, también se observó una disminución en los niveles de α -tubulina tirosinada y en este caso se obtuvo información adicional con respecto al efecto sobre la α -tubulina destirosinada, en la que se detectó aumento en su expresión. Esto sugiere que **GNV-14** provoca un desajuste en el ciclo de tirosinación/destirosinación que experimentan las tubulinas en las células e impide la tirosinación de la tubulina, lo cual lleva a la acumulación de la isoforma destirosinada. Esto podría ocurrir por afectación de la enzima tubulina tirosina ligasa, la cual une un residuo de tirosina en el extremo carboxilo terminal (CTT) restableciendo así a la tubulina tirosinada (Westerman y Weber, 2013) o por unión directa del **GNV-14** a la proteína tirosinada con la subsiguiente degradación de ésta.

En la muestra de **ABZ**, los anticuerpos YL1/2 y YL 1/34 sólo reconocieron una banda de 47 kDa, y en el caso de YL 1/34, una banda más de 28kDa fue detectada. **ABZ** indujo una disminución en la expresión de la banda de 47kDa correspondiente tanto a la α -tubulina tirosinada como de la destirosinada. La banda extra de 28 kDa detectada por YL 1/34 sugiere que la α -tubulina destirosinada fue degradada, afectando así mismo el ciclo de tirosinación/destirosinación de la proteína. Se reconoce que el mecanismo principal de acción del **ABZ** es la inhibición de la polimerización de los microtúbulos mediante su unión a la subunidad β de la tubulina de los

parásitos, la degradación de α -tubulina destirosinada pudiera indicar que al inhibirse la polimerización, las isoformas de α -tubulina monomérica se degradan mediante la vía del proteosoma.

Por otra parte, no se detectó α -tubulina acetilada mediante Western blot en los dos ensayos independientes que se realizaron con la muestra control y con las muestras tratadas con **GNV-14** o **ABZ**. Se sabe que la tubulina acetilada está presente en muchos organismos eucariontes, desde protozoarios como *Giardia intestinalis*, cestodos como *T. crassiceps* hasta mamíferos (Weber et al, 1997; Márquez et al., 2013). Además, esta isoforma forma parte esencial de microtúbulos estables y desempeña alguna función en la motilidad celular (Hubbert et al, 2002; Haggarty et al, 2003). Llama la atención que en este estudio no haya sido posible detectar la isoforma de α -tubulina acetilada, es posible que esté poco expresada en la **LM**, dificultando su detección, pero que esté más representada en otras fases de desarrollo de *T. spiralis*, así como en la gametogénesis del parásito, aspectos que requieren estudios posteriores.

Existen amplias evidencias de la expresión de isoformas específicas de tubulina en tejidos, órganos o determinadas fases del ciclo de vida en helmintos, ya que están involucradas en la generación de microtúbulos con funciones especializadas (Hurd et al., 2010). En *C. elegans* el isotipo de la tubulina MEC-7 es requerido para el ensamble de microtúbulos en neuronas sensibles al tacto (Savage, 1989). Además, estudios de PCR cuantitativo mostraron que en ciertas fases del ciclo de vida de *Fasciola hepatica* ocurren cambios en los niveles transcripcionales de los genes de tubulina,

demostrándose la expresión de 6 isotipos diferentes de β -tubulina a lo largo de su ciclo de vida (Fuchs et al., 2013). El isotipo predominante en el organismo adulto fue el isotipo 1, que está presente principalmente en el espermatozoide y en folículos vitelinos. La presencia de ciertos isotipos en diferentes fases de desarrollo de los parásitos es de gran importancia para el diseño de fármacos antihelmínticos.

A pesar de la importancia de los genes de β -tubulina como blancos terapéuticos y de su participación en la resistencia a bencimidazoles, la familia completa de genes ha sido poco caracterizada en nematodos incluyendo a *T. spiralis*. A la fecha se reconoce que mutaciones en el gen de la β -tubulina están asociadas a la resistencia a bencimidazoles en una gran variedad de especies de nematodos (Prichard, 2001). Mucho de lo que a la fecha se conoce se ha obtenido del estudio en el nematodo *Haemonchus contortus*, en el que inicialmente se identificaron dos genes para β -tubulina, isotipo 1 e isotipo 2, recientemente se identificaron otros dos isotipos. En el isotipo 1 se identificó que la resistencia está asociada a la sustitución de fenilalanina por tirosina en la posición 200 de la β -tubulina, y la delección del isotipo 2 está implicada en mecanismos de resistencia a bencimidazoles (Saunders et al., 2013). En el adulto de *F. hepatica*, se expresan al menos seis diferentes isotipos de β -tubulina, pero el isotipo 2 es el blanco del **ABZ**. Estudios de modelado molecular confirmaron que la conformaciones estructurales alrededor del aminoácido 200 de la β -tubulina es importante para la unión del **ABZ** (Chambers et al., 2010).

