

Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México, México.
ISSN 2707-2207 / ISSN 2707-2215 (en línea), mayo-junio 2025,
Volumen 9, Número 3.

https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v9i1

POTENCIAL ANTIPARASITARIO DE LA BICUCULINA EN TROFOZOÍTOS DE GIARDIA LAMBLIA EN UN CULTIVO IN VITRO

**ANTIPARASITIC POTENTIAL OF BICUCULLINE AGAINST
GIARDIA LAMBLIA TROPHOZOITES IN VITRO CULTURE**

Francisco Javier Munguía-Huizar
Universidad de Guadalajara, México

Araceli Castillo-Romero
Universidad de Guadalajara, México

Daniel Osmar Suárez-Rico
Universidad de Guadalajara, México

Armando Perez-Rangel
Instituto Politécnico Nacional, México

Jose Manuel Hernández-Hernández
Instituto Politécnico Nacional, México

DOI: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v9i3.18878

Potencial Antiparasitario de la Bicuculina en Trofozoítos de *Giardia Lamblia* en un Cultivo in Vitro

Francisco Javier Munguía-Huizar¹

francisco.munguia.huizar@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0003-3402-6997>

Departamento de Microbiología y Patología
Universidad de Guadalajara
Guadalajara, Jalisco, México

Araceli Castillo-Romero

araceli.castillo@academicos.udg.mx

<https://orcid.org/0000-0002-4461-7673>

Departamento de Microbiología y Patología
Universidad de Guadalajara
Guadalajara, Jalisco, México

Daniel Osmar Suárez-Rico

dosuarezr94@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-9237-213X>

Departamento de Fisiología, Guadalajara
Jalisco, México

División de Medicina Molecular, Centro de
Investigación Biomédica de Occidente (CIBO),
Universidad de Guadalajara
Guadalajara, Jalisco, Mexico

Armando Perez-Rangel

rangelarm@yahoo.com

<https://orcid.org/0009-0009-8573-9181>

Departamento de Biología Celular
Centro de Investigación y Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional
Ciudad de México, México

Jose Manuel Hernández-Hernández

manuel.hernandez@cinvestav.mx

<https://orcid.org/0000-0001-9422-2437>

Departamento de Biología Celular
Centro de Investigación y Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional
Ciudad de México, México

RESUMEN

Giardia lamblia es un protozoo que causa giardiasis, una parasitosis prevalente a nivel mundial. El tratamiento se ha complicado por la aparición de cepas resistentes y efectos secundarios, lo que ha impulsado la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas. Recientemente, mediante ensayos *in silico* se identificó al antagonista del receptor GABA-A bicuculina como candidato contra este parásito. Es por ello que el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad biológica de la bicuculina en trofozoítos de *G. lamblia* de tal manera que en un futuro se pueda contar con nuevas alternativas de tratamiento contra esta parasitosis. Trofozoítos de *G. lamblia* se crecieron en presencia de 0, 50, 100 y 200 μM de bicuculina durante 24, 48 y 72 horas. Los resultados obtenidos demostraron que bicuculina inhibe el crecimiento y la adhesión de los trofozoítos, lo que sugiere daño en el disco ventral. Por microscopía de campo claro y fluorescencia se observaron alteraciones morfológicas y cambios en la distribución de tubulina, especialmente en cuerpo medio, disco ventral y flagelos.

Palabras clave: giardia lamblia, bicuculina, reposicionamiento de fármacos, tubulina

¹ Autor principal

² Correspondencia principal: araceli.castillo@academicos.udg.mx.

Antiparasitic Potential of Bicuculline Against *Giardia Lamblia* Trophozoites in Vitro Culture

ABSTRACT

Giardia lamblia is a protozoan that causes giardiasis, a widespread parasitic disease. Treatment has become increasingly challenging due to the emergence of resistant strains and adverse side effects, driving the search for new therapeutic alternatives. Recently, in silico assays identified the GABA receptor antagonist bicuculline as a potential candidate against this parasite. Therefore, the objective of this study was to evaluate the biological activity of bicuculline on *G. lamblia* trophozoites, to contribute to the development of new treatments for giardiasis. *G. lamblia* trophozoites were cultured in the presence of 0, 50, 100, and 200 μM bicuculline for 24, 48, and 72 hours. The results indicated that bicuculline inhibits trophozoite growth and adhesion, suggesting damage to the ventral disc. Bright-field and fluorescence microscopy revealed morphological alterations and changes in tubulin distribution, particularly in the median body, ventral disc, and flagella.

Keywords: giardia lamblia, bicuculin, drug repurposing, tubulin

Artículo recibido 09 junio 2025
Aceptado para publicación: 13 julio 2025



INTRODUCCIÓN

La giardiasis es una parasitosis altamente infecciosa y difícil de erradicar producida por el protozoo flagelado *Giardia lamblia*. En la mayoría de los casos cursa de manera asintomática, las infecciones sintomáticas típicamente incluyen cólicos estomacales, distensión abdominal, náuseas y diarrea grasa (Lalle & Hanevik, 2018; Leung et al., 2019). Si bien, la mayoría de los pacientes se recupera por completo otros pueden experimentar síntomas persistentes o recurrentes, a corto y largo plazo, tales como el síndrome del intestino irritable, malabsorción y deficiencias nutricionales, función cognitiva deficiente, artritis reactiva asociada con una respuesta inmunológica exacerbada, entre otros (Halliez & Buret, 2013; Painter et al., 2017). El tratamiento actual de la giardiasis involucra derivados del 5-nitroimidazol, así como algunos benzimidazoles, todos ellos con perfiles de eficacia y efectos secundarios variables, que pueden incluir desde malestias gastrointestinales hasta efectos neurotóxicos y daño hepático (Chen et al., 2023; Hernández Ceruelos et al., 2019; Piloiu & Dumitrascu, 2021; Vivancos et al., 2018; Watkins & Eckmann, 2014). Aunado a lo anterior, la resistencia adquirida y el aumento en fallos terapéuticos han propiciado una demanda creciente de nuevos compuestos anti-giardiasicos (Ansell et al., 2015; Argüello-García et al., 2020; Leitsch, 2015). En este contexto, el reposicionamiento de fármacos, que implica encontrar nuevos usos a medicamentos ya aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés Food and Drug Administration), se perfila como un enfoque clave en el desarrollo de nuevos tratamientos. Este enfoque ofrece la ventaja de contar con compuestos con perfiles de seguridad conocidos y resultados más rápidos. Ejemplos recientes incluyen a la terfenadina; originalmente desarrollada para tratar alergias, y el ácido acetilsalicílico; ampliamente utilizado para el manejo del dolor y la inflamación, que han mostrado actividad contra los trofozoítos de *Giardia*, pero que aún no se usan en la clínica para tratar esta enfermedad (Ochoa-Maganda et al., 2020; Suárez-Rico et al., 2023). Otro ejemplo es la auranofina, un antirreumático que si bien ha mostrado ser eficaz contra el cáncer y enfermedades infecciosas, incluida la giardiasis, su mecanismo de acción sigue siendo investigado (Mertens et al., 2023; Tejman-Yarden et al., 2013). Recientemente, Palomo-Ligas y colaboradores (2019), identificaron a la proteína hipotética XP_001709490 de *G. lamblia* (disponible en GiardiaDB.org), como canal putativo de potasio (GiK).



