

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación de la actividad de nuevos
derivados del bencimidazol contra cepas de
Giardia lamblia con diferente susceptibilidad al
Metronidazol**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:
JOSUE DANIEL BRAVO MARTINEZ

ASESOR
GUTIÉRREZ RAMOS CARLOS
BONILLA ESPINOSA EDUARDO



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.

**ASESOR DE TESIS:
DR. OVIEDO ORTEGA JOSÉ GERARDO
DR. SUCAR ROMERO CLAUDIA**

ÍNDICE

1.- Resumen.....	1
2.- Introducción.....	3
a) Generalidades de <i>Giardia lamblia</i>	6
b) Ciclo de Vida de <i>Giardia lamblia</i>	8
c) Síntomas.....	10
d) Diagnóstico.....	11
3.- Patogenia.....	12
4.- Quimioterapia.....	14
a) Derivados de nitroimidazoles.....	14
b) Resistencia al Metronidazol.....	16
c) Nitazoxanida.....	17
d) Bencimidazoles.....	22
e) Resistencia a los fármacos bencimidazoles.....	25
5.- Desarrollo de nuevos fármacos con actividad giardicida.....	26
6.- Planteamiento del Problema.....	31
7.- Hipótesis.....	33
8.- Objetivo General.....	33
9.- Objetivos Particulares.....	33
10.- Materiales.....	34
11.-Diagrama de flujo.....	35
12.- Metodología.....	37
13.- Resultados.....	41
14.- Discusión de Resultados.....	49
15.- Conclusiones.....	51
16.- Anexo A.....	52
17.- Anexo B.....	53
18.- Anexo C.....	55
19.- Anexo D.....	56
20.- Bibliografía.....	68

RESUMEN

Giardia lamblia es un parásito unicelular intestinal que causa la enfermedad conocida como giardiasis. La giardiasis puede cursar como asintomática o con una variedad de síntomas tales como: diarrea, pérdida de peso, calambres abdominales y en el caso de niños, retraso en el desarrollo. *G. lamblia* tiene una distribución cosmopolita con un número estimado de 2.8×10^8 casos de infecciones por año. En México es un problema de salud pública, ya que afecta aproximadamente a 9 millones de personas y se considera que la población infantil es la más vulnerable.

El parásito tiene dos etapas en su ciclo de vida, el quiste y el trofozoíto, que representan la fase infectiva y la vegetativa, respectivamente. El trofozoíto es el causante de toda la sintomatología de la giardiasis. El tratamiento de la giardiasis se realiza principalmente con nitro derivados, entre los que se encuentran el metronidazol y la nitazoxanida. El metronidazol, es el fármaco de elección en el tratamiento de la giardiasis, sin embargo, hay evidencias de falla terapéutica, lo que puede deberse al abandono del tratamiento por los efectos secundarios severos que ocasiona, además, de la presencia de parásitos que presentan resistencia al metronidazol. Para el tratamiento de la giardiasis, también se emplea el derivado bencimidazólico, albendazol. Sin embargo, se ha obtenido de manera experimental cepas de *Giardia lamblia* resistentes al albendazol, así como para la nitazoxanida.

Con el propósito de contar con alternativas farmacéuticas para el tratamiento de la giardiasis, se diseñaron y sintetizaron 5 nuevos compuestos derivados del bencimidazol denominados LGI-1 al LGI-5. Estos compuestos tienen como estructura base el anillo bencimidazólico y distintos grupos funcionales en diferentes posiciones del bencimidazol: metiltilio en posición 2, diclorofenil en posición 5/6 y cloro en posición 5/6.

En el presente trabajo de tesis se evaluó la actividad giardicida in vitro de los compuestos LGi-1 a LGi-5, mediante el método de subcultivo. En este análisis se incluyó la cepa WB de *G. lamblia* susceptible al metronidazol y un aislado del parásito

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

con menor susceptibilidad al fármaco. La concentración inhibitoria del 50% de la población de trofozoítos (CI_{50}), se calculó y se reportó como la actividad giardicida de estos nuevos derivados bencimidazólicos.

Los compuestos LGI-3, LGI-4 y LGI-5 resultaron ser más activos que el metronidazol contra la cepa WB de *G. lamblia* con valores de CI_{50} de 0.123, 0.175 y 0.110 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. El compuesto LGI-5 fue el más activo contra la cepa WB de *G. lamblia* resistente a metronidazol con una $CI_{50} = 0.211 \mu\text{g/mL}$.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas constituyen un importante problema de salud pública, particularmente en los países en desarrollo, donde la tasa de mortalidad y morbilidad es muy alta (Paniagua y cols., 2007). Aproximadamente, se producen dos millones de muertes anuales, además, los episodios de diarrea prolongados y recurrentes, están relacionados con retrasos en el crecimiento y deterioro cognitivo en los niños (Rossignol y cols., 2012).

Las infecciones diarreicas pueden ser causadas por enterobacterias tales como: *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Campylobacter jejuni* y *Vibrio cholerae*, también por parásitos zoonóticos que se transmiten con frecuencia por medio de sus quistes infecciosos como: *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* (Paniagua y cols., 2007).

Las Enfermedades Olvidadas se componen de un grupo heterogéneo de enfermedades parasitarias, bacterianas y virales con una distribución heterogénea y superposición. Cada día mueren en el mundo 8,000 personas a causa de alguna de las seis enfermedades llamadas "olvidadas": El VIH/SIDA, la malaria (paludismo), la tuberculosis, la enfermedad de tripanosomiasis americana, la leishmaniasis y la enfermedad del sueño. Se llaman "olvidadas" debido a la insignificante inversión global que se invierte en investigación y en instrumentos para su diagnóstico y tratamiento, predominantemente afectan a poblaciones del mundo tropical empobrecido y se transmiten por vectores: mosquitos, chinches o moscas, entre otros insectos. Estas enfermedades no son altamente mortíferas en las primeras etapas, pero sí causan una considerable morbilidad e incapacitación en adultos, lo que dificulta el desarrollo de estas sociedades. Se producen principalmente en los países en desarrollo donde influye el clima, la pobreza y la falta de acceso a servicios. Cuando se consideran en conjunto, estas enfermedades presentan una carga mundial considerable, creciente y ponen en peligro la capacidad de las personas infectadas, tanto en el desarrollo y socio económicamente (Savioli y cols., 2006). La giardiasis, ocasionada por *Giardia lamblia*

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

(sinónimo de *G. intestinalis*, *G. duodenalis*) ha sido incluida por la OMS en la Iniciativa de Enfermedades Olvidadas (Tejman y cols., 2011).

La OMS estima que alrededor de 280 millones de personas se infectan cada año con *G. lamblia*. La prevalencia es del 20-30% en los países en desarrollo y subdesarrollados, pero disminuye de un 2 al 7% en naciones desarrolladas (Solaymani y cols., 2010). El agua y los alimentos son la principal vía de transmisión de la giardiasis. La transmisión directa de persona a persona es otro mecanismo de infección, especialmente en instituciones colectivas, tales como guarderías y orfanatos, entre los miembros de una misma familia y entre hombres homosexuales (Busatti y cols., 2009).

La giardiasis es una enfermedad zoonótica, relacionada con la pobreza y mala higiene, causante de diarrea y trastornos nutricionales, principalmente en niños de edad pre-escolar y escolar. El impacto clínico parece ser más fuerte en los tres primeros años de vida y en individuos desnutridos o inmunodeprimidos, *G. lamblia* ha sido a menudo señalado como la causa de trastornos del crecimiento en niños. En México, se registraron 19,370 casos de giardiasis en el año 2010 (Boletín de Vigilancia Epidemiológica, 2010) y aunque los casos han disminuido, esta enfermedad continua siendo un problema de salud pública en nuestro país.

Un estudio realizado en una comunidad del norte de México, notificó que la infección con *Giardia* en niños, provocó mala absorción de hierro y vitamina A, contribuyendo a empeorar el estado de anemia. Por otro lado, el estado inmunológico del huésped puede influir tanto en la gravedad de las manifestaciones como en el tiempo de evolución, siendo más frecuente la infección en pacientes inmunosuprimidos. En este estudio se reveló que la carencia de proteína en la dieta de ratas, puede aumentar la susceptibilidad para la infección con dosis más pequeñas de quistes, que las reportadas en otros modelos animales. El grupo de animales alimentados con una dieta libre de nitrógeno necesitó únicamente de seis quistes para que se produjera la giardiasis. Esta situación pudo deberse, a que la ausencia de proteína provocó una baja en el estado nutricional de los animales, lo que llevó a su vez a un deterioro del sistema

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

inmunológico y los animales se volvieron más susceptibles a la infección. La mala nutrición proteico-energética está asociada con un daño significativo en la inmunidad mediada por las células, función fagocítica, sistema del complemento, concentración de anticuerpos secretores de inmunoglobulina A y producción de citocinas (Díaz y cols., 2002).

- GENERALIDADES DE *Giardia lamblia*.

Giardia fue inicialmente descrita por Van Leeuwenhoek en 1681, cuando estaba examinando sus propias heces diarreicas bajo el microscopio. El organismo fue descrito con mayor detalle por Lambl en 1859, que pensaba que el organismo pertenecía al género *Cercomonas* y la llamó *Cercomonas intestinal* (Rodney, 2001). En 1879, Grassi nombró a un microorganismo de los roedores *Muris dimorphus*, ahora se conoce que es una especie de *Giardia*, sin saber de la descripción anterior de Lambl. En 1882 y 1883, Kunstler describió un organismo en renacuajos (*G. agilis*) que llamó *Giardia*, fue la primera vez que se usa como un nombre de género. Blanchard sugirió en 1888 el nombre *Lambliia intestinalis*, luego en 1902 Stiles lo cambió a *G. duodenalis*. Posteriormente, Kofoid y Christiansen proponen los nombres de *G. lamblia* en 1915 y *G. entérica* en 1920 (Rodney, 2001).

* Clasificación taxonómica del parásito.

Reino:	Protista
Phylum:	Sarcomastigophora
Subphylum:	Mastigophora
Clase:	Zoomastigophorea
Orden:	Diplomonadina
Suborden:	Diplomonadina
Familia:	Hexamitidae
Género:	<i>Giardia</i>
Especie:	<i>lamblia (intestinalis o duodenalis)</i>

Giardia es un protista flagelado que pertenece al orden Diplomonadina (Dos cariomastigotes, cada uno con cuatro flagelos, dos núcleos, sin mitocondrias y sin complejo de Golgi, los quistes puede ser de vida libre o parasitaria) y familia Hexamitidae (seis u ocho flagelos, dos núcleos, simetría bilateral, y en ocasiones

axostilos y cuerpos medianos o parabasales). *Giardia* infecta una amplia gama de hospederos vertebrados. El género se compone actualmente de seis especies: *Giardia agilis* en anfibios, *Giardia ardeae* y *Giardia psittaci* en las aves, *Giardia muris* y *Giardia microti* en los roedores, y *Giardia lamblia*, la única especie encontrada en los seres humanos, aunque también se encuentra en otros mamíferos, incluyendo los animales domésticos y el ganado (Rodney, 2001).

Giardia lamblia es considerada como un complejo de especies, cuyos miembros muestran poca variación en su morfología, sin embargo, se pueden asignar por lo menos siete genotipos distintos (A-G) sobre la base de los análisis genéticos. El análisis de más de un millar de cepas humanas de diferentes lugares geográficos, examinados por PCR del ADN extraído directamente de las heces, demuestra que en casi todos los casos, sólo *G. lamblia*, genotipos A y B están asociadas con las infecciones humanas. Los genotipos C y D se han identificado en perros, gatos, coyotes y lobos, el E en el ganado vacuno, ovejas, cabras, cerdos, búfalos de agua y los genotipos F y G en los gatos y ratas (Simone y Una, 2008).

Debido a las limitaciones de los estudios de transmisión transversal, se confía en la identificación de los genotipos A y B en los animales, como una forma de entender la transmisión de enfermedades zoonóticas de *Giardia*. El genotipo A1 se encuentra generalmente en los animales, mientras que el genotipo A2 ha sido principalmente identificado en humanos. El genotipo B se pensaba que se limitaba en gran medida a los seres humanos, pero hace poco, el conjunto B se ha reportado en los castores, vacas, perros, caballos, monos, ratones, conejos y ovejas (Simone y Una, 2008).

El conjunto B se ha asociado con síntomas clínicos graves en los corderos (30-90 días de edad), incluyendo la mala absorción, disminución en el aumento de peso, deterioro en la eficiencia alimenticia y heces mal formadas y malolientes. El porcentaje de infecciones mixtas fue del 2 al 21% y fue mayor en los países económicamente menos desarrollados. Las infecciones mixtas son bastantes común en perros (hasta 25%), debido a la presencia del conjunto A y el conjunto específico C o D (Simone y Una,

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

2008).

- CICLO DE VIDA DE *G. lamblia*

El ciclo de vida de *G. lamblia* consta de dos etapas, una forma infecciosa representada por el quiste y la forma de proliferación representada por el trofozoíto. Los trofozoítos de *G. lamblia* tienen forma de pera (simetría bilateral), miden de 12 a 15 μm de largo y 5 a 9 μm de ancho. El citoesqueleto incluye un cuerpo parabasal del cual emergen los 4 pares de flagelos (anterior, posterior, caudal y ventral) para un movimiento lento, vibratorio y unidireccional y un disco ventral. Los trofozoítos su reproducción es por fisión binaria, tienen dos núcleos con cariosoma central, situados delante y son simétricos con respecto al eje largo, las vacuolas lisosomales y gránulos de glucógeno se encuentran en el citoplasma. El quiste tiene forma ovalada, cuerpos parabasales, una pared celular que está constituida por una capa fibrilar y dos tipos de carbohidratos la N-acetilgalactosamina (en mayor proporción) y la quitina rica en N-acetilglucosamina, mide de 8 a 12 μm de largo y 7 a 10 μm de ancho. Tiene un citoplasma granular fino separado de la delgada pared quística, en su forma inmadura poseen 2 núcleos y los quistes maduros 4 núcleos. El quiste es la forma infectiva del parásito y puede sobrevivir en el agua varios meses. Los quistes ingeridos en agua o alimentos contaminados se desenquistan por acción del medio ácido del estómago dando origen a dos trofozoítos móviles que se reproducen por fisión binaria y se adhieren al epitelio del intestino delgado del huésped. Los trofozoítos de *G. lamblia* colonizan el intestino delgado, adhiriéndose con el disco adhesivo ventral a la pared intestinal, donde obtienen los nutrientes necesarios. El disco ventral es rico en microtúbulos formados por alfa y beta tubulina, además de las proteínas llamadas giardinas. Los estímulos ambientales, incluyendo el colesterol a bajas concentraciones, inducen a los trofozoítos a enquistarse en el intestino grueso y los quistes se eliminan en las heces, lo que permite la infección de un nuevo huésped finalizando el ciclo (Rodney, 2001) (Figura 1). La bioquímica y la importancia fisiológica de la privación del colesterol, el papel de las sales biliares y ácidos grasos en el proceso de enquistamiento, siguen siendo controvertidas (Vahab y Tomoyoshi, 2007). La dosis infectiva es de 10-100 quistes (Busatti y cols., 2009).

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

Giardiasis

(*Giardia intestinalis*)

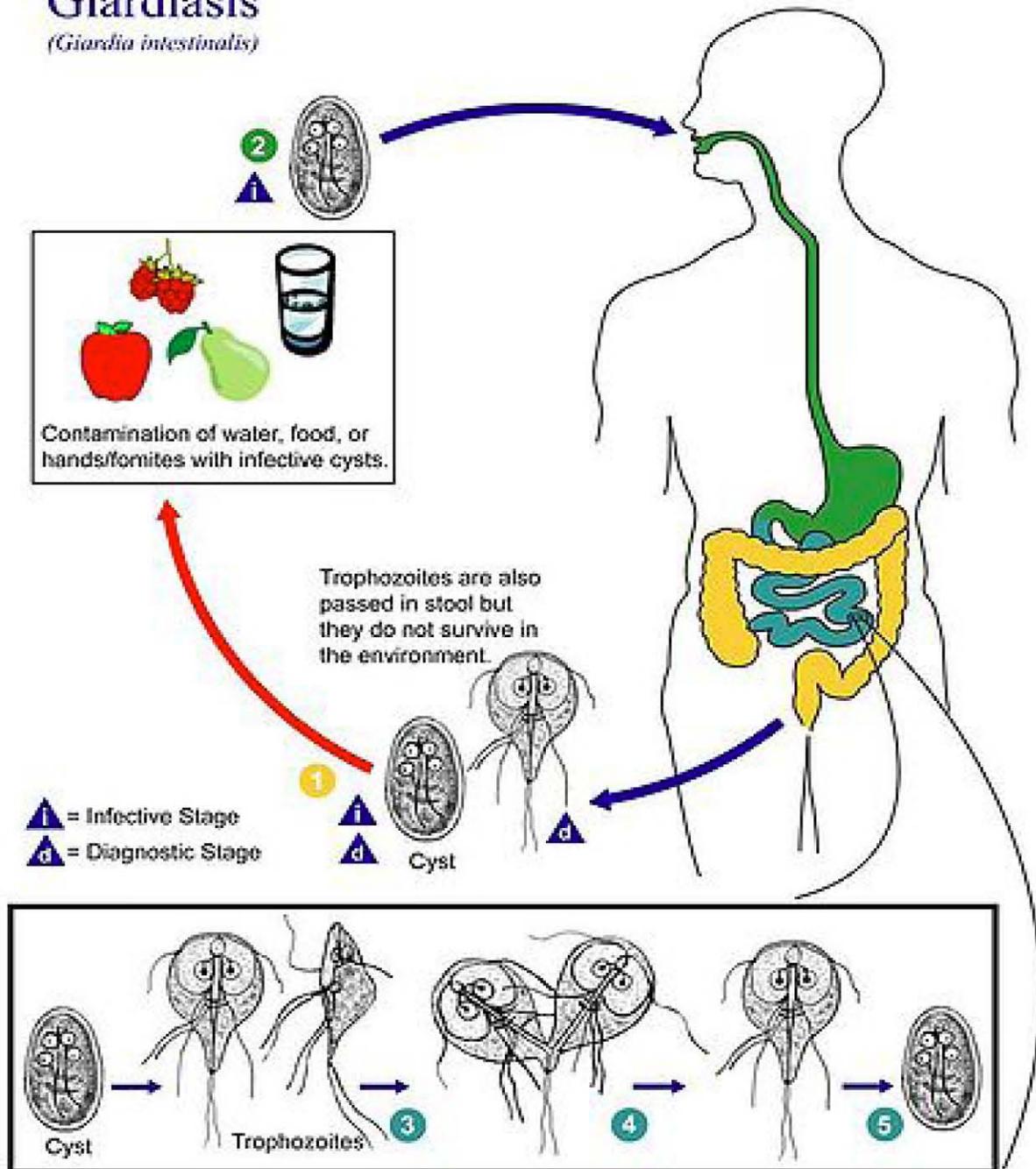


Figura 1. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*.

