



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE NUEVOS DERIVADOS  
BENCIMIDAZÓLICOS CON ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA  
EMPLEANDO LA LÍNEA CELULAR MDCK”**

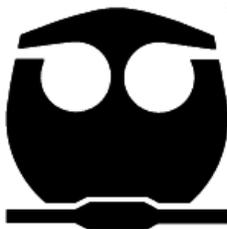
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUIMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A**

**KATIA PARCERO HERRERA**



**MÉXICO, D.F.**

**2009.**



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:** Profesor: Francisco Hernández Luis  
**VOCAL:** Profesor: Perla Carolina Castañeda López  
**SECRETARIO:** Profesor: Lilián Yépez Mulia  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: María Eva González Trujano  
**2º SUPLENTE:** Profesor: María Elena Bravo Gómez

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y  
Parasitarias, Hospital de Pediatría, Laboratorio de Parasitología  
Centro Médico Nacional Siglo XXI.

---

Dra. Lilián Yépez Mulia

Asesor del tema

---

Katia Parcero Herrera

Sustentante

## **DEDICATORIAS**

*A mis papás.*

*A mis hermanas.*

*A Jorge.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mi familia: mis padres y hermanas por su amor y apoyo incondicional.*

*Al proyecto CONACYT 80093 por el apoyo económico recibido.*

*Agradezco a la Dra. Lilián Yépez Mulia por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo, por su guía, su apoyo y sus enseñanzas en este proyecto de Tesis.*

*Agradezco muy sinceramente al Dr. Francisco Hernández Luis por sus apreciables consejos y su apoyo en este proceso.*

*A la Dra. Perla Castañeda por sus valiosos comentarios, consejos y enseñanzas no solamente durante la revisión de mi trabajo sino a lo largo de la carrera.*

*A la QFB Ma. Elena Bravo por tomarse el tiempo de revisar minuciosamente este trabajo, por sus observaciones y sugerencias para enriquecer mi tesis.*

*A la Dra. Samira Muñoz, Amparito, Rosita, Joel, Ricardo, Jesús, Paco, Cynthia y Erika de la UIMEIP, Centro Médico Siglo XXI del IMSS.*

*A mis amigos, con los que compartí momentos muy especiales a lo largo de la carrera.*

*A la UNAM por ser la Máxima Casa de Estudios y permitirme ser parte de ella.*

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	
1.1. Protozoosis.....	3
1.2. Fármacos antiparasitarios.....	5
1.2.1. Nitroderivados .....	6
1.2.1.1. Metronidazol .....	7
1.2.1.2. Nitazoxanida .....	8
1.2.2. Bencimidazoles .....	9
1.2.2.1 Albendazol .....	10
1.3. Problemática actual .....	13
1.3.1. Toxicidad.....	13
1.3.2. Resistencia.....	14
1.3.3. Fallas terapéuticas.....	16
1.4. Desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios .....	17
1.4.1. Descubrimiento.....	18
1.4.2. Optimización.....	18
1.4.3. Desarrollo.....	18
1.5. Ensayos de citotoxicidad .....	19
1.5.1. Ensayo de MTT.....	22
1.6. Nuevos Derivados bencimidazólicos con actividad antiprotozoaria .....	24
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	27
<b>3. OBJETIVOS</b>	
3.1. Objetivo General .....	27
3.2. Objetivos Particulares .....	27
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	28

## **5. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

5.1	Material y Reactivos .....	29
5.2	Cultivo Celular .....	30
5.2.1	Disociación Celular .....	30
5.3	Estandarización .....	30
5.3.1	Número de Células .....	31
5.3.2	Concentración de MTT y efecto del pH .....	31
5.3.3	Intervalo de concentraciones .....	31
5.4	Preparación de Compuestos.....	32
5.5	Ensayos de Citotoxicidad .....	33
5.6	Análisis Estadístico .....	34

## **6. RESULTADOS**

6.1	Estandarización .....	35
6.1.1	Número de Células .....	35
6.1.2	Concentración de MTT y efecto de pH .....	36
6.1.3	Intervalo de concentraciones .....	36
6.2	Evaluación de la Citotoxicidad de los Derivados Bencimidazólicos .....	37

## **7. DISCUSIÓN .....**

44

## **8. CONCLUSIONES .....**

52

## **BIBLIOGRAFÍA .....**

54

## **APÉNDICES**

I.	Medio de cultivo y soluciones .....	64
II.	Información de los derivados bencimidazólicos evaluados .....	66
III.	Conversión de las concentraciones empleadas de $\mu\text{g/ml}$ a $\mu\text{M}$ .....	67

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias causadas tanto por protozoarios como por helmintos afectan principalmente a los países en vías de desarrollo, debido a sus condiciones socio-económicas y sanitarias. Estas infecciones son particularmente endémicas de las zonas tropicales, donde las condiciones climáticas favorecen la supervivencia de los parásitos (Romero, 2008).

Los protozoarios son responsables de algunas de las enfermedades más importantes y prevalentes en los humanos, amenazando alrededor de 1250 millones de personas alrededor del mundo (Orozco y cols., 2002). Entre éstas se encuentra la giardiasis, una de las primeras causas de diarrea persistente en todo el mundo, cuyo agente causal es *Giardia intestinalis* (Upcroft y Upcroft, 1998). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), 280 millones de personas son víctimas de esta enfermedad cada año, siendo la población infantil la más afectada (WHO, 1998a). Por otro lado, *Entamoeba histolytica*, agente causal de la amibiasis, provoca entre 40,000 y 100,000 muertes anualmente (Walsh, 1986, citado en Ali y Nozaki, 2007), lo que la coloca en segundo lugar después de la malaria en mortalidad por protozoarios (WHO, 1997).

En nuestro país, las enfermedades parasitarias representan un gran problema de salud pública debido a factores socio-económicos y culturales, principalmente en zonas marginadas, donde las condiciones sanitarias son desfavorables por la falta de agua potable y alcantarillado, entre otros. De acuerdo al Boletín de Vigilancia Epidemiológica, en el 2007 se presentaron más de medio millón de casos de amibiasis intestinal y alrededor de 25,000 casos de giardiasis.

El control de estas enfermedades se lleva a cabo mediante la quimioterapia, que incluye nitroderivados como el metronidazol (**MTZ**) y la nitazoxanida (**NTZ**), así como bencimidazol-2-carbamatos (**BCM**) de metilo como el albendazol (**ABZ**). A pesar de que estos fármacos son efectivos contra los parásitos causales de la giardiasis y amibiasis, presentan distintas desventajas

como efectos tóxicos y/o propiedades biofarmacéuticas inadecuadas; esto último ocurre en el caso de los **BCM**, lo cual limita su biodisponibilidad y obliga al uso de tratamientos prolongados y altas dosis. Además, cada vez se tiene más evidencia de la resistencia que han desarrollado los parásitos ante los fármacos de elección, limitando su uso.

Considerando todo lo anterior, es indispensable el desarrollo de nuevos medicamentos antiparasitarios, más efectivos, que sean fáciles de producir, que presenten mejores propiedades fisicoquímicas para facilitar su biodisponibilidad y en los que se reduzcan los efectos adversos que puedan ocasionar. De esta manera, investigadores de la Facultad de Química y del Instituto Mexicano del Seguro Social Centro Médico Siglo XXI, han diseñado, sintetizado y evaluado la actividad antiprotozoaria de nuevos derivados bencimidazólicos, obteniéndose algunos compuestos con mejor actividad que la mostrada por el **MTZ**, contra *G.intestinalis* y *E. histolytica*.

La evaluación de la citotoxicidad de algunos de los derivados bencimidazólicos con actividad antiprotozoaria previamente determinada, es un aspecto muy importante dentro de la investigación pre-clínica en el desarrollo de moléculas candidatas que puedan ser consideradas en la quimioterapia antiparasitaria. Por lo anterior, en este trabajo de tesis se procedió a evaluar la citotoxicidad de 10 derivados bencimidazólicos empleando la línea celular MDCK y el método colorimétrico del MTT.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Protozoosis

La prevalencia de enfermedades parasitarias causadas tanto por protozoarios como por helmintos se ha incrementado en los últimos años, principalmente en los países en vías de desarrollo. Las infecciones parasitarias se distribuyen mundialmente pero son particularmente endémicas de las zonas tropicales, ya que las altas temperaturas y humedad favorecen el crecimiento de los parásitos. Esto, combinado con pobres condiciones socio-económicas y sanitarias, establece la situación ideal para la supervivencia y propagación de los parásitos (Romero, 2008)

Los protozoarios son responsables de algunas de las enfermedades más importantes y prevalentes en los humanos, amenazando alrededor de 1250 millones de personas en todo el mundo (Orozco y cols., 2002). Muchas especies de protozoarios son capaces de invadir el tracto gastrointestinal, el hígado, el bazo, el cerebro, la vagina y el torrente sanguíneo en humanos. El tracto gastrointestinal es el sitio de predilección de diversos flagelados y sarcodinos<sup>1</sup> causantes de alteraciones gastrointestinales ligeras hasta condiciones clínicas fatales. Tal es el caso de los protozoarios intestinales *Giardia intestinalis* y *Entamoeba histolytica*, agentes causales de episodios de diarrea en los países en desarrollo (Paniagua y cols., 2007)

*Giardia intestinalis*, también conocida como *G. lamblia* o *G. duodenalis*, es un protozoario flagelado enteropatógeno, que representa la primera causa de diarrea persistente en todo el mundo (Upcroft y Upcroft, 1998; Müller y cols., 2006). Este parásito coloniza el intestino delgado del hospedero y es el responsable de la giardiasis, una enfermedad caracterizada por diarrea crónica que puede resultar en el síndrome de malabsorción. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS; WHO por sus siglas en inglés), 280

---

<sup>1</sup> Los protozoarios están divididos según su mecanismo de locomoción en 4 clases: sarcodinos o rizópodos (pseudópodos), ciliados (cilios), flagelados o mastigóforos (flagelos) y esporozoos (sin ningún sistema de locomoción).

millones de personas son infectadas por este parásito cada año, siendo la población infantil la más afectada (WHO, 1998a).

La giardiasis es considerada una enfermedad zoonótica que afecta a más de 40 especies animales. Su prevalencia es alta en niños de países en desarrollo, pero decrece a 2-7% en países industrializados, por lo que en países en desarrollo, esta enfermedad es considerada una causa importante de morbilidad (Marshall y cols., 1997, citado en Ali y Nozaki, 2007). En México se reportaron en 2007, alrededor de 25,500 casos de giardiasis (Boletín de Vigilancia epidemiológica semana 49, 2007). Varios estudios clínicos han demostrado la emergencia de cepas de *Giardia* resistentes a los fármacos en uso, complicando el tratamiento de dicha enfermedad (Escobedo y Cimerman, 2007).

Este protozooario tiene 2 estadios en su ciclo de vida: el trofozoíto y el quiste o forma infectiva, el cual es ingerido en agua o alimentos contaminados o directamente por la vía fecal-oral. El quiste es capaz de sobrevivir en condiciones ambientales extremas. Una vez que éste entra al tracto gastrointestinal, tras la alcalinización del entorno, se convierte en trofozoíto, la forma vegetativa que se reproduce en el intestino delgado y que es responsable de los síntomas de diarrea y mala absorción de nutrientes. Posteriormente, los trofozoítos se vuelven a enquistar para pasar a las heces fecales, completando así el ciclo infectivo del parásito (Adam, 2001).

*Entamoeba histolytica* es un protozooario patógeno causante de la amibiasis, una enfermedad que puede manifestarse intestinal y extraintestinalmente. La amibiasis intestinal está caracterizada por diarrea, colitis y ameboma<sup>2</sup>, mientras que la extraintestinal causa absceso hepático e incluso la diseminación hacia otros órganos, pudiendo causar la muerte de los pacientes (Pritt y Clark, 2008). Las infecciones por *E. histolytica* causan entre 40,000 y 100,000 muertes anualmente (Walsh, 1986, citado en Ali y Nozaki, 2007), lo que la coloca en segundo lugar, después de la malaria, en mortalidad por protozoarios

---

<sup>2</sup> Lesión pseudo-tumoral constituida por necrosis, ulceración, edema, fibrosis e infiltrado inflamatorio en mucosa y submucosa.

(WHO, 1997). Los trofozoítos amebianos viven y se reproducen en el intestino grueso, donde forman los quistes que se transmiten a través de las heces infectando a otros individuos que consumen alimentos o agua contaminados (Cox, 2002).

La mayoría de los individuos infectados con *E. histolytica* no presentan síntomas, sin embargo, cerca del 10% de los individuos asintomáticos infectados desarrollan la enfermedad después de un año de adquirir la infección (Stanley, 2003). En México, la amibiasis intestinal es una de las principales infecciones parasitarias, reportándose en 2007 cerca de 538,000 casos (Boletín de Vigilancia epidemiológica semana 49, 2007), no obstante, se desconoce qué proporción de esta cifra es causada por *E. histolytica* y cuál por *E. dispar*, siendo ésta última una especie no patógena.

## 1.2. Fármacos Antiparasitarios

La era moderna de la quimioterapia empezó con el descubrimiento de agentes antiparasitarios a principios del siglo XX. Sin embargo, entre 1930 y 1965, el desarrollo de los medicamentos antibacterianos cobró mucha fuerza dejando a la terapéutica antiparasitaria en un segundo plano, a pesar de la extensa morbilidad, mortalidad y pérdidas socio-económicas causadas por las enfermedades parasitarias (Korolkovas, 1988; Sharma, 1997). De esta manera, se fueron desarrollando lentamente los medicamentos antiparasitarios (Tabla 1) que se siguen utilizando actualmente. Éstos presentan problemas de ineficacia terapéutica y efectos adversos.

En México, los fármacos aceptados por la Secretaría de Salud, que se encuentran dentro del cuadro básico de medicamentos antiparasitarios son los siguientes: albendazol, cloroquina, diiodohidroxiquinoleina, mebendazol, metronidazol, niclosamida, nitazoxanida, pirantel, prazicuantel, primaquina y tinidazol (Cuadro Básico de Medicamentos, 2008, COFEPRIS).

Existe una gran variedad de compuestos antiparasitarios de distinta naturaleza, sin embargo, en el presente trabajo nos enfocaremos solamente a algunos fármacos antiprotozoarios del tipo de los nitroderivados y de los derivados

bencimidazólicos, ya que éstos han sido objeto de estudio de nuestro grupo de trabajo.

Tabla 1. Fármacos de elección en el tratamiento de algunas parasitosis.

Enfermedad	Agente causal	Medicamentos de elección*
Protozoosis		
Amibiasis	<i>Entamoeba histolytica</i>	Metronidazol, tinidazol, cloroquina, furoato de diloxanida, yodoquinol, emetina, paromomicina, diyodohidroxiquinoleína
Trichomoniasis	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Metronidazol, tinidazol
Giardiasis	<i>Giardia intestinalis</i>	Quinacrina, metronidazol, tinidazol, furazolidona, paromomicina, albendazol, nitazoxanida
Balantidiasis	<i>Balantidium coli</i>	Metronidazol, yodoquinol, tetraciclina
Helmintiasis		
Ascariasis	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Piperazina, pirantel, levamisol, tiabendazol, albendazol, mebendazol
Triquinelosis	<i>Trichinella spiralis</i>	Mebendazol, tiabendazol, albendazol,
Cisticercosis	<i>Taenia solium</i>	Prazicuantel, albendazol, mebendazol, corticoesteroides

\* Modificado de: Sharma, 1997; Farthing, 2006.

### 1.2.1 Nitroderivados

A principios de los años 40's se descubrió la actividad antibacteriana y antiparasitaria de distintos nitroheterociclos, como es el caso de los nitrofuranos con actividad contra el parásito causante de la malaria (Sharma, 1997). Esto despertó el interés de evaluar la actividad antimicrobiana de numerosos compuestos nitroderivados que posteriormente dieron lugar a fármacos efectivos en la quimioterapia contra enfermedades microbianas y parasitarias. Tal es el caso del metronidazol y la nitazoxanida, que se mencionan a continuación.

1.2.1.1. Metronidazol

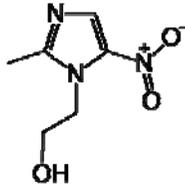


Figura 1. Estructura del metronidazol

El metronidazol (**MTZ**) (Figura 1) es un 5-nitroimidazol ampliamente utilizado en el tratamiento de protozoosis como giardiasis, amibiasis y trichomoniasis, y en infecciones bacterianas (WHO, 1998b, citado en Adagu y cols., 2002; Farthing, 2006). Su mecanismo de acción contra los parásitos (Figura 2) consiste en la reducción del grupo nitro por enzimas nitroreductasas, a partir de los electrones donados por la piruvato ferredoxin oxido-reductasa (PFOR), formando intermediarios reactivos capaces de causar daño directo al DNA y RNA del parásito, inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos y causando la muerte del parásito (Sharma, 1997; Farthing, 2006). El **MTZ** se metaboliza en el hígado, donde sufre reacciones de oxidación, hidroxilación y conjugación con ácido glucurónico, dando lugar a distintos metabolitos que se excretan principalmente por vía renal. El metabolito más importante es el 2-hidroximetil metronidazol, responsable de la actividad bactericida y antiprotozoaria (Vademecum).

