



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Evaluación in vitro de la actividad giardicida de
un derivado del 2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol
y exploración de su posible biotransformación por
los trofozoítos de *Giardia intestinalis* mediante
Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
(CLAR)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

VANESSA VILLEGAS RUIZ



MÉXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2005

m343200



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

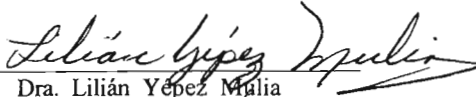
JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE Q.F.B Abel Gutiérrez Ramos
VOCAL M. en C. Alfonso Sebastián Lira Rocha
SECRETARIO Dra. Lilián Yépez Mulia
1er. SUPLENTE Dra. Elena Guadalupe Ramírez López
2er. SUPLENTE Q.F.B. José Cordero Hernández


Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Parasitología, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS y en el Laboratorio 122, Departamento de Farmacia, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.


ASESOR


Dra. Lilián Yépez Mulia

SUPERVISOR TÉCNICO


Dr. Francisco Hernández Luis

SUSTENTANTE


Villegas Ruiz Vanessa

DEDICATORIAS

A mis padres, por ser el latido de mi corazón que me permite seguir adelante. Gracias por darme la vida y dejarme volar.

A mi hermana, por brindarme su mano y protección en los momentos más difíciles. A toda mi familia por hacerme crecer día a día como persona y brindarme su confianza y cariño.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de realizar mis estudios y darme el privilegio de ser universitaria y sentir el orgullo azul y oro.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por la beca otorgada a través del proyecto PAPIIT IN203101 para la realización de esta tesis de licenciatura así como por la compra de materiales y reactivos utilizados en la misma.

A todos mis compañeros y amigos de laboratorio de Parasitología, Amparito, Rosita, Nancy, Lety, José, Julio, Migue, Lalo, Clau, Ale, Chucho y al resto de la unidad por permitirme ser parte de una entidad aglutinada de alegría, cariño y apoyo. Muchas gracias por cada uno de sus consejos y apoyo que han formado parte de mi vida.

A todos mis compañeros y amigos del ruidoso laboratorio 122, Betty, Poncho, Carlos, Toño, Gres, Israel, Fabián, Vilchis, Lalo, Sergio, Víctor, Paty y Nayeli por tenderme la mano y ofrecerme sus conocimientos y sobretodo su amistad.

A la Dra. Lilián por enseñarme un poco de su gran tenacidad, sus conocimientos y sobretodo a exigir más de mí. Gracias por su confianza, por su tiempo e impulsarme a la investigación y ser mejor cada día.

Al Dr. Francisco por su gran confianza, paciencia, sus conocimientos, sus consejos para mi desarrollo profesional y personal. Gracias por ser como una brújula en mi vida que me guía a ser un ejemplo a seguir y sobretodo por su preocupación y gran cariño.

Al Dr. Castillo por abrirme por vez primera las puertas del 122 y hacerme sentir como en casa, por su gran sencillez, su gran chispa que alegra el día, por sus consejos académicos y personales y permitirme conocer a un gran y maravilloso hombre. Gracias.

A la M. en C. Alicia por su confianza, sus consejos académicos y personales, por sus charlas y su gran humor. Gracias.

Índice	
Abreviaturas	vi
Introducción	1
1. Antecedentes	3
1.1. <i>Giardia intestinalis</i> como agente parasitario	3
1.1.1. Epidemiología de la giardiasis	3
1.1.2. Taxonomía de <i>Giardia intestinalis</i>	4
1.1.3. Morfología	5
1.1.4. Ciclo biológico	6
1.1.5. Patogenia	7
1.1.6. Manifestaciones clínica	7
1.1.7. <i>Giardia</i> , un parásito reductor	8
1.1.8. Tratamiento	8
1.2. Bencimidazoles como agentes giardicidas	10
1.2.1. Mecanismo de acción de bencimidazoles	11
1.2.2. Bencimidazoles giardicidas	11
1.2.3. Derivados del 2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol	13
2. Planteamiento del problema	15
3. Hipótesis	16
4. Objetivos	17
4.1. Objetivos Generales	17
4.2. Objetivos Particulares	17
5. Procedimiento experimental	18
5.1. Determinación <i>in vitro</i> de la CI_{50} y CI_{90} del ML-CO y MLA-OH contra trofozoítos de <i>G. intestinalis</i> por el método de subcultivo	18
5.1.1. Parásitos y cultivo axénico de <i>Giardia intestinalis</i>	18
5.1.2. Curva de crecimiento de 50×10^3 y 20×10^6 trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	18
5.1.3. Método de subcultivo	19

5.2. Obtención de lisado de trofozoítos de <i>G. intestinalis</i> tratados con MLA-CO y MLA-OH	20
5.3. Desarrollo del método analítico para la cuantificación del MLA-CO y MLA-OH por CLAR	21
6. Resultados y discusiones	24
6.1. Determinación <i>in vitro</i> de la CI ₅₀ y CI ₉₀ del ML-CO y MLA-OH contra trofozoítos de <i>G. intestinalis</i> por el método de subcultivo	24
6.1.1. Curva de crecimiento de 50 x 10 ³ y 20 x 10 ⁶ trofozoítos <i>G. intestinalis</i>	24
6.1.2. Actividad giardicida del MLA-CO y MLA-OH contra <i>G. intestinalis</i>	25
6.2. Cuantificación del MLA-CO y MLA-OH en fluido de trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	28
7. Conclusiones	35
Bibliografía	36
Anexo 1. Desarrollo del procedimiento experimental	40
Anexo 2. Tablas y cromatogramas	49

Índice de Figuras

Figura 1. Datos epidemiológicos mensuales	3
Figura 2. Datos epidemiológicos por edades	3
Figura 3. Formas de transmisión de <i>G. intestinalis</i>	4
Figura 4. Trofozoíto y quiste de <i>G. intestinalis</i>	5
Figura 5. Ciclo de vida de <i>G. intestinalis</i>	6
Figura 6. Estructura de fármacos utilizados en el tratamiento de la giardiasis	9
Figura 7. Activación del grupo nitro de los 5-nitroimidazoles	9
Figura 8. Estructura del Tiabendazol y su metabolito inactivo	10
Figura 9. Estructura del Albendazol y Mebendazol	10
Figura 10. Puentes de hidrógeno intramoleculares en derivados del bencimidazol 2-carbamato de metilo	12
Figura 11. Derivados del 2-(trifluorometil)bencimidazol con diferentes actividades biológicas	15
Figura 12. Comportamiento de crecimiento de 50×10^3 trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	24
Figura 13. Comportamiento de crecimiento de 20×10^6 trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	25
Figura 14. Coeficiente de potencia contra <i>G. intestinalis</i> , de cada uno de los compuestos en relación al Mtz	26
Figura 15. Coeficiente de potencia contra <i>G. intestinalis</i> , de cada uno de los compuestos en relación al Abz	26
Figura 16. Efectividad comparada del MLA-CO y MLA-OH representada con el inverso de la CI_{50}	27
Figura 17. Curva 1 de calibración del MLA-CO	51
Figura 18. Curva 2 de calibración del MLA-CO	51
Figura 19. Curva de calibración del MLA-OH	51
Figura 20. Espectro del MLA-CO	53
Figura 21. Espectro del MLA-OH	53

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>G. intestinalis</i>	4
Tabla 2. Síntomas frecuentes en giardiasis	7
Tabla 3. Susceptibilidad de <i>G. intestinalis</i>	11
Tabla 4. Propiedades físicas y químicas del tracto gastrointestinal	12
Tabla 5. Derivados del 2-(trifluorometil)bencimidazol con actividad giardicida	14
Tabla 6. Concentración inhibitoria del MLA-CO y MLA-OH contra trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	25
Tabla 7. Parámetros cromatográficos del MLACO y MLA-OH	28
Tabla 8. Linearidad del método	29
Tabla 9. Determinación del MLA-OH en lavados y fluido	30
Tabla 10. Análisis global del MLA-OH presente en los lavados y fluido	31
Tabla 11. Determinación del MLA-CO en lavados y fluido	32
Tabla 12. Determinación del MLA-OH en trofozoítos tratados con MLA-CO	32
Tabla 13. Análisis global del MLA-CO presente en lavados y fluido	33
Tabla 14-18. Anexo 1. Desarrollo del procedimiento experimental	43
Tabla 19-42. Anexo 2. Tablas de datos y cromatogramas	49

Índice de Diagramas

Diagrama 1. Parásitos y cultivo axénico de trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	18
Diagrama 2. Curva de crecimiento de 50×10^3 y 20×10^6 trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	19
Diagrama 3. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad giardicida del MLA-CO y MLA-OH contra trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	20
Diagrama 4. Obtención de lisado de trofozoítos de <i>G. intestinalis</i> tratados con MLA-CO y MLA-OH	22
Diagrama 5. Desarrollo del método analítico para la cuantificación de MLA-CO y MLA-OH	23
Diagrama 6. Diluciones de Abz, Mtz, MLA-CO y MLA-OH	44
Diagrama 7. Muestras de Sn de lavados	46

Índice de Cromatogramas

Cromatograma 1. MLA-CO en ACN	28
Cromatograma 2. MLA-OH en ACN	28
Cromatograma 3. Fluido de trofozoitos de <i>G. intestinalis</i> libre de compuesto	29
Cromatograma 4. MLA-OH en fluido de <i>G. intestinalis</i>	31
Cromatograma 5. Fluido de trofozoitos tratados con MLA-CO	33
Cromatograma 6- 24 Tablas y cromatogramas	52

Abreviaturas

t	Tiempo
tr	Tiempo de retención
μ M	Micromolar
M	Molaridad
v/v	volumen/volumen
T.A	Temperatura ambiente
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
M	Medio
L1	Lavado 1
L2	Lavado 2
L3	Lavado 3
Sn	Sobrenadante
P.C	Paquete celular
Abz	Albendazol
Mtz	Metronidazol
DMSO	Dimetil sulfóxido
ATC	Ácido Tricloroacético
ACN	Acetonitrilo
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
CI ₉₀	Concentración Inhibitoria 90
MLA-CO	1-[2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-il]etanona
MLA-OH	1-[2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-il]etanol
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
X	Promedio
d.e	Desviación estándar
%CV	Porcentaje de coeficiente de variación
FDA	Food and Drug Administration
NADH	Dinucleótido de niacina-adenina reducido
NAD ⁺	Dinucleótido de niacina-adenida oxidado

Introducción

Las enfermedades parasitarias representan uno de los principales problemas de salud por su alta tasa de prevalencia y amplia distribución a nivel mundial. De acuerdo a estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 3,500 millones de personas son afectadas por este tipo de enfermedades, siendo los niños la población más vulnerable. Entre las enfermedades parasitarias se encuentra la giardiasis, causada por el protozooario *Giardia intestinalis*. A nivel mundial, se estima que 200 millones de personas la padecen (WHO, 2004), con una incidencia de 20-30% en países en vías de desarrollo y 2-5% en países industrializados, agudizándose en regiones tropicales y subtropicales con condiciones de higiene y alimentación precarias (Farthing, 1994).

En México, la giardiasis ocupa el segundo lugar de las protozoosis de mayor incidencia después de la amibiasis. En el 2003, la Secretaría de Salud y Asistencia (SSA) reportó 53,193 casos de giardiasis, con la mayor incidencia en el mes de julio con 6,281 casos en su mayoría en estados con climas cálidos y templados como Veracruz, Sonora y el Distrito Federal.

La giardiasis afecta al intestino delgado al nivel de duodeno y yeyuno provocando diarrea, mala absorción y pérdida de peso, entre otros síntomas. Su mecanismo de transmisión es por la ingestión de quistes de *G. intestinalis* presentes en alimentos y/o agua contaminada o por vía fecal-oral, siendo el quiste la forma infectante y el trofozoito la forma parasitaria.

El tratamiento de elección para la giardiasis es el Metronidazol, un derivado del 5-nitroimidazol del que se han reportado efectos adversos como reacciones de hipersensibilidad, vómito, vértigo, dolor abdominal y ha demostrado ser mutagénico en bacterias y carcinogénico en roedores. Además, hay evidencias de falla terapéutica, probablemente debido por un lado a la supresión del tratamiento ocasionado por los efectos secundarios y por otro lado, a la presencia de resistencia al Metronidazol.

En la actualidad, una de las alternativas para el control de la giardiasis incluyen los derivados bencimidazólicos como el Albendazol y Mebendazol. Se tiene el conocimiento de que estos fármacos inhiben la polimerización de la tubulina que forma parte de los microtúbulos, desencadenando una serie de eventos bioquímicos que traen como consecuencia la muerte del parásito. Sin embargo, estos compuestos presentan una baja solubilidad acuosa, lo que disminuye su eficiencia terapéutica.

La molécula del bencimidazol se ha considerado como fuente generadora de nuevos fármacos por ser un heterociclo susceptible a modificaciones químicas que dan lugar a nuevos compuestos con características fisicoquímicas y actividad antiparasitaria diferentes. Con la finalidad de disponer de fármacos alternativos en el tratamiento de la giardiasis que sean específicos, eficientes, seguros y de bajo costo en la terapia humana, se han sintetizado nuevos derivados del 2-(trifluorometil)bencimidazol con actividad contra los trofozoítos de *G. intestinalis*. A partir de los cuales se ha continuado con el trabajo de diseño y síntesis de nuevos derivados del 2-(trifluorometil)bencimidazol con diferentes sustituyentes para aportar información sobre los requerimientos estructurales para su actividad giardicida así como su posible mecanismo de acción,

que hasta el momento se sabe que es diferente a los bencimidazol 2-carbamato de metilo (Albendazol y Mebendazol).

En este trabajo, se describe la evaluación de la actividad giardicida de un derivado del 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol contra trofozoítos de *G. intestinalis* empleando el método de subcultivo. Además, se analizará por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) sí los trofozoítos tienen la capacidad de biotransformar a este derivado mediante la reducción de su grupo carbonilo.

1. Antecedentes

En este apartado se encuentra la información referencial del presente trabajo de tesis. La información está dividida en dos secciones principales: la primera contiene los aspectos relevantes de *Giardia intestinalis* como agente causal de la giardiasis; y en la segunda se encuentran generalidades sobre los bencimidazoles y la exploración de su actividad giardicida.

1.1 *Giardia intestinalis* como agente parasitario

1.1.1 Epidemiología de la giardiasis

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se ha estimado que 3, 500 millones de personas padecen una enfermedad parasitaria, de las cuales 200 millones de éstas presentan giardiasis (WHO, 2004)

La giardiasis es causada por el protozooario *Giardia intestinalis* (sinónimo de *G. lamblia*, *G. duodenalis*) que representa un problema de salud pública en países en vías de desarrollo con una incidencia del 20-30% y en países industrializados del 2-5% (Farthing, 1994)

En México, la Secretaría de Salud y Asistencia (SSA) informó en el año 2003, que las protozoosis de mayor incidencia eran la amibiasis intestinal y la giardiasis, con 1,013,55 y 53,193 casos, respectivamente. De ésta última, en el mes de julio se registró el mayor número de casos (Figura 1). Por tal motivo, en nuestro país, la giardiasis ha adquirido el segundo lugar en importancia dentro de las enfermedades infecto-parasitarias (Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica, 2003).

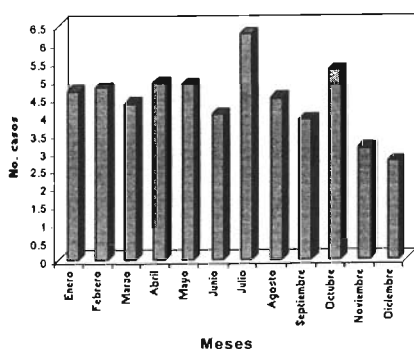


Figura 1. Datos epidemiológicos mensuales

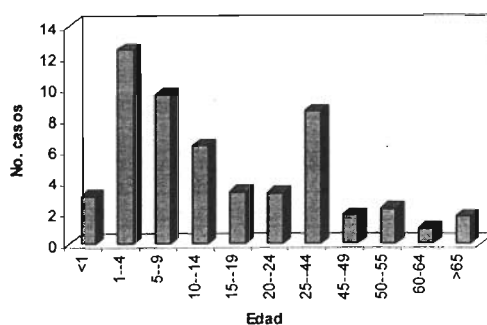


Figura 2. Datos epidemiológicos por edades

De acuerdo a datos epidemiológicos, los grupos de lactantes, preescolares y escolares son la población más vulnerable, sin importar el sexo de los mismos (Figura 2). Los estados de México, Sonora, Veracruz y el Distrito Federal, por tener climas cálidos y templados, son los de mayor incidencia de giardiasis; 54% de los casos según reportes de la SSA.

El reservorio de este parásito es el ser humano. Los mecanismos de transmisión son (Figura 3):

- a) ingestión de quistes en el agua y comida contaminada, vía fecal-oral.
- b) prácticas sexuales, vía oral- anal.
- c) contacto con animales.

Algunos animales son hospederos y portadores de *Giardia sp.*, la cual es morfológica, genotípica y fenotípicamente indistinguibles de los aislados del humano (Erlandsen, 1994; Thompson, 2000).