Recientemente, Aguayo y cols. (2013) construyeron un modelo tridimensional de la β -tubulina de *T. spiralis* empleando la secuencia de aminoácidos de la proteína con el fin de identificar los posibles sitios de unión de los bencimidazoles. En dicho estudio se confirmó que las sustituciones de aminoácidos F200Y, E198A y F167Y son importantes en el desarrollo de resistencia del helminto a los bencimidazoles, además se encontraron otros aminoácidos importantes en el proceso de unión de la β -tubulina a bencimidazoles como glutamina 198, tirosina 165, cisteína 239 y glutamina 134.

Los resultados obtenidos del efecto de **GNV-14** o **ABZ** sobre α y β -tubulina y actina, sugieren que estos compuestos tienen un mecanismo de acción diferente y que la actina puede ser la diana de **GNV-14**. Estudios de modelado molecular de la interacción de **GNV-14** con actina, así como estudios de afinidad del compuesto con actina recombinante de *T. spiralis* aportarán mayor información acerca de la probable interacción del compuesto con esta proteína del citoesqueleto. Por otro lado, para analizar si **GNV-14** afecta a proteínas que interactúan con actina, por RT-PCR, se podría analizar la expresión de estas moléculas así como enzimas que participan en el proceso de tirosinación/destirosinación de la α -tubulina.

9. CONCLUSIONES

- **GNV-14** induce cambios en el proceso de tirosinación-destirosinación de α -tubulina.

- **GNV-14** afecta a nivel de proteína la expresión de actina de la **LM** de *T. spiralis*.
- **GNV-14** y **ABZ** afectan de manera diferente a proteínas del citoesqueleto de la **LM** de *T. spiralis*, sugiriendo que estos compuestos poseen mecanismos de acción diferentes.

10. PERSPECTIVAS

- Determinar el número de isoformas de α y β -tubulina y actina de *T. spiralis* y comprobar si alguna de ellas es afectada por **GNV-14**.
- Estudios *in silico* para analizar la posible unión de **GNV-14** a la actina del parásito.
- Estudios de unión de **GNV-14** con actina recombinante del parásito.
- Estudios de inmunofluorescencia para analizar los cambios inducidos por **GNV-14** en la distribución de las proteínas del citoesqueleto de la **LM**.
- Determinar el efecto de **GNV-14** sobre otras fases de desarrollo de *T. spiralis*.

11. REFERENCIAS

- Aguayo, R., Méndez, O., Medina, J., Castillo, R., Yepez-Mulia, L., Hernández, F., Hernández, A., 2013. Towards the identification of the binding site of benzimidazoles to β -tubulin of *Trichinella spiralis*: Insights from computational and experimental data. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*.41:12-19.
- Alvarez, L., Entrocasso, C., Lifschitz, A., Manazza, J., Ceballos, L., Borda, B., Lanusse, C. 2010. Albendazole failure to control resistant nematodes in lambs: lack of effect of fasting-induced improvement on drug absorption. *Journal of Parasitology*. 96(6):1204-1210.
- Andrade, B.J.I. 2011. Evaluación de la protección inducida por una vacuna de DNA contra la infección por *Trichinella spiralis* en modelo de ratón. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN. México, D.F. 72 pp.
- Antonio, A.G. 2006. Evaluación *in vivo* de la actividad biológica del 5-(2,3-diclorofenoxi-1-metil-2(trifluorometil)-1-*H*-benzimidazol en complejo con la 2-Hidroxipropil-beta ciclodextrina contra *Trichinella spiralis*. Facultad de estudios superiores-Iztacala, UNAM. Tesis de licenciatura.
- Ash, L.R., Orihel, T.C. *Trichinella spiralis* y especies de *Trichinella*. 2007. Atlas de Parasitología Humana. Editorial Médica Panamericana. México. p 232-235.
- Borrowman, M.M., Marriner, S.E., Bogan, J.A. 1984. The fumarate reductase system as a site of anthelmintic attack in *Ascaris suum*. *Bioscience Reports*. 4(10):879-883.
- Beech, R.N., Skuce, P., Bartley, R.J., Martin, R.K., Prichard., 2010. Anthelmintic resistance: markers for resistance or susceptibility? *Parasitology*.138:160-174.
- Bruschi, F., Murrell, D. 2002. New aspects of human trichinellosis: the impact of new *Trichinella* species. *Postgraduate Medical Journal*. 78:15-22.
- Bush, A. O., J. C., Fernández, G. W., Esch, R. Seed. 2001. Parasitism. The diversity and ecology of animal parasites. Cambridge University Press. 566 pp.