Ensayos de acoplamiento molecular permitieron identificar 39 fármacos afines al dominio de poro de GiK, entre éstos se encontró a bicuculina (Palomo-Ligas et al., 2019), la cual es conocida por su acción antagonista sobre los receptores GABA (ácido gamma amino butírico); influye en el funcionamiento de los canales de potasio, específicamente en canales de potasio activados por calcio de pequeña conductancia (SK, por sus siglas en inglés “small conductance calcium-activated potassium channels”), los cuales son responsables de la hiperpolarización después del potencial de acción en células excitables (Johnston, 2013). En este trabajo evaluamos la actividad anti-giardiasica de bicuculina en un cultivo axenico *in vitro*, nuestros hallazgos muestran que este fármaco inhibe el crecimiento y la adhesión de los trofozoítos, provoca daños morfológicos y cambios en la distribución de alfa tubulina.

METODOLOGÍA

Cultivo y mantenimiento

El cultivo y mantenimiento de los trofozoítos de *G. lamblia* (WB C6) se realizó a 37 °C en tubos de borosilicato con medio de crecimiento (TYI-S-33 a pH 7.0), suplementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco®, 16000-044) y antibiótico penicilina/estreptomicina al 1% (Sigma-Aldrich P4333) (Keister, 1983). El cultivo se conservó realizando subcultivos dos veces por semana, incubando los tubos en agua-hielo por 30 min para facilitar el desprendimiento de los trofozoítos, que luego se transfirieron (0.5×10^5 trofozoítos/mL) a un tubo con medio nuevo y se incubaron a 37 °C para su crecimiento. Todos los experimentos se realizaron utilizando cultivos en fase exponencial de crecimiento (70-80% de confluencia). El recuento celular se realizó en cámara de Neubauer.

Determinación del efecto de bicuculina en el crecimiento trofozoítos de *Giardia lamblia*

▪ Ensayo de inhibición de crecimiento

Para evaluar el efecto de bicuculina en el crecimiento de *G. lamblia*, 10,000 trofozoítos/mL se crecieron por 24, 48 y 72 h en presencia de 0, 50, 100 y 200 µM de bicuculina (Sigma-Aldrich, #14340). Como control negativo se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, #D8418) al 0.2%, diluyente de bicuculina y como control positivo se utilizó metronidazol (MTZ; 2 µM, Otrozol-PiSA), medicamento de primera elección contra la giardiasis. Al término de cada tiempo, los trofozoítos se incubaron en agua-hielo por 20 min, para despegar las células adheridas al tubo, y el número de trofozoítos se determinó en cámara de Neubauer.



Los resultados obtenidos se graficaron para comparar el crecimiento a cada tiempo y concentración de fármaco. El porcentaje de inhibición en el crecimiento del parásito se calculó en relación con el control negativo, el cual se definió como el 100% de crecimiento. Se realizaron 3 ensayos independientes, cada ensayo se realizó por triplicado, los resultados obtenidos se presentan como el promedio \pm la desviación estándar. Los datos se analizaron utilizando ANOVA de dos vías (GraphPad Prism versión 6.01 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA). Valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

▪ **Ensayo de viabilidad**

Para evaluar la viabilidad de los trofozoítos de *G. lamblia* después del tratamiento con bicuculina, se utilizó el método de tinción por exclusión de azul de tripano. 10 μ L de los cultivos se mezclaron con 10 μ L del colorante azul de tripano al 0.4% (Gibco BRL #15250-061), se contaron 100 células, incluyendo aquellas que no estaban teñidas. La viabilidad se expresó como el porcentaje de células viables en relación con el total de células tratadas con el diluyente (DMSO 0.2%).

▪ **Ensayo de adherencia**

Para determinar el efecto de bicuculina sobre la capacidad de adhesión de los trofozoítos a las paredes del tubo de borosilicato, se cultivaron 10,000 trofozoítos/mL en medio de crecimiento, conteniendo 100 y 200 μ M de bicuculina, por 24 y 48 h. Al término de cada período de incubación, se retiró el medio que contenía a los trofozoítos que no se adhirieron a la superficie de los tubos. Los tubos se rellenaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) fría y se incubaron en baño de agua-hielo por 30 min. El efecto sobre la adherencia se expresó como porcentaje de trofozoítos no adheridos en relación con el número total de células, los resultados obtenidos se compararon con cultivos control tratados con DMSO (0.2%). El conteo de las células se realizó en cámara de Neubauer.

▪ **Microscopía de campo claro**

Para identificar las posibles alteraciones morfológicas en los trofozoítos de *G. lamblia* por efecto de la bicuculina, parásitos expuestos a DMSO, 0, 100 y 200 μ M de bicuculina durante 48 h se colectaron por centrifugación por 10 min a 2500 rpm y se permitió su adherencia en cubreobjetos previamente recubiertos con polietilenimina al 0.1% a 37 °C durante 30 min, los parásitos adheridos se fijaron con metanol a -20 °C por 10 min y se lavaron con agua por 1 min.



El montaje de las células en portaobjetos se realizó utilizando Gelvatol como medio de montaje. Los portaobjetos se mantuvieron a temperatura ambiente (TA) por 24 h y se conservaron a -20 °C hasta su análisis. Las muestras se observaron en el microscopio Nikon eclipse TS2.

