



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA
IN VITRO DE HÍBRIDOS DE DERIVADOS
BENCIMIDAZÓLICOS CON 2-AMINO-5-NITROIAZOL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:
BEATRIZ ADRIANA ACEVES VILLALBA



MÉXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2005

m350869



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

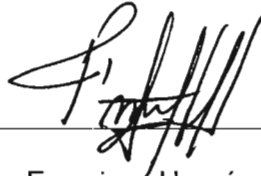
JURADO ASIGNADO:

| | |
|--------------|------------------------------------|
| PRESIDENTE | Profr. Abel Gutiérrez Ramos |
| VOCAL | Profra. Ana María Vázquez Álvarez |
| SECRETARIO | Profr. Francisco Hernández Luis |
| 1er SUPLENTE | Profra. María Eva González Trujano |
| 2do SUPLENTE | Profr. José Cordero Hernández |

Sitio en donde se desarrolló el tema:

UIMEIP, Hospital de Pediatría CMNSXXI del IMSS y Lab. 122, Facultad de Química de la UNAM

ASESOR:



Dr. Francisco Hernández Luis

SUPERVISORA TÉCNICA:



Dra. Lilián Yépez Mulia

SUSTENTANTE:

Beatriz A. Aceves Villalba

Beatriz Adriana Aceves Villalba

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida y por permitirme llegar a este momento de tanta dicha.

A ti Adrianita por ser el motor principal en mi vida, porque tus sonrisas iluminan mis días y me animan a seguir adelante. Te amo mi niña hermosa.

A ti mi angelito por estar siempre a mi lado.

A ti papá porque nadie más podría haberme dado tal ejemplo de responsabilidad, respeto y honradez. Te quiero y admiro papito.

A ti mamá porque gran parte de este trabajo no lo habría logrado sin tu apoyo incondicional, sin ti no estaría cumpliendo este sueño. Te adoro mamita.

A ti Ana porque tu ejemplo ha sido un incentivo para alcanzar este sueño. Te quiero hermana.

A ti Gaby por el apoyo que siempre me has brindado y por compartir conmigo tus experiencias. Te quiero hermana.

A ti Joselito por esa chispa que tienes. Te quiero pequeño.

A ti Juanito por ser un pedacito de cielo. Te quiero bebé.

A ti Alex porque por tu trato y tu apoyo has sido como un hermano para mí.

A mis abuelitos José y Tere por acogerme cada día en su hogar haciéndome sentir como en mi casa. Abuelita te extraño mucho y espero que desde donde estés puedas ver mi trabajo terminado.

A mis abuelitos Jesús y Tere por todo su cariño. Abuelita nos haces mucha falta.

A todos mis tíos y tías, especialmente a: Coco, Ceci, Tomás, Pedro, Paco, Dulce, Lupita, Gaby, Toño, Alex, Juan, Luis, Lulú, Memo, Jorge, Miguel, Dulce A., Paco A. y Faby, Lupita R., Vero, Elvia y Jorge T. por todos sus consejos, regaños y cariño.

A todos mis primos y primas, especialmente a: Caro, David, Mauri, Claudia, Dulce, Paola, Rodrigo, Ximena, Miguelito, Karen, Fey, Dulce E., Lizet, Rafa, Ixchel y Karina, por todo lo que me han enseñado, sin importar la edad.

A ti Juan Carlos por ser una parte muy importante en mi vida. Porque aunque no lo creas parte de este sueño también es tuyo. Te quiero cariño.

A la familia Anaya Islas por todo el apoyo, el cariño y las atenciones. Gracias Sergio y Rocío.

A mis queridas y mejores amigas Ana Lilia, Ceci y Yokebed, porque no sólo fueron mis compañeras de escuela, sino que realmente estuvieron conmigo en las buenas y en las malas. Las quiero mucho comadritas.

A ti Alfredo por ser mi mejor amigo, compañero, confidente y apoyo. Porque tú también eres parte de este sueño. Gracias mi querido Mr.

A Dionisio y Edgar por brindarme su amistad, cariño y apoyo incondicional a través de todos estos años. Los quiero mucho.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por el espacio otorgado durante toda mi carrera, porque más que una escuela fuiste mi segunda casa.

A todos los profesores que durante el desarrollo de mi carrera me formaron como estudiante y como ser humano.

A usted Dr. Francisco Hernández Luis por darme esta maravillosa oportunidad y por hacerme parte de su equipo durante el desarrollo de mi tesis. Gracias por guiarme profesor.

A usted Dra. Lilián Yépez Mulia por recibirme en su laboratorio, por sus atenciones y consejos profesionales y de la vida.

A todos los profesores y compañeros del laboratorio 122 de la Facultad de Química por su apoyo, consejos, comentarios y atenciones.

A todos los compañeros de la UIMEIP del Hospital de Pediatría, especialmente a ti Amparito por todo el cariño, apoyo, enseñanzas, pláticas y consejos. Gracias prima.

Al Proyecto CONACYT V43629-M por la beca proporcionada para el desarrollo de este trabajo y al Proyecto PAPIIT IN210805 por la compra de materiales para uso en el cromatógrafo de líquidos.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| Introducción..... | 1 |
| 1. Marco teórico..... | 3 |
| 1.1. <i>Giardia intestinalis</i> y giardiosis..... | 3 |
| 1.1.1. Epidemiología de la giardiosis..... | 3 |
| 1.1.2. Morfología de <i>Giardia intestinalis</i> | 3 |
| 1.1.3. Ciclo de vida de <i>Giardia intestinalis</i> | 4 |
| 1.1.4. Bioquímica de <i>Giardia intestinalis</i> | 5 |
| 1.1.5. Patogenia de la giardiosis..... | 6 |
| 1.1.6. Cuadro clínico de la giardiosis..... | 7 |
| 1.2. <i>Trichomonas vaginalis</i> y tricomonosis..... | 7 |
| 1.2.1. Epidemiología de la tricomonosis..... | 7 |
| 1.2.2. Morfología de <i>Trichomonas vaginalis</i> | 8 |
| 1.2.3. Ciclo de vida de <i>Trichomonas vaginalis</i> | 8 |
| 1.2.4. Bioquímica de <i>Trichomonas vaginalis</i> | 8 |
| 1.2.5. Patogenia de la tricomonosis..... | 10 |
| 1.2.6. Cuadro clínico de la tricomonosis..... | 11 |
| 1.3. Fármacos utilizados en el tratamiento de la giardiosis y la tricomonosis..... | 11 |
| 1.3.1. Fallas terapéuticas, problemática actual..... | 14 |
| 1.4. Derivados bencimidazólicos como agentes antiparasitarios..... | 15 |
| 1.4.1. Modificaciones estructurales al anillo bencimidazólico..... | 17 |
| 1.4.2. Híbridos de derivados bencimidazólicos con 2-amino-5-nitrotiazol..... | 21 |
| 2. Planteamiento del problema..... | 24 |
| 3. Objetivos..... | 25 |
| 3.1. Objetivo general..... | 25 |
| 3.2. Objetivos particulares..... | 25 |

| | |
|---|----|
| 4. Procedimiento experimental | 26 |
| 4.1. Curvas de crecimiento de trofozoitos de <i>Giardia intestinalis</i> y <i>Trichomonas vaginalis</i> | 26 |
| 4.2. Determinación de la CI_{50} y la CI_{90} <i>in vitro</i> de Albendazol, Nitazoxanida, Tizoxanida, PVB-K, VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72, VMAS-74 y preVMAS-72 contra trofozoitos de <i>Giardia intestinalis</i> y <i>Trichomonas vaginalis</i> , mediante el método de subcultivo..... | 27 |
| 4.2.1. Desarrollo del método de subcultivo..... | 27 |
| 4.3. Exploración de la estabilidad química de los híbridos VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72 y VMAS-74 mediante CLAR..... | 29 |
| 5. Resultados y discusión | 30 |
| 5.1. Curvas de crecimiento de trofozoitos de <i>Giardia intestinalis</i> y <i>Trichomonas vaginalis</i> | 30 |
| 5.2. Determinación de la CI_{50} y la CI_{90} <i>in vitro</i> de Albendazol, Nitazoxanida, Tizoxanida, PVB-K, VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72, VMAS-74 y preVMAS-72 contra trofozoitos de <i>Giardia intestinalis</i> y <i>Trichomonas vaginalis</i> , mediante el método de subcultivo..... | 31 |
| 5.2.1. Actividad giardicida <i>in vitro</i> de Albendazol, Nitazoxanida, Tizoxanida, PVB-K, VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72, VMAS-74 y preVMAS-72 | 32 |
| 5.2.2. Actividad tricomonocida <i>in vitro</i> de Albendazol, Nitazoxanida, Tizoxanida, PVB-K, VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72, VMAS-74 y preVMAS-72 | 36 |
| 5.3. Exploración de la estabilidad química de los híbridos VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72 y VMAS-74 mediante CLAR..... | 40 |
| 6. Conclusiones | 45 |
| Bibliografía | 46 |
| Anexo I. Materiales y métodos | 51 |
| Anexo II. Tablas | 60 |

INTRODUCCIÓN

Las parasitosis causadas por helmintos y protozoarios se encuentran entre los principales problemas de salud pública, tanto en países en vías de desarrollo como en los industrializados. Se estima que de los 6 mil millones de habitantes que hay en el mundo, aproximadamente el 50% está infectado por parásitos y alrededor de 450 millones presentan alguna enfermedad provocada por los mismos.

Dependiendo del agente causal, las parasitosis se clasifican en protozoosis y helmintosis. Dentro de las protozoosis de importancia clínica, debido a su amplia distribución y limitado control, encontramos aquellas provocadas por dos protozoarios flagelados, *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*, agentes causales de la giardiosis y la tricomonosis, respectivamente.

En México, la giardiosis está considerada como una de las parasitosis más frecuentes, afectando a los niños en edad preescolar y escolar, con una frecuencia de 23.8%. Como consecuencia de esta parasitosis se puede presentar: mala absorción intestinal, pérdida excesiva de nutrientes, alteración del apetito y retraso en el crecimiento.

Con respecto a la tricomonosis, la Secretaria de Salud de México informó que este padecimiento ocupó el segundo lugar de incidencia dentro de las enfermedades de transmisión sexual (ETS) en el 2001 con 32 524 casos. Asimismo, datos epidemiológicos mostraron una relación directa entre esta enfermedad y una predisposición a padecer tanto cáncer cérvico uterino como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), (CIMAC, 2001).

Actualmente existen algunos compuestos utilizados en el tratamiento de estas parasitosis, tales como el Metronidazol, Tinidazol, Albendazol, Mebendazol, Furazolidona y Nitazoxanida. Aunque los resultados clínicos son satisfactorios, es importante mencionar dos problemas actuales para dichas sustancias; en primer lugar la presencia de reacciones adversas en varios pacientes ya que estos fármacos necesitan ser administrados en dosis mayores a 15 mg/Kg para alcanzar su eficacia terapéutica; en segundo lugar, la presencia de cepas de parásitos resistentes a los mismos. Ante estas circunstancias, es necesaria la búsqueda de nuevos compuestos

con estructuras distintas o derivados de los fármacos mencionados, que puedan superar las problemáticas mencionadas.

Con esta intención, nuestro grupo de investigación sintetizó un grupo de cuatro compuestos aplicando el concepto que dentro de la química farmacéutica se conoce como hibridación molecular; el diseño consideró la unión de dos porciones estructurales presentes en derivados que han mostrado actividad antiprotozoaria de forma individual, el bencimidazol y el tiazol.

En este contexto, una vez obtenidos los compuestos, el objetivo del presente trabajo de investigación consistió en la determinación *in vitro* de la actividad giardicida y tricomonocida de estas sustancias con el propósito de conocer si estos híbridos moleculares presentaban mayor o igual potencia antiprotozoaria que las porciones estructurales que les dieron origen.

1. MARCO TEÓRICO

Este capítulo contiene la información referencial del presente trabajo de investigación. La información se organizó en tres apartados principales, el primero presenta generalidades de *Giardia intestinalis*, el segundo abarca lo relacionado a *Tricomonas vaginalis* y el tercero trata sobre algunos aspectos de la quimioterapia actual y la búsqueda de nuevas moléculas antiparasitarias.

1.1. *Giardia intestinalis* y giardiosis

1.1.1. Epidemiología de la giardiosis

La giardiosis es una protozoosis de distribución cosmopolita, siendo *G. intestinalis* el parásito intestinal más comúnmente aislado en el mundo (Adam, 1991). Las cifras de frecuencia son muy variables dependiendo en gran medida de las condiciones sanitarias de cada región y del nivel educativo de la población. Los informes de trabajos realizados en México, refieren que la frecuencia varía del 0.7 al 66%; los niños en etapas preescolar y escolar son los más afectados (Tay y cols., 1996).

Giardia intestinalis infecta de forma natural al humano, al perro, al gato, al castor, al coyote, entre otros, y de forma experimental a varias especies de roedores y otros mamíferos (Marquardt y cols., 2000).

1.1.2. Morfología de *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis presenta dos estadios: una fase vegetativa llamada trofozoito y otra de resistencia e infectante denominada quiste (Figura 1).

El trofozoito es piriforme, mide de 9-20 μm de longitud por 5-12 μm de ancho. Tiene una cara dorsal convexa y una porción cóncava; en esta última se localiza el disco ventral constituido por microtúbulos de tubulina, microcintas de giardina, miosina, actina y tropomiosina. Posee dos núcleos con cinco cromosomas cada uno. Tiene cuatro pares de flagelos (anterior, caudal, posterior y ventral), dos axonemas, dos

cuerpos medios y vacuolas que contienen hidrolasas (Adam, 1991; Mandell y cols., 1997; Shore, 2001; Tay y cols., 1996).

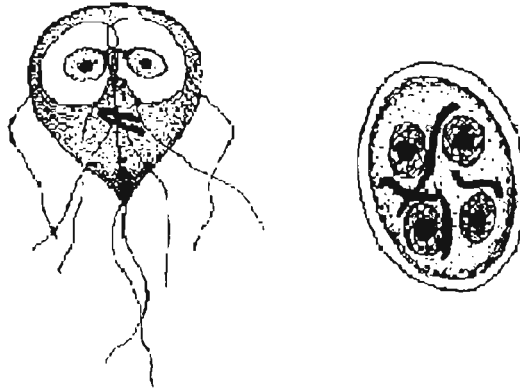


Figura 1. Trofozoito y quiste de *G. intestinalis* (www.bioltrop.org).

El quiste es ovoide, mide de 11-14 μm de longitud por 7-10 μm de ancho. Se encuentra rodeado por una pared de aproximadamente 0.3 μm de espesor, constituida principalmente por galactosa. En su interior se encuentran cuatro núcleos, axonemas, cuerpos medios, vacuolas y fragmentos de flagelos (Adam, 1991; 2001).

1.1.3. Ciclo de vida de *Giardia intestinalis*

La infección inicia con la ingestión de quistes de *G. intestinalis* (Figura 2). La exposición de los quistes al jugo gástrico (pH 1.3-2.7), promueve el reblandecimiento de la pared quística. El proceso de desenquistamiento se lleva a cabo a nivel del duodeno (pH 4.0), con la participación de tripsina, quimiotripsina y fluidos pancreáticos del huésped así como las proteasas del parásito (Adam, 2001). Cada quiste libera dos trofozoitos, los cuales se adhieren firmemente al epitelio intestinal a través de su disco ventral en donde pueden permanecer por semanas o años.

Cuando los trofozoitos se desprenden del epitelio intestinal, son trasladados por el tránsito intestinal hacia la parte final de yeyuno donde inician el proceso de enquistamiento (Gillin y Reiner, 1996). Este proceso se ve favorecido por las condiciones de poca acidez y por la presencia de las sales biliares primarias (Marquardt y cols.,

2000; Shore, 2001; Svård y cols., 2003). En caso de cuadros diarréicos el parásito llega a ser expulsado del huésped como trofozoito ya que no se lleva a cabo el proceso de enquistamiento (Tay y cols., 1996).

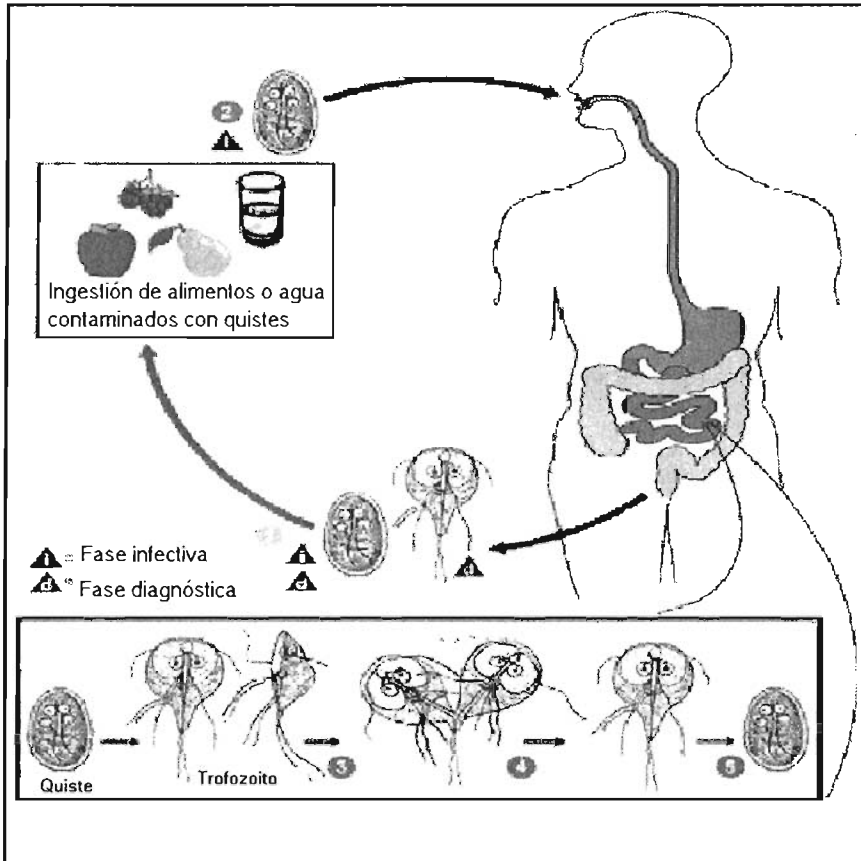


Figura 2. Ciclo de vida de *G. intestinalis* (www.dpd.cdc.gov).

1.1.4. Bioquímica de *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis es un parásito anaerobio aerotolerante que carece de mitocondrias, pero que posee en su citoplasma decenas de pequeñas estructuras de doble membrana llamadas mitosomas. Estas estructuras intervienen en la maduración de proteínas que contienen Fe-S como la enzima piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (PFOR), (Henze y Martín, 2003; Tovar y cols., 2003).