- SINTOMAS

Las manifestaciones clínicas de la giardiasis van desde una fase relativamente asintomática a una fase aguda persistente, o una fase subaguda crónica que puede simular a la vesícula biliar o la enfermedad de úlcera péptica (Solaymani y cols., 2010).

Una variedad de síntomas, como náuseas, vómito, malestar, calambres abdominales y diarrea, ocurren después de un período de incubación de 1 a 2 semanas. La fase aguda de la infección por lo general dura de 3 a 4 días, pero algunas veces los síntomas persisten durante un período más largo. En los niños, el síndrome de mala absorción es causado por la infección con altas cargas del parásito y la desnutrición, en ocasiones se traduce en una severa pérdida de peso corporal (hasta un 20%) y un retraso en el crecimiento. Así, en los países en desarrollo, la giardiasis se considera que es una causa importante de morbilidad. En el intestino delgado, la infestación del organismo reduce el número de microvellosidades y el área superficial del borde en cepillo, causando la atrofia de las vellosidades y la inmadurez del enterocito. También disminuyen las enzimas disacaridasas lumbales y entre otras, son la causa de la mala absorción (Vahab y Tomoyoshi, 2007).

Giardia lamblia se encuentra aproximadamente en un 20% de los pacientes con diarrea, su incidencia puede ser tan alta como en un billón de casos, contribuyendo a los 2.5 millones de muertes anuales en todo el mundo por enfermedades diarreicas. Se estima que un 30-50% de los pacientes desarrollan la enfermedad crónica, presentando esteatorrea, anemia por deficiencia de hierro, deficiencias de micronutrientes y desnutrición, son algunas de las secuelas a largo plazo y puede causar un retraso psicomotor en los niños (Duke y Kelly, 2006).

A diferencia de otras formas, en la diarrea del viajero, el tiempo desde la infección hasta la aparición de los síntomas es generalmente más largo, por ejemplo 7 ± 10 días, con síntomas que a menudo empiezan en los viajeros al regresar a sus casas. Por otra parte, los síntomas suelen persistir durante días o semanas. Los pacientes pueden

desarrollar una infección con diarrea crónica y mala absorción (Vesey y Peterson, 1999).

- DIAGNÓSTICO

Los exámenes coproparasitológicos mediante técnicas cualitativas y cuantitativas (de Ferreira, por dilución de Stoll, técnica de Beaver, método modificado de Kato-Miura, coproparasitológico directo, Faust o Ritchie), son el estándar de oro para la detección de los quistes de *G. lamblia* en la materia fecal. La recolección de muestras de heces por días separados puede aumentar el rendimiento del examen, debido a que la liberación de quistes es intermitente, por lo que se recomienda el análisis de tres muestras seriadas. Las heces pueden ser examinadas directamente como muestras frescas o ser conservadas en formol o alcohol de polivinilo y teñidas con yodo, tricromo o hematoxilina (Vesey y Peterson, 1999).

La presencia de trofozoítos del parásito también puede detectarse a través del análisis del contenido duodenal, obtenido directamente por aspiración con un tubo. Si los exámenes de heces son negativos, el aspirado duodenal sirve como un examen complementario (Vesey y Peterson, 1999).

La cápsula de Beal se usa para demostrar la presencia de parásitos que se alojan en el duodeno y que en un momento crean dificultades para el diagnóstico. Se basa en el uso de una cápsula de gelatina que tiene en su interior un hilo de algodón absorbente, para la obtención de parásitos que se encuentran en el duodeno. Es una técnica útil en la búsqueda de *Giardia lamblia*, *Isospora belli*, *Strongyloides stercoralis*, *Ancylostoma* o *Necator* y *Fasciola hepática*, cuyos adultos se localizan en las vías biliares (Vesey y Peterson, 1999).

PATOGENIA

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

La adhesión del trofozoíto de *G. lamblia* al epitelio intestinal es el principal mecanismo de patogenicidad del parásito. La interacción entre los productos del parásito como: proteinasas de serina y cisteína con la barrera epitelial resulta en la alteración de la permeabilidad epitelial y producción de una respuesta inflamatoria e inmunológica en el huésped (Savioli y cols., 2006). La interrupción celular de F-actina y ZO-1 en uniones estrechas y el aumento simultáneo de la permeabilidad del enterocito son modulados por la caspasa-3 y la miosina quinasa de cadena ligera (Vahab y Tomoyoshi, 2007).

Los trofozoítos de *G. lamblia* inducen la apoptosis de los enterocitos, lo cual es una contribución relevante para la patología epitelial, ya que parece desempeñar un papel importante en la disfunción de la barrera y la diarrea. Es de suponer que la apoptosis es desencadenada por el contacto directo de los parásitos o sus productos con el epitelio. Durante la inflamación local, la baja liberación de citoquinas proinflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral α o el interferón- γ , podrían dar lugar a un aumento de la apoptosis epitelial en respuesta a la colonización crónica (Troeger y cols., 2006). Los efectos de *G. lamblia* en células humanas Caco2 analizados mediante microarreglos, mostraron que las interacciones parásito-hospedador dan lugar a una pronunciada regulación de los genes implicados en la cascada de apoptosis y la formación de especies reactivas de oxígeno. Por otro lado, *Giardia* puede evitar la formación de óxido nítrico, un compuesto importante en la inhibición del crecimiento del parásito, al consumir la arginina local elimina así el sustrato necesario para que los enterocitos puedan producir el óxido nítrico. Este mecanismo puede contribuir a la apoptosis del enterocito inducida por *Giardia*, programando la muerte celular (Buret, 2006).

La necesidad de ácidos biliares en el crecimiento del parásito, ofrece una excelente explicación para la predilección de *Giardia* en residir en el duodeno y yeyuno proximal. Además, el uso de ácidos biliares por el parásito puede ofrecer una explicación parcial de la mala absorción de grasas en los pacientes con diarrea grave como resultado de la giardiasis. El sobre crecimiento bacteriano también ha sido implicado en la patogenia de

la diarrea, molestias abdominales y mala absorción asociada a la giardiasis (Vesey y Peterson, 1999).

La infección por *G. lamblia* en humanos puede dar lugar a muchos cambios microscópicos en el intestino delgado, que van desde leves alteraciones hasta una atrofia subtotal de las vellosidades en los casos graves. Incluso en ausencia de cambios en la estructura de las vellosidades y la cripta, el acortamiento y la disrupción de las microvellosidades se han asociado con deficiencias en las enzimas en el borde de cepillo, sobre todo la lactasa. Estudios más recientes mostraron una reducción del 50% en la resistencia transepitelial después de 24h de la infección por *G. lamblia*, que se asoció con un aumento en la permeabilidad de macromoléculas, una disfunción de la barrera epitelial, como otro mecanismo patógeno de la diarrea. La absorción de sodio acoplado a la D-glucosa en el duodeno en pacientes con infección crónica con *G. lamblia* es alterada, ya que la superficie de la mucosa se ve afectada considerablemente. Por lo tanto, el factor crucial para la malabsorción de glucosa parece ser la reducción del área de superficie en las vellosidades (Troeger y cols., 2006).

En estudios utilizando modelos in vivo e in vitro, se ha demostrado que *Giardia* causa mala absorción de glucosa, sodio, agua y se reduce la actividad de la enzima disacaridasa, debido a la pérdida del área de superficie de absorción epitelial. También este parásito puede alterar las respuestas secretorias de cloruro en células de colon humanas in vitro, así como en modelos murinos. Cuando la giardiasis es crónica, puede provocar una hipersecreción de iones cloruro en los seres humanos. Por lo tanto, una combinación de mala absorción y secreción de electrolitos parece ser responsable de la acumulación de líquido en el lumen intestinal durante esta infección (Buret, 2006).

QUIMIOTERAPIA

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

-DERIVADOS NITROIMIDAZOLES.

Muchos de los fármacos actualmente aprobados para el tratamiento de la giardiasis se descubrieron por primera vez a través de su actividad contra otros microorganismos. Así, el medicamento más utilizado contra la giardiasis es el 2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-etanol, mejor conocido como: metronidazol (MTZ) (Figura 2), que inicialmente se utilizó contra la infección por *Trichomonas vaginalis*. La quinacrina otro fármacogiardicida fue descrita originalmente como un fármaco antipalúdico. Los bencimidazoles carbamatos se identificaron por primera vez como antihelmínticos y posteriormente se demostró su eficacia contra *Giardia* (Tejman y Eckmann, 2011). Otros fármacos también utilizados contra la giardiasis, son el 5-nitrofurano, furazolidona y el tinidazol.

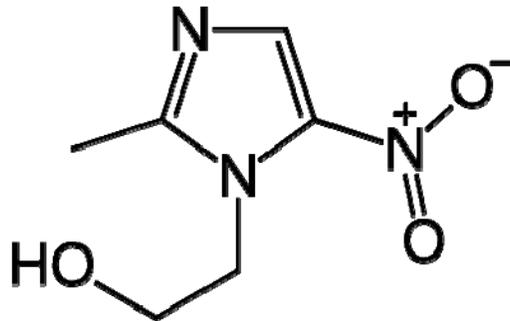


Figura 2. Estructura química del Metronidazol.

Desde finales de 1950, el MTZ se ha utilizado como terapia de elección contra la giardiasis. Se recomienda una dosis de 250 mg por vía oral, durante 5 días, pero en algunos casos la erradicación del parásito no es exitosa. Las dosis más altas y eficaces, son de 500 a 800 mg por 5 días (Vesy y Peterson, 1999). El MTZ entra de manera eficiente en los trofozoítos de *Giardia* y es "activado" por medio de mecanismos redox, que implican la reducción del grupo nitro por el metabolismo anaerobio de la enzima piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFOR), la cual reduce a la ferredoxina durante la descarboxilación del piruvato (Tejman y cols., 2011). La reducción del MTZ forma un radical nitro, que se une al ADN transitoriamente, que interrumpe o rompe las cadenas

de nucleótidos, lo que lleva a la muerte celular. El daño en el ADN puede ser la base de la carcinogenicidad del MTZ en animales, aunque la carcinogenicidad del fármaco en el ser humano no ha sido demostrada. Es importante destacar que la activación del MTZ se produce sólo en fuertes condiciones de reducción. Como el oxígeno es un eficiente aceptor de electrones, el aumento de los niveles de oxígeno da como resultado el deterioro de la activación del MTZ, que teóricamente podría resultar a la resistencia al fármaco (Vahab y Tomoyoshi, 2007).

Una complicación adicional cuando se utiliza la terapia con MTZ para el tratamiento de la giardiasis, es el consumo de alcohol que debe evitarse en los pacientes durante la terapia sistémica con MTZ y al menos 24h después de la finalización del tratamiento. Tomar alcohol puede en ocasiones provocar un tipo de reacción disulfiram (náuseas, vómitos, enrojecimiento, taquicardia) (Solaymani y cols., 2010).

Otros nitroderivados utilizados contra la giardiasis, son el tinidazol (100 mg tres veces al día durante 7 días), furazolidona (100 mg cuatro veces al día durante 7 a 10 días), la quinacrina (100 mg tres veces al día durante 5 a 7 días) y paromomicina (500 mg tres veces al día durante 5 a 10 días) (Vahab y Tomoyoshi, 2007).

- RESISTENCIA AL METRONIDAZOL.

La prevalencia de casos clínicos de giardiasis resistentes a MTZ, se ha reportado hasta en un 20%, con la recurrencia de hasta un 90%. La resistencia cruzada al tinidazol también se ha demostrado en cepas resistentes al MTZ (Vahab y Tomoyoshi, 2007). Diversas cepas genotípicamente distintas con reducida sensibilidad a los medicamentos, también se han encontrado en pacientes. La formación de la resistencia al MTZ por *Giardia*, parece estar asociada con la baja actividad de PFOR y de la ferredoxina (Muller y cols., 2007). A pesar de la resistencia al MTZ y los tratamientos fallidos, los aislamientos clínicos de *G. lamblia* resistentes a MTZ son poco frecuentes. Lo anterior puede deberse a que la baja expresión de la PFOR, probablemente afecta el metabolismo glicolítico de *Giardia* resistente al MTZ y estudios recientes demostraron una disminución de la capacidad de adhesión de los trofozoítos, siendo ésta probablemente la razón por la cual los aislados de los parásitos con resistencia al MTZ no sean tan frecuentes (Tejman y cols., 2011).

La tioredoxin reductasa (TrxR) es una enzima con actividad de nitroreductasa eficiente en la reducción de metronidazol y tinidazol. Las flavinas libres son necesarias para la actividad reductora de la TrxR, estudios recientes sugieren que la disminución de la actividad de NADPH oxidasa en *Giardia* conduce a una alteración en la actividad de la TrxR in vivo, por lo que es probable que sea un factor que contribuye a la resistencia al MTZ (Leitsch y cols., 2011).

Tres pacientes infectados con cepas de *Giardia* resistentes al MTZ tuvieron una terapia con ABZ, dos de estas cepas fueron menos sensibles al ABZ en modelos de ratón neonatal, por lo tanto son clínicamente resistentes al ABZ. Este resultado se confirmó, con estudios clínicos previos que indican fallas en el tratamiento con MTZ y ABZ. La falla terapéutica ocurre en 3 de 11 pacientes, aunque existe un alto número de cepas de *Giardia* resistentes a MTZ encontradas en este estudio. La resistencia clínica a ambos fármacos no parece ser poco común (Lemée y cols., 2000).

- NITAZOXANIDA.

Otro nitroderivado desarrollado como antihelmíntico veterinario es el [2-[(5-nitro-1,3-tiazol-2-il) carbamoil] fenil] etanoato conocido como Nitazoxanida (NTZ) (Figura 3), la cual presenta un amplio espectro de actividad contra parásitos intestinales, tales como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, el apicomplejo *Cryptosporidium parvum* y las bacterias entéricas que afectan animales y humanos (Muller y cols., 2006).

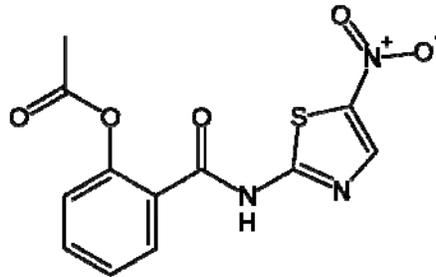


Figura 3. Estructura química de la Nitazoxanida.

La NTZ fue descubierta originalmente en la década de 1980 por Jean François Rossignol en el Instituto Pasteur. En 1990, la NTZ recibe la autorización por la FDA para el tratamiento de la giardiasis y se introduce en el mercado (White, 2003). La dosis recomendada de nitazoxanida es de 100mg cada 12h con las comidas para los niños y 500mg cada 12h para los niños mayores de 12 años y adultos (Vahab y Tomoyoshi, 2007). Tiene una excelente disponibilidad oral y la mayoría de los metabolitos en el suero (tizoxanida y tizoxanida glucurónido) exceden la concentración inhibitoria del 90% (CI₉₀) (Muller y cols., 2006).

A diferencia del MTZ, la NTZ no es mutagénica. In vivo, la NTZ es rápidamente desacetilada a tizoxanida (TIZ), un metabolito de igual eficacia. En el hígado, la TIZ se transforma entonces a tizoxanida glucurónido, una forma inactiva y se excreta por vía biliar u orina (Muller y cols., 2006). En comparación con el MTZ, la NTZ es bien tolerada, aunque provoca leves trastornos gastrointestinales como náuseas y diarrea, se han asociado ocasionalmente con dosis más altas, que se utilizan sobre todo en

personas inmunocomprometidas. Sin embargo, estos efectos secundarios rara vez son graves y no requieren la interrupción del tratamiento (Muller y cols., 2007).