- Cabié, A., Bouchaud, O., Houzé, S., 1996. Albendazole versus thiabendazole as therapy for trichinosis: a retrospective study. *Clinical Infectious Diseases*. 22:1033-1035.
- Campos, R.R. 1990. Resistencia de *Haemonchus contortus* a bencimidazoles en ovinos de México. *Técnica pecuaria en México*. 28:30-34.
- Campos, R.R., Herrera, R.D., Quiroz, R.H. 1992. Diagnóstico *in vitro* de *Haemonchus contortus* resistente al albendazol, febendazol, oxfendazol y febantel en tres rebaños de ovinos Tabasco o Pelibuey. *Veterinaria México*. 23:51-56.
- Casulli A., Gomez-Morales M.A., Gallinella B., Turchetto L., Pozio E. 2006. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin improves the effectiveness of albendazole against encapsulated larvae of *Trichinella spiralis* in a murine model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 58:886-890.
- Chambers, E., Ryan, L.A., Hoey, E.M., Trudgett, A., McFerran, F.V., Fairweather, I., Timson, D.J. 2010. Liver fluke β -tubulin isotype 2 binds albendazole and is thus a probable target of this drug. *Parasitology Research*. 107:1257-1264
- Chung, M.S., Joo, K.H., Quan, F.S., Kwon, H.S., Cho, S.W. 2001. Efficacy of Flubendazole and Albendazole against *Trichinella spiralis* in mice. *Parasite*. 8(2):S195-198.
- De la Rosa J.L., Gómez A. Triquinelosis. 2011. *Parasitología Médica*. Ed. McGraw Hill. México. p 265-272.
- Dennis, D.T., Despommier, D. D., Davis, N. 1970. Infectivity of the newborn larvae of *Trichinella spiralis* in the rat. *Journal of Parasitology*. 56:974-977.
- Despommier, D.D. 1990. *Trichinella spiralis*: The Worm That Would Be Virus. *Parasitology Today*. 6:193-196.

- Despommier, D.D. 1998. How does *Trichinella spiralis* make itself a home?. *Parasitology today*. 14(8):318-323.
- Despommier, D.D., Aron L., Turgeon L. 1975. *Trichinella spiralis*: growth of the intracellular (muscle) larva. *Experimental Parasitology*. 37:108-116.
- Despommier D.D., Gwadz W. R., Hotez J. P., Knirsch A., 2005. *Parasitic Diseases: Capitulo V, The Nematodes: Trichinells spiralis*. Apple Trees. New York. p 135-142.
- Dupouy-Camet, J., Kociecka W., Bruschi, F., Bolas-Fernandez F., Pozio, E. 2002. Opinion on the diagnosis and treatment of human trichinellosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 3:1117–1130.
- Fuchs, M.A., Ryan, L.A., Chambers, Emma L., Moore, C.M., Fairewather, T.A., Timson, D.J., Brennan, G.P., Hoey, E.M. 2013. Differential expression of liver fluke β -tubulin isotypes at selected life cycle stages. *International Journal for Parasitology*. 43: 1133-1139.
- Gottstein, B., Pozio, E., Nöckler, K. 2009. Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 22(1):127-145.
- Gurvinder S., Kaur M., Chander M. 2013. Benzimidazoles: the latest information on biological activities. *International Research Journal of Pharmacy*. 4:82-87
- Haggarty, S.J., Koeller, K. M., Wong, J.C., Grozinger, G.M., Schreiber S. L., (2003). Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. 100:4389-4394
- Harris G., Schaefer K.L., 2009. The microtubule-targeting agent T0070907 induces proteosomal degradation of tubulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 388:345-349.
- Hernández, M., Ramos, E., Casco, E.J., Morales, J.M., Pérez, E.M., 1992. Triquinosis aguda. Epidemia de 166 casos en Ciudad Delicias, Chihuahua.

