



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto del derivado bencimidazólico RCB15 en el
proteoma del citoesqueleto de cisticercos de *Taenia
crassiceps* cepa ORF**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

LORENA NAVA VILLEGAS



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNANDEZ**

(2015)

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Víctor Manuel Valdés López

Vocal: Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky

Secretario Tutor: Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández

Suplente: Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez

Suplente: Biol. Olivia Alicia Reynoso Ducoing

La presente tesis fue realizada en el Laboratorio de Biología del Citoesqueleto, Departamento de Microbiología y Parasitología. Edificio A, Facultad de Medicina, U. N. A. M.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández**, por la oportunidad brindada al abrirme las puertas de su laboratorio, y formar parte de su equipo de investigadores; por creer en mí y darme el apoyo, la fuerza y el coraje de seguir adelante cuando más los necesité.

A la **Biol. Olivia Reynoso Ducoing**, por enseñarme a trabajar correctamente en un laboratorio y haberme proporcionado las herramientas que en su momento me fueron indispensables para mi desarrollo profesional y personal; y además de enseñarme que no hay sentimiento más gratificante que el de haber realizado bien tu trabajo y hacer valer el tiempo invertido.

Al **Dr. Rafael Castillo Bocanegra** de la Facultad de Química de la UNAM por proporcionar los DBCMs, SOABZ y RCB15, para la realización de la presente tesis.

A la **Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández**, por sus asesorías y apoyo, que me fueron de gran ayuda.

A mis compañeros de batalla y amigos del laboratorio: Mónica Buendía, Carlos Ibarra (“Doc. Carlitos”), Rita Mariana y Jimena Montes; gracias por su compañía, apoyo y amistad.

A mis amigas y colegas: Nidia Mendoza, Diana Donato, Alejandra Isidoro, Elba Loyola y Karen Pasillas por compartir el caminar a través de este sendero lleno de

sorpresas y adversidades; y aunque el tiempo nos ha distanciado, agradezco su compañía y apoyo en cada momento.

A la facultad de Ciencias por ser la plataforma y abrirme las puertas a una vida distinta llena de retos y sueños por alcanzar.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la dicha de formar parte de la comunidad universitaria y convertirme en un puma de corazón. Mi esfuerzo diario se centrará en ser una digna representante de esta institución.

A la facultad de Medicina por haberme dado la oportunidad de formarme como futura investigadora y por la oportunidad de conocer a excelentes académicos, de los cuales he tenido la dicha de aprenderles aunque sea un poquito.

Al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica** (PAPIIT), por los apoyos otorgados para la realización de este trabajo:

- Proyecto IN201510 “Alteraciones inducidas en la expresión de proteínas del citoesqueleto de parásitos por la acción de sustancias antiparasitarias”; y
- Proyecto IN216213 “Obtención y caracterización de los proteomas del citoesqueleto de cisticercos de *Taenia crassiceps* de la cepa ORF y *Taenia solium*”, por las becas otorgadas bajo los conceptos: conclusión de estudios y elaboración de tesis.

DEDICATORIAS

A mi familia por brindarme el apoyo, paciencia y comprensión que en su momento necesité, pero principalmente a ti mamá, Ma. Eustolia Villegas González, por haber creído en mí, por tu gran apoyo y por haberte esforzado para que yo pudiera alcanzar mi sueño; y es por ello, que ese logro también es tuyo. Gracias.

Al ahora Lic. Francisco Javier Estrada Garcia, por ser mi incondicional y haberme apoyado desde el primer momento en que decidí emprender este viaje, por creer en mí e impulsarme día a día; por enseñarme a ser mejor persona y cambiar mi vida, ¡te amo!

A mis amigas y hermanas de toda la vida: Paola Rivero Salcedo, Ma. De Jesús García Santa Olalla y Ma. Del Pilar Hernández, gracias por apoyarme en este proyecto de vida y darme ánimos cuando más las he necesitado. ¡Siempre juntas! Espero que la vida me permita compartir con ustedes muchos logros más.

ÍNDICE GENERAL

| | Tema | Página |
|------|---|---------------|
| I. | RESUMEN | 10 |
| II. | INTRODUCCIÓN | 12 |
| | 2.1 Importancia del desarrollo de fármacos antihelmínticos..... | 12 |
| | 2.2 La molécula del BCM como fuente del diseño y síntesis de fármacos antihelmínticos..... | 13 |
| | 2.3 Derivados bencimidazólicos..... | 14 |
| | a. Albendazol y sulfóxido de albendazol..... | 14 |
| | b. 5-cloro-6-(2,3 diclorofenoxi)-2- (trifluorometil)-1H-bencimidazol (RCB15)..... | 16 |
| | 2.4 Efecto de los DBCMs sobre componentes del citoesqueleto..... | 17 |
| | 2.5 Modelo experimental de cisticercosis murina para evaluación de fármacos antihelmínticos..... | 19 |
| | 2.6 La farmacoproteómica como herramienta de evaluación de fármacos..... | 19 |
| III. | HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 22 |
| IV. | MATERIALES Y MÉTODOS | 23 |
| | 4.1 Diagrama de flujo general..... | 23 |
| | 4.2 Obtención y mantenimiento de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> cepa ORF..... | 24 |
| | 4.3 Preparación de medio de cultivo..... | 24 |
| | 4.4 Preparación de las soluciones con los DBCMs..... | 25 |
| | 4.5 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de los DBCMs en cisticercos de <i>T. crassiceps</i> | 25 |
| | 4.6 Obtención y cuantificación de proteínas de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> | 26 |
| | 4.7 Análisis electroforético unidimensional de las proteínas de cisticercos..... | 26 |
| | 4.8 Análisis electroforético bidimensional de las proteínas de cisticercos..... | 27 |
| | a. Isoelectroenfoque (IEE)..... | 27 |

| | |
|--|-----------|
| b. Electroforesis en doble dimensión..... | 27 |
| 4.9 Análisis bioinformático de las separaciones electroforéticas..... | 28 |
| a. Geles unidimensionales. Empleo del programa Quantity One 4.0..... | 28 |
| b. Geles bidimensionales. Empleo del programa PDQuest 7.4..... | 28 |
| 4.10 Análisis comparativo de los mapas proteómicos generados..... | 29 |
| V. RESULTADOS..... | 30 |
| 5.1 Evaluación de la morfología de cisticercos durante el tratamiento con los DBCMs, SOABZ y RCB15..... | 30 |
| 5.2 Perfiles electroforéticos en una dimensión de las proteínas de cisticercos..... | 32 |
| 5.3 Perfiles electroforéticos en dos dimensiones de las proteínas de cisticercos..... | 36 |
| a. Análisis comparativo de proteínas del grupo A..... | 41 |
| b. Análisis comparativo de proteínas del grupo B..... | 42 |
| c. Análisis comparativo de proteínas del grupo C..... | 44 |
| d. Análisis comparativo de proteínas del grupo D..... | 45 |
| 5.4 Comparación del efecto de los DBCMs en la expresión de proteínas..... | 46 |
| VI. DISCUSIÓN..... | 49 |
| VII. CONCLUSIONES..... | 56 |
| VIII. PERSPECTIVAS..... | 57 |
| IX. ANEXOS..... | 58 |
| a. Precipitación de proteínas..... | 58 |
| b. Cuantificación de proteínas..... | 59 |
| c. Preparación de los DBCMs para su evaluación <i>in vitro</i> | 60 |
| d. Preparación del medio de cultivo..... | 62 |
| X. REFERENCIAS..... | 63 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. Estructura del anillo del bencimidazol (BCM)..... | 14 |
| FIGURA 2. Estructura química de los DBCMs, ABZ y TCBZ..... | 15 |
| FIGURA 3. Estructuras químicas del ABZ y sus metabolitos..... | 15 |
| FIGURA 4. Estructura química del RCB15..... | 16 |
| FIGURA 5. Estructura de los microtúbulos (MTs)..... | 17 |
| FIGURA 6. Evaluación del efecto <i>in vitro</i> de cisticercos tratados con los DBCMs, SOABZ y RCB15..... | 31 |
| FIGURA 7. Comparación de los perfiles electroforéticos en una dimensión de las proteínas de cisticercos..... | 33 |
| FIGURA 8. Comparación de los perfiles densitométricos bajo los diferentes tratamientos..... | 34 |
| FIGURA 9. Comparación de los densitogramas de las bandas numeradas en la figura 7..... | 36 |
| FIGURA 10. Mapas proteómicos de las proteínas de cisticercos..... | 38 |
| FIGURA 11. Mapas proteómicos representativos de las tres condiciones experimentales..... | 39 |
| FIGURA 12. Selección y clasificación de las 50 proteínas detectadas en el comparativo de los mapas proteómicos..... | 40 |
| FIGURA 13. Proteínas en geles 2D del grupo A..... | 41 |
| FIGURA 14. Proteínas en geles 2D del grupo B..... | 43 |
| FIGURA 15. Proteínas en geles 2D del grupo C..... | 44 |
| FIGURA 16. Proteínas en geles 2D del grupo D..... | 46 |
| FIGURA 17. Comparación de proteínas observadas bajo los tratamientos con los DBCMs, y sin tratamiento..... | 47 |
| FIGURA 18. Comparación de la intensidad en la expresión de las proteínas en común, bajo las tres condiciones de estudio..... | 48 |
| FIGURA 19. Empalme de mapas proteómicos obtenidos para proteínas de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> | 53 |
| TABLA 1. Comparación de los parámetros de las bandas numeradas en la figura 7..... | 35 |
| TABLA 2. Proteínas del grupo A..... | 42 |
| TABLA 3. Proteínas del grupo C..... | 45 |
| TABLA 4. Proteínas del grupo D..... | 46 |
| TABLA 5. Comparación de la expresión de proteínas previamente identificadas mediante MS y con anticuerpos..... | 53 |

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------|--|
| ABZ | Albendazol |
| ASB | Albúmina de suero bovino |
| ATC | Ácido tricloroacético |
| BCM | Bencimidazol |
| CMFDA | 5-clorometilfluoresceína diacetato |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| DSS | Dodecil sulfato de sodio |
| DBCMs | Derivados becimidazólicos |
| DTT | Ditiotritol |
| EGP-DSS | Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de DSS |
| Fr | Frente relativo |
| IEE | Isoelectroenfoque |
| kDa | kilodalton |
| MTs | Microtúbulos |
| MAPs | Proteínas asociadas a microtúbulos |
| pI | Punto isoeléctrico |
| PM | Peso molecular |
| RCB15 | 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol |
| SE | Solución de equilibrio |
| SOABZ | Sulfóxido de albendazol |
| SR | Solución de rehidratación |
| SSBF | Solución salina balanceada de fosfatos |
| TA | Temperatura ambiente |
| TCBZ | Triclabendazol |
| UV | Luz ultravioleta |
| βME | 2-mercaptoetanol |
| μg | Microgramo |
| μM | Micromolar |
| μL | Microlitro |
| V | Volts |
| 1D | Electroforesis en una dimensión |
| 2D | Electroforesis en dos dimensiones |

I. RESUMEN.

Las enfermedades parasitarias producidas por cestodos continúan siendo un problema de salud pública, especialmente en países en vías de desarrollo. Una de las estrategias de tratamiento médico inmediato es el uso de fármacos antihelmínticos, en el que el sulfóxido de albendazol (SOABZ) es uno de los más utilizados por su bajo costo y fácil aplicación. Sin embargo, debido a que este tipo de fármacos presentan inconvenientes como toxicidad, baja solubilidad e inducción a resistencia, se considera necesario el continuar en la búsqueda, diseño, síntesis y desarrollo de nuevos compuestos antiparasitarios. Recientemente, bajo estrategias de química medicinal, se han generado nuevos derivados bencimidazólicos (DBCMs), los cuales, se han diseñado con la finalidad de solucionar los problemas indicados con el uso de los bencimidazoles clásicos. De estos compuestos han surgido los de la serie RCB, entre los cuales se encuentra el 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol (RCB15), que se evaluó en el presente proyecto de tesis para determinar el efecto que presenta en las proteínas de cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF y se seleccionó al SOABZ, el metabolito activo del ABZ, como el cestocida de referencia, ya que el efecto que tiene en los parásitos ha sido bien caracterizado (Palomares et al. 2004; 2006). Para analizar los efectos de los tratamientos, los cisticercos se revisaron en cuanto a su morfología y a la expresión de las proteínas mediante análisis electroforéticos en una y dos dimensiones. Se observó que el derivado RCB15 tuvo un efecto morfológico irreversible en los cisticercos. En los análisis por electroforesis en una dimensión, se observó una diferencia en

la expresión de proteínas de acuerdo al tratamiento. En el análisis por electroforesis en dos dimensiones, se detectaron 50 proteínas cuya expresión cambió de acuerdo a la presencia de cada tratamiento, lo cual reflejó, de alguna manera, el efecto de los DBCMs. La identificación de las proteínas no se realizó, sin embargo, éstas se compararon con proteínas ya identificadas con anterioridad en trabajos publicados recientemente por nuestro equipo de trabajo (Reynoso-Ducoing et al. 2014). Dicha comparación se basó principalmente en el empalme de uno de los mapas proteómicos obtenidos en el presente trabajo de tesis y uno de los obtenidos por la Biol. Reynoso Ducoing, y dado que el perfil de proteínas fue muy semejante en ambos casos, se buscaron aquellas proteínas congruentes. Esto llevó a la posible identificación de diez proteínas hipotéticas afectadas bajo los tratamientos con los DBCMs.

II. INTRODUCCIÓN.

2.1 Importancia del desarrollo de fármacos antihelmínticos.

A pesar de los notables avances tecnológicos en diversos campos de la ciencia, actualmente las enfermedades parasitarias siguen siendo un gran problema de salud pública, cuyo impacto recae directamente en la calidad de vida y en la salud pública de una gran parte de la población mundial, especialmente en países en vías de desarrollo (Ambrosio 2007; Del Brutto and Lama 2013). Por eso es necesario el control y tratamiento satisfactorio de este tipo de enfermedades, para lo cual se han propuesto diferentes estrategias de tratamiento, entre las que el uso de fármacos es una de aplicación inmediata y efectiva (Fairlamb et al. 2003). De los fármacos más utilizados en el tratamiento antihelmíntico, el albendazol (ABZ) ha demostrado ser un fármaco de elección por su buena efectividad, amplio espectro de acción, bajo costo de producción y de uso masivo (Sotelo 2011; González et al. 2006; Del Brutto 2013).

Sin embargo, el ABZ, así como otros derivados bencimidazólicos (DBCMS) de uso en la clínica, presenta inconvenientes como: toxicidad, baja solubilidad e inducción a resistencia (Aguayo-Ortiz et al. 2013) y mucho de su mecanismo de acción aún es desconocido.

Por lo anteriormente expuesto, se continúa en la búsqueda, diseño, síntesis y desarrollo de nuevos compuestos antiparasitarios, basados en modificaciones de la estructura del anillo del bencimidazol (BCM). Cambios con los cuales se esperan superar las inconveniencias anteriormente indicadas. Por ello, en el laboratorio del Dr. Rafael Castillo Bocanegra de la Facultad de Química de la

UNAM, se están desarrollando distintos compuestos con actividad antiparasitaria como el caso de la serie RCB, entre las que se encuentra el RCB15. Al igual que el RCB20 (Márquez-Navarro et al. 2013), parece que el RCB15 es un candidato promisorio para el tratamiento de parasitosis producidas por cestodos. El RCB15 difiere de los bencimidazol carbamatos, como el ABZ, al presentar tres sustituciones en su estructura molecular (las cuales se explicarán con mayor detalle en la sección 2.3), y que han favorecido su solubilidad y biodisponibilidad. En el presente trabajo de tesis se evaluó el efecto del RCB15 en el modelo experimental de cisticercosis murina por *T. crassiceps* de la cepa ORF, ya que este modelo ha sido utilizado para evaluar otras sustancias antihelmínticas (Palomares et al. 2004; 2006; Márquez-Navarro et al. 2013).

2.2 La molécula del BCM como fuente del diseño y síntesis de fármacos antihelmínticos.

La estructura química de la molécula del BCM se muestra en la figura 1. Se compone de dos estructuras cíclicas fusionadas: una bencénica, con los sustituyentes R1 y R2; y otra, diazólica, con los sustituyentes R3 y R4.