Un estudio llevado a cabo en México en pacientes mostró que la actividad de la NTZ fue superior al placebo y comparable al MTZ. Además, la NTZ es eficiente en el tratamiento de giardiasis contra cepas resistentes al MTZ (White, 2003).

La mejor actividad de las tiazolidas en cultivos axénicos de *G. lamblia* se observó con compuestos que contienen un grupo nitro en la posición 5 del anillo tiazol, tales como NTZ, TIZ, MTZ, con una CI_{50} que va desde 2.4 hasta 14.7 μ M. Aunque, el grupo nitro no es el único factor determinante de la actividad antiparasitaria, se ha encontrado que la modificación del anillo de benceno en la posición 3 por una metilación o metoxilación, significativamente reduce la eficacia de los fármacos, alrededor de cinco a seis veces y la metilación de la tizoxanida en la posición 5, completamente anuló la actividad anti-giardicida (CI_{50} mayor a 50 μ M) (Muller y cols., 2006).

Con el fin de visualizar las alteraciones morfológicas de *G. lamblia* inducida por la NTZ y compararlos con los inducidos por MTZ, los cultivos axénicos confluentes de trofozoítos fueron tratados con 50 μ M de NTZ o MTZ o con DMSO como control. Las observaciones por microscopía electrónica de barrido (Figura 4) mostraron que después de 3 h del tratamiento con NTZ, aproximadamente el 50% de los trofozoítos estaban inmóviles, a las 5h de tratamiento, más del 95% de los trofozoítos fueron inmóviles y formaron grandes agregados multicelulares, y a las 24h con NTZ no se encontraron trofozoítos móviles. Todos ellos exhibieron aberrantes estructuras citoplasmáticas vacuolares, demostrando que en 1h de tratamiento con NTZ, un número considerable de trofozoítos ya se exhibieron pequeñas inclusiones citoplasmáticas aberrantes dentro su citoplasma. A las 3h del tratamiento, hay mayores vacuolas que contienen inclusiones membranosas o pilas de membrana, a las 24h de tratamiento, estos parásitos fueron seriamente dañados, mostrando una disociación de su organización en su citoplasma o en muchos casos, por grande vacuolas que contienen residuos de membrana. Sin embargo, los elementos del citoesqueleto de los trofozoítos, tales como

los filamentos asociados con el disco ventral o flagelos y los cuerpos basales, no se alteraron notablemente (Muller y cols., 2006).

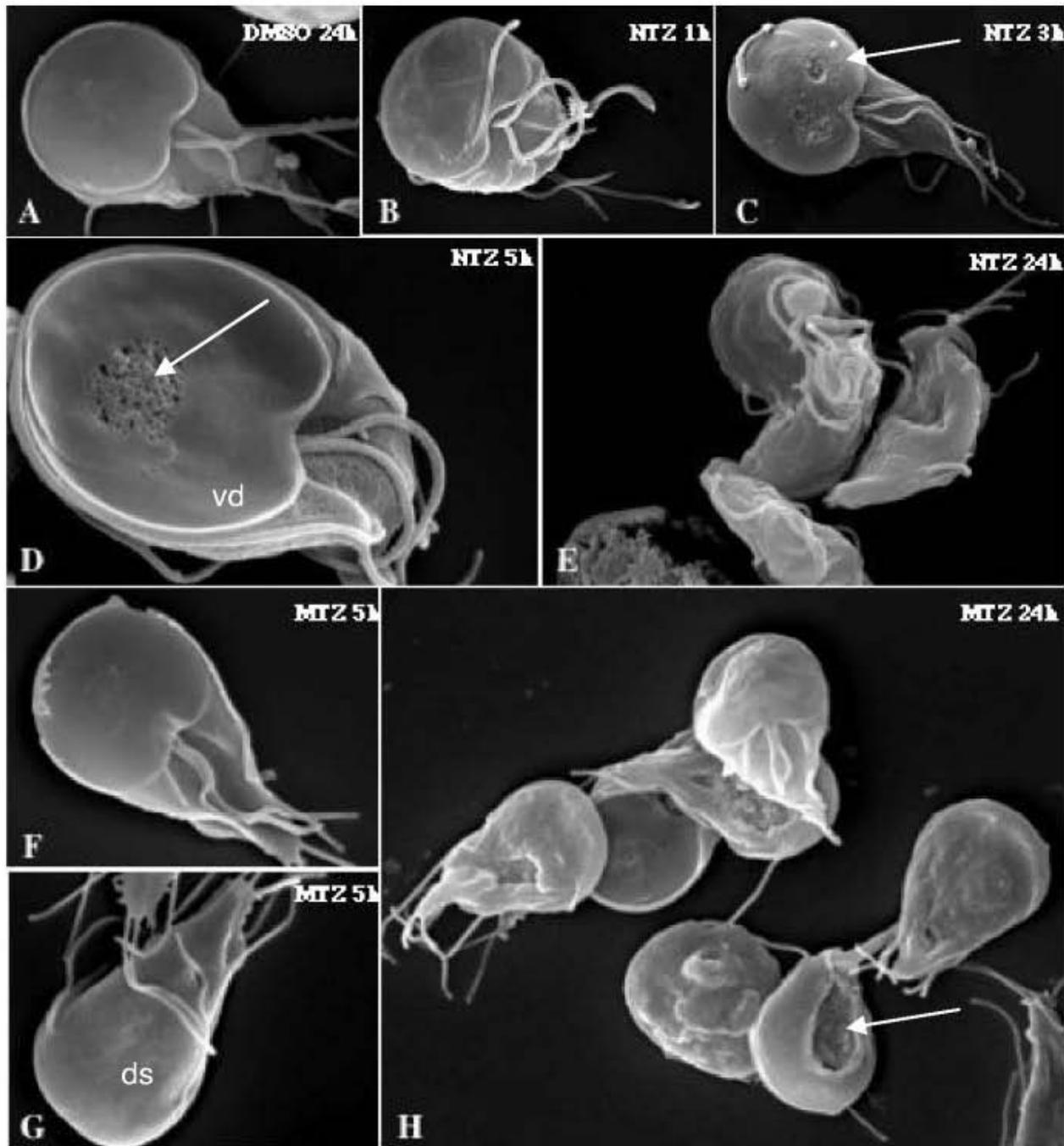


Figura 4. Microscopía electrónica de barrido de *G. lamblia* a diferentes tiempos de tratamiento con NTZ o MTZ. (A) trofozoítos tratados con DMSO. (B a E) trofozoítos tratados con 50 μM de NTZ. (F y H) trofozoítos tratados con 50 μM de MTZ. vd, QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

disco ventral; ds, escudo dorsal. Las flechas indican las zonas distintas de las lesiones (Muller y cols., 2006).

La inhibición del metabolismo energético anaerobio a través de la NTZ interfiriendo con la actividad funcional de PFOR, se ha informado para otros protozoarios parásitos, pero este proceso se piensa que es sólo en una de varias vías por la cual el fármaco exhibe su actividad antiprotozoaria. De hecho, estudios más recientes han demostrado que los derivados de NTZ, que carecen del grupo nitro exhiben una profunda actividad in vitro frente a patógenos intracelulares, lo que sugiere que el grupo nitro no es necesario para la actividad contra parásitos intracelulares (Muller y cols., 2007).

El conocimiento actual sugiere que la actividad de la NTZ es dependiente de la reducción intracelular de su grupo nitro por nitrorreductasas en una manera similar al MTZ. Se empleó una serie de derivados de la NTZ, algunos carecen del grupo nitro asociado al tiazol y algunas versiones modificadas de las que contienen restos de ácido salicílico, demostrando la importancia del anillo de benceno situado en el extremo opuesto de la molécula. El intercambio del grupo nitro por un bromuro no altera notablemente la actividad antiparasitaria de la molécula, pero está claro que sugiere que hay uno o más sitios activos adicionales que ejercen un efecto antiparasitario. Se encontró que la actividad antiparasitaria de la molécula se pierde por completo si el anillo del ácido salicílico es metilado en la posición 3, mientras que la metilación en la posición 4 o 5 no tiene ningún efecto (Esposito y cols., 2005).

Se ha descrito que la PFOR es un objetivo importante de la NTZ, en *Giardia* y otros parásitos. Se demuestra que la NTZ no es reducida por la ferredoxina reducida, sino que inhibe la actividad de la PFOR en su forma protonada al interferir con su cofactor tiamina pirofosfato. *G. lamblia* tiene muchas reacciones metabólicas y atributos genéticos de las bacterias anaerobias. Además, las dianas moleculares de la PFOR o las proteínas de unión para tiazolidas son desconocidas (Muller y cols., 2007).

Recientemente se demostró que la ferredoxina nitroreductasa, denominada como

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

GINR1 es una proteína de unión importante en *G. lamblia* y su actividad de reducción del dinitrotolueno (DNT) puede ser inhibida por la NTZ. La presencia de un grupo nitro se requiere para la unión de la GINR1 a tiazolidas, observado por una cromatografía de afinidad. La expresión de GINR1 se ve sustancialmente afectada en cepas de *Giardia* resistentes a la NTZ o MTZ. La NTZ y las tiazolidas relacionadas pueden actuar, como inhibidores de la GINR1. Al inhibir la función de GINR1, la enzima no puede transferir sus electrones a un sustrato endógeno o exógeno, como en las procariotas anaeróbicas. En la presencia de fármacos con grupo nitro, la inhibición de la GINR1, perturba más el equilibrio redox de la célula, llevando a un daño en la membrana y el aparato secretor, seguido por la muerte celular (Esposito y cols., 2005).

- BENCIMIDAZOLES.

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

Un tratamiento alternativo de la giardiasis es el albendazol (ABZ) (Figura 5), éste se utiliza ampliamente como antihelmíntico. Su dosificación en el tratamiento de la giardiasis, es de 400 mg por 3 días (Vesey y Peterson, 1999). El ABZ administrado en una dosis única era tan eficaz como el MTZ en el tratamiento de giardiasis en los seres humanos, además, el ABZ tuvo estadísticamente el mismo perfil de seguridad como el MTZ (Solaymani y cols., 2010).

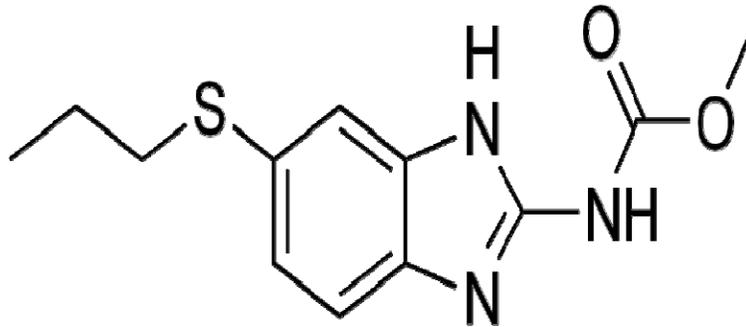


Figura 5. Estructura química del Albendazol.

El modo de acción de los bencimidazol-carbamato como el ABZ, fenbendazol y mebendazol, ha sido estudiado en el nemátodo parásito *Haemonchus contortus*. El albendazol se une al monómero de la β -tubulina antes de la dimerización con la α -tubulina, para bloquear la formación de los microtúbulos, paralizando al parásito y causando su muerte (Vesey y Peterson, 1999).

El albendazol induce cambios drásticos en la morfología del trofozoíto y ya no es capaz de replicarse en concentraciones efectivas (0.1-1.0 μ M), evaluada mediante la observación en el microscopio. La replicación celular se veía afectada cada vez que los parásitos fueron tratados con ABZ aumentando las concentraciones, mientras que el tamaño del inóculo no influyó en la tasa de crecimiento celular, excepto en concentraciones altas de ABZ (0.45 μ M). El método de morfología celular es directo, rápido y muy sensible, que podría sustituir el método de subcultivo en medio líquido para evaluar el efecto de los bencimidazoles (Arguello y cols., 2004).

Entre los bencimidazoles, el mebendazol mostró una actividad similar al albendazol, mientras que los otros fármacos tuvieron un patrón diferente menor al 0.01. A partir de estos compuestos se seleccionaron cuatro tipos de medicamentos representativos (metronidazol, tinidazol, albendazol y mebendazol) para las evaluaciones de su alta eficacia in vitro y un amplio uso en la giardiasis clínica (Arguello y cols., 2004).

La actividad de los bencimidazol-carbamatos sobre *G. lamblia* se debe a que el disco ventral del parásito, importante en el proceso de adhesión, es rico en β -tubulina. Estudios de microscopía electrónica de transmisión han mostrado que el ABZ desorganiza los microtúbulos del disco ventral de *G. lamblia* (Figura 6) (Vahab y Tomoyoshi, 2007) (Chávez y cols., 1992).

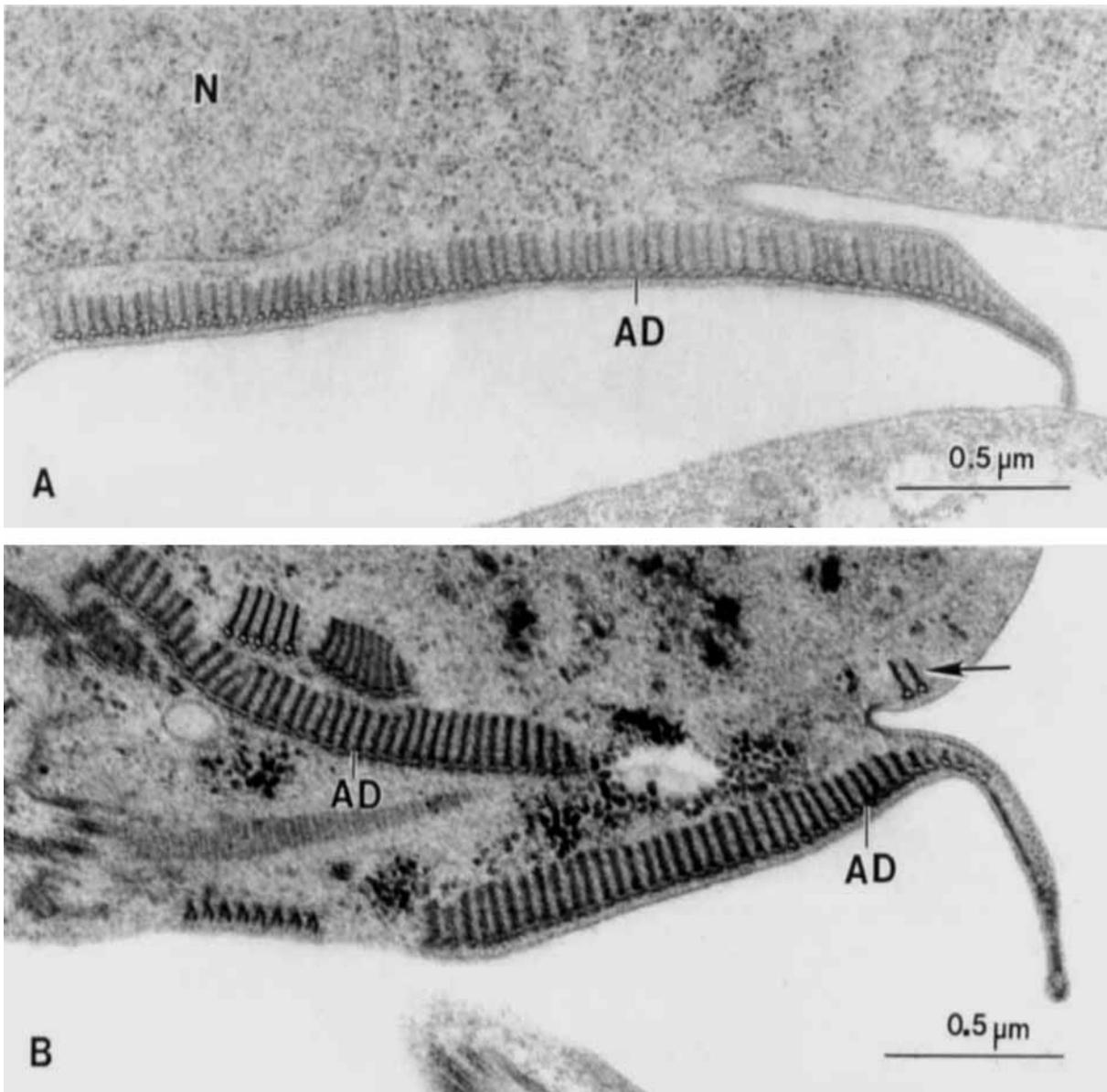


Figura 6. Microscopía electrónica de transmisión de *G. lamblia* control y tratada con albendazol. A. Trofozoíto control, se observa la disposición regular de los microtúbulos del disco adhesivo (AD), (N) núcleo. B. Los componentes del AD, aparecen fragmentados y desplazados después del tratamiento con albendazol, además, las fibras aisladas pueden verse (flecha) (Chávez y cols., 1992).

La actividad de una dosis única de albendazol puede ser limitada contra los parásitos protozoarios, pero pueden mejorar las tasas de curación y reducir el recuento de

huevos de helmintos (Quihui y cols., 2006).

- RESISTENCIA A LOS BENCIMIDAZOLES.