Efecto de bicuculina en la localización y expresión de la proteína tubulina en *G. lamblia*

▪ Inmunofluorescencia

Para determinar cambios en la localización del citoesqueleto de tubulina, muestras de trofozoítos expuestos por 48 h a DMSO, 0, 100 y 200 μ M de bicuculina se adhirieron a cubreobjetos previamente tratados con polietilenimina al 0.1%, a 37 °C durante 30 min. Los parásitos adheridos se fijaron con metanol a -20 °C por 10 min y se lavaron con PBS 1X. Posteriormente, se permeabilizaron con una solución de Tritón X-100 al 0.05% y SDS al 0.05% en PBS 1X por 10 min, se lavaron 3 veces con PBS 1X y se incubaron por 1 h con albumina de suero bovino (ASB, SIGMA, #A7030) al 0.1% en PBS, para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo. Los cubreobjetos se lavaron y se incubaron por 1 h a TA con el anticuerpo primario anti- α -tubulina hecho en ratón (1:500, Invitrogen, #13-8000), seguidamente se lavaron 3 veces con PBS 1X y se incubaron por 1 h a TA con el anticuerpo secundario IgG de ratón acoplado a FITC (1:150, Invitrogen, #31569). Finalmente, las preparaciones se lavaron 8 veces con PBS 1X con incubación de 10 min cada uno. El montaje se realizó con vecta-shield/DAPI (Zymed, Life Technologies, invitrogen, #P36931), las muestras se analizaron en el microscopio Nikon eclipse TS2, las imágenes se procesaron con el software NIS-Element (Nikon).

▪ Preparación de los extractos celulares

A partir de cultivos expuestos a 0, 100 y 200 μ M de bicuculina y DMSO por 48 h se obtuvieron extractos totales. Brevemente, previo enfriamiento de los cultivos, los parásitos se recolectaron por centrifugación a 2500 rpm por 10 min a 4 °C, los botones celulares se resuspendieron en PBS 1X, suplementado con inhibidores de proteasas (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche #11836153001), ortovanadato de sodio 1mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM. El rompimiento celular se realizó mediante sonicación a 130 W y una frecuencia de 20 kHz, con un voltaje de 3.0 V. Se aplicaron 7 ciclos de sonicación de 10 segundos cada uno, con un periodo de descanso de 10 segundos entre ciclos. Los homogenizados se centrifugaron a 2500 rpm y 4 °C para eliminar restos celulares. Los sobrenadantes se conservaron a -20 °C hasta su uso.



La cuantificación de proteínas se realizó por ensayo de micro-Bradford (Quick Start Bradford 1x Dye Reagent, Bio Rad, #5000205), las mediciones de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 595 nm.

▪ **SDS-PAGE y Western blot**

Primeramente, se determinó el efecto de la bicuculina en el patrón electroforético, para esto, los extractos celulares (20 µg) se separaron en geles de SDS-poliacrilamida al 10%, en una cámara electroforética Mini PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad). Las muestras se prepararon en condiciones reductoras con el buffer 2x Laemmli Sample (Bio-Rad #161-0737) complementado con 2-mercaptoetanol al 5 % y se calentaron a 100°C por 5 min. La separación electroforética de las proteínas se realizó a un voltaje constante de 100 V por 2 h. posteriormente, las proteínas se visualizaron por tinción con azul de coomassie y analizadas con el software Image Studio Digits versión 5.2. Para determinar el efecto de bicuculina en la expresión de tubulina, las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) a 350 mA durante 90 min. La membrana se incubó por 1 h a TA con buffer de bloqueo 1X (Pierce, #37575) en PBS complementado con Tween-20 al 0.05% (PBS-T), para evitar uniones inespecíficas. Se realizó un lavado con PBS-T y se incubó por 2 h con el anticuerpo primario anti- α -tubulina hecho en ratón (1:500, Invitrogen 13-8000). Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS-T y se incubó por 1 h con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón hecho en cabra, acoplado a la peroxidasa de rábano (1:20000, Pierce, Thermo Scientific #31437). Finalmente, la unión antígeno-anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia (Western ECL, Bio-Rad #170-5060) y la señal se capturó empleando el sistema C-Digit. Para el análisis de la imagen se utilizó el Software Image Studio Digits versión 5.2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

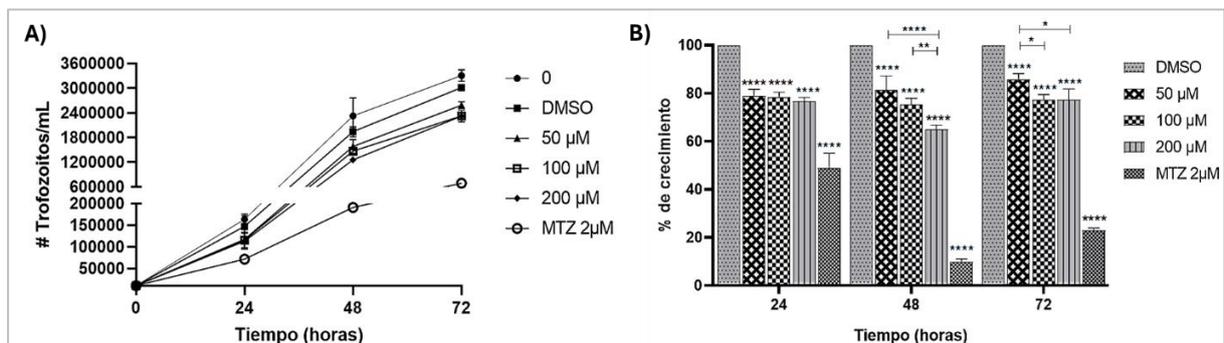
Bicuculina inhibe el crecimiento y la supervivencia de los trofozoítos de *Giardia lamblia*

El tratamiento de los trofozoítos de *G. lamblia* con 0, DMSO, 50, 100 y 200 µM de bicuculina muestra una inhibición en el crecimiento dosis-dependiente desde las 24 h de iniciado el ensayo (Fig. 1A). Con 200µM de bicuculina se observa el efecto máximo a las 48 h (38% de inhibición) y una disminución de éste a las 72h (22% de inhibición), en comparación con los controles negativos (Fig. 1B).