Por las propiedades del anillo del BCM, sus derivados conforman un grupo de compuestos con actividad biológica, tales como anticancerígenos, antirretrovirales, antimicóticos, herbicidas, insecticidas, antibacterianos, antiprotozoarios y antihelmínticos (Pérez-Reyes 2008). Estos compuestos se han utilizado desde hace más de 40 años para la producción de agentes antiparasitarios y en el tratamiento de enfermedades parasitarias, por lo que han tenido una amplia aplicación tanto en la medicina humana como en la veterinaria. El primer derivado

del BCM aprobado para su uso en humanos, fue el tiabendazol, y a partir de este se establecieron los parámetros toxicológicos y de eficacia de la terapia antiparasitaria para los derivados del BCM (Lacey 1988). Posteriormente se le hicieron diferentes sustituciones químicas al anillo del BCM, y con ellas se encontró que se podía modificar la actividad biológica del compuesto; y se llegó al desarrollo de nuevos derivados (McKellar and Jackson 2004).

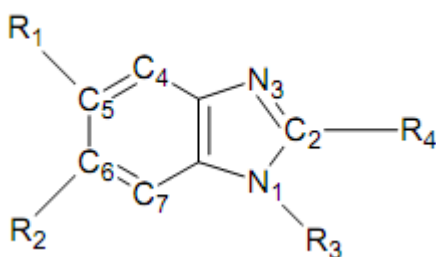
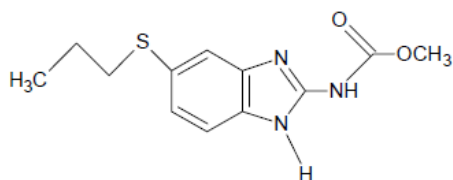


Figura 1. Estructura del anillo del bencimidazol (BCM). El anillo se forma, a su vez, de estructuras cíclicas: una bencénica y la otra diazólica. Se observa la numeración que se asigna a cada uno de los átomos del anillo y en los cuales están representados los diferentes sitios en los que se hacen las sustituciones en la molécula (R1, R2, R3 y R4). Imagen tomada de García-Vilchis 2007.

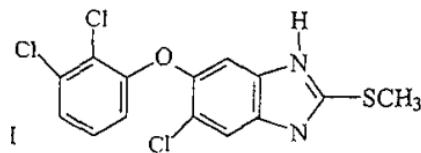
2.3 Derivados bencimidazólicos.

a. Albendazol y sulfóxido de albendazol.

El ABZ es un derivado del BCM de amplio espectro antiparasitario y para el que se aprobó su uso en humanos en 1982 (Dayan 2003; Hotez et al. 2006); siendo este efectivo contra nematodos, trematodos y cestodos. Se encuentra en el grupo de los DBCMs con un grupo carbamato ($-\text{NHCO}_2\text{CH}_3$) en alguno de sus sustituyentes (figura 2a). Dentro de este grupo también se encuentra el parbendazol (PBZ) (siendo este el primero de la serie con un grupo carbamato en el carbono 2); mebendazol (MBZ), efectivo en el tratamiento contra protozoarios aprobado para su uso en humanos en 1972; tiabendazol (TBZ); febendazol (FBZ), un fasciolocida; y otros (Gottschall et al. 1990).



a) **ABZ** (derivado carbamato)



b) **TCBZ** (derivado no carbamato)

Figura 2. Estructura química de los DBCMs, ABZ y TCBZ. El ABZ pertenece al grupo de los DBCMs con un grupo carbamato (-NHCO₂CH₃) en alguno de sus sustituyentes, mientras que el triclabendazol (TCBZ) es un bencimidazol trisustituido; con un grupo trifluorometil (CF₃) en su sustituyente R4; un grupo 2,3-diclorofenoxi en el grupo R1; y un átomo de Cl en el grupo R2. Imagen tomada de López-González 2001.

El ABZ es poco soluble en agua y totalmente soluble en solventes orgánicos, es una propiedad que influye en su absorción y distribución en el organismo (Gottschall et al. 1990). Se ha encontrado que luego de ser administrado por vía oral, prácticamente no se le detecta en el plasma debido a la rápida metabolización que sufre en el hígado, en donde se convierte en SOABZ, y por ello se considera a este como el metabolito activo del ABZ (Dayan 2003); parte del SOABZ es oxidado todavía más, hasta generar el metabolito sulfona (SONABZ), al cual se le ha considerado farmacológicamente inactivo (figura 3).

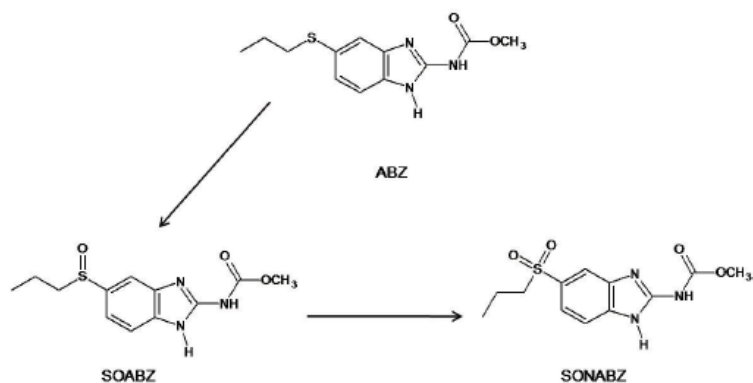


Figura 3. Estructuras químicas del ABZ y sus metabolitos. El ABZ cuando es absorbido al torrente circulatorio se transforma rápidamente en sulfóxido de albendazol (SOABZ), el cual es inestable y se transforma a sulfona de albendazol (SONABZ) que es inactiva. Tomado de Dayan 2003.

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

La estructura molecular del RCB15 está basada en la estructura del anillo del BCM (figura 1). Estructuralmente, el RCB15 difiere de los bencimidazol carbamatos como el ABZ (figura 2a), en que es un bencimidazol trisustituido; con un grupo trifluorometil (CF_3) en su sustituyente R_4 , un grupo 2,3-diclorofenoxi en el grupo R_1 , y un átomo de Cl en el grupo R_2 (López-González 2001) (figura 4).

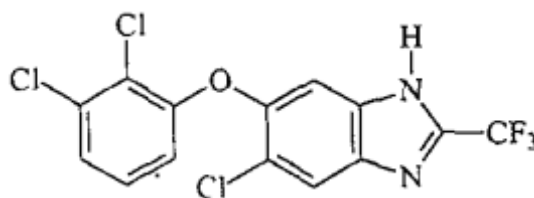


Figura 4. Estructura química del RCB15. El RCB15 es el análogo del triclabendazol, con el cual difiere únicamente en la presencia de un grupo CF_3 en lugar de un grupo SCH_3 . Tomado de López-González 2001.

El RCB15 se diseñó con base a la molécula del triclabendazol (TCBZ) (figura 2b), por lo cual es un análogo del mismo. Esto se basó en que el TCBZ es efectivo contra los estadios inmaduros y adultos de *Fasciola hepatica* (Quiroz et al. 1988; Bennett and Kohler 1987), pero inefectivo contra otros helmintos intra y extraintestinales (Boray 1986). El grupo CF_3 (figura 4), que sustituye al SCH_3 en el TCBZ (figura 2b) se ha demostrado que tiene actividad en contra de helmintos parásitos en bovinos, perros y ratas (Buechel and Flucke 1972). Además, el diseño del RCB15 genera mejoras en sus propiedades químicas lo que favorece su biodisponibilidad y que, comparado con el ABZ, podría ser más eficiente como fármaco antihelmíntico.

2.4 Efecto de los DBCMs sobre componentes del citoesqueleto.

En investigaciones previas se ha propuesto que las estructuras proteicas blanco de los derivados del BCM, son los microtúbulos (MTs), componentes principales del citoesqueleto (González-Malerva and Hernández-Ambrosio 2003) y en específico, la proteína β -tubulina (Lacey 1988; 1990). Los MTs son esencialmente polímeros constituidos por heterodímeros de α y β -tubulina (figura 5), los cuales están presentes en todas las células eucariotas. Varias actividades de importancia dependen de la organización de los MTs, tales como: la forma celular, el transporte, la motilidad y la división celular. En células especializadas como las células flama, los MTs tienen un papel preponderante para generar la dinámica de este tipo de células que permita la excreción de sustancias de desecho (Valverde-Islas et al. 2011), que de otra forma podrían resultar tóxicas para los parásitos (Ambrosio et al. 2014).

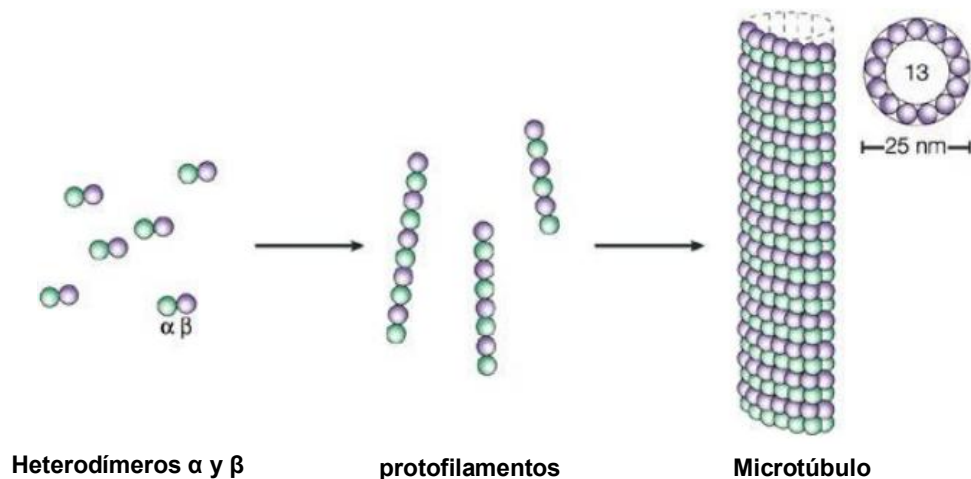


Figura 5. Estructura de los microtúbulos (MTs). Estructuralmente, los MTs son varillas rígidas y huecas de aproximadamente 25 nm de diámetro, se componen de un único tipo de proteína globular, la tubulina. La tubulina es un dímero constituido por dos polipéptidos de 55 kDa estrechamente relacionados, α y β -tubulina. Los dímeros de tubulina se polimerizan para formar MTs, que generalmente consisten en 13 protofilamentos lineales ensamblados alrededor de un centro hueco. Los protofilamentos, que están constituidos por un conjunto de dímeros de tubulina dispuestos cabeza con cola se disponen en paralelo. Imagen tomada de Westermann and Weber 2003.

Debido a que las funciones de los MTs dependen de su interacción con un gran número de proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs), que les permite regular y distribuir los MTs en la célula (Nogales et al. 2000), cualquier cambio en este tipo de proteínas podría generar defectos en la polimerización y formación de los MTs. De hecho se sabe que todas las proteínas del citoesqueleto están intrínsecamente relacionadas unas con otras a través de este tipo de proteínas asociadas. Por consiguiente cuando las condiciones ambientales celulares cambian o se les expone a ciertos tratamientos, se inducen cambios que conducen directa o indirectamente a que se presente una cascada de cambios bioquímicos y fisiológicos. Si esos cambios son severos podrían dañar los parásitos, e incluso, llevarlos a la muerte. Por lo tanto, cualquier sustancia que tenga efecto en estas proteínas tendría un potencial antiparasitario como se ha demostrado para moléculas semejantes al RCB15 (RCB20) (Márquez-Navarro et al. 2013) y las hormonas esteroideas (Ambrosio et al. 2014).

Es conocido que los fármacos que impiden la polimerización o la despolimerización de la tubulina pueden ejercer un efecto rápido y profundo en la organización del citoesqueleto (Karp 2011), y por ende, en su integración celular. Es por ello que tanto el estudio de sus modificaciones y dinámica de las proteínas constitutivas y asociadas del citoesqueleto que resultan afectadas por las sustancias mencionadas requiere de análisis basados en estudios proteómicos (Walther and Mann 2010).

2.5 Modelo experimental de cisticercosis murina para evaluación de fármacos antihelmínticos.

Los cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF se han considerado como un modelo útil para evaluar a las cisticercosis producidas por *T. solium* (Willms and Zurabian 2010), siendo la cisticercosis una enfermedad parasitaria humana y porcina (Willms et al. 2006), por lo que su uso es de vital importancia para comprender mejor la dinámica de este tipo de parasitosis.

Los cisticercos de *T. crassiceps* son vesículas visibles de fácil manejo, que se reproducen asexualmente en la cavidad peritoneal de ratones, y dado que su reproducción es exponencial, su disponibilidad es amplia. Estas características, hacen que los cisticercos de *T. crassiceps* sean un modelo ideal en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Willms and Zurabian 2010), donde es posible evaluar drogas antihelmínticas (Márquez-Navarro et al. 2013; Palomares et al. 2004; 2006; Palomares-Alonso et al. 2007), y determinar los prospectos de una potencial vacuna (Sciutto et al. 2011).

En contraste con otras tenias como *T. solium*, *T. saginata*, *Hymenolepis nana* y *Echinococcus granulosus*, *T. crassiceps* cepa ORF no puede infectar a humanos (Heldwein et al. 2006), además, su fácil mantenimiento dentro del laboratorio lo hacen un modelo experimental útil.

2.6 La farmacoproteómica como herramienta de evaluación de fármacos.

El efecto de un fármaco es posible estudiarlo por medio del uso de la proteómica y el análisis de las proteínas involucradas, siendo ahora una estrategia

que permite establecer específicamente el sitio de acción de un fármaco y, además, es un monitor de las alteraciones en las proteínas bajo tratamientos químicos (Chapal et al. 2004; Witzmann and Grant 2003; Pandey and Mann 2000).

En organismos eucariotas, los genes y las proteínas presentes en los tejidos difieren entre sí, además de depender de la etapa de desarrollo. Un proteoma consta de todas las proteínas expresadas por el genoma de una célula, o un tejido, en un momento determinado (Ambrosio 2007), el cual incluye no sólo proteínas traducidas, sino también aquellas modificadas por el corte y empalme alternativo de los transcritos primarios y el procesamiento posterior a la traducción, o la combinación de ambos (Mann and Jensen 2003). También se pueden obtener análisis cuantitativos y cualitativos de estas proteínas, que junto con análisis estructurales, puede permitir la localización y determinación de la naturaleza de sus interacciones con otras proteínas (Witzmann y Grant 2003).

Los proteomas son altamente dinámicos (Ambrosio 2007), varían constantemente según el estado y naturaleza de la célula, estas variaciones pueden producirse por diversas razones, desde cambios en el medio ambiente celular, hasta por la acción de algunos fármacos (Alberts 2011), la respuesta inducida puede involucrar señales de transducción definidas, inducción de distintos eventos moleculares, incluyendo la expresión de genes de respuesta y factores transcripcionales (Huang et al. 2004).

El hecho de que un mismo gen pueda dar lugar a diferentes formas proteicas y estas, a su vez, puedan interactuar con otras proteínas al formar complejos proteicos; o que las proteínas presenten distintas modificaciones

postraduccionales dando lugar a diversas formas moleculares que puedan estar presentes simultáneamente, hacen que el proteoma presente un nivel de complejidad superior (San Miguel-Hernández et al. 2009). Por lo tanto, el análisis de los proteomas es un anexo informativo a la finalización de su secuencia genómica de creciente importancia.

III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

HIPOTESIS.

A través del análisis proteómico en geles bidimensionales es posible determinar los cambios en la expresión de proteínas de cisticercos de *T. crassiceps*, luego de su tratamiento *in vitro* con el derivado bencimidazólico RCB15.