La resistencia al ABZ ha sido estudiada en cepas de *Giardia* resistentes al MTZ produciendo un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos. La mutación común (fenilalanina por una tirosina) del aminoácido 200 en la β -tubulina presente en helmintos resistentes al ABZ, no se detectó en los trofozoítos resistentes al ABZ, aunque se observaron cambios en el citoesqueleto, lo que sugiere un mecanismo de resistencia alternativo (Muller y cols., 2006). En cepas de *G. lamblia* resistentes a Furanidazol producidas in vitro, se adaptan más fácilmente a la quinacrina, así como al ABZ in vitro. La resistencia desarrollada al ABZ se produce más fácilmente en una cepa resistente a furazolidona, dando lugar a un fenotipo multidrogas resistente (Vahab y Tomoyoshi, 2007).

La posibilidad de encontrar cepas de *Giardia* resistentes es apoyada por datos clínicos y experimentales: las comunidades que reciben tratamientos antihelmínticos con el bencimidazol mebendazol, utilizan dosis subóptimas para la giardiasis, presentando un aumento de las tasas de infecciones por *Giardia*, y la exposición a dosis subletales del fármaco es un método eficaz para la obtención de cultivos resistentes a los fármacos in vitro. Mediante el uso de CI_{50} de 5-nitroimidazoles (metronidazol y tinidazol) y bencimidazoles (albendazol y mebendazol) en estudios longitudinales hasta 40 días, las observaciones sugieren que el parásito es capaz de mostrar no sólo la variabilidad, sino variación en la respuesta de un cultivo individual a los fármacos. Esta variación es espontánea e independiente del método utilizado para determinar la viabilidad celular, demostrando que las dosis subletales del fármaco se utilizan en la evaluación de las progenies (Arguello y cols., 2004).

DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS CON ACTIVIDAD GIARDICIDA.

El desarrollo de nuevos fármacos giardicidas tiene la finalidad de contar con alternativas en el tratamiento de esta enfermedad. Existen dos estrategias fundamentales para el desarrollo de la próxima generación de giardicidas. La primera tiene un enfoque centrado en el diseño de fármacos dirigidos contra un componente parasitario específico, empleando el diseño computacional, para después llevar a cabo la síntesis de los compuestos con actividad giardicida predicha, y su posterior validación experimental. La segunda estrategia se enfoca en el diseño de compuestos con probable actividad giardicida, su síntesis y su evaluación in vitro; para posteriormente investigar el mecanismo de acción del compuesto giardicida (Figura 7) (Tejman y Eckmann, 2011).

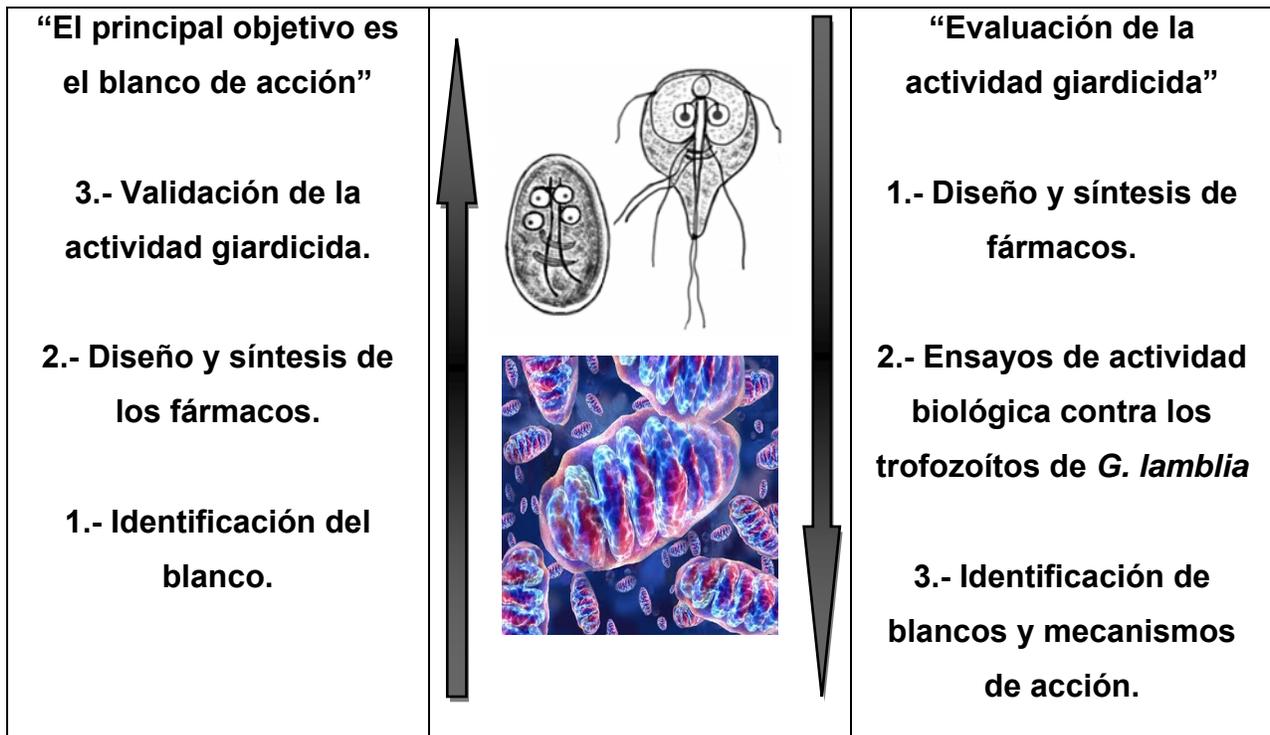


Figura 7. Las dos principales estrategias para el diseño de fármacos antiparasitarios (Tejman y Eckmann, 2011).

La segunda estrategia es la que en nuestro grupo de investigación ha sido inicialmente aplicada en el diseño y síntesis de compuestos giardicidas. En este caso se ha utilizado la molécula del bencimidazol como molécula líder para el diseño y síntesis de derivados bencimidazólicos con actividad antiparasitaria. A la fecha se han obtenido varios compuestos bencimidazólicos con actividad giardicida (Valdez y cols., 2002), en la tabla 1 se presentan algunos de ellos.

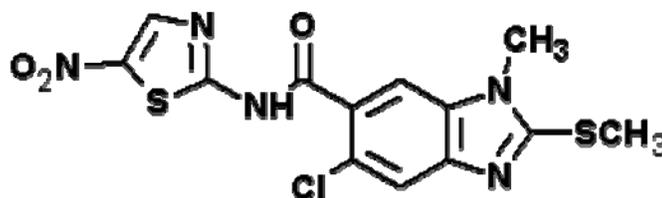
Tabla 1. Actividad biológica de los nuevos compuestos bencimidazólicos 1-18 y compuestos de referencia (Valdez y cols., 2002).

COMPUESTO	R1	R2	R3	Cl ₅₀ (μM) <i>G. lamblia</i>
1	H	H	CH ₃	0.317
2	H	H	NH ₂	1.902
3	H	H	NHCO ₂ CH ₃	0.057
4	H	H	SH	0.040
5	H	H	SCH ₃	0.045
6	H	H	H	0.008
7	Cl	H	CH ₃	0.156
8	Cl	H	NH ₂	0.030
9	Cl	H	NHCO ₂ CH ₃	0.066
10	Cl	H	SH	0.081
11	Cl	H	SCH ₃	0.005
12	Cl	H	H	0.282
13	Cl	Cl	CH ₃	0.065
14	Cl	Cl	NH ₂	0.218
15	Cl	Cl	NHCO ₂ CH ₃	0.127
16	Cl	Cl	SH	0.078
17	Cl	Cl	SCH ₃	0.227

18	Cl	Cl	H	0.358
ALBENDAZOL	-	-	-	0.037
METRONIDAZOL	-	-	-	1.22

Todos los compuestos fueron más activos contra *G. lamblia* que el MTZ, excepto el compuesto 2, El compuestos 6, con un hidrógeno en la posición 1 y sin sustitución en el anillo benzoico, así como el compuesto 11, con un grupo metiltio en la posición 2 y un cloro en la posición 5, fueron 152.5 y 244 veces más potentes que el MTZ. Los compuestos 6, 8,11 fueron más activos que el ABZ (Valdez y cols., 2002).

Otra estrategia que se ha utilizado para crear nuevos fármacos con actividad giardicida es la producción de moléculas híbridas, las cuales se obtienen mediante un proceso de asociación molecular en la que se unen dos estructuras las cuales presentan una cierta actividad biológica, estas estructuras se pueden unir por enlaces covalentes formando una hibridación molecular. La finalidad es obtener moléculas con mejor actividad antiparasitaria que los fármacos de origen. A este respecto, se han sintetizado moléculas híbridas del bencimidazol con el nitrotiazol, cuya actividad antiprotozoaria es superior a la del ABZ y de la NTZ (Robinson y cols., 2004). Dentro de los compuestos híbridos desarrollados se encuentra el conocido como CMC-20, el cual se encuentra constituido por el anillo del bencimidazol en asociación con el anillo 2-amino-5-nitrotiazol (parte activa de la NTZ), presenta un grupo metilo (CH₃) en posición 1, un grupo metiltio (SCH₃) en posición 2, un sustituyente cloro (Cl) en posición 5 y finalmente el grupo nitrotiazol en posición 6 (Figura 8).



CMC20

Figura 8. Estructura química del CMC-20

En pruebas in vitro se demostró que el CMC-20 presenta una actividad giardicida 122 veces más potente que el MTZ, 4 veces más activo que el ABZ y actividad similar a la NTZ (Tabla 2).

Tabla 2. Actividad giardicida in vitro del CMC20 y fármacos de referencia.

COMPUESTO	CI₅₀ (µM)
CMC-20	0.010
Albendazol	0.037
Metronidazol	1.228
Nitazoxanida	0.013

En un modelo de giardiasis murina, el CMC-20 redujo la liberación del quiste en heces, además de acortar la duración de la infección (Méndez, 2005).

Con la finalidad de determinar la molécula blanco y el mecanismo de acción de CMC-20, se realizó el análisis proteómico de trofozoítos de *G. lamblia* tratados con esta molécula híbrida. Mediante este análisis se identificaron proteínas del parásito cuya expresión se vio afectada por el CMC-20. Para el análisis proteómico se llevó a cabo la separación electroforética de extractos totales del parásito tratado o no tratado con CMC-20 en geles 2D y mediante el programa PD-QUEST_{MR}, se calculó el peso molecular, punto isoeléctrico e intensidad de las machas (medida en píxeles). Se recuperaron aproximadamente 18 proteínas que mostraron una diferencia en su expresión (incrementada o disminuída) con respecto al control (Figura 9), de las cuales 14 se identificaron mediante espectrometría de masa (MALDI TOF_{MR}). Entre las proteínas cuya expresión se vio disminuída se encuentran moléculas del citoesqueleto como β -tubulina (50.7 kDa, spot 1) y 7.1 α -giardina (33.5 kDa, spot 3). Además, de enzimas que participan en el metabolismo del parásito como son la Arginina Deiminasa (ADI) (65 kDa, spot 6) y la Enolasa (48.8 kDa, spot 2) (Pérez, 2008). Entre las

moléculas que aumentaron su expresión se encuentran enzimas detoxificadoras y factores de elongación que participación en la síntesis de proteínas.

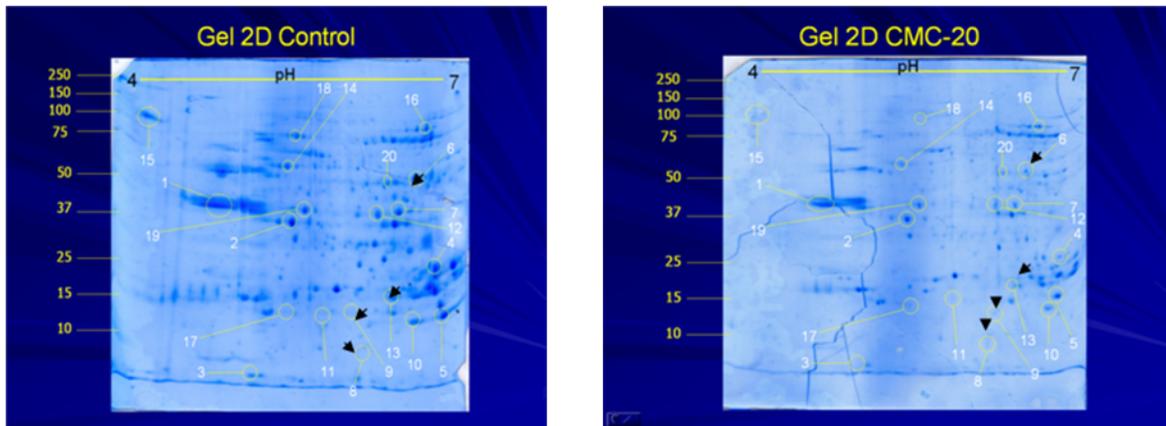


Figura 9. Análisis proteómico de extractos totales de trofozoítos de *G. lamblia* tratados con CMC20 y control.

De gran interés como resultado de este análisis fue la reducción en la expresión de la enzima arginina deiminasa (ADI). Esta es una enzima metabólica que participa en la ruta metabólica de la Arginina Deshidrolasa, catalizando el primer paso en la degradación de la L-arginina a citrulina para finalmente obtener ATP y amoniaco. La ADI también juega un papel en la citrulización de proteínas variantes de superficie específicas en *Giardia*, lo que permite al parásito evadir temporalmente las defensas inmunológicas. Es importante destacar que al inhibir esta enzima por la interferencia de ARN, no hubo trofozoítos viables, indicando que la ADI es esencial para la supervivencia del trofozoíto. Los inhibidores de la ADI se han diseñado en base a sus mecanismos catalíticos y son eficaces contra el parásito in vitro. Por otra parte, los humanos no tienen un homólogo a la ADI, esta enzima se encuentra únicamente en algunos organismos anaerobios, por lo que la enzima es un blanco importante en el desarrollo de los medicamentos.

Actualmente nuestro grupo de investigación ha abordado la primera estrategia mencionada anteriormente, para el diseño de compuestos giardicidas mediante el diseño molecular, teniendo como blanco conocido a la ADI. Mediante esta estrategia se

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

diseñaran y sintetizarán compuestos con actividad predicha contra la ADI para su posterior validación experimental.

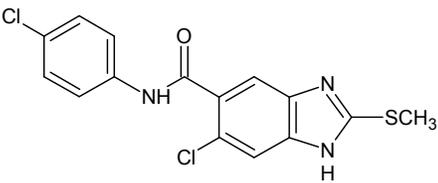
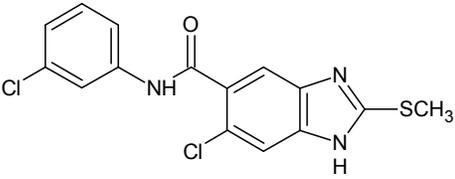
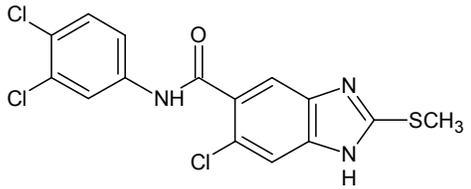
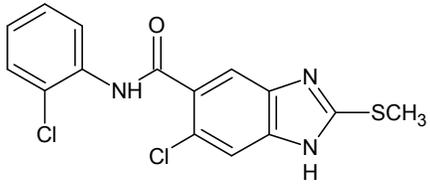
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

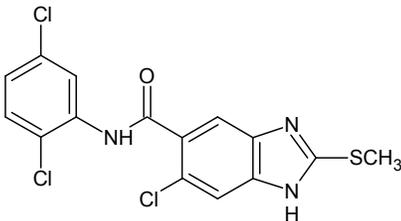
La giardiasis es considerada por la OMS como una enfermedad emergente y reemergente en varios países del mundo, en México representa un problema de salud pública, afectando principalmente a los niños de edad pre-escolar y escolar. El MTZ sigue siendo el fármaco de primera elección, sin embargo, su administración farmacológica es por periodos largos, además, induce diferentes efectos secundarios a los pacientes, por lo que se abandona el tratamiento. La falla terapéutica asociada al uso del MTZ está posiblemente relacionada a este abandono del tratamiento, aunado a la existencia de cepas de *G. lamblia* resistentes al fármaco.

Con la finalidad de contar con tratamientos alternativos, en la Facultad de Química, UNAM, en el grupo de investigación del Dr. Rafael Castillo, se sintetizaron 5 nuevos compuestos derivados del bencimidazol (llamados LGI-1 al LGI-5) (Tabla 3), cuya actividad giardicida no ha sido evaluada.

En este trabajo de tesis se propone evaluar la actividad in vitro de los compuestos LGI-1 a LGI-5 contra *G. lamblia* cepa WB (susceptible al MTZ) y una cepa de *G. lamblia* menos susceptible al MTZ.

Tabla 3. Nuevos compuestos derivados del bencimidazol.

COMPUESTO	PESO MOLECULAR (g/mol)
<p style="text-align: center;">LGI-1</p> 	352.23
<p style="text-align: center;">LGI-2</p> 	352.23
<p style="text-align: center;">LGI-3</p> 	386.68
<p style="text-align: center;">LGI-4</p> 	352.23

<p>LGI-5</p> 	<p>386.68</p>
---	----------------------

HIPÓTESIS

Los nuevos compuestos derivados del bencimidazol (LGI-1 al LGI-5), tendrán actividad giardicida contra los trofozoítos de *Giardia lamblia* susceptibles al metronidazol, así como contra la cepa del parásito resistente al fármaco de referencia.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad biológica “in vitro” de los nuevos compuestos derivados del bencimidazol contra los trofozoítos de *Giardia lamblia* con diferente susceptibilidad al metronidazol.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Determinar la actividad giardicida (CI_{50}) de los compuestos derivados del bencimidazol (LGI-1 al LGI-5), contra los trofozoítos de *G. lamblia* con diferente susceptibilidad al metronidazol empleando el método de subcultivo.
- b) Analizar la relación estructura-actividad giardicida de los compuestos derivados del bencimidazol.