El metronidazol, por otro lado, resulto ser más activo, con una inhibición del 90% y 80% a las 48 y 72h, respectivamente. Las células sin tratamiento y tratadas con DMSO no mostraron diferencia significativa en su crecimiento. Los resultados de viabilidad mostraron que las células tratadas con bicuculina que sobreviven no se tiñen con azul tripano (dato no mostrado), lo que sugiere el mecanismo de acción de la bicuculina no está relacionado con el daño a la membrana plasmática. En el caso de *G. lamblia*, la función de los canales de potasio aún no se comprende completamente; sin embargo, se propone que pudieran estar involucrados en procesos de homeostasis iónica y mantenimiento del potencial de membrana (Palomo et al., 2019). Estudios previos en otros protozoarios, como *Plasmodium falciparum*, han demostrado que bloqueadores de canales de potasio, como el metioduro de bicuculina (una sal cuaternaria), pueden interferir en funciones esenciales del parásito, tales como la regulación osmótica y la señalización celular, lo que eventualmente conduce a su muerte (Waller et al., 2008). Es posible que un mecanismo similar esté implicado en la actividad anti-giardiasica de bicuculina, se necesita más investigación para confirmar lo anterior.

Figura 1. Efecto de anti-giardiasico de bicuculina.



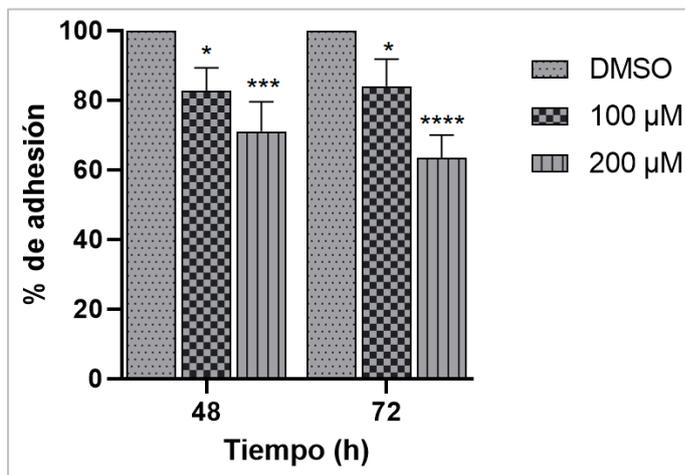
A) Trofozoitos cultivados en presencia de bicuculina, DMSO (0.2%) el diluyente de la droga y metronidazol (MTZ) se usaron como control negativo y positivo, respectivamente. B) Porcentaje de crecimiento de *G. lamblia* en respuesta al tratamiento con bicuculina en comparación con el control DMSO. Los datos corresponden al valor medio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$.

Bicuculina afecta la capacidad de adhesión en trofozoitos de *Giardia lamblia*.

La adhesión de los trofozoitos a las paredes del intestino delgado es un paso fundamental para la infección y multiplicación de *G. lamblia*. Este proceso es mediado principalmente por el disco ventral, una estructura especializada que permite la interacción mecánica directa con los enterocitos del huésped (Nosala et al., 2023; Hagen et al., 2023).

En este estudio, se evaluó el efecto de la bicuculina sobre la capacidad de adhesión de los trofozoítos, utilizando como modelo *in vitro* la adherencia a la superficie de tubos de borosilicato. Los resultados mostraron que la bicuculina disminuyó significativamente la adhesión de los trofozoítos de manera dependiente de la concentración. Con 200 μM de bicuculina, solo el 65 % de la población permanecía adherida a las 48 h, y esta proporción se redujo ligeramente a un 60 % a las 72 h (Fig. 2). Este efecto contrasta con el control tratado con DMSO donde la adherencia de los trofozoítos a las paredes del tubo no se vio alterada, lo que indica que bicuculina afecta el mecanismo de adhesión de los trofozoítos lo cual podría estar relacionado con alteración de la estructura del disco ventral. Estudios previos han reportado que el disco ventral está formado por una matriz de microtúbulos asociados a otros complejos proteicos y que alteraciones en las proteínas que conforman esta estructura pueden llevar a una pérdida de adherencia de los trofozoítos. Estas alteraciones, como las ocasionadas por los benzimidazoles, que conducen al desensamblaje del disco ventral, provoca una menor adhesión y, por ende, a una reducción en la capacidad infecciosa del parásito (Mariane et al., 2005). Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que la bicuculina podría estar interfiriendo con la integridad o funcionalidad del disco ventral.

Figura 2. Porcentaje de inhibición de la adhesión de trofozoítos de *Giardia lamblia* por efecto de bicuculina.



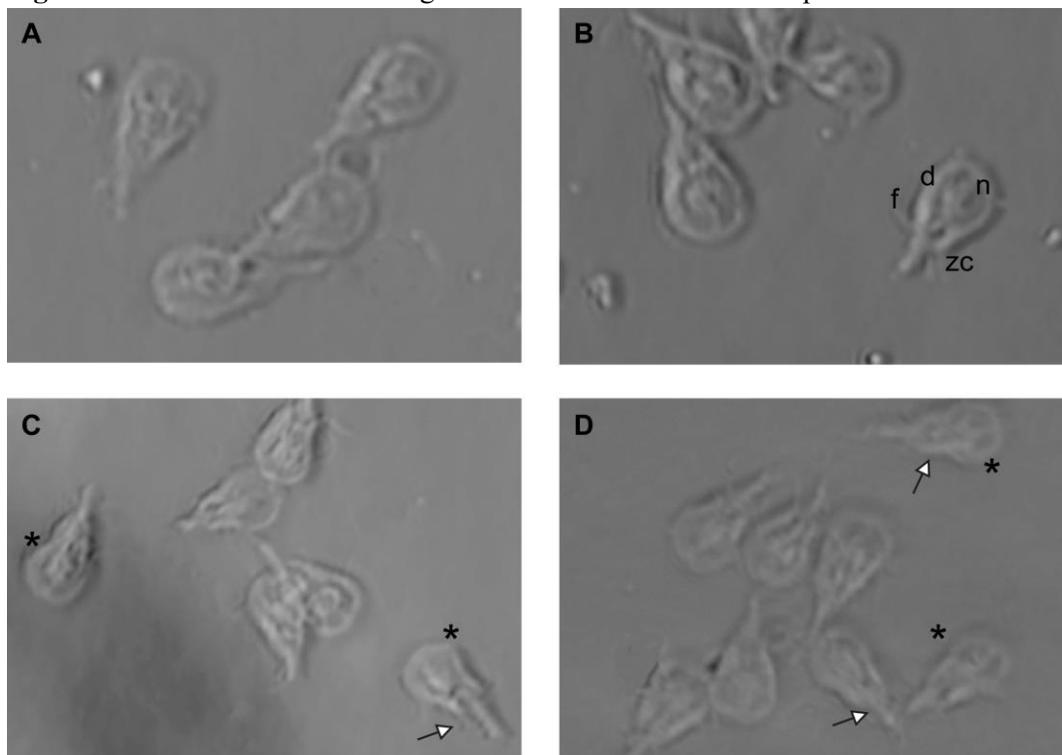
Los datos corresponden al valor medio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado.
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Análisis de la morfología de los trofozoítos de *G. lamblia* por efecto de bicuculina.