OBJETIVO GENERAL

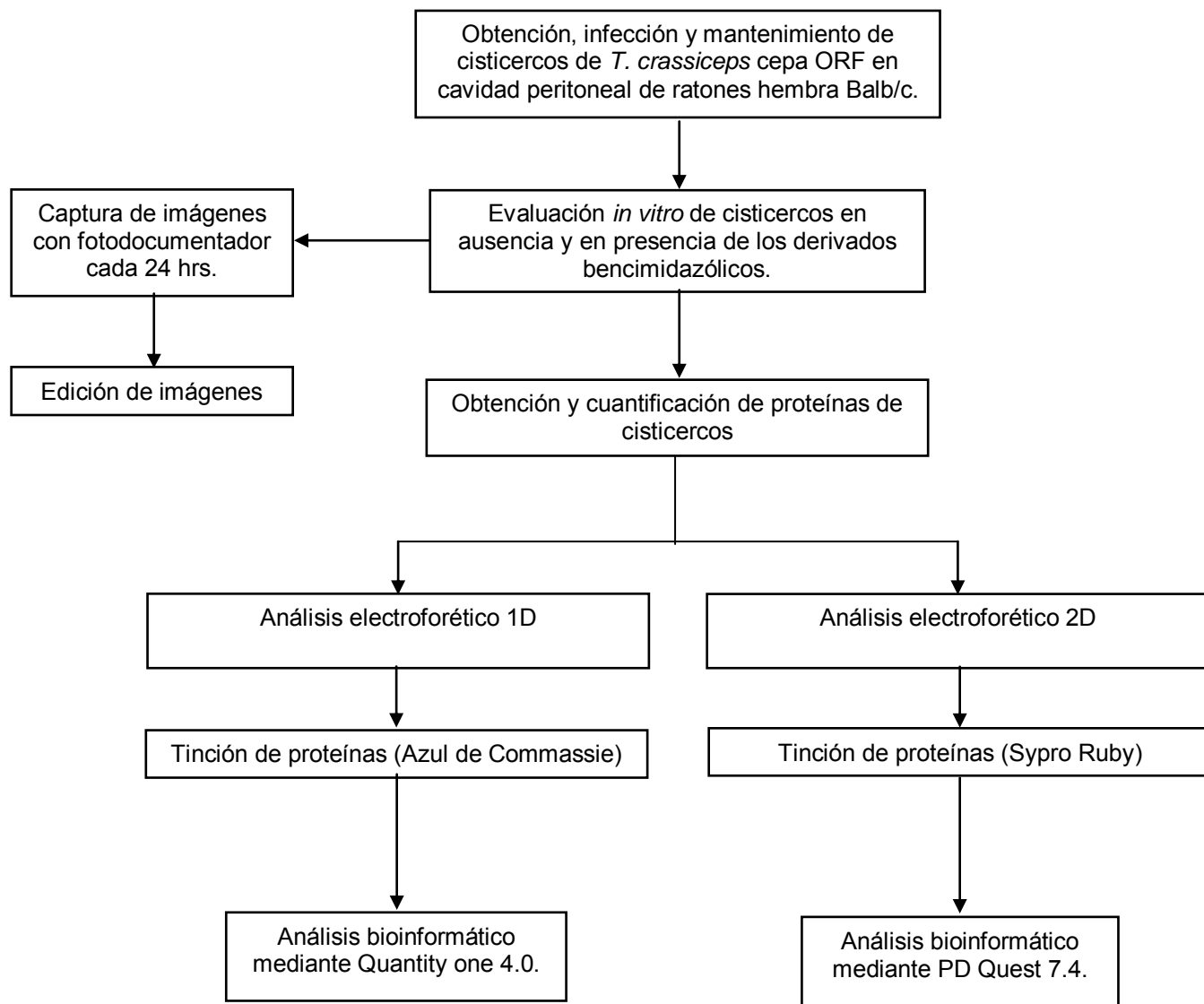
Evaluar el efecto del derivado bencimidazólico RCB15 en la expresión de proteínas del citoesqueleto de cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF mediante análisis electroforéticos en geles bidimensionales.

Objetivos particulares.

1. Obtener los cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF en ratones mediante infecciones experimentales.
2. Evaluar el efecto *in vitro* de los DBCMs, RCB15 y SOABZ, en cisticercos de *T. crassiceps*.
3. Obtener los perfiles electroforéticos en geles en una y dos dimensiones de las proteínas de cisticercos de *T. crassiceps* en presencia de los DBCMs, RCB15 y SOABZ, y sin tratamiento.
4. Identificar los cambios en la expresión de las proteínas de cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF en presencia de los DBCMs.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Diagrama de flujo general.



4.2 Obtención y mantenimiento de cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF.

Los cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF se obtuvieron de la cavidad peritoneal de ratones hembra Balb/c de 13 semanas de edad. Para mantener las infecciones, los parásitos se inocularon intraperitonealmente en ratones de cinco semanas de edad y se consideró un volumen de 400µL de cisticercos/ratón. Luego de dos meses post-infección, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se les extrajeron los cisticercos. La cepa de cisticercos se mantuvo a lo largo del proyecto de investigación mediante inoculaciones intraperitoneales seriadas de ratón a ratón. Para los experimentos, los parásitos se lavaron tres veces con SSBF, se seleccionó el tamaño de los mismos para trabajar con poblaciones homogéneas y, finalmente, con la finalidad de evitar alteraciones en la expresión de proteínas, los parásitos se almacenaron hasta su uso a 4°C en SSBF suplementado con antibiótico-antimicótico (penicilina-G, estreptomycin, anfotericina-B) marca GIBCO BRL.

El uso y sacrificio de los animales se estableció en el proyecto del laboratorio denominado “Obtención y caracterización de los proteomas del citoesqueleto de cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF y de *T. solium*”, el cual se aprobó con el número FMED/CI 082-2012 por los comités de investigación y de ética de la Facultad de Medicina de la UNAM.

4.3 Preparación de medio de cultivo.

Para los estudios *in vitro* se utilizó medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO BRL) complementado con HEPES al 0.22 %, H₂CO₃ al 0.22 % y 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina G, estreptomycin, anfotericina B) a pH 7. El medio de

cultivo se esterilizó con membranas de filtración de 0.22 μm (MILLIPORE) y se almacenó a 4°C hasta su uso. La descripción completa de la preparación del medio se hizo de acuerdo a lo descrito en el anexo d.

4.4 Preparación de las soluciones con los DBCMs.

Previamente, los DBCMs se diseñaron y sintetizaron en el laboratorio del Dr. Rafael Castillo Bocanegra del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química UNAM. Para preparar las soluciones de los compuestos en medio de cultivo, se partió de una solución con una concentración de 1 mg/mL del compuesto. A partir de estas soluciones se hicieron los cálculos necesarios para emplear los compuestos en medio de cultivo a una concentración final de 6.2 μM (ver anexo c).

Como medio de cultivo control, y para todos los casos, se utilizó el medio de cultivo RPMI complementado con DMSO al 0.09 % y etanol al 0.05 %. Estos solventes se utilizaron en todos los casos en que se les requirió.

4.5 Evaluación *in vitro* del efecto de los DBCMs en cisticercos de *T. crassiceps*.

Grupos de 35 cisticercos se incubaron *in vitro* en presencia de los DBCMs durante 6 días. Para estos fines, los cisticercos se colocaron en placas multipozos de nueve pozos, en presencia de 3 mL de medio de cultivo que contenía el compuesto a evaluar y también en ausencia del mismo. Los ensayos se efectuaron por triplicado. Las condiciones bajo las cuales se mantuvieron los parásitos fueron: 37°C, 5 % de CO₂ y 98 % de humedad relativa dentro de una

incubadora NUAIRE. Los parásitos se trabajaron bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar (ESCO ACS-3S2). Para mantener una concentración constante de los DBCMs, el medio de cultivo de los parásitos se reemplazó cada 48 horas.

Con la finalidad de llevar un registro de los cambios observados por los efectos de los DBCMs en los parásitos, cada 24 horas se capturaron las imágenes de los cisticercos con un fotodocumentador (BioRad, Chemidoc-Doc XRS), se procesaron, editaron y guardaron en formato TIFF. Estas se analizaron y compararon entre sí para determinar el momento en el cual el efecto de los compuestos fue evidente. Bajo las condiciones de cultivo indicadas y con las observaciones obtenidas (descritas en lo correspondiente a resultados), se tomó la decisión de que luego de dos días de mantenimiento *in vitro* los cisticercos debían ser obtenidos y procesados para su evaluación mediante electroforesis.

4.6 Obtención y cuantificación de proteínas de cisticercos de *T. crassiceps*.

Los cisticercos se descongelaron y homogenizaron con un homogenizador PRO 200, luego, las suspensiones se sonicaron tres veces con un sonicador VIBRA CELL y se precipitaron con ATC al 10% y DTT 20 mM en acetona (ver anexo a). Finalmente, las proteínas se cuantificaron utilizando el Kit protein Assay DC (ver anexo b).

4.7 Análisis electroforético unidimensional de las proteínas de cisticercos.

La separación electroforética se realizó con 30 µg de proteína por carril en geles de poliacrilamida pre-hechos al 10% (Invitrogen), bajo condiciones

reductoras con antioxidante. En estas separaciones se utilizaron marcadores de peso molecular pre-teñidos (BioRad) y los geles resultantes se tiñeron con Azul de Coomassie R-350 al 0.2%.

4.8 Análisis electroforético bidimensional de las proteínas de cisticercos.

a. Isoelectroenfoque (IEE).

Se emplearon tiras de 7 cm de gradiente inmovilizado de pH 3-10 lineal (GE Healthcare) y se utilizaron dos concentraciones distintas de proteínas: 50 µg para los cisticercos del grupo control y 31 µg para los cisticercos tratados con los DBMs, SOABZ y RCB15. En los tres casos, las proteínas se hidrataron en presencia de urea 7 M, tiourea 2 M, chaps al 4 %, DTT 60 mM y anfolitos al 2 %, y se aforaron a 125 µL con SR (urea 7 M, chaps al 4 %, tiourea 2 M, azul de Bromofenol al 0.002 %). La hidratación se realizó a TA durante 14 horas. Transcurrido el periodo de hidratación, las tiras se colocaron en un aparato IEF cell (BioRad) ajustado con un programa de tres pasos: 250 V lineal por 20 minutos, 4 000 V lineal por 2 horas y 4 000V, en pendiente rápida, hasta alcanzar 10 000 V/hr. Las tiras se retiraron de la placa de corrimiento y se congelaron a -70°C hasta su uso. En las tres condiciones experimentales las tiras se procesaron por triplicado.

b. Electroforesis en doble dimensión.

Previo a la electroforesis en 2D, las tiras se incubaron por 15 minutos, en solución de equilibrio (Urea 6 M; Tris-base pH 8.8; DSS al 2%; glicerol al 30% y azul de bromofenol al 0.002%) enriquecida con 0.05 g de DTT y, posteriormente,

las tiras se incubaron por otros 15 minutos en SE suplementada con 0.125 g de iodoacetamida.

Para la electroforesis en 2D, las tiras isoelectroenfocadas se fijaron con agarosa al 0.5 % y se depositaron sobre geles pre-hechos (NuPAGE de 4-12 % de poliacrilamida). En la separación electroforética, los geles se colocaron en una cámara XCell SureLock y se corrieron a 200 V durante 40 min a 4°C con un Buffer de corrida comercial (NuPAGE MES SDS Running Buffer, Invitrogen) suplementado con 0.25 % de antioxidante. Se utilizaron marcadores de peso molecular no teñidos y, posteriormente, para la tinción de las proteínas se empleó el reactivo Sypro Ruby de acuerdo a lo descrito por el fabricante.

4.9 Análisis bioinformático de las separaciones electroforéticas.

a. Geles unidimensionales. Empleo del programa Quantity One 4.0.

Las imágenes de los geles se capturaron mediante un fotodocumentador ChemiDoc (BioRad) bajo el empleo del programa Quantity One 4.0. Bajo este programa, se editaron, analizaron y guardaron las imágenes para las cuales se determinó su número de bandas por carril, su intensidad y PM. Luego, a partir de tales condiciones, se obtuvieron y analizaron los densitogramas de las tres condiciones experimentales, y, finalmente, se compararon entre sí.

b. Geles bidimensionales. Empleo del programa PDQuest 7.4.

Las imágenes de los geles se capturaron con un fotodocumentador (BioRad) y las proteínas se visualizaron con luz UV. Las imágenes se editaron y analizaron con el programa PD Quest 7.4. Se analizó cada mapa proteómico por separado, y

por condición experimental, y se obtuvo el número de puntos en cada uno de ellos. Los mapas proteómicos se imprimieron en papel fotográfico para su posterior análisis.

4.10 Análisis comparativo de los mapas proteómicos generados.

Los mapas proteómicos obtenidos se compararon de dos formas: una visual y otra, mediante el software PDQuest 7.4. En el primer análisis se seleccionaron las proteínas que de acuerdo a los criterios de evaluación (presencia e intensidad) presentaron diferencias entre los tratamientos. En el segundo análisis, además de confirmar dichas diferencias, se obtuvieron los valores de pI, la intensidad (píxeles) y PM de cada una de ellas.

Para analizar a detalle las diferencias entre las proteínas, estas se agruparon en cuatro grupos (A, B, C y D), los cuales se definieron en función de la ubicación de las proteínas en los mapas proteómicos.

V. RESULTADOS

5.1 Evaluación de la morfología de cisticercos durante el tratamiento con DBCMs, SOABZ y RCB15.

En la figura 6 se muestra que durante el tiempo en mantenimiento *in vitro*, en ausencia de tratamiento (control), los parásitos se conservaron sin cambios con su morfología típica ovalada con gemas en uno de los polos y translúcidos. Sin embargo, en presencia de los derivados del BCM (SOABZ y RCB15), se observaron cambios en la morfología: se apreció pérdida del contenido de fluido vesicular, disminución de tamaño y, en algunos casos, los cisticercos se colapsaron totalmente. En el caso del tratamiento con SOABZ se observó que tales cambios ocurrieron a partir del segundo día de tratamiento. Mientras que con el RCB15, los parásitos resultaron dañados a partir del primer día y, en comparación con los tratados con SOABZ, los parásitos resultaron muy dañados. En la figura 6 se observa que el de SOABZ fue menos agresivo que el del RCB15 (dentro de cuadros en color rojo, se muestra la comparación del efecto de los diferentes tratamientos). Los efectos en la morfología de los cisticercos durante ambos tratamientos se mantuvo durante los siguientes días de ensayo e, incluso, hubo un mayor número de cisticercos dañados conforme aumentó el tiempo de exposición a cada tratamiento. En el caso del tratamiento con RCB15, durante los días 3 a 6, se observó que los cisticercos estaban completamente dañados, y al ser comparados con los cisticercos tratados con SOABZ, este último no generó tanto daño en los parásitos.

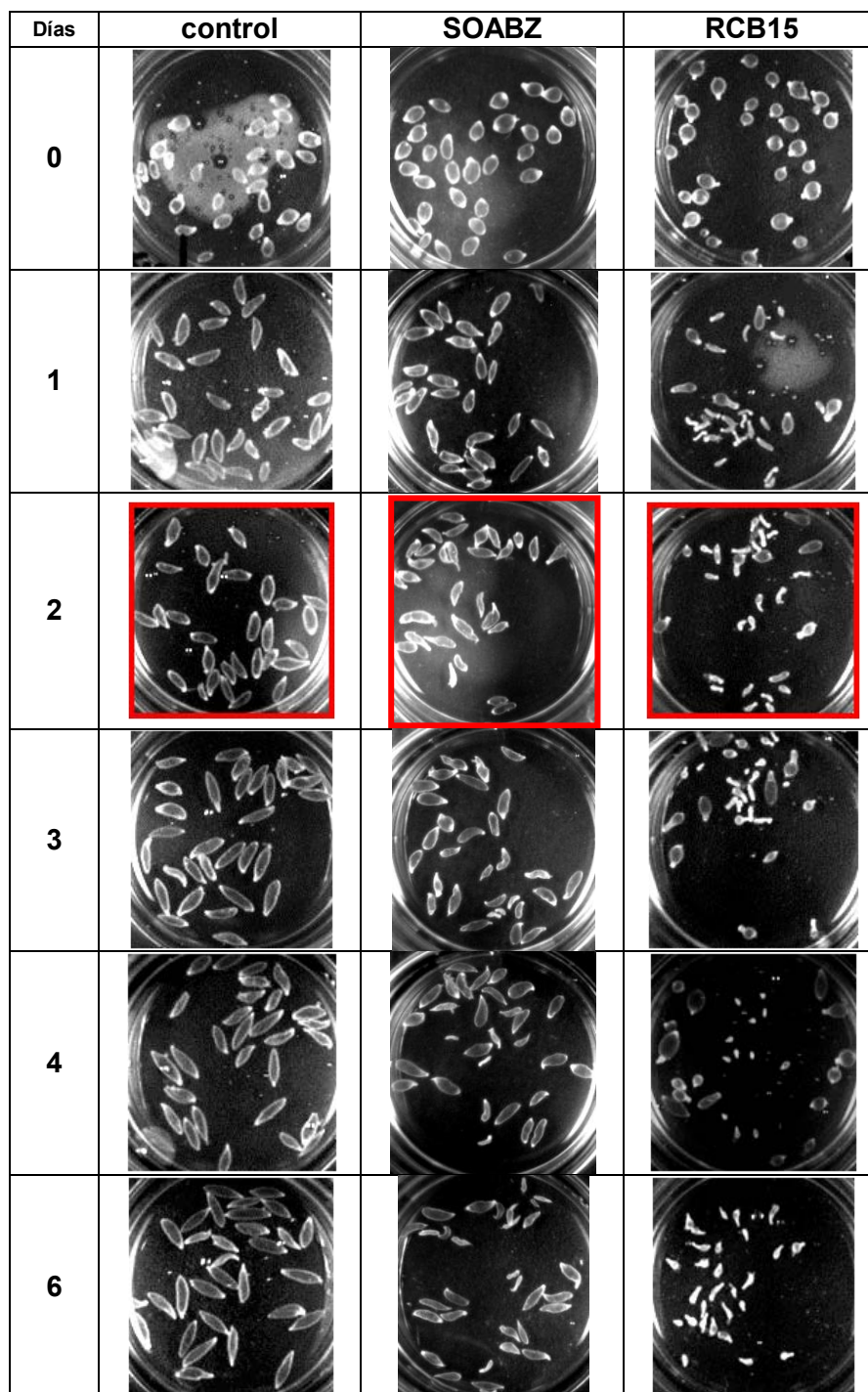


Figura 6. Evaluación del efecto *in vitro* de cisticercos tratados con los DBCMs, SOABZ y RCB15. Los cisticercos se mantuvieron durante seis días bajo condiciones definidas (37°C, CO₂ al 5%, humedad al 98%, en medio de cultivo RPMI). Un grupo de parásitos no fue tratado (control), mientras que los otros dos se trataron con SOABZ y RCB15. Ambos compuestos se probaron a una concentración de 6.2 µM en presencia de DMSO al 0.09 % y etanol al 0.05 %. Ambos disolventes también se adicionaron al medio de cultivo del grupo control. El efecto de ambos tratamientos fue visible a partir del segundo día de tratamiento (cuadros en color rojo), por lo que estos parásitos fueron analizados mediante electroforesis.