Asimismo, no presenta ciclo de Krebs, transporte de electrones mediado por citocromos o fosforilación oxidativa; por lo que su metabolismo es glicolítico y fermentativo. La parte final de la vía glicolítica la cataliza la PFOR. Esta enzima es homóloga a la encontrada en bacterias anaerobias y reemplaza a la piruvato deshidrogenasa presente en organismos aerobios. Los productos finales del metabolismo fermentativo de *G. intestinalis* son: acetato, alanina, etanol y dióxido de carbono; el balance de la formación de dichos productos es sensible a la concentración de oxígeno y glucosa en el medio. El ATP se genera por fosforilación a nivel de sustrato; algunas enzimas de la vía glicolítica dependen de fosfato inorgánico en lugar de ATP (Adam, 1991; Adam, 2001; Upcroft y Upcroft, 2001).

Por ser un organismo anaerobio, *G. intestinalis* no presenta los mecanismos clásicos para el control del estrés oxidante (superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa y glutatión). En vez de ellos, los trofozoitos presentan una NADH-oxidasa que convierte el oxígeno directamente en agua y protege a la PFOR y a la ferredoxina (Fd). Este mecanismo es la ruta principal de destoxificación del oxígeno (Adam, 2001; Upcroft y Upcroft, 2001).

El metabolismo de aminoácidos se considera como una alternativa para la producción de energía. *Giardia intestinalis* únicamente sintetiza alanina y valina. El resto de los aminoácidos, así como sus requerimientos de lípidos, purinas y pirimidinas, los debe obtener del medio extracelular (Adam, 1991; Adam, 2001).

1.1.5. Patogenia de la giardiosis

Mediante un mecanismo muy complejo, donde interviene varios factores, los trofozoitos de *G. intestinalis* se adhieren al epitelio intestinal a través del disco ventral. Las células epiteliales secretan proteasas como la tripsina e inducen la producción de lectinas por los trofozoitos, de manera que se favorece su adhesión a los enterocitos. La adhesión mediada por receptor no ha sido documentada y la función flagelar no es esencial para dicho proceso (Adam, 1991; Adam, 2001; Marquardt y cols., 2000).

Tanto los trofozoitos adheridos a la pared intestinal como el moco producido por la irritación de la mucosa, constituyen una doble obstrucción que conlleva a alteraciones en el epitelio intestinal. Las consecuencias de esta situación son: hipertrofia de las

microvellosidades, inmadurez de los enterocitos, disminución o pérdida de disacaridasas, mala absorción de electrolitos, grasas y algunas vitaminas y carbohidratos (Tay y cols., 1996; Upcroft y Upcroft, 2001; Wolfe, 1992).

1.1.6. Cuadro clínico de la giardiosis

La infección por *G. intestinalis* incluye la eliminación asintomática de quistes, síndrome crónico de diarrea, mala absorción y pérdida de peso. Se estima que de cada 100 personas que ingieran quistes de *G. intestinalis*, del 5-15% van a convertirse en eliminadores asintomáticos, del 25-50% van a presentar síndrome diarreico agudo y el 35-70% restante no van a tener rastros de infección alguna (Mandell y cols., 1997).

El período de incubación dura en promedio 10 días y las molestias más frecuentes son: diarrea aguda, náusea, vómito, dolor abdominal, anorexia y retardo en el crecimiento. Las evacuaciones son grasosas, malolientes, pueden presentar moco, pero no sangre (Tay y cols., 1996).

1.2. *Trichomonas vaginalis* y tricomonosis

1.2.1. Epidemiología de la tricomonosis

Trichomonas vaginalis es un parásito de distribución cosmopolita. Se presenta en todos los grupos raciales y niveles socioeconómicos. La incidencia anual de tricomonosis se estima en alrededor de 170 millones de casos a nivel mundial (Soper, 2004; Shore, 2001).

El humano es el único huésped natural de *T. vaginalis*. La transmisión es casi en su totalidad por contacto sexual. Dado que *T. vaginalis* tiene una resistencia relativamente alta a las condiciones ambientales externas que facilitan su diseminación, todo aquel material que contenga fluidos genitales (ropa íntima, toallas, retretes, instrumentos de exploración ginecológica u otros objetos contaminados) puede contener a este parásito. También existen informes de transmisión a los neonatos durante el pasaje a través del canal de parto de mujeres infectadas (Mandell y cols., 1997; Shore, 2001; Tay y cols., 1996).

1.2.2. Morfología de *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis es la especie más grande de las tres que se han descrito en el ser humano —*Trichomonas hominis* y *Trichomonas tenax*. Sólo presenta la fase vegetativa de trofozoito (Figura 3). El trofozoito tiene una forma alargada y ovoide, mide de 7-30 μm de longitud por 4-15 μm de ancho. Tiene una estructura central rígida, conocida como axostilo, que sale por la región posterior y funciona como esqueleto; en la parte anterior se localiza el núcleo con seis cromosomas; por arriba de él se localiza el blefaroblasto, a partir del cual se originan los cuatro flagelos, la costa y la membrana ondulante, más pequeña que la de otras especies. En su citoplasma se encuentran vacuolas e hidrogenosomas (Lecke y cols., 2002; Romero, 1999; Tay y cols., 1996).

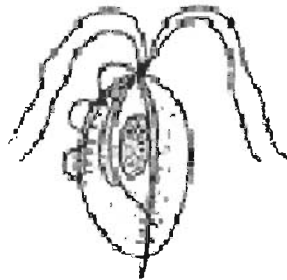


Figura 3. Trofozoito de *T. vaginalis* (www.dpd.cdc.gov).

1.2.3. Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*

La transmisión de *T. vaginalis* es directa (Figura 4). El parásito pasa de persona a persona por contacto sexual (generalmente) y se establece en la mucosa vaginal, uretra femenina o masculina y próstata, donde se reproduce por fisión binaria; no se conoce ninguna modalidad de reproducción sexual (Marquardt y cols., 2000; Tay y cols., 1996).

1.2.4. Bioquímica de *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis es un parásito anaerobio aerotolerante que carece de mitocondria y enzimas mitocondriales (excepto algunas malato deshidrogenasas). No presenta ciclo de Krebs, transporte de electrones mediado por citocromos o fosforilación oxidativa, por lo que su metabolismo es glicolítico y fermentativo. La vía glicolítica de glucosa a piruvato se localiza en el citosol; los productos finales de esta etapa son

lactato y glicerol. La parte final de la vía glicolítica se lleva a cabo en el hidrogenosoma y la ejecuta la PFOR, la cual transfiere los electrones a la Fd y ésta a su vez a la enzima hidrogenasa; los productos finales del metabolismo fermentativo de *T. vaginalis* en el hidrogenosoma son: acetato, hidrógeno y dióxido de carbono (Kulda, 1999; Upcroft y Upcroft, 2001).

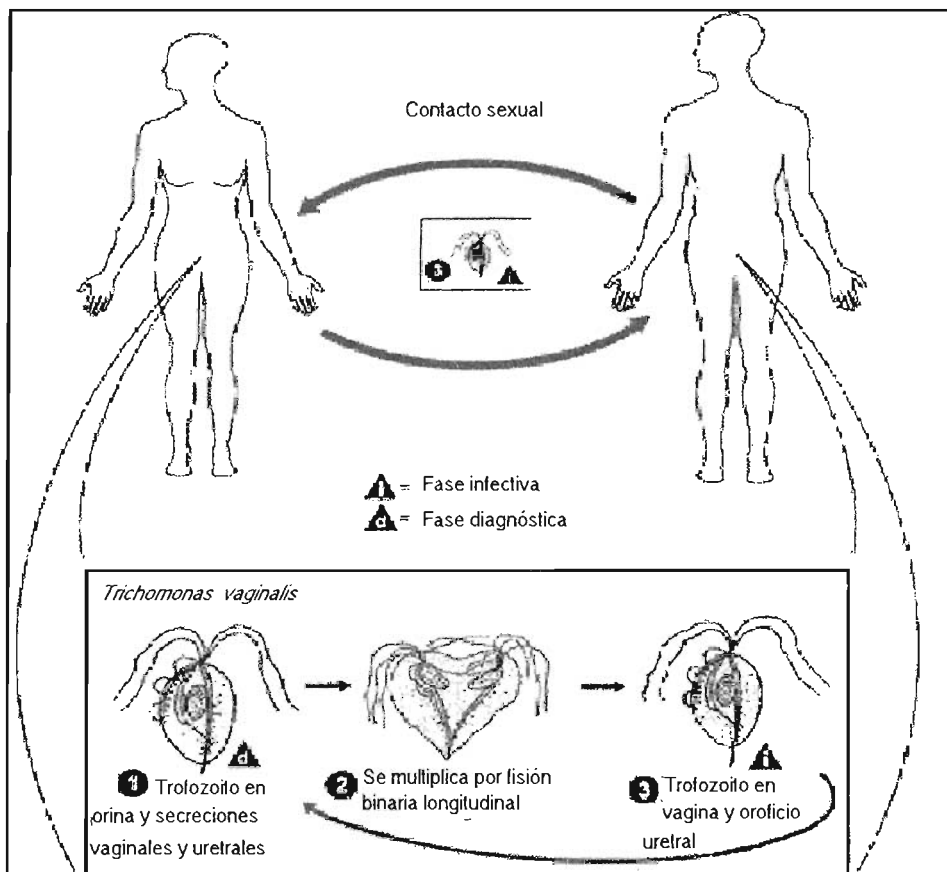


Figura 4. Ciclo de vida de *T. vaginalis* (www.dpd.cdc.gov).

El ATP se genera por fosforilación a nivel de sustrato; algunas enzimas de la vía glicolítica dependen de fosfato inorgánico en lugar de ATP. Por su naturaleza anaeróbica, este parásito no presenta los mecanismos clásicos para el control del estrés oxidante (superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa y glutatión). En vez de ellos, los trofozoitos presentan una NADH-oxidasa que convierte el oxígeno directamente en agua y protege a la PFOR y a la Fd (Upcroft y Upcroft, 2001).

El metabolismo de aminoácidos se considera como una alternativa para la producción de energía. *T. vaginalis* debe cubrir sus requerimientos de aminoácidos, lípidos, purinas y pirimidinas obteniéndolos del medio extracelular (Shore, 2001).

1.2.5. Patogenia de la tricomonosis

Trichomonas vaginalis parasita el epitelio vaginal del huésped mediante un mecanismo altamente específico de adhesión a las células del epitelio vaginal (VEC). Esta citoadherencia involucra la interacción entre moléculas en la superficie del parásito (adhesinas) con moléculas específicas en la superficie de las VEC (receptores). En *T. vaginalis* se han identificado cuatro adhesinas (AP65, AP51, AP33 y AP23) necesarias para el proceso de adhesión; estas adhesinas se encuentran recubiertas con otras proteínas, las cuales deben ser removidas enzimáticamente con una proteasa (cisteína proteasa) para que se lleve a cabo la adherencia (Alderete y cols., 1995; Arroyo y cols., 1992; Garber y Lemchuk, 1989; Marquardt y cols., 2000; North y cols., 1990).

Una vez que *T. vaginalis* se une a las VEC, da inicio la transformación de los trofozoitos, los cuales cambian su forma ovoide por una ameboide aplanada. Este cambio les permite un mayor número de sitios de contacto con las VEC y una interacción más estrecha y fuerte, debido al aumento en la síntesis de adhesinas y a una señal de quimiotaxis para el reclutamiento de más trofozoitos al sitio de infección. La presencia del flagelado en el epitelio vaginal produce degeneración y destrucción de las VEC y genera una reacción inflamatoria (Alderete y cols., 1995; Fiori y cols., 1999; Marquardt y cols., 2000).

1.2.6. Cuadro clínico de la tricomonosis

Una proporción alta de mujeres y hombres con *T. vaginalis* no presentan síntomas y cuando hay molestias, éstas pueden desaparecer espontáneamente aún cuando persista el parásito. Los signos y síntomas en la mujer son: secreción abundante y espumosa de color blanquecino acompañada de prurito intenso y dolor, dispareunia (coito difícil y doloroso) y alteraciones en vías urinarias como disuria (expulsión difícil, dolorosa e incompleta de la orina); en un examen clínico se observan escoriaciones en vulva, edema y enrojecimiento de labios; las paredes vaginales y del cérvix se ven claramente inflamadas (Romero, 1999; Tay y cols., 1996).

Por otro lado, se ha informado de una gran variedad de complicaciones asociadas a *T. vaginalis*, siendo las siguientes las de mayor relevancia: uretritis y prostatitis en hombres, asociación con nacimientos prematuros e incremento en el riesgo de cáncer cérvico uterino e infecciones postoperatorias en mujeres, infertilidad y aumento en la transmisión e infectividad de VIH en hombres y mujeres (Soper, 2004).

1.3. Fármacos utilizados en el tratamiento de la giardiosis y la tricomonosis

En el tratamiento de la giardiosis y la tricomonosis se han utilizado varios compuestos de naturaleza química muy diversa (Figura 5). Actualmente, dentro de esa variedad, sobresalen dos grupos principales. En el primero se encuentran aquellos fármacos heterocíclicos con un grupo nitro como sustituyente común: derivados del 5-nitroimidazol, derivados del 5-nitrofurano y derivados del 5-nitrotiazol. En el segundo se incluyen a los derivados bencimidazólicos sustituidos con un grupo carbamato de metilo en la posición 2.

La actividad antiparasitaria del primer grupo de compuestos, los nitroderivados, se debe a la reducción del grupo nitro por una vía metabólica presente en protozoarios anaerobios como *G. intestinalis* y *T. vaginalis*. Esta reducción se lleva a cabo en el citosol de *G. intestinalis* o en el hidrogenosoma *T. vaginalis*.

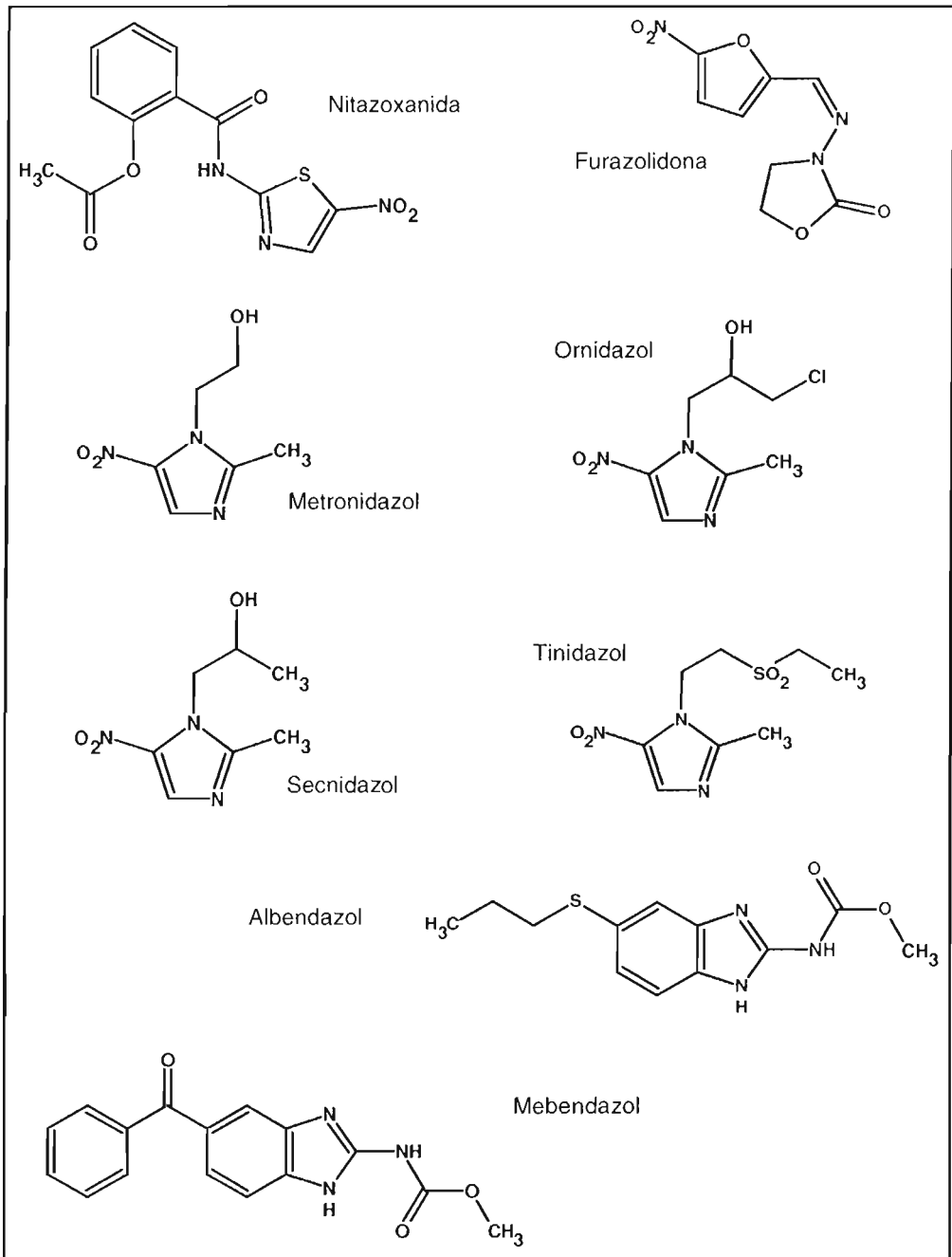


Figura 5. Fármacos utilizados en el tratamiento de la giardiasis y la tricomoniasis.

El Metronidazol, un derivado del 5-nitroimidazol, entra a la célula donde su grupo nitro se reduce al oxidarse la ferredoxina, reacción catalizada por PFOR (Figura 6). Los intermediarios reactivos formados durante la reducción del Metronidazol interaccionan con varios componentes celulares como DNA, proteínas y membranas provocando daño celular irreparable (Johnson, 1993; Upcroft y Upcroft, 2001; Vázquez y cols., 2001). En cepas de *G intestinalis* resistentes al Metronidazol, la actividad de la PFOR se encuentra disminuída (Upcroft y Upcroft, 2001). En *T. vaginalis* resistentes, el metabolismo reductor del hidrogenosoma se encuentra suprimido (Kulda, 1999; Upcroft y Upcroft, 2001).

La Furazolidona, un derivado del 5-nitrofurano, requiere activarse mediante la reducción del grupo nitro al igual que el Metronidazol pero a través de una NADH oxidasa (Figura 6). Los intermediarios reactivos que se generan provocan daño a componentes celulares importantes (Gardner y Hill, 2001).