Diagnóstico por compresión tisular y tinción. Gaceta Médica de México. 128(1):45-50.

- Hubbert, C., Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao T.P. 2002. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*. 417: 455-458.
- Hurd, D.D., Miller, R.M., Nuñez, L., Portman D.S. 2010. Specific α - and β -tubulin isotypes optimize the functions of sensory cilia in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 185:883-896.
- Jasmer, D. P. 1993. *Trichinella spiralis* infected skeletal muscle cells arrest in G2/M and cease muscle gene expression. *Journal of Cell Biology* 121:785–793.
- Kelly, J.D., Hall, C.A. 1983. Resistance of animal helminthes to anthelmintics. *Advances in Pharmacology & Chemotherapy*. 16:89-127.
- Kim, C.W., Ledbetter, M.C., 1980. Surface morphology of *Trichinella spiralis* by scanning electron microscopy. *Journal of Parasitology*. 66(1):75-81
- Ko, R.C., Fan, L., Lee, D.L, Crompton, H. 1994. Changes in host muscle induced by excretory/secretory products of larval *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis* . *Parasitology* 108:195-205.
- Kociecka, W. 2000. Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. *Veterinary Parasitology*. 93:365-383.
- Köhler, P., 2001. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*. 31:336-345.
- Krivokapich J.S., Pozio E., Gatti G.M., Gonzalez C.L., Ribicich M., Marucci G., La Rosa G., Confalonieri V. 2012. *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. *International Journal for Parasitology*. 42:903-910.

- Lacey, E. 1988. The Role of cytoskeletal protein tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazole. *International Journal of Parasitology*. 18:885-936.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): 680-685.
- Lee, D.L., Ko, R.C., Yi, X.Y., Yeung, M.H.F. 1991. *Trichinella spiralis*: antigenic epitopes from the stichocytes detected in the hypertrophic nuclei and the cytoplasm of the parasitized muscle fibre (nurse cell) of the host. *Parasitology*. 102:117-123.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, S.L., Darnell, J. *Biomembranas y arquitectura celular*. 2005. *Biología celular y molecular*. Editorial Médica Panamericana. México. p 173-178.
- Loftson, T., Brewster M.E. 1996. Pharmaceutical application of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 85:1017-1025.
- Malakauskas A., Paulauskas, Järvis T., Keidans P., Eddi C., Kapel M.O. 2007. Molecular epidemiology of *Trichinella* spp. in three Baltic countries: Lithuania, Latvia and Estonia. *Parasitology Research*. 100:687-693.
- Márquez-Navarro A., Pérez Reyes A., Zepeda-Rodríguez A., Reynoso-Ducoing O., Hernández-Campos .A., Hernández-Luis F., Castillo R., Yépez-Mulia L., Ambrosio R.J. (2013). RCB20 an experimental benzimidazole derivative, affects tubulin expression and induces gross anatomical changes in *Taenia crassiceps* cysticerci. *Parasitology Research*. 112(6): 2215-2226.
- Martínez-Marañón, R. 1974. Triquinosis en México. *Salud Pública de México*. 21:161-165
- Matadamas-Martínez, F., Noguera-Torres, B., Hernández-Campos, A., Hernández-Luis, F., Castillo, R., Mendoza, G., Ambrosio, R.J., Andrés-Antonio, G., Yépez-Mulia, L. 2013. Analysis of effect of a 2-(trifluoromethyl)-1H-

benzimidazole derivative on *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Veterinary Parasitology*. 194: 193-197.