Con base en estos resultados, se determinó que los parásitos recuperados de los cultivos a los dos días de tratamiento con los DBCMs serían los analizados por estudios electroforéticos.

5.2 Perfiles electroforéticos en una dimensión de las proteínas de cisticercos.

En la figura 7 se muestra la comparación entre los perfiles electroforéticos de las proteínas obtenidas de los cisticercos control y en presencia de los DBCMs (SOABZ y RCB15). Según los perfiles observados a simple vista, se encontró que en cada carril de acuerdo a la tinción con azul de Coomassie se revelaron diferentes números de bandas: 34 (control), 40 (SOABZ) y 28 (RCB15). La comparación de las bandas bajo todos los tratamientos muestra que aquellas de mayor intensidad están presentes en los tres perfiles electroforéticos. Mientras que es distinto cuando se observan las bandas con menos intensidad. La mayor parte de las bandas se encuentran localizadas en el intervalo de los 250 a los 25 kDa.

Como se puede ver en la misma figura, es diferente el efecto de los DBCMs en la expresión de las proteínas de los cisticercos. Mientras que con el RCB15 no se observaron seis bandas, bajo el tratamiento con SOABZ sí. Estas se encuentran dentro del intervalo de PM de 150 a 10 kDa (cuyos valores de PM fueron: 121, 62, 48, 35, 27 y 13). Por otro lado, bajo el tratamiento con SOABZ se observaron seis bandas adicionales comparadas con las encontradas en el grupo control, que se encuentran dentro del intervalo de 150 y 10 kDa (cuyos valores de PM fueron: 110, 91, 19, 12, 10 y 9).

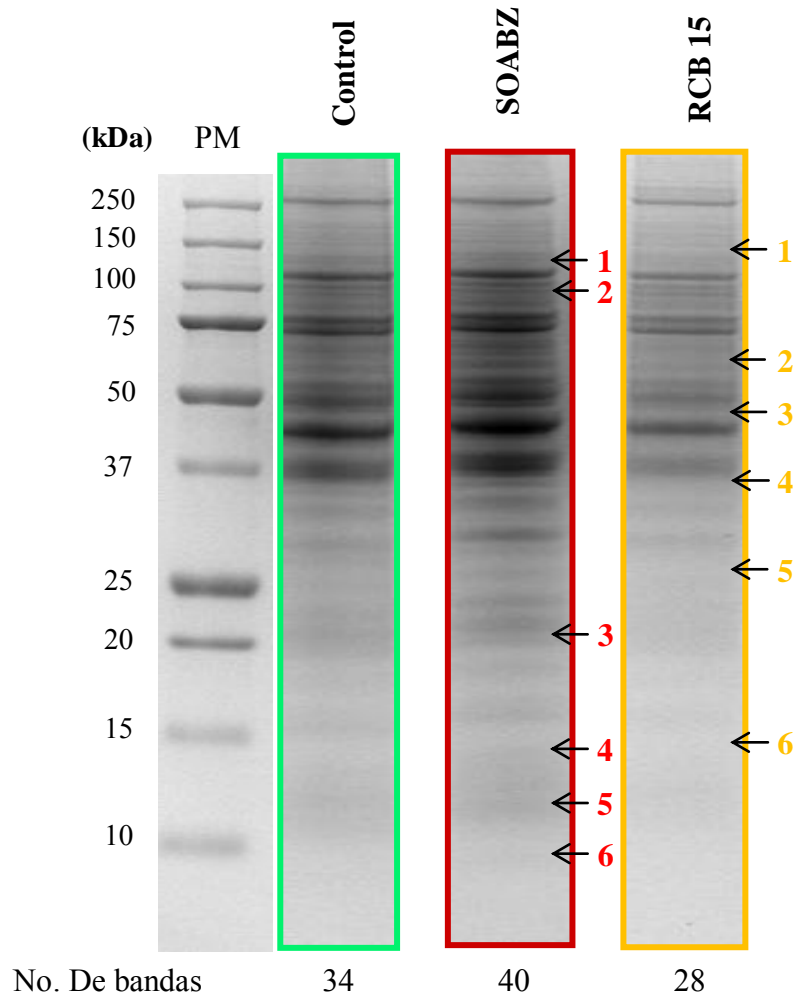


Figura 7. Comparación de los perfiles electroforéticos en una dimensión de las proteínas de cisticercos. Se comparan tres diferentes perfiles electroforéticos que corresponden a los tratamientos a los que se sometieron los cisticercos: SOABZ y RCB15, y sin tratamiento (control). EGP-DSS al 10% en condiciones reductoras con DTT, 30 µg de proteínas por carril. Las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie al 0.2%. Se utilizaron PM pre-teñidos (BioRad). En el perfil electroforético de cisticercos tratados con SOABZ se detectaron seis bandas adicionales (números en color rojo), mientras que bajo el tratamiento con RCB15, no se observaron seis bandas (números en color verde).

Con la finalidad de hacer una evaluación cuantitativa de la expresión de proteínas y para analizar las bandas distintas bajo los tratamientos con los DBCMs, se llevó a cabo un análisis densitométrico de las bandas indicadas en la figura 7 (6 en el tratamiento con SOABZ, y 6 en el tratamiento con RCB15) (figura 8).

Tabla 1. Comparación de los parámetros de las bandas numeradas en la figura 7.

| Banda | Atributo | Control | SOABZ | RCB15 |
|--------------|-----------------|----------------|--------------|--------------|
| 1 | PM | - | 110.34 | - |
| | Intensidad | - | 75.00 | - |
| | Rf | - | 0.174 | - |
| 2 | PM | - | 91.51 | - |
| | Intensidad | - | 76.94 | - |
| | Rf | - | 0.218 | - |
| 3 | PM | - | 19.40 | - |
| | Intensidad | - | 155.50 | - |
| | Rf | - | 0.655 | - |
| 4 | PM | - | 11.70 | - |
| | Intensidad | - | 40.25 | - |
| | Rf | - | 0.846 | - |
| 5 | PM | - | 9.88 | - |
| | Intensidad | - | 26.69 | - |
| | Rf | - | 0.905 | - |
| 6 | PM | - | 8.89 | - |
| | Intensidad | - | 42.44 | - |
| | Rf | - | 0.943 | - |
| 1 | PM | 120.60 | 120.75 | - |
| | Intensidad | 57.36 | 80.06 | - |
| | Rf | 0.160 | 0.162 | - |
| 2 | PM | 61.97 | 61.64 | - |
| | Intensidad | 59.81 | 103.50 | - |
| | Rf | 0.284 | 0.286 | - |
| 3 | PM | 47.92 | 47.67 | - |
| | Intensidad | 162.00 | 258.63 | - |
| | Rf | 0.348 | 0.349 | - |
| 4 | PM | 35.07 | 35.28 | - |
| | Intensidad | 91.19 | 196.81 | - |
| | Rf | 0.453 | 0.455 | - |
| 5 | PM | 27.31 | 27.45 | - |
| | Intensidad | 85.44 | 155.50 | - |
| | Rf | 0.540 | 0.538 | - |
| 6 | PM | 13.06 | 13.26 | - |
| | Intensidad | 22.06 | 29.19 | - |
| | Rf | 0.807 | 0.802 | - |

Nota: Ausencia de proteína (-)

En color rojo las proteínas observadas sólo bajo el tratamiento con SOABZ

En color amarillo las proteínas observadas en control y bajo el tratamiento con SOABZ

Valores de intensidad representan la expresión de las proteínas en pixeles.

Valores de PM (kDa) y los de Rf se calcularon con el Programa Quantity one 4.0.

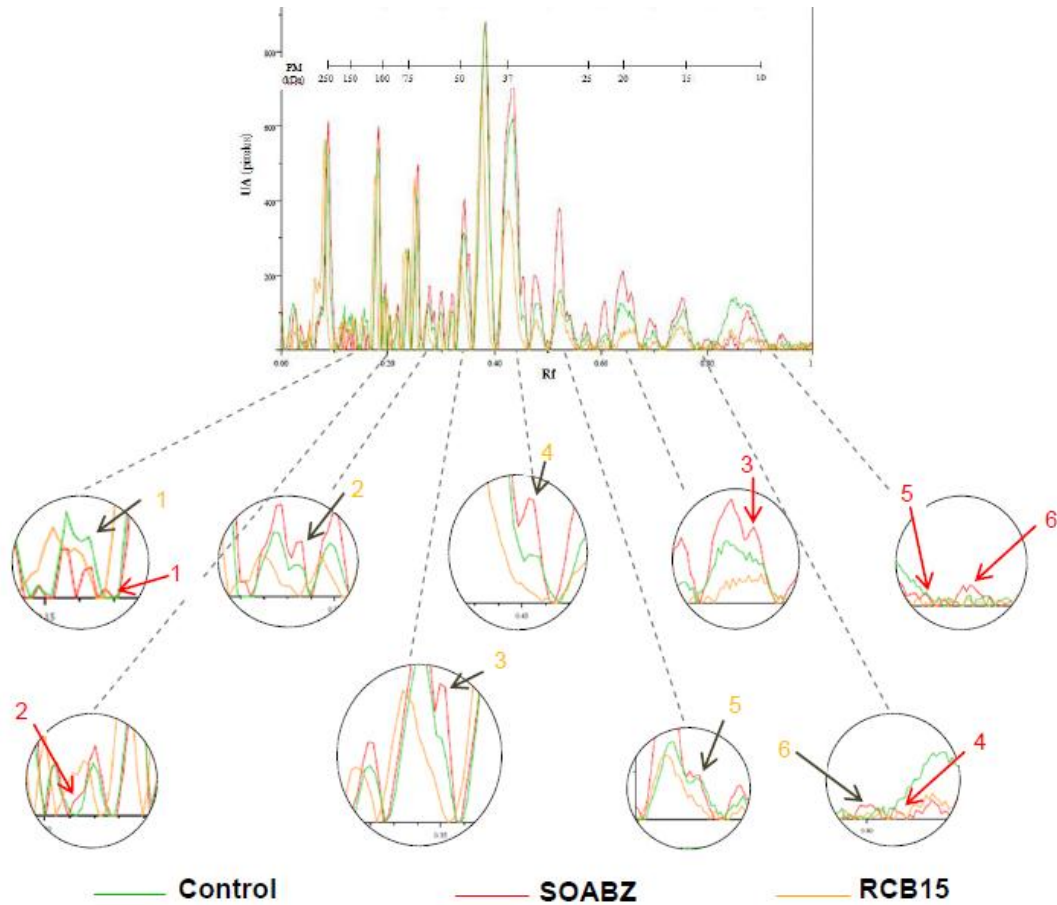


Figura 9. Comparación de los densitogramas de las bandas numeradas en la figura 7. Se comparan tres densitogramas que corresponden a los tratamientos a los que se sometieron los cisticercos como se muestra en la figura 7 (línea verde = control; línea roja= cisticercos tratados con SOABZ y línea anaranjada= cisticercos tratados con RCB15). Bajo el tratamiento con SOABZ se detectaron seis bandas adicionales (flechas color negro), mientras que bajo el tratamiento con RCB15 no se observaron seis bandas (flechas en color rojo). En la parte superior se encuentra la imagen de la figura 8 a partir de la cual se realizaron las ampliaciones. En la parte inferior se muestran las ampliaciones de las bandas seleccionadas e indicadas con su respectivo número. Las flechas en color rojo indican las bandas presentes sólo bajo el tratamiento con SOABZ y las flechas en color negro indican las bandas presentes bajo el tratamiento con SOABZ y sin tratamiento (control).

5.3 Perfiles electroforéticos en dos dimensiones de las proteínas de cisticercos.

En la figura 10 se muestran los mapas proteómicos por triplicado bajo las diferentes condiciones de tratamiento a la que se sometieron los parásitos. Como se observa, hubo un excelente enfoque y definición de los puntos obtenidos según la tinción de los geles con el reactivo Sypro Ruby y aparentemente, las mejores

definiciones se consiguieron con las proteínas obtenidas bajo el tratamiento con RCB15. Aún cuando se analizó la misma cantidad de proteína para los DBCMs, SOABZ y RCB15, con base en el tratamiento, en el análisis de los mapas proteómicos por triplicado se detectó variabilidad en la expresión de las proteínas y, mientras que en el grupo control se encontraron una mayor cantidad de puntos (316, 300 y 295), bajo el tratamiento con RCB15 se encontraron los menores puntos (194, 200 y 222). Los puntos encontrados para el tratamiento con SOABZ, mostraron corresponder al número de puntos intermedio (216, 210 y 214). En todos los mapas proteómicos se encontró que los puntos estaban distribuidos principalmente dentro del intervalo de PM de 10 a 150 kDa y pH de 4 a 10.

Con la finalidad de llevar a cabo un análisis comparativo de los proteomas obtenidos de la figura 10, se hizo una selección de tres mapas proteómicos que representaran a cada condición experimental en estudio (figura 11), cuya selección se basó en el patrón de expresión de las proteínas y su definición. Durante la comparación se encontró que 50 proteínas (situadas en el intervalo de PM de 100 a 15 kDa y de pH de 4 a 10), difirieron en lo relacionado con su intensidad y con su presencia (tablas 2-4), en por lo menos dos de las tres condiciones experimentales. Luego, con la finalidad de llevar a cabo un mejor análisis comparativo de las 50 proteínas, estas fueron divididas en los grupos A (PM: 110-74 kDa; pH: 5-7.5), B (PM: 52 kDa, pH:4.6-5.5; y PM: 43 kDa, pH: 4.9-6.1), C (PM: 50-37 kDa; pH: 6-9.2) y D (PM: 30-15 kDa; pH: 5-8) (figura 12), los cuales se analizaron como se indica posteriormente en la figuras 13-16.