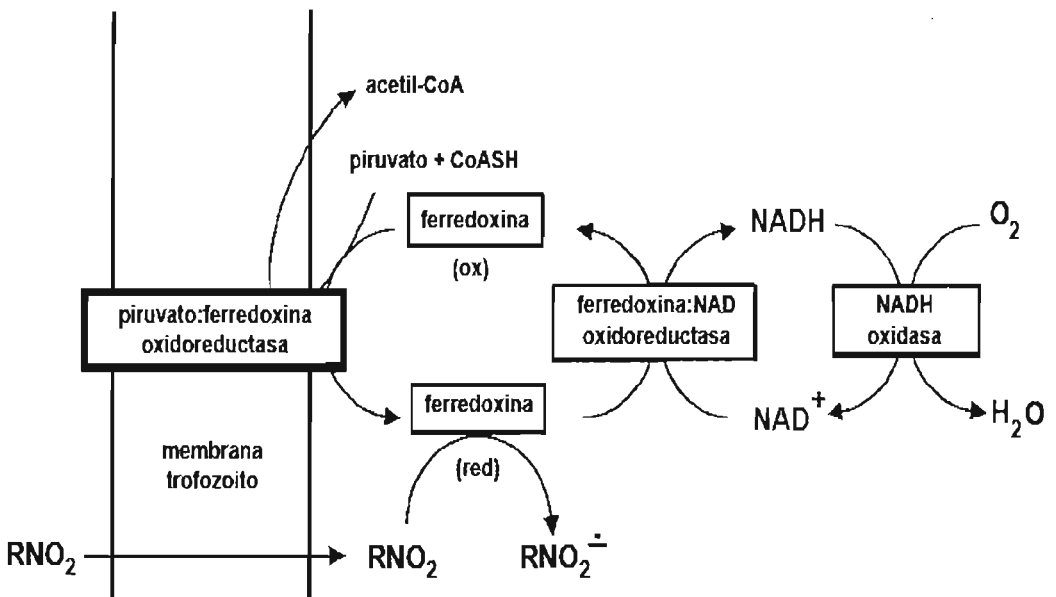


Figura 6. Mecanismo de activación de los nitroheterociclos (Upcroft y Upcroft, 2001).

El mecanismo de acción de la Nitazoxanida, un derivado del 5-nitrotiazol, está mediado por la inhibición de la PFOR y no depende de la Fd; la reducción del grupo

nitro no es indispensable para la actividad de este fármaco y los productos formados durante la activación de la Nitazoxanida no inducen mutaciones en el DNA, a diferencia de lo observado con los otros nitroheterociclos. El daño provocado por la Nitazoxanida implica alteraciones en el citoplasma, la membrana plasmática y el citoesqueleto del parásito, pero sin modificar la organización de los microtúbulos (Cedillo y cols., 2002; Gilles y Hoffman, 2002; Fox y Saravolatz, 2005; Raether y Hänel, 2003).

La actividad antiparasitaria del segundo grupo de compuestos, los derivados del carbendazim (1*H*-bencimidazol-2-carbamato de metilo), se debe a su interacción con la proteína β -tubulina, componente de los microtúbulos que constituyen el citoesqueleto de los parásitos. Aunque esta proteína también es un componente esencial de otras células eucariontes, estos bencimidazoles muestran afinidad selectiva por la β -tubulina de los parásitos.

La interferencia con la polimerización de la tubulina y, por lo tanto, el bloqueo de la formación de los microtúbulos provocan cambios en la estructura y las funciones normales de los parásitos (Lacey, 1988; Lacey, 1990; Lacey y Gill, 1994).

1.3.1. Fallas terapéuticas, problemática actual

Los fármacos tradicionalmente utilizados en el tratamiento de la giardiosis y la tricomonosis tienen la ventaja de ser compuestos efectivos y de bajo costo, con un amplio espectro de actividad y de los cuales se cuenta con información relevante acerca de su mecanismo de acción. Sin embargo, la presencia de efectos adversos y la aparición de cepas resistentes han provocado una disminución en la expectativa de utilidad en los años venideros.

Por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que mantengan o mejoren la eficacia de los fármacos actuales y que a su vez sean capaces de rebasar a los factores que conllevan a la falla terapéutica, tales como toxicidad y resistencia parasitaria.

1.4. Derivados bencimidazólicos como agentes antiparasitarios

Los derivados bencimidazólicos son un grupo de compuestos ampliamente utilizados debido a la diversidad en su actividad biológica y sus aplicaciones clínicas. El anillo bencimidazólico está presente en fármacos con actividad fungicida, herbicida, antiparasitaria, antibacteriana, entre otros (Andrzejewska, 2004). Por tal motivo han despertado el interés de muchos investigadores para utilizarlos como estructuras prototipos (líder) en la búsqueda y optimización de principios quimioterapéuticos.

El uso de los derivados bencimidazólicos como agentes antiparasitarios inició con el descubrimiento del Tiabendazol en 1961. No obstante que este compuesto poseía un amplio espectro de actividad antihelmíntica tenía la desventaja de ser rápidamente biotransformado a su metabolito inactivo, el 5-Hidroxitiabendazol. Para evitar la inactivación metabólica se desarrollaron análogos del Tiabendazol con diferentes sustituyentes en la posición 5; posteriormente, se llevó a cabo el diseño y la síntesis de nuevos derivados sustituidos también en la posición 2, dando origen a los bencimidazol-2-carbamatos de metilo (Townsend y Wise, 1990). De este grupo destacan el Albendazol y el Mebendazol (Figura 5), fármacos utilizados actualmente en el tratamiento de diversas helmintosis a nivel gastrointestinal y sistémico.

Tomando en cuenta que el citoesqueleto y el disco ventral de *G. intestinalis* están constituidos principalmente por microtúbulos de la proteína β -tubulina y que el Albendazol y Mebendazol, ejercen su actividad antiparasitaria interactuando con esta proteína, se pensó que dichos derivados bencimidazólicos podrían presentar actividad giardicida. De esta manera dio inicio el estudio de la actividad antiprotozoaria *in vitro* de estos compuestos (Cedillo y Muñoz, 1992; Edlind y cols., 1990; Melloni y cols., 1990; Reynoldson y cols., 1992).

Los ensayos realizados por Cedillo y Muñoz en 1992, confirmaron la actividad giardicida *in vitro* de ambos derivados bencimidazólicos, siendo el Albendazol más potente que el Mebendazol y que el Metronidazol, fármaco de elección en el tratamiento de la giardiosis (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad giardicida *in vitro* del Albendazol, Mebendazol y Metronidazol

| Compuesto | CI ₅₀ (µg/mL) | CI ₅₀ (µM) | CI ₉₀ (µg/mL) | CI ₉₀ (µM) |
|--------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
| Albendazol | 0.010 | 0.038 | 0.020 | 0.075 |
| Mebendazol | 0.060 | 0.203 | 0.130 | 0.440 |
| Metronidazol | 0.210 | 1.23 | 1.28 | 7.49 |

CI₅₀: concentración de fármaco que inhibe el crecimiento poblacional en un 50%

CI₉₀: concentración de fármaco que inhibe el crecimiento poblacional en un 90%

Sin embargo, los resultados anteriores no se reflejaron en los ensayos *in vivo*, ya que la eficacia del Albendazol fue muy similar a la del Metronidazol al requerirse en ambos casos de 7 a 10 días de tratamiento en dosis similares (Gardner y Hill, 2001). Uno de los puntos para explicar esta diferencia consiste en mencionar que el Albendazol es un compuesto que presenta baja solubilidad acuosa (0.004 mg/mL), comportamiento atribuido a la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares y a la presencia del sustituyente carbamato de metilo en posición 2. Esta baja solubilidad no le permite al fármaco disolverse en cantidades suficientes para actuar a nivel de duodeno y yeyuno en el tiempo de tránsito de 2 a 3 horas.

Aunque la poca solubilidad acuosa no ha sido crucial en el tratamiento de infecciones por helmintos gastrointestinales, si ha limitado el uso del Albendazol en infecciones extraintestinales (Townsend y Wise, 1990). Además, es importante destacar que aun refiriéndose a infecciones intestinales, el efecto de estos derivados bencimidazólicos es variado. Por ejemplo, el Albendazol ha sido utilizado con buenos resultados como agente giardicida pero no así como amebicida. Esto se debe a que el citoesqueleto de *Entamoeba histolytica* está formado principalmente por actina en lugar de tubulina, además de que el daño más visible sobre *G. intestinalis* se presenta a nivel del disco ventral, estructura que únicamente se encuentra en este parásito y que promueve la adhesión del trofozoito a las células epiteliales. Esta característica propia de *G. intestinalis* también marca la diferencia sobre la actividad tricomonocida del Albendazol. Ensayos *in vitro* muestran este comportamiento (Tabla 2) (Cedillo y cols., 2002).

Tabla 2. Actividad antiprotozoaria *in vitro* del Albendazol

| Parásito | CI ₅₀ (µg/mL) | CI ₅₀ (µM) | CI ₉₀ (µg/mL) | CI ₉₀ (µM) |
|------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
| <i>G. intestinalis</i> | 0.010 | 0.038 | 0.020 | 0.075 |
| <i>T. vaginalis</i> | 0.422 | 1.59 | 3.29 | 12.4 |
| <i>E. histolytica</i> | 15.0 | 56.5 | >20.0 | ----- |

Asimismo, estudios realizados mediante microscopía electrónica mostraron que el Albendazol provocó alteraciones más evidentes en la morfología de los trofozoitos de *G. intestinalis* que en los de *T. vaginalis* y *E. histolytica* (Cedillo y cols., 2002; Chávez y cols., 1992; Oxberry y cols., 1994).

1.4.1. Modificaciones estructurales al anillo bencimidazólico

Con la finalidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas que permitan superar las limitaciones del Albendazol, nuestro grupo de investigación ha diseñado y sintetizado una amplia variedad de derivados bencimidazólicos con diversos sustituyentes en las posiciones 1,2,5 y 6. En varios casos, las modificaciones permitieron mejorar las propiedades fisicoquímicas de las moléculas y por lo tanto conferirles mejores características de solubilidad y actividad antiprotozoaria.

Dentro de los diferentes grupos que se han introducido en la posición 2 del anillo bencimidazólico, los sustituyentes metiltio y trifluorometilo han arrojado resultados prometedores. Se consideró al grupo metiltio por su capacidad de aumentar la liposolubilidad y la absorción de la molécula, como en el caso del Triclabendazol (Boray y cols., 1983; Turner y cols., 1984). Por su parte, se eligió al grupo trifluorometilo por ser un sustituyente presente en diversos compuestos con amplio espectro de actividad biológica.

Asimismo, se han llevado a cabo sustituciones adicionales a estos derivados bencimidazólicos. Estas modificaciones estructurales se realizaron de acuerdo a las siguientes consideraciones: 1) grupo metilo en posición 1 para evitar el efecto tautomérico, 2) halógenos, principalmente cloro, en las posiciones 5 y 6 para aumentar

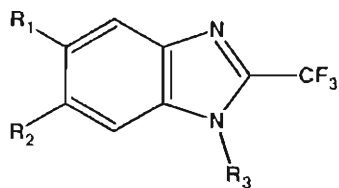
la liposolubilidad de la molécula y 3) grupo carboxamida en la posición 5 ya que es un sustituyente que se encuentra en varios compuestos con actividad antihelmíntica (Gupta y cols., 1990).

La actividad antiparasitaria de los derivados bencimidazólicos que presentan el patrón de sustitución anterior se determinó en helmintos, como *Trichinella spiralis*, y en protozoarios, como *G. intestinalis*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*. Los resultados que se muestran en las Tablas 3 y 4 corresponden únicamente a la evaluación *in vitro* de la actividad giardicida, ya que de este parásito se tiene la información más completa (López, 2005; Navarrete y cols., 2001; Reza, 2005; Sánchez, 1999; Valdez y cols., 2002; Vargas, 2002).

Como se puede apreciar en las Tablas 3 y 4, los derivados bencimidazólicos evaluados presentaron una mejor actividad giardicida que el Metronidazol, excepto los compuestos **1** y **14** que corresponden a los ácidos carboxílicos. En general, los derivados del 2-(metiltio)bencimidazol (Tabla 4) mostraron una actividad giardicida mayor que los derivados del 2-(trifluorometil)bencimidazol (Tabla 3); los compuestos **16**, **18**, **19**, **21** y **23** fueron más activos que el Albendazol. Los derivados del 2-(metiltio)bencimidazol sustituidos con un grupo metilo en la posición 1 y un cloro en la posición 5 y/o 6, tuvieron una actividad giardicida similar a sus análogos no metilados. Sin embargo, los derivados **22-25** con sustituyentes del tipo carboxamida en la posición 5 y que no se encontraban metilados en la posición 1, presentaron una mejor actividad que sus análogos metilados.

Lo anterior sugiere que aunque existan reportes donde se señala que el átomo de hidrógeno en la posición 1 no es determinante para la actividad antiprotozoaria, en algunos casos como en los derivados del 2-(metiltio)bencimidazol con sustituyente carboxamida en la posición 5, el hidrógeno es más conveniente ya que confiere a la molécula una mejor actividad giardicida.

Tabla 3. Actividad giardicida *in vitro* de derivados del 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol

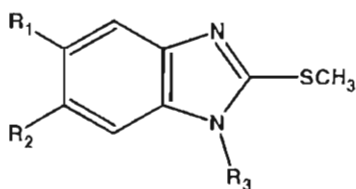


| COMPUESTO | R ₁ | R ₂ | R ₃ | Cl ₅₀ (μM) |
|--------------|--|----------------|-----------------|-----------------------|
| 1 | COOH | H | H | 3.010 |
| 2 | H | H | H | 0.107 |
| 3 | Cl | H | H | 1.282 |
| 4 | Cl | Cl | H | 0.078 |
| 5 | H | H | CH ₃ | 0.064 |
| 6 | Cl | H | CH ₃ | 0.042 |
| 7 | H | Cl | CH ₃ | 0.127 |
| 8 | Cl | Cl | CH ₃ | 0.260 |
| 9 | CONH ₂ | H | H | 0.174 |
| 10 | CONHCH ₃ | H | H | 0.320 |
| 11 | CON(CH ₃) ₂ | H | H | 0.099 |
| 12 | CONHC ₂ H ₅ | H | H | 0.206 |
| 13 | CON(C ₂ H ₅) ₂ | H | H | 0.070 |
| Albendazol | | | | 0.037 |
| Metronidazol | | | | 1.220 |

Por otro lado, la importancia del desarrollo de nuevos derivados bencimidazólicos no sólo radica en el éxito de los resultados de la evaluación biológica *in vitro* sino también en la búsqueda de moléculas que ejerzan su actividad antiparasitaria mediante un mecanismo de acción diferente al de los bencimidazol-2-carbamatos de metilo. A este respecto, el estudio del mecanismo de acción de los compuestos **2-8** y **15-21** mostró que aun cuando éstos tuvieron actividad giardicida, no inhibieron la polimerización de la tubulina *in vitro*. Lo anterior pudo deberse a que no presentaron el patrón de sustitución requerido para ejercer dicho mecanismo de acción: un átomo de hidrógeno en la posición 1 y un grupo carbamato de metilo en la posición 2 (Navarrete y

cols., 2001; Valdez y cols., 2002). Asimismo, cabe mencionar que los derivados bencimidazólicos con sustituyentes del tipo carboxamida en posición 5 presentaron buena actividad giardicida (Tablas 3 y 4).

Tabla 4. Actividad giardicida *in vitro* de derivados del 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol



| COMPUESTO | R ₁ | R ₂ | R ₃ | CI ₅₀ (μM) |
|--------------|--|----------------|-----------------|-----------------------|
| 14 | COOH | H | H | 21.764 |
| 15 | H | H | H | 0.045 |
| 16 | Cl | H | H | 0.005 |
| 17 | Cl | Cl | H | 0.227 |
| 18 | H | H | CH ₃ | 0.033 |
| 19 | Cl | H | CH ₃ | 0.028 |
| 20 | H | Cl | CH ₃ | 0.122 |
| 21 | Cl | Cl | CH ₃ | 0.024 |
| 22 | CONH ₂ | H | H | 0.070 |
| 23 | CONHCH ₃ | H | H | 0.018 |
| 24 | CON(CH ₃) ₂ | H | H | 0.072 |
| 25 | CONHC ₂ H ₅ | H | H | 0.085 |
| 26 | CON(C ₂ H ₅) ₂ | H | H | 0.346 |
| 27 | CONH ₂ | H | CH ₃ | 0.253 |
| 28 | CONHCH ₃ | H | CH ₃ | 0.225 |
| 29 | CON(CH ₃) ₂ | H | CH ₃ | 0.108 |
| 30 | CONHC ₂ H ₅ | H | CH ₃ | 0.242 |
| 31 | CON(C ₂ H ₅) ₂ | H | CH ₃ | 0.068 |
| Albendazol | | | | 0.037 |
| Metronidazol | | | | 1.220 |

1.4.2. Híbridos de derivados bencimidazólicos con 2-amino-5-nitrotiazol

Dentro de los métodos generales para la obtención de fármacos mediante modificación molecular se encuentra el proceso de asociación molecular, el cual se basa en la unión de dos estructuras con una determinada actividad, con el fin de potenciarla. La nueva molécula formada incorpora algunas o todas las agrupaciones de los compuestos originales; cuando la asociación es de partes distintas o mixtas por formación de enlace covalente entonces dicho proceso se denomina hibridación molecular (Avendaño, 1993; Korolkovas y Burckhalter, 1979).

Actualmente, nuestro grupo de investigación está interesado en el desarrollo de moléculas híbridas con posible actividad antiparasitaria. La importancia de la evaluación de este tipo de moléculas radica en el interés por conocer qué efecto sobre la actividad biológica tendrá la unión de la parte farmacofórica proveniente de moléculas que han presentado muy buena actividad antiparasitaria, ejercida a través de un mecanismo de acción diferente.

Por tal motivo, para la formación de las moléculas híbridas evaluadas en este trabajo de tesis se consideraron algunos derivados del 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol y del 2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol, y el grupo 5-nitro-1,3-tiazol-2-amino, un derivado del 5-nitrotiazol, el cual forma parte de la Nitazoxanida y de su metabolito activo, la Tizoxanida (Figura 7).

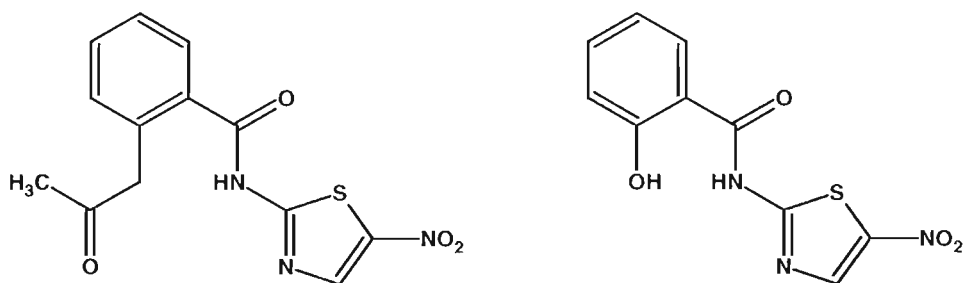


Figura 7. Estructura de la Nitazoxanida y la Tizoxanida.

La Nitazoxanida ha presentado buena actividad antiprotozoaria (Tabla 5) y no existen reportes de efectos adversos o resistencia (Cedillo y cols., 2002).