- Murrell, D.K., Pozio, E. 2011. Worldwide Occurrence and Impact of Human Trichinellosis, 1986-2009. *Emerging Infectious Diseases*. 17(12):2194-2202.
- Navarrete, V.J. G. 2004. Diseño, síntesis y actividad antiparasitaria de derivados de 2-(trifluorometil) bencimidazol. Tesis doctoral Facultad de Química, UNAM.
- Ono, S., Nomura, K., Hitosugi, S., Tu, D.K., Lee, A.J., Baillie, D.L., Ono, K. 2011. The two actin-interacting protein 1 genes have overlapping and essential function for embryonic development in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell*. 22 (13):2258-2269.
- Ono, K., Ono, S. 2014. Two actin-interacting protein 1 isoforms function redundantly in the somatic gonad and are essential for reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Cytoskeleton*. 71:36-45.
- Ortega-Pierres M.G., Arriaga C., Yépez-Mulia L. 2000. Epidemiology of Trichinellosis in Mexico, Central and South America. *Veterinary Parasitology*. 93(3-4):201-225.
- Ovando, I.C., 1988. Aislamiento y caracterización del ARN de *Trichinella spiralis*. Tesis de Maestría CINVESTAV IPN.
- Parcero, H.K. 2009. Evaluación de la citotoxicidad de nuevos derivados benzimidazolicos con actividad antiparasitaria empleando la línea celular MDCK., Tesis de Licenciatura Facultad de Química, UNAM.
- Pozio, E. 2000. Factors affecting the flow among domestic, synanthropic and sylvatic cycles of *Trichinella*. *Veterinary Parasitology*. 93:241-262.
- Pozio, E. 2001. New patterns of *Trichinella* infection. *Veterinary Parasitology*. 98:133-148.

- Pozio, E., Hoberg, E., la Rosa, G., Zarlenga, D. 2009. Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. *Infection, Genetics and Evolution*. 9:606-616.
- Pozio, E., Sacchini, D., Sacchi, L., Tamburrini, A., Alberici, F. 2001. Failure of Mebendazole in the treatment of Humans with *Trichinella spiralis* Infection at the Stage of encapsulating. *Clinical Infectious Diseases*. 32:638-642.
- Pozio, E., Zarlenga, D. 2013. New pieces of the *Trichinella* puzzle. *International Journal for Parasitology*. 43(12):983-997.
- Prichard, R.K. 2001. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends in Parasitology*. 17:445-453
- Riva, E., Steffan, P.E., Fiel, C.A. 2007. Trichinellosis: Aspectos múltiples de una zoonosis global.FAO Mejoramiento del Control de la Trichinellosis FAO América Latina y el Caribe, Roma. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. pp 94-109.
- Robinson, M, W., McFerran, N., Trudgett, A., Hoey, L., Fairweather, I. 2004. A posible model of benzimidazole binding to β -tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 23: 275-284.
- Saunders, G.I., Washmuth, J.D., Beech, R., Hunt, R.L.M., Naghra, H., Cotton, J. A., Berriman, M., Britton, C., Gilleard, J.S., 2013. Characterization and comparative análisis of the complete *Haemonchus contortus* β -tubulin gen family and implications for benzimidazole resistance in strongylid nematodes. *International Journal for Parasitology*. 43:465-475.
- Savage, C., Hamelin, M., Culotti, J.G., Coulson, A., Albertson, D.G. (1989). Mec-7 is a beta tubulin gene required for the production of 15-protofilament microtubules in *Caenorhabditis elegans*. *Genes and Development*. 3:870-881.
- Sharma, S., Anand, N. 1997. Approaches to design and sintesis of antiparasitic drugs. Elsevier Science. Netherlands:195-238.

- Takahashi, Y., Uno, Takako., Mizumo, N., Yamada, S., Araki, Tsuneji., 1989. Ultrastructural localization of antigenic substances in *Trichinella spiralis*. Parasitology Research. 75:316-324.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". Proceedings of the National Academy of Sciences USA 76(9): 4350–4354.
- Viveros N., Arriaga C., Banda V., Ortega-Pierres M. G., Yépez-Mulia L. 2001. Detection on *Trichinella* infection in slaughter horses by artificial digestion, ELISA and PCR. Parasite. 8:S257-259.
- Vorou, R.M., Papavassiliou, V.G., Tsiodras, S. 2007. Emerging zoonoses and vector-borne infections affecting humans in Europe. Epidemiology and Infection. 135:1231-1247.
- Wang, B., Wang, Z.Q., Jin, J., Ren, J.H., Liu, N.L., Cui, J. 2013. Cloning expression and characterization of a *Trichinella spiralis* serine protease gene encoding a 35.5 kDa protein. Experimental Parasitology. 134:148.154.
- Weber, K., Schneider, A., Westermann, S., Muller N. 1997. Posttranslational modifications of α - and β -tubulin in *Giardia lamblia*, an ancient prokaryote. FEBS Letters. 419: 87-91.
- Webster, L.T. 1991. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Editorial Médica Panamericana; México. pp 934-953.
- Westermann, F., Weber, K. 2003. Post-translational modifications regulate microtubule function. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 4:938-947.
- Yépez-Mulia, L., Ortega-Pierres, M.G. 1994. Aspectos actuales sobre el diagnóstico de la triquinelosis. Revista Latinoamericana de Microbiología. 36:127-138.
- <http://www.trichinella.org/gallery/DDD-HQ-Main.htm>