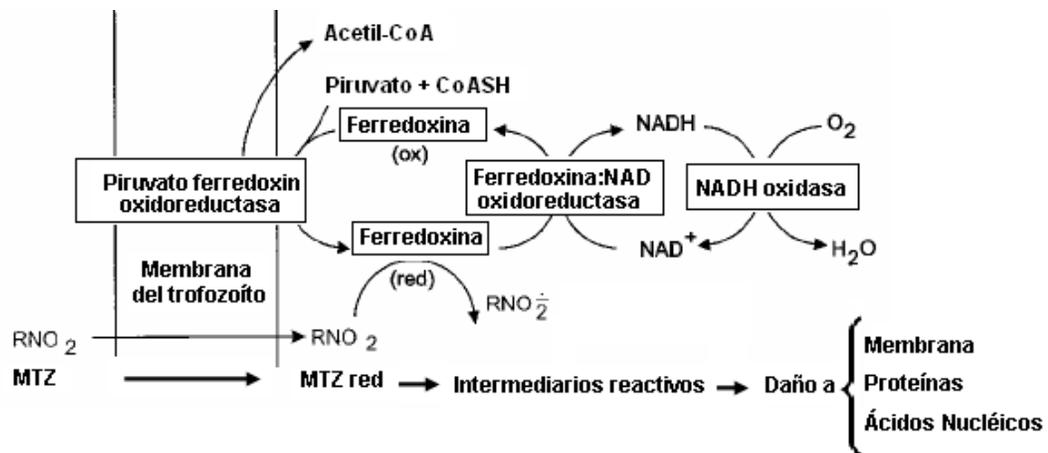


Figura 2. Mecanismo de acción del MTZ  
(Adaptado de Upcroft y Upcroft, 2001b)

## 1.2.1.2. Nitazoxanida

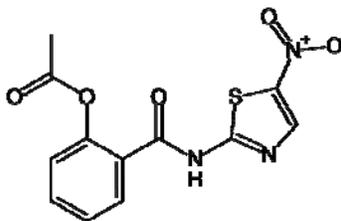


Figura 3. Estructura de la nitazoxanida

La nitazoxanida (**NTZ**) (Figura 3) es un nitrotiazol que tiene actividad antiparasitaria de amplio espectro, siendo efectiva contra protozoarios como *G. intestinalis*, *E. histolytica*, *T. vaginalis*, y *Cryptosporidium parvum* (Farthing, 2006; Müller y cols., 2006) y helmintos como *Ascaris lumbricoides* y *Taenia solium* (Parashar y Arya, 2005). A pesar de que numerosos estudios han mostrado que el grupo nitro se requiere para la actividad biológica de la **NTZ**, su eficacia terapéutica contra cepas resistentes a **MTZ**, sugiere que su modo de acción es distinto al de los nitroimidazoles. Se ha postulado que su mecanismo de acción consiste en la inhibición de diversas enzimas, como la PFOR presente en bacterias y parásitos anaerobios. En relación a lo anterior, recientemente se encontró que la **NTZ** inhibe a la PFOR de *Helicobacter pylori*, al interferir con su cofactor<sup>3</sup> tiamina-pirofosfato (TPP), lo cual podría estar sucediendo en los protozoarios anaerobios (Hoffman y cols., 2007). En el caso de *G. intestinalis*, se encontró que la **NTZ** se une e inhibe a una nitroreductasa, la GINR1 (Müller y cols., 2007b), interfiriendo con el metabolismo energético del parásito y causando su muerte. Además, se sabe que la **NTZ** inhibe la actividad de proteínas disulfuro-isomerasas (PDI) de *G. intestinalis*, causando el ensamble inadecuado de proteínas y por lo tanto la interrupción de procesos metabólicos y regulatorios importantes para el parásito (Müller y cols., 2008).

Tras la administración de la **NTZ**, ésta es rápidamente hidrolizada a su metabolito activo, la tizoxanida, la cual, a su vez, sufre una reacción de glucuronidación para ser excretada por la vía biliar, renal y en menor proporción por vía fecal (Parashar y Arya, 2005).

<sup>3</sup> Un cofactor es un componente no proteico, termoestable y de bajo peso molecular, necesario para la acción catalítica de una enzima; pueden ser iones metálicos o moléculas orgánicas.

### 1.2.2. Bencimidazoles

El bencimidazol, es un biciclo formado por un benceno fusionado a un anillo imidazólico en las posiciones 4 y 5 (Figura 4). Debido a su amplio espectro de actividad biológica (antiparasitario, antibacteriano, antiviral y antifúngico), el núcleo bencimidazólico ha sido reconocido como un heterociclo versátil en el desarrollo de fármacos (Navarrete-Vázquez, 2004; Hernández-Martínez, 2008). En 1961 se descubrió la actividad antihelmíntica de amplio espectro de un derivado bencimidazólico, el tiabendazol, lo cual dio lugar a una nueva era en la investigación farmacéutica dentro de la quimioterapia contra enfermedades gastrointestinales (Brown y cols., 1961, citado en Townsend y Wise, 1990; Sharma, 1994).

Los derivados bencimidazólicos (**BCD**) pueden sufrir diversas reacciones para dar lugar a compuestos estables, muy activos para el tratamiento de distintas parasitosis. Como resultado de dichas modificaciones, surgió posteriormente una nueva generación de compuestos utilizados en medicina humana y veterinaria, los bencimidazol-2-carbamatos de metilo (**BCM**), dentro de los cuales se encuentran el mebendazol y el albendazol (**ABZ**), fármacos de elección en el tratamiento de diversas helmintiasis (Townsend y Wise, 1990; Sharma, 1997). Los **BCM** son de los compuestos antihelmínticos más utilizados en la actualidad, debido a su amplio espectro de actividad.

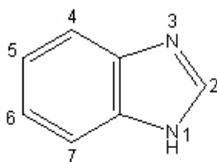


Figura 4. Estructura y numeración del bencimidazol

El modo de acción de los **BCD** incluye 3 mecanismos principales (Figura 5):

- a) Inhibición de la polimerización de tubulina: Los **BCD** tienen la habilidad de unirse *in vitro* e *in vivo* a la proteína  $\beta$ -tubulina, un componente del citoesqueleto de todas las células, inhibiendo su polimerización y la formación de microtúbulos. Existen evidencias de que estos compuestos presentan mayor afinidad por la  $\beta$ -tubulina del parásito que por la de los mamíferos, explicando así su selectividad (Lacey, 1990).

- b) Inhibición del metabolismo de glucosa: La enzima fumarato-reductasa juega un papel muy importante en el metabolismo anaerobio de la glucosa de varios helmintos. Se sabe que los **BCD** inhiben a esta enzima, interfiriendo con la fuente energética y por lo tanto provocando la parálisis del parásito. Además, esta enzima no está presente en mamíferos, por lo cual es un blanco excelente en la quimioterapia antihelmíntica (Sharma, 1997).
- c) Inhibición de la incorporación de glucosa: Los **BCD** alteran severamente el gradiente transmembranal de protones, interfiriendo así con la producción de energía celular. El bloqueo de la incorporación de glucosa exógena o de su transporte, así como la depleción de los niveles de glucógeno, genera una disminución en los niveles de ATP, indispensable para las funciones vitales del parásito y por lo tanto, causándole la muerte (Sharma, 1997).

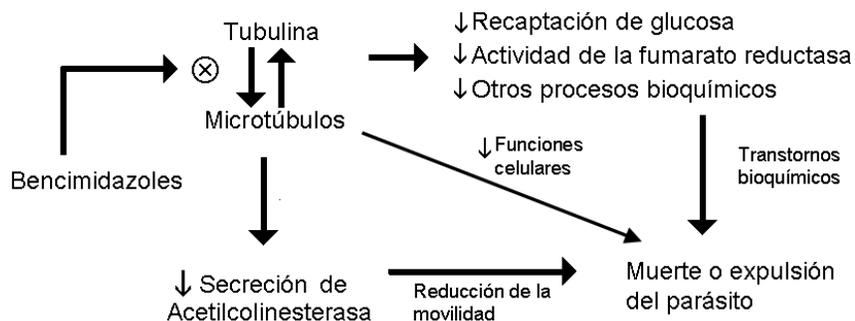


Figura 5. Mecanismo de acción de los bencimidazoles

#### 1.2.2.1. Albendazol

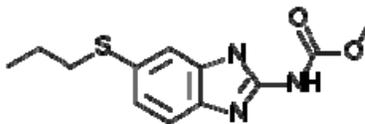


Figura 6. Estructura del Albendazol

El albendazol (**ABZ**) (Figura 6) es un **BCM** que fue utilizado por primera vez como antihelmíntico de amplio espectro en 1982 (Upcroft y Upcroft, 2001b). Su espectro de acción incluye infecciones helmínticas intestinales y sistémicas como echinococcosis alveolar (*Echinococcus multilocularis*), neurocisticercosis

(*Taenia solium*), estrogiloidosis (*Strongyloides stercoraria*), enterobiasis (*Enterobius vermicularis*) (Venkatesen, 1998) y triquinosis entre otras cestodiasis y nematodiasis (Aparicio y cols., 2003). El **ABZ** sufre una reacción de oxidación para dar lugar a su sulfóxido (**ABSO**), el cual es el metabolito activo y posteriormente éste último se vuelve a oxidar para formar la sulfona de albendazol (**ABS**), que es inactiva (Venkatesen, 1998; Rawden y cols., 2000).

Tomando en cuenta que el citoesqueleto y el disco ventral de *G. intestinalis* están constituidos por microtúbulos formados por  $\beta$ -tubulina y que el **ABZ** ejerce su actividad antiparasitaria interactuando con esta proteína, se pensó que este derivado bencimidazólico podría presentar actividad giardicida. De esta manera dio inicio el estudio de su actividad antiprotozoaria *in vitro* (Meloni y cols., 1990; Cedillo-Rivera y Muñoz, 1992; Reynoldson y cols., 1992).

Los ensayos *in vitro* empleando el método de subcultivo confirmaron la actividad giardicida del **ABZ**; en éstos se demostró que el **ABZ** es 30 a 50 veces más potente que el **MTZ** (Chávez y cols., 1992). Por microscopía electrónica se demostró que el **ABZ** indujo efectos dramáticos en la morfología del trofozoíto (Figura 7) y fragmentación del disco ventral asociado con depósitos de tubulina precipitada (Figura 8) (Chávez y cols., 1992; Cedillo-Rivera y Muñoz, 1992).

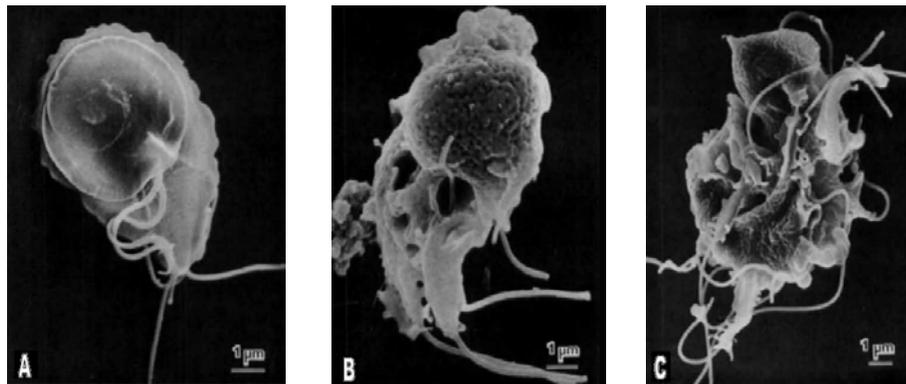


Figura 7. Imagen de microscopía electrónica de barrido. Efecto del **ABZ** sobre los trofozoítos de *Giardia*. **A** corresponde al control; mientras que **B** y **C** corresponden al tratamiento con **ABZ**.

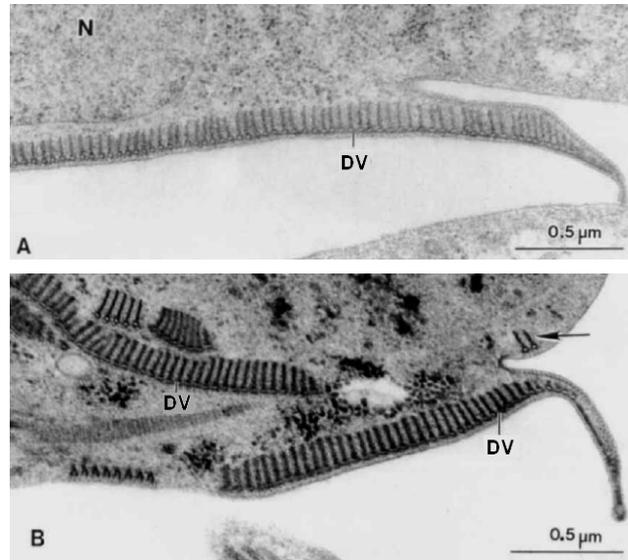


Figura 8. Micrografía de transmisión de electrones. Efecto del **ABZ** sobre el disco ventral (DV) de los trofozoítos de *Giardia*. **A** corresponde al control; **B** corresponde al tratamiento con **ABZ**.

En la Tabla 2, se muestran las concentraciones inhibitorias 50 (**CI<sub>50</sub>**) de tres de los fármacos empleados en la quimioterapia de la giardiasis y de la amibiasis: **MTZ**, **NTZ** y **ABZ** (Cedillo-Rivera y cols., 2002). En ella, se puede ver que la **NTZ** fue 94 y 3 veces más potente que el **MTZ** y el **ABZ** contra *Giardia*, respectivamente, y 6 veces más potente que el **MTZ** contra *Entamoeba*.

Tabla 2. Valores de **CI<sub>50</sub>** del **MTZ**, **NTZ** y **ABZ** contra *G.intestinalis* y *E. histolytica*.

Fármaco	CI <sub>50</sub> (μM)*	
	<i>G. intestinalis</i> IMSS:1090:1	<i>E. histolytica</i> HM1-IMSS
Metronidazol	1.226	0.350
Nitazoxanida	0.013	0.055
Albendazol	0.037	56.53

\* Información tomada de: Cedillo-Rivera y cols., 2002.

### 1.3. Problemática actual

Los casos de amibiasis intestinal (538,000) y de giardiasis (25,500) reportados en nuestro país en 2007 (Boletín de Vigilancia epidemiológica semana 49, 2007) ponen de manifiesto que a pesar de la eficacia de los fármacos giardicidas y amebicidas mencionados anteriormente, estas enfermedades intestinales siguen representando un problema de salud pública.

En la actualidad, los principales problemas de los tratamientos giardicidas y amebicidas se pueden resumir en 3 factores:

- i. Toxicidad
- ii. Resistencia
- iii. Fallas terapéuticas

#### 1.3.1. Toxicidad

Muchos medicamentos provocan una gran variedad de efectos adversos en los pacientes. Tal es el caso del **MTZ**, que tiene efectos como anorexia, náusea, vómito y sabor metálico en la mayoría de los pacientes (Kucik y cols., 2004) hasta pancreatitis y efectos tóxicos a nivel del sistema nervioso central a altas dosis (Müller y cols., 2006). Además, se tiene evidencia de sus efectos mutagénicos y carcinogénicos en diversos estudios *in vitro* e *in vivo* (Elizondo y cols., 1996; Bendesky y cols., 2002). Los efectos secundarios del **ABZ** son pocos y generalmente ligeros, como mareo, dolor abdominal y comezón, pero también se ha demostrado que es teratogénico en animales, por lo cual se debe prohibir su uso durante el embarazo y lactancia (Venkatesen, 1998). En cuanto a la **NTZ**, ésta no presenta riesgos de toxicidad como los del **MTZ**, ya que sus productos de activación no inducen mutaciones en el ADN (Esposito y cols., 2005). Se cree que el átomo de azufre que reemplaza al nitrógeno en el anillo, es responsable de algún tipo de detoxificación de los nitroderivados, lo cual explica que los nitroimidazoles sean mutagénicos mientras que los nitrotiazoles no lo sean. No obstante, estudios recientes han demostrado que la **NTZ** también causa efectos adversos como dolor abdominal, cefalea y diarrea, por lo cual también debe ser usada con precaución (Belkind-Valdovinos y cols., 2004; Rodríguez y cols., 2004).

### 1.3.2. Resistencia

El uso inadecuado de medicamentos antiparasitarios ha generado el problema de la resistencia de parásitos ante éstos (Upcroft y Upcroft, 2001a; Bansal y cols., 2006). Algunas de las causas por las que se genera la resistencia son: Regímenes quimioterapéuticos inadecuados o inconclusos dentro de los cuales se encuentran exposiciones agudas y a corto plazo hacia los medicamentos, la exposición por parte de los pacientes a dosis subletales y la automedicación, que se vuelve posible por la venta incontrolada de medicamentos OTC's.<sup>4</sup>

En la actualidad, se tiene evidencia de la existencia de aislados clínicos de parásitos resistentes a **MTZ** y de cepas resistentes a **ABZ** y **NTZ** inducidas *in vitro* (Upcroft y Upcroft, 2001b; Argüello-García y cols., 2004; Müller y cols., 2007a). Se ha reportado que la prevalencia de la resistencia clínica de *Giardia* al **MTZ** llega hasta un 20% (Farthing, 1996). Por otro lado, en numerosos estudios se ha demostrado que las dosis y/o concentraciones letales 50 (CL<sub>50</sub> o DL<sub>50</sub>) y las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) contra parásitos como *Giardia sp.*, *Entamoeba sp.* y *Trichomonas sp.*, entre otros, varían no solo de acuerdo a las técnicas utilizadas para evaluar la actividad antiparasitaria *in vitro*, sino a las clonas de un mismo cultivo de parásitos, demostrando así, la variabilidad en la susceptibilidad parasitaria ante los tratamientos de elección (Upcroft y cols., 1990; Upcroft y Upcroft, 2001a; Argüello-García y cols., 2004; Bansal y cols., 2004; Müller y cols., 2007a).

De manera general, se han mencionado 4 mecanismos principales de resistencia hacia los fármacos antiprotozoarios (Bansal y cols., 2006):

- 1) Disminución en la captación del fármaco debida a la pérdida de transportadores necesarios para su entrada hacia la célula.
- 2) Reflujo de las moléculas por la presencia de la glicoproteína-P y ATPasas.
- 3) Cambios en la expresión génica y mutaciones en los blancos de acción.
- 4) Pérdida de la activación del fármaco por cambios en enzimas metabólicas involucradas en dicho proceso.