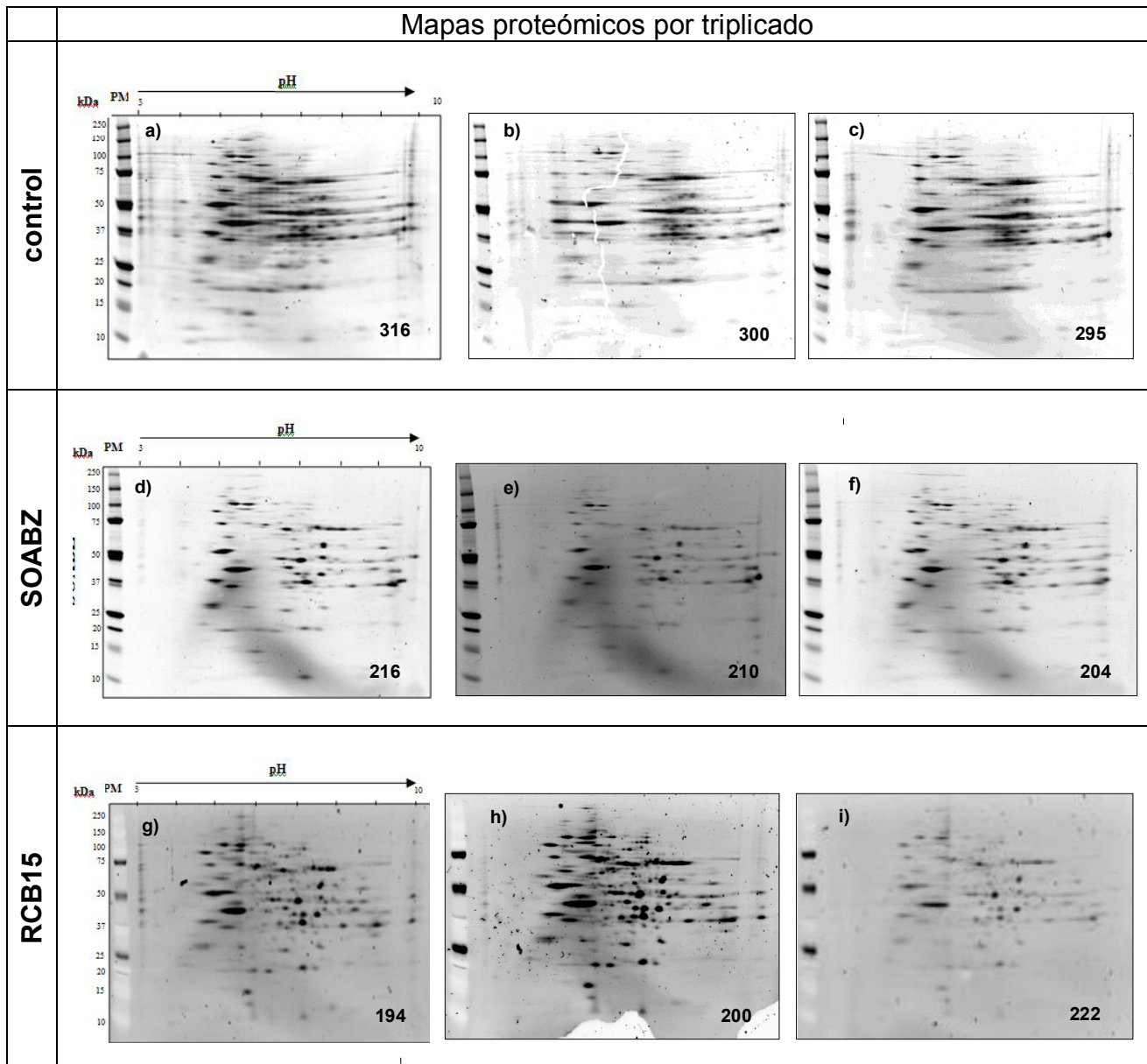


Figura 10. Mapas proteómicos de las proteínas de cisticercos. Se presentan los proteomas de cisticercos, por triplicado, mantenidos en presencia de los tratamientos con los DBCMs: SOABZ y RCB15; y sin tratamiento (control). Se utilizaron dos concentraciones de proteína: 50 μ g en control, y 31 μ g en SOABZ y RCB15. Se utilizaron tiras de IEE en intervalo de pH 3-10 lineal de 7 cm y se realizaron EGP-DSS pre-hechos de 4-12 %. Las proteínas fueron teñidas con Sypro Ruby. Se utilizaron PM no teñidos, excepto en RCB15 en los que se utilizaron PM pre-teñidos (BioRad). En la parte inferior derecha de cada mapa proteómico se indica el número de puntos detectados con el software PDQuest 7.4. Las escalas de PM y pH señaladas en los primeros mapas proteómicos de cada grupo aplican para el resto de ellos.

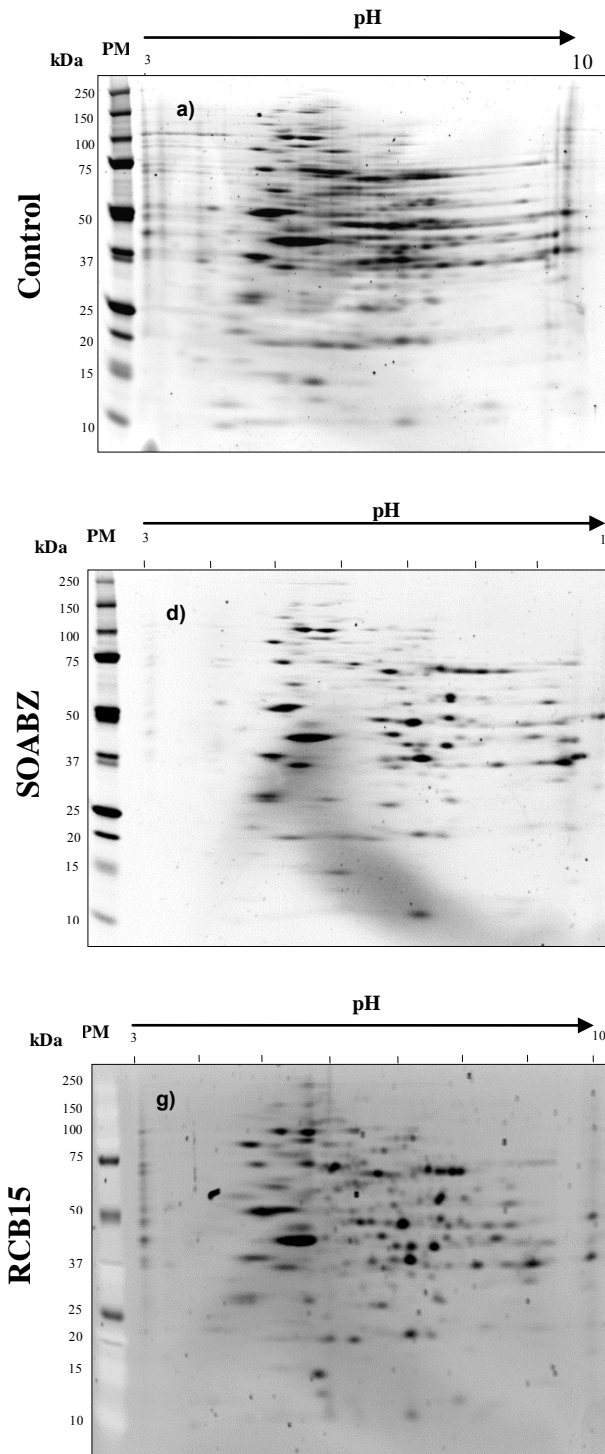


Figura 11. Mapas proteómicos representativos de las tres condiciones experimentales. Se muestran los mapas proteómicos seleccionados para el análisis de las 50 proteínas. Las letras corresponden a los mapas proteómicos clasificados de acuerdo a la figura 10.

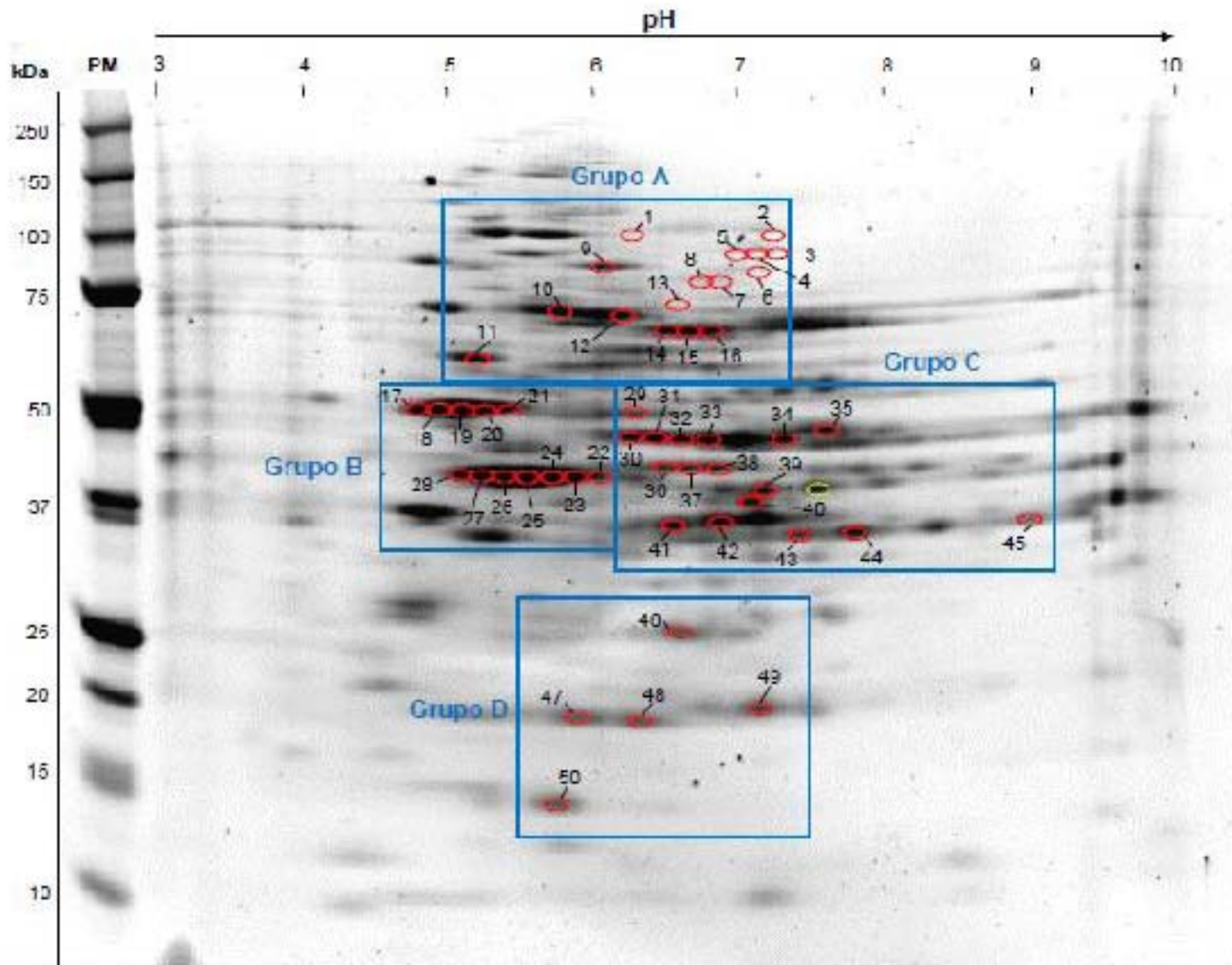


Figura 12. Selección y clasificación de las 50 proteínas detectadas en el comparativo de los mapas proteómicos. Se muestra el mapa proteómico de cisticercos del grupo control en el cual se seleccionaron las 50 proteínas detectadas en el análisis comparativo de los mapas proteómicos de las figuras 10 y 11. También se muestra su clasificación en grupos: A, B, C y D, de acuerdo a su cercanía y ubicación en los mapas proteómicos.

a. Análisis comparativo de proteínas del grupo A.

En la figura 13 se comparan las proteínas incluidas en el grupo A bajo las tres condiciones experimentales y se tomó como base el número de proteínas encontradas bajo el tratamiento con RCB15. En este grupo se contabilizaron 16 proteínas, 6 bajo el tratamiento con SOABZ y 7 en control. Además la intensidad de los puntos en común fue distinta (tabla 2). De las 6 proteínas que se encontraron en común, la intensidad de ellas fue menor bajo el tratamiento con el SOABZ. Las proteínas 14 y 16 encontradas en el grupo control no fueron visualizadas o tuvieron muy baja intensidad bajo el tratamiento con SOABZ. Bajo el tratamiento con RCB15 la intensidad de la proteína 15 fue mayor.

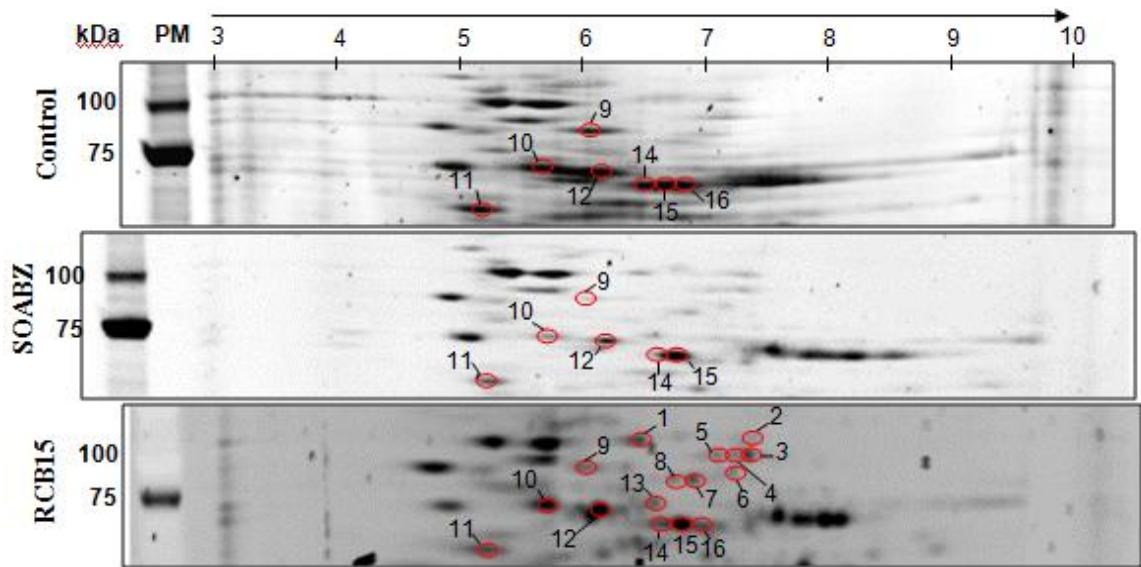


Figura 13. Proteínas en geles 2D del grupo A. En este grupo se seleccionaron dieciséis proteínas cuyos valores de PM se encuentran en el intervalo de 110 a 74 kDa y de 5 a 7.5 de pI. En RCB15 se detectaron las dieciséis proteínas (1-16); en SOABZ solo se detectaron seis (9, 10, 11, 12, 14 y 15); y en control siete (9, 10, 11, 12, 14, 15 y 16). Las intensidades de las proteínas en común fueron menores bajo el tratamiento con SOABZ, mientras que la intensidad de la proteína 15 bajo el tratamiento con RCB15 fue mayor (tabla 2).

Tabla 2. Proteínas del grupo A.

| Proteínas | PM | pl | Control | Intensidad | SOABZ | Intensidad | RCB15 | Intensidad |
|-----------|--------|----------------|---------|------------|-------|------------|-------|------------|
| | (kDa) | (experimental) | | | | | | |
| 1 | 99.45 | 6.2 | - | 0 | - | 0 | + | 137024 |
| 2 | 100.78 | 7.1 | - | 0 | - | 0 | + | 37107 |
| 3 | 92.58 | 7.1 | - | 0 | - | 0 | + | 136637 |
| 4 | 92.58 | 6.9 | - | 0 | - | 0 | + | 31050 |
| 5 | 92.58 | 6.8 | - | 0 | - | 0 | + | 31176 |
| 6 | 85.25 | 6.9 | - | 0 | - | 0 | + | 24605 |
| 7 | 82.33 | 6.6 | - | 0 | - | 0 | + | 73129 |
| 8 | 82.33 | 6.5 | - | 0 | - | 0 | + | 36379 |
| 9 | 93.14 | 6.1 | + | 320820 | + | 20210 | + | 81663 |
| 10 | 73.54 | 5.7 | + | 666520 | + | 66391 | + | 250253 |
| 11 | 73.43 | 6.0 | + | 422006 | + | 72508 | + | 200876 |
| 12 | 62.04 | 5.3 | + | 661643 | + | 91185 | + | 409088 |
| 13 | 73.20 | 6.3 | - | 0 | - | 0 | + | 46305 |
| 14 | 68.21 | 6.5 | + | 171989 | + | 141480 | + | 75000 |
| 15 | 69.23 | 6.6 | + | 286612 | + | 20087 | + | 663033 |
| 16 | 69.65 | 6.8 | + | 373528 | - | 0 | + | 172306 |

Nota: Presencia de proteína (+)

Ausencia de proteína (-)

Los valores representan la intensidad de expresión de las proteínas medida en píxeles.

Los valores de PM (kDa) y los de pl se calcularon directamente en las imágenes de los proteomas.

El recuadro indica el punto con mayor intensidad bajo el tratamiento con RCB15.

b. Análisis comparativo de proteínas del grupo B.

En la figura 14 se comparan las proteínas incluidas en el grupo B bajo las tres condiciones experimentales. Para ello, se seleccionaron dos aglomeraciones de proteínas, una con cinco (17-21) y otra con siete (22-28). Las proteínas del primer aglomerado se situaron al nivel de los 52 kDa y dentro del intervalo de pH entre 4.6 a 5.5; las proteínas del segundo agregado, se encontraron al nivel de los 43 kDa y dentro del intervalo de pH entre 4.9 a 6.1. Para los aglomerados se determinó el número de proteínas que los podría constituir con base al diámetro de uno de los mejores puntos enfocados del grupo control, el cual se observa en el

mapa proteómico presentado en la figura 12 (perfilado en amarillo). Como se muestra en la figura 14, dentro del primer aglomerado se identificaron cinco posibles proteínas bajo el tratamiento con RCB15 y en ausencia del mismo. Mientras que, bajo el tratamiento con SOABZ, solamente se identificaron tres puntos. Por otro lado, en el segundo aglomerado de proteínas, se identificaron 7 puntos en el grupo control y 4 bajo el tratamiento con el SOABZ y con RCB15. Una vez más, se detectaron menores puntos bajo el tratamiento con ambos DBCMs. En el caso de la proteína 24, bajo el tratamiento con RCB15 tuvo una disminución importante en su expresión.