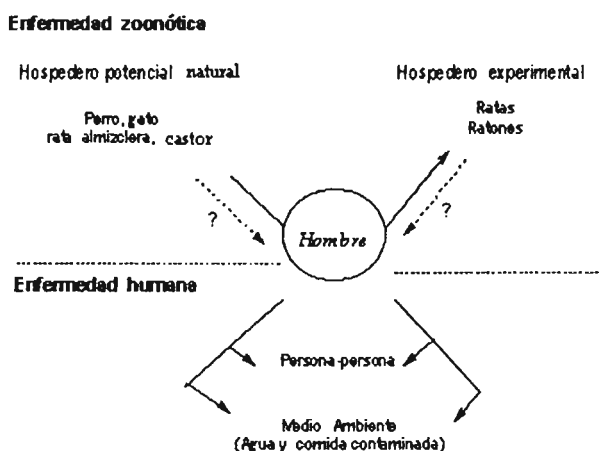


Figura 3. Formas de transmisión de *G. intestinalis* (Erlandsen, 1994; Thompson, 2000).

A continuación se describen de forma breve y precisa las características más relevantes sobre este protozooario, así como los aspectos más significativos de la enfermedad que produce y de su terapéutica hoy en día.

1.1.2. Taxonomía de *Giardia intestinalis*

De acuerdo a la clasificación más reciente (Tabla 1), *Giardia* es un protozooario que forma parte del reino Protista, se encuentra dentro del subreino Protozoa, en el phylum Sarcocistidophora (locomoción por flagelos, pseudópodos o ambos), subphylum Mastigófora (locomoción por flagelos), clase Zoomastigófora (cloroplastos ausentes) y orden Diplomonadida (organelos duplicados con simetría bilateral con dos núcleos y seis a ocho flagelos) (Marquardt et al., 2000).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *G. intestinalis*

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophora
Orden	Diplomonadida
Subclase	Diplomonadida
Familia	Hexamitidae
Género	Giardia
Especie	intestinalis

1.1.3. Morfología

G. intestinalis existe en dos formas, vegetativa o parasitaria y quiste o infectante. La primera corresponde al trofozoíto que se encuentra adherido a la mucosa intestinal a nivel de duodeno y yeyuno; la segunda corresponde al quiste que es resistente a condiciones ambientales adversas y que se encuentra en agua y alimentos contaminados.

El **trofozoíto** (Figura 4), es periforme, con extremo anterior ancho y exterior delgado, que visto de frente tiene forma de pera y visto de lado semeja a una cuchara. Tiene simetría bilateral, mide 10-20 μm de largo y 5-15 μm de ancho, y en la parte anterior posee dos núcleos que contienen cinco cromosomas cada uno. Su citoesqueleto consiste en cuerpos medios, flagelos y un disco ventral que ocupa $\frac{1}{2}$ o $\frac{3}{4}$ partes del cuerpo. El disco esta constituido por tubulina, giardinas y otras proteínas contráctiles como actina, miosina y trompomiosina, además esta estructura es de importancia en la adhesión de las células epiteliales. Sobre éste, existe una parte rígida llamada axostilio, sobre el cual se encuentran los cuerpos medios que semejan la boca. Tiene vacuolas en el citoplasma, que contiene variedad de hidrolasas (fosfatas ácida, DNAsa, RNAasa y proteasa) y cuatro pares de flagelos, que son dos anteriores, dos posteriores, dos ventrales y dos caudales que le permiten al trofozoíto capacidad de translación de movimiento lento, vibratorio y rotatorio (Shore, 2001).

El **quiste** (Figura 4) es una estructura ovalada o elipsoide de aproximadamente 10-20 μm de ancho, tiene en el interior cuatro núcleos, cuerpos medios, restos de flagelos, y su capacidad de resistencia se debe a su pared quística constituida por galactosa y quitina (Adam, 1991). Se requiere la ingesta de más de 100 quistes para asegurar la infección en el humano; sin embargo, se ha visto que la infección en voluntarios requiere menos de 10 quistes (Wolfe, 1992, Thompson, 2000).

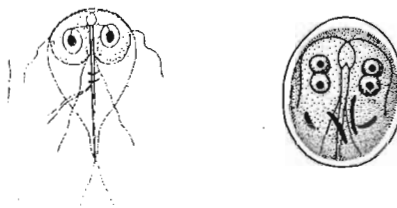


Figura 4. Trofozoíto y quiste de *Giardia intestinalis* (Schmidt et al., 2000)

1.1.4. Ciclo biológico

La infección del hospedero se inicia por la ingestión de quistes por vía oral. El quiste pasa primero por la parte alta del tubo digestivo y a los 2-5 minutos llega al estómago (pH=1.3- 2.7). En este órgano, se inicia el desenquistamiento al reblandecerse la pared del quiste por acción de las proteasas propias de *G. intestinalis* (Botero et al., 1998). Al llegar al duodeno, la pared quística se rompe para dar lugar a una fase intermedia entre el quiste y el trofozoíto, llamado exquistozoíto. Éste, se divide para formar dos trofozoítos con dos núcleos diploides cada uno (Suard, 2003). Estos trofozoítos se fijan a la mucosa del duodeno y yeyuno mediante su disco ventral. Allí, se multiplican por fisión binaria. Después de existir un enorme número de éstos, caen a la luz intestinal, y poco a poco avanzan por el intestino por acción del tránsito intestinal. A medida que se deshidratan y entran en contacto con las sales biliares primarias, se transforman a quistes por el proceso conocido como enquistación. A las 5 h aparecen los primeros antígenos específicos de enquistamiento, CWP-1, CWP-2, ricos en leucina. A la 24 h, ya están presentes cuatro antígenos de enquistamiento de alto peso molecular (66 a 103 kDa). A las 44-70 h, la transformación del quiste es completa. Los quistes tetranucleados con pared celular son eliminados en las heces, permaneciendo viables en el suelo húmedo o en aguas por varios meses, repitiéndose el ciclo (Figura 5). También pueden salir algunos trofozoítos arrastrados por el tránsito intestinal acelerado, que al no tener el tiempo suficiente para transformarse en quistes se desintegran por la ausencia de estructuras de resistencia (Adam, 1991; Meyer, 1994; Marquardt et al., 2000; Adam, 2001).

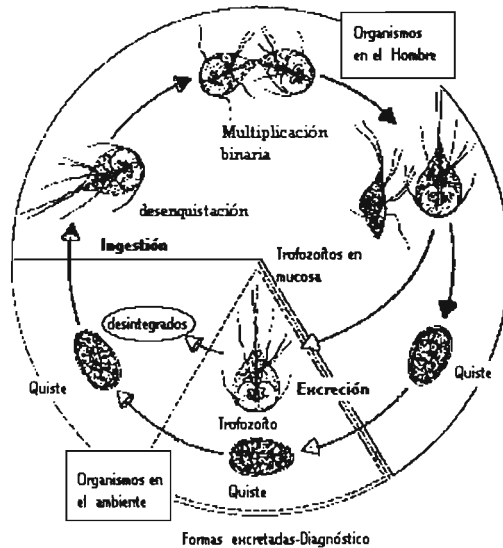


Figura 5. Ciclo de vida de *G. intestinalis* (Meyer, 1994)

1.1.5. Patogenia

El mecanismo patogénico por el cual *G. intestinalis* causa la giardiasis es multifactorial e implica tanto al parásito como al hospedero (Thompson, 2000).

La adhesión de los trofozoítos de *G. intestinalis* a la superficie de los enterocitos es debida por un lado, a la secreción de proteasas producidas por las células epiteliales, y por otro lado, a la producción de una proteína rica en cisteína, CRP 13 propia del flagelado. Esta proteína representa la primera evidencia de toxina potencial, que induce la liberación de moco y recluta a las células cebadas. De esta manera se origina una barrera de trofozoítos que inducen alteraciones en los enterocitos. Estas alteraciones son: pérdida o disminución de las disacaridasas (lactasa, maltasa), disminución de la absorción de vitamina B₁₂, alteración del transporte de glucosa-sodio, deficiente absorción de D-xilosa y la incidencia de reacciones de hipersensibilidad de tipo alérgica. (Farthing, 1994; Botero et al, 1998; Cabello, 1998; Shore, 2001;).

1.1.6. Manifestaciones clínicas

La sintomatología clínica de la giardiasis muestra gran variabilidad, depende de la respuesta inmunitaria del hospedero, virulencia de la cepa, carga infecciosa y duración de la parasitosis (Alcaraz, 1998). La mayoría de los pacientes infectados con *G. intestinalis* son asintomáticos. Se estima que el 60% cursa de esta manera, aunque la cifra puede modificarse por el grupo de población y el área geográfica (Alcaraz, 1998).

El periodo de incubación en giardiasis sintomática oscila entre 12-20 días. La infección puede evolucionar de forma aguda o crónica. La fase aguda es parecida a una infección entérica, amibiana o disentería bacilar, que se resuelve espontáneamente. Sin embargo, el 25% de los infectados puede persistir con la enfermedad y progresar a una fase crónica (Farthing, 1994).

Tanto para la infección aguda como la crónica, la sintomatología gastrointestinal comprende un amplio espectro de manifestaciones (Tabla 2). En la giardiasis crónica la sintomatología predominante es el malestar abdominal acompañado de dolor epigástrico difuso (Farthing, 1994; Cabello, 1996; Wolfe, 1992).

Tabla 2. Síntomas frecuentes en giardiasis

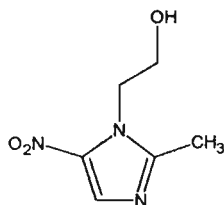
Síntomas	%
Diarrea	63
Déficit de absorción de lactosa	60
Estreñimiento	55
Déficit de absorción de B ₁₂ / fólico	45
Flatulencia	46
Dolor/distensión abdominal	32
Fatiga	28
Anorexia/náuseas	20
Pérdida de peso	18
Vómito	5

1.1.7. *Giardia*, un parásito reductor

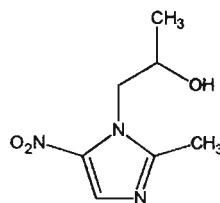
G. intestinalis es un eucarionte que posee núcleo y membrana nuclear, pero a diferencia del resto de los eucariontes no tiene mitocondrias, y por tanto no presenta fosforilación oxidativa, ni retículo endoplásmico (Henze; Martín, 2003). De ahí, que este protozooario sea considerado como un “fósil biológico” que dio lugar a una célula eucarionte (Gillin et al., 1996; Adam, 2001; Tovar et al., 2003). Sin embargo, por análisis de rRNA se han encontrado genes mitocondriales (Gillin et al., 1996). De hecho, en el año 2003, se identificaron dos proteínas mitocondriales IscS y IscU, demostrando que *G. intestinalis* posee en su citoplasma decenas de estructuras pequeñas de doble membrana que carecen de DNA, llamadas mitosomas, lugar en donde se ensamblan proteínas que contienen Fe-S, involucradas en la reducción de moléculas por medio de la transferencia de electrones de un donador como el piruvato-ferredoxin oxidoreductasa (PFOR) a un aceptor de electrones como el NAD^+ . De esta manera, la maduración de las proteínas con Fe-S tiene la función de mantener un balance redox en el metabolismo de organismos sin mitocondrias, como *Giardia*, cuyo proceso es sensible a la presencia de oxígeno (Henze; Martín, 2003; Tovar et al., 2003). No obstante, desde 1991, *Giardia* es considerado como un parásito microaerófilo para la conservación de su energía, donde el balance de los productos finales está fuertemente influenciado por los niveles de oxígeno molecular y glucosa del medio (Lindmark, 1991; Lloyd et al., 2002;).

1.1.8. Tratamiento

Los fármacos usados actualmente en el tratamiento de la giardiasis incluyen a varios heterociclos con un grupo nitro como sustituyente común (Figura 6) (Upcroft y Upcroft, 2001). Algunos de estos heterociclos son los derivados del 5-nitroimidazol, tales como el Metronidazol (Mtz), Tinidazol, Ornidazol y Secnidazol; el primero es el fármaco de elección en el tratamiento de este padecimiento. La actividad antiparasitaria de estos compuestos se debe a la reducción del grupo nitro por una vía metabólica que se encuentra exclusivamente en protozoarios anaerobios, como *G. intestinalis* (Figura 7). Esta reducción la realiza la piruvato-ferredoxin oxidoreductasa (PFOR) que dona un electrón al grupo nitro del 5-nitroimidazol. El nitro anión-radical producido puede formar compuestos citotóxicos, tales como las especies oxidantes reactivas (ROS), que inducen daños al DNA del parásito (Johnson, 1993; Harder et al., 2001). Los 5-nitroimidazoles tienen una serie de efectos adversos que incluyen vómito, vértigo, sabor metálico o amargo, dolor abdominal y gastrointestinal, náuseas y reacciones de hipersensibilidad. Además, son mutagénicos en bacterias y carcinogénicos en ratas aunque esto no se ha comprobado en seres humanos (Gardner; Hill, 2001).



Metronidazol



Secnidazol

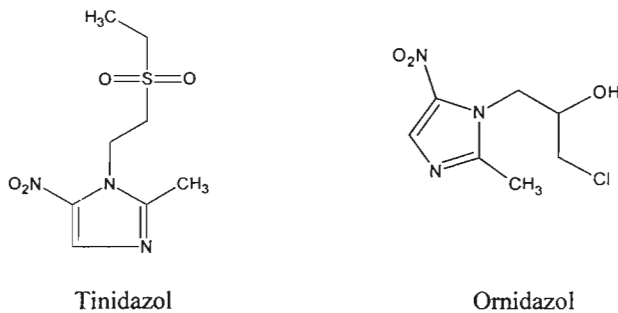


Figura 6. Estructura de fármacos utilizados en el tratamiento de la giardiasis (Upcroft y Upcroft 2001).

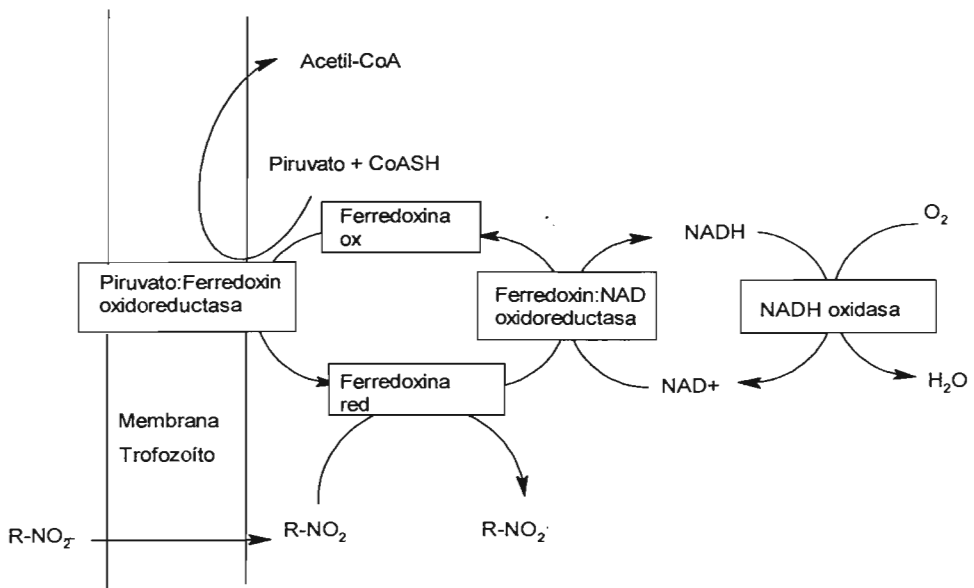


Figura 7. Activación del grupo nitro de los 5-nitroimidazoles (Upcroft y Upcroft, 2001).

La Furozalidona es un derivado del nitrofurano que se activa posiblemente por vía NAD oxidasa (Figura 7), originando productos citotóxicos que dañan al DNA y a otros componentes celulares del parásito. Su formulación en suspensión favorece la administración en niños, sin embargo es menos efectivo que el Mtz. Los efectos adversos que este compuesto presenta son fiebre, náusea, vómito, orina café, dolor gastrointestinal, y es mutagénico en bacterias y ratones, por lo que su uso clínico se ve limitado (Adam, 2001; Garder y Hill, 2001; Shore, 2001).

Otro heterociclo de uso clínico es la Nitazoxanida, un derivado del 5-nitrotiazol que fue descubierto en 1980. Se ha usado como una alternativa al Mtz (Clinton, 2003). Este fármaco fue aprobado recientemente por la Food & Drug Administration (FDA) para el tratamiento de la giardiasis. Su mecanismo de acción implica daño al citoplasma, membrana plasmática y citoesqueleto del trofozoito de *G. intestinalis* (Cedillo et al., 2002). Hasta el momento no se ha informado de efectos adversos presentados por este compuesto.