MATERIALES

Material de Vidrio.

- Pipetas graduadas de 10 mL (PYREX).
- Pipetas graduadas de 5 mL (PYREX).
- Vasos de precipitados de 1000 mL (Scott Duran).
- Tubos de ensaye de 7 mL (PYREX).
- Botellas con tapa de 1000 mL (Scott Duran).
- Botellas de con tapa de 100mL (Scott Duran).
- Probeta graduada de 10 mL (PYREX).
- Cámara de Neubauer (Reichert).
- Portaobjetos (Corning).

Materiales de Plástico.

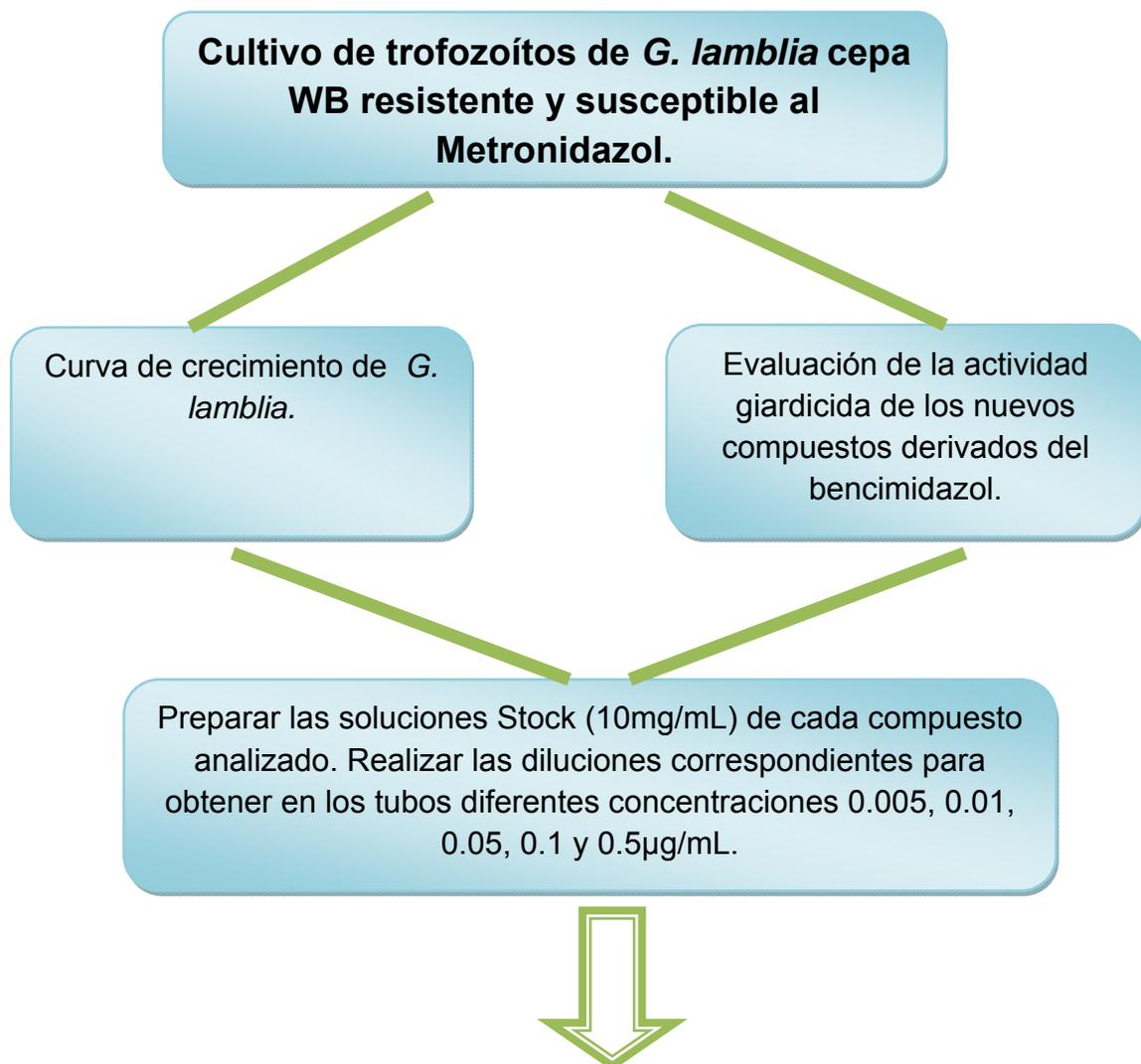
- Micropipetas de 20, 100 y 1000 μ L (Gilson).
- Puntas para micropipetas (BECKMAN).
- Gradillas de 96 pozos (Axygen).
- Tubos Eppendorf (Axygen).
- Tubos Falcon de 15 mL (Corning).
- Guantes (*TITAN*).

Sales puras.

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

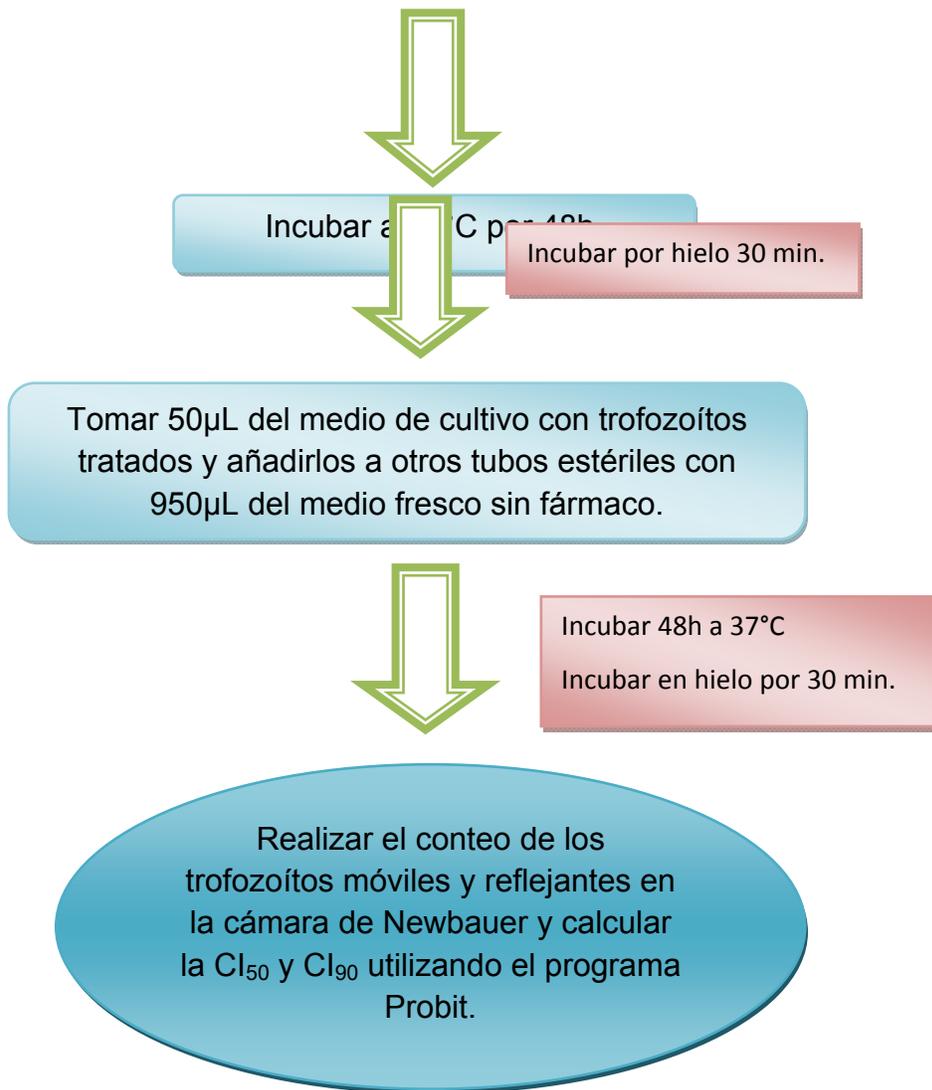
- Albendazol (SIGMA).
- Metronidazol (SIGMA).

DIAGRAMA DE FLUJO



QFB. JO

Añadir el volumen requerido para obtener 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 µg de cada uno de los derivados bencimidazólicos y compuestos de referencia, agregar 5×10^4 trofozoítos y llevar a 1mL con medio de cultivo. Control negativo: trofozoítos en medio TYI-S-33 sin fármaco: Control positivo: ABZ y MTZ a las mismas concentraciones.



METODOLOGÍA

A) CULTIVO AXÉNICO de las cepas WB de *Giardia lamblia* susceptible y resistente a metronidazol.

- 1.- Se descongelaron las cepas WB de *G. lamblia* susceptibles y resistentes al MTZ (conservada a -70°C).
- 2.- En los tubos de ensaye estériles de 13x100, se añadieron 3 mL de medio TYI-S-33 (Anexo A) complementado con suero de ternera al 10% y se repartió el contenido del criovial en los diferentes tubos centrifugándose a 1500 rpm durante 5 min. A temperatura ambiente o a 4°C
- 3.- El sobrenadante se desechó y se añadieron 6 ó 7 mL de medio de cultivo.
- 4.- Los tubos se homogenizaron lentamente, se etiquetaron y se sellaron con parafilm, incubándose por 48h a 37°C.
- 5.- Posteriormente, los tubos se observaron al microscopio con el objetivo de 40x, al alcanzar el 80% confluencia, se cambió el medio de cultivo y se volvió a resembrar, agregando el medio de cultivo fresco en cada tubo.

6.- Los tubos se incubaron nuevamente durante 48h a 37°C para obtener los parásitos en confluencia y ser empleados en la curva de crecimiento y en los ensayos de actividad parasitaria.

B) CURVA DE CRECIMIENTO.

1.- De un cultivo axénico de trofozoítos de *Giardia lamblia* en fase logarítmica de crecimiento, se tomaron 100 µL y se diluyeron con 900 µL del amortiguador de fosfatos salino 1X (PBS) y se contaron en la cámara de Newbauer.

2.- Se sembraron 8 tubos con 5×10^4 trofozoítos/mL en medio TYI-S-33 complementado con suero de ternera al 10% y se incubaron a diferentes tiempos (24h, 48h, 72h y 96h) a 37°C.

3.-El número de trofozoítos viables se determinaron a los diferentes tiempos establecidos, por duplicado. Se graficó el número de trofozoítos obtenidos a los diferentes tiempos. Con esta gráfica se determinó el tiempo al cual se encontraban los trofozoítos en la fase de crecimiento exponencial. Este dato es importante para realizar los ensayos de actividad giardicida, ya que se determinará el efecto de los compuestos bencimidazólicos sobre el crecimiento del parásito.

C) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GIARDICIDA DE LOS NUEVOS COMPUESTOS BENCIMIDAZOLICOS LGI-1 A LGI-5.

La actividad biológica de los 5 nuevos compuestos derivados del bencimidazol (LGI-1 al LGI-5) contra los trofozoítos de *Giardia lamblia* cepa WB con diferente susceptibilidad a metronidazol se determinó mediante el método de subcultivo (Cedillo y Muñoz, 1992).

1.- Se prepararon las soluciones stock (10 mg/mL) de los compuestos de referencia (MTZ y ABZ) y de cada nuevo derivado del bencimidazol. A partir de este stock, se realizaron diluciones para obtener diferentes concentraciones de los compuestos (0.005 – 0.1 $\mu\text{m}/\text{mL}$), empleando el DMSO como diluyente al 1% máximo del volumen total.

2.- En tubos eppendorf se añadieron 5×10^4 trofozoítos, el volumen determinado de los compuestos de referencia y de los derivados bencimidazólicos a las diferentes concentraciones, llevándose a un volumen final de 1mL de medio TYI-S-33, incubando la serie de tubos a 37°C por 48h. Como control negativo se incubaron los trofozoítos en medio de cultivo TYI-S-33 libre de fármacos.

3.- Terminada la primera incubación, se enfriaron los tubos en baño de hielo por 30 min, se tomaron 50 μL y se añadieron en otro tubo que contenía 950 μL de medio de cultivo libre de fármaco, incubándose otra vez los tubos a 37°C por 48h.

4.- Una vez transcurrido el tiempo se enfriaron los tubos en baño de hielo por 30 min.

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

Se realizaron diluciones 1:10 con PBS 1X y se tomaron 12µL para contarlos en la cámara de Newbauer. Se contaron los trofozoítos móviles y reflejantes, también se hizo un promedio de cada conteo, para obtener el número de trofozoítos viables a cada concentración.

5.- Se calculó el número de trofozoítos muertos [Número de trofozoítos vivos en los controles – Número de trofozoítos vivos en cada una de las concentraciones (0.005 – 0.5µg/mL)]. Cada uno de estos datos obtenidos se introdujeron al Programa Probit para calcular la concentración inhibitoria al 50% y 90% (CI₅₀ y CI₉₀) correspondientes para cada uno de los compuestos controles positivos y los nuevos compuestos derivados del bencimidazol.

6.- Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado cada uno.

RESULTADOS

CURVA DE CRECIMIENTO DE LOS TROFOZOITOS DE *G. lamblia*

La curva de crecimiento de trofozoítos de la cepa WB *G. lamblia* con diferente susceptibilidad al MTZ se presenta en la figura 10 y 11. La fase exponencial de crecimiento del parásito susceptible al MTZ se encuentra entre las 24 y 72h, y la fase estacionaria a partir de las 72h. La curva de crecimiento permitió determinar que a las 48h se puede evaluar la actividad giardicida de compuestos bencimidazólicos sobre el crecimiento de *G. lamblia*, es decir sobre la fase exponencial de crecimiento. Si el compuesto afecta el crecimiento del parásito esto se verá reflejado en el número de parásitos que crecen de manera comparativa con un control sin tratamiento.

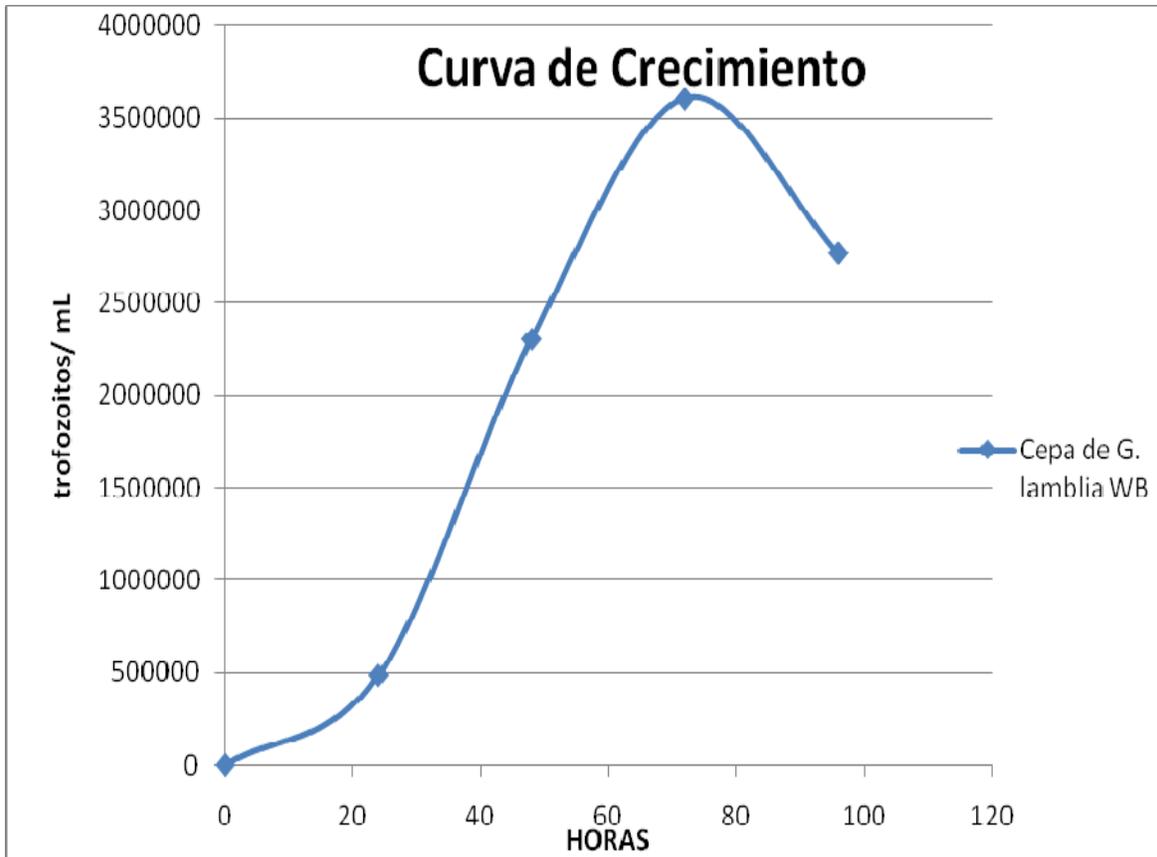


Figura 10. Curva de crecimiento de *G. lamblia* empleando un inóculo de 5×10^4 trofozoitos/mL.