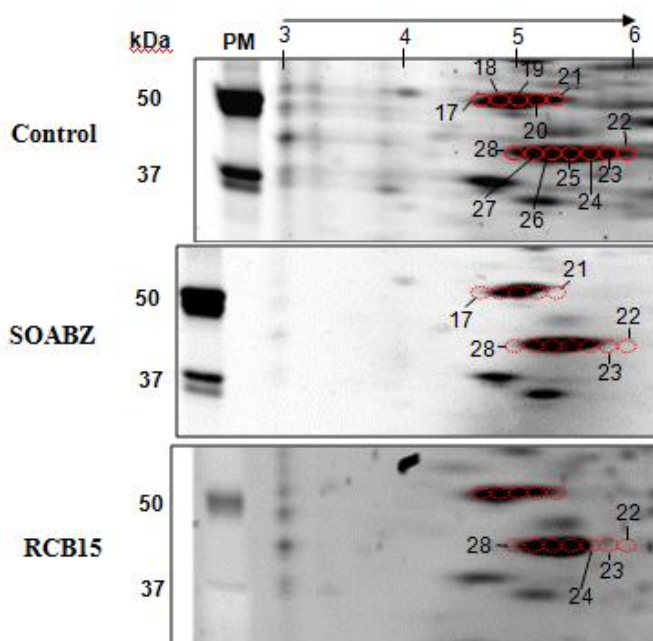


Figura 14. Proteínas en geles 2D del grupo B. En este grupo se seleccionaron dos aglomeraciones de proteínas, uno con cinco (17-21) y otro con siete (22-28). Las proteínas del primer aglomerado se situaron al nivel de los 52 kDa y dentro del intervalo de pH de 4.62 a 5.5; mientras que las proteínas del segundo aglomerado se situaron al nivel de los 43 kDa y dentro del intervalo de pH de 4.92 a 6.03. Dentro del primer aglomerado se identificaron cinco proteínas tanto en ausencia como en presencia de RCB15; en el caso de SOABZ, solamente se observaron tres. En el caso del segundo aglomerado, se identificaron siete posibles proteínas en ausencia de tratamiento; en el caso del tratamiento con los DBCMs se observaron solo cuatro. En el caso de la proteína 24, bajo el tratamiento con RCB15, tuvo una disminución importante en su expresión.

c. Análisis comparativo de proteínas del grupo C.

En la figura 15 se comparan las proteínas incluidas en el grupo C bajo las tres condiciones experimentales y se tomó como base el número de proteínas encontradas en el grupo control. Aquí se contabilizaron 17 proteínas, 12 bajo el tratamiento con SOABZ y 13 bajo el tratamiento con RCB15, por lo tanto, se detectaron menor número de proteínas bajo el tratamiento con los DBCMs. Según la intensidad medida de los puntos presentada en la tabla 3, los puntos tuvieron una expresión diferencial. De las 10 proteínas que se encontraron en común, la intensidad de ocho de ellas fue mayor en el grupo control, sin embargo, la intensidad de la proteína 45 fue mayor bajo el tratamiento con RCB15, mientras que la intensidad de la proteína 35 fue mayor bajo el tratamiento con SOABZ.

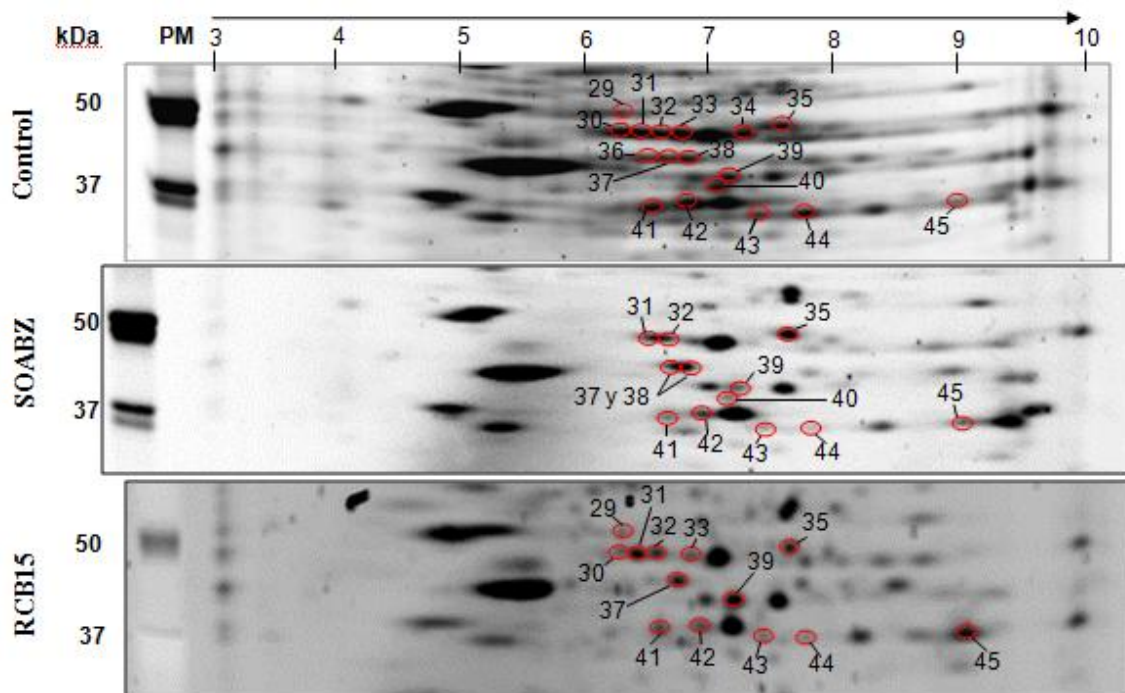


Figura 15. Proteínas en geles 2D del grupo C. En este grupo se seleccionaron diecisiete proteínas cuyos valores de PM se encuentran en el intervalo de 50 a 37 kDa y de 6 a 9.2 de pl. En ausencia de tratamiento (control) se detectaron las diecisiete proteínas (29-45); bajo el tratamiento con SOABZ se detectaron doce proteínas (31, 32, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 y 45); y bajo el tratamiento con RCB15 se detectaron trece proteínas (29, 30, 31, 32, 33, 35, 37, 39, 41, 42, 43, 44 y 45). De acuerdo a los valores de la tabla 3, la proteína 45 tuvo una mayor intensidad bajo el tratamiento con RCB15; y la proteína 35 bajo el tratamiento con SOABZ.

Tabla 3. Proteínas del grupo C.

| Proteínas | PM (kDa) | pl (experimental) | control | Intensidad | SOABZ | Intensidad | RCB15 | Intensidad |
|-----------|----------|-------------------|---------|------------|-------|------------|-------|------------|
| 29 | 51.80 | 6.2 | + | 108587 | - | 0 | + | 50443 |
| 30 | 49.10 | 6.2 | + | 122933 | - | 0 | + | 55173 |
| 31 | 48.25 | 6.4 | + | 448270 | + | 101976 | + | 147132 |
| 32 | 45.18 | 6.5 | + | 436748 | + | 121688 | + | 134662 |
| 33 | 48.36 | 6.9 | + | 65313 | - | 0 | + | 98738 |
| 34 | 47.34 | 7.3 | + | 83600 | - | 0 | - | 0 |
| 35 | 49.16 | 7.6 | + | 176886 | + | 418717 | + | 149474 |
| 36 | 45.74 | 8.5 | + | 160101 | - | 0 | - | 0 |
| 37 | 43.02 | 6.7 | + | 258317 | + | 14812 | + | 198924 |
| 38 | 44.06 | 6.9 | + | 282145 | + | 127586 | - | 0 |
| 39 | 40.17 | 7.2 | + | 354900 | + | 100871 | + | 243107 |
| 40 | 36.75 | 7.1 | + | 299668 | + | 37527 | - | 0 |
| 41 | 36.98 | 6.5 | + | 253703 | + | 118609 | + | 156446 |
| 42 | 38.23 | 6.9 | + | 265112 | + | 99818 | + | 86426 |
| 43 | 34.65 | 7.5 | + | 132393 | + | 48478 | + | 54127 |
| 44 | 34.58 | 7.8 | + | 236593 | + | 45489 | + | 48377 |
| 45 | 33.84 | 9.1 | + | 371463 | + | 135719 | + | 398647 |

Nota: Presencia de proteína (+)

Ausencia de proteínas (-)

Los valores representan la intensidad de expresión medida en píxeles.

Los valores de PM (kDa) y los de pl se calcularon directamente en las imágenes de los proteomas.

El recuadro indica el punto con mayor intensidad bajo el tratamiento con alguno de los DBCMs, SOABZ ó RCB15.

d. Análisis comparativo de proteínas del grupo D.

En la figura 16 se comparan las proteínas incluidas en el grupo D bajo las tres condiciones experimentales. Según la intensidad medida de los puntos presentada en la tabla 4 las proteínas 46, 48, 49 y 50 tuvieron una intensidad mayor bajo el tratamiento con RCB15, mientras que la proteína 47 bajo el tratamiento con SOABZ (tabla 4).

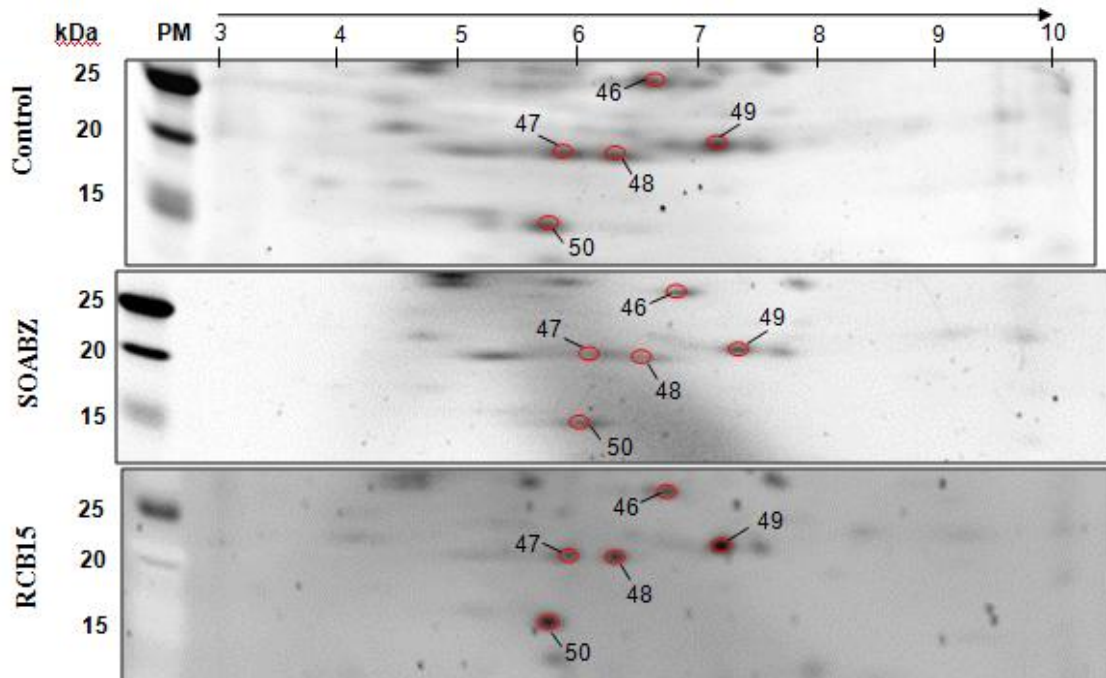


Figura 16. Proteínas en gels 2D del grupo D. En este grupo se seleccionaron cinco proteínas cuyos valores de PM se encuentran en el intervalo de 30 a 15 kDa y de 5 a 8 de pI. Las cinco proteínas (46, 47, 48, 49 y 50) fueron observadas bajo los dos tratamientos con los DBCMs, SOABZ y RCB15, y en el control. Los valores de intensidad de las cinco proteínas fue distinta entre los tres grupos de estudio (tabla 4).

Tabla 4. Proteínas del grupo D.

| Proteínas | PM (kDa) | pI (experimental) | control | Intensidad | SOABZ | Intensidad | RCB15 | Intensidad |
|-----------|----------|-------------------|---------|------------|-------|------------|-------|------------|
| 46 | 27.21 | 6.7 | + | 163856 | + | 95475 | + | 219968 |
| 47 | 20.61 | 6.1 | + | 165639 | + | 47359 | + | 141313 |
| 48 | 20.70 | 6.5 | + | 130747 | + | 62871 | + | 199378 |
| 49 | 21.40 | 7.2 | + | 360051 | + | 132145 | + | 463852 |
| 50 | 14.50 | 6.0 | + | 330735 | + | 63879 | + | 422617 |

Nota: Presencia de proteína (+)

Los valores representan la intensidad de expresión medida en pixeles.

Los valores de PM (kDa) y los de pI se calcularon directamente en las imágenes de los proteomas.

El recuadro indica los puntos con mayor intensidad bajo el tratamiento con SOABZ.

5.4 Comparación del efecto de los DBCMs en la expresión de proteínas.

Con la finalidad de tener una perspectiva más clara de los cambios en la expresión de las proteínas, se efectuaron análisis comparativos tanto de la presencia como de la intensidad de las 50 proteínas. Los resultados de cada

análisis se presentaron en diagramas de Venn (figuras 17 y 18). En estos análisis se encontró que hubo diferencias en la expresión de las proteínas bajo las tres condiciones experimentales. En la figura 17, relacionada con la presencia, no se observaron nueve proteínas (1-8, 13) bajo el tratamiento con SOABZ y sin tratamiento (control); siete (15, 16, 17 21, 29 30 y 33) bajo el tratamiento con SOABZ y cinco (22, 23, 28, 34 y 36) bajo ambos tratamientos con los DBCMs. Sólo bajo el tratamiento con RCB15 dos proteínas no se observaron (24 y 40).

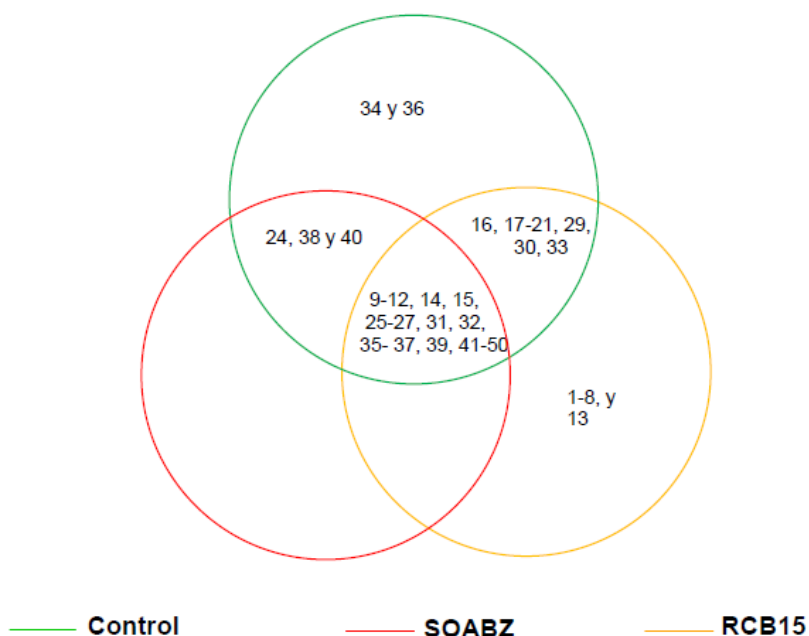


Figura 17. Comparación de proteínas observadas bajo los tratamientos con los DBCMs, y sin tratamiento. El diagrama de Venn se construyó con base en las proteínas observadas en las figuras 13-16. Los números corresponden a las proteínas numeradas en las figuras indicadas. Los colores de los círculos corresponden a los tratamientos empleados (línea verde = control; línea roja= cisticercos tratados con SOABZ y línea anaranjada= cisticercos tratados con RCB15). Se encontró que hay proteínas que no observaron bajo las tres condiciones experimentales: nueve proteínas (1-8, 13) bajo el tratamiento con SOABZ y sin tratamiento (control); siete (15, 16, 17 21, 29 30 y 33) bajo el tratamiento con SOABZ y cinco (22, 23, 28, 34 y 36) bajo ambos tratamientos con los DBCMs. Sólo bajo el tratamiento con RCB15 dos proteínas no se observaron (24 y 40).