Anexo

Soluciones

1. PBS 10x (Concentrado)

NaCl	80g
KH ₂ PO ₄	2g
NaH ₂ HPO ₄	11.5g
KCl	2g

Disolver las sales en 800 mL de agua bidestilada. Aforar a 1000 mL y esterilizar por autoclave.

2. PBS 1x (1000 mL)

Tomar 100 mL de la solución anterior y agregar 800 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1000 mL. Esterilizar por autoclave.

3. Bactoagar al 0.2% p/v

Pesar 0.2g de bactoagar y disolver en 100 mL de agua bidestilada. Calentar en horno de microondas durante 3 minutos. Almacenar a temperatura ambiente.

4. Medio de cultivo RPMI-1640

Disolver el medio de cultivo en polvo en 800 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 7.4 con HCl 1N. Agregar los antibióticos y aforar a 1000 mL. Filtrar en esterilidad con una membrana Millipore de 0.22µm.

5. Inhibidores de proteasas (TPCK, TLCK 1mg/mL)

Pesar 10 mg de TPCK y TLCK. Diluir por separado en 10 mL de metanol. Guardar a -20°C.

8. Solución para extraer proteínas del citoesqueleto (MgCl₂ 1mM, KCl 0.04 mM en PBS1x).

Pesar 2.05g de MgCl₂ y disolver en 10 mL de agua desionizada estéril. Hacer una dilución 1:2, tomar 2µL y disolver en 1mL de PBS estéril

Pesar 0.75g de KCl y disolver en 10 mL de agua desionizada estéril. Diluir en proporción 1:5, tomar 2µl de esta dilución y agregarlos a 1 mL de PBS con MgCl₂.

Soluciones para SDS-PAGE y Western Blot

1. Acrilamida 30%-bis-acrilamida 0.8%

Pesar 29.2g de acrilamida (99.9% de pureza) y 1g de bis-acrilamida. Disolver y aforar a 100 mL con agua bidestilada. Filtrar con papel Whatman 1 y guardar en frasco ámbar a 4 °C.

2. Amortiguador del gel separador (tris-base 1.5M, pH 8.8)

Pesar 18.7g de Tris-Base y disolverlos en 85 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl 1N. Aforar a 100 mL y guardar a 4°C.

3. Amortiguador del gel concentrador (Tris-HCl 0.5M, pH 6.8)

Pesar 6.05g de Tris y disolverlos en 85 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 6.8 con HCl 1N. Aforar a 100 mL y guardar a 4°C.

4. Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%

Pesar 10g de SDS y disolverlos en 100 mL con agua bidestilada.

5. Persulfato de amonio al 10%

Pesar 100 mg de persulfato de amonio y disolverlos en 1 mL de agua bidestilada.

6. Amortiguador de muestra 4x

Agua bidestilada	250µl
Tris-HCl 0.5M, pH 6.8	250µl
Glicerol	400µl
SDS	80 mg
Azul de bromofenol	4 mg
2-β-mercaptoetanol	400µl

7. Amortiguador para electroforésis 5x (tris-glicina-SDS)

Tris-Base	15.1g
Glicina	94g
SDS al 10%	50 mL
Agua bidestilada	900 mL

Disolver todos los componentes y aforar a 1000 mL con agua bidestilada. Guardar a 4°C.