El análisis de la morfología de los trofozoítos de *G. lamblia* expuestos a bicuculina es fundamental para entender cómo este compuesto afecta la integridad estructural del parásito.

El análisis por microscopía de campo claro mostró que los trofozoítos tratados con bicuculina presentaron alteraciones morfológicas evidentes, mientras que los controles (sin tratar y tratados con DMSO) mantuvieron su forma piriforme característica; se aprecian los flagelos, los núcleos, la zona caudal y el disco ventral sin alteraciones (Fig. 3 A y B). En contraste, los trofozoítos tratados con 100 μ M de bicuculina muestran alteraciones en la región anterior ventral; sitio donde se localiza el disco ventral, además de alteraciones en la zona caudal, por una aparente pérdida de rigidez (Fig. 3C). A 200 μ M, se observa un mayor número de trofozoítos con daño en la zona caudal (Fig. 3D). Considerando que el citoesqueleto de *G. lamblia* es fundamental para dar la forma y soporte y que esta conformado principalmente por microtubulos altamente dinámicos y estables, estudios previos han reportado que agentes desestabilizantes de los microtúbulos, provocan deformidades estructurales similares, afectando la morfología de los trofozoítos (Hagen et al., 2019; Chatterji et al., 2011). Estos resultados sugieren que la bicuculina afecta la estabilidad de los microtúbulos, comprometiendo la funcionalidad y estructuras críticas del parásito.

Figura 3. Alteración de la morfología de trofozoítos de *G. lamblia* por efecto de bicuculina.



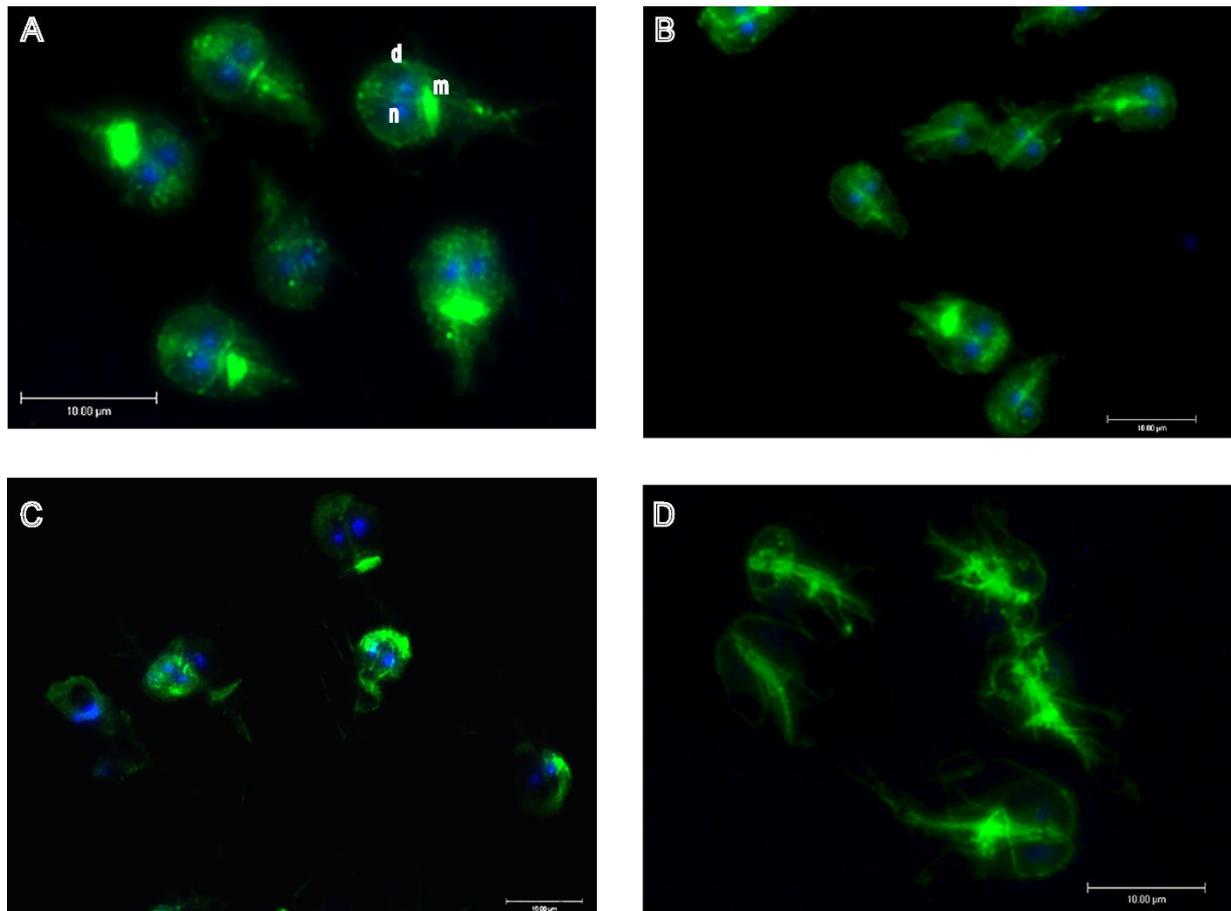
Microscopías de cultivos expuestos por 48 h a A) trofozoítos sin tratamiento; B) DMSO como control negativo; C) 100 μ M de bicuculina; D) 200 μ M de bicuculina. d= disco ventral; f= flagelo; zn= zona caudal; n=núcleo. * señala la región anterior con daño. → señala parásitos con daño en zona caudal.