En la figura 18, que corresponde a la intensidad de las proteínas bajo las tres condiciones experimentales, se observaron cambios en su expresión: catorce proteínas (9-12, 14, 31, 32, 37, 39, 41-44 y 47) en el grupo control; una bajo el tratamiento con SOABZ y seis bajo el tratamiento con RCB15 (15, 45, 46, 48-50).

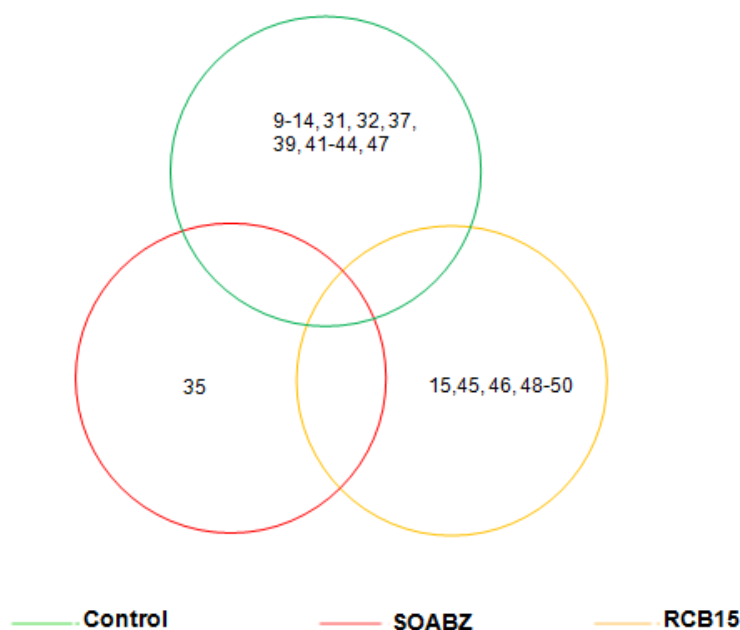


Figura 18. Comparación de la intensidad en la expresión de las proteínas en común, bajo las tres condiciones de estudio. El diagrama de Venn se construyó con base en las proteínas detectadas en las figuras 13-16, y la comparación de sus respectivos valores de intensidad enlistados en las tablas 2-4. Los números corresponden a las proteínas numeradas en las figuras indicadas y cuyas intensidades fueron mayores bajo el respectivo tratamiento. Los colores de los círculos corresponden a los tratamientos empleados (línea verde = control; línea roja= cisticercos tratados con SOABZ y línea anaranjada= cisticercos tratados con RCB15). Se detectaron proteínas con intensidades mayores bajo las tres condiciones en estudio: 14 en control (9-14, 31, 32, 37, 39, 41-44 y 47); 1 en SOABZ (35); y 6 en RCB15 (15, 45, 46, 48-50).

VI. DISCUSION.

Los estudios presentados aquí forman parte de lo que se ha realizado en nuestro grupo de investigación y junto con lo encontrado para otro derivado del BCM denominado RCB20, muestra que los DBCMs tienen un efecto en la morfología, la viabilidad y la variabilidad en la expresión de proteínas de los cisticercos (García-Vilchis 2007; Pérez-Reyes 2008; Márquez-Navarro et al. 2013). Sin embargo, en el presente trabajo de tesis, por primera vez, se determinó el efecto producen los DBCMs, SOABZ y el RCB15 en la expresión de proteínas observadas mediante geles obtenidos por electroforesis bidimensionales. Esta estrategia de estudio permitió evaluar, en un solo instante, el efecto del tratamiento *in vitro* de los parásitos con los DBCMs SOABZ y RCB15, lo cual es mejor a evaluar el efecto sobre una sola de las proteínas (Lau et al. 2003). Así mismo, con este tipo de estrategia fue posible determinar el número de proteínas involucradas en el efecto de los fármacos, y de esta forma en posteriores estudios se podrá establecer tanto los posibles blancos de acción, como el mecanismo de acción de estas sustancias (Chapal et al. 2004; He and Chiu 2003), como lo propuesto para la evaluación de fármacos cestocidas (Ambrosio 2007).

En cuanto al efecto en la morfología de los parásitos se encontró que el RCB15 fue más agresivo que el SOABZ (figura 6), y que dicho efecto se presentó más rápido, ya que hubo cambios en la forma de los parásitos desde el primer día de tratamiento. Aparentemente, los cisticercos fueron destruidos totalmente a partir del sexto día de tratamiento. Este efecto morfológico fue irreversible, a diferencia de lo obtenido con el SOABZ, lo cual corrobora lo demostrado

previamente en Pérez-Reyes 2008. Es posible que los cambios tan dramáticos en la morfología de los parásitos sea un reflejo de que ello ha generado una desorganización del citoesqueleto, lo cual ha llevado a la muerte de los cisticercos. Cabría la posibilidad de que el RCB15 altere de alguna forma tanto la fisiología como la bioquímica de los parásitos (Santivañez et al. 2010). Aunque en los estudios presentes no se hicieron ensayos de medición de viabilidad en los parásitos, en el laboratorio ya se evaluó previamente al medir la biotransformación del CMFDA por la maquinaria de detoxificación de los cisticercos tratados con los DBCMs, y se encontró que los parásitos ya habían muerto después del tratamiento (García-Vilchis 2007; Pérez-Reyes 2008).

Con estos antecedentes, se decidió evaluar el efecto de los DBCMs al nivel de la expresión de las proteínas de los parásitos tratados y, como se observó en el análisis electroforético unidimensional (figura 7), hay diferencias en el patrón de expresión de las proteínas frente a los tratamientos cuando se les compara con las proteínas del grupo control. Por otro lado, bajo el tratamiento con el SOABZ se detectó un posible aumento en la expresión de seis bandas, en el caso del RCB15 hubo disminución en la expresión de bandas semejantes. Aunque en la figura 7 parece que la cantidad de proteínas bajo el tratamiento con RCB15 es menor que la que aparece en el grupo control y bajo el tratamiento con SOABZ, el análisis densitométrico mostró que las bandas no se observaron. Con la finalidad de asegurar la baja en la expresión de las proteínas sería necesario llevar a cabo evaluaciones con concentraciones semejantes de proteínas tal y como se hizo para el tratamiento con el RCB20 (Márquez-Navarro et al. 2013). En estos estudios se indicó que el apagado en la expresión de las proteínas podría deberse

a una respuesta a estrés celular, lo cual produjo una disminución de la expresión de tubulinas tirosinadas (Márquez- Navarro et al. 2013).

Si el RCB15 es un derivado del BCM similar al RCB20, cabe la posibilidad de que algo semejante esté ocurriendo en la disminución de la expresión de las proteínas bajo el tratamiento con este compuesto. Una de las formas de corroborar esto, sería efectuar reconocimientos de las proteínas mediante anticuerpos como lo realizado previamente bajo el tratamiento con el RCB20 (Márquez-Navarro et al. 2013). Sin embargo, debido a las diferencias moleculares entre ambos compuestos químicos, cabría la posibilidad de que se encontraran otro tipo de proteínas en adición a las ya reportadas.

En los densitogramas de la figura 9 se encontró que varias bandas tienen diferencias en su expresión bajo las tres condiciones experimentales, y como resultado de su análisis se comprobó la presencia de las seis bandas bajo el tratamiento con SOABZ, y bajo el tratamiento con RCB15 las seis bandas no se observaron.

El aumento de la expresión de proteínas de los parásitos bajo el tratamiento con SOABZ podría atribuirse a que estas proteínas fueron inducidas bajo el tratamiento, y que pudieran estar relacionadas con los cambios morfológicos observados en estos parásitos, los cuales involucran daños en sus tejidos al nivel ultraestructural como pueden ser: las microvellosidades, el tegumento, el tejido subtegumentario y en las células flama (Palomares-Alonso et al. 2007; Palomares et al. 2006), así como también, a nivel de fibras musculares (Pérez- Reyes 2008). Una de las formas para identificar qué proteínas están involucradas en dicho efecto, podría ser la obtención de las bandas desde los geles de poliacrilamida y

su posterior su análisis por espectrometría de masas al utilizar la información contenida en el genoma de *T. solium* (Tsai et al. 2013). De la misma manera, en relación al RCB15. Al tomar como referencia las proteínas presentes en el grupo control, y a su vez tomando como base las figuras 7 y 9, se podría hacer la identificación de las seis bandas que no fueron observadas bajo el tratamiento con RCB15.

De acuerdo a los resultados expuestos en el diagrama de Venn (figura 17) la expresión de las proteínas cambió bajo las tres condiciones experimentales, lo cual debe estar relacionado directamente con la forma en la que estos parásitos intentan resistir a los distintos tratamientos. De tal forma, que tales proteínas podrían ser importantes, incluso, para la supervivencia de los parásitos (Santivañez et al 2010), por lo que su posterior identificación es de vital importancia para comprender mejor el mecanismo de acción de estos compuestos.

Con base en lo publicado recientemente, por el equipo de trabajo (Reynoso-Ducoing et al. 2014; Márquez-Navarro et al. 2013); se logró la identificación de varias proteínas del citoesqueleto de cisticercos de *T. crassiceps* que al compararlas con las proteínas observadas en el presente trabajo de tesis, se encontró que hay coincidencias en la expresión de varias de ellas. En la figura 19 se muestra el empalme realizado de los mapas proteómicos: uno publicado en Reynoso-Ducoing et al. 2014 y otro obtenido en el presente trabajo de tesis, en el cual se identificaron proteínas que podrían corresponder a las ya identificadas, y cuyas características se enlistan en la tabla 5.

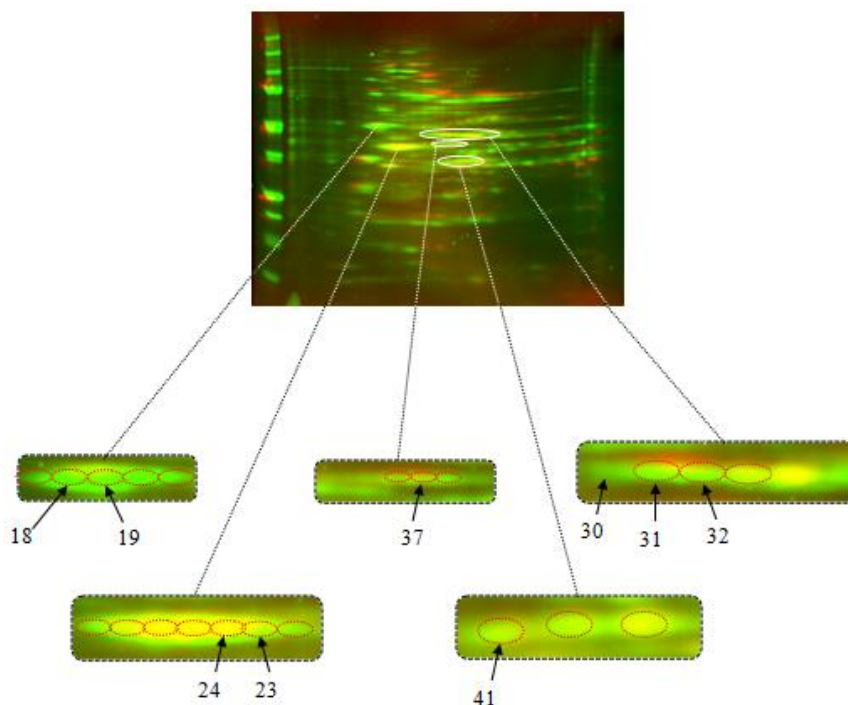


Figura 19. Empalme de mapas proteómicos obtenidos para proteínas de cisticercos de *T. crassiceps*.

Se comparan los mapas proteómicos obtenidos en el presente trabajo y que corresponde al grupo control (figura 9) con el publicado por Reynoso-Ducoing et al. 2014. Con la finalidad de generar una mejor comparación de los mapas, se les asignaron colores falsos mediante el programa PDQUEST (en verde se presenta al proteoma de los cisticercos control y en rojo al ya publicado). En la parte inferior se muestran las ampliaciones de aquellas proteínas que coincidieron en la comparación (color amarillo) y que son indicadas dentro de los círculos y con su número respectivo.

Tabla 5. Comparación de la expresión de proteínas previamente identificadas mediante MS y con anticuerpos (Reynoso-Ducoing et al. 2014).

| Punto | Proteína | PM/pl | Control | SOABZ | RCB15 | Función en el citoesqueleto |
|-------|---|-----------|---------|-------|-------|--------------------------------------|
| 9 | Glutación sintetasa | 78.56/6.2 | +++ | + | ++ | Ensamble de MTs |
| 18 | tubulina β | 53.50/4.7 | ND | ND | ND | Tráfico vesicular |
| 23 | Actina | 42.45/5.5 | +++ | - | - | Contracción muscular |
| 24 | Actina | 42.45/5.6 | ND | ND | - | Contracción muscular |
| 30 | Proteína hipotética | 50.62/6.4 | ++ | - | + | ND |
| 31 | Hidrolasa S- adenosil homocisteína | 50.62/6.6 | +++ | + | ++ | Metilación y fosforilación de actina |
| 32 | Enolasa | 50.62/6.7 | +++ | + | ++ | Interacción con MTs |
| 37 | Actina | 45.95/6.7 | +++ | + | ++ | Contracción muscular |
| 41 | Fructosa 1,6 bifosfatasa 1 | 37.39/6.6 | +++ | + | ++ | Une y agrupa a actina |
| 50 | Proteína citosólica que une ácidos grasos | 14.83/5.6 | ++ | + | +++ | ND |

Nota: Ausencia de proteína (-)
 Baja expresión de proteínas (+)
 Mediana expresión de proteínas (++)
 Alta expresión de proteínas (+++)
 No determinado (ND)

Cuando se comparan estas proteínas cabe la posibilidad de que se traten de proteínas tales como: proteínas del citoesqueleto (actina, tubulina), relacionadas con los mecanismos de detoxificación de xenobióticos (Glutación sintetasa) (Cvilink et al. 2009), asociadas a contracción muscular (actinas) y de tránsito intracelular (enolasa, glutación sintetasa, hidrolasas y tubulinas). Sin embargo, la ratificación de esto podría ser llevado a cabo mediante la identificación de proteínas por espectrometría de masas (Walther and Mann 2010; Baldwin 2004) o bien, con el uso de anticuerpos, en ensayos de inmunohistoquímica (Barret et al. 2005).

La diferencia observada en el efecto de los tratamientos aplicados podría tener relación con la naturaleza química de cada compuesto y que, aunque ambos son derivados del BCM, las diferencias en su estructura química podría tener una forma distinta de interacción con sus proteínas blanco. Por un lado, el SOABZ posee un grupo carbamato ($-\text{NHCO}_2\text{CH}_3$) en la posición R4 (figura 2), cuya eficacia ha demostrado ser lenta, además de ser prácticamente insoluble en agua (Dayan 2003), factor que influye en la biodisponibilidad del fármaco. Por otro lado, el RCB15 presenta un átomo de Cl en la posición R2 del anillo BCM (figura 4) y ello le confiere estabilidad a la molécula, así como disminuye la velocidad de su metabolismo (García-Vilchis 2007); además, el RCB15, posee un grupo triflorometil (CF_3) en la posición R4 del anillo BCM lo cual le confiere mayor solubilidad a la molécula, eleva su absorción, y por ende, su biodisponibilidad como lo descrito para el TCBZ (Buechel and Flucke 1972).

El hecho de que el efecto del RCB15 en los cisticercos sea mayor que el ejercido por el SOABZ, sugiere que las modificaciones generadas en el RCB15,

cuando se le compara con el SOABZ, producen un derivado BCM con una alta actividad antihelmíntica. Aunque se ha establecido que el principal modo de acción de este tipo de compuestos ocurre a través de su interacción con la β -tubulina (Lacey 1988; Pisano et al. 2000), las modificaciones mencionadas en el RCB15 pudieran cambiar su blanco proteico, o bien, que estén involucradas otras proteínas distintas a la tubulina.

VII. CONCLUSIONES.

Los efectos más importantes de los DBCMs evaluados se observaron al nivel de la morfología de los cisticercos, entre los que destacaron la pérdida de fluido vesicular y la disminución de tamaño. Sólo con el tratamiento con RCB15, los cisticercos se colapsaron totalmente desde el primer día de tratamiento y estos daños fueron más rápidos e irreversibles, comparados con el SOABZ.

Se encontró que la electroforesis, tanto en una como en dos dimensiones, demostró ser una herramienta eficiente para la evaluación del efecto en la expresión de proteínas de los cisticercos bajo su tratamiento con los DBCMs. En ambos análisis electroforéticos se encontró que hubo cambios en la expresión de proteínas comparadas con las de los parásitos del grupo control. Con el análisis electroforético en 2D se determinó la presencia de las proteínas, así como cambios en la intensidad de su expresión. Estos cambios se encontraron correlacionados con el tipo de tratamiento al que fueron sometidos los parásitos.