---

<sup>4</sup> \*OTC: "Over the counter" Medicamento que se vende sin algún tipo de prescripción por parte de un médico.

En el caso de *G. intestinalis*, se ha encontrado que la resistencia al **MTZ** se debe a una disminución en la expresión y/o actividad de la PFOR del parásito, impidiendo la activación del fármaco, y por lo tanto su efecto (Upcroft y Upcroft, 2001b). Por otro lado, en cepas de *E. histolytica* resistentes a **MTZ** se ha encontrado un aumento en la expresión de la superóxido dismutasa que contiene Fe (fe-SOD) y la peroxirredoxina, enzimas involucradas en el metabolismo detoxificante del parásito; y una disminución en la expresión de la ferredoxina y de flavin-reductasas que median el transporte de electrones y por lo tanto permiten la activación del fármaco (Bansal y cols., 2006).

A pesar de que se sabe que la resistencia al **ABZ** en algunos nemátodos se debe a mutaciones en el aminoácido 200 de la secuencia de la  $\beta$ -tubulina, en *Giardia* no se ha encontrado esa mutación, sugiriendo que el mecanismo de resistencia es distinto en este protozoario (Upcroft y Upcroft, 2001b). Evidencias recientes demuestran que en cepas de *G. intestinalis* resistentes a **ABZ**, existen mutaciones en secuencias de la  $\beta$ -giardina, una proteína importante para la formación de microtúbulos y filamentos, que junto con otras proteínas contráctiles, permiten la formación del disco ventral del protozoario, importante en la unión del parásito a la mucosa intestinal. En las cepas resistentes a **ABZ**, se observaron cambios en el doblamiento proteico del extremo carboxilo terminal de la  $\beta$ -giardina por la presencia de repetidos de prolina, sugiriendo que el mecanismo de resistencia pudiera relacionarse con cambios en las funciones regulatorias de esta proteína (Jiménez-Cardoso y cols., 2008).

Hablando de la resistencia en clonas de *G. intestinalis* a la **NTZ**, en estudios recientes se encontraron cambios en la expresión de proteínas involucradas en el ensamble y doblamiento proteico, en la adhesión y en el metabolismo energético de dicho protozoario. Particularmente, se detectó un aumento en la expresión de proteínas disulfuro-isomerasas (PDI2 y PDI4), y chaperonas como las proteínas de choque térmico (HSP70 y HSP90); y una disminución en la expresión de nitroreductasas. Asimismo, se encontraron cambios en la expresión de algunas proteínas variables de superficie (VSP's). Esto se puede explicar, ya que las cepas resistentes que sobreexpresan chaperonas y

proteínas involucradas en la estabilización celular, compensarían la inhibición de las isomerasas causada por la **NTZ**. (Müller y cols., 2007a; Müller y cols., 2008). Además, estas evidencias muestran que *G. intestinalis* presenta mecanismos adaptativos complejos, que incluyen la variación antigénica y la regulación positiva y negativa en la expresión génica, para responder a cambios en el medio como la presencia de fármacos.

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, los estudios de resistencia a **ABZ** y **NTZ** se han hecho en cepas resistentes inducidas *in vitro*, sin embargo, los mecanismos de resistencia de *E. histolytica* a **NTZ** aún no han sido estudiados.

### 1.3.3. Fallas terapéuticas

En muchos casos sucede que cuando se evalúa la actividad biológica de distintos compuestos antiparasitarios *in vitro*, éstos muestran una gran eficacia, sin embargo, cuando se realizan los ensayos *in vivo*, se encuentran fallas terapéuticas. Lo anterior se debe a que los compuestos a menudo tienen propiedades biofarmacéuticas<sup>5</sup> inadecuadas, lo cual constituye alrededor del 40% de las causas que contribuyen al fracaso de moléculas en el desarrollo de medicamentos (Shillingford y Vose, 2001; Hidalgo, 1999).

Tal es el caso de los **BCM**, los cuales a pesar de haber demostrado tener actividades antiparasitarias muy altas, son prácticamente insolubles en agua, lo cual limita su biodisponibilidad. El **ABZ**, por ejemplo, tiene una absorción oral muy pobre ya que por su insolubilidad acuosa, solamente el 5% llega a la circulación; esto hace que se requieran dosis muy altas y tratamientos prolongados (Cook, 1990; Rivera y cols., 2007), lo que representa una desventaja para los pacientes.

Como se puede ver, estos 3 factores además, están íntimamente relacionados entre sí, pues las fallas terapéuticas causadas por las propiedades

---

<sup>5</sup> Las propiedades biofarmacéuticas de las moléculas incluyen características inherentes a la estructura química, como solubilidad, grado de ionización, volumen molecular, área polar superficial y enlaces de hidrógeno, así como características inherentes al proceso biológico como permeabilidad celular, reflujo por transportadores, unión a proteínas y biotransformación.

biofarmacéuticas inadecuadas de las moléculas, provocan la necesidad del uso de dosis muy altas, lo que trae como consecuencia un aumento en los costos y en los riesgos de toxicidad. Ésta última, a su vez, provoca que muchos pacientes no terminen los regímenes quimioterapéuticos, impidiendo la erradicación del parásito y promoviendo la generación de resistencia ante los medicamentos de elección. Finalmente, la resistencia crea la necesidad de utilizar terapias donde se combinen más de un medicamento, lo cual representa un mayor riesgo de efectos adversos por las interacciones medicamentosas. Es por estas razones, que existe la necesidad de desarrollar nuevos medicamentos antiprotozoarios, fáciles de producir, que tengan mejores propiedades biofarmacéuticas y que no presenten riesgos de toxicidad.

#### 1.4. Desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios

El desarrollo de un medicamento es un proceso complejo y extenso constituido por varias etapas, que abarcan desde el descubrimiento de una molécula, hasta la aprobación de un fármaco para su uso comercial, donde las probabilidades de éxito son bajas. Para los medicamentos en general, tan sólo el 20% de los descubrimientos, conducen a una molécula candidata, de las cuales solamente el 10% alcanzan el registro comercial (Pauwels, 2006).

En la Figura 9 se muestra un esquema de las etapas del desarrollo de medicamentos.

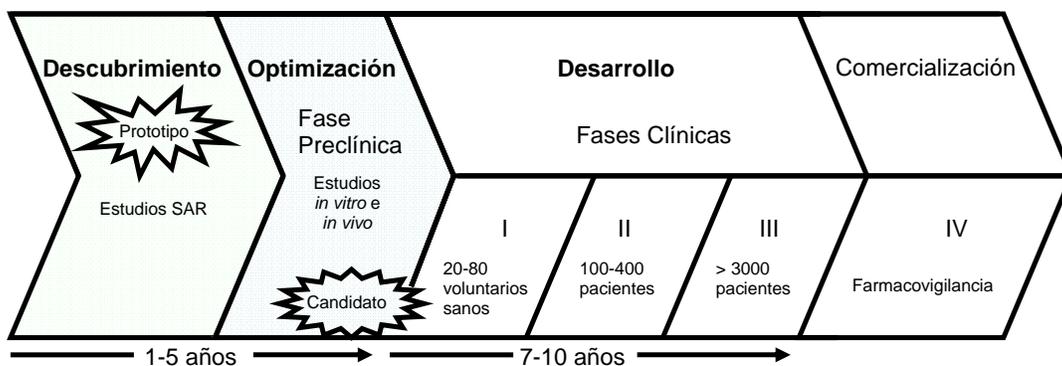


Figura 9. Etapas del desarrollo de un medicamento

#### 1.4.1. Descubrimiento

La primera etapa en el desarrollo de un medicamento consta del descubrimiento en sí, de las moléculas que tienen actividad biológica. Éstas se pueden obtener de 3 distintas fuentes: Síntesis, productos naturales y microorganismos. En esta etapa se pueden crear alrededor de 30000 compuestos de los cuales se seleccionan tan solo 2000 moléculas para entrar a la fase preclínica de optimización (Shillingford y Vose, 2001). Además, se llevan a cabo estudios de relación estructura-actividad (SAR) donde se evalúa el grupo farmacofórico<sup>6</sup>, y se descubren los prototipos<sup>7</sup> (Figura 9).

#### 1.4.2. Optimización

Esta etapa está constituida por los estudios preclínicos, es decir, estudios *in vitro* en cultivos e *in vivo* en animales de laboratorio, para evaluar la actividad biológica de los compuestos sintetizados. Conjuntamente con estos estudios, es necesario evaluar las propiedades ADMET (Absorción-Distribución-Metabolismo-Excreción-Toxicidad) para elegir las moléculas con las mejores propiedades biofarmacéuticas, que tengan una mayor probabilidad de tener éxito al final del desarrollo. Esta fase, tiene como objetivo, perfeccionar los prototipos para dar lugar a moléculas candidatas capaces de pasar a la fase clínica de desarrollo. De manera general, se puede decir que aquí se lleva a cabo el establecimiento de los parámetros que relacionan la eficacia contra la toxicidad del compuesto (Figura 9).

#### 1.4.3. Desarrollo

Esta etapa está constituida por las fases de desarrollo clínico I, II y III, en las cuales se evalúan las propiedades farmacocinéticas así como la relación dosis-respuesta en humanos. Las características de cada fase son las siguientes (Hidalgo, 1999) (Figura 9):

---

<sup>6</sup> Farmacóforo: Sabiendo que la actividad de un fármaco se da por una interacción ligando-receptor, el farmacóforo, es la porción estructural del ligando (fármaco) responsable de la interacción con su receptor, y por lo tanto, de desencadenar la actividad.

<sup>7</sup> Prototipo: Conocido como "lead", molécula que tiene una actividad biológica de interés, pero que presenta otras características indeseables, por lo cual se debe optimizar.

Fase Clínica I: Se lleva a cabo el ajuste de dosis en un número de 20 a 80 voluntarios sanos. Se establece la seguridad del producto, las dosis toleradas, así como sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas.

Fase Clínica II: Los estudios se realizan en un número de 100-400 pacientes, para determinar la eficacia y seguridad terapéutica. Se evalúan los posibles efectos secundarios.

Fase Clínica III: Se prueban las moléculas candidatas en más de 3000 pacientes para monitorear la eficacia y los efectos secundarios frente a diferentes agentes de eficacia comprobada.

Esta etapa funciona como un tamiz donde de cada 200 moléculas candidatas, tan solo 1 logra el éxito comercial (Shillingford y Vose, 2001). Finalmente, cuando el fármaco pasa todas las fases del desarrollo con resultados satisfactorios, se solicita la aprobación para el registro del nuevo medicamento para su comercialización. Una vez en el mercado, comienza la fase clínica IV, de post-comercialización o farmacovigilancia, donde se continúan haciendo evaluaciones periódicas con el medicamento a la venta, para establecer la seguridad del producto y detectar incidencias de reacciones adversas y efectos a largo plazo (Figura 9).

### 1.5. Ensayos de Citotoxicidad

Una parte muy importante dentro del desarrollo de medicamentos, una vez demostrada su actividad biológica, es la evaluación de su citotoxicidad. Las propiedades ADMET son críticas para que el medicamento pueda llegar a ser un éxito comercial (Li, 2005). La evaluación de la citotoxicidad de un compuesto se puede llevar a cabo tanto en ensayos *in vivo*, en animales de laboratorio, como en ensayos *in vitro*. En este apartado nos enfocaremos a las técnicas de evaluación *in vitro*.

Una de las formas en que se evalúa la citotoxicidad de compuestos es mediante su efecto en el crecimiento celular, ya sea en ensayos de

proliferación o de viabilidad celular. En estos ensayos se emplean líneas celulares que permiten establecer las condiciones óptimas del cultivo celular (número de células, tiempo de incubación, entre otras). En este tipo de ensayos se puede evaluar la eficacia de compuestos quimioterapéuticos en el rastreo de moléculas con actividad biológica y el potencial citostático o antitumoral dentro del desarrollo de medicamentos contra el cáncer (Roche Applied Science, 2003).

El uso de líneas celulares que retengan propiedades órgano-específicas, representa un sistema experimental conveniente para la evaluación toxicológica. Algunos tipos de líneas celulares que se emplean para realizar ensayos de citotoxicidad son la línea celular Caco-2 y la MDCK, entre otras. La primera proviene de un adenocarcinoma de colon humano, y tras su diferenciación en cultivos de monocapas confluentes, adquiere características morfológicas y funcionales de enterocitos<sup>8</sup> normales. Este tipo celular en específico, es ampliamente utilizado en estudios de permeabilidad intestinal, en un sistema mundialmente aceptado, diseñado para la evaluación de distintos mecanismos de transporte a través del epitelio intestinal (Li, 2001).

La línea celular MDCK, proveniente de epitelio renal de perro, posee una morfología epitelial distintiva y características anatómicas y funcionales de células tubulares normales de mamífero, entre las cuales se encuentran la formación de uniones estrechas y la presencia de microvellosidades (Rindler y cols., 1979; Saier, 1981). De esta manera, las células MDCK presentan distintas propiedades bioquímicas que le permiten ser un modelo biológico adecuado para estudios de absorción, permeabilidad (Di, 2003; Li, 2005) y citotoxicidad (Han y Karim, 2008; Liu y cols., 2008; Halliday y cols., 2009; Mena-Rejon y cols., 2009).

Los ensayos de proliferación celular son aquellos en los que se cuantifica el número de células que se están dividiendo activamente en un cultivo, por lo cual la síntesis de ácidos nucleicos o de proteínas es una medida indirecta de

---

<sup>8</sup> Células epiteliales maduras que revisten la mucosa intestinal. Su función es la absorción de nutrientes.

dicha proliferación. Tal es el caso del ensayo de sulforrodamina B (SRB) y de cristal violeta (CV), en los cuales, se tiñen componentes celulares, en este caso, las proteínas totales y el DNA respectivamente, después de ser fijados, y posteriormente se cuantifican espectrofotométricamente para correlacionar el contenido proteico total o nucleico total con la proliferación celular. Otros ensayos que se utilizan comúnmente son aquellos en donde se agregan al medio de cultivo, precursores de DNA marcados como 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) o timidina tritiada ([3H]-Timidina), los cuales serán incorporados al DNA genómico por las células que se estén replicando, y posteriormente podrán ser cuantificados; la incorporación del precursor marcado al DNA, será directamente proporcional a la proliferación celular.

Por otro lado, en los ensayos de viabilidad celular se cuantifican las células “sanas” de un cultivo, ya sea directamente contándolas al microscopio, o indirectamente, mediante un indicador de las células “íntegras” en una población, como por ejemplo, actividad metabólica o integridad de la membrana celular (Roche Applied Science, 2003). El daño celular provocado por compuestos que sean tóxicos, traerá como consecuencia la pérdida de la habilidad de las células para mantener y proveer energía para sus funciones vitales, por lo cual, los ensayos de capacidad metabólica son los más comúnmente utilizados. En este tipo de ensayos, se puede evaluar la actividad metabólica de distintos organelos, dentro de los cuales las funciones mitocondriales son las más empleadas. En la Tabla 3, se muestran distintos indicadores de viabilidad y proliferación celular así como algunos ejemplos de los ensayos que se basan en éstos.

Tabla 3. Ensayos de Citotoxicidad *in vitro*

Tipo de Ensayo	Indicador	Parámetro que se mide	Ejemplos
Proliferación	Síntesis de DNA	Incorporación de precursores de DNA por la replicación	BrdU [3H]-Timidina
		Contenido nucleico total	CV
	Síntesis de proteínas	Contenido proteico total	SRB
Viabilidad	Actividad metabólica	Funciones mitocondriales	MTT, XTT, WST-1
		Funciones lisosomales	RN
		Función celular	[Glu] <sub>extracelular</sub>
	Integridad de la membrana	Exclusión de colorantes	Azul tripano
		Niveles de enzimas citoplasmáticas	LDH
	Funciones de Transporte	Transporte activo	RN
	Contenido de metabolitos	ATP celular	Luciferina-luciferasa
Muerte celular	Apoptosis	Actividad de caspasas	

(MTT = Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio ; XTT = Sal monosódica de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-Tetrazolio; WST-1 = Sal monosódica de 2-(4-Yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio ; RN = Rojo neutro; [Glu]<sub>extracelular</sub> = Glucosa extracelular; LDH = Lactato deshidrogenasa)

Tabla elaborada con información de: Li, 2001; Li, 2005; Roche Applied Science, 2003

### 1.5.1. Actividad metabólica: Ensayo de MTT

La actividad metabólica mitocondrial, a menudo se evalúa mediante la incubación de las células con sales de tetrazolio (MTT, XTT, WST-1)<sup>9</sup> que son convertidas a un compuesto colorido de formazán por las células

<sup>9</sup> XTT y WST-1 son sales de tetrazolio modificadas que forman productos de formazán solubles a diferencia del MTT, cuyo producto de reacción es insoluble en agua.

metabólicamente activas (Roche Applied Science, 2003). Este compuesto se puede disolver y cuantificar espectrofotométricamente.

El MTT sufre una reacción de reducción por el sistema mitocondrial succinato-tetrazolio reductasa, el cual pertenece a la cadena respiratoria mitocondrial y es activo únicamente en las células viables, para formar un compuesto colorido insoluble en agua, una sal de formazán. Además, hoy en día se sabe que estas reacciones de reducción requieren la presencia de cofactores como el NADH para llevarse a cabo ([www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis/docs/manual\\_apoptosis.pdf](http://www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis/docs/manual_apoptosis.pdf)). Finalmente, la sal de formazán se puede disolver en dimetilsulfóxido (DMSO) para posteriormente ser cuantificado fácil y rápidamente a una longitud de onda determinada (540-570nm). En la Figura 10, se muestra la estructura del MTT así como la reacción que sufre para dar lugar a la sal de formazán.