Bicuculina provoca cambios en la distribución y expresión de tubulina en trofozoítos de *Giardia lamblia*.

Para analizar las posibles alteraciones en la distribución del citoesqueleto de tubulina por efecto de bicuculina, cultivos tratados con bicuculina y DMSO durante 48 h fueron evaluados mediante microscopía de fluorescencia utilizando el anticuerpo anti- α -tubulina-FITC. En los trofozoítos sin tratamiento y los tratados con DMSO, las imágenes que se obtuvieron muestran a tubulina distribuida en todo el cuerpo del parásito, con una señal más intensa en la zona del cuerpo medio y disco ventral (Fig. 4 A y B). Los trofozoítos tratados con bicuculina presentan alteraciones en la distribución y tinción de tubulina de manera dosis-dependiente. Con 100 μ M de bicuculina, se observó a tubulina más condensada y agrupada en algunos cúmulos en la zona del disco ventral, con disminución de la marca en todo el cuerpo del parásito. (Fig. 4C). Con 200 μ M, se observa a tubulina más condensada y formando cumulos en la región de los cuerpos basales, parabasales y flagelos, la marca en el disco ventral se observa difusa y desarreglada señalando un aparente ensanchamiento de esta estructura (Fig. 4 D). En las células eucariotas se ha demostrado la participación del citoesqueleto en la forma celular y en la organización de las estructuras internas. En *Giardia*, la motilidad y adhesión son procesos fundamentales para la patogenia del parásito y éstos están mediados por el citoesqueleto. Nuestros hallazgos sugieren que las alteraciones en el citoesqueleto de tubulina y en el disco ventral, por bicuculina, están relacionadas con la inhibición en la capacidad de adhesión de los trofozoítos. Además, coinciden con los reportados por Gutiérrez y colaboradores (2017), quienes observaron una distribución irregular de tubulina con formación de agregados tras el tratamiento con curcumina, sugiriendo una despolarización o fragmentación de los microtúbulos (Gutierrez et al., 2017). Adicionalmente, estudios previos han demostrado que fármacos desestabilizadores de microtúbulos afectan la integridad estructural de *G. lamblia*. Por ejemplo, el nocodazol induce cambios morfológicos en la membrana, disco ventral y flagelos, además de generar vesiculaciones en la superficie celular (Mariante et al., 2005). De manera similar, el oryzalin provoca el enroscamiento de los flagelos, interrupción de la división celular y pérdida de la morfología normal (Terra et al., 2010).



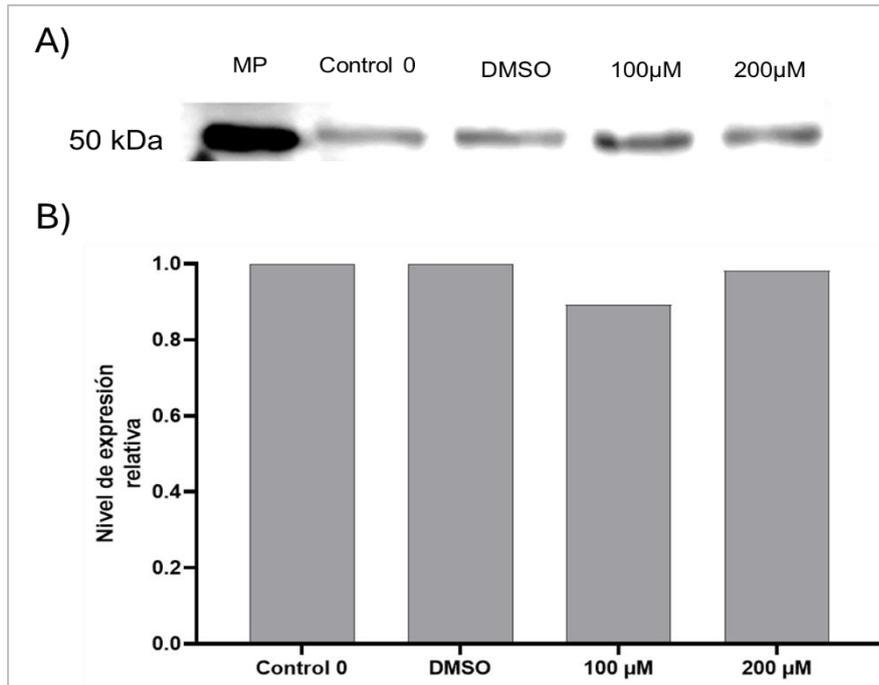
Figura 4 Efecto de bicuculina en la inmunolocalización de tubulina mediante microscopía de fluorescencia.



Cultivos expuestos por 48 h a A) Control sin tratamiento; B) DMSO; C) 100 μ M de bicuculina; D) 200 μ M de bicuculina. d = disco ventral, m= cuerpo medio, n = núcleo. Barra=10 μ m.

Para determinar si los cambios en la distribución e intensidad de la marca de tubulina se debían a una reducción en la expresión de la proteína, realizamos un ensayo de Western blot (Fig. 5A). El análisis densitométrico semicuantitativo mostró una ligera disminución en la señal a concentraciones de 100 y 200 μ M de bicuculina; sin embargo, esta reducción no fue estadísticamente significativa en comparación con el control DMSO ni con el control sin tratamiento (Fig. 5B). Esto sugiere que el mecanismo de acción anti-giardíasis de la bicuculina no está mediado por una disminución en la expresión de tubulina, sino más bien por la desestabilización de las estructuras microtubulares, afectando la morfología y funcionalidad del parásito. Hacen falta más estudios para confirmar lo anterior.

Figura 5 Efecto de bicuculina en la expresión de tubulina.