8. Amortiguador de transferencia (Tris 0.025M, glicina 0.192M, Metanol 20%).

Pesar 12.11g de Tris-base y 57.68g de glicina. Diluir en 800 mL de metanol. Aforar a 4L con agua bidestilada. Guardar a 4°C.

9. Azul de Coomassie al 0.06%

Pesar 250 mg de azul de Coomassie R-250 y disolver en 90 mL de metanol al 50%. Agregar 10 mL de ácido acético glacial. Filtrar con papel Whatman 1.

10. Solución decolorante para geles de acrilamida

Medir 500 mL de metanol absoluto. Añadir 100 mL de ácido acético glacial. Aforar a 1000 mL con agua bidestilada. Guardar en frasco ambar a temperatura ambiente.

11. Solución decolorante de amido negro

Medir 25 mL de isopropanol, Añadir 10 mL de ácido acético. Aforar a 100 mL con agua bidestilada.

12. Solución de bloqueo (albúmina sérica bovina al 3% en PBS)

Pesar 3g de albúmina sérica bovina. Diluir en 90 mL de PBS 1X estéril. Aforar a 100 mL y refrigerar a 4°C.

13. Amortiguador de trietanolamina.

Pesar 7.5g de NaCl. Medir 2.8 mL de trietanolamina y 17 mL de HCl 1N. Disolver todos los componentes en 800 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 7.5 y aforar a 1000 mL.

14. Solución cromógeno/sustrato para Western Blot.

Diluir una tableta de 4-cloro-1-naftol (Sigma®) en 10 mL de metanol frío. Medir 2 mL de esta solución y mezclar con 10 mL de amortiguador de trietanolamina. Agregar 5µl de H₂O₂ al 30%. Proteger de la luz.

Soluciones para PCR y RT-PCR

1. Dietilpirocarbonato al 0.01% (DEPC) 500 mL.

Agregar 1 mL de DEPC a 999 mL de agua mili Q. Agitar y dejar actuar toda la noche. Esterilizar por autoclave.

2. Amortiguador TAE 20X (tris acetato 0.04M; EDTA 0.001M) 500 mL.

Agregar 48.4g de tris base, 11.42mL de ácido acético glacial y 20 mL de EDTA 0.5M pH 8.0 a 400 mL de agua desionizada. Mezclar y aforar a 500mL.

3. EDTA 0.5M

Pesar 18.61g de EDTA y agregarlos a 70 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 8.0 agregando perlas de NaOH. Aforar a 100 mL.

Análisis densitométrico (Western blot)

α-tubulina			
Ensayos	Control	ABZ	GNV-14
1	829.33	359.91	845.09
2	705.8	296.54	940.37

β-tubulina			
Ensayos	Control	ABZ	GNV-14
1	104.68	0	148.77
2	109.6	20.36	196.6

Actina			
Ensayos	Control	ABZ	GNV-14
1	552.72	706.36	0
2	250.96	780.87	58.16

α-Tub tirosinada						
Ensayos	Control	Control	ABZ	ABZ	GNV-14	GNV-14
	61 kDa	47 kDa	61 kDa	47kDa	61 kDa	47 kDa
1	565.31	481.83	0	219.96	355.59	313.26

2	800.92	792.01	0	126.1	155.16	256
α-Tubulina dest	Control	Control	ABZ	ABZ	GNV-14	GNV-14
Ensayos	61 kDa	47 kDa	61 kDa	47kDa	61 kDa	47 kDa
1	328.2	635.2	0	136.71	829.59	1032.44
2	464.05	296.03	0	211.32	607.05	776.27

Análisis densitométrico (RT-PCR)

α-Tubulina						
Ensayos	control	GDPH C	ABZ	ABZ/GDPH	GNV-14	GDPH/GNV-14
1	27.604	72.421	22.453	79.127	40.454	78.258
2	64.7	124.935	54.264	139.527	74.996	133.964
β-tubulina						
Ensayos	Control	GDPH C	ABZ	ABZ/GDPH	GNV-14	GDPH/GNV-14
1	137.535	127.549	146.001	144.391	121.848	143.3
2	113.779	128.54	99.16	98.48	127.099	108.148
Actina						
Ensayos	Control	GDPH C	ABZ	ABZ/GADPH	GNV-14	GADPH/ABZ
1	50.497	147.115	103.915	125.074	52.728	132.178
2	39.656	74.096	47.226	54.549	39.348	53.055