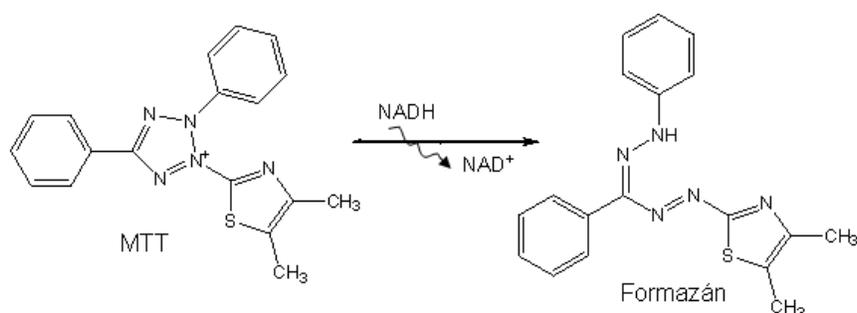


Figura 10. Reacción del MTT para el ensayo de viabilidad celular.

El ensayo de MTT ha sido ampliamente utilizado para la evaluación de la citotoxicidad de xenobióticos de distinta naturaleza entre los que se encuentran: agentes que favorecen la biodisponibilidad de distintos fármacos (tensoactivos, ciclodextrinas, etc.) (Luo y cols., 2007; Bouquet y cols., 2009), agentes antimicrobianos sintéticos (Chen y cols., 2009), extractos y aceites esenciales provenientes de plantas (Visanji y cols., 2004; Kim y cols., 2009; Villa y cols. 2009) y de manera general compuestos con potencial antitumoral en el desarrollo de fármacos anticancerígenos (Visanji y cols., 2004; Oliveira y cols., 2007; Wang y cols., 2008).

### 1.6. Nuevos derivados bencimidazólicos con actividad giardicida y amebicida

La molécula del bencimidazol es susceptible de un gran número de sustituciones químicas, por lo que representa un prototipo de molécula guía para la creación de nuevos fármacos. Con el objetivo de desarrollar nuevos fármacos antiparasitarios, investigadores de la Facultad de Química de la UNAM en conjunto con investigadores del Instituto Mexicano del Seguro Social, han diseñado, sintetizado y evaluado la actividad antiprotozoaria de derivados bencimidazólicos con diversos grupos funcionales en diferentes posiciones de la molécula (como trifluorometilos, propiltios, propilsulfonilos, benzoilos, aminos, metiltios y metilos, entre otros) (Navarrete-Vázquez y cols., 2001; Valdez y cols., 2002; Navarrete-Vázquez y cols., 2003). La actividad giardicida y amebicida *in vitro* de algunos de estos nuevos compuestos fue mejor que la del **MTZ** y **ABZ**.

En algunos de los derivados bencimidazólicos se ha sustituido el H en posición 1 de la molécula por un grupo  $-CH_3$ , observándose que su permeabilidad fue mayor que la del **ABZ** (Morales, 2000). Además, se demostró que el mecanismo por el cual estos compuestos ejercen su acción es diferente al del **ABZ**, ya que no inhibieron la polimerización de la  $\beta$ -tubulina (Navarrete-Vázquez y cols., 2001; Valdez y cols., 2002). Sin embargo, se desconoce la citotoxicidad de estos derivados bencimidazólicos con potencial giardicida y amebicida.

En la Tabla 4 se presenta la estructura química de los 10 derivados bencimidazólicos objeto de evaluación, divididos en 3 grupos, de acuerdo al sustituyente en la posición 2. La actividad giardicida y amebicida (concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ )) de los mismos se presenta en la Tabla 5. Todos los compuestos fueron mejores giardicidas que el **MTZ**, particularmente, **CMC20** y **RCB20**, fueron 245 veces más activos que este fármaco, además de ser 7 veces más activos que el **ABZ** y 2.6 veces más activos que la **NTZ**. Por otro lado, los compuestos **JVG9** y **GNV14** son los más potentes amebicidas siendo 70 y 39 veces más potentes que el **MTZ**, respectivamente; y 11 y 6 veces más activos que la **NTZ**, respectivamente.

Tabla 4. Estructura de los compuestos seleccionados para evaluar su citotoxicidad

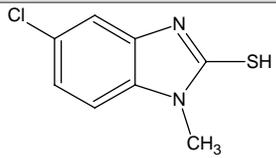
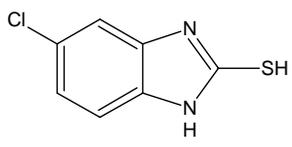
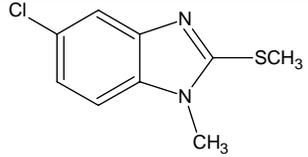
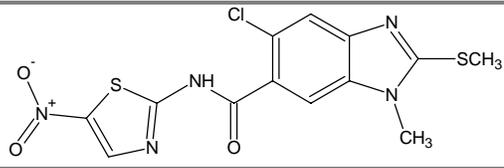
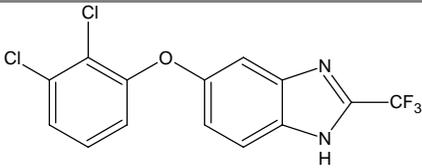
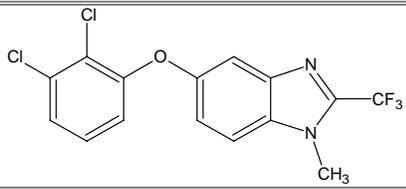
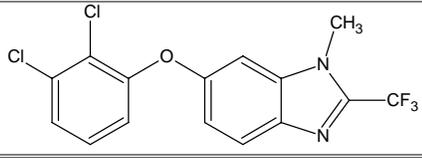
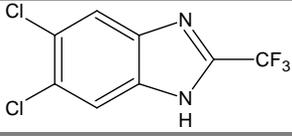
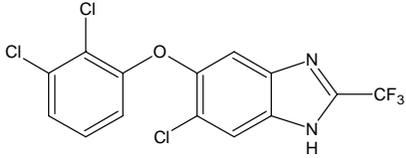
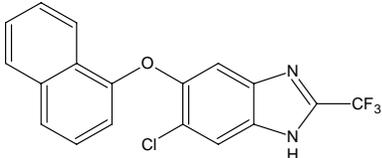
Grupo	Clave	Estructura
I	RSD7	
	JVG9	
II	RSD8	
	CMC20	
III	GNV7	
	GNV14	
	GNV21	
	G2	
	RCB15	
	RCB20	

Tabla 5. Actividad giardicida y amebicida de los 10 derivados bencimidazólicos y de los fármacos de elección en el tratamiento de la giardiasis y amibiasis.

Compuesto	CI <sub>50</sub> (µM) *	
	<i>G. intestinalis</i>	<i>E. histolytica</i>
<b>RSD7</b>	0.045	0.010
<b>JVG9</b>	0.081	0.005
<b>RSD8</b>	0.028	0.037
<b>CMC20</b>	0.005	0.022
<b>GNV7</b>	0.054	0.018
<b>GNV14</b>	0.030	0.009
<b>GNV21</b>	0.063	0.019
<b>G2</b>	0.078	0.011
<b>RCB15</b>	0.0314	0.020
<b>RCB20</b>	0.005	0.019
<b>ABZ</b>	0.037	56.53
<b>MTZ</b>	1.226	0.350
<b>NTZ</b>	0.013	0.055

\* Datos de CI<sub>50</sub> tomados de:

Sánchez, 1999; Navarrete-Vázquez, 2004; Méndez-Cuesta, 2005.

## **2. HIPÓTESIS**

Los derivados bencimidazólicos objeto de estudio, al ser activos selectivamente contra protozoarios, no presentarán citotoxicidad en la línea celular MDCK, demostrando así que pueden ser buenos candidatos en el desarrollo de fármacos antiparasitarios.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo General:**

- ☞ Evaluar la citotoxicidad de 10 derivados bencimidazólicos con actividad antiprotozoaria en la línea celular MDCK empleando el método colorimétrico del MTT.

### **3.2. Objetivos Particulares:**

- ☞ Estandarizar las condiciones de los ensayos de citotoxicidad: el número de células MDCK a sembrar por pozo, la concentración de MTT a emplear y el pH óptimo, así como el intervalo de concentraciones de los compuestos a evaluar.
- ☞ Determinar las concentraciones citotóxicas 50 (**CC<sub>50</sub>**) de los 10 derivados bencimidazólicos y del albendazol.
- ☞ Determinar el índice de selectividad (**IS**) de los compuestos que presenten citotoxicidad en las células MDCK.
- ☞ Analizar la relación estructura química-actividad citotóxica de los derivados bencimidazólicos.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Considerando que las enfermedades parasitarias representan un problema de salud pública en nuestro país, y con la finalidad de contar con nuevos compuestos antiparasitarios, nuestro grupo de investigación ha diseñado, sintetizado y evaluado una serie de derivados bencimidazólicos cuya actividad antiprotozoaria ha sido mejor que la mostrada por algunos fármacos de elección como el metronidazol y el albendazol, empleados en la quimioterapia de protozoosis del tipo de giardiasis, amibiasis y trichomoniasis. Sin embargo, se desconoce la citotoxicidad de dichos compuestos en células de mamíferos, lo cual es imprescindible, para dar continuidad a los estudios pre-clínicos como parte del proceso del desarrollo de medicamentos y considerarlos como nuevas y mejores alternativas en el tratamiento de enfermedades parasitarias.

## 5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 5.1. Material y Reactivos

El material necesario para llevar a cabo los ensayos se muestra a continuación:

- Cajas de cultivo de 25 y 75 cm<sup>2</sup> (Costar)
- Placas de 96 pozos (Costar)
- Pipetas serológicas de 5, 10 y 25 mL (Costar)
- Unidades de filtración (Millipore)
- Tubos Falcon de 15 y 50 mL (Corning)
- Eppendorfs de 0.6, 1.6 y 1.8 mL
- Puntas para micropipeta de 200 µL y 1 mL
- Viales
- Botellas de 100, 200 y 500 mL (Schott)
- Hematocitómetro
- Micropipetas de 10, 200 y 1000µL (Gilson)
- Espectrofotómetro (Labsystems Multiskan Ascent)

Los reactivos y compuestos utilizados fueron los siguientes:

- Medio de Cultivo DMEM (GIBCO) (Preparación en el apéndice I)
- Suero Fetal Bovino SFB (GIBCO)
- Tripsina/EDTA 0.05% (GIBCO)
- Solución amortiguadora de Fosfatos PBS (Preparación en el apéndice I)
- Azul Tripano
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (J.T. Baker)
- Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Aldrich)
- Albendazol (**ABZ**) (SIGMA)

Se eligió la siguiente serie de 10 derivados bencimidazólicos con actividad giardicida y amebicida para determinar su citotoxicidad en la línea celular MDCK:

- **RSD7, JVG9, RSD8, CMC20, GNV7, GNV14, GNV21, G2, RCB15 y RCB20** (Información en el apéndice II).

Es importante mencionar que todo se trabajó bajo condiciones de esterilidad.

## 5.2. Cultivo Celular

La línea celular MDCK empleada en el presente estudio fue obsequiada por la Dra. Guadalupe Ortega-Pierres, del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV. Las células se mantuvieron en botellas de 25 y 75 cm<sup>2</sup> en medio DMEM suplementado con SFB al 10% con una mezcla de penicilina/estreptomicina al 1% a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se hicieron inóculos de aproximadamente 0.8 y 2 millones de células MDCK en las botellas de 25 y 75 cm<sup>2</sup> respectivamente, para obtener monocapas celulares confluentes después de 3 días. Por cada botella a 100% de confluencia se subcultivaron 3 botellas más.

### 5.2.1. Disociación Celular

Una vez que las células alcanzaban la confluencia en las cajas de cultivo, se tripsinizaron con objeto de obtener su disociación y utilizarse en los ensayos de citotoxicidad. Para ello, los reactivos se calentaron en baño maría a 37°C y se procedió a retirar el medio de cultivo de la caja, lavándose las células con 1mL de una solución de Tripsina/EDTA al 0.05%. Posteriormente, se agregaron 2.5 mL por cada 75 cm<sup>2</sup> de la misma solución de Tripsina/EDTA al 0.05% y las células se incubaron durante 10 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido ese tiempo, se diluyó la tripsina con el mismo volumen de medio y se recuperaron las células, resuspendiéndolas con una pipeta para disociar posibles aglomerados celulares. Las células se pasaron a un tubo de 15 mL y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en un volumen de 1-2 mL de DMEM. Se procedió a contar las células en el hematocitómetro y a resembrar.

## 5.3. Estandarización

Para evaluar la citotoxicidad de los 10 derivados bencimidazólicos, se procedió inicialmente a estandarizar las condiciones de los ensayos: número de células a sembrar por pozo, concentración de MTT y efecto del pH, así como el intervalo de concentraciones.

### 5.3.1. Número de Células

Para determinar el número adecuado de células, se sembraron células MDCK a diferentes densidades/pozo (6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 x 10<sup>3</sup> células) por triplicado, en 100µL de medio DMEM suplementado con SFB al 10%, en una placa de 96 pozos y se incubaron por 24 h. a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Una vez que las células se adhirieron, éstas fueron cuantificadas mediante la técnica colorimétrica de MTT. Se añadió MTT a una concentración final de 0.5 mg/mL (disuelto en una solución amortiguadora de fosfatos estéril) y las células se incubaron durante 45 minutos a 37°C. Tras la incubación se retiró el sobrenadante de los pozos y se agregó un volumen de 100µL de DMSO para disolver los cristales de formazán, agitando la placa un par de minutos. El compuesto reducido por las células viables se cuantificó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540nm.

### 5.3.2. Concentración de MTT y efecto del pH

Una vez que se determinó el número de células a sembrar por pozo, se procedió a determinar la concentración de MTT y el efecto que tiene el pH sobre la absorción del formazán. Para ello, se sembraron 15x10<sup>3</sup> células por pozo y una vez adheridas, (tras 24 h. de incubación), se realizó una curva de MTT por triplicado, utilizando las concentraciones finales de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/mL y variando el pH (6, 7.4 y 9) en cada una de las concentraciones de MTT empleadas. Las células se incubaron con el MTT durante 45 minutos a 37°C, posteriormente se retiró el sobrenadante y se agregaron 100µL de DMSO. Para variar el pH, se agregaron 25µL de medio DMEM sin SFB ajustado a pH de 6 con HCl 0.1N o 25 µL de una solución amortiguadora de glicina (pH de 9) una vez disueltos los cristales de formazán en DMSO. Finalmente, se cuantificó el compuesto colorido en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540nm.

### 5.3.3. Intervalo de concentraciones

Para determinar el intervalo de concentraciones a utilizar de los compuestos bencimidazólicos, se trabajó inicialmente con el compuesto de referencia, **ABZ**. Se sembraron 15x10<sup>3</sup> células por pozo en placas de 96 pozos y se incubaron a

37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. para que se adhirieran. Se preparó una solución stock de **ABZ** a partir de 10 mg/mL de DMSO. A partir de ésta, se realizó la dilución correspondiente con medio DMEM sin SFB, para llevarlo a 100 µg/mL y a partir de ésta se hicieron diluciones seriadas con DMEM sin SFB para obtener concentraciones de 50, 25, 12.5, 6 y 3 µg/mL. Estas diluciones fueron las que se utilizaron para dar el tratamiento a las células, y se diluyeron 1:10 en las placas ya que se agregaron 10µL del compuesto en 90µL de medio por pozo para llegar a las concentraciones finales de 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 y 0.3 µg/mL. Como control negativo se utilizaron células con el disolvente a la máxima concentración utilizada (DMSO 0.1%) en medio sin SFB. Las células se incubaron con las diferentes concentraciones de **ABZ** por 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a cuantificar la viabilidad de las células por el método de MTT (ver inciso 5.3.1, página 31).

Es importante mencionar que para simplificar el sistema, evitar interferencias y obtener resultados que solo reflejaran el efecto de los compuestos a evaluar, una vez que las células se adherían tras las primeras 24h. de incubación en medio con SFB al 10%, éste se reemplazó por medio sin SFB para dar el tratamiento correspondiente. De esta misma manera, se decidió que el tiempo de exposición adecuado para los ensayos sería de 24 h., debido a que en este lapso de tiempo, las células MDCK no mostraron un daño considerable por la falta de SFB, presentando cada pozo una confluencia similar a las 24 h. anteriores, con SFB (alrededor del 90%).

Las condiciones seleccionadas para realizar los ensayos fueron las siguientes: Se sembraron  $15 \times 10^3$  células por pozo en placas de 96 pozos, utilizando MTT a una concentración final de 0.3 mg/mL a pH de 7.4 y se expusieron las células a un rango de concentraciones de 0.3 a 10 µg/mL de los compuestos durante 24 h.

#### 5.4. Preparación de Compuestos

Los compuestos a evaluar, **RSD7**, **RSD8**, **JVG9**, **CMC20**, **GNV7**, **GNV14**, **GNV21**, **RCB15**, **RCB20** y **G2**, fueron proporcionados por el grupo de investigación del Dr. Castillo del Departamento de Farmacia de la Facultad de

Química de la UNAM. Se prepararon las soluciones stock a partir de 10 mg/mL de DMSO. A partir de éstas, se realizaron las mismas diluciones especificadas para el **ABZ** con medio DMEM sin SFB, para llevarlos a las concentraciones finales de 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 y 0.3 µg/mL.

Es importante mencionar que en el caso del compuesto **RCB20**, éste presentó ciertos problemas de solubilidad en DMSO, por lo cual se procedió a trabajarlo en un complejo de inclusión con la Hidroxipropil β-ciclodextrina (HP-β-CD), que fue posible disolver en etanol. Por este motivo, se trabajó de la misma forma mencionada anteriormente, pero cambiando el disolvente por etanol.