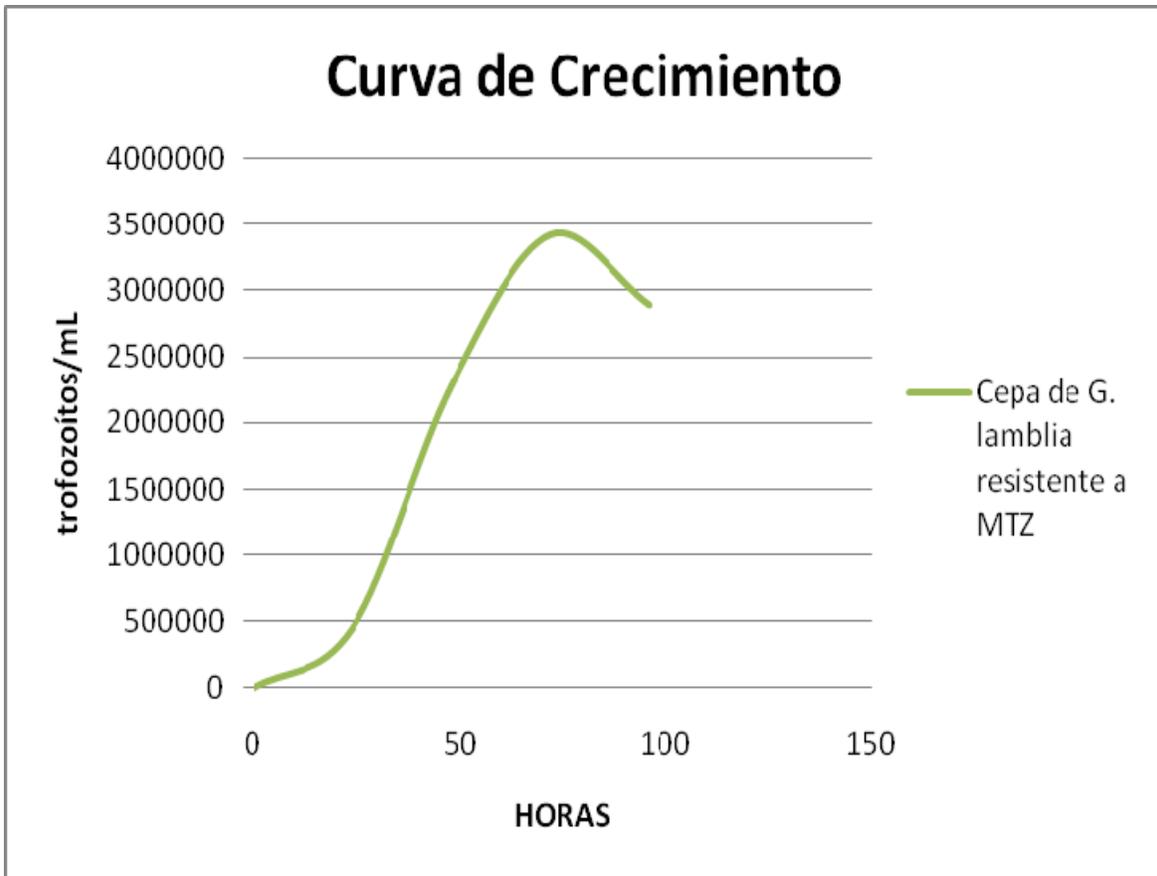


Figura 11. Curva de crecimiento de *G. lamblia* resistente al MTZ utilizando un inóculo de 5×10^4 trofozoitos/mL.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS DERIVADOS DEL BENCIMIDAZOL CONTRA LOS TROFOZOÍTOS DE *G. lamblia*

En la Tabla 4, se presenta la actividad giardicida (CI_{50}) de los compuestos de referencia ABZ y MTZ y de los compuestos derivados del bencimidazol contra los trofozoítos de *G. lamblia* susceptible al MTZ, determinada por el método de subcultivo. Al analizar las CI_{50} obtenidas de los ensayos biológicos, el compuesto LGI-1 ($CI_{50} = 0.252 \mu\text{g/mL}$) presentó una actividad giardicida similar a la del MTZ ($CI_{50} = 0.231 \mu\text{g/mL}$). La CI_{50} de los compuestos LGI-3, LGI-4 y LGI-5 fue de $0.123 \mu\text{g/mL}$, $0.175 \mu\text{g/mL}$ y $0.110 \mu\text{g/mL}$, respectivamente siendo más activos que el MTZ. El compuesto LGI-2 fue el menos activo de todos los compuestos evaluados ($CI_{50} = 0.391 \mu\text{g/mL}$), siendo a la vez menos activo que el MTZ. Los compuestos LGI- 3 y LGI-5 fueron 1.8 y 2 veces más potentes que el MTZ, Sin embargo, el compuesto LGI-2 fue 0.59 veces menos activo que el MTZ.

Tabla 4. Actividad biológica (CI_{50} y CI_{90}) de los compuestos de referencia y los compuestos LGI-1 a LGI-5 sobre los trofozoítos de *Giardia lamblia* susceptible al Metronidazol.

COMPUESTO	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (% CV)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (σ)	CI_{90} ($\mu\text{g/mL}$)
METRONIDAZOL	0.231 ± 0.002	3.12	0.00721	46.567
ALBENDAZOL	0.0126	4.58	0.00057	0.184
LGI-1	0.252 ± 0.002	1.19	0.003	55.469
LGI-2	0.391 ± 0.004	0.39	0.00153	187.7
LGI-3	0.123 ± 0.001	2.48	0.00305	56.406
LGI-4	0.175 ± 0.001	2.57	0.00451	32.129
LGI-5	0.110 ± 0.001	3.67	0.00404	10.528

***Estos valores representan el promedio obtenido de 3 ensayos realizados para cada uno de los compuestos evaluados. Las CI_{50} y CI_{90} fueron obtenidas mediante el programa Probit. (Anexo D).**

Los compuestos LGI-3 y LGI-5 fueron 1.8 y 2 veces más potentes que el MTZ, sin embargo, el compuesto LGI-2 fue 0.59 veces menos activo que el MTZ (Tabla 5) (Figura 12).

Tabla 5. Potencia giardicida de los 5 compuestos LGI-1 a LGI-5 con respecto al MTZ.

COMPUESTOS	COEFICIENTES DE POTENCIA CON RESPECTO AL METRONIZADOL
LGI-1	0.92
LGI-2	0.59
LGI-3	1.88
LGI-4	1.32
LGI-5	2.09
MTZ	1.00

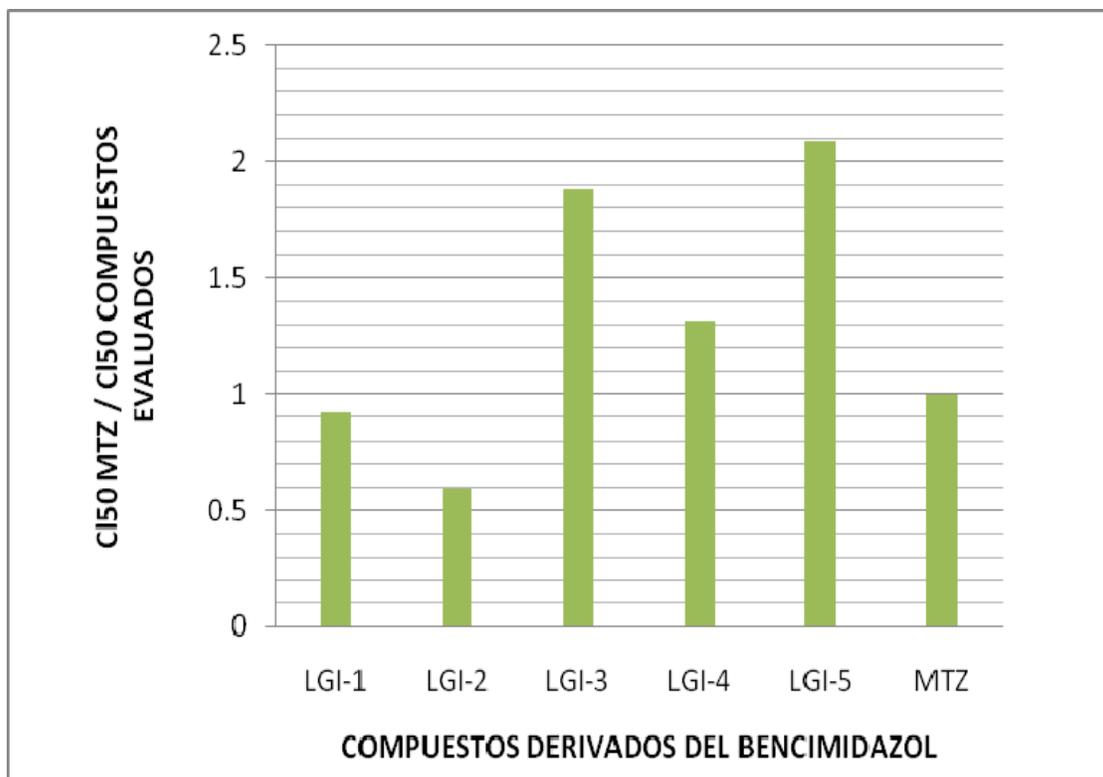


Figura 12. Coeficiente de potencia giardicida de los compuestos LGI-1 a LGI-5 con respecto al metronidazol (MTZ).

Los compuestos LGI-3 a LGI-5 se evaluaron contra la cepa del parásito resistente al MTZ. La actividad giardicida de estos compuestos se presentan en la Tabla 6. La cepa resistente al MTZ mostró ser aproximadamente 2.7 veces menos susceptible al MTZ ($CI_{50} = 0.633 \mu\text{g/mL}$). Los tres compuestos fueron más activos que el MTZ con valores de CI_{50} de 0.256, 0.380 y 0.211 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Los compuestos LGI-3, LGI-4 y LGI-5 resultaron 2.47, 1.67 y 3 veces más potentes que el MTZ (Tabla 7) (Figura 13).

Tabla 6. Actividad biológica (CI_{50} y CI_{90}) de los compuestos de referencia y los

compuestos LGI-3, LGI-4 y LGI-5 sobre los trofozoítos de *Giardia lamblia* resistentes a Metronidazol.

COMPUESTO	CI ₅₀ (µg/mL)	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (% CV)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (σ)	CI ₉₀ (µg/mL)
METRONIDAZOL	0.633±0.003	0.64	0.00404	132.94
ALBENDAZOL	0.0183	3.17	0.00058	0.468
LGI-3	0.256±0.002	1.76	0.00451	30.516
LGI-4	0.380±0.002	0.92	0.00351	36.925
LGI-5	0.211±0.002	1.52	0.00321	44.377

* Estos valores representan el promedio obtenido de 3 ensayos realizados para cada uno de los compuestos evaluados. Las CI₅₀ y CI₉₀ fueron obtenidas mediante el programa Probit (Anexo D).

Tabla 7. Coeficientes de potencia de los compuestos (LGI-3, LGI-4 y LGI-5) contra los trofozoítos de *G. lamblia* cepa WB resistentes a metronidazol, obtenidos con respecto a Metronidazol.

COMPUESTOS	COEFICIENTES DE POTENCIA CON RESPECTO AL METRONIDAZOL
LGI-3	2.47
LGI-4	1.67
LGI-5	3.0

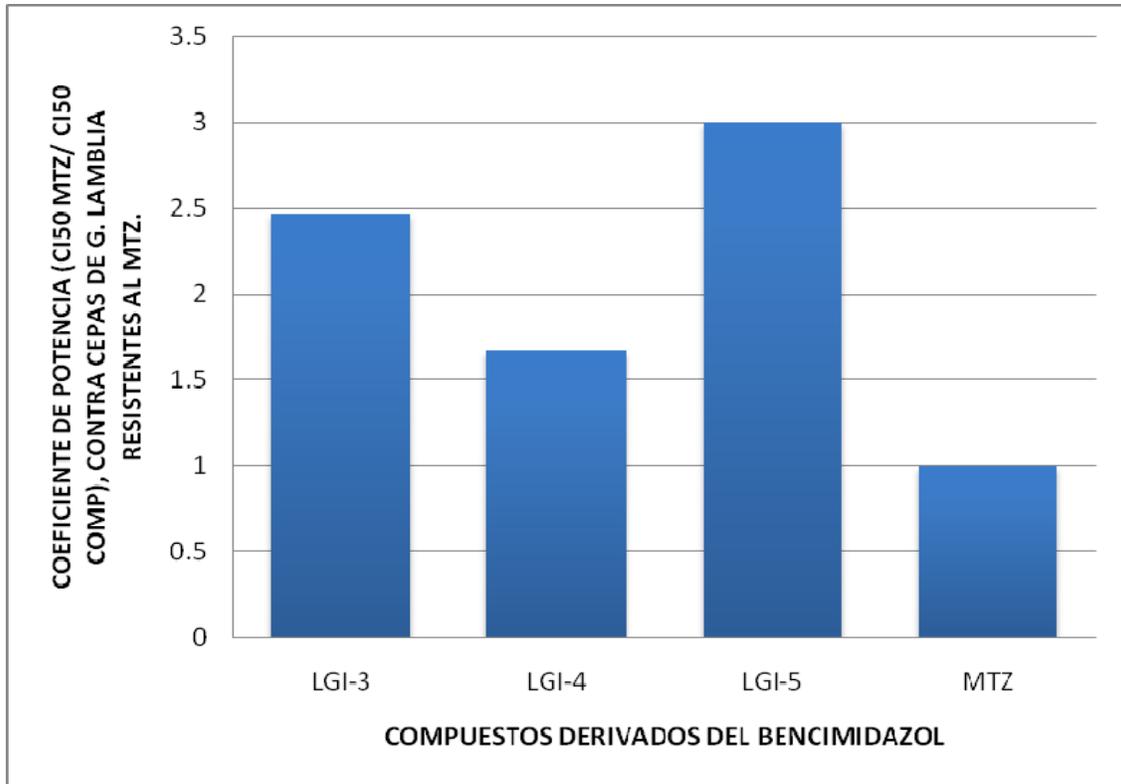


Figura 13. Coeficiente de potencia contra los trofozoítos de *Giardia lamblia* resistentes a metronidazol, calculados por la relación de la CI₅₀ del Metronidazol (MTZ) y la CI₅₀ de cada compuesto derivado del bencimidazol evaluado.

ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Todos los compuestos LGI-1 al LGI-5 presentan el núcleo bencimidazólico, un grupo sustituyente H en posición 1, un metilitio en posición 2, un cloro en posición 5 y una carboxamida en posición 6, sin embargo, lo más relevante son las posiciones y el número de grupos cloro sustituyentes en el grupo fenilo.

Los compuestos LGI-1 y LGI-2, que fueron los menos activos contra los trofozoítos de *G. lamblia* susceptible al MTZ, en su estructura química presentan solamente un cloro en posición 3 y 4 en el grupo fenilo, respectivamente. El compuesto LGI-4 tiene en su estructura un cloro en posición 2 en el grupo fenilo, sin embargo, los compuestos LGI-3 y LGI-5, que fueron los más potentes giardicidas, presentan dos cloros en posición 3,4 y 2,5 del grupo fenilo, respectivamente, siendo el LGI-5 el más activo giardicida.

DISCUSIÓN.

En este trabajo de tesis el método de subcultivo permitió evaluar la actividad giardicida (CI_{50}) de los compuestos LGI-1 a LGI-5, de manera fácil, rápida y reproducible, este método al ser comparado con otros métodos in vitro como la tinción con DAPI, método colorimétrico del MTT, resultó ser el más sensible y reproducible (Arguello y cols., 2004).

Los compuestos LGI-3 a LGI-5, fueron más activos que el MTZ contra las cepas susceptible y resistente al fármaco, particularmente LGI-3 y LGI-5 fueron más activos. Como se mencionó anteriormente, hay evidencias experimentales que indican que parásitos resistentes al MTZ, también presentan resistencia a otros fármacos, en ellos al ABZ (Sadjjadi y cols., 2001). Los resultados obtenidos muestran que en el caso de la cepa WB resistente al MTZ, ésta fue 2.7 veces menos susceptible al propio MTZ, sin embargo, ésta no mostró resistencia hacia el ABZ, obteniéndose una CI_{50} de 0.018 $\mu\text{g/mL}$, comparada con 0.013 $\mu\text{g/mL}$ de la cepa susceptible al MTZ. Es importante evaluar la actividad giardicida de los compuestos LGI-3 y LGI-5 contra cepas del parásito resistentes al ABZ, dependiendo de estos resultados, se podrían proponer estos dos compuestos como alternativa en el tratamiento de giardiasis refractaria al MTZ y ABZ.

Estudios in silico realizados por Robinson y cols., (2004), empleando la β -tubulina del nemátodo *Haemonchus contortus*, mostraron que el sustituyente H y metil-carbamato en posición 1 y 2 del anillo bencimidazólico del ABZ son importantes para su unión a la tubulina del parásito. Considerando la estructura química de los compuestos LGI-3 y LGI-5, es probable que el mecanismo de acción sea diferente al del ABZ. Con respecto a esto, estudios de microscopía electrónica de transmisión de trofozoítos de *G. lamblia* tratados con ABZ, mostraron el efecto del fármaco sobre el citoesqueleto del parásito realizados por Chávez y cols., (1992), así se podrá analizar a nivel ultraestructural el efecto de LGI-3 y LGI-5 sobre los trofozoítos de *G. lamblia* y tener evidencias de si

éstos afectan el citoesqueleto del parásito.