1.2. Bencimidazoles como agentes giardicidas

El interés por el anillo del bencimidazol como núcleo para el desarrollo de nuevos agentes antiparasitarios surgió en 1961, cuando se descubrió que el 2-(4-tiazolil) bencimidazol (Tiabendazol) presentaba actividad contra helmintos intestinales, aunque tenía la desventaja de biotransformarse rápidamente a un metabolito inactivo, el 5-hidroxitiabendazol (Figura 8). Además, sus efectos adversos como anorexia, náusea, vómito, dolor epigástrico y diarrea, limitaron su uso clínico.

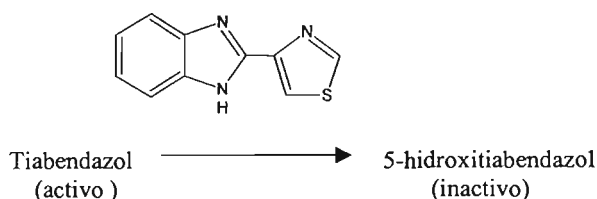


Figura 8. Estructura del Tiabendazol y su metabolito inactivo (Towsend y Wise, 1990)

Esto no impidió abrir las puertas para el diseño y síntesis de nuevos derivados del bencimidazol como posibles agentes antiparasitarios. Entre los derivados importantes se encontraron los bencimidazol-2-carbamatos de metilo, los bencimidazol-2-aminoarilos, y los bencimidazol-2-ureas. Siendo los primeros, los que mejor actividad antihelmíntica presentaron, cuando se sustituyeron en la posición 5. Así fue como surgieron el Albendazol (Abz) y el Mebendazol de uso clínico actual (Figura 9).

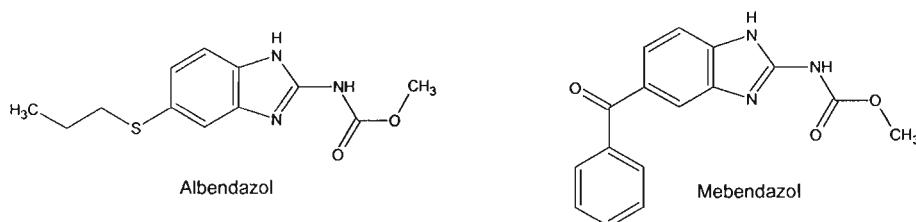


Figura 9. Estructuras del Albendazol y Mebendazol

1.2.1. Mecanismo de acción de los Bencimidazoles

Después de varios estudios, se demostró que los bencimidazol-2-carbamatos de metilo interactuaban con la β -tubulina, una proteína formadora de microtúbulos y constituyente del citoesqueleto del parásito. El bloqueo en la formación de microtúbulos interfiere en las funciones normales de la célula (Lacey, 1990; Lacey y Gill, 1994; Jaroll, 1994). La primera evidencia de que el blanco de estos bencimidazoles era la tubulina, se mostró en *Ascaris suum*, al observarse una inhibición de la polimerización de microtúbulos después de una exposición al Mebendazol. En estudios posteriores se determinó que la asociación [tubulina del parásito-bencimidazol] era estable y la velocidad de disociación fue menor que la [tubulina del mamífero-bencimidazol], lo que reflejó la alta afinidad que presentan estos compuestos por la tubulina del parásito (Lacey y Gill, 1994).

1.2.2. Bencimidazoles giardicidas

Debido a que *G. intestinalis* presenta en su citoesqueleto una distribución predominante de tubulina, se pensó que los bencimidazoles-2-carbamatos de metilo podrían utilizarse como agentes giardicidas (Lacey, 1990; Lacey y Gill, 1994; Campanati et al. 2003).

Con esta intención, se realizaron estudios de susceptibilidad *in vitro* para evaluar la actividad giardicida del Abz y el Mebendazol (Cedillo y Muñoz, 1992). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3. Como puede apreciarse, el Abz es 30 a 50 veces más potente que el Mtz, y 6 a 10 veces más potente que el Mebendazol (Chávez et al., 1992). Por microscopía electrónica se demostró que el Abz a las 3 h indujo efectos dramáticos en la morfología del trofozoíto, a las 24 h disminuyó la viabilidad por fragmentación del disco ventral asociado con depósitos de tubulina precipitada, y a las 36 h, el trofozoíto apareció totalmente destruido (Chávez et al., 1992; Oxberry et al., 1994; Cedillo et al., 2002).

Tabla 3. Susceptibilidad *in vitro* de *G. intestinalis*

Compuesto	CI ₅₀ (µg/mL)	CI ₉₀ (µg/mL)
Albendazol	0.010	0.020
Metronidazol	0.210	1.280
Mebendazol	0.060	0.130

CI₅₀, 50% de concentración inhibitoria, CI₉₀, 90% de concentración inhibitoria

Los estudios *in vitro* no siempre son extrapolables a resultados *in vivo*. A pesar de que el Alb *in vitro* fue más activo que el Metronidazol, *in vivo* su eficacia disminuyó y fue prácticamente similar al Metronidazol. Este comportamiento se atribuyó a varios factores involucrados y que no están presentes en un estudio *in vitro*. De los factores reportado tenemos :

1. Características de la cepa infectante.
2. Características físicas y químicas del fármaco.
3. El tiempo de exposición del parásito con el fármaco.

El primer factor está asociado con las características de la cepa, la cual puede presentar resistencia al fármaco, debido principalmente a un inadecuado uso de éste. El segundo factor, nos indica que una de las principales desventajas de los compuestos bencimidazol 2-carbamatos de metilo (Abz y Mebendazol) es su baja solubilidad acuosa debida a la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares (Figura 10), lo que lleva a una biodisponibilidad baja y en consecuencia a una respuesta terapéutica poco favorable (Lacey y Hill, 1994; López, 2002).

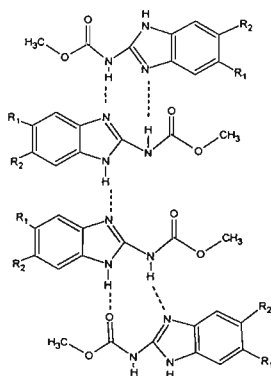


Figura 10. Puentes de hidrógeno intramoleculares bencimidazol 2- carbamatode metilo (López, 2002).

Por último, el tiempo de exposición del parásito al fármaco es un punto crítico *in vivo*. En un ensayos *in vitro*, la determinación de la actividad giardicida se realiza a las 48 h, pero *in vivo*, la permanencia del fármaco a nivel del duodeno y yeyuno es de 2-2.5 h (Tabla 4). Si sabemos de antemano que *G. intestinalis* infecta duodeno y yeyuno, la residencia del contenido intestinal en la cual se encontraría el fármaco al ser menor de 3 h lo pone en desventaja para ejercer su efecto giardicida.

Tabla 4. Propiedades físicas y químicas del tracto gastrointestinal (Balimane et al., 2000)

Segmento gastrointestinal	Área Superficial	Longitud de segmento	t de residencia del contenido intestinal	pH del segmento
Cavidad oral	100 cm ²	----	segundos a minutos	6.5
Esófago	200 cm ²	23-25 cm	segundos	----
Estomago	3.5 m ²	25 cm	1.5 h	1-2
Duodeno	1.9 m ²	35 cm	0.5-0.75 h	4.0-5.5
Yeyuno	184 m ²	280 cm	1.5-2.0 h	5.5-7.0
Ilion	276 m ²	420 cm	5-7 h	7.0-7.5
Colón y recto	1.3 m ²	150 cm	1-60(3 h)	7.0-7.5

t, tiempo

1.2.3. Derivados del 2-(trifluorometil)bencimidazol

La necesidad de diseñar y sintetizar nuevos derivados bencimidazoles con mejores características fisicoquímicas para el tratamiento de la giardiasis llevó al desarrollo de los 2-(trifluorometil)bencimidazoles.

La síntesis de los 2-(trifluorometil)bencimidazoles fue publicada en 1952 (citado en Vilchis, 2004). Se prepararon diferentes derivados que mostraron un amplio espectro de actividad biológica (Figura 11).

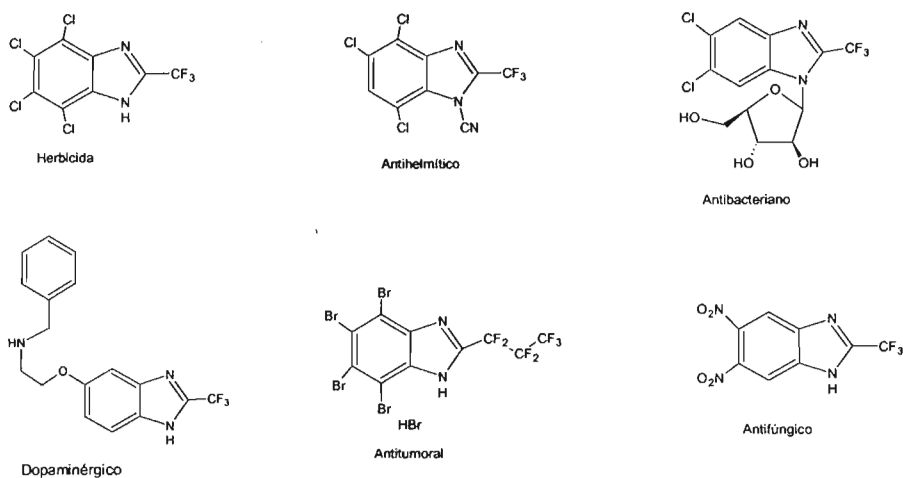
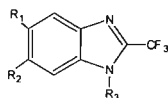


Figura 11. Derivados del 2-(trifluorometil)bencimidazol con diferentes actividades biológicas (Navarrete, 2004).

Recientes investigaciones en nuestro grupo de trabajo y el de otros investigadores, mostraron que algunos derivados del 2-(trifluorometil)bencimidazol presentaron actividad contra *G. intestinalis* (Tabla 5) (Navarrete et al., 2001; Andrzejewska, et al., 2002; Navarrete et al., 2003; Vilchis, 2004).

Tabla 5. Derivados del 2-(trifluorometil)bencimidazol con actividad giardicida



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	CI ₅₀ (μ M)
1 ^a	H	H	H	0.107
2 ^a	Cl	H	H	1.282
3 ^a	Cl	Cl	H	0.078
4 ^a	H	H	CH ₃	0.064
5 ^a	Cl	H	CH ₃	0.042
6 ^a	H	Cl	CH ₃	0.127
7 ^a	Cl	Cl	CH ₃	0.260
8 ^b	Br	Br	H	0.040
9 ^b	NO ₂	NO ₂	H	0.059
10 ^c	COOCH ₃	H	H	1.190
11 ^c	COOCH ₂ CON(CH ₂ CH ₃) ₂	H	CH ₃	0.130
12 ^c	CONHCH ₃	H	CH ₃	0.210
13 ^c	COOH	H	CH ₃	0.330
Albendazol				0.037
Metronidazol				1.220

a, Navarrete, et al., 2003; b, Andrzejewska et al., 2002; c, Vilchis, 2004

Todos los compuestos fueron más activos contra *G. intestinalis* que el Metronidazol. El compuesto 5 fue tan activo como el Abz. Dos aspectos adicionales a resaltar es que estos derivados presentaron mejores características de solubilidad que el Abz y para el caso de los compuestos 1-4, 6,7 no mostraron el mismo comportamiento que el Abz, frente a la tubulina, indicando un mecanismo de acción distinto sobre el parásito (Navarrete et al., 2001; Navarrete et al., 2003).

Por los datos antes mostrados y para darle continuidad a nuestro trabajo de investigación, nuestro grupo decidió explorar el comportamiento de un derivado del 2-(trifluorometil)bencimidazol, que presenta el sustituyente acetilo en la posición 5. La elección de este compuesto se realizó con el interés de conocer su comportamiento antiprotozoario y metabólico frente a *Giardia intestinalis* como organismo microaerófilo.

2. Planteamiento del problema

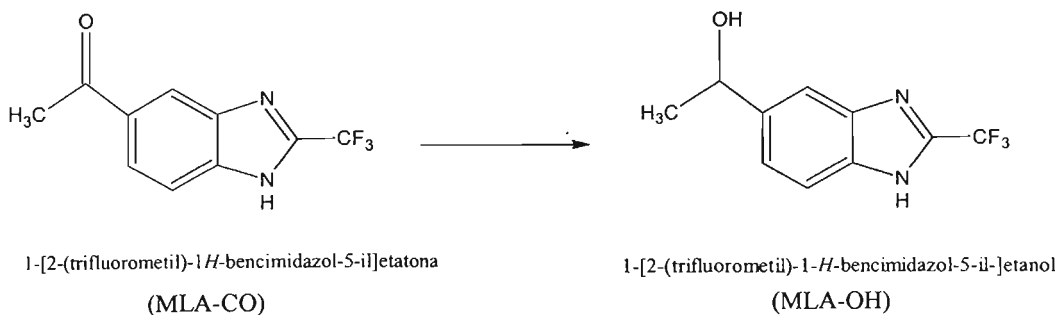
La giardiasis es una parasitosis intestinal que en nuestro país representa un problema de salud pública. Esta enfermedad es causada por el protozoo *Giardia intestinalis*, el cual infecta a nivel de duodeno y yeyuno provocando diarrea, dolor abdominal, pérdida de peso y mala absorción.

En la actualidad el tratamiento quimioterapéutico es una de las mejores alternativas de control de esta parasitosis que involucra una serie de compuestos derivados del 5-nitroimidazol como el Metronidazol y Tinidazol y más recientemente los bencimidazoles, Albendazol y Mebendazol. El tratamiento con los compuestos 5-nitroimidazoles tiene efectos secundarios que llevan al paciente a abandonar el tratamiento. Además, en estudios *in vitro* como *in vivo* se ha demostrado la presencia de parásitos resistentes a estos fármacos. Por otro lado, se ha observado en ensayos *in vivo* que los bencimidazoles no son tan efectivos como *in vitro* por la presencia de varios factores como el estado individual del paciente, características de la cepa infectante, características fisicoquímicas del fármaco (por ejemplo, baja solubilidad) y el tiempo de exposición del parásito al fármaco. Este último factor representa un punto crítico en la actividad giardicida, debido a que la residencia del contenido gastrointestinal al ser menor de 3 h, pone en desventaja al fármaco para ejercer su efecto. Lo anterior pone en evidencia la necesidad del diseño y síntesis de nuevos compuestos con mejores características fisicoquímicas que favorezcan la respuesta terapéutica. Entre los nuevos compuestos con diferente patrón de sustitución se encuentran los derivados del 2-(trifluorometil)bencimidazol, que han mostrado actividad giardicida, y que pueden a través de sus diferentes sustituyentes mejorar su actividad antiprotozoaria, así como sus propiedades fisicoquímicas. No obstante, el tiempo de exposición del parásito al compuesto es un punto crítico.

Considerando que *G. intestinalis* infecta al duodeno y yeyuno, y que es un parásito microaerófilo que preferentemente realiza reacciones de reducción, surge el interés de explorar si los trofozoítos de este protozoo durante un periodo de tres horas de exposición *in vitro*, ¿serán capaces de biotransformar un derivado del 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol que tenga un grupo susceptible de sufrir reducción, afectando su actividad giardicida?

3. Hipótesis

Los trofozoítos de *G. intestinalis* que preferentemente realizan reacciones de reducción, después de ser expuestos al compuesto 1-[2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-il]etanona (MLA-CO) con actividad giardicida por un periodo de 3 h, serán capaces de biotransformarlo a su forma reducida, 1-[2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-il]etanol (MLA-OH) también con actividad giardicida.



4. Objetivos

4.1. Objetivos Generales

- 4.1.1. Determinar la actividad giardicida *in vitro* de 1-[2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-il]etanona (MLA-CO) y 1-[2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-il]etanol (MLA-OH).
- 4.1.2. Explorar la capacidad de *Giardia intestinalis* para reducir al MLA-CO a MLA-OH en estudios *in vitro* por un periodo de exposición de tres horas.

4.2. Objetivos Particulares

- 4.2.1. Determinar *in vitro* la CI_{50} y CI_{90} del MLA-CO y MLA-OH contra trofozoítos de *Giardia intestinalis* por el método de subcultivo.
- 4.2.2. Analizar por CLAR la posible reducción del MLA-CO a MLA-OH por los trofozoítos de *Giardia intestinalis* en un periodo de exposición de tres horas.
- 4.2.3. Proporcionar información sobre el comportamiento que presenta el MLA-CO y MLA-OH en el interior del trofozoíto de *Giardia intestinalis*.

5. Procedimiento experimental

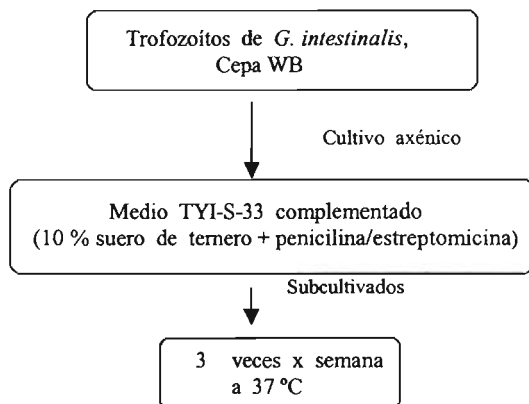
A continuación se indican de manera general los procedimientos realizados para alcanzar los objetivos planteados en el presente trabajo. La secuencia de presentación se realizó según el orden de los objetivos particulares indicados en el apartado anterior. La descripción detallada de cada uno de los procedimientos se presenta en el Anexo 1 del presente informe escrito.