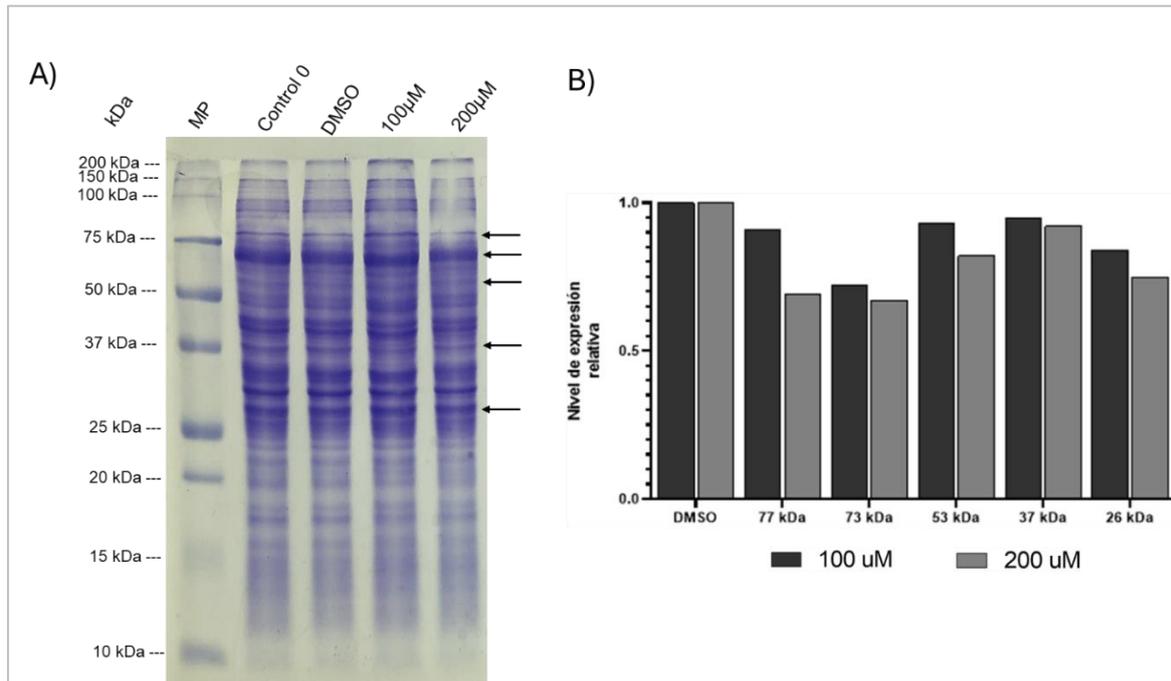


A) Western blot de extractos celulares de cultivos expuestos por 48 horas a 0, DMSO, 100μM, 200μM de bicuculina. B) Análisis densitométrico semicuantitativo de la intensidad de la banda mediante el software Image Studio Digits. MP: Marcador de peso.

Bicuculina provoca cambios en el patrón de distribución de proteínas.

Profundizando en los efectos de la bicuculina sobre la expresión proteica en *Giardia lamblia* se extrajeron proteínas totales de cultivos expuestos a DMSO y bicuculina durante 48 y se analizaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras. Tras la extracción y cuantificación de proteínas, estas fueron separadas en geles de SDS-poliacrilamida para evaluar su perfil electroforético. La figura 6 muestra que las proteínas solubles de *G. lamblia* consisten en una mezcla heterogénea con masas moleculares en un rango de 15 a 200 kDa. Se identificaron bandas con pesos moleculares de 26, 37, 53, 73 y 77 kDa (Fig. 6A flechas), que evidenciaron cambios aparentes en su expresión tras el tratamiento con bicuculina (Fig. 6B). Estos cambios sugieren que la bicuculina podría estar afectando proteínas críticas en la homeostasis celular o en la estructura del citoesqueleto. En el genoma de *G. lamblia* (disponible en GiardiaDB.org) se han identificado una variedad de proteínas de *G. lamblia* con pesos moleculares entre 30 y 73 kDa que participan en funciones estructurales, enzimáticas y de membrana, esenciales para la biología y patogenicidad del parásito, sin embargo, se requieren estudios adicionales, como espectrometría de masas, para confirmar la identidad de las proteínas afectadas por bicuculina.

Figura 6 Efecto de bicuculina en el patrón electroforético de proteínas totales de trofozoítos de *Giardia lamblia*.



20 μg de proteínas totales de cultivos de trofozoítos expuestos a 0, DMSO, 100 μM, 200 μM de bicuculina y MTZ fueron separados por SDS-PAGE en condiciones reductoras. A) Expuestos por 48 h. B) Expuestos por 72 h. C) Análisis de la señal obtenida de la banda de 73 kDa mediante el software Image Studio Digits. MP: Marcador de peso.

CONCLUSIONES

Bicuculina muestra actividad anti-giardiasica en cultivos *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*; afecta la capacidad de adhesión del trofozoíto vía desestabilización del citoesqueleto de tubulina, sin afectar la expresión de la proteína. Se necesitan estudios adicionales para dilucidar el mecanismo citotóxico de bicuculina y evaluar su efecto en modelos *in vivo*. También, es necesario investigar si la acción de bicuculina está ligada a la proteína GiK y proponer a esta última como una nueva diana farmacológica.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ansell, B. R., McConville, M. J., Ma'ayeh, S. Y., Dagley, M. J., Gasser, R. B., Svärd, S. G., & Jex, A. R. (2015). Drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Biotechnol Adv*, 33(6 Pt 1), 888-901.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.04.009>

Argüello, G. R., Leitsch, D., Skinner, A. T., & Ortega, P. M. G. (2020). Drug resistance in *Giardia*: Mechanisms and alternative treatments for Giardiasis. *Adv Parasitol*, 107, 201-282.