Por otro lado, para el estudio del mecanismo de acción de los compuestos LGI-3 y LGI-5, una herramienta que se puede usar es la proteómica, mediante la cual se podrían identificar moléculas del parásito cuya expresión se ve afectada por los compuestos y a partir de éstas analizar la unión de los compuestos a estos sustratos.

Es importante mencionar que en el control de la giardiasis, la educación sanitaria sigue siendo un componente fundamental, ésta debe ser dirigida al individuo, familia, comunidad o a nivel nacional. Aunado a lo anterior, la lactancia materna, es reconocida como el factor de riesgo único y más importante para la diarrea en los niños pequeños. Finalmente, es evidente que la prevención y control de la giardiasis debe involucrar de manera conjunta condiciones higiénicas y la quimioterapia.

La importancia de contar con alternativas en el tratamiento de la giardiasis es la continua falla terapéutica con el fármaco de elección el MTZ, calculada en aproximadamente 20% del total de casos (Tejman y cols., 2011). Aunado a esto, se deben considerar los casos crónicos de giardiasis en individuos inmunocomprometidos. Por lo anterior, la actividad giardicida mostrada por los compuestos LGI-3 y LGI-5 son de gran relevancia y motivan a continuar con la caracterización de su actividad en estudios pre-clínicos.

CONCLUSIONES.

- 1.- El método de subcultivo es un método de fácil de realizarse y reproducirse que permite determinar la actividad giardicida de diferentes compuestos.
- 2.- Los compuestos derivados del bencimidazol LGI-3, LGI-4 y LGI-5 fueron más activos que el MTZ contra los trofozoítos de *Giardia lamblia*.
- 3.- El compuesto derivado del bencimidazol LGI-1, tiene una actividad similar al MTZ contra los trofozoítos de *Giardia lamblia*.
- 4.- El compuesto derivado del bencimidazol LGI-2, resultó ser el menos activo de todos los compuestos evaluados y con menor actividad que el MTZ.
- 5.- El compuesto LGI-5, fue el más activo contra la cepa de *G. lamblia* resistente al MTZ, mostrando ser 3 veces más potente que el MTZ.
- 6.- De acuerdo a la estructura química del compuesto LGI-5, la 6-carboxamida, el 2-metiltio, el 5-cloro, el 1-hidrógeno y el 2,5-diclorofenil le confieren al compuesto una mayor actividad giardicida.
- 7.- De acuerdo a la actividad biológica giardicida, los compuestos LGI-3 y LGI-5 podrían ser candidatos a evaluarse en modelos murinos.

ANEXO A

* Preparación del medio de cultivo TYI-S-33.

Para preparar 1L del medio de cultivo TYI-S-33 complementado para *Giardia lamblia*, se adicionan los siguientes reactivos:

- a) 0.2 gr. Ácido Ascórbico (SIGMA).
- b) 1gr. Fosfato de Potasio Monobásico (J.T. Backer).
- c) 1gr. Fosfato de Potasio Dibásico (J.T. Backer).
- d) 2 gr. L-cisteína (INC).
- e) 2gr. Cloruro de Sodio (MERCK).
- f) 0.8 gr. Bilis (SIGMA).
- g) 10gr. Glucosa (SIGMA).
- h) 0.022 gr. Citrato Férrico (SIGMA).
- i) 30gr de Biosate (SIGMA).

PREPARACIÓN:

- 1.- Después de pesar correctamente los reactivos anteriores, se adicionaron a un matraz Erlenmeyer de 2L con 700mL de agua destilada y se disolvieron con agitación constante.
- 2.- Se adicionó la cantidad suficiente de agua para llevar a un volumen final de 900mL.
- 3.- El pH se ajustó con NaOH o HCl entre 7-7,2.
- 4.- El medio de cultivo se filtró a través de varias membranas Millipore MF con un diámetro de 0.45µm y 0.22µm cada una de ellas, para ser recolectado en frascos de vidrio estériles con capacidad de 500mL.
- 5.- Se realizó la prueba de esterilidad del medio de cultivo. Se toma una alícuota de 4µL y se inocula en una caja con agar sangre, incubándola por 24h a 37°C.
- 6.- Los frascos con medio de cultivo se rotulan con el nombre del medio, nombre de la persona que lo elaboró y fecha de su preparación, finalmente si la prueba de esterilidad es aprobada, se congelan los frascos a -20°C.
- 7.- Para crecer el parásito (*G. lamblia*) bajo condiciones de esterilidad se complementa el medio de cultivo TYI-S-33 con 10% de suero de ternera (Hyclone) y 0.5mL de

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

antibiótico penicilina-estreptomicina 10,000 U/ μ g/mL.

ANEXO B

***Cuenta de trofozoítos con Cámara de Newbauer.**

La cámara de Newbauer es una cámara de conteo adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula como la que se observa en la imagen. Es un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. Así, el área sombreada y marcada "L" corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de tal forma que cuando se cubre con un cubreobjetos, éste dista de la superficie marcada 0.1 milímetro y el volumen comprendido entre la superficie "L" y el cubreobjetos es de 0.1 milímetro cúbico, es decir, 0.1 microlitro.

- 1.- El recuento presupone un conocimiento exacto de las líneas límite de las cámaras de conteo utilizadas.
- 2.- Los trofozoítos que se encontraban adentro o cerca de las líneas de limitación, no se contaron dos veces o si no se sobrepasará el conteo, se siguieron determinadas reglas.
- 3.- Se contaron todas las células dentro de una zona de medición definida.
- 4.- También se contaron las células, que se situaban o tocaban las dos caras de la cámara secundaria.
- 5.- Esto también fue válido para el tipo de operación de conteo propiamente dicho, que se efectuó en forma de meandro. Se comenzó desde el ángulo superior izquierdo en dirección de zig-zag.
- 6.- En los conteos de las cámaras, el diagrama del condensador en el microscopio invertido, se encontraba cerrado en gran parte.
- 7.- La diferencia de las células contadas en los cuadrantes grandes y en los cuadrados de grupos, no podrá ser superior a 10 células. En todos los conteos de células, se realizaron dobles determinaciones. Después del recuento de la red de conteo superior, se recuenta como control también la red de conteo inferior. Se tuvo cuidado de que no

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

estuviera reseca la cámara.

8.- Si en algunas de las redes se contaba más de 50 trofozoítos se hacía una dilución 1:10, en donde se agregaban 100 μL de la muestra y 900 μL de PBS.

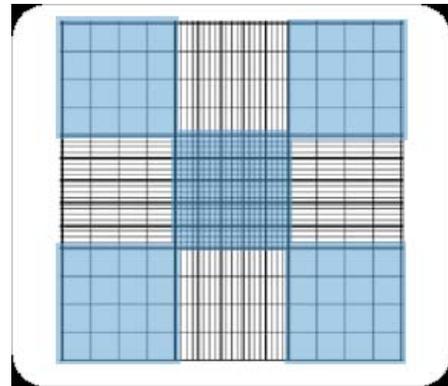
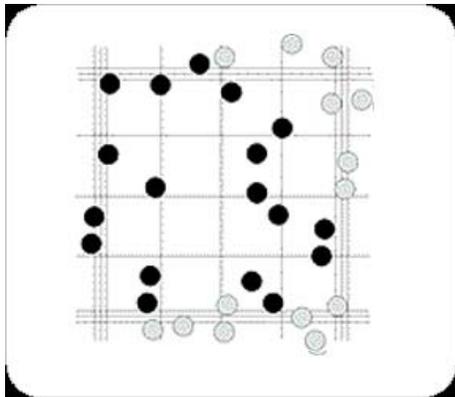
9.- Al terminar de contar los trofozoítos en las cuatro redes, el total de estos se divide entre cuatro (calculando un promedio), el resultado es multiplicado por el factor de dilución y por **10,000**. Obteniendo el número de trofozoítos por mL.

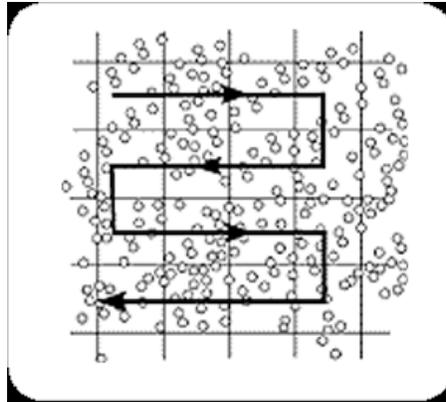
*El valor de **10,000** se debe a que cada cuadrante tiene de superficie 0.1 mm y cada lado 1mm, es igual a:

Volumen = $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0.1\text{mm} = 0.1 \text{ mm}^3 = 0.1 \text{ mL}$, por lo tanto

$$\begin{array}{ccc} \text{Trofozoítos por cuadrante} & \longrightarrow & 0.1 \mu\text{L} \\ \mathbf{X} & & \longleftarrow 1000 \mu\text{L} \end{array}$$

Donde **X = 10,000**

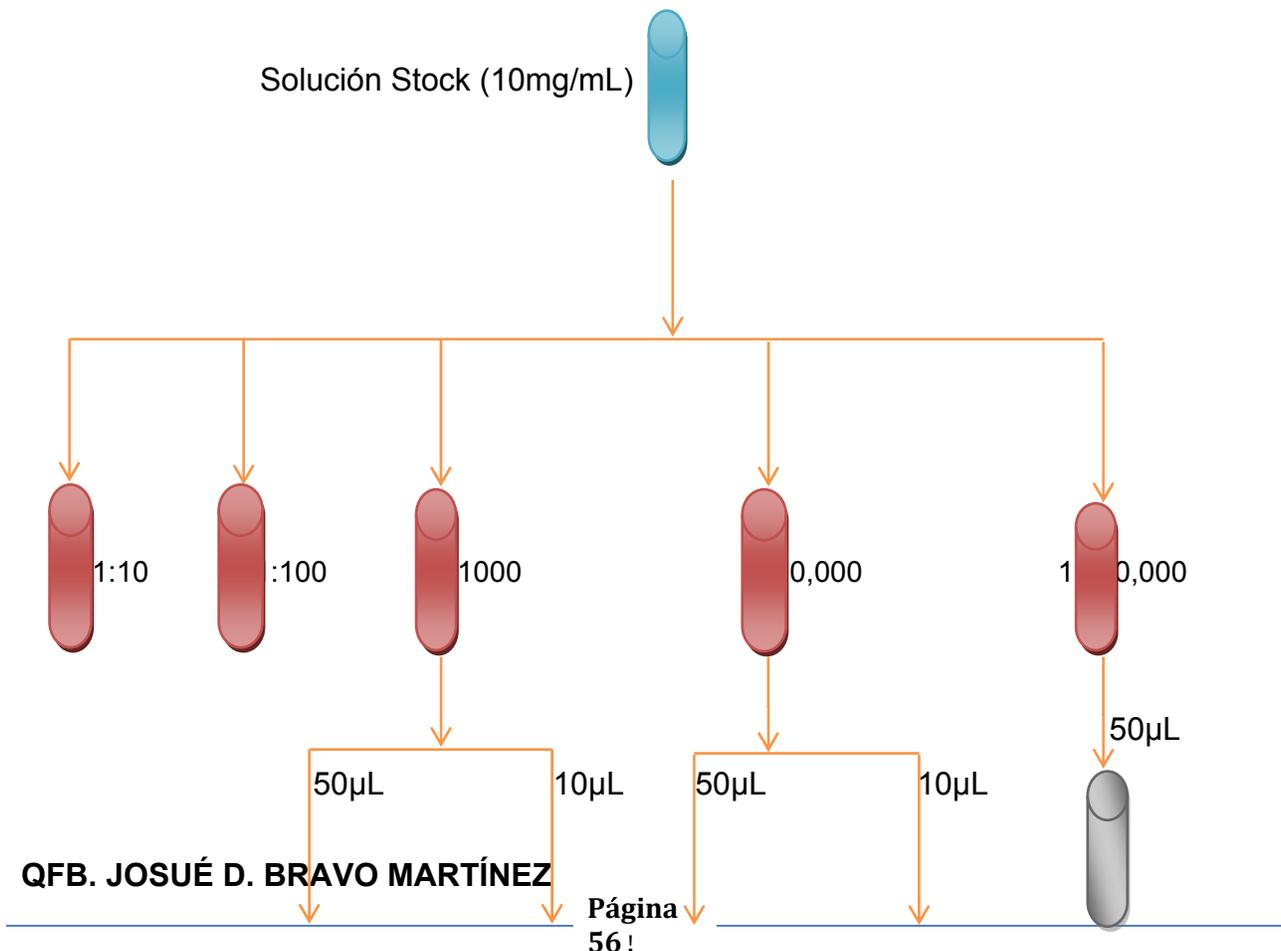




ANEXO C

*Diluciones empeladas en el Método de Subcultivo.

Se comenzó de una solución Stock con 10mg del compuesto (MTZ, ABZ y derivados del bencimidazol) disuelto en 1mL de DMSO (Baker). Se estuvo revisando que la concentración final del DMSO en los tubos de ensaye, no rebasara el 1% de la concentración total de la solución, con la finalidad de que el parásito no saliera afectado en su crecimiento debido a dicho disolvente.



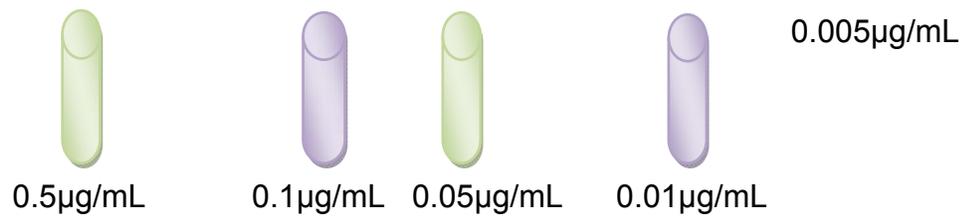


Figura14. Diagrama de diluciones empleadas en el método de subcultivo.

ANEXO D

***Resultados del Programa Probit.**

a) Compuestos de referencia (MTZ y ABZ) y los compuestos derivados del bencimidazol contra la cepa WB de *Giardia lamblia* susceptible al MTZ:

METRONIDAZOL

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	11.70	11.70	3.830
2	0.01	26.20	26.20	4.370
3	0.05	35.90	35.90	4.640
4	0.1	43.60	43.60	4.840
5	0.5	54.40	54.40	5.110

DL₅₀ = 0.239 µg/MI
 INTERVALO DE CONFIANZA: 0.238-0.24
 DL₉₀ = 43.162 µg/mL

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	13.30	13.30	3.910
2	0.01	27.30	27.30	4.410
3	0.05	37.60	37.60	4.680
4	0.1	44.20	44.20	4.850
5	0.5	55.00	55.00	5.120

DL₅₀ = 0.225 µg/mL
 INTERVALO DE CONFIANZA: 0.224-0.226
 DL₉₀ = 53.567 µg/mL

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
-------	-----------------------	------------------	----------------------	-------------------

1	0.005	12.20	12.20	3.850
2	0.01	26.10	26.10	4.370
3	0.05	35.60	35.60	4.630
4	0.1	46.20	46.20	4.910
5	0.5	53.80	53.80	5.090

DL₅₀ = 0.229 µg/mL
INTERVALO DE CONFIANZA: 0.228-0.23
DL₉₀ = 42.973 µg/mL

ALBENDAZOL

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	23.10	23.10	4.290
2	0.01	56.50	56.50	5.160
3	0.05	76.00	76.00	5.700
4	0.1	84.70	84.70	6.020
5	0.5	91.50	91.50	6.360

DL₅₀ = 0.013 µg/mL
INTERVALO DE CONFIANZA: 0.013
DL₉₀ = 0.23 µg/mL

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	23.90	23.90	4.310
2	0.01	58.20	58.20	5.210
3	0.05	75.80	75.80	5.700
4	0.1	89.60	89.60	6.220
5	0.5	95.20	95.20	6.650

DL₅₀ = 0.012 µg/mL
INTERVALO DE CONFIANZA: 0.012
DL₉₀ = 0.147 µg/mL

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	22.80	22.80	4.270
2	0.01	56.40	56.40	5.170
3	0.05	73.10	73.10	5.620
4	0.1	85.10	85.10	6.030
5	0.5	95.90	95.90	6.740

DL₅₀ = 0.013 µg/mL

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

INTERVALO DE CONFIANZA: 0.013

DL₉₀ = 0.176 µg/mL

LGI-1

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	14.40	14.40	3.940
2	0.01	25.60	25.60	4.350
3	0.05	34.40	34.40	4.600
4	0.1	43.60	43.60	4.840
5	0.5	54.80	54.80	5.120

DL₅₀ = 0.249 µg/mL

INTERVALO DE CONFIANZA: 0.248 – 0.250

DL₉₀ = 57.996 µg/mL

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	12.40	12.40	3.850
2	0.01	21.60	21.60	4.220
3	0.05	33.20	33.20	4.570
4	0.1	44.50	44.50	4.870
5	0.5	54.10	54.10	5.100

DL₅₀ = 0.255 µg/mL

INTERVALO DE CONFIANZA: 0.254 – 0.256

DL₉₀ = 36.383 µg/mL

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	16.70	16.70	4.030
2	0.01	25.50	25.50	4.350
3	0.05	34.30	34.30	4.600
4	0.1	41.50	41.50	4.790
5	0.5	56.60	56.60	5.170

DL₅₀ = 0.252 µg/MI

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

Página

59!