5.1 Determinación *in vitro* de la CI_{50} y CI_{90} del MLA-CO y MLA-OH contra trofozoítos de *G. intestinalis* por el método de subcultivo

5.1.1. Parásitos y cultivo axénico de trofozoítos de *G. intestinalis*

En este trabajo se emplearon trofozoítos de *Giardia intestinalis*, cepa WB (IMSS:0989:1), que se cultivaron axénicamente a 37 °C en medio TYI-S-33 modificado (Keister, 1983) adicionado con 10 % de suero fetal de ternera descomplementado (56 °C, 30 min) y 500 µL de una mezcla de antibiótico penicilina/estreptomicina (10 000U/µg/mL), efectuando subcultivos tres veces por semana (Diagrama 1) (Cedillo et al, 1991; Cedillo y Muñoz, 1992).

Diagrama 1. Parásitos y cultivo axénico de trofozoítos de *G. intestinalis*

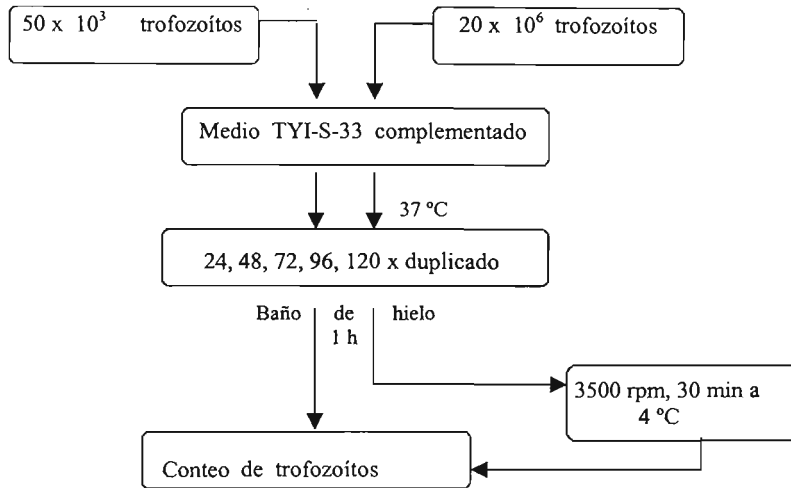


5.1.2. Curva de crecimiento de 50×10^3 y 20×10^6 trofozoítos de *G. intestinalis*

50×10^3 trofozoítos se incubaron en medio TYI-S-33 complementado a 37 °C utilizando tubos eppendorf de 1.5 mL, por un periodo de 24, 48, 72, 96 y 120 h, cada uno por duplicado. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los cultivos se colocaron en baño de hielo 1 h para su posterior conteo en la cámara de Neubauer (Diagrama 2).

De manera paralela, se realizó una curva de crecimiento con un inóculo inicial de 20×10^6 trofozoítos en tubos falcón de 15 mL y se incubaron a los tiempos ya mencionados. En este caso, después del baño de hielo se centrifugaron a 3500 rpm, 30 min a 4°C y se realizó el conteo.

Diagrama 2. Curva de crecimiento de 50×10^3 y 20×10^6 trofozoítos de *G. intestinalis*



5.1.3. Método de subcultivo

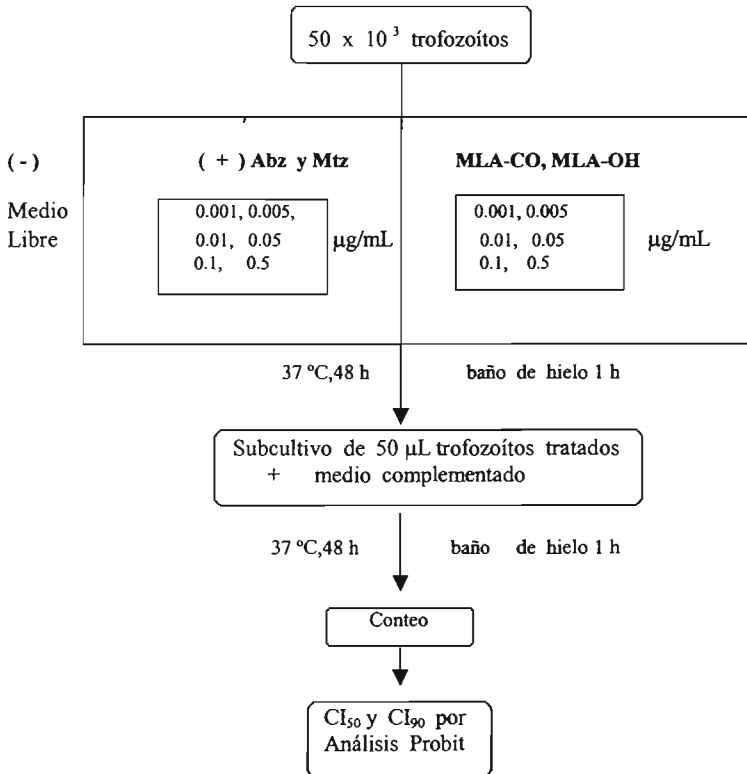
Para la determinación de la actividad giardicida del MLA-CO y MLA-OH se empleó el método de subcultivo previamente descrito por Cedillo y Muñoz, 1991. Para ello, se preparó un solución patrón de Abz, Mtz, MLA-CO y MLA-OH de 10 mg/mL en DMSO, a partir del cual se realizaron las diluciones pertinentes para obtener concentraciones finales de 0.005 $\mu\text{g/mL}$, 0.001 $\mu\text{g/mL}$, 0.05 $\mu\text{g/mL}$, 0.01 $\mu\text{g/mL}$, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ y 0.5 $\mu\text{g/mL}$ en un volumen final de 1 mL (Diagrama 3).

Se incubaron 50×10^3 trofozoítos de *G. intestinalis* en medio TYI-S-33 complementado y con las diferentes concentraciones de los compuestos a 37°C por 48 h. Como control negativo se incubó trofozoítos en medio de cultivo y como control positivo se incluyó Abz y Mtz a las mismas concentraciones. Después de la incubación, se colocaron los tubos en baño de hielo por 1 h y de cada tubo se tomó 50 μL y se subcultivaron por 48 h en medio de cultivo fresco, libre de fármaco a 37°C . Transcurrido este periodo, nuevamente los tubos se colocaron en baño de hielo por 1 h y se determinó la cantidad de trofozoítos en cada concentración de los compuestos empleando la cámara de Neubauer y un microscopio invertido. El ensayo se realizó de 2 a 3 veces por duplicado.

Una vez que se determinó el número de trofozoítos presentes tanto en el control negativo como en cada una de las concentraciones de Abz, Mtz, MLA-CO y MLA-OH, se calculó el número de trofozoítos muertos en cada una de las concentraciones de los compuestos a los que fueron expuestos (# trofozoítos del control negativo - # trofozoítos en cada concentración).

Estos resultados se introdujeron al Análisis Probit y con ello se determinó la CI_{50} y CI_{90} del Abz, Mtz, MLA-CO y MLA-OH (Diagrama 3).

Diagrama 3. Evaluación *in vitro* de la actividad giardicida del MLA-CO y MLA-OH contra los trofozoítos de *G. intestinalis*.



5.2 Obtención de lisado de trofozoítos de *G. intestinalis* tratados con MLA-CO y MLA-OH

Una vez que se determinó la CI_{50} y CI_{90} del MLA-CO y MLA-OH, se obtuvo el lisado de trofozoítos para el análisis de la posible biotransformación del MLA-CO a MLA-OH. Para ello, se prepararon cultivos de trofozoítos con un inóculo inicial de 20×10^6 trofozoítos. En la fase logarítmica de crecimiento, éstos fueron expuestos de forma individual a la mitad de la CI_{90} del MLA-CO y MLA-OH por 3 h a 37 °C. El control negativo fue trofozoítos libres de compuesto. El ensayo se realizó por duplicado.

El control negativo y los cultivos tratados con los compuestos se colocaron en baño de hielo por 1 h y se centrifugaron a 3 500 rpm, 30 min a 4 °C. El paquete celular obtenido se lavó tres veces. Dos de los lavados se realizaron con 10 mL de amortiguador de fosfato salino (PBS) y se centrifugaron a 3 500 rpm, 10 min a 4°C, transfiriendo en cada lavado el paquete celular a un tubo falcón de 15 mL estéril. El último lavado se hizo con 2 mL de PBS y se centrifugó a 8 000 rpm, 5 min a 4 °C: De cada lavado se tomó una alícuota de 1 mL para su posterior análisis por CLAR.

Para obtener el lisado de trofozoítos, el paquete celular se homogeneizó con 150 µL de agua desionizada y posteriormente se realizó el lisado de los trofozoítos mediante 7 ciclos de congelamiento (-70 °C, 5 min)-descongelamiento (-37 °C, 5 min). Enseguida se pipeteó para asegurar la lisis total de los trofozoítos.

Posteriormente, se precipitó con 500 µL de ácido tricloroacético (ATC) al 0.2 % por 10 min las proteínas residuales del medio y las liberadas de los trofozoítos tras su lisis. Se centrifugó a 8 000 rpm, 20 min a 4 °C y el sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo eppendorf limpio y nuevo y se concentró a la mitad de su volumen. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis por CLAR (Diagrama 4).

5.3 Desarrollo del método analítico para la cuantificación del MLA-CO y MLA-OH por CLAR

Para la separación del MLA-CO y MLA-OH se utilizó una columna Symmetry Shield RP₁₈ 5µm de 4.6 x 150 mm; como fase móvil agua-acetonitrilo 0.5% ácido acético por gradiente, con un flujo de 0.6 min/mL y un tiempo de muestreo de 15 min (Quattrocchi et al., 1992).

Para la realización de la curva estándar, se preparó para cada compuesto una solución patrón a partir de la cual se realizaron las diluciones para obtener en el caso del MLA-CO concentraciones de 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM y 10 µM y para el MLA-OH concentraciones de 200 µM y 100 µM (Diagrama 5).

Por último, el fluido de trofozoítos de *G. intestinalis*, y las alícuotas recolectadas en los lavados, se colocaron en agitación. De cada muestra se realizó una dilución 1:10 en acetonitrilo y se centrifugaron a 8 000 rpm, 10 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se filtró por una membrana de acetato de celulosa de 0.45 µm de diámetro de poro. El filtrado se inyectó de 3 a 4 veces en el CLAR.

Diagrama 4. Obtención de lisado de trofozoítos de *G. intestinalis* tratados con MLA-CO y MLA-OH

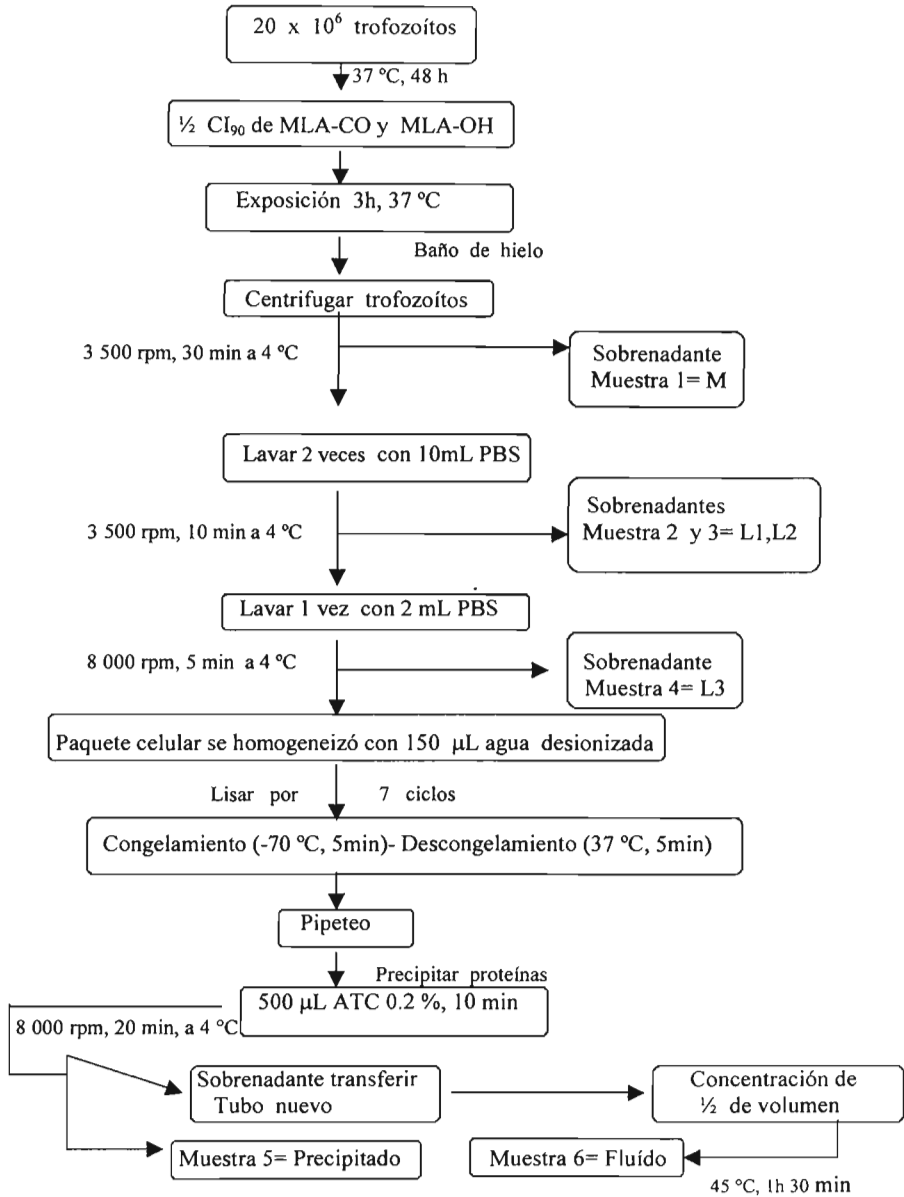
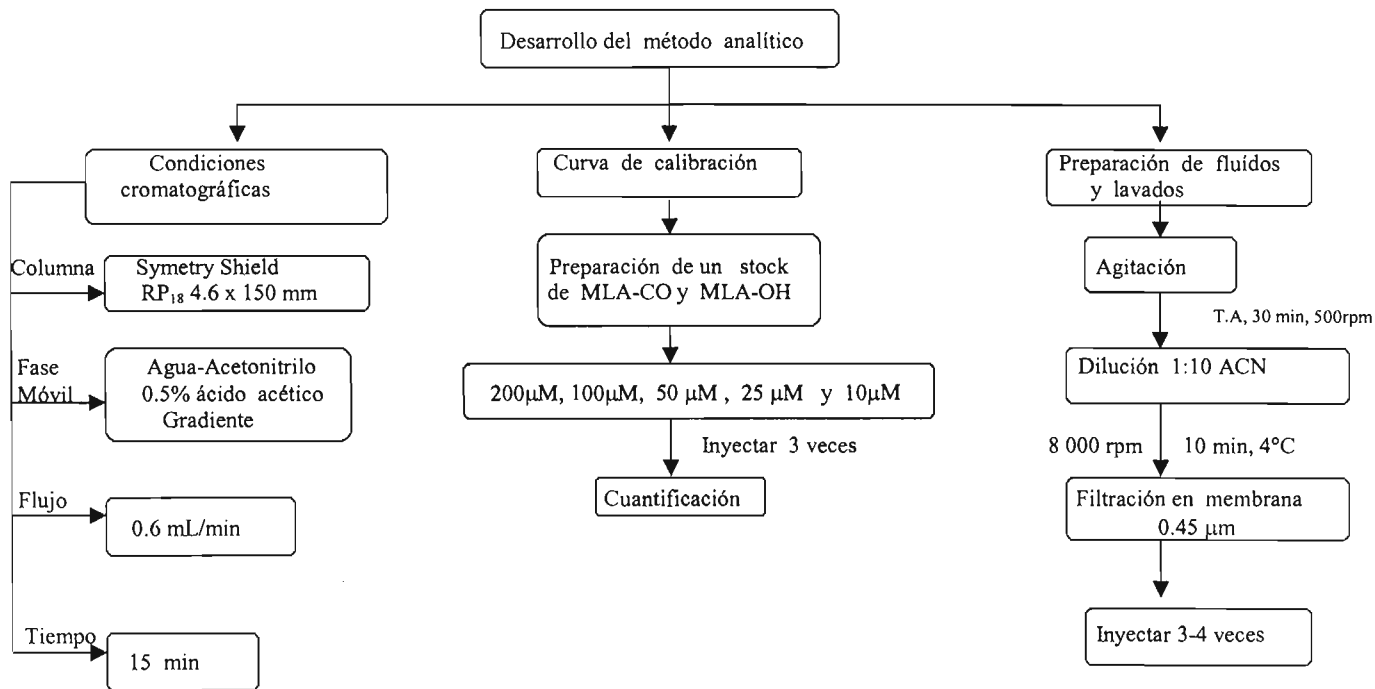


Diagrama 5. Desarrollo del método analítico para la cuantificación del MLA-CO y MLA-OH



6. Resultados y discusión

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos con los procedimientos descritos en el apartado anterior. La secuencia de presentación es la misma de los procedimientos antes mencionados.