Aun cuando se identificaron cambios en la expresión de proteínas específicas bajo los tratamientos con los DBCMs, solamente para algunas de ellas se pudo hacer una aproximación en lo relativo a su identidad con base en lo publicado por el equipo de trabajo, sin embargo, es necesario continuar con la identificación del resto de las proteínas.

VIII. PERSPECTIVAS.

Con el presente trabajo de tesis y lo que se ha publicado al respecto, parece ser que el derivado del BCM, RCB15, es un compuesto con poder cestocida. Sin embargo, se necesitan continuar con los estudios en los que se valoren a otros cestodos para definir esta situación. Posiblemente con la idea de aproximarse al mecanismo de acción y a los blancos farmacológicos de este compuesto, se requiere ampliar la identificación de las proteínas. Esto podría llevarse a cabo principalmente por análisis de espectrometría de masas y la ratificación con el empleo de anticuerpos específicos. La identificación podría facilitarse debido a que en la actualidad se tiene información del genoma de *T. solium*, del cual los cisticercos de *T. crassiceps* se consideran como un modelo parasitario.

IX. ANEXOS.

a. Precipitación de proteínas.

- Adicionar en proporción 1:1 la solución 1 (ATC al 10% y 20 mM de DTT en acetona) y el extracto de proteínas dentro de tubos eppendorf.
- Sonicar por 10 segundos a una amplitud de 25 mA.
- Incubar a 4°C durante 2 hrs.
- Centrifugar a 10 000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
- Eliminar al máximo el sobrenadante con una pipeta de plástico.
- Adicionar 1mL de la solución 2 (20 mM de DTT en acetona) a cada tubo eppendorf.
- Agitar en vórtex y centrifugar a 10 000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
- Retirar el sobrenadante con una pipeta de plástico teniendo cuidado de no extraer proteína.
- Adicionar al precipitado 150 µL de SSBF suplementado con antibiótico-antimicótico (penicilina-G, estreptomina, anfotericina-B) marca GIBCO BRL.
- Guardar a 4°C hasta su uso.

b. Cuantificación de proteínas.

- A partir de la solución de ABS [10 mg/mL] (diluir 10 mg de ASB en 1 mL de SSBF) hacer las siguientes diluciones en tubos eppendorf y marcarlos de acuerdo a la concentración correspondiente:

| Solución ABS [10 mg/mL] (μ L) | SSBF (μ L) | Concentración (mg/mL) |
|--|--------------------|--------------------------|
| 0 | 200 | 0 |
| 10 | 190 | 0.5 |
| 20 | 180 | 1 |
| 40 | 160 | 2 |
| 60 | 140 | 3 |
| 100 | 100 | 5 |

- Adicionar por triplicado 5 μ L de cada dilución y depositarlos dentro de los pozos en una microplaca.
- Sonicar el precipitado de proteínas a cuantificar (3 veces durante 10 segundos a una amplitud de 25 % con intervalos de reposo de 1 minuto).
- Depositar alícuotas de SSBF en la microplaca, correspondientes a las diluciones calculadas previamente del extracto de proteínas a cuantificar.
- Depositar las alícuotas del precipitado de proteínas a cuantificar sobre las alícuotas de SSBF.
- Adicionar a cada pozo 25 μ L de solución alcalina de tartrato de cobre (reactivo A), y 200 μ L de reactivo de Folin diluido (proporcionado por el fabricante).
- Agitar suavemente la placa para que se mezclen perfectamente las soluciones.
- Eliminar las burbujas con la punta de una pipeta.
- Esperar un par de minutos y leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 750 nm.
- Hacer los cálculos correspondientes para obtener la curva y la cantidad de proteína por pozo.

c. Preparación de los derivados bencimidazólicos para su evaluación *in vitro*.

- Procesar cada derivado bencimidazólico por separado para evitar contaminación cruzada.
- Pesar 1 mg de cada compuesto y diluir cada uno en 1 mL de solución disolvente (DMSO al 50% y etanol al 30 % en agua MilliQ).
- Depositar dentro de un matraz aforado 1 mg de compuesto y 0.5 mL de solución disolvente.
- Agitar en vórtex hasta que el compuesto esté totalmente disuelto.
- Aforar a 1 mL con solución disolvente.
- Tapar y etiquetar el matraz con el nombre del compuesto y concentración [1 mg/1 mL].
- Hacer lo mismo con el resto de los compuestos.
- Filtrar los compuestos con filtros de 0.22 µm dentro de una campana de flujo laminar para evitar contaminantes.
- Etiquetar y guardar en tubos de ensayo de 15 mL estériles a -20°C hasta su uso.

Cálculos para preparar el medio de cultivo con los DBCMs:

- **Convertir 6.2 µM de SOABZ a µg/mL:**

PM: 281.33 g

$$(6.2 \times 10^{-6} \text{ mol/L})(1 \text{ L}/1000 \text{ mL})(281.33 \text{ g}/1 \text{ mol})(1000 \text{ mg}/1 \text{ g})(1000 \text{ µg}/1 \text{ mg})=$$

1.74 µg/mL

- Calcular el volumen necesario para obtener medio de cultivo con SOABZ a una concentración final de 6.2 µM:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$(1000 \text{ µg/mL})(x)=(1.74 \text{ µg/mL})(60 \text{ mL})$$

$$x=0.1044 \text{ mL}$$

x=104.4 µL de SOABZ

- **Convertir 6.2 µM de RCB15 a µg/mL:**

PM: 381.56 g

$$(6.2 \times 10^{-6} \text{ mol/L})(1 \text{ L}/1000 \text{ mL})(381.56 \text{ g}/1 \text{ mol})(1000 \text{ mg}/1 \text{ g})(1000 \text{ µg}/1 \text{ mg})=$$

2.36 µg/mL

- Calcular el volumen necesario para obtener medio de cultivo con RCB15 a una concentración final de 6.2 μM :

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$(1\ 000\ \mu\text{g}/\text{mL})(x)=(2.36\ \mu\text{g}/\text{mL})(60\ \text{mL})$$

$$x= 0.1416\ \text{mL}$$

$$\mathbf{x=141.6\ \mu\text{L de RCB15}}$$

d. Preparación del medio de cultivo.

- Disolver dentro de una probeta de 1 L un sobre de RPMI Medium 1640 en 750 mL de agua MilliQ.
- Adicionar poco a poco 2.2 g de Bicarbonato de sodio y disolver totalmente.
- Aforar la solución a 1 L con agua MilliQ.
- Ajustar el pH a 7.
- Filtrar el medio de cultivo con filtro de 0.22 μm estéril dentro de una campana de flujo laminar previamente lavada y desinfectada.
- Etiquetar y sellar con parafilm los frascos de vidrio.
- Guardar a 4°C hasta su uso.
- Adicionar antibiótico-antimicótico al 10 % justo antes de usar.

X. REFERENCIAS.

- Aguayo-Ortiz R, Méndez-Lucio O, Romo-Mancillas A, Castillo R, Yépez-Mulia L, Medina-Franco JL, Hernández-Campos A (2013) Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel β -tubulin binding site model. *J Mol Graph Model* 45:26-37.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P (2002) *Molecular biology of the cell*. 4^a edición. Garland Science. USA.
- Ambrosio JR (2007) Cytoskeletal proteins of parasites as therapeutic agents. En: Terrazas LI (ed) *Advances in the immunobiology of parasitic diseases*. pp 73-90.
- Ambrosio JR, Ostoa-Saloma P, Palacios-Arreola MI, Ruíz-Rosado A, Sánchez-Orellana PL, Reynoso-Ducoing O, Nava-Castro KE, Martínez-Velázquez N, Escobedo G, Ibarra-Coronado EG, Valverde-Islas L, Morales-Montor J. (2014) Oestradiol and progesterone differentially alter cytoskeletal protein expression and flame cell morphology in *Taenia crassiceps*. *Int J Parasitol* 44(10):687-696.
- Baldwin MA (2004) Protein identification by mass spectrometry: issues to be considered. *Mol Cell Proteomics* 3(1):1-9.
- Barrett J, Brophy PM and Hamilton JV (2005) Analysing proteomic data. *Int J Parasitol* 35(5):543-553.
- Bennett JL, Köhler P (1987) *Fasciola hepática*: action *in vitro* of triclabendazole on immature and adult stages. *Exp Parasitol* 63(1):49-57.
- Boray JC (1986) Trematode infections of domestic animals. En: *Chemotherapy of Parasitic diseases*. pp 401-425.
- Buechel KH and Fluke W (1972) Anthelmintic 4, 5, 6, 7-tetrachloro-2-(trifluorometil) benzimidazole. *Chem Abs*: 76-116.
- Chapal N, Molina L, Molina F, Laplanche M, Pau B, Petit P (2004) Pharmacoproteomic approach to the study of drug mode of action, toxicity, and resistance: applications in diabetes and cancer. *Fundam Clin Pharmacol* 18(4):413-22.
- Cvilink V, Lamka J, Skalová L (2009) Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug Metab Rev* 41(1):8-26.
- Dayan AD (2003) Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Trop* 86(2-3):141-159.
- Del Brutto OH (2013) Human cysticercosis (*Taenia solium*). *Trop Parasitol* 3(2):100-103.
- Del Brutto OH, Lama J (2013) The importance of neurocysticercosis in stroke in rural areas of a developing Latin American country. *Am J Trop Med Hyg* 89(2):374-375.
- Fairlamb AH, Ridley RG and Vial HJ (2003) Discovery and drug development for tropical diseases: new opportunities, new trends. *Drugs against parasitic diseases: R&D methodologies and issues*. En WHO. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) 5-7.

- García-Vilchis D 2007. Determinación del Potencial antihelmíntico de derivados del BZM en cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM.
- González AE, López-Urbina T, Tsang B, Gavidia C, Garcia HH, Silva ME, Ramos DD, Manzanedo R, Sanchez-Hidalgo L, Gilman RH, Tsang VC (2006) Transmission dynamics of *Taenia solium* and potential for pig-to-pig transmission. *Parasitol Int* 55:131-135.
- González-Malerva L y Hernández-Ambrosio J (2003) El citoesqueleto. Una mirada al interior de las células. *Ciencias* 70:68-75.
- Gottschal DW, Theodorides VJ, and Wang R (1990) The metabolism of benzimidazole anthelmintics. *Parasitol Today* 6(4):115-124.
- He QY, Chiu JF (2003) Proteomics in biomarker discovery and drug development. *J Cell Biochem* 89(5):868-886.
- Heldwein K, Biedermann HG, Hamperl WD, Bretzel G, Löscher T, Laregina D, Frosch M, Büttner DW, Tappe D (2006) Subcutaneous *Taenia crassiceps* infection in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Trop Med Hyg* 75(1):108-111.
- Hotez PJ, Bethony J, Bottazzi ME, Brooker S, Diemert D, Loukas A (2006) New technologies for the control of human hookworm infection. *Trends Parasitol* 22(7): 327-331.
- Huang CM (2004) Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch Oral Biol* 49(12):951-962.
- Karp G 2011. *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos*. 6ª edición. McGrawHill. México.
- Lacey E (1988) The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol* 18(7):885-936.
- Lacey E (1990) Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol Today* 6(4):112-115.
- Lau AT, He QY, Chiu JF (2003) Proteomic technology and its biomedical applications. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao* 35(11):965-975.
- López-González R. (2001) Síntesis del 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-2-trifluorometil-1H-benzimidazol, análogo del triclabendazol, con potencial actividad antihelmíntica. Tesis de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Química, UNAM.
- Mann M and Jensen ON (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* 21(3):255-261.
- Márquez-Navarro A, Pérez-Reyes A, Zepeda-Rodríguez A, Reynoso-Ducoing O, Hernández-Campos A, Hernández-Luis F, Castillo R, Yépez-Mulia L, Ambrosio JR (2013) RCB20, an experimental benzimidazole derivate, affects tubulin expression and induces gross anatomical changes in *Taenia crassiceps* cysticerci. *Parasitol Res* 112(6):2215-2226.
- McKellar QA, Jackson F (2004) Veterinary anthelmintics: old and new. *Trends Parasitol* 20(10):456-461.

- Nogales E (2000) Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 69:277-302.
- Palomares F, Palencia G, Ambrosio JR, Ortiz A, Jung-Cook H (2006) Evaluation of the efficacy of albendazole sulphoxide and praziquantel in combination on *Taenia crassiceps* cysts: *in vitro* studies. *J Antimicrob Chemother* 57(3):482-488.
- Palomares F, Palencia G, Pérez R, González-Esquivel D, Castro N, Cook HJ (2004) *In vitro* effects of albendazole sulfoxide and praziquantel against *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysts. *Antimicrob Agents Chemother* 48(6):2302-2304.
- Palomares-Alonso F, Piliado JC, Palencia G, Ortiz-Plata A, Jung-Cook H (2007) Efficacy of nitazoxanide, tizoxanide and tizoxanide/albendazole sulphoxide combination against *Taenia crassiceps* cysts. *J Antimicrob Chemother* 59(2):212-218.
- Pandey A, Mann M (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405(6788):837-846.
- Pérez-Reyes A 2008. Efecto de derivados del bencimidazol en la morfología y en la expresión de proteínas del citoesqueleto de cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF. Tesis de Licenciatura en Química. Facultad de Química, UNAM.
- Pisano C, Battistoni A, Antoccia A, Degrassi F, Tanzarella C (2000) Changes in microtubule organization after exposure to a benzimidazole derivative in Chinese hamster cells. *Mutagenesis* 15(6):507-515.
- Quiroz H, Ibarra F, Vera Y (1988) Eficacia del triclabendazol contra formas inmaduras de *Fasciola hepática* y la ganancia de peso en bovinos. *Veterinaria México* 19(1):29-33.
- Reynoso-Ducoing O, Valverde-Islas L, Paredes-Salomon C, Pérez-Reyes A, Landa A, Robert L, Mendoza G, Ambrosio JR (2014) Analysis of the expression of cytoskeletal proteins of *Taenia crassiceps* ORF strain cysticerci (Cestoda). *Parasitol Res* 113(5):1955-69.
- San Miguel-Hernández A, Martín-Gil F y Armentia-Medina A (2009) Metodología y aplicaciones en proteómica clínica. *Diál Transp.* 30(4):139-143.
- Santivañez SJ, Hernández-González A, Chile N, Oleaga A, Arana Y, Palma S, Verastegui M, González AE, Gilman R, Garcia HH, Siles-Lucas M (2010) Proteomic study of activated *Taenia solium* oncospheres. *Mol Biochem Parasitol* 171(1):32-39.
- Sciutto E, Frago G, Larralde C (2011) *Taenia crassiceps* as a model for *Taenia solium* and the S3Pvac vaccine. *Parasite Immunol* 33(1):79-80.
- Sotelo J (2011) Clinical manifestations, diagnosis and treatment of neurocysticercosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 11(6):529-535.
- Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garciarribio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, Tracey A, Bobes RJ, Frago G, Sciutto E, Aslett M, Beasley H, Bennett HM, Cai J, Camicia F, Clark R, Cucher M, De Silva N, Day TA, Deplazes P, Estrada K, Fernández C, Holland PW, Hou J, Hu S, Huckvale T, Hung SS, Kamenetzky L, Keane JA, Kiss F, Koziol U, Lambert O, Liu K, Luo X, Luo Y, Macchiaroli N, Nichol S, Paps J, Parkinson J, Pouchkina-Stantcheva N, Riddiford N, Rosenzvit M,

Salinas G, Wasmuth JD, Zamanian M, Zheng Y, Taenia solium Genome Consortium, Cai X, Soberón X, Olson PD, Lacleste JP, Brehm K, Berriman M (2013) The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 496(7443):57-63.

- Valverde-Islas LE, Arrangoiz E, Vega E, Robert L, Villanueva R, Reynoso-Ducoing O, Willms K, Zepeda-Rodríguez A, Fortoul TI, Ambrosio JR (2011) Visualization and 3D reconstruction of flame cells of *Taenia solium* (cestoda). *PLoS One* 6(3):e14754.
- Walther TC and Mann M (2010) Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol* 190(4):491-500.
- Westermann and Weber (2003) Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(12):938-947.
- Willms K and Zurabian R (2010) *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. *Parasitology* 137(3):335-346.
- Willms K, Vargas-Parada L, Lacleste J (2006) Biología del parásito. En: Larralde C y S. de Aluja A (Coords.). *Cisticercosis. Guía para profesionales de la salud*. Instituto Nacional de Salud Pública. pp19-40.
- Witzmann FA and Grant RA (2003) Pharmacoproteomics in drug development. *Pharmacogenomics J* 3(2):69-76.