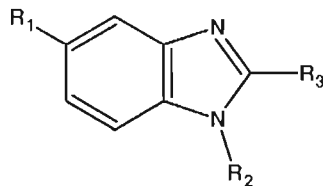
Tabla 5. Actividad antiprotozoaria de la Nitazoxanida, el Albendazol y el Metronidazol

| Parásito | Compuesto | CI ₅₀ (μg/mL) | CI ₅₀ (μM) | CI ₉₀ (μg/mL) | CI ₉₀ (μM) |
|------------------------|--------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
| <i>E. histolytica</i> | Nitazoxanida | 0.017 | 0.055 | 0.776 | 2.53 |
| | Albendazol | 15.0 | 56.5 | >20.0 | ----- |
| | Metronidazol | 0.060 | 0.351 | 1.12 | 6.55 |
| <i>G. Intestinalis</i> | Nitazoxanida | 0.004 | 0.013 | 0.067 | 0.218 |
| | Albendazol | 0.010 | 0.038 | 0.020 | 0.075 |
| | Metronidazol | 0.210 | 1.23 | 1.28 | 7.49 |
| <i>T. vaginalis</i> | Nitazoxanida | 0.034 | 0.111 | 2.05 | 6.66 |
| | Albendazol | 0.422 | 1.59 | 3.29 | 12.4 |
| | Metronidazol | 0.037 | 0.216 | 0.169 | 0.988 |

De acuerdo a lo anterior, en la parte experimental de este trabajo de tesis se llevará a cabo la evaluación de la actividad giardicida y tricomonocida *in vitro* de cuatro híbridos de derivados bencimidazólicos con el 2-amino-5-nitrotiazol (**VMAS-60**, **VMAS-62**, **VMAS-72** y **VMAS-74**) así como de un híbrido no nitrado denominado **preVMAS-72** y del ácido 1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**PVB-K**), uno de los metabolitos del híbrido **VMAS-62** (Tabla 6).

La decisión de evaluar 2 compuestos, uno nitrado (**VMAS-72**) y otro no nitrado (**preVMAS-72**), se tomó con el fin de observar el efecto de la presencia o la ausencia del grupo nitro sobre la actividad biológica de los híbridos formados, ya que resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación con el 2-amino-5-nitrotiazol y el 2-aminotiazol, demostraron que ambos compuestos tuvieron buena actividad giardicida *in vitro*, con valores de CI₅₀ de 0.372 y 0.260μM, respectivamente, sugiriendo que la presencia del grupo nitro no es indispensable para que se presente la actividad giardicida.

Tabla 6. Derivados bencimidazólicos a evaluar



| Compuesto | R ₁ | R ₂ | R ₃ | Peso Molecular | Nombre |
|-------------------|----------------|-----------------|------------------|----------------|--|
| PVB-K | OH | H | SCH ₃ | 208.238 | Acido 1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico |
| VMAS-60 | A | H | CF ₃ | 357.269 | <i>N</i> -(5-Nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida |
| VMAS-62 | A | H | SCH ₃ | 335.364 | 2-(Metiltio)- <i>N</i> -(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida |
| VMAS-72 | A | CH ₃ | CF ₃ | 371.296 | 1-Metil- <i>N</i> -(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida |
| VMAS-74 | A | CH ₃ | SCH ₃ | 349.390 | 1-Metil-2-(metiltio)- <i>N</i> -(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida |
| preVMAS-72 | B | CH ₃ | CF ₃ | 326.298 | 1-Metil- <i>N</i> -(1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida |

A: 5-nitro-1,3-tiazol-2-amino

B: 1,3-tiazol-2-amino

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Qué efecto sobre la actividad giardicida y tricomonicida tendrá la unión de moléculas del bencimidazol y el tiazol que presentaron buena actividad antiprotozoaria de forma individual?

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar la actividad giardicida y tricomonicida *in vitro* de **PVB-K, VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72, VMAS-74** y **preVMAS-72**.

3.2. Objetivos particulares

3.2.1. Curvas de crecimiento de trofozoitos *G. intestinalis* y *T. vaginalis*.

3.2.2. Determinar la CI_{50} y la CI_{90} de Albendazol, Nitazoxanida, Tizoxanida, **PVB-K, VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72, VMAS-74** y **preVMAS-72** contra *G. intestinalis* y *T. vaginalis*, mediante el método de subcultivo y análisis Probit.

3.2.3. Explorar la estabilidad química de **VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72** y **VMAS-74** en los medios de cultivo mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1. Curvas de crecimiento de trofozoitos de *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*

A partir de cultivos axénicos de trofozoitos de *G. intestinalis*, cepa IMSS:0989:1, y *T. vaginalis*, cepa GT3, se llevaron a cabo las curvas de crecimiento correspondientes.

Inicialmente, se eligió uno de los tubos con cultivo axénico de trofozoitos de *G. intestinalis*, con una confluencia del 100% (presencia de una monocapa). En el caso de *T. vaginalis*, se eligió uno de los tubos donde se observó la presencia de acúmulos de trofozoitos, ya que, a diferencia de *G. intestinalis*, *T. vaginalis* no forma una monocapa. A continuación, los tubos se colocaron en un baño de hielo por 10 min.; posteriormente, se realizó una dilución 1:10 (100µL de cultivo axénico + 900µL de medio de cultivo) y se obtuvo la concentración celular (trofozoitos/mL). Tomando en cuenta el número de trofozoitos por cada mililitro de suspensión, se determinó el volumen necesario para tener una cantidad de $5 \cdot 10^4$ y $6 \cdot 10^3$ trofozoitos de *G. intestinalis* y *T. vaginalis* respectivamente. La curva de crecimiento se desarrolló bajo los siguientes criterios (Tabla 7).

Tabla 7. Curvas de crecimiento de trofozoitos de *G. intestinalis* y *T. vaginalis*

| # tubos | Período de incubación (h) | Inóculo de trofozoitos | Volumen final con medio de cultivo (mL) |
|---------|---------------------------|---------------------------------|---|
| 3 | 24 | $5 \cdot 10^4$ ó $6 \cdot 10^3$ | 1 |
| 3 | 48 | $5 \cdot 10^4$ ó $6 \cdot 10^3$ | 1 |
| 3 | 72 | $5 \cdot 10^4$ ó $6 \cdot 10^3$ | 1 |
| 3 | 96 | $5 \cdot 10^4$ ó $6 \cdot 10^3$ | 1 |

Incubación: 37°C

Transcurrido el tiempo de cada período de incubación, los tubos se colocaron en un baño de hielo durante 1h y se llevó a cabo el conteo de trofozoitos. El número promedio de trofozoitos obtenido se graficó con respecto al tiempo, para determinar el

momento en el cuál los trofozoitos de *G. intestinalis* y *T. vaginalis* se encontraron en la fase logarítmica de crecimiento.

4.2. Determinación de la CI_{50} y la CI_{90} *in vitro* de Albendazol, Nitazoxanida, Tizoxanida, **PVB-K**, **VMAS-60**, **VMAS-62**, **VMAS-72**, **VMAS-74** y **preVMAS-72** contra trofozoitos de *G. intestinalis* y *T. vaginalis*, mediante el método de subcultivo

4.2.1. Desarrollo del método de subcultivo

La evaluación de la actividad antiprotozoaria de los compuestos híbridos se realizó de acuerdo a lo descrito por Cedillo y Muñoz (1992). Para esto, 5×10^4 y 6×10^3 trofozoitos de *G. intestinalis* y *T. vaginalis* respectivamente, se incubaron a 37°C por 48h en medio de cultivo libre de compuestos y en medio de cultivo con las diferentes concentraciones de los controles, Albendazol, Nitazoxanida y Tizoxanida, y de los compuestos a evaluar (Tablas 8 y 9).

Tabla 8. Concentraciones de los compuestos a evaluar contra *G. intestinalis*

| Compuesto | Concentración (µg/mL) |
|-------------------|---|
| Albendazol | 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 |
| Nitazoxanida | 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 |
| Tizoxanida | 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 |
| PVB-K | 0.004, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 |
| VMAS-60 | 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 |
| VMAS-62 | 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 |
| VMAS-72 | 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 |
| VMAS-74 | 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 |
| preVMAS-72 | 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 |

Tabla 9. Concentraciones de los compuestos a evaluar contra *T. vaginalis*

| Compuesto | Concentración (µg/mL) |
|-------------------|---|
| Albendazol | 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 |
| Nitazoxanida | 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 |
| Tizoxanida | 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 |
| PVB-K | 0.004, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 |
| VMAS-60 | 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 |
| VMAS-62 | 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 |
| VMAS-72 | 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 |
| VMAS-74 | 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 |
| preVMAS-72 | 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 |

El Albendazol, la Nitazoxanida y la Tizoxanida se consideraron como controles positivos y los tubos con medio de cultivo e inóculo de trofozoitos, como control negativo. Cada experimento se realizó por triplicado y repitió dos veces.

Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se colocaron en un baño de hielo por 1h para promover el desprendimiento de los trofozoitos de la pared del tubo. Posteriormente, se subcultivaron 50µL de trofozoitos en 950µL de medio de cultivo libre de compuestos e incubaron nuevamente a 37°C por 48h. Al término de la incubación, los tubos se colocaron en un baño de hielo por 1h y se llevó a cabo el conteo de trofozoitos. La cuenta final de trofozoitos reportada fue el promedio del número de los mismos presentes en cada tubo.

Al número de trofozoitos correspondiente al control negativo, se le restó el número de trofozoitos de cada concentración del compuesto evaluado; el valor resultante se consideró como el número de trofozoitos muertos. La determinación de la CI_{50} y la CI_{90} de cada compuesto se realizará mediante análisis Probit, introduciendo en el programa computacional las concentraciones utilizadas y el número correspondiente de trofozoitos muertos.

4.3. Exploración de la estabilidad química de los híbridos **VMAS-60**, **VMAS-62**, **VMAS-72** y **VMAS-74** en los medios de cultivo mediante CLAR

Para realizar la exploración de la estabilidad química de los híbridos en los medios de cultivo, se utilizó una columna Symmetry Shield RP₁₈; como fase móvil una mezcla acetonitrilo/agua con 0.5% de ácido acético; un flujo de 0.6mL/min con gradiente (ver Anexo II), una longitud de onda de 298nm y un tiempo de muestreo de 10 min.

En primer lugar se inyectaron 100μL de una mezcla de solución Stock del compuesto (10mg/mL) y 500μL de ACN, para obtener el cromatograma de cada uno de los híbridos evaluados, así como del compuesto **PVB-K**, metabolito del híbrido **VMAS-62**. A continuación se llevó a cabo la preparación de la mezcla del compuesto con medio de cultivo, para obtener una concentración aproximada de 100μM; esta mezcla se incubó a 37°C por 48h y agitación de 700rpm, simulando las condiciones de trabajo manejadas durante la evaluación de la actividad biológica. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron 40μL de la mezcla y adicionaron 60μL de H₂O y 900μL de ACN; esta nueva mezcla se incubó a 4°C por 10min y agitación de 8000rpm. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.45μm y un volumen de 100μL del filtrado obtenido se inyectó. El procedimiento anterior se realizó con el fin de determinar la presencia del híbrido o sus posibles metabolitos generados, durante el tiempo de incubación, a través de alguna reacción de hidrólisis.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Curvas de crecimiento de trofozoitos de *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*

En las Figuras 8 y 9 se muestran las curvas de crecimiento de trofozoitos de *G. intestinalis* y *T. vaginalis*. En ambas curvas se logra apreciar claramente el comportamiento del crecimiento de los parásitos: la fase logarítmica se alcanzó entre las 24 y 48h de incubación, la fase estacionaria se inició aproximadamente a las 50h y la fase de muerte se presentó alrededor de las 72 h.

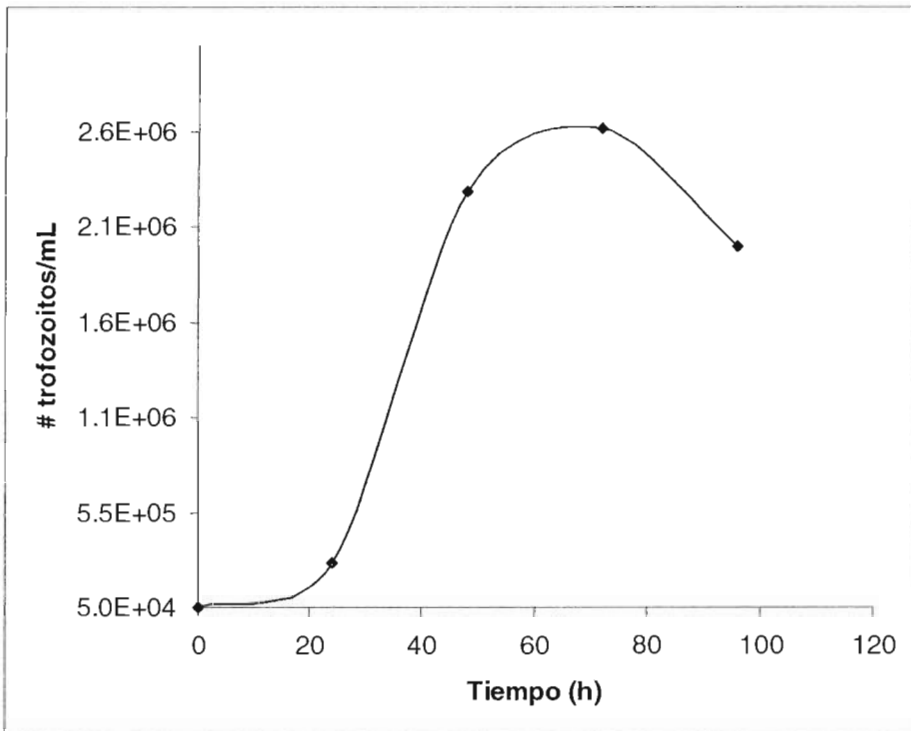


Figura 8. Curva de crecimiento de trofozoitos de *G. intestinalis*.

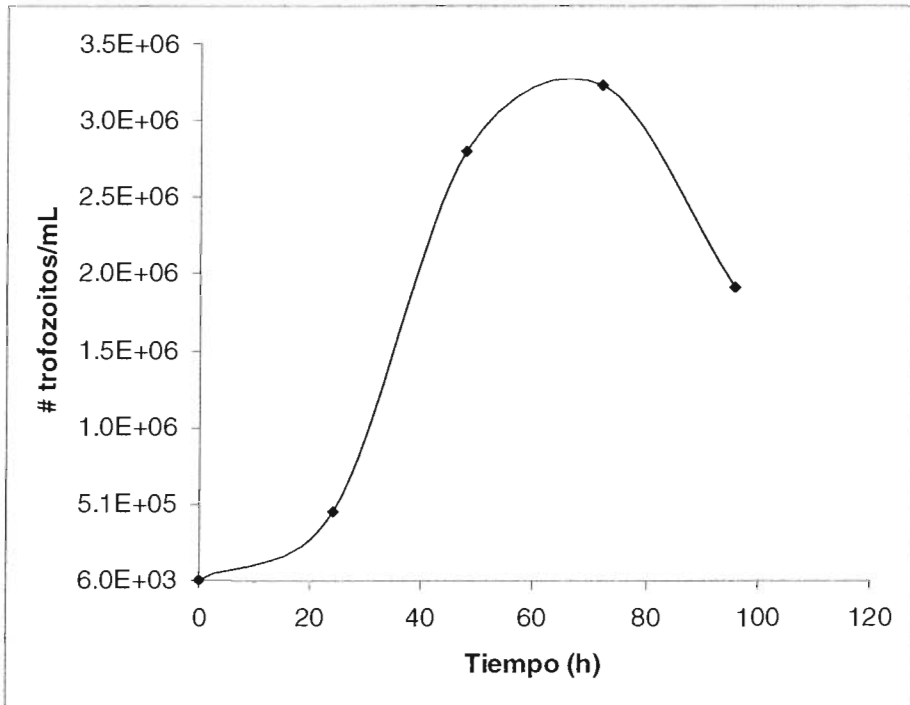


Figura 9. Curva de crecimiento de trofozoitos de *T. vaginalis*.

Los resultados anteriores sirvieron como base para el desarrollo del método de subcultivo, ya que éste se lleva a cabo en 2 intervalos de 48 h cada uno, tiempo en el cual los parásitos deben encontrarse en la fase logarítmica de crecimiento.

5.2. Determinación de la CI_{50} y la CI_{90} *in vitro* de Albendazol, Nitazoxanida, Tizoxanida, **PVB-K**, **VMAS-60**, **VMAS-62**, **VMAS-72**, **VMAS-74** y **preVMAS-72** contra trofozoitos de *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*, mediante el método de subcultivo

A continuación se presentan los resultados de la actividad giardicida y tricomonocida *in vitro* de los compuestos evaluados. En primer término, se muestran los datos correspondientes a la CI_{50} y la CI_{90} de dichos compuestos, así como las gráficas de efectividad comparada contra *G. intestinalis* y, posteriormente, contra *T. vaginalis*.

5.2.1. Actividad giardicida *in vitro* de Albendazol, Nitazoxanida, Tizoxanida, **PVB-K**, **VMAS-60**, **VMAS-62**, **VMAS-72**, **VMAS-74** y **preVMAS-72**

En la Tabla 10 se muestra la actividad giardicida *in vitro* de los compuestos evaluados, representada por la CI_{50} y la CI_{90} .

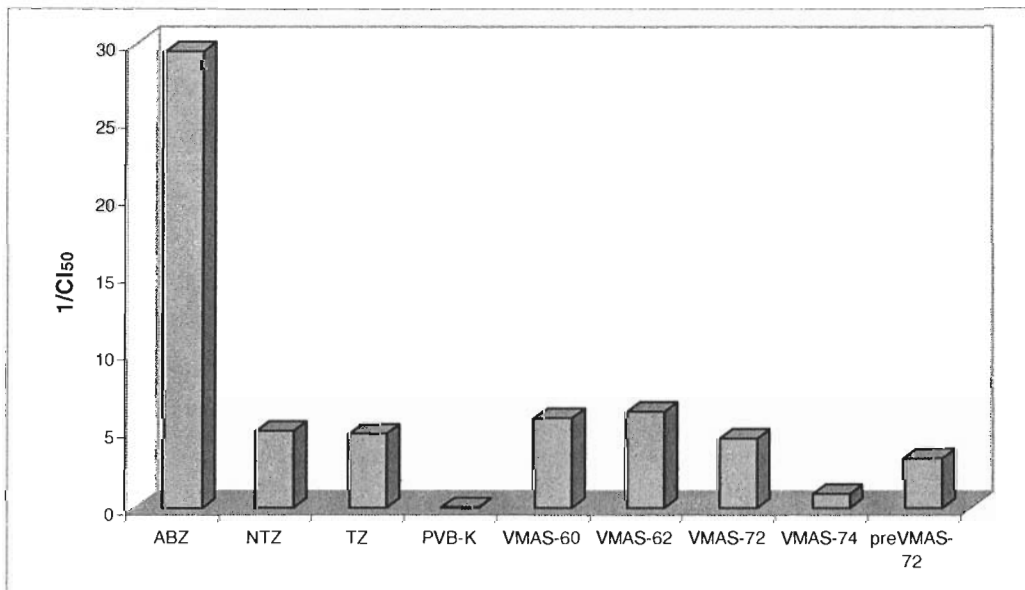
Tabla 10. Actividad giardicida *in vitro* de los compuestos evaluados

| Compuesto | CI_{50} | | CI_{90} | |
|-------------------|------------------|---------------|------------------|---------------|
| | $\mu\text{g/mL}$ | μM | $\mu\text{g/mL}$ | μM |
| Albendazol | 0.009 | 0.034 | 0.100 | 0.377 |
| Nitazoxanida | 0.062 | 0.202 | 0.459 | 1.492 |
| Tizoxanida | 0.056 | 0.209 | 0.834 | 3.144 |
| PVB-K | 4.532 | 21.764 | 178535.1 | 857360.8 |
| VMAS-60 | 0.062 | 0.172 | 0.608 | 1.700 |
| VMAS-62 | 0.054 | 0.161 | 0.459 | 1.367 |
| VMAS-72 | 0.083 | 0.224 | 0.518 | 1.395 |
| VMAS-74 | 0.383 | 1.095 | 31.645 | 90.571 |
| preVMAS-72 | 0.101 | 0.310 | 0.821 | 2.515 |

En las Figuras 10 y 11 se presentan las gráficas de efectividad comparada de los compuestos evaluados contra trofozoitos de *G. intestinalis*. Este parámetro se obtuvo mediante el inverso de la CI_{50} y la CI_{90} de cada compuesto; de acuerdo a lo anterior, la actividad antiprotozoaria será mayor mientras mayor sea el valor del inverso de la concentración (Tabla 11).