6.1. Determinación *in vitro* de la CI_{50} y CI_{90} del MLA-CO y MLA-OH contra trofozoítos de *G. intestinalis* por el método de subcultivo

6.1.1. Curva de crecimiento de 50×10^3 trofozoítos y 20×10^6 trofozoítos de *G. intestinalis*

Con el fin de determinar el comportamiento de crecimiento de los trofozoítos de *G. intestinalis* en medio TYI-S-33 modificado (Keister, 1988) se realizó el seguimiento de crecimiento de éstos antes de llevar a cabo la evaluación *in vitro* de la actividad giardicida de los compuestos.

En la Figura 12 se muestra el comportamiento que tuvieron los trofozoítos de *G. intestinalis* con un inóculo inicial de 50×10^3 trofozoítos.

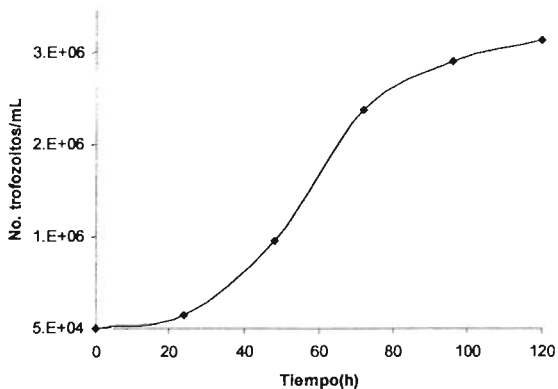


Figura 12. Comportamiento de crecimiento de 50×10^3 trofozoítos de *G. intestinalis*

Como puede observarse, la fase logarítmica de crecimiento se inició antes de 48 h, donde la población existente era ya 20 veces mayor que la inicial. La fase estacionaria se presentó a partir del quinto día, donde la población era 50 veces superior a la inicial, observándose un crecimiento de la población más lento a partir de las 80 h, posiblemente debido a la depletación de los nutrientes.

En la Figura 13 se presenta el comportamiento de crecimiento que presentaron los trofozoítos de *G. intestinalis* con un inóculo inicial de 20×10^6 trofozoítos.

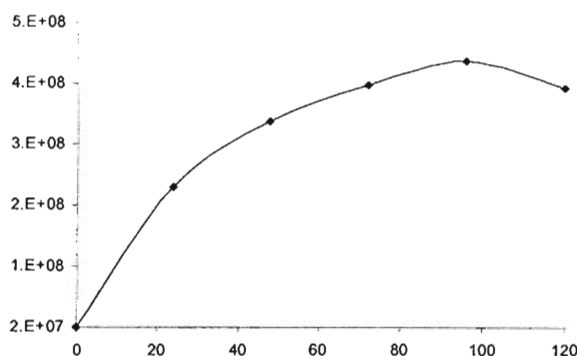


Figura 13. Comportamiento de crecimiento de 20×10^6 trofozoítos de *G. intestinalis*

Se puede observar que el crecimiento de los trofozoítos es mucho más acelerada debido a que el inóculo inicial fue mayor, por lo que la fase logarítmica se alcanzó antes de las 24 h y la fase estacionaria se hizo evidente poco antes de las 72 h.

6.1.2. Actividad giardicida del MLA-CO y MLA-OH contra trofozoítos de *G. intestinalis*

En la Tabla 6 se muestran los resultados de actividad obtenidos *in vitro* para los compuestos MLA-CO y MLA-OH contra los trofozoítos de *G. intestinalis* empleando el método de subcultivo.

Tabla 6. Concentración inhibitoria del MLA-CO y MLA-OH contra trofozoítos de *G. intestinalis*

Compuesto	CI ₅₀		CI ₉₀	
	µg/mL	µM	µg/mL	µM
MLA-CO	1.347	5.903	1256.618	5507.37
MLA-OH	0.380	1.652	668.140	2989.57
Albendazol	0.011	0.042	0.141	0.534
Metronidazol	0.253	1.482	2.551	14.92

CI₅₀ = Concentración inhibitoria 50

CI₉₀ = Concentración inhibitoria 90

A continuación se presentan los coeficientes de potencia de los compuestos MLA-CO y MLA-OH contra los trofozoítos de *G. intestinalis*, que fueron obtenidos relacionando la CI_{50} de cada compuestos y la CI_{50} del Mtz y del Abz.

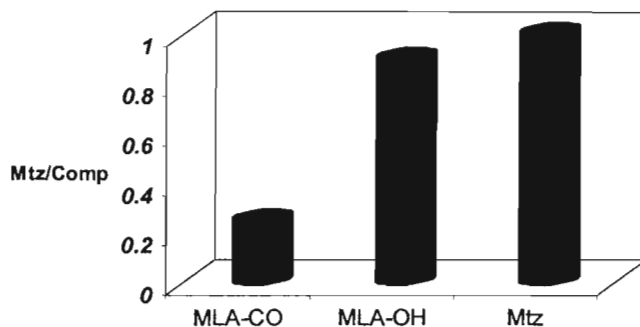


Figura 14. Coeficiente de potencia contra *G. intestinalis*, de cada uno de los compuestos en relación al Mtz.

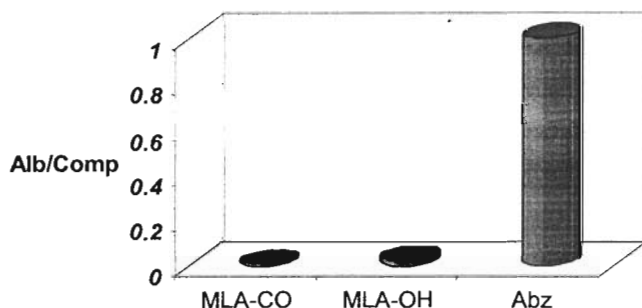


Figura 15. Coeficiente de potencia contra *G. intestinalis*, de cada uno de los compuestos en relación al Abz.

El MLA-OH tuvo una actividad giardicida semejante al Mtz mientras que el MLA-CO tuvo una cuarta parte de la actividad del Mtz (Figura 14) y ninguno de los dos presentó actividad significativa comparada con el Abz (Figura 15).

La Figura 16 muestra la forma global de la actividad comparada de ambos compuestos con respecto al Abz y el Mtz, dado por el inverso de la CI_{50} de cada compuesto.

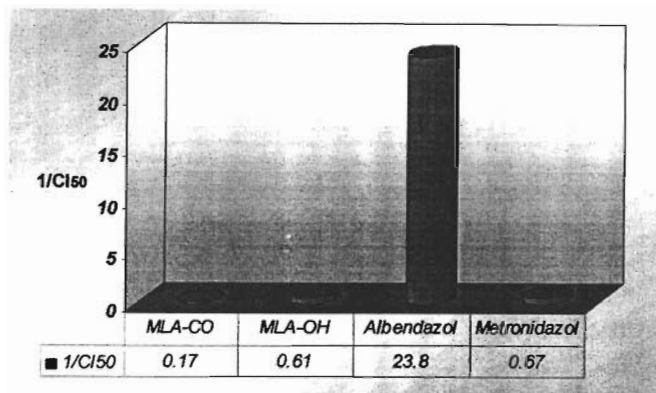


Figura 16. Efectividad comparada del MLA-CO y MLA-OH contra trofozoitos de *G. intestinalis* representada por el inverso de la CI_{50} .

Debajo de cada compuesto se presenta el valor exacto del inverso de la CI_{50} , entre mayor sea el valor, mayor es la actividad. Se puede observar que el MLA-CO y MLA-OH no presentaron actividad giardicida comparable con el Abz. Sin embargo, como ya se mencionó, el MLA-OH sí presentó actividad giardicida semejante al Metronidazol, mientras que el MLA-CO presentó una pobre actividad.

Cabe señalar, que la actividad de estos compuestos fueron comparables con el Mtz en términos de CI_{50} pero no en CI_{90} , porque los dos compuestos presentaron una CI_{90} muy elevada, lo que nos indica que para eliminar el 90% de la población se requiere mayor cantidad de compuesto.

Al establecer la relación estructura-actividad giardicida, el compuesto MLA-CO tienen un sustituyente acetilo ($COCH_3$) en posición 5, a diferencia del MLA-OH que en la misma posición tiene un hidroxietilo ($CHOHCH_3$). La CI_{50} fue $5.903 \mu M$ y $1.652 \mu M$ para el MLA-CO y MLA-OH respectivamente, por lo que se infiere que el sustituyente hidroxietilo confiere mayor actividad al compuesto trifluorometilado.

Estos resultados nos indican que:

- Los sustituyentes pequeños como el acetilo y hidroxietilo confieren menor actividad giardicida comparada con el propiltio, presente en el Abz.
- La actividad giardicida del hidroxietilo fue el resultado de la actividad neta de la mezcla racémica porque este compuesto tiene un carbono quiral.

6.2. Cuantificación del MLA-CO y MLA-OH en fluido de trofozoítos de *G. intestinalis*

Para cada compuesto se obtuvieron los parámetros característicos en las condiciones de trabajo descritas con detalle en la sección de Metodología. Los parámetros por CLAR del MLA-CO y MLA-OH se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Parámetros cromatográficos del MLA-CO y MLA-OH

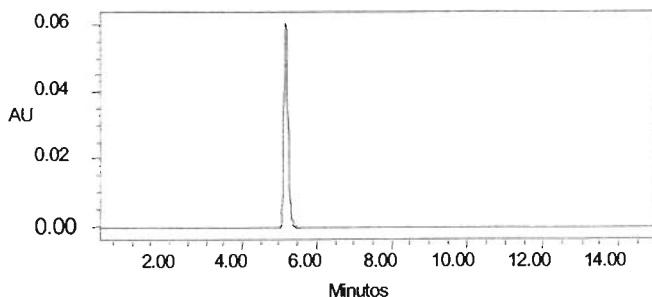
Compuesto	tr	d.e	%CV	λ_1	λ_1	λ_1
MLA-CO	5.194	0.0440	0.847	227.3	274.4	_____
MLA-OH	3.690	0.0552	1.49	213.3	252.0	276.8

tr = tiempo de retención

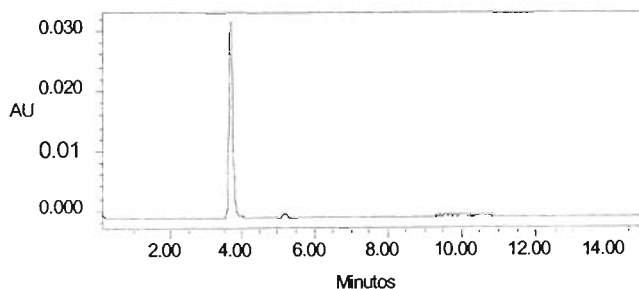
d.e = desviación estándar

CV = coeficiente de variación

Cromatograma 1. MLA-CO en ACN



Cromatograma 2. MLA-OH en ACN



Además, se determinó que la concentración mínima cuantificable para el MLA-CO fue de 10 μM , mientras que para el MLA-OH fue de 5 μM . Partiendo de esto, se determinó la linealidad del método (Tabla 8) con el fin de tener resultados directamente proporcionales a la concentración de cada compuesto, obteniéndose lo siguiente:

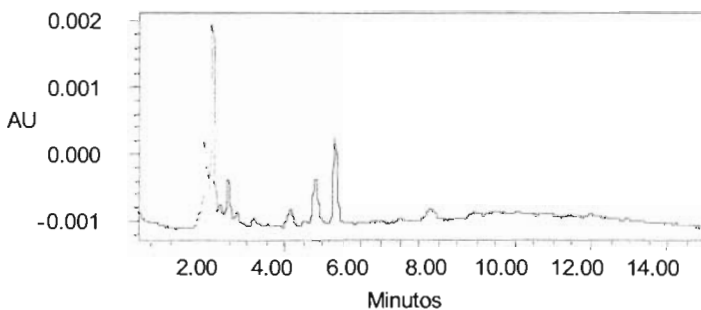
Tabla 8. Linealidad del método

Compuesto	Ecuación lineal	r^2
MLA-CO	$y = 2\,343x - 20\,086.5$	0.9968
MLA-OH	$y = 42\,598 - 1363.3$	1

Se puede observar que aún cuando el coeficiente de correlación del MLA-OH fue de 1, la reproducibilidad durante el desarrollo del método fue bajo, lo que es atribuido posiblemente a una microprecipitación de éste en el sistema, lo que dió lugar a que sólo se trabajara con dos concentraciones, analizadas cuatro veces cada una, mientras que el MLA-CO al no presentar problema semejante permitió la realización de dos curvas de calibración.

Una vez desarrollada la linealidad del método, de acuerdo al comportamiento de crecimiento de los trofozoítos con un inóculo inicial de 20×10^6 trofozoítos, se estableció que a las 48 h, tiempo en el que los trofozoítos se encontraban en su fase logarítmica, se expusieran al MLA-CO y MLA-OH de forma independiente por un periodo de 3 h, tiempo que semejaría el periodo de residencia del compuesto por el tránsito intestinal en el duodeno y yeyuno.

Se analizaron los sobrenadantes de los lavados así como el fluido de los trofozoítos libres de compuesto, obteniéndose de éste último el siguiente cromatograma.

Cromatograma 3. Fluido de trofozoítos de *G. intestinalis* libre de compuesto

Podemos observar que por parte de la matriz biológica no surge ningún pico a los 3.69 min, tiempo de retención del MLA-OH, pero sí existe un pequeño pico en el tiempo de retención del MLA-CO (5.194), lo que nos permitió determinar que el método analítico fue selectivo para el MLA-OH pero no así para el MLA-CO.

Para eliminar el pico de interferencia se incrementó el número de lavados de los trofozoítos tratados con los compuestos, y se emplearon cartuchos antes del análisis de la muestra por CLAR. Sin embargo, las dos alternativas fueron fallidas. Por un lado, cuando se incrementó el número de lavados, también se incrementó el tiempo de procesamiento de la muestra antes del lisado, lo que se tradujo en la nula detección de los compuestos en el lisado y en algunos de los lavados, por lo que se redujeron el número de lavados. Por otro lado, con el uso de cartuchos se encontraron los compuestos en las diferentes eluciones teniendo una recuperación menor a la empleada con el filtro de 0.45 μm , además de que el pico no era eliminado completamente. Por tal motivo, se empleó el filtro de 0.45 μm por que fue una alternativa útil, práctica y económica.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de MLA-OH en los lavados y fluido de los trofozoítos expuestos por 3 h al compuesto se muestran en las Tablas 9 y 10.

Tabla 9. Determinación del MLA-OH en lavados y fluido

Ensayo	Medio		L1		L2		L3		Fluido	
	*Conc μM	%CV	*Conc μM	%CV	*Conc μM	%CV	*Conc μM	%CV	*Conc μM	%CV
1	716.30	19.2	338.13	30.1	ND	ND	ND	ND	329.44	7.9
2	721.01	20.0	344.45	29.1	ND	ND	ND	ND	344.82	13.6
3	678.74	11.6	319.89	11.2	317.29	15.3	ND	ND	327.66	12.2
4	612.52	22.5	321.29	20.8	317.70	22.0	ND	ND	325.98	9.8

* Promedio de cuatro inyecciones

ND = no detectado

$C_{\text{inicial}} = 1494.78 \mu\text{M}$

En el P.C no se detecto compuesto

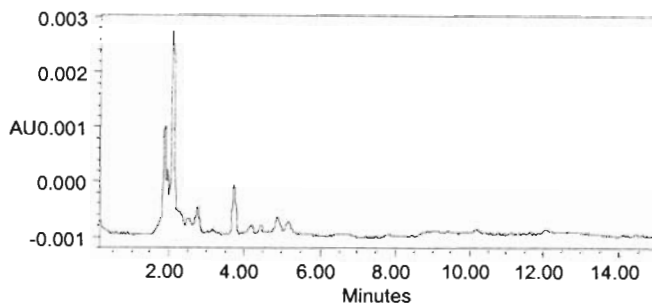
L1= Lavado 1

L2= Lavado 2

L3= lavado 3

Tabla 10. Análisis global del MLA-OH presente en los lavados y fluido

Ensayo	Conc _{Total}	%Recup	%Pérdida	%Conc _{exterior}	%Conc _{interior}
1	1 386.87	92.72	7.28	70.55	29.45
2	1 410.28	94.32	5.68	71.25	28.75
3	1 643.58	109.73	----	88.03	11.97
4	1 577.49	106.53	----	83.73	16.27

Cromatograma 4. MLA-OH en fluido de *G. intestinalis*

Con la exposición de los trofozoítos de *G. intestinalis* por 3 h al compuesto MLA-OH se puede observar que:

- El tiempo de retención del MLA-OH, tanto en el fluido como en los lavados, fue 3.744 ligeramente superior de 3.690 con un %CV de 0.46% que es atribuido a la gran cantidad de pequeños picos en la matriz biológica.
- El ingreso del compuesto a los trofozoítos en los cuatros ensayos fue bajo en un intervalo de 16-29 % de la concentración inicial.
- El 70-80% del compuesto se localizó en los lavados, encontrándose más del 50% en el primer sobrenadante que correspondía al medio.
- La nula detección del compuesto en el paquete celular indica que durante el ingreso del compuesto al interior de los trofozoítos presenta poco afinidad a las proteínas de membrana.
- En la mitad de los ensayos, al obtener la concentración global del compuesto, ésta resultó ser superior a la concentración inicial (1494.78 μM). Esto demuestra por un lado, la baja reproducibilidad de los resultados, y por otra, la obtención de resultados no esperado. A pesar de que las muestras se manejaron en las mismas condiciones, los resultados encontrados estuvieron fuera de lo esperado, ya que en ambos casos, la recuperación fue más del cien por

ciento y sin ninguna pérdida, lo cual es poco probable que haya sucedido. Una posible explicación, es que la presencia de este compuesto posiblemente provocó una respuesta en los trofozoítos de *G. intestinalis* que se tradujo probablemente en la producción y tal vez en la liberación de un metabolito que presenta un tiempo de retención semejante al del MLA-OH. Para demostrar lo anterior, es necesario hacer un estudio más detallado posteriormente.