INTERVALO DE CONFIANZA: 0.251 – 0.253

DL₉₀ = 72.028 µg/mL

LGI-2

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	11.00	11.00	3.780
2	0.01	20.40	20.40	4.180
3	0.05	29.10	29.10	4.450
4	0.1	43.50	43.50	4.840
5	0.5	48.50	48.50	4.960

DL₅₀ = 0.391 µg/mL

INTERVALO DE CONFIANZA: 0.389 – 0.393

DL₉₀ = 176.577 µg/mL

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	15.50	15.50	3.990
2	0.01	24.80	24.80	4.330
3	0.05	33.00	33.00	4.560
4	0.1	40.90	40.90	4.770
5	0.5	50.60	50.60	5.020

DL₅₀ = 0.389 µg/mL

INTERVALO DE CONFIANZA: 0.387 – 0.391

DL₉₀ = 198.107 µg/mL

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	15.80	15.80	4.000
2	0.01	24.20	24.20	4.300
3	0.05	31.90	31.90	4.530
4	0.1	41.30	41.30	4.780
5	0.5	50.60	50.60	5.020

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

Página

60!

DL₅₀ = 0.392 µg/mL
 INTERVALO DE CONFIANZA: 0.390 – 0.394
 DL₉₀ = 188.408 µg/mL

LGI-3

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	20.80	20.80	4.190
2	0.01	32.10	32.10	4.540
3	0.05	40.80	40.80	4.770
4	0.1	50.20	50.20	5.010
5	0.5	60.40	60.40	5.260

DL₅₀ = 0.126 µg/mL
 INTERVALO DE CONFIANZA: 0.125 – 0.126
 DL₉₀ = 51.286 µg/mL

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	21.00	21.00	4.200
2	0.01	33.10	33.10	4.560
3	0.05	41.40	41.40	4.780
4	0.1	48.60	48.60	4.970
5	0.5	62.10	62.10	5.310

DL₅₀ = 0.120 µg/mL
 INTERVALO DE CONFIANZA: 0.119 – 0.120
 DL₉₀ = 50.757 µg/mL

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	21.50	21.50	4.210
2	0.01	34.10	34.10	4.590
3	0.05	40.70	40.70	4.770
4	0.1	49.60	49.60	4.990

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

5	0.5	61.10	61.10	5.280
---	-----	-------	-------	-------

DL₅₀ = 0.122 µg/mL
INTERVALO DE CONFIANZA: 0.121 – 0.122
DL₉₀ = 67.205 µg/mL

LGI-4

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	14.40	14.40	3.940
2	0.01	24.80	24.80	4.330
3	0.05	36.70	36.70	4.660
4	0.1	46.30	46.30	4.910
5	0.5	58.50	58.50	5.210

DL₅₀ = 0.180 µg/mL
INTERVALO DE CONFIANZA: 0.179 – 0.180
DL₉₀ = 24.677 µg/mL

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	17.00	17.00	4.050
2	0.01	27.40	27.40	4.400
3	0.05	38.50	38.50	4.710
4	0.1	47.30	47.30	4.930
5	0.5	58.00	58.00	5.200

DL₅₀ = 0.171 µg/mL
INTERVALO DE CONFIANZA: 0.171 – 0.172
DL₉₀ = 35.785 µg/mL

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	16.70	16.70	4.040
2	0.01	26.90	26.90	4.390
3	0.05	38.40	38.40	4.700

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

4	0.1	47.90	47.90	4.950
5	0.5	57.40	57.40	5.180

DL₅₀ = 0.175 µg/mL
INTERVALO DE CONFIANZA: 0.174 – 0.175
DL₉₀ = 35.925 µg/mL

LGI-5

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	14.60	14.60	3.950
2	0.01	26.60	26.60	4.380
3	0.05	39.90	39.90	4.750
4	0.1	52.30	52.30	5.060
5	0.5	64.30	64.30	5.360

DL₅₀ = 0.114 µg/mL
INTERVALO DE CONFIANZA: 0.114 – 0.115
DL₉₀ = 8.714 µg/mL

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	17.80	17.80	4.080
2	0.01	29.70	29.70	4.480
3	0.05	40.90	40.90	4.770
4	0.1	53.10	53.10	5.080
5	0.5	64.10	64.10	5.360

DL₅₀ = 0.106 µg/mL
INTERVALO DE CONFIANZA: 0.106 – 0.107
DL₉₀ = 13.394 µg/mL

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	16.10	16.10	4.010
2	0.01	26.80	26.80	4.380

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

3	0.05	38.70	38.70	4.710
4	0.1	53.50	53.50	5.090
5	0.5	64.80	64.80	5.380

DL₅₀ = 0.111 µg/mL
INTERVALO DE CONFIANZA: 0.111
DL₉₀ = 9.475 µg/mL

b) Compuestos de referencia (MTZ y ABZ) y los compuestos derivados del bencimidazol contra la cepa WB de *Giardia lamblia* resistente al MTZ:

METRONIDAZOL

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	8.40	8.00	3.640
2	0.01	19.00	19.00	4.130
3	0.05	27.40	27.40	4.400
4	0.1	35.50	35.50	4.630
5	0.5	45.20	45.20	4.880

DL₅₀ = 0.631 µg/mL
INTERVALO DE CONFIANZA: 0.630 – 0.632
DL₉₀ = 135.394 µg/mL

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	8.20	8.20	3.630
2	0.01	19.10	19.10	4.130
3	0.05	26.80	26.80	4.380
4	0.1	36.50	36.50	4.660
5	0.5	44.70	44.70	4.870

DL₅₀ = 0.638 µg/mL
INTERVALO DE CONFIANZA: 0.636 – 0.640
DL₉₀ = 139.733 µg/mL

DOSIS	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	8.40	8.40	3.630
2	0.01	17.80	17.80	4.100
3	0.05	27.60	27.60	4.410
4	0.1	35.40	35.40	4.630
5	0.5	44.80	44.80	4.870

$DL_{50} = 0.631 \mu\text{g/mL}$
 INTERVALO DE CONFIANZA: 0.629 – 0.633
 $DL_{90} = 123.709 \mu\text{g/mL}$

ALBENDAZOL

DOSIS	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	24.70	24.70	4.330
2	0.01	52.50	52.50	5.070
3	0.05	61.60	61.60	5.290
4	0.1	71.30	71.30	5.560
5	0.5	82.50	82.50	5.930

$DL_{50} = 0.019 \mu\text{g/mL}$
 INTERVALO DE CONFIANZA: 0.019
 $DL_{90} = 0.498 \mu\text{g/mL}$

DOSIS	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	23.90	23.90	4.310
2	0.01	51.90	51.90	5.050
3	0.05	63.90	63.90	5.350
4	0.1	74.20	74.20	5.640
5	0.5	82.90	82.90	5.950

$DL_{50} = 0.018 \mu\text{g/mL}$
 INTERVALO DE CONFIANZA: 0.018
 $DL_{90} = 0.43 \mu\text{g/mL}$

DOSIS	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
-------	---------------------------------------	---------------------	-------------------------	----------------------

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

1	0.005	22.10	22.10	4.240
2	0.01	51.90	51.90	5.060
3	0.05	63.90	63.90	5.350
4	0.1	76.80	76.80	5.730
5	0.5	89.10	89.10	6.230

DL₅₀ = 0.018 µg/mL
INTERVALO DE CONFIANZA: 0.018
DL₉₀ = 0.476 µg/mL

LGI-3

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	11.50	11.50	3.810
2	0.01	22.70	22.70	4.260
3	0.05	31.20	31.20	4.510
4	0.1	42.70	42.70	4.820
5	0.5	55.90	55.90	5.150

DL₅₀ = 0.252 µg/mL
INTERVALO DE CONFIANZA: 0.251-0.253
DL₉₀ = 30.789 µg/mL

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	9.20	9.20	3.680
2	0.01	22.00	22.00	4.250
3	0.05	32.00	32.00	4.530
4	0.1	40.40	40.40	4.760
5	0.5	56.00	56.00	5.150

DL₅₀ = 0.261 µg/mL
INTERVALO DE CONFIANZA: 0.260-0.262
DL₉₀ = 25.829 µg/mL

DOSIS	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	11.10	11.10	3.790
2	0.01	22.90	22.90	4.270
3	0.05	32.90	32.90	4.560
4	0.1	44.30	44.30	4.860
5	0.5	53.90	53.90	5.100

$DL_{50} = 0.257 \mu\text{g/mL}$
 INTERVALO DE CONFIANZA: 0.256-0.258
 $DL_{90} = 34.93 \mu\text{g/mL}$

LGI-4

DOSIS	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	8.00	8.00	3.600
2	0.01	17.00	17.00	4.060
3	0.05	26.30	26.30	4.370
4	0.1	39.30	39.30	4.730
5	0.5	50.70	50.70	5.020

$DL_{50} = 0.376 \mu\text{g/mL}$
 INTERVALO DE CONFIANZA: 0.375-0.377
 $DL_{90} = 32.991 \mu\text{g/mL}$

DOSIS	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	8.60	8.60	3.640
2	0.01	17.80	17.80	4.100
3	0.05	27.70	27.70	4.410
4	0.1	38.90	38.90	4.720
5	0.5	50.50	50.50	5.010

$DL_{50} = 0.38 \mu\text{g/mL}$
 INTERVALO DE CONFIANZA: 0.379-0.381
 $DL_{90} = 39.555 \mu\text{g/mL}$

DOSIS	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	8.10	8.10	3.620
2	0.01	18.10	18.10	4.090
3	0.05	27.30	27.30	4.400
4	0.1	38.50	38.50	4.710
5	0.5	50.80	50.80	5.020

$DL_{50} = 0.383\mu\text{g}/\text{mL}$
 INTERVALO DE CONFIANZA: 0.382-0.384
 $DL_{90} = 38.23\mu\text{g}/\text{mL}$

LGI-5

DOSIS	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	14.80	14.80	3.960
2	0.01	25.80	25.80	4.360
3	0.05	36.10	36.10	4.650
4	0.1	45.20	45.20	4.880
5	0.5	55.80	55.80	5.150

$DL_{50} = 0.215\mu\text{g}/\text{mL}$
 INTERVALO DE CONFIANZA: 0.214-0.216
 $DL_{90} = 45.52\mu\text{g}/\text{mL}$

DOSIS	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	14.10	14.10	3.940
2	0.01	26.50	26.50	4.380
3	0.05	36.40	36.40	4.650
4	0.1	46.60	46.60	4.920
5	0.5	55.50	55.50	5.140

$DL_{50} = 0.21\mu\text{g}/\text{mL}$
 INTERVALO DE CONFIANZA: 0.209-0.21
 $DL_{90} = 45.061\mu\text{g}/\text{mL}$

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

DOSIS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	MORTALIDAD BRUTA	MORTALIDAD CORREGIDA	PROBIT CALCULADOS
1	0.005	15.00	15.00	3.970
2	0.01	25.70	25.70	4.350
3	0.05	36.70	36.70	4.660
4	0.1	44.30	44.30	4.860
5	0.5	57.00	57.00	5.180

DL₅₀ = 0.209 µg/mL

INTERVALO DE CONFIANZA: 0.208-0.21

DL₉₀ = 42.55 µg/mL

BIBLIOGRAFÍA

- Abboud P., Lemée V, Gargala G., cols. Successful Treatment of Metronidazole and Albendazole Resistant Giardiasis with Nitazoxanide in a Patient with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Clinical Infectious Diseases*. 2001; 32: 1792-1794.

- Arguello R., Cruz-Soto M., Romero L., cols. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004; 54(4): 711-719.

- Boletín de Vigilancia Epidemiológica, 2010.

http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd_boletin.html

- Buret A. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut Online*.

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

doi:10.1136/gut.2006.107771. 2006; 56: 316-317.

- Busatti H., Santos J., cols. The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: Where are we? *Biologics*. 2009; 3: 273-283.

- Cedillo R. y Muñoz O. In vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J. Med. Microb.* 1992; 37:221-223.

- Chavez B., Cedillo R. *Giardia lamblia*: Ultrastructural Study of the In Vitro Effect of Benzimidazoles. *J. Protozool.* 1992; 39(4): 310-314.

- Diaz E., Mondragon J., Ramirez E., cols. Epidemiology and Control of Intestinal Parasites with Nitazoxanide in children in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 68(4): 384-385.

- Díaz M., Ballesteros M., cols. Impacto de la dieta sobre la inducción de infección con quistes de *Giardia lamblia* en ratas Sprague-Dawley. *Salud Pública de México*. 2002; 44(4): 315-320.

- Duke T. and Kelly J. Review. Evidence behind the WHO Guidelines: Hospital Care for Children: What is the most appropriate treatment for giardiasis. 2006; 52: 1-2.

- Dunn L., Burgess A., cols. A new generation 5-nitroimidazole can induce highly metronidazole-resistant *Giardia lamblia* in vitro. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 36(1): 37-40.

- Esposito M., Stettler R., cols. In Vitro Efficacies of Nitazoxanide and Other Thiazolides against *Neospora caninum* Tachyzoites Reveal Antiparasitic Activity Independent of the Nitro Group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005; 49(9): 3715-3722.

- Hagen K., Hirakawa M., cols. Novel Structural Components of the Ventral Disc and

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

Lateral Crest in *Giardia intestinalis*. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5(12): 1-12.

- Lemée V., Zaharia I., cols. Metronidazole and Albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2000; 46: 819-821.

- Leitsch D., Burgess A., cols. Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase and thioredoxin reductase are involved in 5-nitroimidazole activation while flavin metabolism is linked to 5-nitroimidazole resistance in *Giardia lamblia*. J Antimicrob Chemother. doi:10.1093/jac/dkr192. 2011; 66 (8): 1756-1764.

- Méndez Cuesta Carlos. Evaluación de sintetizados derivados bencimidazólicos. Tesis de Licenciatura, UNAM Facultad de Química; 2005.

- Muller J., Ruhle G., cols. In Vitro Effects of Thiazolides on *Giardia lamblia* WB Clone C6. Cultured Axenically and in Coculture with Caco2 Cells. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. doi:10.1128/AAC.50.1. .2006; 50(1): 162-167.

- Muller J., Sterk M., cols. Characterization of *Giardia lamblia* WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2007; 60: 280-286.

- Muller J., Wastling J., cols. A Novel *Giardia lamblia* Nitroreductase, GINR1, Interacts with Nitazoxanide and Other Thiazolides. Antimicrobial Agents and Cheotherapy. 2007; 51(6): 1979-1985.

- Paniagua G., Monroy E., cols. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2007; 6(17): 3-9.

- Pérez Bautista Araceli. Tesis: Evaluación de la actividad giardicida de compuestos derivados bencimidazólicos en un modelo murino. Instituto Politécnico Nacional. 2008.

QFB. JOSUÉ D. BRAVO MARTÍNEZ

- Quihui L., Valencia M., cols. Role of the employment status and education of mothers in the prevalence of intestinal parasitic infections in Mexican rural schoolchildren. *BioMed Central*. 2006; 225 (6): 2-6.
- Robinson M., McFerran N., cols. A possible model of benzimidazole binding to β -tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *ELSEVIER*. 2004; doi:10.1016/j.jmglm.2004.08.001. 275-283.
- Rodney, A. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Rev.* 2001; 14 (3): 447-468.
- Rossignol J., López N., cols. Nitazoxanide for the empiric treatment of pediatric infectious diarrhea. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012; 106(3):167-172
- Sadjjadi S., Alborzi A., cols. Comparative clinical trial of mebendazole and metronidazole in giardiasis of children. *J Trop Pediatr.* 2001; 47(3): 176-178.
- Savioli L., Smith H., cols. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the Neglected Diseases Initiative. *Trends Parasitol.* 2006; 22(5): 203-207.
- Simone C., Una R. Review, Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular & Biochemical Parasitology.* doi:10.1016/j.molbiopara.2008.04.006. 2008; 160: 75-79
- Solaymani S., Genkinger J., cols. A Meta-analysis of the Effectiveness of Albendazole Compared with Metronidazole as Treatments for Infections with *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4(5): 1-8.
- Tejman N., Eckmann L. New approaches to the treatment of giardiasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2011; 24(5): 451-455.

- Tejman N., Millman M., cols. Impaired Parasite Attachment as Fitness Cost of Metronidazole Resistance in *Giardia lamblia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55 (10): 4643-4650.

- Troeger H., Epple J., cols. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut Online.* doi:10.1136/gut.2006.100198. 2006; 56: 328-334.

- Upcroft P., Upcroft J. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. *Clinical Microbiology Reviews.* 2001; 14(1): 150-159.

- Vahab A., Tomoyoshi N. Current Therapeutics, Their Problems, and Sulfur-Containing-Amino-Acid Metabolism as a Novel Target against Infections by “Amitochondriate” Protozoan Parasites. *Clinical Microbiology Rev.* 2007; 20(1): 164–180.

- Valdez J., Cedillo R., cols. Synthesis and Antiparasitic Activity of 1H-Benzimidazole Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2002; 12: 2222-2223.

- Vesly J., Peterson L. The management of Giardiasis. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999; 13: 843-848.

- White, A. NITAZOXANIDE: An important advance in anti-parasitic therapy. *Infectious Diseases Section, Department of Medicine, Baylor College of Medicine, Houston, Texas. Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 68(4): 382-383.