#### 5.5. Ensayos de Citotoxicidad

Las células MDCK ( $15 \times 10^3$  células/pozo) se sembraron en placas de 96 pozos y se incubaron durante 24 h. a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> para permitir que se adhirieran. Posteriormente, se sometieron al tratamiento con los diferentes compuestos a concentraciones de 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, 5 y 10 µg/mL por cuadruplicado, durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, las células viables fueron cuantificadas mediante la técnica colorimétrica de MTT, añadiéndose éste a una concentración final de 0.3 mg/mL. Las células se incubaron durante 45 minutos a 37°C y posteriormente, se retiró el sobrenadante de los pozos y se agregó un volumen de 100 µL de DMSO para disolver los cristales de formazán. El compuesto reducido por las células viables se cuantificó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540nm.

En cada placa se incluyó al **ABZ** como compuesto de referencia y se utilizó como control negativo a las células con el disolvente a la máxima concentración utilizada (DMSO 0.1%). En el caso del compuesto **RCB20** en inclusión con la HP-β-CD, el control fue la ciclodextrina en etanol a la máxima concentración (Etanol 0.1%).

Posteriormente, los valores de absorbencia obtenidos se procesaron para realizar las curvas dosis-respuesta, convirtiendo las absorbencias en % de viabilidad, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{(\text{Abs}_{\text{Problema}} * 100)}{\text{Abs}_{\text{Control}}}$$

A partir de las gráficas se determinaron las concentraciones citotóxicas 50 (**CC<sub>50</sub>**) de los compuestos, utilizando el programa GraphPad Prism versión 4.0, con el cual se llevó a cabo una regresión no lineal de tipo sigmoideal para establecer el intervalo de confianza (Nivel de significancia del 95%) de los valores de **CC<sub>50</sub>**. Se realizaron los cálculos correspondientes para convertir la **CC<sub>50</sub>** de µg/mL a µM. Finalmente, se calculó el índice de selectividad (**IS**) para *G. intestinalis* y *E. histolytica*, en aquellos compuestos donde se obtuvo la **CC<sub>50</sub>**, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IS}_{G. \text{ intestinalis}} = \frac{\text{CC}_{50\_MDCK}}{\text{CI}_{50 \text{ } G. \text{ intestinalis}}}$$

$$\text{IS}_{E. \text{ histolytica}} = \frac{\text{CC}_{50\_MDCK}}{\text{CI}_{50 \text{ } E. \text{ histolytica}}}$$

### 5.6. Análisis estadístico

La significancia estadística entre los valores del control y las distintas concentraciones de cada compuesto se determinó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnet. (\*p < 0.05%, \*\*p < 0.01%) utilizando el software GraphPad Prism 4.0. Se graficó el promedio de 5 ensayos independientes, donde cada determinación se realizó por cuadruplicado.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Estandarización

Para establecer las condiciones adecuadas para realizar los ensayos de citotoxicidad, se estandarizaron parámetros como el número de células a sembrar por pozo, la concentración de MTT, el efecto del pH y el rango de concentraciones a utilizar de los compuestos. Este último parámetro se estandarizó con el compuesto de referencia **ABZ**, ya que éste es un compuesto bencimidazólico ampliamente conocido y es uno de los medicamentos de elección para el tratamiento de las enfermedades parasitarias.

#### 6.1.1. Número de Células

En la Figura 11 se muestra la absorbancia obtenida con respecto al número de células MDCK empleadas en el ensayo cuando éstas se incubaron con 0.5% de MTT. Como puede observarse, entre 6 y 18 x 10<sup>3</sup> células por pozo existe una relación directamente proporcional entre el número de células y la absorbancia, alcanzándose una meseta a partir de 21 x 10<sup>3</sup> células, donde la relación ya no es lineal. A partir de esta curva, se eligió sembrar 15x10<sup>3</sup> células por pozo en los ensayos posteriores.

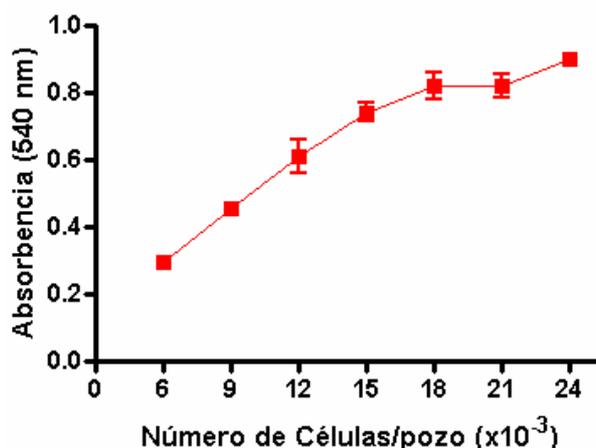


Figura 11. Valores de absorbancia con respecto al número de células MDCK empleadas en el ensayo e incubadas con MTT al 0.5%.

### 6.1.2. Concentración de MTT y efecto del pH

Para determinar la concentración óptima de MTT y el efecto del pH en la absorbencia del formazán, se incubaron  $15 \times 10^3$  células/pozo por 24 h y posteriormente se les añadió el MTT a concentraciones finales de 0.1 a 0.5 mg/mL, variando el pH (5, 7.4 y 9) con cada una de las concentraciones evaluadas. En la Figura 12, se aprecia que el comportamiento de las curvas a los 3 valores de pH es muy parecido, sin embargo, la pendiente varía, cubriéndose un rango de lecturas distinto en los 3 casos. A pH de 7.4 se obtuvieron valores de absorbencia más altos con las diferentes concentraciones de MTT, cubriéndose un rango de lecturas más amplio. Con estos resultados, se decidió trabajar con 0.3 mg/mL de MTT a pH 7.4.

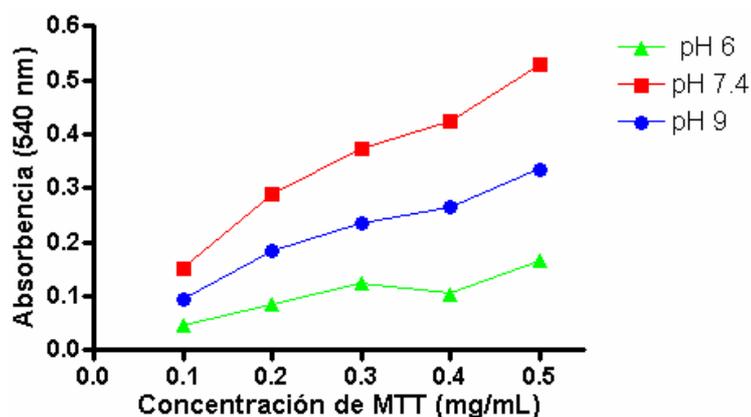


Figura 12. Efecto del pH sobre la absorbencia del MTT a diferentes concentraciones en la línea celular MDCK.

### 6.1.3. Intervalo de concentraciones del **ABZ** como compuesto referencia.

Las concentraciones empleadas del **ABZ** fueron: 0.3, 0.6, 1.2, 2.5 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$ , con las que se evaluó su citotoxicidad en la línea celular MDCK bajo las condiciones anteriormente mencionadas.

En la Figura 13, se observa que a partir de 0.6  $\mu\text{g/mL}$  hay una disminución en la viabilidad de las células, sin embargo, aún a la máxima concentración empleada (10  $\mu\text{g/mL}$ ) no se alcanza la concentración citotóxica 50 ( $\text{CC}_{50}$ ), es decir, no llega a presentarse una citotoxicidad que disminuya la viabilidad de las células MDCK a un 50%. La viabilidad de las células resultó ser significativamente diferente con respecto al control a partir de 1.2  $\mu\text{g/mL}$  de

**ABZ** ( $p < 0.01$ ). La citotoxicidad del **ABZ** no se pudo analizar a concentraciones mayores a 10  $\mu\text{g/mL}$  por razones de solubilidad, por lo que se eligieron las concentraciones evaluadas del **ABZ** para ser empleadas con los derivados bencimidazólicos de interés.

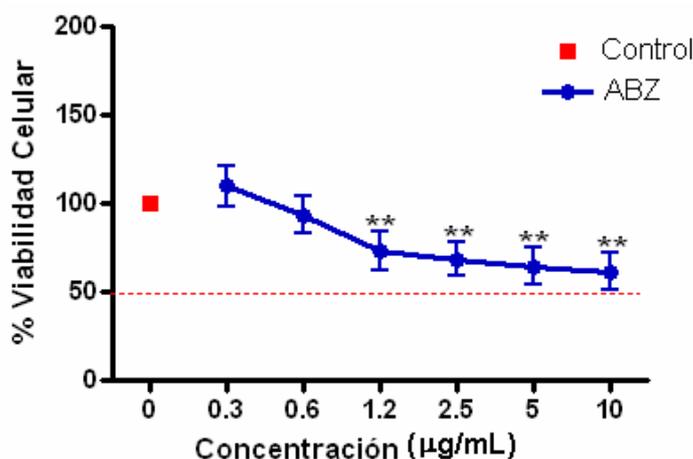


Figura 13. Citotoxicidad del **ABZ** en células MDCK.

Diferencia estadística (\*\*  $p < 0.01$ ) con respecto al control.

## 6.2. Evaluación de la citotoxicidad de los 10 derivados bencimidazólicos

Una vez que las condiciones del ensayo fueron estandarizadas, se procedió a evaluar la citotoxicidad de los 10 derivados bencimidazólicos con actividad giardicida y amebicida demostrada con anterioridad. Para fines prácticos de este trabajo, los compuestos se agruparon de acuerdo a la presencia de un mismo sustituyente en la posición 2 del anillo bencimidazólico (Ver Tabla 4, página 25).

En el primer grupo se incluyó a los compuestos **RSD7** y **JVG9**, ya que ambos tienen el sustituyente -SH en posición 2. Como se observa en la Figura 14, la viabilidad de las células MDCK no se vio afectada con **RSD7** y **JVG9**, lo que indica que estos dos compuestos no son citotóxicos a las concentraciones evaluadas. En el caso de **RSD7**, la viabilidad celular con las últimas dos concentraciones aumentó, presentando únicamente diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0.05$ ) a la última concentración (10  $\mu\text{g/mL}$ ).

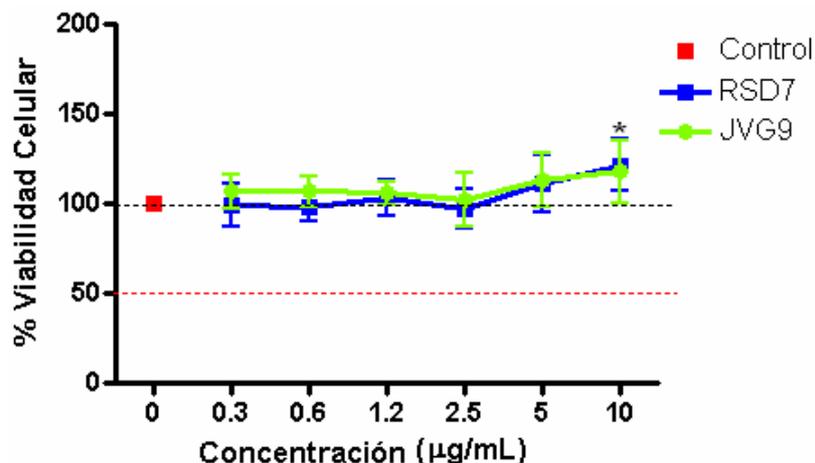


Figura 14. Citotoxicidad de los compuestos **RSD7** y **JVG9** en células MDCK.

\* Diferencia estadística (\* $p < 0.05\%$ ) con respecto al control.

Los resultados del segundo grupo de compuestos formado por **RSD8** y **CMC20**, ambos con sustituyente  $-SCH_3$ , se presentan en la Figura 15. Resulta evidente que **RSD8** y **CMC20**, no tuvieron efecto citotóxico sobre la línea celular MDCK. El comportamiento del compuesto **RSD8** es muy similar al **RSD7**, observándose un incremento en la viabilidad celular a la concentración de 10 µg/mL, el cual tuvo significancia estadística con respecto al control ( $p < 0.01$ ).

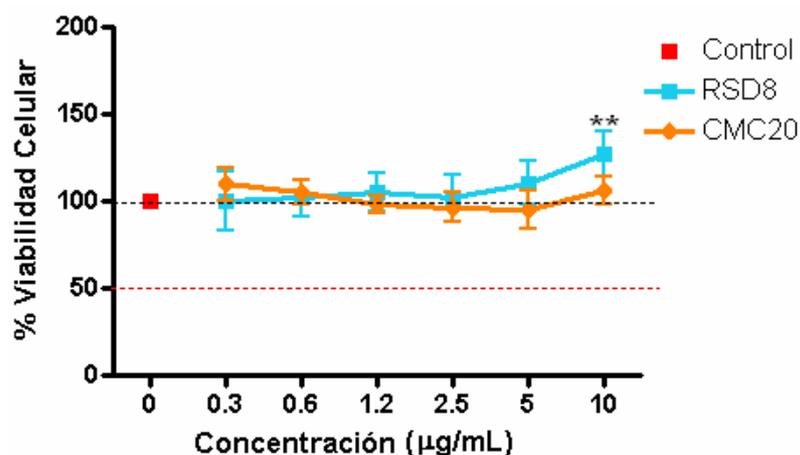


Figura 15. Citotoxicidad de los compuestos **RSD8** y **CMC20** en células MDCK.

Diferencia estadística (\*\* $p < 0.01$ ) con respecto al control.

Un tercer grupo de compuestos se formó con **GNV7**, **GNV14**, **GNV21**, **RCB15**, **RCB20** y **G2** con sustituyente  $-CF_3$  en posición 2. Como se observa en la Figura 16, **GNV7** disminuye aproximadamente un 20% la viabilidad celular

desde la concentración más baja usada (0.3  $\mu\text{g/mL}$ ) y se mantiene este efecto con las concentraciones más altas. En el caso de los compuestos **GNV14** y **GNV21**, se aprecia que ninguno de estos compuestos, a las diferentes concentraciones evaluadas, presenta citotoxicidad en la línea celular MDCK, siendo la viabilidad celular prácticamente igual que en el control (100%).

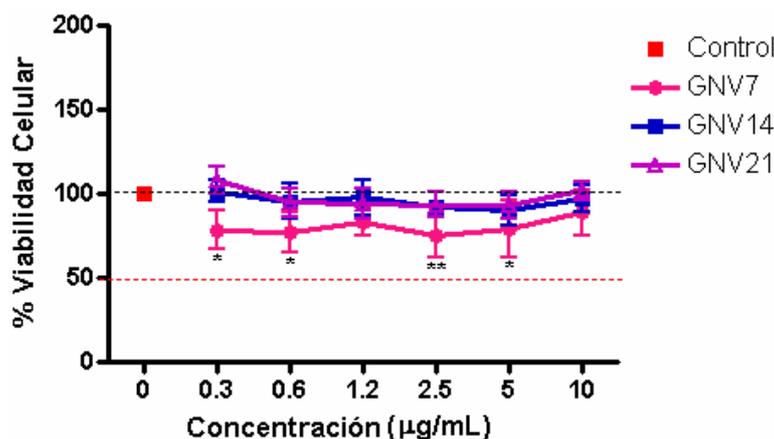


Figura 16. Citotoxicidad de los compuestos **GNV7**, **GNV14** y **GNV21** en células MDCK. Diferencia estadística (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) con respecto al control.

En la Figura 17 se observa que **RCB15** y **RCB20** fueron citotóxicos, siendo el último más citotóxico. Las  $\text{CC}_{50}$  de **RCB15** y **RCB20** fueron de 2.43 (2.077-2.851), y 2.28 (2.017-2.578)  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (equivalentes a 6.38 y 6.29  $\mu\text{M}$ , respectivamente) (Tabla 6). A partir de la concentración de 2.5  $\mu\text{g/mL}$ , se presenta en ambos casos una diferencia significativa con respecto al control ( $p < 0.01$ ). En el caso de **RCB20**, a la concentración más alta evaluada se obtuvo una reducción de la viabilidad del 95%.

En las Figuras 18 y 19 se presentan imágenes de las células MDCK tras el tratamiento con las últimas 3 concentraciones empleadas (2.5, 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$ ) de **RCB15** y **RCB20** y después de la incubación con MTT. En estas imágenes es evidente que el daño celular ocasionado es proporcional a la concentración de los compuestos y que la viabilidad celular va disminuyendo hasta provocar la muerte de casi todas las células con respecto al control.

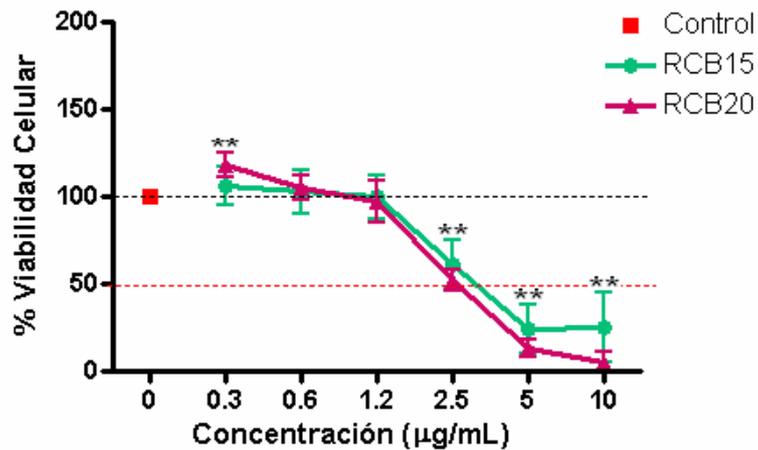


Figura 17. Citotoxicidad de los compuestos **RCB15** y **RCB20** en células MDCK. Diferencia estadística (\*\* $p < 0.01$ ) con respecto al control.

Tabla 6. Valores de  $CC_{50}$  de los compuestos **RCB15** y **RCB20** y conversión a  $\mu M$ .