- El coeficiente de variación en algunos casos fue superior al 25%, inherentes a los problemas propios del compuesto durante su cuantificación en el sistema.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de la exposición por 3 h al compuesto MLA-CO.

Tabla. 11. Determinación del MLA-CO en lavados y fluido

Ensayo	Medio		L 1		L 2		L3		Fluido		P.C	
	*Conc μM	%CV	*Conc μM	%CV	*Conc μM	%CV	*Conc μM	%CV	*Conc μM	%CV	*Conc μM	%CV
1	1801.39	7.7	172.79	16.8	ND	ND	ND	ND	155.48	5.5	ND	ND
2	1692.10	7.1	167.05	24.7	121.4	18.9	100.51	18.4	120.94	5.5	ND	ND
3	1666.02	1.8	155.85	15.0	144.02	4.3	96.77	18.4	106.47	9.3	139.35	5.0
4	1673.05	0.5	122.03	15.1	122.98	22.4	142.57	14.1	139.25	7.9	ND	ND
5	1590.05	0.9	150.43	20.6	135.55	9.8	136.48	3.8	137.93	7.2	ND	ND
6	1528.99	6.8	159.18	15.7	106.10	18.3	ND	ND	112.66	4.5	237.76	6.5
7	1465.41	3.3	171.03	18.4	ND	ND	ND	ND	104.20	11.6	ND	ND

* Promedio de cuatro inyecciones, ND = no detectado

Tabla 12. Determinación del MLA-OH en trofozoítos tratados con MLA-CO

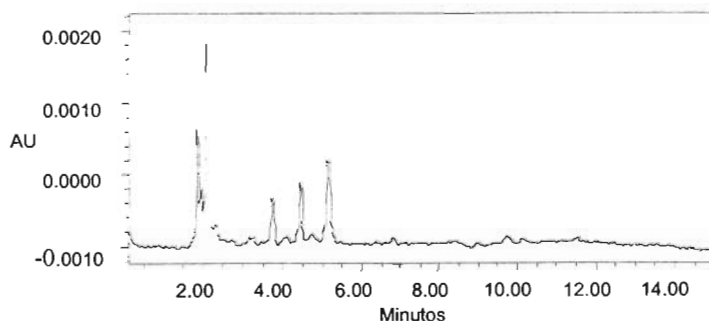
Ensayo	Fluido		Paquete celular	
	Conc μM	% CV	Conc μM	%CV
1	ND	ND	ND	ND
2	341.3	19.4	ND	ND
3	ND	ND	330.07	5.7
4	ND	ND	ND	ND
5	356.34	2.18	ND	ND
6	376.93	24.7	ND	ND
7	353.04	19.0	385.42	5.8

ND = no determinado

Tabla 13. Análisis global del MLA-CO presente en lavados y fluido

Ensayo	Conc _{total}	% Recup	% Pérdida	%Conc _{ext}	%Conc _{int}	%*Conc _{biotraf}
1	2 133.66	76.75	23.25	92.71	7.28	0
2	2 545.32	92.43	7.57	81.72	18.28	74.0
3	2 641.49	95.92	4.08	78.09	21.91	57.53
4	2 199.58	79.88	20.12	93.67	6.33	0
5	2 509.93	91.15	8.85	80.18	19.81	72.27
6	2 524.95	91.69	8.31	71.06	28.94	52.04
7	2 485.63	90.26	9.74	65.84	4.16	87.73

*Conc_{biotraf} = concentración biotransformada de MLA-CO a MLA-OH (reportada en equivalentes de MLA-CO)



Cromatograma 5. Fluido de trofozoítos tratados con MLA-CO

Con la exposición de los trofozoítos de *G. intestinalis* al compuesto MLA-CO por 3 h, se puede mencionar lo siguiente:

- El tiempo de retención del MLA-CO en el fluido de trofozoítos no fue significativamente diferente al determinado en el desarrollo del método analítico.

- En el fluido de los trofozoítos tratados con MLA-CO se determinó la presencia de MLA-OH, aunque no en todos los casos.
- La exposición de 3 h al MLA-CO es un período corto para permitir su ingreso al trofozoíto, ya que se detectó y cuantificó entre el 72-94 % del compuesto en el exterior. El resto que ingresó, el trofozoíto logró reducirlo en un 52-74%. De esta manera, la reducción del compuesto es proporcional a la entrada de MLA-CO.
- Del total de las muestras analizadas, el 75% presentó una biotransformación del MLA-CO en el fluido de los trofozoítos, y de éstas, en la muestra 7 solo se identificó el compuesto reducido en el paquete celular, mientras que en la muestra 3 se determinaron los dos compuestos en el paquete celular. Así que, en una población más grande se pudo observar que el 20% presenta uno u otro o los dos compuestos en la membrana, lo que hace deducir que la afinidad de los dos compuestos por las proteínas de membrana es baja.
- La formación del compuesto reducido posiblemente está relacionada con las proteínas donadoras de electrones que se encargan de mantener un balance redox en los trofozoítos de *G. intestinalis*.
- No es posible identificar por este método analítico la configuración que tiene el sustituyente en posición 5 del anillo bencimidazólico (R o S) que logró reducir los trofozoítos de *G. intestinalis*.
- El coeficiente de variación en la determinación para el MLA-CO no fue mayor del 25% a diferencia del coeficiente de variación que se presentó en algunos casos en la determinación del MLA-OH.

7. Conclusiones

- Los resultados obtenidos permitieron comprobar la hipótesis de trabajo, ya que los trofozoítos de *G. intestinalis*, en su fase logarítmica de crecimiento, expuestos por 3 h al compuesto MLA-CO fueron capaces de reducirlo a MLA-OH. El compuesto oxidado no presentó actividad giardicida comparada con el MLA-OH.
- El compuesto MLA-OH mostró actividad giardicida *in vitro* por el método de subcultivo comparable con el Metronidazol, mientras que el MLA-CO sólo presentó el 25% de la actividad giardicida del Metronidazol.
- Los compuestos MLA-OH y MLA-CO no mostraron actividad giardicida comparable con el Albendazol.
- El sustituyente 1-hidroxietilo en la posición 5 del anillo bencimidazólico confirió al compuesto MLA-OH mayor actividad giardicida que el sustituyente acetilo.
- La entrada del MLA-CO al trofozoíto esta relacionada con la reducción del compuesto. De modo que, si la entrada esta limitada, la biotransformación se verá afectada.
- El MLA-OH y el MLA-CO mostraron poca retención en las membranas de los trofozoítos, lo que se traduce en una baja afinidad de estos compuestos a las proteínas de membrana.
- El MLA-CO en el interior del trofozoíto de *G. intestinalis* es reducido a MLA-OH, un compuesto con mayor actividad giardicida. Así que, el MLA-CO presenta un proceso similar que es característico en el Metronidazol, se reduce y es activo.

Bibliografía

- ADAM RODNEY, D. *The biology of Giardia ssp.* Clinical Microbiology Review, **1991**, 55(4): 706-732.
- ADAM RODNEY, D. *The biology of Giardia ssp.* Clinical Microbiology Review, **2001**, 14(3): 447-475.
- ALCARAZ SORIANO, M. J. *Giarda y Giardiosis.* Control Calidad Servicio de Microbiología, **1998**, 1-9; www.seim.org/control/rev_Para/Giardia :15, 9, 2004.
- ANDRZEJEWSKA, M.; Yépez Mulia, L.; Cedillo Rivera, R.; Tapia, A.; Vilpo, L.; Vilpo, J; Kazimierczuk, Z. *Synthesis, antiprotozoal and anticancer activity of substituted 2-pentafluoroethylbencimidazol.* European Journal of Medicinal Chemistry, **2002**, 37: 973-978.
- BALIMANE PRAVEEN, V.; Chong, S.; Morrison Richard, A. *Current methodologies used for evaluation of intesinal permeability and absorption.* Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, **2000**, 44: 301-312.
- BOTERO, D.; Restrepo, M. *Parasitosis Humana.* 3ª. Ed., Colombia, Corporación para investigación biológica, **1998**, 48-53.
- CABELLO ROMERO, R. *Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades parasitarias.* 2ª. reimp. de la 1ª. ed., México, Panamericana, **1998**, 12-15.
- CAMPANATI, L.; Troester, H.; Monteiro, L.; Spring, H.; Trendelenburg, M. F. *Tubulin diversity in trophozoites of Giardia lamblia.* Histochemistry and Cell Biology, **2003**, 119: 323-331.
- CEDILLO RIVERA, R.; Enciso Moreno, J. A.; Martínez Palomo, A.; Ortega Pierres, G. *Isolation and axenization of Giardia lamblia isolates from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico.* Archives of Medical Research, **1991**, 22: 79-85.
- CEDILLO RIVERA, R.; Muñoz, O. *In vitro susceptibility of Giardia lamblia to Albendazole, Mebendazole and other chemoterapeutic agents.* Journal Medical Microbiology, **1992**, 17: 221-224.
- CEDILLO RIVERA, R.; Chávez, B.; González Robles, A.; Tapia, A.; Yépez Mulia, L. *In vitro effect of Nitazoxanide againt Entamoeba histolytica, Giardia intestinalis and Trichomonas vaginalis trophozoites.* Journal of Eukaryotic Microbiology, **2002**, 49(3): 201-208.

- CHÁVEZ, B; Espinosa Cantellano, M.; Cedillo Rivera, R.; Ramírez A.; Martínez Palomo, A.
Effect of Albendazole on Entamoeba histolytica and Giardia lamblia Trofozoites. Archives of Medical Research, **1992**, 23(2): 63-67.
- CHÁVEZ, B.; Cedillo Rivera, R.; Martínez Palomo, A.. *Giardia lamblia: Ultrastructural study of the in vitro effect of Bencimidazoles*. Journal Protozoology, **1992**, 39(4): 510-515.
- CLINTON WHITE, A. *Nitazoxanide: an important advance in anti-parasitic therapy*. American Journal Tropical Medical Hygiene, **2003**, 68(4): 382-383.
- ERLANDSEN, S. L. *Biotic transmittion-is giardiasis a zoonosis*. Giardia: from molecules to disease, Thompson R. C. A., Reynoldson, J. A., Lymbery, A. J., Alemania, Cab International, **1994**, 83-97
- FARTHING, M. J. G. *Giardiasis as a disease*, Giardia: from molecules to disease, Thompson R. C. A., Reynoldson, J. A., Lymbery, A. J., Alemania, Cab International, **1994**, 15-37.
- GARDNER, T. B.; Hill, H. R. *Treatment of Giardiasis*. Clinical Microbiology Reviews, **2001**, 14(1): 114-128.
- GILLIN, F. D.; Reiner, D. S.; McCaffery, J. M. *Cell biology of the primitive eukaryote Giardia lamblia*. Annual Review Microbiology, **1996**, 50: 679-705.
- HARDER, A; Greif, G.; Haberkon, A. *Chemotherapeutic approaches to protozoa: Giardia Trichomonas and Entamoeba -current level of knowledge and outlook*. Parasitology Research, **2001**, 87: 785-786.
- HENZE, K.; Martin, W. *Evolutionary biology: Essence of mitochondria*. Nature, **2003**, 426: 127-128.
- JARROLL, E. L. *Biochemical mechanisms of anti giardial drug action*. Giardia: from molecules to disease, Thompson R. C. A., Reynoldson, J. A., Lymbery, A. J., Alemania, Cab International, **1994**, 329-335.
- JOHNSON, P.J. *Metronidazole and drug resistance*. Parasitology Today, **1993**, 9(5): 183-186.
- KEISTER, D. B. *Axenic culture of Giardia lamblia in TYI-S-33 medium supplemented with bile*. Tropical Medicine and Hygiene, **1983**, 77(4): 487-488.
- LACEY, E. *Mode of action of Bencimidazoles*. Parasitology Today, **1990**, 6(4): 112-115.
- LACEY, E; Gill, J. H. *Biochemistry of benzimidazole resistance*. Acta Tropica, **1994**, 56: 245-262.
- LINDMARK, D.G. *Energy metabolism of the anaerobic protozoon Giardia lamblia*. Molecule Biochemistry Parasitology, **1991**, 45(1): 39-47.

- LLOYD, D.; Harris, J. C.; Maroulis S.; Wadley R.; Ralphs JR; Hann AC. *The "primitive" microaerophile Giardia intestinalis (syn. Lamblia, duodenalis) has specialized membranes with electron transport and membrane-potential-generating.* Microbiology, **2002**, 148:13491354.
- LÓPEZ AGUILAR, M. *Síntesis de un derivado biorreversible del (R)(S)-5(6)-1-(fenil-1-hidroxi) metil-2-metoxicarbonilamino-1H-bencimidazol, metabolito del Mebendazol, con potencial actividad giardicida.* México, Facultad de Química, UNAM, **2002** (Tesis de Licenciatura).
- MARQUARDT, C. W.; Demaree, S. R.; Grive, B. R. *Parasitology & Vector Biology.* 2a. ed., Academic Press, London, **2000**, 89-99.
- MEYER, E. A., *Giardia as an organism.* Giardia: from molecules to disease, Thompson R. C. A., Reynoldson, J. A., Lymbery, A. J., Alemania, Cab International, **1994**, 3-13.
- MODELO OMS de información sobre prescripción de medicamentos. *Medicamentos utilizados en enfermedades parasitarias.* 2ª. Ed., Organización Mundial de Salud, Ginebre, **1996**, 5-13.
- NAVARRETE VÁZQUEZ, G.; Cedillo Rivera, R; Hernández Campos, A.; Yépez Mulia, L.; Hernández Luis, F.; Valdez, J.; Morales, R.; Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R. *Synthesis and antiparasitic activity of 2-(trifluoromethyl)-bencimidazole derivatives.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **2001**, 11: 187-190.
- NAVARRETE VÁZQUEZ, G.; Yépez Mulia, L.; Hernández Campos, A.; Tapia, A.; Hernández Luis, F.; Cedillo Rivera, R.; Martínez Fernández, A.; Martínez Grueiro, M.; Castillo, R. *Synthesis and antiparasitic activity of Albendazole and Mebendazole Analogues.* Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2003**, 11: 4615-4622.
- NAVARRETE VÁZQUEZ, G. *Diseño, síntesis y actividad antiparasitaria de derivados del 2-(trifluorometil)-bencimidazoles.* México, Facultad de Química, UNAM, **2004** (Tesis de Doctorado).
- OXBERRY, M. E.; Thompson, R. C. A.; Reynoldson, J. A. *Evaluation of the effects of Albendazole and Metronidazole on the ultrastructure of Giardia duodenalis, Trichomonas vaginalis and Spiroplasma muris using transmission electron microscopy.* International Journal for Parasitology, **1994**, 24(5): 695-703.
- QUATTROCCHI, O. A.; Abelaura de Andrizzi, S. I. *Introducción a la HPLC: Aplicación y Práctica.* Argentina, Artes Gráficas, **1992**, pp. 39-87.
- SCHMIDT, G.; Roberts', L. *Foundations of Parasitology.* 6a. ed., Boston, McGrawHill, **2000**: 84-88
- SHORE GARCÍA, L. *Diagnostic Medical Parasitology.* 4a. Ed., Washington, ASM Press, D. C., **2001**, pp. 141-152.