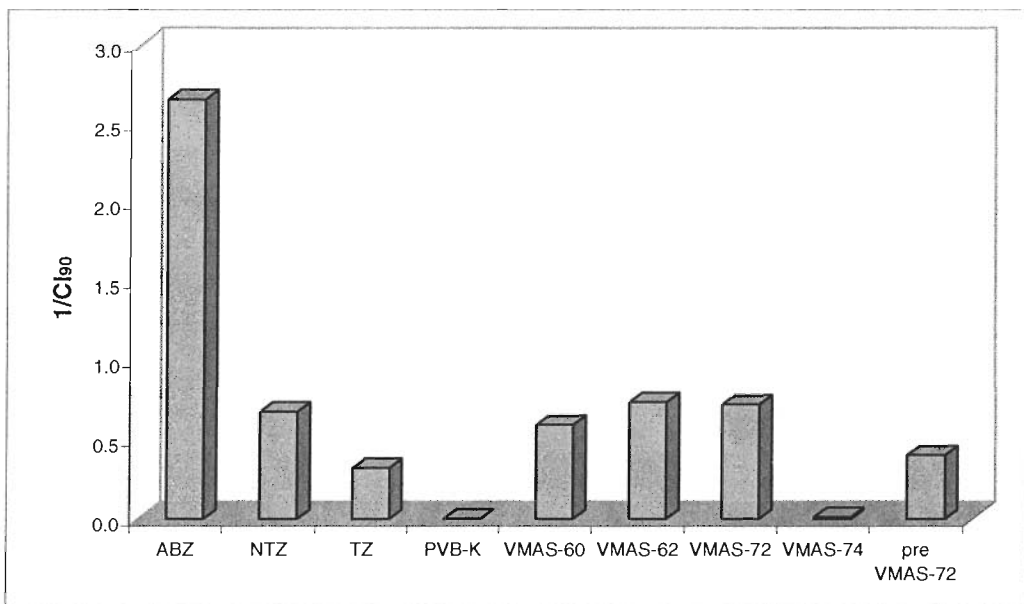
Tabla 11. Efectividad comparada de los compuestos evaluados contra trofozoitos de *G. intestinalis* representada por el inverso de la CI₅₀ y la CI₉₀

| Compuesto | 1/CI ₅₀ | 1/CI ₉₀ |
|-------------------|--------------------|--------------------|
| Albendazol | 29.481 | 2.653 |
| Nitazoxanida | 4.956 | 0.670 |
| Tizixanida | 4.779 | 0.318 |
| PVB-K | 0.046 | 0 |
| VMAS-60 | 5.809 | 0.588 |
| VMAS-62 | 6.210 | 0.731 |
| VMAS-72 | 4.473 | 0.717 |
| VMAS-74 | 0.913 | 0.011 |
| preVMAS-72 | 3.231 | 0.398 |



ABZ: Albendazol, NTZ: Nitazoxanida, TZ: Tizoxanida

Figura 10. Efectividad comparada de los compuestos evaluados contra trofozoitos de *G. intestinalis*.



ABZ: Albendazol, NTZ: Nitazoxanida, TZ: Tizoxanida

Figura 11. Efectividad comparada de los compuestos evaluados contra trofozoitos de *G. intestinalis*.

Como se puede apreciar en las Tablas 10 y 11 y en las Figuras 10 y 11, la actividad giardicida del Albendazol fue superior a la de los otros controles, Nitazoxanida y Tizoxanida, y demás moléculas evaluadas.

Los valores obtenidos de CI_{50} y CI_{90} para la Nitazoxanida fueron diferentes a aquellos previamente obtenidos por nuestro grupo de investigación (Cedillo y cols., 2002), ya que durante el desarrollo experimental de este trabajo de tesis se utilizó un lote de fabricación distinto al usado anteriormente.

La Nitazoxanida presentó una actividad giardicida similar a su metabolito, la Tizoxanida, tomando en cuenta el valor de la CI_{50} ; sin embargo, el valor de la CI_{90} de la Tizoxanida fue aproximadamente 2 veces mayor que el de la Nitazoxanida, lo que indica que ésta fue ligeramente más activa que su metabolito.

Los compuestos **VMAS-60**, **VMAS-62**, **VMAS-72** y **preVMAS-72** mostraron un comportamiento similar a la Nitazoxanida y la Tizoxanida; los compuestos **PVB-K** y

VMAS-74 tuvieron una actividad muy modesta comparada con las demás moléculas estudiadas.

Con respecto a la relación estructura-actividad se obtuvieron los siguientes resultados:

- El compuesto **VMAS-62**, derivado del 2-(metiltio)bencimidazol y sin sustitución en la posición 1, fue aproximadamente 7 veces más activo que su análogo metilado, el híbrido **VMAS-74**. Lo anterior indica que la modificación en dicha posición afecta considerablemente la actividad giardicida del híbrido.
- El compuesto **VMAS-72**, derivado del 2-(trifluorometil)bencimidazol y sustituido con un grupo metilo en la posición 1, presentó una actividad giardicida similar a su análogo no metilado, el híbrido **VMAS-60**. Lo anterior indica que la modificación en dicha posición no afecta la actividad giardicida de los híbridos.
- El compuesto **VMAS-62** tuvo una actividad giardicida muy similar a su análogo, el híbrido **VMAS-60**. Lo anterior indica que la sustitución en la posición 2 con un grupo metiltio o trifluorometilo, respectivamente, no afecta la actividad giardicida de los híbridos.
- El compuesto **VMAS-72** fue aproximadamente 5 veces más activo que el híbrido **VMAS-74**. La baja actividad giardicida de **VMAS-74** pudo deberse a los problemas de solubilidad.
- Es importante mencionar que el híbrido **VMAS-62**, análogo no metilado de **VMAS-74**, no tuvo problemas de solubilidad. Lo anterior sugiere que la presencia de un grupo metilo en posición 1 junto con el grupo metiltio en posición 2 afectan la solubilidad del compuesto.
- El compuesto **VMAS-72** tuvo una actividad giardicida similar a su análogo no nitrado, el híbrido **preVMAS-72**; lo anterior indica que la presencia del grupo nitro no es fundamental para la actividad giardicida de los híbridos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por nuestro grupo de investigación con el 2-amino-5-nitrotiazol y el 2-aminotiazol.
- El compuesto **VMAS-62** fue alrededor de 100 veces más activo que su metabolito **PVB-K**, lo cual indica que la actividad del híbrido depende de la unión del derivado bencimidazólico con el 2-amino-5 nitrotiazol.

- Todos los híbridos evaluados fueron más activos que el Metronidazol ($CI_{50}=1.228\mu M$, $CI_{90}=7.485\mu M$), fármaco de elección en el tratamiento de la giardiosis; lo anterior corrobora que los derivados bencimidazólicos y los derivados del tiazol son una mejor opción sobre los nitroimidazoles, debido a las diferencias en sus mecanismos de acción.

5.2.2. Actividad tricomonida *in vitro* de Albendazol, Nitazoxanida, Tizoxanida, **PVB-K**, **VMAS-60**, **VMAS-62**, **VMAS-72**, **VMAS-74** y **preVMAS-72**

En la Tabla 12 se muestra la actividad tricomonida *in vitro* de los compuestos evaluados, representada por la CI_{50} y la CI_{90} .

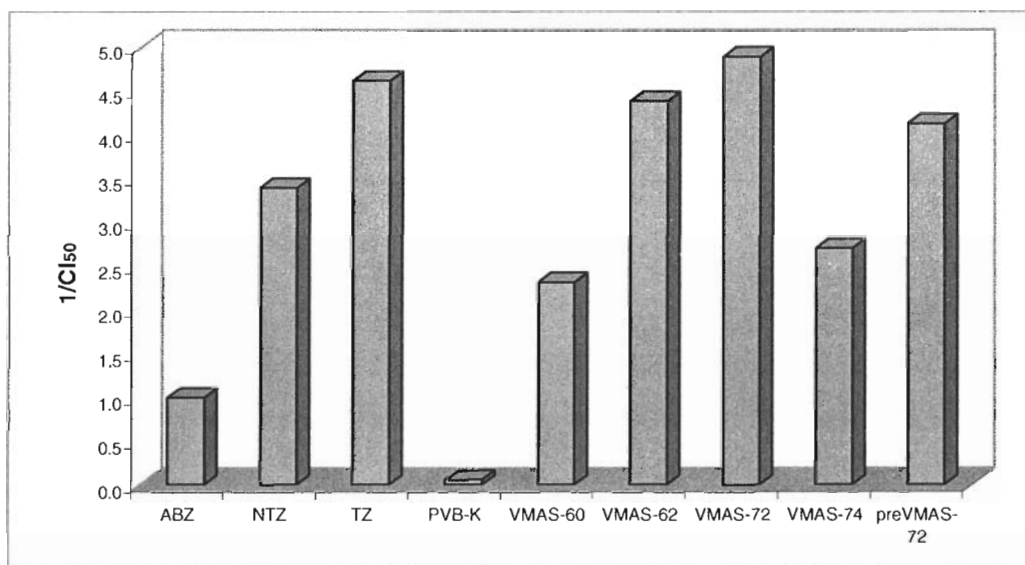
Tabla 12. Actividad tricomonida *in vitro* de los compuestos evaluados

| Compuesto | CI_{50} | | CI_{90} | |
|-------------------|------------|---------|------------|---------|
| | $\mu g/mL$ | μM | $\mu g/mL$ | μM |
| Albendazol | 0.267 | 1.004 | 2.080 | 7.839 |
| Nitazoxanida | 0.091 | 0.295 | 0.890 | 2.895 |
| Tizoxanida | 0.058 | 0.217 | 0.988 | 3.725 |
| PVB-K | 3.405 | 16.351 | 2669.3 | 12818.4 |
| VMAS-60 | 0.155 | 0.432 | 2.986 | 8.358 |
| VMAS-62 | 0.077 | 0.228 | 0.455 | 1.355 |
| VMAS-72 | 0.076 | 0.205 | 0.469 | 1.262 |
| VMAS-74 | 0.130 | 0.371 | 4.326 | 12.380 |
| preVMAS-72 | 0.079 | 0.242 | 0.592 | 1.814 |

En las Figuras 12 y 13 se presentan las gráficas de efectividad comparada de los compuestos evaluados contra trofozoitos de *T. vaginalis* (Tabla 13).

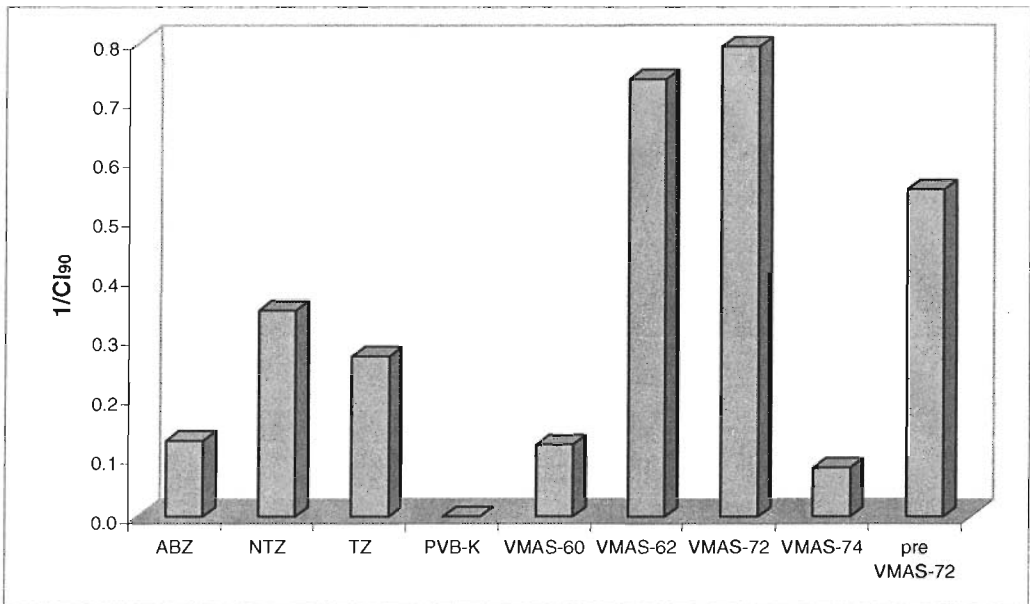
Tabla 13. Efectividad comparada de los compuestos evaluados contra trofozoitos de *T. vaginalis* representada por el inverso de la CI_{50} y la CI_{90}

| Compuesto | $1/CI_{50}$ | $1/CI_{90}$ |
|-------------------|-------------|-------------|
| ABZ | 0.996 | 0.128 |
| NTZ | 3.395 | 0.345 |
| TZ | 4.613 | 0.268 |
| PVB-K | 0.061 | 0 |
| VMAS-60 | 2.312 | 0.120 |
| VMAS-62 | 4.384 | 0.738 |
| VMAS-72 | 4.885 | 0.793 |
| VMAS-74 | 2.698 | 0.081 |
| preVMAS-72 | 4.130 | 0.551 |



ABZ: Albendazol, NTZ: Nitazoxanida, TZ: Tizoxanida

Figura 12. Efectividad comparada de los compuestos evaluados contra trofozoitos de *T. vaginalis*.



ABZ: Albendazol, NTZ: Nitazoxanida, TZ: Tizoxanida

Figura 13. Efectividad comparada de los compuestos evaluados contra trofozoitos de *T. vaginalis*.

Como se puede apreciar en las Tablas 12 y 13 y en las Figuras 12 y 13, la actividad tricomonocida del Albendazol fue menor a la de la Nitazoxanida y la Tizoxanida. Asimismo, la Nitazoxanida presentó una actividad tricomonocida similar a su metabolito, la Tizoxanida.

Los compuestos **VMAS-62**, **VMAS-72** y **preVMAS-72** mostraron una actividad tricomonocida similar a la de la Nitazoxanida y la Tizoxanida y superior a los compuestos **PVB-K**, **VMAS-60** y **VMAS-74**.

Con respecto a la relación estructura-actividad se obtuvieron los siguientes resultados:

- El compuesto **VMAS-62**, derivado del 2-(metiltio)bencimidazol y sin sustitución en la posición 1, fue aproximadamente 1.6 veces más activo que su análogo metilado, el híbrido **VMAS-74**, con respecto a la CI_{50} , y 9 veces más activo con respecto a la

Cl₉₀. Lo anterior indica que el metilo en posición 1 afecta la actividad tricomonocida del híbrido.

- El compuesto **VMAS-72**, derivado del 2-(trifluorometil)bencimidazol y sustituido con un grupo metilo en la posición 1, fue aproximadamente 2 veces más activo que su análogo no metilado, el híbrido **VMAS-60**, con respecto a la Cl₅₀ y 7 veces más activo con respecto a la Cl₉₀. Lo anterior indica que la modificación en dicha posición afecta la actividad tricomonocida del híbrido.
- El compuesto **VMAS-62** fue aproximadamente 2 veces más activo que su análogo, el híbrido **VMAS-60**, con respecto a la Cl₅₀ y 6 veces más activo con respecto a la Cl₉₀. Lo anterior indica que la sustitución en la posición 2 con un grupo metilto confiere mayor actividad tricomonocida al híbrido.
- El compuesto **VMAS-72** fue aproximadamente 2 veces más activo que el híbrido **VMAS-74** con respecto a la Cl₅₀ y 10 veces más activo con respecto a la Cl₉₀. La baja actividad tricomonocida de **VMAS-74** pudo deberse a los problemas de solubilidad.
- El compuesto **VMAS-72** tuvo una actividad tricomonocida similar a su análogo no nitrado, el híbrido **preVMAS-72**. Lo anterior indica que la presencia del grupo nitro no es fundamental para la actividad tricomonocida de los híbridos.
- El compuesto **VMAS-62** fue alrededor de 70 veces más activo que su metabolito **PVB-K**, lo cual indica que la actividad del híbrido depende de la unión del derivado bencimidazólico con el 2-amino-5 nitrotiazol.
- Sólo los compuestos **VMAS-60**, **VMAS-72** y **preVMAS-72** presentaron una actividad tricomonocida similar al Metronidazol, fármaco de elección en el tratamiento de la tricomonosis, considerando el valor de la Cl₅₀ (Cl₅₀=0.216µM, Cl₉₀=0.988µM). Los resultados obtenidos de la actividad tricomonocida de los compuestos híbridos evaluados en este trabajo sugieren que los nitroimidazoles siguen siendo la mejor opción sobre los derivados bencimidazólicos y los derivados del tiazol, debido a la especificidad de su mecanismo de acción: los intermediarios reactivos formados durante la activación del Metronidazol inhiben la síntesis y degradan el ADN, siendo mayor cuanto más contenido de A+T tiene el ADN; *T. vaginalis* tiene un contenido

de A+T mayor del 70%, comparado con el 40% en *G. intestinalis* (Vázquez y cols., 2001).

5.3. Exploración de la estabilidad química de los híbridos **VMAS-60**, **VMAS-62**, **VMAS-72** y **VMAS-74** mediante CLAR

A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos durante la evaluación de la estabilidad química de los híbridos **VMAS-60**, **VMAS-62**, **VMAS-72** y **VMAS-74**; también se muestra el cromatograma del compuesto **PVB-K**, metabolito del híbrido **VMAS-62** y del medio de cultivo utilizado en la evaluación de la actividad biológica (Figuras 14-24).

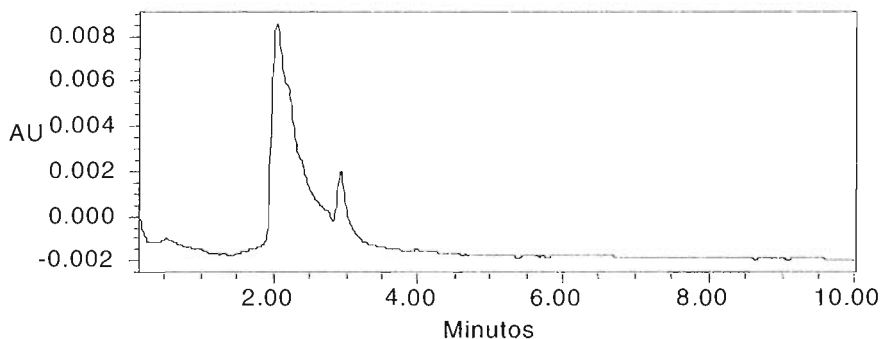


Figura 14. Medio de cultivo.