Compuesto	$CC_{50}$ MDCK ( $\mu g/mL$ )*	Intervalo de confianza ( $\alpha = 95\%$ )*	$CC_{50}$ MDCK ( $\mu M$ )	Intervalo de confianza ( $\alpha = 95\%$ )
<b>RCB15</b>	2.43	2.077-2.851	6.38	5.443-7.472
<b>RCB20</b>	2.28	2.017-2.578	6.29	5.561-7.107

\*Valores calculados de GraphPad Prism v. 4.0 (Regresión no lineal sigmoideal)

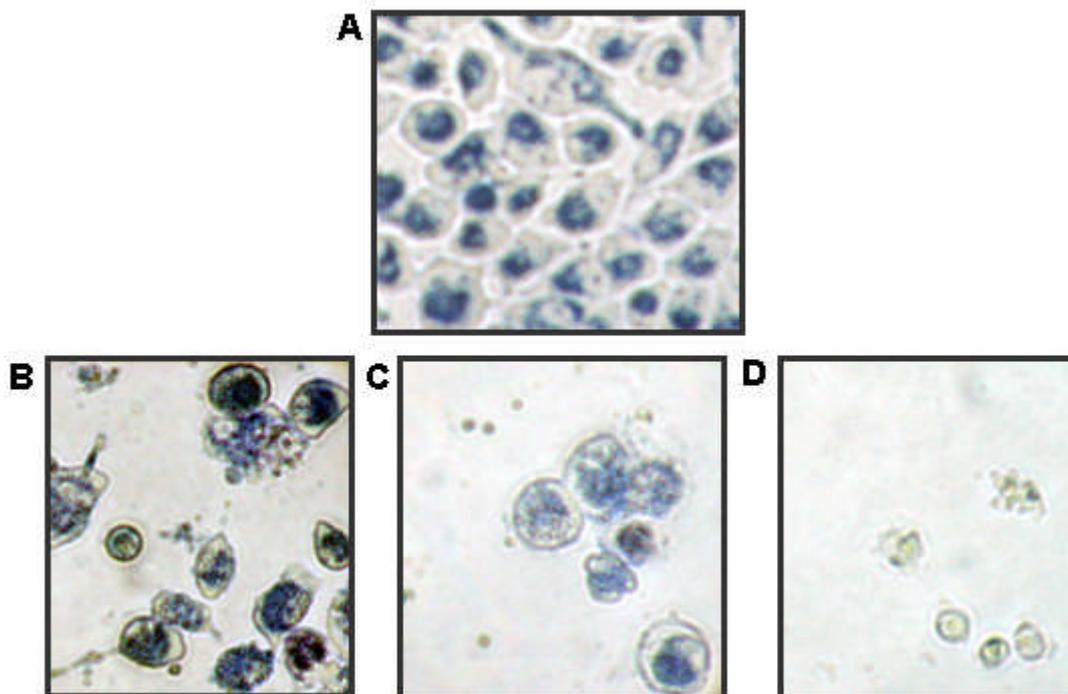


Figura 18. Imagen de microscopía óptica (100x). Efecto del compuesto **RCB15** sobre la viabilidad de las células MDCK. **A** corresponde al control; **B**, **C** y **D** corresponden al tratamiento con 2.5, 5 y 10  $\mu g/mL$ , respectivamente.

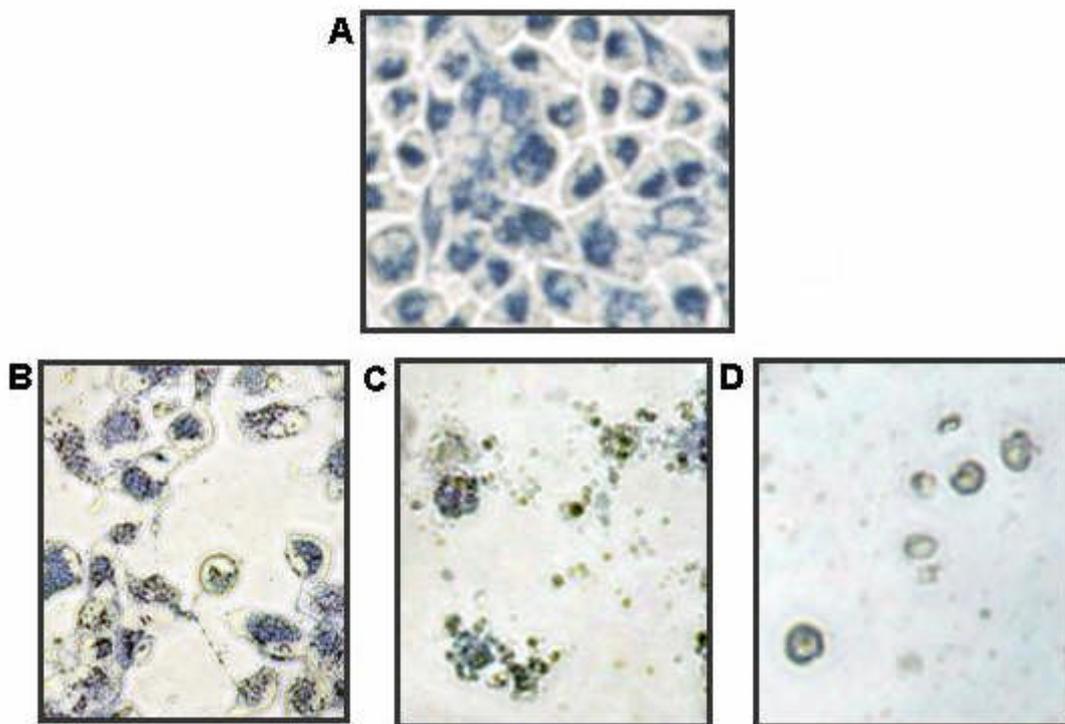


Figura 19. Imagen de microscopía óptica (100x). Efecto del compuesto **RCB20** sobre la viabilidad de las células MDCK. **A** corresponde al control; **B**, **C** y **D** corresponden al tratamiento con 2.5, 5 y 10 µg/mL, respectivamente.

Las células MDCK tratadas con **G2** mostraron un efecto diferente al mostrado con los demás compuestos (Figura 20), ya que se observó un aumento considerable en la viabilidad celular a partir de la concentración de 2.5 µg/mL y alcanzando hasta 150% de viabilidad a la concentración más alta del compuesto. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas con respecto al control ( $p < 0.01$ ).

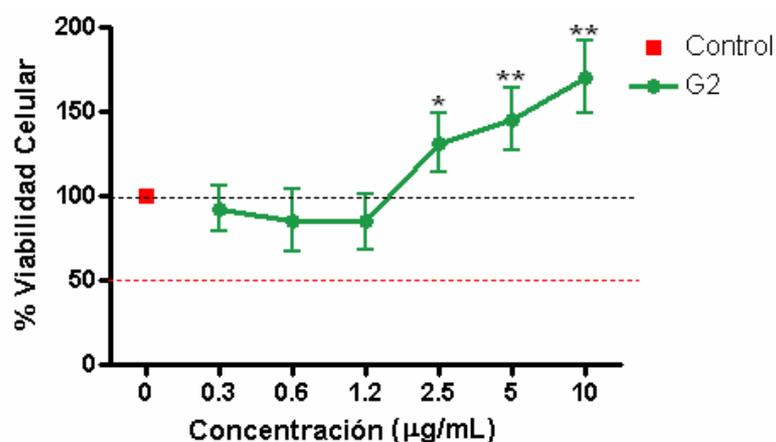
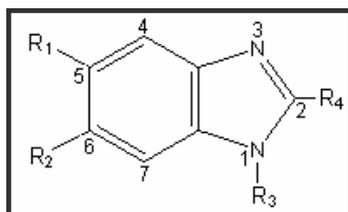


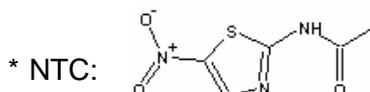
Figura 20. Citotoxicidad del compuesto **G2** en células MDCK. Diferencia estadística (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) con respecto al control.

Una vez obtenidas las curvas dosis-respuesta de los 10 derivados bencimidazólicos, se procedió a calcular las  $CC_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) para cada uno de los compuestos y se agruparon de acuerdo a su sustituyente en posición 2 de la molécula (Tabla 7). En la Tabla 8 se presentan las  $CI_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) de los compuestos contra *G. intestinalis* y *E. histolytica* y su correspondiente  $CC_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ), así como el coeficiente de partición calculado (ClogP) para su posterior análisis.

Tabla 7. Relación Estructura química-Actividad citotóxica de los 10 derivados bencimidazólicos



Grupo	Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	CC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
I	RSD7	Cl	H	CH <sub>3</sub>	SH	> 50.3
	JVG9	Cl	H	H	SH	> 54.2
II	RSD8	Cl	H	CH <sub>3</sub>	SCH <sub>3</sub>	> 47.0
	CMC20	Cl	NTC*	CH <sub>3</sub>	SCH <sub>3</sub>	> 26.1
III	GNV7	Diclorofenoxi	H	H	CF <sub>3</sub>	> 28.8
	GNV14	Diclorofenoxi	H	CH <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>	> 27.7
	GNV21	H	Diclorofenoxi	CH <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>	> 27.7
	G2	Cl	Cl	H	CF <sub>3</sub>	> 39.2
	RCB15	Diclorofenoxi	Cl	H	CF <sub>3</sub>	6.38 (5.443-7.472)**
	RCB20	Naftiloxi	Cl	H	CF <sub>3</sub>	6.29 (5.561-7.107)**



\*\* Intervalo de confianza ( $\alpha=95\%$ )

Debido a que los únicos compuestos que llegaron a la  $CC_{50}$  fueron los derivados bencimidazólicos **RCB15** y **RCB20**, se procedió a determinar su índice de selectividad (**IS**) contra los protozoarios *G. intestinalis* y *E. histolytica* (Tabla 9). Como punto de comparación se calculó el **IS** del compuesto de referencia, **ABZ**, utilizando la concentración más alta evaluada como si correspondiera a la  $CC_{50}$ . Así, se observa que los **IS** de los compuestos **RCB15** y **RCB20** contra los dos protozoarios, son mayores a 100, incluso, en el caso de *Giardia*, se calculó para **RCB20**, un **IS** mayor a 1000. El **ABZ** presenta un **IS**

mayor a 1000 contra el parásito causante de la giardiasis, mientras que su **IS** contra *Entamoeba* es menor a 1.

Tabla 8. Concentraciones citotóxicas 50 (**CC<sub>50</sub>**) de los derivados bencimidazólicos evaluados y concentraciones inhibitorias 50 (**CI<sub>50</sub>**) contra *G. intestinalis* y *E. histolytica*; Coeficientes de partición calculados (**ClogP**).

Compuesto	CC <sub>50</sub> MDCK (µM)(α=95%)	*CI <sub>50</sub> <i>G. intestinalis</i> (µM)	*CI <sub>50</sub> <i>E. histolytica</i> (µM)	**ClogP
RSD7	> 50.3	0.045	0.010	3.20 ± 0.62
JVG9	> 54.2	0.081	0.005	3.32 ± 0.59
RSD8	> 47.0	0.028	0.037	3.32 ± 1.02
CMC20	> 26.1	0.005	0.022	3.08 ± 0.62
GNV7	> 28.8	0.054	0.018	3.75 ± 0.23
GNV14	> 27.7	0.030	0.009	5.36 ± 0.78
GNV21	> 27.7	0.063	0.019	5.67 ± 1.22
G2	> 39.2	0.078	0.011	5.67 ± 1.22
RCB15	6.38 (5.443-7.472)	0.0314	0.020	5.88 ± 0.79
RCB20	6.29 (5.561-7.107)	0.005	0.019	6.14 ± 0.77
ABZ	> 37.7	0.037	56.60	3.20 ± 0.62
MTZ	ND	1.226	0.350	3.32 ± 0.59

ND = No determinado

\*Datos tomados de Sánchez, 1999; Navarrete-Vázquez, 2004; Méndez-Cuesta, 2005

\*\*Calculado de ACD/Labs software v.9.0 (Advanced Chemistry Development, Inc.)

Tabla 9. Concentraciones citotóxicas 50 (**CC<sub>50</sub>**) e índices de selectividad (**IS**) contra *G. intestinalis* y *E. histolytica* de los compuestos **RCB15**, **RCB20** y **ABZ**.

Compuesto	CC <sub>50</sub> MDCK (µM) (α=95%)	IS	
		<i>G. intestinalis</i>	<i>E. histolytica</i>
ABZ	37.7	1018.9	0.666
RCB15	6.38 (5.443-7.472)	203	319
RCB20	6.29 (5.561-7.107)	1258	331

## 7. DISCUSIÓN

Actualmente se cuenta con 10 derivados bencimidazólicos con actividad antiprotozoaria superior al **MTZ**, fármaco de elección en el tratamiento de la giardiasis y amibiasis, entre otras protozoosis. El paso siguiente es evaluar sus propiedades ADMET, dentro de las cuales está la toxicidad.

En este trabajo, se procedió a determinar la citotoxicidad de los derivados bencimidazólicos en la línea celular MDCK empleando el método colorimétrico del MTT, que brinda la ventaja de obtener lecturas directamente en un lector de ELISA, proporcionando un procedimiento automatizado y permitiendo el procesamiento de datos de manera rápida y eficiente ([www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis/docs/manual\\_apoptosis.pdf](http://www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis/docs/manual_apoptosis.pdf)).

En cuanto a la elección de la línea celular MDCK para realizar los ensayos de citotoxicidad, se consideraron sus características epiteliales distintivas, la formación de uniones estrechas y la presencia de microvellosidades (Rindler y cols., 1979; Saier, 1981), permitiendo que estas células fueran un modelo conveniente para este trabajo.

Las metodologías empleadas, así como las condiciones de los ensayos biológicos, constituyen un factor importante para validar los resultados que se obtuvieran en el desarrollo del trabajo experimental. En este trabajo, se decidió utilizar  $15 \times 10^3$  células MDCK por pozo, número celular que mantenía una relación lineal con los valores de absorbancia registrados (Figura 11, página 35), además de que se alcanzó una confluencia de alrededor del 90-95% a las 24 h. de incubación. El MTT se utilizó a 0.3mg/mL a un pH de 7.4, condiciones a las cuales se obtuvieron lecturas confiables, abarcando un rango más amplio de absorbancias en comparación con los pH de 6 y 9 (Figura 12, página 36).

Con respecto al intervalo de concentraciones que se emplearon, éstas se establecieron utilizando al **ABZ**, fármaco ampliamente usado de manera segura para el tratamiento de la giardiasis y de las helmintiasis en general, y cuyas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas han sido previamente

descritas (Venkatesen, 1998; Rawden y cols., 2000). Aunado a esto, el **ABZ** representó un buen fármaco de referencia para los ensayos de citotoxicidad, debido a la naturaleza bencimidazólica de éste y de los compuestos objeto de estudio. En el caso del **ABZ**, con las concentraciones usadas no se llegó a determinar su **CC<sub>50</sub>** (Figura 13, página 37), ya que se tuvo la limitante de su baja solubilidad acuosa que impidió evaluar concentraciones mayores, sin embargo, la concentración más alta (10 µg/mL) representa 1000 veces el valor de la **CI<sub>50</sub>** (0.010 µg/mL) obtenido para *G. intestinalis*; el intervalo de 0.3 a 10 µg/mL permitió determinar la **CC<sub>50</sub>** de dos compuestos (**RCB15** y **RCB20**).

Es importante resaltar que el intervalo de concentraciones elegido para evaluar la citotoxicidad de los 10 derivados bencimidazólicos (0.3-10 µg/mL que corresponde a un rango de 0.815-54 µM) (Apéndice III), representa entre 500 a 1000 veces la concentración que se requiere para matar al 50% (**CI<sub>50</sub>**) de la población de un cultivo *in vitro* de *G. intestinalis* y de *E. histolytica*, teniendo de esta forma un margen terapéutico<sup>10</sup> muy amplio (Ver Tabla 8, página 43).

Con el fin de analizar la relación estructura química-actividad citotóxica y la correlación entre la actividad antiprotozoaria y la citotóxica de los 10 derivados bencimidazólicos, éstos se agruparon de acuerdo al sustituyente que poseen en la posición 2, sitio que desempeña un papel muy importante en el perfil antiparasitario de las moléculas, por lo que se han realizado una gran variedad de modificaciones estructurales en esta posición (Sharma, 1994; Sharma, 1997; Navarrete-Vázquez, 2003, Navarrete-Vázquez, 2004; Rivera y cols., 2007). De esta manera, se formaron 3 grupos, como se muestra en la Tabla 7 (Ver página 42):

Grupo I: Compuestos con el sustituyente tiol (-SH) → **RSD7, JVG9**

Grupo II: Compuestos con el sustituyente metiltio (-SCH<sub>3</sub>) → **RSD8, CMC20**

Grupo III: Compuestos con el sustituyente trifluorometilo (CF<sub>3</sub>) → **GNV7, GNV14, GNV21, G2, RCB15 y RCB20**.

<sup>10</sup> El margen terapéutico es un parámetro que nos permite medir la seguridad de un fármaco, y se refiere a la relación que existe entre la dosis tóxica expresada como dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) y la dosis terapéutica expresada como dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>), rango dentro del cual existe una probabilidad elevada de conseguir eficacia con la mínima toxicidad.

En el primer grupo podemos observar que la única diferencia en la estructura de los dos compuestos es la introducción en posición 1 del anillo bencimidazólico de un grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) en **RSD7**, en lugar del H en **JVG9**. Cabe mencionar que cuando el anillo bencimidazólico tiene un H en la posición 1, la molécula sufre un efecto tautomérico, ya que existe un rápido intercambio protónico entre el  $\text{N}_1$  (N-H) y el  $\text{N}_3$  (-N=), dando lugar a 2 tautómeros; de esta manera, la introducción del grupo  $-\text{CH}_3$  evita dicho efecto, anclando las posiciones 5 y 6 del bencimidazol (Townsend, 1990). Los resultados obtenidos indican que esta sustitución no influye en el efecto citotóxico de la molécula, pues ninguno de los dos resultó ser citotóxico en la línea celular MDCK, manteniéndose la viabilidad celular igual que el control (100%) (Figura 14, página 38).