- SISTEMA Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología/SSA, Distribución de los casos de giardiasis por mes, 2003; [www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2003/giardiasis por mes](http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2003/giardiasis%20por%20mes): 21, 9, 2004.
- SISTEMA Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología/SSA, Distribución de los casos de giardiasis por grupo de edad, 2003; www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2003/giardiasisporgrupodeedad: 21, 9, 2004.
- SISTEMA Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología/SSA, Distribución de los casos de giardiasis por fuente de notificación, 2003; [www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2003/giardiasporfuenteodenotificación](http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2003/giardiasporfuenteodenotificacion): 21, 9, 2004
- SÜARD STAFFAN, G.; Hagblom, Per; Palm, J.E. *Giardia lamblia-a model organism for Eukaryotic cell differentiation*. FEMS Microbiology Letter, 2003, 218: 3-7.
- THOMPSON, R. C. A. *Giardiasis as a re-emergie infectious disease and its zoonotic potential*. International Journal for Parasitology, 2000, 30: 1259-1267.
- TOVAR, J.; León Ávila, G.; Sánchez Ledya, B; Sutak, R.; Tachezy, J.; Hernández, M; Müller, M. *Mitochondrial remnant organelles of Giardia function in iron-sulphur protein maturation*. Nature, 2003, 426: 172-176.
- TOWNSEND, L. B; Wise, D.S. *The synthesis and chemistry of certain anthelmintics Benzimidazoles*. Parasitology Today, 1990, 6(4): 107-112.
- VILCHIS REYES, M. A. *Biosíntesis, actividad giardicida y permeabilidad aparente de derivados del 2-(trifluorometil)benzimidazol*. México, Facultad de Química, UNAM, 2004 (Tesis de Maestría).
- UPCROFT, P.; Upcroft, J. A. *Drug target and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa*. Clinical Microbiology Reviews, 2001, 14(1): 150-164.
- WOLFE MARTIN, S. *Giardiasis*. Clinical Microbiology Reviews, 1992, 5(1): 93-100.
- WORLD Health Organization (WHO), www.who.int/water_sanatation_health/dwp/en/ admirrobs.pdf: 3, 3,05.
- WORLD Health Organization (WHO), www.who.int/wormcontrol/statistic: 3, 3, 05

Anexo 1. Desarrollo del procedimiento experimental

Reactivos y equipos

Reactivos

- Albendazol (Smith-Kline Beechman, México)
- Metronidazol (Sigma, México)
- Cloruro de sodio (Merck, México)
- Fosfato de sodio dibásico (Baker, México)
- Fosfato de sodio monobásico (Baker, México)
- Biosate, peptona (BBL)
- D-(+)-Glucosa (Sigma, México)
- L-cisteína (ICN Biochemicals)
- L-ácido ascórbico (Sigma, México)
- Bilis (Sigma, México)
- Citrato férrico (Sigma, México)
- Mezcla de antibiótico penicilina/estreptomina (In vitro lab)
- Suero fetal de ternera (Hyclone)
- Acetonitrilo HPLC (Baker, México)
- Ácido acético glacial (Baker, México)
- Agua HPLC

Equipo

- Gabinete de Seguridad Biológica, Clase II (NU-425-400, Nuair)
- Incubadora de 37 °C (Habitat, Revco)
- Balanza analítica (SA210, Scientech)
- Microscopio invertido (Axiovert 25, Zeiss)
- Crioconservador (XLC 500, Cryogenics)
- Potenciómetro (φ720 pHMeter, Beckman)
- Centrifuga clínica (Sorvall RT 6000D, Ohio)
- Centrifuga de tubos eppendorf (Mikro 22R, Hettich)
- Centrifuga de tubos falcón de 5 mL (Mikro 22R, Hettich)

- Concentrador de vacío (concentrador 5301, Eppendorf)
- Baño de agua (Aquabath, Lab-Line)
- Vortex (Genie, Fisher)
- Ultracongelador (ULT-Freezer, FormaScientific)
- Congelador -20 (TermoForma, LabPharmacy Freezer)
- Balanza analítica (Santorius analytic)
- Agitador de tubos eppendorf (Thermomixer, Eppendorf)
- Centrifuga de tubos eppendorf (5840R, Brinkman)
- Vortex (Super-Mixer, Lab-Line)
- Bombas Binarias (1525, Waters)
- Detector de fotodiodos (996, Waters)
- Columna Symmetry Shield RP₁₈ 4.6 x 150 mm

Preparación del medio TYI-S-33 suplementado con bilis por Keister, 1983

Para preparar 1 L de medio se pesó en una balanza analítica los siguientes compuestos:

- Cloruro de sodio2.0 g
- Fosfato de sodio dibásico.....1.0 g
- Fosfato de sodio monobásico.....0.6 g
- Biosote, peptona.....30.0 g
- D-(+)-Glucosa.....10.0 g
- L-cisteína.....2.0 g
- L-ácido ascórbico0.2 g
- Citrato férrico.....0.0228 g
- Bilis.....0.8 g

Se disolvieron con agitación cada uno de los compuestos en 700 mL de agua bidestilada, posteriormente se llevó al aforo en un matraz de 1 L. Se ajustó el pH a 7-7.2 en un potenciómetro ϕ 720 pHMeter con NaOH 1M, para después ser esterilizado por filtración utilizando una membrana de 0.45 μ m. El medio fue recolectado en frascos Schcott de 500mL estériles, utilizando solo el 80 % de su capacidad y después fue sometido a prueba de esterilidad.

Prueba de esterilidad

Dentro del gabinete de Seguridad Biológica se tomó una alícuota de 4 μ L de cada medio y se sembró en una placa de agar-sangre, se incubó a 37 °C por 48 h al igual que los medios perfectamente sellados con la finalidad de permitir un posible crecimiento bacteriano o fúngico en caso de existir contaminación. Una vez que se concluyó el periodo de incubación, se observó la presencia de turbidez en el medio y con ayuda de la placa se verificó una posible contaminación. Si tanto la prueba del medio como la placa fueron negativas, se almacenaron los medios a -20 °C hasta su posterior uso.

Preparación de medio TYI-S-33 complementado para trofozoítos de *G. intestinalis*

Una vez que los medios pasaron por la prueba de esterilidad, cada 100 mL de medio TYI-S-33 se complementó con 10 mL de suero fetal de ternera descomplementado (56 °C, 30 min) y se agregó una mezcla de antibiótico penicilina/estreptomicina 10 000 U/μg/mL, con el fin de permitir el adecuado crecimiento de los trofozoítos de *G. intestinalis* y evitar una contaminación durante su uso. Se homogeneizó y etiquetó adecuadamente (Keister, 1983).

Descongelación de trofozoítos de *G. intestinalis*, cepa WB

Del crioprotector se obtuvo un criovial de 1 mL con trofozoítos de *G. intestinalis*, cepa WB (IMSS:0989:1) en 0.1 % de DMSO. Los trofozoítos se descongelaron a T.A y se repartió el contenido en dos tubos de 18 x 100 mm con 3 mL de medio de cultivo y se homogeneizó. Ambos tubos se centrifugaron a 1500 rpm, 5 min a 4 °C en una Sorvall RT 6000 para eliminar el DMSO. El sobrenadante se eliminó y el paquete celular fue resuspendido en 7 mL de medio de cultivo fresco y fueron incubado a 37 °C , 24 h.

Al siguiente día, se realizó el cambio de medio, que consistió en decantar el medio de cultivo del tubo y reconstituirlo con medio de cultivo fresco para nuevamente ser incubados en las mismas condiciones. Después del periodo de incubación, se observó la confluencia empleando un microscopio invertido. Esta confluencia era referida a la observación de una monocapa de trofozoítos y a la ausencia de espacio entre célula y célula. Si la confluencia era del 100 % al 90 %, entonces se realizaba el mantenimiento del cultivo axénico y si no, solo se realizaba el cambio de medio.

Mantenimiento de cultivos axénico de *G. intestinalis*

Una vez que se observó una confluencia de 100 %-90 % de los tubos con trofozoítos, éstos se colocaron 10 min en baño de hielo. De manera paralela, se agregaron 7 mL de medio de cultivo a 3 tubos cada uno y se inoculó cada tubo con 15 μL de trofozoítos provenientes del tubo que estaba en enfriamiento, y de cada uno se realizó la prueba de esterilidad. Los tubos se sellaron, etiquetaron e incubaron en posición ligeramente inclinados a 37 °C , 48 h. De esta manera, los cultivos de trofozoítos de *G. intestinalis* se subcultivaron a intervalos de 72 a 96 h dependiendo de la confluencia. Si ésta era menor del 80%, se realizó el cambio de medio sin colocar los tubos en baño de hielo para asegurar que los trofozoítos adheridos a la pared del vidrio se mantuvieran en el tubo (Cedillo y Muñoz, 1992).

Conteo de trofozoítos de *G. intestinalis* en la cámara de Neubauer

En la cámara de Neubauer o Hemocitómetro constituido por dos cámaras, cada cámara subdividida en 5 cuadrantes, 4 de ellos dividido en 16 cuadros y el cuadrante restante constituido por 25 cuadros, se colocó por capilaridad (aprox. 12μL) una dilución de trofozoítos de *G. intestinalis*. Para su observación se utilizó un microscopio invertido en 10 X

Para la realización del conteo de trofozoítos se consideró el número de trofozoítos presentes dentro de los cuatro cuadrantes de la esquina de la cámara. El número total de trofozoítos se dividió en cuatro (# cuadrantes leído) y se multiplicó por 10 000 (factor de la cámara) y por el inverso de la dilución, para finalmente obtener los trofozoítos/mL.

Así que , Trof/mL= [# trofozoitos/ # cuadrantes leídos][10 000] [Inv. de la dil]

Curva de crecimiento de trofozoitos de *G. intestinalis*

De los cultivos axénicos de trofozoitos se eligió un tubo con 100 % de confluencia, se colocó en baño de hielo 10 min, y dentro del gabinete de seguridad biológica se realizó una dilución 1:10 en un tubo eppendorf con PBS (10 μ L de trofozoitos + 90 μ L de PBS). Se contó el número de trofozoitos empleando el microscopio invertido y basándose en ello se determinó el volumen requerido para obtener 50×10^3 trofozoitos.

De esta forma, se incubaron 50×10^3 trofozoitos en medio TYI-S-33 complementado, empleando tubos eppendorf de 1.5 mL limpios y estériles. Los tubos se etiquetaron perfectamente en los tiempos indicados e incubaron a 37 °C en los tiempos asignados.

Tabla 14. Curva de crecimiento de 50×10^3 trofozoitos de *G. intestinalis*

No. tubos	Periodo de incubación (h)	Inóculo de trofozoitos ($\times 10^3$)
2	24	50
2	48	50
2	72	50
2	96	50
2	120	50

Transcurrido cada periodo de incubación, se colocaron los tubos en baño de hielo 1 h para el posterior conteo de los trofozoitos.

Se graficó el número de trofozoitos vs tiempo para determinar el tiempo requerido en que los trofozoitos alcanzaron la fase logarítmica y la estacionaria. Esta curva se realizó cada semana para identificar el comportamiento del crecimiento de los trofozoitos de *G. intestinalis* hasta que se logró reproducibilidad en los resultados.

Curva de crecimiento de 20×10^6 trofozoitos de *G. intestinalis*

Para obtener gran cantidad de trofozoitos de *G. intestinalis* se obtuvo un cultivo masivo de trofozoitos empleando un tubo falcón de 50 mL que se incubó en un periodo de 3 a 5 día. El cultivo se colocó 1 h en hielo y posteriormente se centrifugó a 3500 rpm, 30 min a 4 °C. Del paquete celular se tomó una alícuota y se realizó una dilución 1:10 para su conteo (10 μ L de trofozoitos + 90 μ L de PBS). Una vez que se determinó el número de trofozoitos presentes se calculó el volumen requerido para tener 20×10^6 trofozoitos.

Así que se cultivó 20×10^6 trofozoitos en 12 mL de medio TYI-S-33 complementado en tubos falcón estériles de 15 mL, que se etiquetaron de la siguiente forma:

Tabla 15. Curva de crecimiento de 20×10^6 trofozoítos de *G. intestinalis*

No. tubos	Periodo de incubación (h)	Inóculo de trofozoítos ($\times 10^6$)
2	24	20
2	48	20
2	72	20
2	96	20
2	120	20

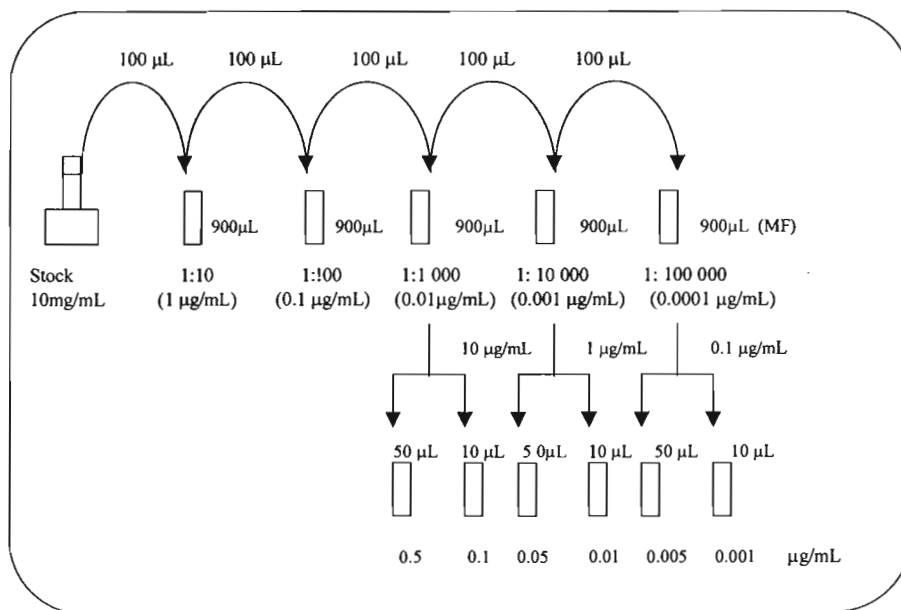
Transcurrido cada periodo de incubación, los dos tubos se colocaron en baño de hielo 1 h. De uno de ellos se realizó el conteo, mientras que del otro se centrifugó a 3500 rpm, 30 min a 4 °C para su posterior conteo.

De igual forma que en la curva anterior, se graficó el número de trofozoítos vs tiempo y se determinó el tiempo de cada una de las fases de crecimiento.

Preparación de diluciones del Abz, Mtz, MLA-CO y ML-OH

Para obtener una solución patrón de 10 mg/mL de cada compuesto, se pesaron 10 mg en una balanza analítica y se aforó a 1 mL con DMSO A partir de cada solución patrón se realizaron las diluciones correspondientes para obtener de cada compuesto concentraciones desde 0.001 $\mu\text{g/mL}$ a 0.5 $\mu\text{g/mL}$ en medio de cultivo fresco (Diagrama 6).

Diagrama 6. Diluciones de Abz, Mtz, MLA-CO y MLA-OH



Método de subcultivo

Para evaluar la actividad giardicida tanto del Alb, Mtz, MLA-CO y MLA-OH se incubaron 50×10^3 trofozoitos de *G. intestinalis* en medio TYI-S-33 complementado con las diferentes concentraciones de cada compuesto a 37 °C, 48 h. El control negativo fue trofozoitos en medio de cultivo fresco y el control positivo fue Abz. Después de la incubación, se colocaron los tubos 1 h en baño de hielo para permitir el desprendimiento de los trofozoitos de la pared del tubo y se subcultivaron 50 μ L de trofozoitos en medio de cultivo fresco libre de compuesto a 37 °C, 48 h. Transcurrido el periodo de incubación, nuevamente se colocaron los cultivos 1 h en baño de hielo y se determinó el número de trofozoitos de cada concentración de compuesto en la cámara de Neubauer empleando un microscopio invertido. El ensayo se realizó de dos a tres veces por duplicado (Cedillo y Muñoz, 1992).

Una vez que se determinó el número de trofozoitos presentes tanto en el control positivo, control negativo y en cada una de las concentraciones de los compuestos evaluados (número de trofozoitos que después de haber sido expuestos a las diferentes concentraciones del compuesto pudieron sobrevivir y reproducirse), se determinó el número de trofozoitos muertos. Para ello, se restó el número de trofozoitos presentes en el control negativo menos el número de trofozoitos obtenidos en cada concentración, y esos valores se introdujeron al programa computación de Análisis Probit para conocer la CI_{50} y la CI_{90} y el intervalo de confianza de cada compuesto evaluado.

Obtención de lisado de trofozoitos de *G. intestinalis* tratados con MLA-CO y MLA-OH

Para obtener los cultivos de 20×10^6 trofozoitos iniciales se realizó un cultivo masivo de trofozoitos en un tubo falcón de 50 mL, el cual se enfrió 1 h y centrifugó a 3500 rpm, 30 min a 4 °C. Del paquete celular obtenido se tomó una alícuota para hacer una dilución 1:10 (10 μ L de trofozoitos + 90 μ L PBS) para su posterior conteo y calcular el inóculo necesario para tener 20×10^6 trofozoitos.

De esta forma, se prepararon cultivos de trofozoitos con 20×10^6 trofozoitos en tubos falcón de 15 mL nuevos y estériles, etiquetados de la siguiente forma:

Tabla 16. Preparación de cultivos de trofozoitos para lisado

Etiqueta	No. de tubos
Control	1
MLA-CO	2
MLA-OH	2

A cada tubo se le realizó la prueba de esterilidad, se sellaron perfectamente e incubaron a 37 °C, 48 h.