En este cromatograma se aprecian las señales correspondientes a los componentes del medio de cultivo utilizado en la evaluación de la actividad biológica; dichas señales no se observaron en los demás cromatogramas, lo que indicó que los componentes del medio de cultivo no interfirieron durante el análisis químico.

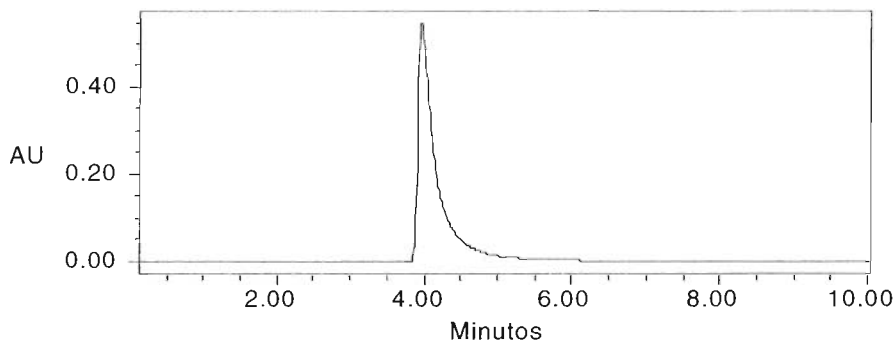


Figura 15. Compuesto **PVB-K**.

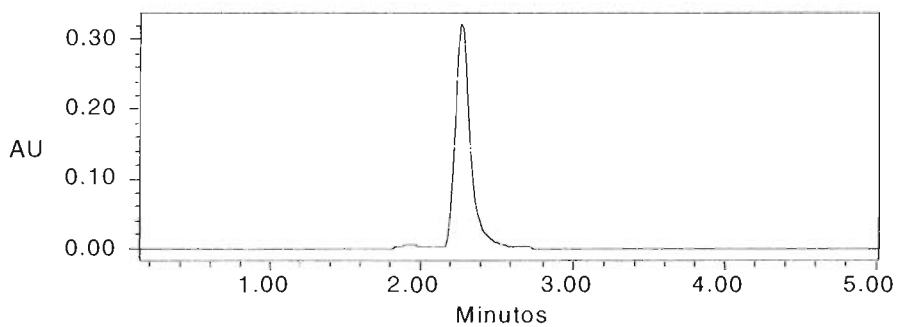


Figura 16. Compuesto **PVB-K** en medio de cultivo.

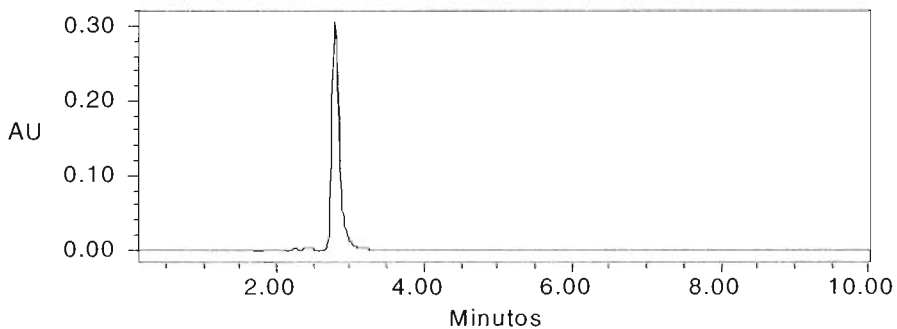


Figura 17. Compuesto **VMAS-60**.

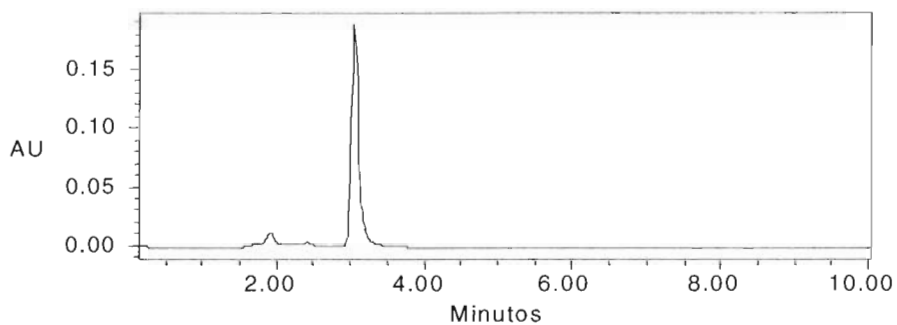


Figura 18. Compuesto **VMAS-60** en medio de cultivo.

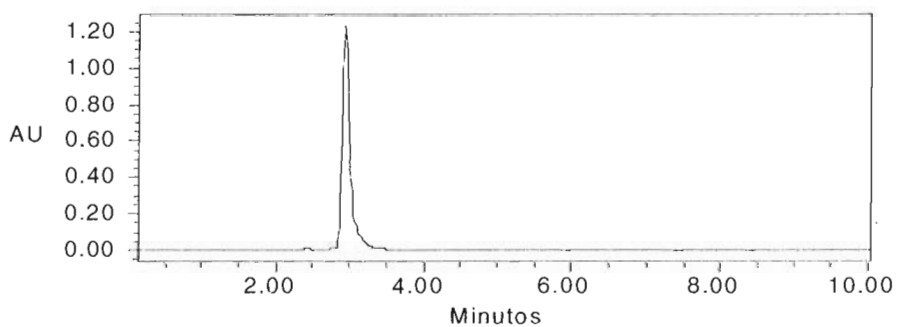


Figura 19. Compuesto **VMAS-62**.

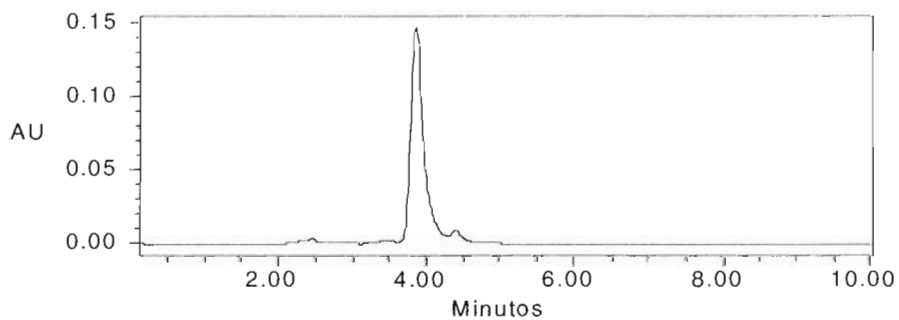


Figura 20. Compuesto **VMAS-62** en medio de cultivo.

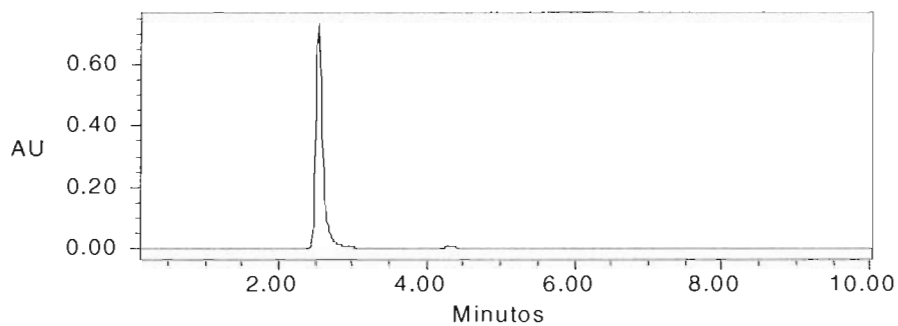


Figura 21. Compuesto **VMAS-72**.

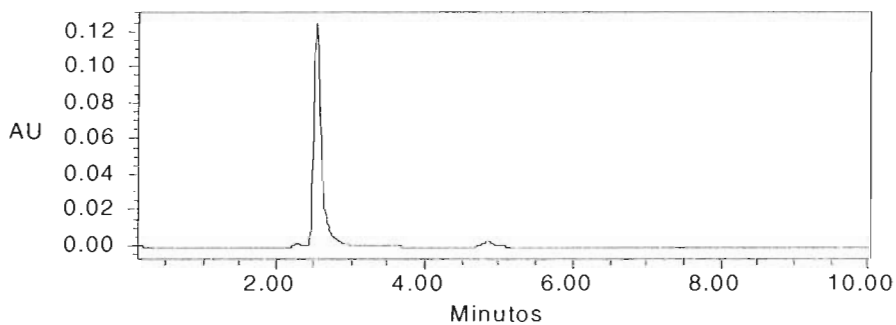


Figura 22. Compuesto **VMAS-72** en medio de cultivo.

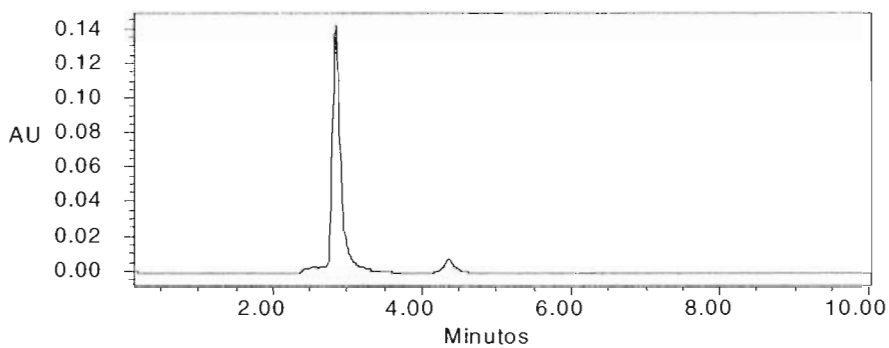


Figura 23. Compuesto **VMAS-74**.

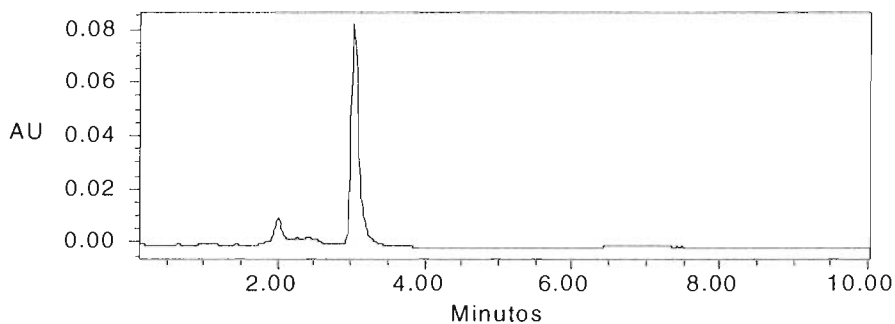


Figura 24. Compuesto **VMAS-74** en medio de cultivo.

En los cromatogramas presentados en las Figuras 18, 20, 22 y 24 se puede apreciar que los híbridos no sufrieron ninguna reacción de hidrólisis, ya que sólo se observaron los picos correspondientes a los compuestos originales y no hubo ninguna señal que indicara la presencia de algún metabolito. Como se mencionó anteriormente, el compuesto **PVB-K** es metabolito del híbrido **VMAS-62**, de manera que si **VMAS-62** hubiera sufrido una reacción de hidrólisis, se hubiera visto la señal de su metabolito, sin embargo en la Figura 20 (**VMAS-62** en medio de cultivo e incubación) se observó únicamente la señal del híbrido en un tiempo aproximado de 4 min.

6. CONCLUSIONES

- Considerando los valores de la CI_{50} , ninguno de los compuestos híbridos evaluados tuvo una actividad giardicida comparable a la del Albendazol. Sin embargo, todos los compuestos presentaron una mayor actividad tricomonida que el Albendazol.
- Todos los híbridos evaluados tuvieron mayor actividad giardicida que el Metronidazol, pero su actividad tricomonida fue menor.
- Los compuestos **VMAS-60**, **VMAS-62** y **VMAS-72** mostraron una actividad giardicida similar a la Nitazoxanida y la Tizoxanida. Los compuestos **VMAS-62**, **VMAS-72** y **preVMAS-72** mostraron una actividad tricomonida similar a la Nitazoxanida y la Tizoxanida.
- La actividad giardicida y tricomonida de los híbridos depende totalmente de la unión del derivado bencimidazólico con el 2-amino-5 nitrotiazol.
- El grupo nitro no es indispensable para la actividad giardicida y tricomonida de los híbridos.
- La introducción de un grupo metilo en la posición 1 del anillo bencimidazólico disminuyó la actividad giardicida de los compuestos híbridos, no observándose lo anterior en *T. vaginalis*.
- La presencia de un grupo trifluorometilo o metiltio en la posición 2 de los derivados bencimidazólicos no metilados no afectó la actividad giardicida de los híbridos.
- La introducción de un grupo metilo en posición 1 y un grupo trifluorometilo en posición 2 confirió una mayor actividad tricomonida.
- La presencia de un grupo metilo en posición 1 y un grupo metiltio en posición 2 disminuyó la solubilidad del híbrido **VMAS-74**.
- Todos los compuestos híbridos evaluados fueron estables durante el desarrollo experimental de la evaluación biológica y el análisis químico.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, R. The Biology of *Giardia spp.* *Microbiological Reviews* **1991**, 55:706-732.
- Adam, R. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews* **2001**, 14:447-475.
- Alderete, J.; Lehker, M.; Arroyo, R. The Mechanisms and Molecules Involved in Cytoadherence and Pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Today* **1995**, 11: 70-74.
- Andrzejewska, M.; Yépez, L.; Tapia, A.; Cedillo, R.; Laudy, A.; Starosciak, B.; Kazimierczuk, Z. Synthesis, and antiprotozoal and antibacterial activities of S-substituted 4,6-dibromo- and 4,6-dichloro-2-mercaptobenzimidazoles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2004**, 21:323-329.
- Arroyo, R.; Engbring, J.; Alderete, J. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Microbiology* **1992**, 6:853-862.
- Avendaño López, Ma. del Carmen. *Introducción a la Química Farmacéutica*. España, Ed. Interamericana McGraw-Hill, **1993**.
- Boray, J.; Crowfoot, P.; Strong, M.; Schellenbaum, M.; Vonorelli, M.; Sarasin, G.; Allison, J. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with Triclabendazole. *Veterinary Rec* **1983**, 113:315-317.
- Cedillo, R.; Muñoz, O. In-vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *Journal of Medical Microbiology* **1992**, 37:221-224.
- Cedillo, R.; Chávez, B.; González, A.; Tapia, A.; Yépez, L. In Vitro Effect of Nitazoxanide Against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* Trophozoites. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **2002**, 49:201-208.
- Comunicación e información de la mujer (CIMAC), www.cimac.org.mx/noticias/01jul/01071802.html
- Chávez, B.; Cedillo, R.; Martínez, A. *Giardia lamblia*: Ultrastructural Study of the In Vitro Effect of Benzimidazoles. *Journal of Protozoology* **1992**, 39:510-515.
- Diamond, L.; Harlow, D.; Cunnick, C. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other entamoeba. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1978**, 72:431-432.

- Edlind, T.; Hang, T. Activity of the Anthelmintic Benzimidazoles against *Giardia lamblia* In Vitro. *The Journal of Infectious Diseases* **1990**, 162:1408-1411.
- Fiori, P.; Rapelli, P.; Addis, M. The flagellated *Trichomonas vaginalis*: new insights into cytopathogenicity mechanisms. *Microbes and infection* **1999**, 2:149-156.
- Fox, L. y Saravolatz, L. Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent. *Reviews of anti-infective agents* **2005**, 40:1173-1180.
- Garber, G.; Lemchuk, L. Characterization and purification of extracellular proteases of *Trichomonas vaginalis*. *Canadian Journal of Microbiology* **1989**, 35:903-909.
- Gardner, T.; Hill, D. Treatment of Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews* **2001**, 14:114-128.
- Gilles, H.; Hoffman, P. Treatment of intestinal parasitic infections: a review of nitazoxanide. *Trends in Parasitology* **2002**, 18:95-97.
- Gillin, F., Reiner, D. Cell Biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annual Review of Microbiology* **1996**, 50:679-705.
- Gupta, S.; Khan, A.; Jain, M.; Katiyar, J. Anthelmintic profile of methyl 5(6)-(4-methylpiperidin-1-yl)carbonylbenzimidazole-2-carbamate in experimental helminthiasis. *Indian Journal of Experimental Biology* **1990**, 28:475.
- Henze, K. y Martin, W. Essence of mitochondria. *Nature* **2003**, 426:127-128.
- Johnson, P. Metronidazole and Drug Resistance. *Parasitology Today* **1993**, 9:183-186.
- Keister, D. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1983**, 77:487-488.
- Korolkovas, A.; Burckhalter, J. *Compendio esencial de Química Farmacéutica*. España, Ed. Reverté, **1979**.
- Kulda, J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International Journal for Parasitology* **1999**, 29:199-212.
- Lacey, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal for Parasitology* **1988**, 18:885-936.
- Lacey, E. Mode of Action of Benzimidazoles. *Parasitology Today* **1990**, 6:112-115.

- Lacey, E.; Gill, J. Biochemistry of benzimidazole resistance. *Acta Tropica* **1994**, 56:245-262.
- Lecke, S.; Tasca, T.; Souto, A.; De Carli, G. *Trichomonas vaginalis*: microtubule cytoskeleton distribution using fluorescent taxoid. *Experimental Parasitology* **2002**, 102:113-116.
- López Balbiaux, N. *Diseño, síntesis y actividad antiparasitaria de nuevas carboxamidas benzimidazólicas 1-metiladas*. México, Facultad de Química, UNAM, **2005** (Tesis de maestría).
- Mandell, Douglas y Bennett. *Enfermedades infecciosas, Principios y Práctica*. 4^a ed., Argentina, Ed. Médica Panamericana, **1997**.
- Marquardt, W.; Demaree, R.; Grieve, R. *Parasitology Vector Biology*. 2^a ed., USA, Academic Press, **2000**.
- Meloni, B.; Thompson, R.; Reynoldson, J.; Seville, P. Albendazole: a more effective anti-giardial agent in vitro than metronidazole or tinidazole. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1990**, 84:375-379.
- Navarrete-Vázquez, G.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A.; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Valdez, J.; Morales, R.; Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R. Synthesis and Antiparasitic Activity of 2-(Trifluoromethyl)-benzimidazole Derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2001**, 11:187-190.
- North, M.; Mottram, J.; Coombs, G. Cysteine Proteinases of Parasitic Protozoa. *Parasitology Today* **1990**, 6:270-275.
- Oxberry, M.; Thompson, R.; Reynoldson, J. Evaluation of the effects of albendazole and metronidazole on the ultrastructure of *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Spironucleus muris* using transmission electron microscopy. *International Journal for Parasitology* **1994**, 24:695-703.
- Raether, W.; Hänel, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitology Research* **2003**, 90:S19-S39.
- Reynoldson, J.; Thompson, R.; Horton, R. Albendazole as a Future Anti-giardial Agent. *Parasitology Today* **1992**, 8:412-414.