El grupo II incluye al compuesto **CMC20**, que presenta en posición 6 del anillo bencimidazólico un grupo voluminoso (NTC) (Ver Tabla 7, página 42), que sustituye al H, del compuesto **RSD8**. En ambos casos la molécula no presenta toxicidad en la línea celular, por lo que dicha sustitución no le confiere a la molécula ningún efecto citotóxico (Figura 15, página 38). Sin embargo, este reemplazo sí juega un papel importante en la actividad antiprotozoaria, aumentando la potencia giardicida y amebicida de la molécula (Méndez-Cuesta, 2005) (Tabla 8, página 43). Esto es un punto de gran importancia, puesto que en el caso del **CMC20**, se logró potenciar la actividad biológica de interés, sin conferirle propiedades citotóxicas ante una línea celular de mamífero.

Al comparar a los compuestos **RSD7** (grupo I) y **RSD8** (grupo II), cuya única diferencia es el sustituyente en posición 2 (grupo  $-\text{SH}$  por  $-\text{SCH}_3$ , respectivamente), se puede apreciar que éste no influye en la citotoxicidad de las moléculas. No obstante, la actividad biológica de **RSD7** y **RSD8** contra *G. intestinalis* y *E. histolytica*, es diferente, confirmando el grupo  $-\text{SCH}_3$  mayor actividad giardicida a la molécula (Sánchez, 1999) (Tabla 8, página 43).

El grupo III está conformado por la mayoría de los compuestos evaluados en este trabajo, cuyo sustituyente es el  $-\text{CF}_3$ . La introducción del grupo  $-\text{CF}_3$  en

moléculas orgánicas, induce cambios significativos en las propiedades físicas y químicas del compuesto, debido a su alta electronegatividad y estabilidad, produciendo un incremento en la lipofilia, un efecto electroattractor y bioestable ante la degradación metabólica. Estudios realizados por Navarrete-Vázquez (2004) demostraron que la sustitución de los derivados bencimidazólicos en la posición 2 con un grupo  $-CF_3$ , aumenta las características de solubilidad, permeabilidad, la actividad antiparasitaria y la estabilidad metabólica del compuesto, lo cual explica nuestro interés por evaluar la citotoxicidad de los 6 compuestos pertenecientes al grupo III.

Dentro del grupo III podemos distinguir cuatro subgrupos de compuestos de acuerdo a sus otros sustituyentes, y la posición de éstos en la molécula. En el primer subgrupo se encuentran **GNV7**, **GNV14** y **GNV21** con un sustituyente diclorofenoxi en posición 5/6. El compuesto **GNV7**, que tiene un H en posición 1, disminuye la viabilidad celular en aproximadamente un 20% con respecto al control a la concentración más baja (0.3  $\mu\text{g/mL}$ ); no obstante, esta citotoxicidad permanece constante a lo largo de la curva, sin tener un efecto dependiente de la dosis. La sustitución del H en posición 1 por un  $-CH_3$ , en el caso de los compuestos **GNV14** y **GNV21**, parece suprimir el efecto tóxico que tiene la molécula en las células MDCK, ya que con estos dos últimos compuestos, la viabilidad celular se mantiene alrededor del 100% (Figura 16, página 39). Quizá esto se podría deber a que la unión a una molécula blanco dependa del 1-H, sin embargo, con los ensayos realizados no es posible concluir acerca de ello.

Los compuestos **GNV14** y **GNV21** son isómeros estructurales o regioisómeros, ya que únicamente difieren en la sustitución 1,5 o 1,6 de los grupos metilo y 2,3-diclorofenoxi. En la Figura 16, podemos ver que la regioisomería no influye en el efecto tóxico de los compuestos en la línea celular MDCK, ya que ninguno de los 2 resultó ser tóxico en este sistema.

Respecto a los compuestos **GNV7** y **RCB15** (segundo subgrupo), se observa que la única diferencia estructural es la introducción del sustituyente  $-Cl$  en posición 5(6) (debido a la tautomería del anillo bencimidazólico en el último). Al observar las Figuras 16 y 17 (páginas 39 y 40) y la Tabla 7 (página 42), se

puede afirmar que la adición de este sustituyente (Cl) en **RCB15** sí juega un papel sumamente importante en la citotoxicidad del compuesto, puesto que **GNV7** disminuye la viabilidad celular aproximadamente un 20% sin embargo, con la introducción del -Cl, el comportamiento de **RCB15** es claramente tóxico, llegando a disminuir la viabilidad celular hasta un 75% en las últimas concentraciones. Esto se puede deber a que el cloro favorezca la penetración de la membrana celular. En efecto, el coeficiente de partición (ClogP), el cual nos habla de la lipofilia y por tanto de la permeabilidad que tienen los compuestos en las membranas biológicas, de **GNV7** y de **RCB15**, que es 5.36 y 5.88 respectivamente, indica que efectivamente si hay una pequeña diferencia en la lipofilia de las moléculas, aspecto que pudiera ser importante para el efecto citotóxico observado.

Por otro lado, en el tercer subgrupo se encuentra **RCB20**, bioisómero de **RCB15**, donde solamente se sustituyó el grupo diclorofenoxi por el grupo naftiloxi, siendo éste último un grupo más voluminoso. En este aspecto, podemos ver que el reemplazo bioisostérico no modificó el comportamiento citotóxico de las moléculas de manera significativa, pues ambas son tóxicas y las **CC<sub>50</sub>** son muy parecidas (6.38  $\mu$ M para **RCB15** y 6.29  $\mu$ M para **RCB20**), siendo el **RCB20** ligeramente más tóxico (Figura 17, página 40).

Por último, podemos realizar la comparación de los compuestos del tercer subgrupo con el compuesto **G2** (cuarto subgrupo), donde la diferencia es el sustituyente en posición 5/6, diclorofenoxi en **RCB15**, y naftiloxi en **RCB20**, a diferencia del cloro en **G2**. La actividad citotóxica de **RCB15** y **RCB20** por un lado y de **G2** por otro, parece ser totalmente opuesta (Figuras 17 y 20, páginas 40 y 41). Del análisis de la estructura de estos compuestos resulta evidente que la disustitución 5,6-dicloro en **G2**, no le confiere propiedades citotóxicas a la molécula, mientras el efecto de un solo cloro combinado con un grupo más voluminoso (diclorofenoxi o naftiloxi) favorece la citotoxicidad celular. Valdría la pena evaluar la citotoxicidad del compuesto 5(6)-cloro-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol para realizar un análisis de la relación estructura-actividad más completo y poder correlacionar el efecto de la sustitución única y la disustitución con cloros en las posiciones 5 y 6 del anillo bencimidazólico.

El ClogP del compuesto **G2** es de 3.75, mientras que en los compuestos **RCB15** y **RCB20** éste aumenta hasta 5.88 y 6.14, respectivamente (Apéndice II). La mayor permeabilidad de estos dos compuestos puede estar jugando un papel muy importante en la citotoxicidad observada, puesto que al aumentar la permeabilidad, las moléculas podrían estar atravesando con mayor facilidad la membrana celular para llevar a cabo su efecto. Sin embargo, ésta no es la única explicación ya que considerando el ClogP de **GNV14** y **GNV21** de 5.67, se esperaría que estos dos fueran más citotóxicos que **GNV7** cuyo ClogP es 5.36, pero con los resultados obtenidos no observamos un efecto del coeficiente de partición sobre la citotoxicidad. De esta misma manera, **GNV14** y **GNV21** deberían haber incrementado su toxicidad con respecto a **RSD7**, **RSD8**, **JVG9** y **CMC20** con ClogP en el orden de 3 (Ver Tabla 8, página 43).

Todas estas evidencias, indican que la citotoxicidad que puedan causar los derivados bencimidazólicos depende de la combinación de varios factores, entre ellos, el coeficiente de partición, que junto con los sustituyentes del anillo bencimidazólico, establecerá la actividad citotóxica que puedan tener las moléculas. En este aspecto, podemos afirmar que el patrón de sustitución en las posiciones 1, 5 y/o 6 del anillo bencimidazólico influirá de manera muy importante en la citotoxicidad.

El derivado bencimidazólico **G2** es una molécula cuyo comportamiento llama la atención, al ser distinto de todas los demás, y presentar un efecto que parece estimular la viabilidad celular. En la actualidad existen evidencias de que hay compuestos de diversa naturaleza (antibióticos, metales pesados, extractos de plantas) que presentan un fenómeno conocido como “Hórmesis”, el cual se caracteriza por la estimulación de la respuesta que se esté midiendo a bajas dosis e inhibición a altas dosis, dando lugar a curvas dosis-respuesta en forma de “U” o “J” (Calabrese y Baldwin, 2003). El intervalo de concentraciones de **G2** evaluado en las células MDCK podría inducir un efecto estimulador (Figura 20, página 41), sin embargo, con los resultados obtenidos no podemos afirmar que el compuesto **G2** presente hórmesis, ya que para poder corroborar este efecto sería necesario realizar ensayos de citotoxicidad con otras técnicas evaluando

rangos más amplios de concentraciones, por debajo y por arriba de las probadas en el presente trabajo.

En cuanto al índice de selectividad (**IS**), es importante mencionar que se calculó el del **ABZ**, estableciendo la concentración más alta probada (limitada por su solubilidad) como si fuera la **CC<sub>50</sub>** en la línea celular MDCK; ésto con el fin de tener un punto de comparación para discutir la selectividad de los derivados que presentaron citotoxicidad (Tabla 9, página 43). El **ABZ** es una alternativa en el tratamiento de la giardiasis, su alta eficacia contra esta enfermedad se confirma con su **IS** contra *G. intestinalis*, que es de 1018.9; por otro lado, el **ABZ** no se emplea en el tratamiento de la amibiasis, lo que está de acuerdo con el **IS** obtenido (<1) que tiene contra *E. histolytica*. La alta y baja especificidad del **ABZ** contra *Giardia* y *Entamoeba*, respectivamente, se fundamenta en su afinidad por la  $\beta$ -tubulina, componente principal del citoesqueleto de *Giardia*, a diferencia de *Entamoeba*, donde el principal componente es actina.

Si comparamos el **IS** contra *E. histolytica* de los compuestos **RCB15** y **RCB20** con el del **ABZ** (Tabla 9), podemos sugerir que los nuevos derivados bencimidazólicos serían muy buenos agentes amebicidas, aunque sería necesario compararlos con algún agente amebicida como el **MTZ**. El **RCB20** sería un excelente agente giardicida (**IS** de 1258) puesto que fue más selectivo incluso que el **ABZ**. El compuesto **RCB15** (**IS**>100) no sería tan selectivo como el **ABZ** y el **RCB20** contra *Giardia*, pero sería ligeramente más selectivo que el **RCB20** contra *Entamoeba*. A pesar de que estos 2 derivados bencimidazólicos fueron los únicos en presentar citotoxicidad en las células MDCK, siguen siendo muy selectivos contra los 2 protozoarios. No obstante, es importante evaluar su toxicidad en animales de experimentación, con la finalidad de establecer la dosis máxima que se puede administrar y determinar su margen terapéutico.

Con respecto al mecanismo de acción de los **BCM**, la presencia de un H en la posición 1 y de un grupo metoxycarbonilamino en la posición 2 del anillo bencimidazólico son requerimientos para que estos compuestos se unan a la  $\beta$ -

tubulina (Lacey, 1988; Valdez y cols., 2002). El mecanismo de acción de los compuestos trifluorometilados en posición 2, específicamente **JVG9**, **GNV7**, **GNV14** y **GNV21**, es distinto al de los **BCM** clásicos como el **ABZ**, ya que se demostró con anterioridad que no inhiben la polimerización de la  $\beta$ -tubulina (Valdez y cols., 2002; Navarrete-Vázquez, 2004).

Considerando por un lado que los derivados bencimidazólicos tienen una potente actividad giardicida y amebicida, y que actúan sobre un blanco distinto a la  $\beta$ -tubulina, lo que reduce la posibilidad de resistencia por parte de los parásitos por ese mecanismo; y por otro lado, que 8 de 10 no presentan citotoxicidad de acuerdo a los resultados obtenidos de este trabajo, queda de manifiesto la utilidad de estos derivados bencimidazólicos en la quimioterapéutica antiprotozoaria y apoya el interés en continuar con los estudios preclínicos como parte del desarrollo de medicamentos antiparasitarios.

## 8. CONCLUSIONES

- ✓ Se logró estandarizar la metodología para realizar los ensayos de citotoxicidad en la línea celular MDCK empleando la técnica colorimétrica del MTT.
- ✓ El **ABZ** disminuyó 40% la viabilidad celular de la línea celular MDCK a la máxima concentración evaluada. Su **IS** para *G. intestinalis* es >1018.9 y para *E. histolytica* < 1.
- ✓ Los derivados bencimidazólicos **RSD7**, **RSD8**, **JVG9**, **CMC20**, **G2**, **GNV14** y **GNV21** no mostraron citotoxicidad en la línea celular MDCK a las concentraciones evaluadas.
- ✓ El compuesto **GNV7** disminuyó 20% la viabilidad celular, a partir de la concentración de 0.3µg/mL.
- ✓ Los derivados bencimidazólicos **RCB15** y **RCB20** fueron citotóxicos en la línea celular MDCK, presentando **CC<sub>50</sub>** de 6.38 (5.443-7.472) y 6.29 (5.561-7.107) µM, respectivamente. No obstante, ambos compuestos presentan gran selectividad contra *G. intestinalis*/*E. histolytica*, con **IS** de 203 / 319 y 1258 / 331, respectivamente.
- ✓ El análisis cualitativo de la relación estructura química-actividad citotóxica de los 10 derivados bencimidazólicos, muestra que el patrón de sustitución en las posiciones 1, 5 y/o 6 del anillo bencimidazólico influye de manera importante en la citotoxicidad.
- ✓ Alta lipofilia, grupos voluminosos del tipo de diclorofenoxi y naftiloxi en posición 5/6, así como la combinación de éstos con grupos electroattractores como el -Cl y el sustituyente en posición 1 del anillo bencimidazólico influyen de manera importante en la citotoxicidad de los compuestos.

- ✓ 8 de los 10 compuestos evaluados no fueron citotóxicos en la línea celular MDCK, sin embargo, los 2 compuestos que resultaron citotóxicos son altamente selectivos contra los protozoarios *Giardia* y *Entamoeba*.
- ✓ Los resultados obtenidos apoyan la continuación de los estudios pre-clínicos para demostrar que los derivados bencimidazólicos son buenos candidatos para el desarrollo de fármacos antiparasitarios.

### Perspectivas:

- ✓ Continuar con los estudios para determinar la toxicidad *in vivo* de los 10 compuestos evaluados en el presente trabajo.
- ✓ Evaluar la citotoxicidad de los compuestos **RCB15** y **RCB20** en líneas tumorales para analizar su potencial citotóxico como posibles fármacos antitumorales.
- ✓ Llevar a cabo estudios para elucidar los posibles mecanismos de acción de los derivados bencimidazólicos a nivel molecular, especialmente de los compuestos **GNV14** y **CMC20**, cuyas actividades biológicas contra *G. intestinalis* y *E. histolytica* son muy prometedoras.
- ✓ De manera general, continuar con el estudio pre-clínico de los derivados bencimidazólicos evaluados en este trabajo, para optimizar sus propiedades biofarmacéuticas, aumentando la probabilidad de que lleguen a tener éxito al final de su desarrollo.

## APÉNDICE I

### Medio de Cultivo y Soluciones

#### 1.1 Medio de Cultivo

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (GIBCO)

Adicionado con:

- Aminoácidos no esenciales 1x (GIBCO)
- Antibióticos (In Vitro)
  - Penicilina G 100 U/mL
  - Estreptomina 100 µg/mL
- SFB 10% (GIBCO)
- L-glutamina 2mM (In Vitro)
- Piruvato de sodio 1mM (In Vitro)
- Regulador HEPES 10mM (In Vitro)

Modo de preparación:

- i. Disolver el contenido de un sobre en aproximadamente 800mL de agua bidestilada estéril en un contenedor de 2 L.
- ii. Agregar 3.7 g de  $\text{NaHCO}_3$  por litro de medio.
- iii. Agregar la cantidad equivalente de los demás componentes (Aminoácidos no esenciales, L-glutamina, Piruvato de sodio y regulador HEPES) para llegar a las concentraciones indicadas arriba.
- iv. Llevar a 1 L y disolver perfectamente todos los componentes.
- v. Ajustar el pH a 7.1-7.2 con NaOH o HCl.
- vi. Esterilizar por filtración en membrana de 0.22µm de diámetro.
- vii. Dejar el medio en prueba de esterilidad por lo menos 3 días a temperatura ambiente.
- viii. Una vez que el medio pasa la prueba de esterilidad se le adicionan los antibióticos y el SFB.

## 1.2. Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS 1X)

Para 1 L:

### Parte I

- i. Disolver 8.76 g de NaCl lentamente en aproximadamente 500 mL de agua bidestilada estéril.
- ii. Agregar 2.129 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  poco a poco, agitando.
- iii. Llevar a 800 mL.
- iv. Ajustar el pH a 7.4

### Parte II

- v. Disolver 0.87 g de NaCl en aproximadamente 80 mL de agua bidestilada estéril.
- vi. Agregar 0.21 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  poco a poco, agitando.
- vii. Llevar a 100 mL.
- viii. Mezlar parte I y II.
- ix. Aforar a 1 L.