<https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.11.003>

- Chatterji, B.P., Jindal B., Srivastava S. & Panda, D. (2011). Microtubules as antifungal and antiparasitic drug targets. *Expert Opin Ther Pat.* 21(2):167-86.
<https://doi.org/10.1517/13543776.2011.545349>.
- Chen, Y., Li, P., Chen, T., Liu, H., Wang, P., Dai, X., & Zou, Q. (2023). Ronidazole Is a Superior Prodrug to Metronidazole for Nitroreductase-Mediated Hepatocytes Ablation in Zebrafish Larvae. *Zebrafish*, 20(3), 95-102. <https://doi.org/10.1089/zeb.2022.0066>
- Gutiérrez, G. F., Palomo, L.L., Hernández, H.J.M., Pérez, R.A., Aguayo, O.R., Hernández, C.A., Castillo, R., González, P.S., Cortés, Z.R., Ramírez, H.M.A., Mendoza, M.M.L., & Castillo, R.A. (2017). Curcumin alters the cytoskeleton and microtubule organization on trophozoites of *Giardia lamblia*. *Acta Tropica*, 172;113-121. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.027>
- Hagen, K. D., McNally, S. G., Hilton, N. D. & Dawson, S.C. (2020). Microtubule organelles in *Giardia*. *Adv Parasitol.* 107:25-96. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.11.001>
- Hagen, K. D., Nosala, C., Hilton, N., Mueller, A., Holthaus, D., Laue, M., Klotz, C., Aebischer, A. & Dawson S. C. (2023). The domed architecture of *Giardias* ventral disc is necessary for attachment and host pathogenesis. *bioRxiv.* 2023.07.02.547441.
<https://doi.org/10.1101/2023.07.02.547441>
- Halliez, M. C., & Buret, A. G. (2013). Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World J Gastroenterol*, 19(47), 8974-8985.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i47.8974>
- Hernández, C. A., Romero, Q. L. C., Ruvalcaba, L. J. C., & López, C. L. (2019). Therapeutic uses of metronidazole and its side effects: an update. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 23(1), 397-401.
https://doi.org/10.26355/eurrev_201901_16788
- Johnston, G. A. R. (2013). Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists. *British Journal of Pharmacology*, 169(2);328–336. <https://doi.org/10.1111/bph.12127>
- Keister, D. B. (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 77(4), 487-488. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(83\)90120-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(83)90120-7)
- Lalle, M., & Hanevik, K. (2018). Treatment-refractory giardiasis: challenges and solutions. *Infect Drug Resist*, 11, 1921-1933. <https://doi.org/10.2147/idr.S141468>



- Leitsch, D. (2015). Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*. *Curr Trop Med Rep*, 2(3), 128-135. <https://doi.org/10.1007/s40475-015-0051-1>
- Leung, A. K. C., Leung, A. A. M., Wong, A. H. C., Sergi, C. M., & Kam, J. K. M. (2019). Giardiasis: An Overview. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 13(2), 134-143. <https://doi.org/10.2174/1872213x13666190618124901>
- Mariante, R. M., Vancini, R. G., Melo, A. L., & Benchimol, M. (2005). *Giardia lamblia*: Evaluation of the in vitro effects of nocodazole and colchicine on trophozoites. *Experimental Parasitology*, 110(1);62-72. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.01.007>
- Mertens, R. T., Gukathasan, S., Arojojoye, A. S., Olelewe, C., & Awuah, S. G. (2023). Next Generation Gold Drugs and Probes: Chemistry and Biomedical Applications. *Chem Rev*, 123(10), 6612-6667. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00649>
- Nosala, C., Hagen, K., Guest, S., Hilton, N., Müller, A., Laue, M., Klotz, C., Aebischer, A., & Dawson, S. (2023). Dynamic ventral disc contraction is necessary for *Giardia* attachment and host pathology. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.07.04.547600>.
- Ochoa, M. V. Y., Rangel, C. I. A., Suárez, R. D. O., Cortés, Z. R., Hernández, H. J. M., Pérez, R. A., Chiquete, F. N., León, Á. G., González, P. S., Gaona, B. J., & Castillo, R. A. (2020). Antigiardial Activity of Acetylsalicylic Acid Is Associated with Overexpression of HSP70 and Membrane Transporters. *Pharmaceuticals (Basel)*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/ph13120440>
- Painter, J. E., Collier, S. A., & Gargano, J. W. (2017). Association between *Giardia* and arthritis or joint pain in a large health insurance cohort: could it be reactive arthritis? *Epidemiol Infect*, 145(3), 471-477. <https://doi.org/10.1017/s0950268816002120>
- Palomo, L. L., Gutiérrez, G. F., Ochoa, M. V. Y., Cortés, Z. R., Charles, N. C. L., & Castillo, R. A. (2019). Identification of a novel potassium channel (GiK) as a potential drug target in *Giardia lamblia*: Computational descriptions of binding sites. *PeerJ*, 7, e6430. <https://doi.org/10.7717/peerj.6430>
- Piloiu, C., & Dumitrascu, D. L. (2021). Albendazole-Induced Liver Injury. *Am J Ther*, 28(3), e335-e340. <https://doi.org/10.1097/mjt.0000000000001341>



- Raj, D., Ghosh, E., Mukherjee, A. K., Nozaki, T. & Ganguly, S. Differential gene expression in *Giardia lamblia* under oxidative stress: significance in eukaryotic evolution. *Gene*. 2014 Feb 10;535(2):131-9. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.11.048>
- Suárez, R. D. O., Munguía, H. F. J., Cortés, Z. R., Hernández, H. J. M., González, P. S., Perez, R. A., & Castillo, R. A. (2023). Repurposing Terfenadine as a Novel Antigiardial Compound. *Pharmaceuticals*, 16(9), 1332. <https://www.mdpi.com/1424-8247/16/9/1332>
- Tejman, Y. N., Miyamoto, Y., Leitsch, D., Santini, J., Debnath, A., Gut, J., McKerrow, J. H., Reed, S. L., & Eckmann, L. (2013). A reprofiled drug, auranofin, is effective against metronidazole-resistant *Giardia lamblia*. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(5), 2029-2035. <https://doi.org/10.1128/aac.01675-12>
- Terra, L. L., Campanati, L., & de Souza, W. (2010). Heterogeneity in the sensitivity of microtubules of *Giardia lamblia* to the herbicide oryzalin. *Parasitology Research*, 107(1);47-54. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1831-0>
- Vivancos, V., González, A. I., Bermejo, M., & Gonzalez, A. M. (2018). Giardiasis: Characteristics, Pathogenesis and New Insights About Treatment. *Curr Top Med Chem*, 18(15), 1287-1303. <https://doi.org/10.2174/1568026618666181002095314>
- Waller, K. L., Kim, K., & McDonald, T. v. (2008). *Plasmodium falciparum*: Growth response to potassium channel blocking compounds. *Experimental Parasitology*. 120(3);280–285. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.07.010>
- Watkins, R. R., & Eckmann, L. (2014). Treatment of giardiasis: current status and future directions. *Curr Infect Dis Rep*, 16(2), 396. <https://doi.org/10.1007/s11908-014-0396-y>