- Reza Ramírez, B. *Síntesis de 5 carboxamidas derivadas del ácido 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-il carboxílico con posible actividad giardicida*. México, Facultad de Química, UNAM, **2005** (Tesis de licenciatura).
- Romero Cabello, Raúl. *Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas*. 2ª ed., México, Ed. Médica Panamericana, **1999**.
- Sánchez Díaz, M. *Síntesis de derivados del 1-metilbenzimidazol con actividad antihelmíntica potencial*. México, Facultad de Química, UNAM, **1999** (Tesis de licenciatura).
- Shore Garcia, L. *Diagnostic Medical Parasitology*. 4ª ed., USA, ASM Press, **2001**.
- Soper, D. Trichomoniasis: Under control or undercontrolled? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **2004**, 190:281-290.
- Svärd, S.; Hagblom, P.; Palm, D. *Giardia lamblia*-a model organism for eukaryotic cell differentiation. *FEMS Microbiology Letters* **2003**, 218:2-7.
- Tay, J.; Lara, R.; Velasco, O.; Gutiérrez, M. *Parasitología Médica*. 6ª ed., México, Mendez Editores, **1996**.
- Tovar, J.; León, G.; Sánchez, L.; Sutak, R.; Tachezy, J.; Van der Giezen, M.; Hernández, M.; Müller, M.; Lucocq, J. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* **2003**, 426:172-176.
- Townsend, L.; Wise, D. The Synthesis and Chemistry of Certain Anthelmintic Benzimidazoles. *Parasitology Today* **1990**, 6:107-112.
- Turner, K.; Armour, J.; Richards, R. Anthelmintic efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Rec* **1984**, 114:41-42.
- Upcroft, J.; Upcroft, P. Future Therapeutic Alternatives for Combating Protozoa. *Parasitology Today* **1998**, 14:212-214.
- Upcroft, P.; Upcroft, J. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. *Clinical Microbiology Reviews* **2001**, 14:150-164.
- Valdez, J.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A.; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Navarrete-Vázquez, G.; Tapia, A.; Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R. Synthesis and Antiparasitic Activity of 1H-Benzimidazole Derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2002**, 12:2221-2224.

Vargas Benítez, P. *Síntesis de derivados del 5-amino-carbonil-1H-bencimidazol con potencial actividad antiparasitaria*. México, UABJO, **2002** (Tesis de licenciatura).

Vázquez, F.; García, M.; Pérez, F.; Palacio, V. *Trichomonas vaginalis*: tratamiento y resistencia a nitroimidazoles. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **2001**, 19:114-124.

Wolfe, M. Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews* **1992**, 5:93-100.

World Health Organization (WHO), www.who.int/wormcontrol/statistic:3,3,05

www.bioltrop.org/08-diagparasito/giardia-fv.gif

www.bioltrop.org/08-diagparasito/giardia-kyste.gif

www.cinvestav.mx/patologia/rarroyo.html

www.dpd.cdc.gov/dpdx/images/ParasiteImages/G-L/Giardiasis/Giardia_LifeCycle.gif

www.dpd.cdc.gov/dpdx/images/ParasiteImages/S-Z/Trichomoniasis/Trichomonas_LifeCycle.gif

www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/imagenes_de_neubauer.htm

ANEXO I. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Reactivos:

- Albendazol (Smith-Kline)
- Nitazoxanida (Fac. Química, UNAM)
- Dimetilsulfóxido (J.T. Baker)
- Cloruro de sodio (Merck)
- Fosfato de sodio dibásico (J.T. Baker)
- Fosfato de sodio monobásico (J.T. Baker)
- Biosate, peptona (BBL)
- D-(+)-glucosa (Sigma)
- L-cisteína (ICN Biochemicals)
- L-ácido ascórbico (Sigma)
- Bilis (Sigma)
- Citrato férrico (Sigma)
- Mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina (In vitro)
- Suero fetal de ternera (Invitrogen Corporation)
- Mezcla de vitaminas-tween 80 (In vitro)
- Acetonitrilo grado HPLC (J.T. Baker)
- Agua grado HPLC (J.T. Baker)
- Ácido acético glacial (J.T. Baker)

Equipos e instrumentos:

- Gabinete de seguridad biológica Clase II (Nuaire)
- Incubadora (REVCO)
- Balanza analítica (Sartorius)
- Microscopio invertido (Axiovert 25, Carl Zeiss)
- Crioconservador (XLC 500, Cryogenics)

- Potenciómetro (720 pHMeter, Beckman)
- Centrifuga clínica (Sorvall RT 6000D, Ohio)
- Congelador (Thermo Forma)
- Refrigerador (LG)
- Bombas binarias (1525, Waters)
- Detector de fotodiodos (996, Waters)
- Columna Symmetry Shield RP₁₈ 4.5 * 150 mm

MÉTODOS

Preparación del medio TYI-S-33 (Diamond, 1978)

- Cloruro de sodio.....2.0 g
 - Fosfato de sodio dibásico.....1.0 g
 - Fosfato de sodio monobásico.....0.6 g
 - Biosate, peptona.....30.0 g
 - D-(+)-glucosa.....10.0 g
 - L-cisteína.....1.0 g
 - L-ácido ascórbico.....0.2 g
 - Citrato férrico.....0.0228 g
 - Agua bidestilada.....cbp 1L
- pH final 6.8

Se disolvieron con agitación cada uno de los compuestos en 900mL de agua bidestilada. Se ajustó el pH de la mezcla y posteriormente ésta se transfirió a un matraz aforado de 1L para llevar a volumen con agua bidestilada. El medio se recolectó en frascos Schcott de 500mL y esterilizó en autoclave. Finalmente, el medio se sometió a prueba de esterilidad.

Preparación del medio TYI-S-33 modificado (Keister, 1983)

- Cloruro de sodio.....2.0 g
 - Fosfato de sodio dibásico.....1.0 g
 - Fosfato de sodio monobásico.....0.6 g
 - Biosate, peptona.....30.0 g
 - D-(+)-glucosa.....10.0 g
 - L-cisteína.....2.0 g
 - L-ácido ascórbico.....0.2 g
 - Citrato férrico.....0.0228 g
 - Bilis.....0.8 g
 - Agua bidestilada.....cbp 1L
- pH final 7-7.2

Se disolvieron con agitación cada uno de los compuestos en 900 mL de agua bidestilada. Se ajustó el pH de la mezcla y posteriormente ésta se transfirió a un matraz aforado de 1L para llevar a volumen con agua bidestilada. El medio se esterilizó por filtración (filtros Millipore de 0.22 y 0.45 μm) y recolectó en frascos Schcott de 500 mL estériles. Finalmente, el medio se sometió a prueba de esterilidad.

Prueba de esterilidad

Se tomaron alícuotas de 4 μL de cada uno de los medios de cultivo y sembraron en placas de agar sangre, las cuales se incubaron a 37°C por 48 horas junto con los frascos que contenían los medios de cultivo, adecuadamente sellados. Transcurrido el tiempo, se verificó que tanto en las placas como en los frascos no se observara crecimiento bacteriano o fúngico, indicador de contaminación. Finalmente, los medios de cultivo se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

Preparación de medio para el cultivo de trofozoitos de *G. intestinalis* (Keister, 1983)

En frascos Schcott de 100mL, se añadieron aproximadamente 90 mL de medio TYI-S-33 modificado, 10 mL de suero fetal de ternera descomplementado (56°C, 30min) y 1mL de mezcla de antibióticos. El medio preparado se homogeneizó y etiquetó para ser utilizado. En caso necesario, se almacenó a 4°C para su posterior uso.

Preparación de medio para el cultivo de trofozoitos de *T. vaginalis* (Diamond, 1978)

En frascos Schcott de 100mL, se añadieron aproximadamente 90mL de medio TYI-S-33, 10mL de suero fetal de ternera descomplementado (56°C, 30min), 3mL de mezcla de vitaminas-tween 80 y 1mL de mezcla de antibióticos. El medio preparado se homogeneizó y etiquetó para ser utilizado. En caso necesario, se almacenó a 4°C para su posterior uso.

Mantenimiento del cultivo axénico de trofozoitos de *G. intestinalis*

De acuerdo al crecimiento observado al microscopio, esperando una confluencia de 90-100% (presencia de una monocapa), los tubos con el cultivo de *G. intestinalis*, cepa IMSS:0989:1, se introdujeron en un baño de hielo durante 10min para promover el desprendimiento de los trofozoitos de la pared del tubo. Transcurrido el tiempo, un volumen de 15µL de inóculo se transfirió a un tubo con 7mL de medio para el cultivo de trofozoitos de *G. intestinalis*. Los tubos recién inoculados se sellaron, etiquetaron e incubaron a 37°C, aproximadamente entre 72 y 96h, hasta ser nuevamente subcultivados. En caso de no observarse la confluencia de 90-100%, únicamente se llevó a cabo el cambio de medio a los tubos con el cultivo, sin previa incubación en hielo.

Mantenimiento del cultivo axénico de trofozoitos de *T. vaginalis*

Para llevar a cabo el subcultivo de trofozoitos de *T. vaginalis*, cepa GT3, se debió observar al microscopio acúmulos de trofozoitos en los tubos que contenían el cultivo, ya que los trofozoitos de *T. vaginalis* no forman una monocapa como la de los

trofozoitos de *G. intestinalis*. De acuerdo a lo anterior, los tubos se introdujeron en un baño de hielo durante 10 min para promover el desprendimiento de los trofozoitos que se pudieran encontrar adheridos a la pared del tubo. Transcurrido el tiempo, un volumen de 10 μ L de inóculo se transfirió a un tubo con 7mL de medio para el cultivo de trofozoitos de *T. vaginalis*. Los tubos recién inoculados se sellaron, etiquetaron e incubaron ligeramente inclinados a 37°C, aproximadamente entre 48 y 72h, hasta ser nuevamente subcultivados. En caso de no observarse la confluencia esperada, únicamente se llevó a cabo el cambio de medio a los tubos con el cultivo, sin previa incubación en hielo.

Cuenta de trofozoitos de *G. intestinalis* y *T. vaginalis*

La cuenta de trofozoitos de *G. intestinalis* y *T. vaginalis* se llevó a cabo utilizando un hemocitómetro o cámara de Neubauer (Brand) y un microscopio invertido.

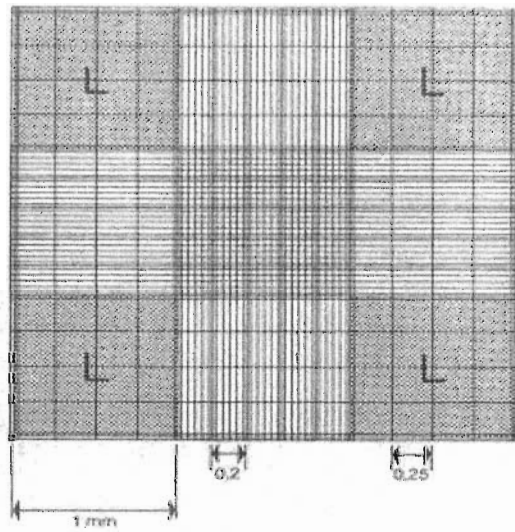


Figura 25. Cámara del hemocitómetro (www.ub.es).

Este hemocitómetro contiene dos cámaras independientes para el conteo de células y consiste en un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado, con la ayuda de un diamante, una cuadrícula como la que se ve en la imagen inferior. Es un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. Así pues, el área sombreada y marcada L corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0.1 milímetro, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0.1 milímetro cúbico, es decir 0.1 microlitro.

Si contamos las cuatro áreas sombreadas (L) observando un total de X células entre las cuatro áreas, la concentración en la suspensión celular será:

$$\text{concentración en la suspensión (células / mL)} = (X/4) * 10,000$$

↑
(Factor de corrección)

Tanto para el conteo de trofozoitos de *G. intestinalis* como de *T. vaginalis*, se siguió el mismo procedimiento: se colocó una alícuota de 12µL de trofozoitos, proveniente de uno de los tubos del cultivo de mantenimiento, en una de las cámaras del hemocitómetro; cuando la cantidad observada fue superior a 60 trofozoitos por área, se realizó una dilución 1:10 (100µL de cultivo axénico + 900µL de medio de cultivo). De esta dilución, se tomó una alícuota de 12µL, se colocó en la cámara y se contaron los trofozoitos presentes en cada cuadrante. Para saber la concentración real de trofozoitos/mL en el tubo con el cultivo axénico, se llevó a cabo la siguiente operación:

$$\text{concentración (trofozoitos / mL)} = (X/4) * 10,000 * 10$$

↑
(Inverso de la dilución)

Preparación de las diluciones de Albendazol, Nitazoxanida, Tizoxanida, PVB-K, VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72, VMAS-74 y preVMAS-72

El procedimiento descrito en la Figura 27 se llevó a cabo para cada uno de los compuestos evaluados contra *G. intestinalis* y *T. vaginalis*.

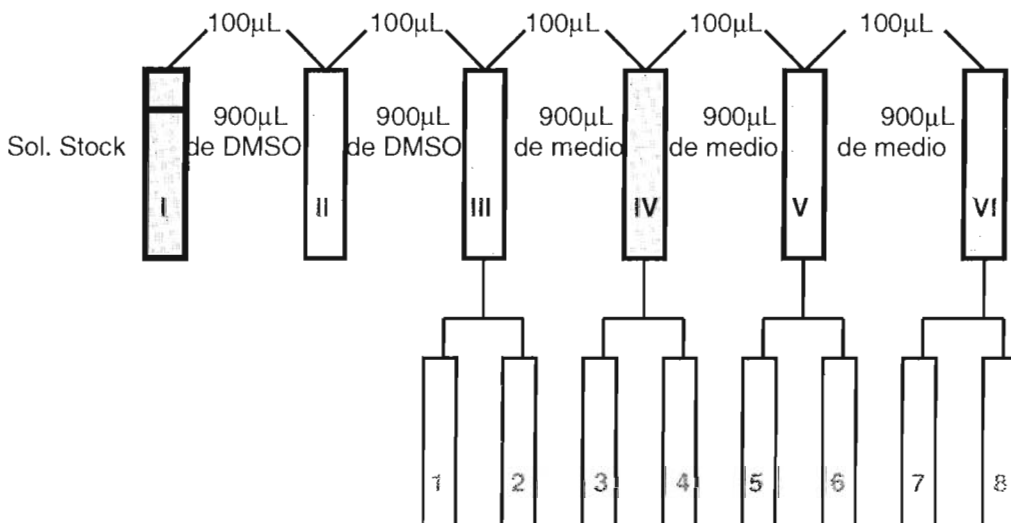


Figura 26. Preparación de las diluciones de los compuestos evaluados

Para la solución patrón del compuesto a evaluar, se pesaron 10mg del mismo y disolvieron en 1mL de DMSO (10mg/mL); de esta solución se realizaron diluciones seriadas en DMSO y medio de cultivo, factor de dilución 10 (Tabla 14).

NOTA: el híbrido **VMAS-72** se solubilizó en DMSO por calentamiento, mientras que el híbrido **VMAS-74** se mantuvo insoluble aún después del calentamiento, obteniéndose una suspensión.

Tabla 14. Diluciones seriadas de los compuestos evaluados

| Tubo | Concentración (mg/mL) | Dilución |
|------|--------------------------|----------|
| I | 10 | ----- |
| II | 1 | 1:10 |
| III | 0.1 | 1:100 |
| IV | 0.01 | 1:1000 |
| V | 0.001 | 1:10000 |
| VI | 0.0001 | 1:100000 |

Para obtener el intervalo de concentraciones deseado (0.001µg/ml-5µg/mL), se tomó el volumen necesario de cada dilución y aforó a 1mL con medio de cultivo (Tabla 15).

Tabla 15. Intervalo de concentraciones de los compuestos evaluados

| Tubo | Concentración final (µg/mL) | Volumen final (µL) | Volumen de alícuota (µL) | Tubo |
|------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------------|------|
| 1 | 5.0 | 1000 | 50 | III |
| 2 | 1.0 | 1000 | 10 | III |
| 3 | 0.5 | 1000 | 50 | IV |
| 4 | 0.1 | 1000 | 10 | IV |
| 5 | 0.05 | 1000 | 50 | V |
| 6 | 0.01 | 1000 | 10 | V |
| 7 | 0.005 | 1000 | 50 | VI |
| 8 | 0.001 | 1000 | 10 | VI |

Exploración de la estabilidad química de VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72 y VMAS-74 mediante CLAR

Para realizar la exploración de la estabilidad química de los híbridos evaluados se utilizó una columna Symmetry Shield RP₁₈; como fase móvil una mezcla ACN-H₂O con 0.5% de ácido acético; un flujo de 0.6mL/min por gradiente (Tabla 16), una longitud de onda de 298nm y un tiempo de muestreo de 10 min.