## 1.3. Solución Amortiguadora de Glicina

Para 100 mL:

Se requiere Glicina 0.1M y NaCl 0.1 M, para lo cual:

- i. Pesar 750.7 mg de Glicina.
- ii. Pesar 584.5 mg de NaCl.
- iii. Disolver ambos reactivos en 100 mL de agua desionizada estéril.
- iv. Ajustar el pH con NaOH a 9.0

## APÉNDICE II

### Información de los Derivados Bencimidazólicos evaluados

Clave	Fórmula Molecular	Peso Molecular (g/mol)	Nombre Químico
RSD7	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> ClN <sub>2</sub> S	198.672	5-Cloro-1-metil-2-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-tiol
JVG9	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> ClN <sub>2</sub> S	184.646	5-Cloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-tiol
RSD8	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>2</sub> S	212.649	5-Cloro-1-metil-2-(metilito)-1 <i>H</i> -bencimidazol
CMC20	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	383.833	6-Cloro-1-metil-2-(metiltio)- <i>N</i> -(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxamida
GNV7	C <sub>14</sub> H <sub>7</sub> F <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	347.119	5(6)-(2,3-Diclorofenoxi)-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol
GNV14	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> F <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	361.145	5-(2,3-Diclorofenoxi)-1-metil-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol
GNV21	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> F <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	361.145	6-(2,3-Diclorofenoxi)-1-metil-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol
G2	C <sub>8</sub> H <sub>3</sub> F <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	255.024	5,6-Dicloro-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol
RCB15	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> F <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O	381.564	5(6)-Cloro-6(5)-(2,3-diclorofenoxi)-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol
RCB20	C <sub>18</sub> H <sub>10</sub> F <sub>3</sub> ClN <sub>2</sub> O	362.733	6(5)-Cloro-5(6)-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol

## APÉNDICE III

### Conversión de las concentraciones empleadas (0.3 – 10 µg/mL) a µM

Compuesto	ABZ	RSD7	JVG9	RSD8	CMC20	GNV7	GNV14	GNV21	G2	RCB15	RCB20
<b>PM</b> (µg/µmol)	265.3	198.672	184.646	212.649	383.833	347.119	361.145	361.145	255.024	381.564	362.733
<b>Cf</b> (µg/mL)											
<b>0.3125</b>	1.178	1.573	1.693	1.470	0.815	0.900	0.865	0.865	1.225	0.819	0.862
<b>0.625</b>	2.356	3.146	3.385	2.940	1.629	1.801	1.731	1.731	2.451	1.638	1.723
<b>1.25</b>	4.711	6.291	6.770	5.880	3.259	3.601	3.461	3.461	4.901	3.276	3.446
<b>2.5</b>	9.423	12.583	13.540	11.760	6.518	7.203	6.923	6.923	9.803	6.553	6.893
<b>5</b>	18.845	25.165	27.080	23.520	13.035	14.405	13.845	13.845	19.605	13.105	13.785
<b>10</b>	37.690	50.330	54.160	47.040	26.070	28.810	27.690	27.690	39.210	26.210	27.570
<b>Concentración (µM)</b>											

PM = Peso molecular ; Cf = Concentración final

## BIBLIOGRAFÍA

- Adagu IS, Nolder D, Warhurst DC, Rossignol JF. In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 49(1):103-111.
- Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(3):447-475.
- Ali V, Nozaki T. Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by "amitochondriate" protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20(1):164-187.
- Aparicio P, Rodríguez E, Gárate T, Molina R, Soto A, Alvar J. Terapéutica antiparasitaria *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003; 21: 579 – 594.
- Argüello-García R, Cruz-Soto M, Romero-Montoya L, Ortega-Pierres G. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in vitro. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54(4):711-721.
- Bansal D, Malla N, Mahajan RC. Drug resistance in amoebiasis. *Indian J Med Res.* 2006; 123(2):115-118.
- Bansal D, Sehgal R, Chawla Y, Mahajan RC, Malla N. In vitro activity of antiamebic drugs against clinical isolates of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2004; 21;3:27.

- Belkind-Valdovinos U, Belkind-Gerson J, Sánchez-Francia D, Espinoza-Ruiz MM, Lazcano-Ponce E. Nitazoxanide vs albendazole against intestinal parasites in a single dose and for three days *Salud Publica Mex.* 2004; 46(4):333-340.
- Bendesky A, Menéndez D, Ostrosky-Wegman P. Is metronidazole carcinogenic? *Mutat Res.* 2002; 511(2):133-144.
- Boletín de Vigilancia epidemiológica, Dirección General de Epidemiología, semana 49, 2007.
- Bouquet W, Boterberg T, Ceelen W, Pattyn P, Peeters M, Bracke M, Remon JP, Vervaet C. In vitro cytotoxicity of paclitaxel/beta-cyclodextrin complexes for HIPEC. *Int J Pharm.* 2009; 367(1-2):148-154.
- Brown HD, Matzuk AR, Ilves IR, Peterson LH, Harris SA, Sarret LH, Egerton JR, Campbell WC, Cuckler AC. Antiparasitic drugs: IV. 2-(4<sup>f</sup>-Thiazolyl)-Benzimidazole. A new anthelmintic. *J Am Chem Soc* 1961; 83:1764–1765.
- Calabrese E, Baldwin A. Hormesis: The dose-response revolution. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43:175-197.
- Cedillo-Rivera R, Chávez B, González-Robles A, Tapia A, Yépez-Mulia L. In vitro effect of nitazoxanide against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *J Eukaryot Microbiol.* 2002; 49(3):201-208.
- Cedillo-Rivera R, Muñoz O. In-vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J Med Microbiol.* 1992; 37(3):221-224.
- Chavez B, Cedillo-Rivera R, Martinez-Palomo A. *Giardia lamblia*: ultrastructural study of the in vitro effect of benzimidazoles. *J Protozool.* 1992; 39(4):510-515.

- Chen Q, Tang S, Jin X, Zou J, Chen K, Zhang T, Xiao X. Investigation of the genotoxicity of quinocetone, carbadox and olaquinox in vitro using Vero cells. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47(2):328-334.
- Cook GC. Use of benzimidazole chemotherapy in human helminthiases: indications and efficacy. *Parasitol Today.* 1990; 6(4):133-136.
- Cox FE. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(4):595-612.
- Cuadro Básico de Medicamentos, 2008, COFEPRIS
- Di L, Kerns E. Profiling drug-like properties in discovery research *Current Opinion in Chemical Biology* 2003, 7:402–408
- Elizondo G, Gonsebatt ME, Salazar AM, Lares I, Santiago P, Herrera J, Hong E, Ostrosky-Wegman P. Genotoxic effects of metronidazole. *Mutat Res.* 1996; 370(2):75-80.
- Escobedo AA, Cimerman S. Giardiasis: a pharmacotherapy review. *Expert Opin Pharmacother.* 2007; 8(12):1885-1902.
- Esposito M, Stettler R, Moores SL, Pidathala C, Müller N, Stachulski A, Berry NG, Rossignol JF, Hemphill A. In vitro efficacies of nitazoxanide and other thiazolides against *Neospora caninum* tachyzoites reveal antiparasitic activity independent of the nitro group. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(9):3715-3723.
- Farthing MJ. Treatment options for the eradication of intestinal protozoa. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2006; 3(8):436-445.

- Halliday DC, Venables D, Moore D, Shanmuganathan T, Pallister J, Robinson AJ, Hyatt A. Cane toad toxicity: An assessment of extracts from early developmental stages and adult tissues using MDCK cell culture. *Toxicol.* 2009; 53(4):385-391.
- Han B, Karim MN. Cytotoxicity of aggregated fullerene C60 particles on CHO and MDCK cells. *Scanning.* 2008; 30(2):213-220.
- Hernández-Martínez A. Síntesis y actividad antiparasitaria de [5-cloro-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-2-il] carbamato de metilo y de un derivado 1-metilado como profármaco potencial. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México, D.F., 2008.
- Hidalgo, I.J., Memorias del curso: Uso de cultivos celulares como sistema modelo para la predicción de absorción intestinal de fármacos. Fecha: 5-7 julio 1999.
- Hoffman PS, Sisson G, Croxen MA, Welch K, Harman WD, Cremades N, Morash MG. Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(3):868-876.
- Jiménez-Cardoso E, Eligio-García L, Cortés-Campos A, Flores-Luna A, Valencia-Mayoral P, Lozada-Chávez I. Changes in beta-giardin sequence of *Giardia intestinalis* sensitive and resistant to albendazole strains. *Parasitol Res.* 2009, DOI 10.1007/s00436-009-1363-7.
- Kim CF, Jiang JJ, Leung KN, Fung KP, Lau CB. Inhibitory effects of *Agaricus blazei* extracts on human myeloid leukemia cells. *J Ethnopharmacol.* 2009; 122(2):320-326.
- Korolkovas, A. Essentials of Medicinal Chemistry. John Wiley & Sons Inc, 2a edición, USA, 1976.

- Kucik CJ, Martin GL, Sortor BV. Common intestinal parasites. *Am Fam Physician*. 2004; 69(5):1161-1168.
- Lacey E., Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol Today*. 1990; 6(4):112-115.
- Lacey E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol*. 1988; 18(7):885-936.
- Li, AP. Preclinical in vitro screening assays for drug-like properties *Drug Discov Today* 2005; 2(2):179-185.
- Li, AP. Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2001; 6(7):357-366.
- Liu Q, Wang Q, Yang X, Shen X, Zhang B. Differential cytotoxic effects of denitroaristolochic acid II and aristolochic acids on renal epithelial cells. *Toxicol Lett*. 2009; 184(1):5-12.
- Luo L, Xu X, Shi B, Wu J, Hu Y. Polyoxyethylene 40 stearate modulates multidrug resistance and enhances antitumor activity of vinblastine sulfate. *AAPS J*. 2007; 9(3):E329-335.
- Marshall, M. M., D. Naumovitz, Y. Ortega, and C. R. Sterling. Waterborne protozoan pathogens. *Clin. Microbiol. Rev*. 1997; 10:67–85.
- Meloni BP, Thompson RC, Reynoldson JA, Seville P. Albendazole: a more effective anti-giardial agent in vitro than metronidazole or tinidazole. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1990; 84(3):375-379.
- Mena-Rejon G, Caamal-Fuentes E, Cantillo-Ciau Z, Cedillo-Rivera R, Flores-Guido J, Moo-Puc R. In vitro cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine. *J Ethnopharmacol*. 2009; 121(3):462-465.

- Méndez-Cuesta, C. Síntesis y actividad antiparasitaria del 6-cloro-2-(metiltio)-n-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-1H-bencimidazol-5-carboxamida y sus derivados 1-metilados. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, D.F., 2005.
- Morales-Hurtado, R. Determinación del coeficiente de permeabilidad aparente de derivados del 1-metilbencimidazol, utilizando a la línea celular Caco-2 como modelo "in vitro". Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México, D.F., 2000.
- Müller J, Ley S, Felger I, Hemphill A, Müller N. Identification of differentially expressed genes in a *Giardia lamblia* WB C6 clone resistant to nitazoxanide and metronidazole. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62(1):72-82.
- Müller J, Rühle G, Müller N, Rossignol JF, Hemphill A. In vitro effects of thiazolides on *Giardia lamblia* WB clone C6 cultured axenically and in coculture with Caco2 cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(1):162-170.
- Müller J, Sterk M, Hemphill A, Müller N. Characterization of *Giardia lamblia* WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole. *J Antimicrob Chemother.* 2007a; 60(2):280-287.
- Müller J, Wastling J, Sanderson S, Müller N, Hemphill A. A novel *Giardia lamblia* nitroreductase, GINR1, interacts with nitazoxanide and other thiazolides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007b; 51(6):1979-1986.
- Navarrete-Vázquez, G., Diseño, síntesis y actividad antiparasitaria de derivados del 2-(trifluorometil) bencimidazol, Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM, México, D.F., 2004.
- 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. *Bioorg Med Chem Lett.* 2001; 11(2):187-190.
- Navarrete-Vázquez G, Yépez L, Hernández-Campos A, Tapia A, Hernández-Luis F, Cedillo R, González J, Martínez-Fernández A, Martínez-Grueiro M, Castillo R. Synthesis and antiparasitic activity of albendazole and mebendazole analogues. *Bioorg Med Chem Lett.* 2003; 11:4615-4622.
  - Oliveira J, Ralton L, Tavares J, Codeiro-da-Silva A, Bestwick CS, McPherson A, Thoo Lin PK. The synthesis and the in vitro cytotoxicity studies of bisnaphthalimidopropyl polyamine derivatives against colon cancer cells and parasite *Leishmania infantum*. *Bioorg Med Chem.* 2007; 15(1):541-545.
  - Orozco E, López C, Gómez C, Pérez DG, Marchat L, Bañuelos C, Delgadillo DM. Multidrug resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Int.* 2002; 51(4):353-359.
  - Paniagua GL, Monroy E, García-González O, Alonso J, Negrete E, Vaca S. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2007; 6:17.
  - Parashar A, Arya R. Nitazoxanide. *Indian Pediatr.* 2005; 42(11):1161-1165.
  - Pauwels, R. Aspects of successful drug discovery and development, *Antiviral Research.* 2006; 71:77-89.
  - Pritt BS, Clark CG. Amebiasis. *Mayo Clin Proc.* 2008; 83(10):1154-1159.
  - Rawden, H.C., Kokwaro, G.O., Ward, S.A., Edwards, G. Relative contribution of cytochrome P-450 and flavine-containing monooxygenases to the metabolism of Albendazole in human liver microsomes. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2000, 49(4), 313-322.

- Reynoldson JA, Thompson RC, Horton RJ. Albendazole as a future anti-giardial agent. *Parasitol Today*. 1992; 8(12):412-414.
- Rindler M., Chuman L, Shaffer L, Saier M. Retention of differentiated properties in an established dog kidney epithelial cell line (MDCK). *J. Cell Biology*. 1979; 81: 635-648.
- Rivera JC, Yépez-Mulia L, Hernández-Campos A, Moreno-Esparza R, Castillo R, Navarrete-Vázquez G, Fuentes-Noriega I, Jung-Cook H. Biopharmaceutic evaluation of novel anthelmintic (1H-benzimidazol-5(6)-yl)carboxamide derivatives. *Int J Pharm*. 2007; 343(1-2):159-165.
- Roche Applied Science. Assay Procedures for Cell Proliferation and Viability Measurement Kits. *BIOCHEMICA* No. 3, 2003.
- Rodríguez García R, Aguilar Ye A, Puig Sosa P, Rodríguez Guzmán LM, Esteban Vaz JE. Nitazoxanide: adverse effects. *Salud Publica Mex*. 2004; 46(6):496-497.
- Romero, R. Sociedad Mexicana de Parasitología, A.C., Amibiasis en el Siglo XXI. Grupo Idisa. 1ª Edición. 2008.
- Saier, M. Growth and Differentiated properties of a kidney epithelial cell line (MDCK). *American Physiological Society*. 1981; 106-109.
- Sánchez, D.R. Síntesis de derivados del 1-metilbencimidazol con actividad antihelmíntica potencial. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México, D.F. 1999.
- Sharma, S. Approaches to design and synthesis of antiparasitic drugs. *Pharmacochemistry Library*, Vol. 25, Elsevier Science, Holanda, 1997.
- Sharma, S. Design of new drugs for helminth diseases: Lead optimization in benzimidazoles. *Adv Drug Res*, 1994, 25: 103-172.

- Shillingford CA, Vose CW. Effective decision-making: progressing compounds through clinical development. *Drug Discov Today*. 2001; 6(18):941-946.
- Software ACD/Labs, version 9.0, Advanced Chemistry Development, Inc.
- Software GraphPad Prism, versión 4.0, San Diego, California, USA.
- Stanley SL Jr. Amoebiasis. *Lancet*. 2003; 361:1025-34.
- Townsend LB, Wise DS. The synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles. *Parasitol Today*. 1990; 6(4):107-112.
- Upcroft JA, Upcroft P. Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001a; 45(6):1810-1814.
- Upcroft JA, Upcroft P. My favorite cell: *Giardia*. *Bioessays*. 1998; 20(3):256-263.
- Upcroft P, Upcroft JA. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin Microbiol Rev*. 2001b; 14(1):150-164.
- Upcroft JA, Upcroft P, Boreham PF. *Drug resistance in Giardia intestinalis*. *Int J Parasitol*. 1990; 20(4):489-496.
- VADEMECUM; <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/indicea.htm>
- 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. *Bioorg Med Chem Lett*. 2002; 12(16):2221-2224.

- Venkatesan, P. Albendazole, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998; 41, 145–147.
- Villa C, Trucchi B, Bertoli A, Pistelli L, Parodi A, Bassi AM, Ruffoni B. Salvia somalensis essential oil as a potential cosmetic ingredient: solvent-free microwave extraction, hydrodistillation, GC-MS analysis, odour evaluation and in vitro cytotoxicity assays. *Int J Cosmet Sci.* 2009; 31(1):55-61.
- Visanji JM, Duthie SJ, Pirie L, Thompson DG, Padfield PJ. Dietary isothiocyanates inhibit Caco-2 cell proliferation and induce G2/M phase cell cycle arrest, DNA damage, and G2/M checkpoint activation. *J Nutr.* 2004; 134(11):3121-3126.
- Walsh, J. A. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.* 1986; 8:228–238.
- Wang JS, Wang CL, Wen JF, Wang YJ, Hu YB, Ren HZ. Lithium inhibits proliferation of human esophageal cancer cell line Eca-109 by inducing a G2/M cell cycle arrest. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(25):3982-3989.
- World Health Organization. Intestinal parasites control: burden and trends. WHO, Geneva, Switzerland. 1998a.
- World Health Organization. Model Prescribing Information: Drugs used in Parasitic Diseases. WHO, Geneva, 1998b.
- World Health Organization. Weekly Epidemiological Record. WHO, Geneva, 1997.
- [www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis/docs/manual\\_apoptosis.pdf](http://www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis/docs/manual_apoptosis.pdf)  
Roche Applied Science. Apoptosis, Cell Death, and Cell Proliferation Manual: Methods for studying cell proliferation and viability in cell populations, 3ª edición.