Tabla 16. Gradiente de la fase móvil

| Tiempo (min) | H ₂ O (%) | ACN (%) |
|-----------------|-------------------------|------------|
| 0 | 20 | 80 |
| 1 | 20 | 80 |
| 2 | 15 | 85 |
| 3 | 10 | 90 |
| 4 | 15 | 85 |
| 5 | 20 | 80 |
| 6 | 20 | 80 |
| 7 | 20 | 80 |
| 8 | 20 | 80 |
| 9 | 20 | 80 |
| 10 | 20 | 80 |

ANEXO II. TABLAS

Curvas de crecimiento de trofozoitos de *G. intestinalis* y *T. vaginalis*

Tabla 17. Crecimiento de trofozoitos de *G. intestinalis*

| Tiempo (h) | # trofozoitos /mL | | | Promedio |
|------------|-------------------|---------|---------|----------|
| | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | |
| 0 | 50000 | 50000 | 50000 | 50000 |
| 24 | 302500 | 305000 | 257500 | 288333 |
| 48 | 1975000 | 2350000 | 2375000 | 2233333 |
| 72 | 2375000 | 2275000 | 3050000 | 2566667 |
| 96 | 2025000 | 2075000 | 1750000 | 1950000 |

Tabla 18. Crecimiento de trofozoitos de *T. vaginalis*

| Tiempo (h) | # trofozoitos /mL | | | Promedio |
|------------|-------------------|---------|---------|----------|
| | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | |
| 0 | 6000 | 6000 | 6000 | 6000 |
| 24 | 497500 | 425000 | 432000 | 451500 |
| 48 | 2875000 | 2745500 | 2775000 | 2798500 |
| 72 | 2995500 | 3485000 | 3225000 | 3235167 |
| 96 | 1950000 | 1825000 | 1975000 | 1916667 |

Evaluación de la actividad antiprotozoaria *in vitro* de Albendazol, Nitazoxanida, Tizoxanida, PVB-K, VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72, VMAS-74 y preVMAS-72

Evaluación de la actividad giardicida

Tabla 19. Actividad giardicida *in vitro* de Albendazol (ensayo 1)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.001 | 2275000 | 562500 |
| 0.005 | 1912500 | 925000 |
| 0.01 | 1775000 | 1062500 |
| 0.05 | 0 | 2837500 |
| 0.1 | 0 | 2837500 |

Control: 2837500

$CI_{50} = 0.009 \mu\text{g/mL}$

$CI_{90} = 0.097 \mu\text{g/mL}$

Tabla 20. Actividad giardicida *in vitro* de Albendazol (ensayo 2)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.001 | 2325000 | 575000 |
| 0.005 | 2025000 | 875000 |
| 0.01 | 1925000 | 975000 |
| 0.05 | 0 | 2900000 |
| 0.1 | 0 | 2900000 |

Control:2900000

CI₅₀=0.009µg/mL

CI₉₀=0.103µg/mL

Tabla 21. Actividad giardicida *in vitro* de Nitazoxanida (ensayo 1)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 2200000 | 575000 |
| 0.05 | 1837500 | 937500 |
| 0.1 | 1637500 | 1137500 |
| 0.5 | 15000 | 2760000 |
| 1.0 | 0 | 2775000 |

Control:2775000

CI₅₀=0.068µg/mL

CI₉₀=0.456µg/mL

Tabla 22. Actividad giardicida *in vitro* de Nitazoxanida (ensayo 2)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.005 | 2875000 | 400000 |
| 0.01 | 2687500 | 587500 |
| 0.05 | 2250000 | 1025000 |
| 0.1 | 1325000 | 1950000 |
| 0.5 | 175000 | 3100000 |
| 1.0 | 0 | 3275000 |

Control:3275000

CI₅₀=0.056µg/mL

CI₉₀=0.461µg/mL

Tabla 23. Actividad giardicida *in vitro* de Tizoxanida (ensayo 1)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.005 | 2525000 | 350000 |
| 0.01 | 2050000 | 825000 |
| 0.05 | 1712500 | 1162500 |
| 0.1 | 1537500 | 1337500 |
| 0.5 | 0 | 2875000 |
| 1.0 | 0 | 2875000 |

Control:2875000

CI₅₀=0.055µg/mL

CI₉₀=0.768µg/mL

Tabla 24. Actividad giardicida *in vitro* de Tizoxanida (ensayo 2)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.005 | 2800000 | 650000 |
| 0.01 | 2575000 | 875000 |
| 0.05 | 2250000 | 1200000 |
| 0.1 | 1725000 | 1725000 |
| 0.5 | 0 | 3450000 |
| 1.0 | 0 | 3450000 |

Control:3450000

CI₅₀=0.056µg/mL

CI₉₀=0.900µg/mL

Tabla 25. Actividad giardicida *in vitro* de **PVB-K** (ensayo 1)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 2266667 | 766666 |
| 0.05 | 2175000 | 858333 |
| 0.1 | 2166667 | 866666 |
| 0.5 | 2075000 | 958333 |
| 1.0 | 1487500 | 1545833 |

Control:3033333

CI₅₀=4.359µg/mL

CI₉₀=137435.9µg/mL

Tabla 26. Actividad giardicida *in vitro* de **PVB-K** (ensayo 2)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.004 | 2825000 | 587500 |
| 0.02 | 2533333 | 879167 |
| 0.1 | 2225000 | 1187500 |
| 0.5 | 2033333 | 1379167 |
| 1.0 | 1875000 | 1537500 |
| 5.0 | 1833333 | 1579167 |

Control:3412500

CI₅₀=4.705µg/mL

CI₉₀=219634.3µg/mL

Tabla 27. Actividad giardicida *in vitro* de **VMAS-60** (ensayo 1)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 2133333 | 991667 |
| 0.05 | 1891667 | 1233333 |
| 0.1 | 1691667 | 1433333 |
| 0.5 | 80000 | 3045000 |
| 1.0 | 32500 | 3092500 |

Control:3125000

CI₅₀=0.051µg/mL

CI₉₀=0.593µg/mL

Tabla 28. Actividad giardicida *in vitro* de **VMAS-60** (ensayo 2)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 2166667 | 733333 |
| 0.05 | 2137500 | 762500 |
| 0.1 | 1725000 | 1175000 |
| 0.5 | 95000 | 2805000 |
| 1.0 | 42500 | 2857500 |

Control:2900000

CI₅₀=0.072µg/mL

CI₉₀=0.622µg/mL

Tabla 29. Actividad giardicida *in vitro* de **VMAS-62** (ensayo 1)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 2300000 | 787500 |
| 0.05 | 2141667 | 945833 |
| 0.1 | 1458333 | 1629167 |
| 0.5 | 71667 | 3015833 |
| 1.0 | 33750 | 3053750 |

Control:3087500

CI₅₀=0.059µg/mL

CI₉₀=0.476µg/mL

Tabla 30. Actividad giardicida *in vitro* de **VMAS-62** (ensayo 2)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 2275000 | 625000 |
| 0.05 | 1616667 | 1283333 |
| 0.1 | 1050000 | 1850000 |
| 0.5 | 218333 | 2681667 |
| 1.0 | 55000 | 2845000 |

Control:2900000

CI₅₀=0.049µg/mL

CI₉₀=0.441µg/mL

Tabla 31. Actividad giardicida *in vitro* de **VMAS-72** (ensayo 1)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 2562500 | 387500 |
| 0.05 | 2137500 | 812500 |
| 0.1 | 1612500 | 1337500 |
| 0.5 | 130000 | 2820000 |
| 1.0 | 0 | 2950000 |

Control:2950000

CI₅₀=0.082µg/mL

CI₉₀=0.456µg/mL

Tabla 32. Actividad giardicida *in vitro* de **VMAS-72** (ensayo 2)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 2350000 | 487500 |
| 0.05 | 2000000 | 837500 |
| 0.1 | 1775000 | 1062500 |
| 0.5 | 185000 | 2652500 |
| 1.0 | 16250 | 2821250 |

Control:2837500

CI₅₀=0.084µg/mL

CI₉₀=0.580µg/mL

Tabla 33. Actividad giardicida *in vitro* de **VMAS-74** (ensayo 1)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 2350000 | 487500 |
| 0.05 | 2187500 | 650000 |
| 0.1 | 1922500 | 915000 |
| 0.5 | 1562500 | 1275000 |
| 1.0 | 900000 | 1937500 |

Control:2837500

CI₅₀=0.411µg/mL

CI₉₀=35.53µg/mL

Tabla 34. Actividad giardicida *in vitro* de **VMAS-74** (ensayo 2)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 2562500 | 562500 |
| 0.05 | 2375000 | 750000 |
| 0.1 | 2062500 | 1062500 |
| 0.5 | 1575000 | 1550000 |
| 1.0 | 1000000 | 2125000 |

Control:3125000

CI₅₀=0.354µg/mL

CI₉₀=27.759µg/mL

Tabla 35. Actividad giardicida *in vitro* de **preVMAS-72** (ensayo 1)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 2550000 | 675000 |
| 0.05 | 2375000 | 850000 |
| 0.1 | 1975000 | 1250000 |
| 0.5 | 475000 | 2750000 |
| 1.0 | 70000 | 3155000 |

Control:3225000

Cl₅₀=0.092µg/mL

Cl₉₀=0.897µg/mL

Tabla 36. Actividad giardicida *in vitro* de **preVMAS-72** (ensayo 2)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 2487500 | 387500 |
| 0.05 | 2275000 | 600000 |
| 0.1 | 1825000 | 1050000 |
| 0.5 | 362500 | 2512500 |
| 1.0 | 0 | 2875000 |

Control:2875000

Cl₅₀=0.110µg/mL

Cl₉₀=0.744µg/mL

Tabla 37. Cl₅₀ de los compuestos evaluados contra *G. intestinalis*

| Compuesto | Cl ₅₀ (µg/mL) | | Promedio |
|-------------------|--------------------------|----------|----------|
| | Ensayo 1 | Ensayo 2 | |
| Albendazol | 0.009 | 0.009 | 0.009 |
| Nitazoxanida | 0.068 | 0.056 | 0.062 |
| Tizoxanida | 0.055 | 0.056 | 0.056 |
| PVB-K | 4.359 | 4.705 | 4.532 |
| VMAS-60 | 0.051 | 0.072 | 0.062 |
| VMAS-62 | 0.059 | 0.049 | 0.054 |
| VMAS-72 | 0.082 | 0.084 | 0.083 |
| VMAS-74 | 0.411 | 0.354 | 0.383 |
| preVMAS-72 | 0.092 | 0.110 | 0.101 |

Tabla 38. CI_{90} de los compuestos evaluados contra *G.intestinalis*

| Compuesto | $CI_{90}(\mu\text{g/mL})$ | | Promedio |
|-------------------|---------------------------|----------|----------|
| | Ensayo 1 | Ensayo 2 | |
| Albendazol | 0.103 | 0.097 | 0.100 |
| Nitazoxanida | 0.456 | 0.461 | 0.459 |
| Tizoxanida | 0.768 | 0.900 | 0.834 |
| PVB-K | 137435.9 | 219634.3 | 178535.1 |
| VMAS-60 | 0.593 | 0.622 | 0.608 |
| VMAS-62 | 0.476 | 0.441 | 0.459 |
| VMAS-72 | 0.456 | 0.580 | 0.518 |
| VMAS-74 | 35.530 | 27.759 | 31.645 |
| preVMAS-72 | 0.897 | 0.744 | 0.821 |

Evaluación de la actividad tricomonocida

Tabla 39. Actividad tricomonocida *in vitro* de Albendazol (ensayo 1)

| Concentración ($\mu\text{g/mL}$) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|------------------------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 3250000 | 225000 |
| 0.05 | 3075000 | 400000 |
| 0.1 | 2787500 | 687500 |
| 0.5 | 1750000 | 1725000 |
| 1.0 | 20000 | 3455000 |

Control:3475000

$CI_{50}=0.262\mu\text{g/mL}$

$CI_{90}=1.903\mu\text{g/mL}$

Tabla 40. Actividad tricomonocida *in vitro* de Albendazol (ensayo 2)

| Concentración ($\mu\text{g/mL}$) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|------------------------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 3312500 | 87500 |
| 0.05 | 2787500 | 612500 |
| 0.1 | 2475000 | 925000 |
| 0.5 | 1837500 | 1562500 |
| 1.0 | 248750 | 3151250 |

Control:3400000

$CI_{50}=0.271\mu\text{g/mL}$

$CI_{90}=2.257\mu\text{g/mL}$

Tabla 41. Actividad tricomonocida *in vitro* de Nitazoxanida (ensayo 1)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.005 | 3587500 | 187500 |
| 0.01 | 3250000 | 525000 |
| 0.05 | 2450000 | 1325000 |
| 0.1 | 2012500 | 1762500 |
| 0.5 | 875000 | 2900000 |
| 1.0 | 0 | 3775000 |

Control:3775000

CI₅₀=0.093µg/mL

CI₉₀=0.915µg/mL

Tabla 42. Actividad tricomonocida *in vitro* de Nitazoxanida (ensayo 2)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 2975000 | 500000 |
| 0.05 | 2162500 | 1312500 |
| 0.1 | 1900000 | 1575000 |
| 0.5 | 725000 | 2750000 |
| 1.0 | 0 | 3475000 |

Control:3475000

CI₅₀=0.088µg/mL

CI₉₀=0.864µg/mL

Tabla 43. Actividad tricomonocida *in vitro* de Tizoxanida (ensayo 1)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.005 | 3425000 | 525000 |
| 0.01 | 2812500 | 1137500 |
| 0.05 | 2400000 | 1550000 |
| 0.1 | 2162500 | 1787500 |
| 0.5 | 525000 | 3425000 |
| 1.0 | 0 | 3950000 |

Control:3950000

CI₅₀=0.058µg/mL

CI₉₀=0.840µg/mL

Tabla 44. Actividad tricomonocida *in vitro* de Tizoxanida (ensayo 2)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.005 | 2950000 | 737500 |
| 0.01 | 2600000 | 1087500 |
| 0.05 | 2225000 | 1462500 |
| 0.1 | 2012500 | 1675000 |
| 0.5 | 625000 | 3062500 |
| 1.0 | 0 | 3687500 |

Control:3687500

CI₅₀=0.057µg/mL

CI₉₀=1.136µg/mL

Tabla 45. Actividad tricomonocida *in vitro* de **PVB-K** (ensayo 1)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 3033333 | 416667 |
| 0.05 | 2750000 | 700000 |
| 0.1 | 2550000 | 900000 |
| 0.5 | 2266667 | 1183333 |
| 1.0 | 2037500 | 1412500 |

Control:3450000

CI₅₀=3.330µg/mL

CI₉₀=2381.223µg/mL

Tabla 46. Actividad tricomonocida *in vitro* de **PVB-K** (ensayo 2)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.004 | 4175000 | 291667 |
| 0.02 | 3666667 | 800000 |
| 0.1 | 3200000 | 1266667 |
| 0.5 | 2908333 | 1558334 |
| 1.0 | 2683333 | 1783334 |
| 5.0 | 2183333 | 2283334 |

Control:4466667

CI₅₀=3.480µg/mL

CI₉₀=2957.332µg/mL

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Tabla 47. Actividad tricomonocida *in vitro* de **VMAS-60** (ensayo 1)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 3016667 | 658333 |
| 0.05 | 2737500 | 937500 |
| 0.1 | 2333333 | 1341667 |
| 0.5 | 1657425 | 2017575 |
| 1.0 | 50000 | 3625000 |

Control:3675000

CI₅₀=0.160µg/mL

CI₉₀=3.075µg/mL

Tabla 48. Actividad tricomonocida *in vitro* de **VMAS-60** (ensayo 2)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 2912500 | 587500 |
| 0.05 | 2500000 | 1000000 |
| 0.1 | 2100000 | 1400000 |
| 0.5 | 1637500 | 1862500 |
| 1.0 | 125000 | 3375000 |

Control:3500000

CI₅₀=0.149µg/mL

CI₉₀=2.897µg/mL

Tabla 49. Actividad tricomonocida *in vitro* de **VMAS-62** (ensayo 1)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 3000000 | 741667 |
| 0.05 | 2541667 | 1200000 |
| 0.1 | 2408333 | 1333334 |
| 0.5 | 36250 | 3705417 |
| 1.0 | 0 | 3741667 |

Control:3741667

CI₅₀=0.074µg/mL

CI₉₀=0.487µg/mL

Tabla 50. Actividad tricomonida *in vitro* de **VMAS-62** (ensayo 2)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 3083333 | 541667 |
| 0.05 | 2712500 | 912500 |
| 0.1 | 2050000 | 1575000 |
| 0.5 | 27500 | 3597500 |
| 1.0 | 0 | 3625000 |

Control:3625000

CI₅₀=0.079µg/mL

CI₉₀=0.422µg/mL

Tabla 51. Actividad tricomonida *in vitro* de **VMAS-72** (ensayo 1)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 3175000 | 537500 |
| 0.05 | 2300000 | 1412500 |
| 0.1 | 2125000 | 1587500 |
| 0.5 | 206250 | 3506250 |
| 1.0 | 0 | 3712500 |

Control:3712500

CI₅₀=0.074µg/mL

CI₉₀=0.472µg/mL

Tabla 52. Actividad tricomonida *in vitro* de **VMAS-72** (ensayo 2)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 3100000 | 587500 |
| 0.05 | 2625000 | 1062500 |
| 0.1 | 2075000 | 1612500 |
| 0.5 | 148750 | 3538750 |
| 1.0 | 0 | 3687500 |

Control:3687500

CI₅₀=0.078µg/mL

CI₉₀=0.465µg/mL

Tabla 53. Actividad tricomonocida *in vitro* de **VMAS-74** (ensayo 1)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 3650000 | 1150000 |
| 0.05 | 3225000 | 1575000 |
| 0.1 | 3008333 | 1791667 |
| 0.5 | 2287500 | 2512500 |
| 1.0 | 358333 | 4441667 |

Control:4800000

Cl₅₀=0.143µg/mL

Cl₉₀=5.500µg/mL

Tabla 54. Actividad tricomonocida *in vitro* de **VMAS-74** (ensayo 2)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 3016667 | 1033333 |
| 0.05 | 2741667 | 1308333 |
| 0.1 | 2558333 | 1491667 |
| 0.5 | 1600000 | 2450000 |
| 1.0 | 138750 | 3911250 |

Control:4050000

Cl₅₀=0.116µg/mL

Cl₉₀=3.151µg/mL

Tabla 55. Actividad tricomonocida *in vitro* de **preVMAS-72** (ensayo 1)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 3658333 | 716667 |
| 0.05 | 2925000 | 1450000 |
| 0.1 | 2733333 | 1641667 |
| 0.5 | 212500 | 4162500 |
| 1.0 | 131667 | 4243333 |

Control:4375000

Cl₅₀=0.083µg/mL

Cl₉₀=0.609µg/mL

Tabla 56. Actividad tricomonocida *in vitro* de **preVMAS-72** (ensayo 2)

| Concentración (µg/mL) | Trofozoitos vivos | Trofozoitos muertos |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| 0.01 | 3400000 | 912500 |
| 0.05 | 3175000 | 1137500 |
| 0.1 | 2316667 | 1995833 |
| 0.5 | 305000 | 4007500 |
| 1.0 | 0 | 4312500 |

Control:4312500

CI₅₀=0.075µg/mL

CI₉₀=0.575µg/mL

Tabla 57. CI₅₀ de los compuestos evaluados contra *T. vaginalis*

| Compuesto | CI ₅₀ (µg/mL) | | Promedio |
|-------------------|--------------------------|----------|----------|
| | Ensayo 1 | Ensayo 2 | |
| Albendazol | 0.262 | 0.271 | 0.267 |
| Nitazoxanida | 0.093 | 0.088 | 0.091 |
| Tizoxanida | 0.058 | 0.057 | 0.058 |
| PVB-K | 3.330 | 3.480 | 3.405 |
| VMAS-60 | 0.160 | 0.149 | 0.155 |
| VMAS-62 | 0.074 | 0.079 | 0.077 |
| VMAS-72 | 0.074 | 0.078 | 0.076 |
| VMAS-74 | 0.143 | 0.116 | 0.130 |
| preVMAS-72 | 0.083 | 0.075 | 0.079 |

Tabla 58. CI₉₀ de los compuestos evaluados contra *T. vaginalis*

| Compuesto | CI ₉₀ (µg/mL) | | Promedio |
|-------------------|--------------------------|----------|----------|
| | Ensayo 1 | Ensayo 2 | |
| Albendazol | 1.903 | 2.257 | 2.080 |
| Nitazoxanida | 0.915 | 0.864 | 0.890 |
| Tizoxanida | 0.840 | 1.136 | 0.988 |
| PVB-K | 2381.2 | 2957.3 | 2669.3 |
| VMAS-60 | 3.075 | 2.897 | 2.986 |
| VMAS-62 | 0.487 | 0.422 | 0.455 |
| VMAS-72 | 0.472 | 0.465 | 0.469 |
| VMAS-74 | 5.500 | 3.151 | 4.326 |
| preVMAS-72 | 0.609 | 0.575 | 0.592 |