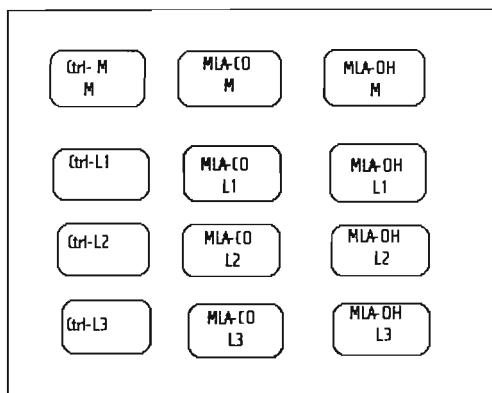
Después del periodo de incubación, en el cual los trofozoitos se encontraban en su fase logarítmica de crecimiento fueron expuestos por un lado a la $\frac{1}{2}$ de la CI_{90} del MLA-CO y por otro a la $\frac{1}{2}$ de la CI_{90} del MLA-OH por 3 h a 37 °C. Pasado este periodo de exposición todos los cultivo (Control, MLA-CO y MLA-OH) se enfriaron 1 h y centrifugaron a 3500 rpm, 30 min a

4 °C. El paquete celular se lavó tres veces (Tabla 17) con PBS (pH= 7.2), se transfirió en los dos primeros lavados el paquete en un tubo falcón de 15 mL estéril, en el último lavado se transfirió a un tubo eppendorf de 2 mL estéril. De cada sobrenadante obtenido se tomó una alícuota de 1 mL que se colocó en un tubo eppendorf estéril (Diagrama 7).

Tabla 17. Condiciones de lavado de trofozoítos de *G. intestinalis*

No. lavados	PBS(mL)	Transferencia de Paquete celular	Condiciones de centrifugación
1	10	Tubo falcón 15 mL	3 500 rpm, 10 min, 4 °C
2	10	Tubo falcón 15 mL	3 500 rpm, 10 min, 4 °C
3	2	Tubo eppendorf 2 ml	8 000 rpm, 5 min, 4 °C

Diagrama 7. Muestras de Sn de lavados



M= Medio
L1 = Lavado 1
L2= Lavado 2
L3= Lavado 3
Sn= Sobrenadante

Para obtener el lisado de trofozoítos, el paquete celular que se obtuvo del último lavado se homogeneizó en 150 µL de agua desionizada y se sometió a 7 ciclos de congelamiento (-70 °C, 5 min)-descongelamiento(37 °C, 5 min) y posteriormente se pipeteó para asegurar una lisis total de los trofozoítos. Para ello, se requirió puntas de 34 mm y una constante revisión de los trofozoítos en la cámara de Neubauer para verificar un lisado completo.

Para eliminar la gran mayoría de proteínas provenientes del medio de cultivo y las liberadas de los trofozoitos tras su lisis, se precipitaron con 500 μL de ATC al 0.2 %, durante 10 min y después se centrifugó a 8000 rpm, 20 min, 4 °C para obtener el fluido de los trofozoitos que liberaron el compuesto a los que fueron expuestos. Este sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y concentró a la mitad de su volumen en el SeepVac, a 45 °C, 1 h, 30 min.

Condiciones para la separación de MLA-CO y MLA-OH

Para lograr separar el MLA-CO y el MLA-OH a partir de una mezcla de ambos, se preparó cualitativamente una mezcla de los dos compuestos en ACN HPLC y se utilizaron diferentes columna, fase móvil y gradiente (Quatricchi et al., 1992) y finalmente se seleccionó:

- Columna Symmetry Shield RP₁₈, tamaño de partícula 5 μm y una longitud de 4.5 x 150 mm.
- Fase móvil de acetonitrilo-agua al 0.5% de ácido acético (v/v) por gradiente (Tabla 18)
- Velocidad de flujo de 0.6 mL/min
- Tiempo de muestreo: 15 min
- Longitud de onda: 280 nm

Tabla 19. Gradiente de la fase móvil.

Tiempo (min)	Agua (%)	ACN (%)
0	52.0	48.0
3	50.0	50.0
5	49.0	51.0
7	45.0	55.0
9	46.0	54.0
11	48.0	52.0
13	50.0	50.0
15	52.0	48.0

Preparación de curva estándar de MLA-CO y MLA-OH

Para identificar el límite mínimo de detección de ambos compuestos se preparó un stock de 5 mg/mL a partir del cual se realizaron las diluciones pertinentes para tener concentraciones de 10 μM , 5 μM , 1 μM , 0.5 μM y posteriormente se inyectó cada concentración en CLAR y se determinó la concentración más pequeña cuantificable.

Teniendo el conocimiento del límite de detección se realizó la curva de calibración de MLA-CO y para ello se pesaron 5 mg de MLA-CO y se aforó a 10 mL de ACN HPLC, a partir de este stock se realizaron las diluciones en ACN HPLC correspondientes para tener concentraciones finales de 200 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM y 10 μM . Mientras que para el MLA-OH se prepararon concentraciones de 200 μM y 100 μM por problemas que el compuesto presentó durante su cuantificación en el CLAR.

Cada concentración se inyectó 3 veces y se registró el área bajo la curva y con ello se obtuvo la ecuación de recta por regresión lineal.

Tratamiento de fluido de trofozoítos de *G. intestinalis* incubados con MLA-CO y MLA-OH para su cuantificación por CLAR

Las muestras obtenidas de cada lavado así como el fluido de los trofozoítos tratados con MLA-CO y MLA-OH se agitaron a T.A, 30 min, 500 rpm. De cada muestra se realizó una dilución 1:10 en ACN HPLC y se centrifugó a 8000 rpm, 10 min a 4 ° C para precipitar las proteínas residuales. El sobrenadante se tomó con una jeringa de 1 mL, se filtró con una membrana de 0.45 μm y el filtrado se inyectó de 3 a 4 veces en el CLAR.

Al paquete celular de trofozoítos obtenido en la última parte del lisado se le agregaron 500 μL de urea 8M, se homogeneizó y posteriormente se le agregaron 1000 μL de acetato de etilo y se dejó agitando por un periodo de 45 min a 500 rpm. Finalmente, se obtuvieron dos fase, la orgánica y la acuosa, se extrajo la orgánica, se filtró e inyectó para determinar la presencia de cualquiera de los dos compuestos en la membrana.

Anexo 2. Tablas y cromatogramas

Curvas de crecimiento de trofozoítos de *G. intestinalis*

A continuación se presentan los valores obtenidos de las curvas de crecimiento de *G. intestinalis* con un inóculo inicial de 50×10^3 y con 20×10^6 trofozoítos.

Tabla 19. Crecimiento de 50×10^3 trofozoítos de *G. intestinalis*

Tiempo(h)	0	24	48	72	96	120
*X	50000	216571	1304042	2222250	2834367	3613617
d.e	0	47176.25	423570.25	293264.17	382637.27	474943.27
%CV	0	21.78	17.14	13.19	13.50	13.14

*Obtenidos de seis ensayos por triplicado

Tabla 20. Crecimiento de 20×10^6 trofozoítos de *G. intestinalis* utilizando baño de hielo antes de la cuantificación de trofozoítos

Tiempo(h)	0	24	48	72	96	120
*X	20000000	40259500	50479167	584461667	59591667	61022333
d.e	0	2029001.8	3213796.8	7493561.3	7011166.7	7058678.8
%CV	0	0.0504	0.06367	0.12821	0.11765	0.11567
%Pérdida	0	83.7	85.1	85.8	87.8	86.1

*Obtenidos de tres ensayos por duplicado

Tabla 21. Crecimiento de 20×10^6 trofozoítos de *G. intestinalis* utilizando baño de hielo + centrifugación antes de la cuantificación de trofozoítos

Tiempo(h)	0	24	48	72	96	120
*X	20000000	246748333	339283333	412100000	488250000	438358333
d.e	0	45617984.5	54712117.8	4881598.1	40208052.7	52224373.7
%CV	0	0.18488	0.16126	0.01185	0.08235	0.11914

*Obtenidos de tres ensayos por duplicado

Evaluación *in vitro* de la actividad giardicida del MLA-CO y MLA-OH

Para la determinación de la CI_{50} y CI_{90} se realizaron cuatro ensayos por el método de subcultivo.

Tabla 22. Inhibición del crecimiento de los trofozoítos de *G. intestinalis* por los compuestos MLA y controles

Parámetro	CI_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			CI_{90} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	X	d.e	%CV	X	d.e	%CV
MLA-CO	1.347	0.1422	10.55	1256.618	6.9636	0.55
MLA-OH	0.3803	0.082	21.57	668.14	158.245	22.98
Alb	0.011	0.001	0.909	0.141	0.0025	1.77
Mtz	0.253	0.0191	7.55	2.551	0.315	12.36

Desarrollo del Método Analítico

Para el desarrollo del método analítico se realizaron dos curvas de calibración del compuesto MLA-CO empleando cinco concentraciones en las condiciones de trabajo indicadas en la sección V. Mientras que para el compuesto MLA-OH se realizó una curva con solo dos concentraciones debido a los problemas que presentó durante la cuantificación.

A continuación se presentan los datos empleados para la obtención de la linealidad del método de ambos compuestos.

Tabla 23. Curva 1 y 2 de calibración de MLA-CO

Conc μM	Curva 1			Curva 2		
	*X	d.e	%CV	*X	d.e	%CV
10	494	53.0161	10.73	681.66	75.7109	11.10
25	25636.67	842.805	3.28	27592.33	1845.5434	6.68
50	102900	1837.7715	17.85	119770.67	3944.035	3.29
100	202523.67	2807.5415	1.38	235572	22111.8529	9.38
200	424064.33	22005.3731	5.18	464716.67	43159.3116	9.28

* Área obtenida de tres inyecciones sucesivas

Tabla 24. Curva de calibración del MLA-OH

Curva 1			
Conc μM	*X	d.e	%CV
100	93733	6542.5551	6.98
200	232064	31080.9718	13.393

* Area obtenida de tres inyecciones sucesivas

Se muestran las gráficas de cada curva con su desviación estándar y la ecuación obtenida por regresión lineal.

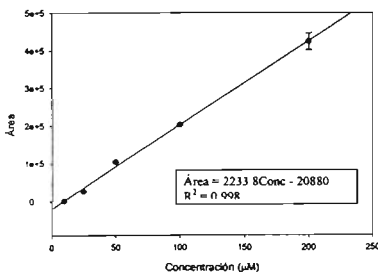


Figura 17. Curva 1 de calibración del MLA-CO

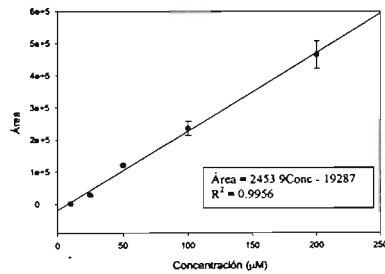


Figura 18. Curva 2 de calibración del MLA-CO

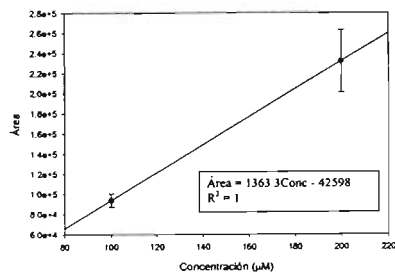


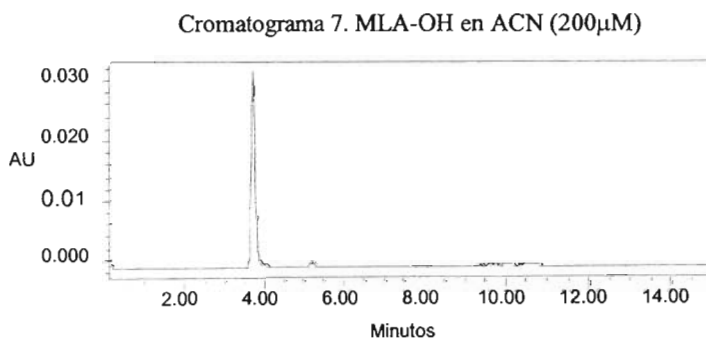
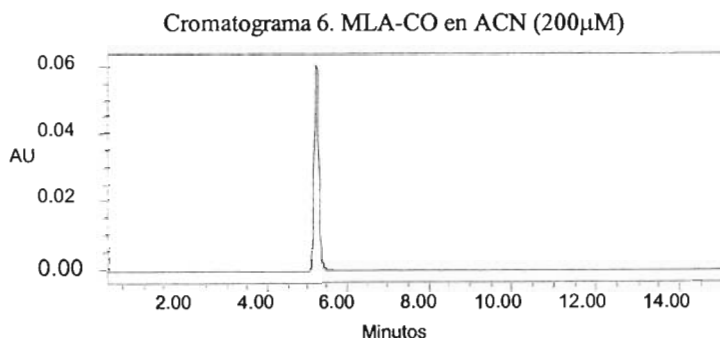
Figura 19. Curva 1 de calibración de de MLA-OH

A continuación se presentan los datos empleados para la obtención de la linealidad del método, utilizado posteriormente para la cuantificación de ambos compuestos.

Tabla 25. Determinación de la linealidad del método analítico

Parámetros	MLA-CO		MLA-OH			
	Curva 1	Curva 2	X	d.e	%CV	Curva 1
m	2233.8	2453.9	2343.85	155.6342	0.0664	1363.3
b	-20886	-19287	-20086.5	1130.6637	-0.0563	42598
r^2	0.998	0.9956	0.9968	0.0017	0.0017	1

Enseguida se muestran los cromatogramas correspondientes de cada compuesto así como su espectro de absorción en UV mostrando su λ 's de absorción propias de cada compuesto.



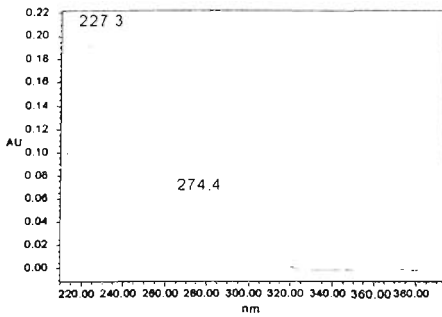


Figura 20. Espectro de MLA-CO

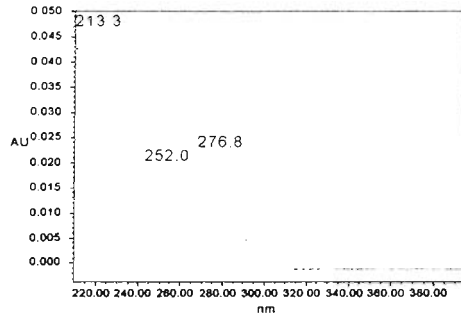


Figura 21. Espectro de MLA-OH

Cuantificación del MLA-CO y MLA-OH en fluidos de trofozoítos de *G. intestinalis*

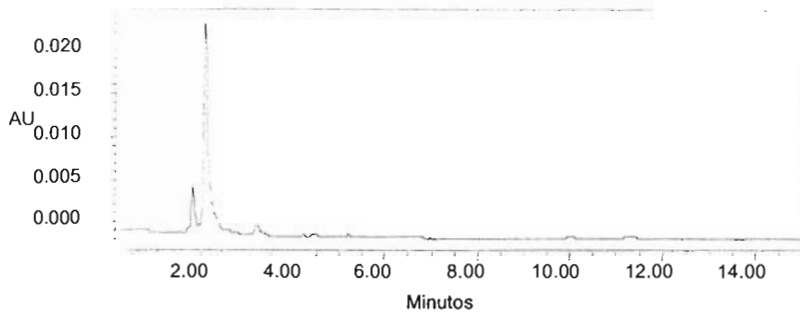
Para la determinación del MLA-CO y MLA-OH en el fluido de trofozoítos primero se realizó el muestreo de la matriz biológica (Sn del Ctrl) así como en los lavados (L1, L2, L3).

Tabla 26. Matriz biológica

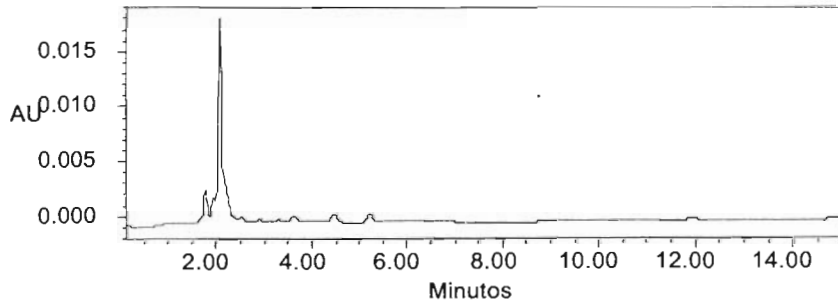
Parámetro	tr			Área		
	*X	d.e	%CV	*X	d.e	%CV
Medio	5.19	0.046	0.88	6130	1192.78	19.46
L1	5.214	0.0437	0.83	4934	567.755	11.51
L2	5.152	0.082	1.55	5255	1145.863	21.8
L3	5.183	0.0455	0.87	4987	150.789	1
Sn	5.127	0.0174	0.34	5345	293.833	5.5
P.C	5.153	0.05586	1.08	12896	397.394	3.08

* Obtenido de cuatro inyecciones de cuatro ensayos

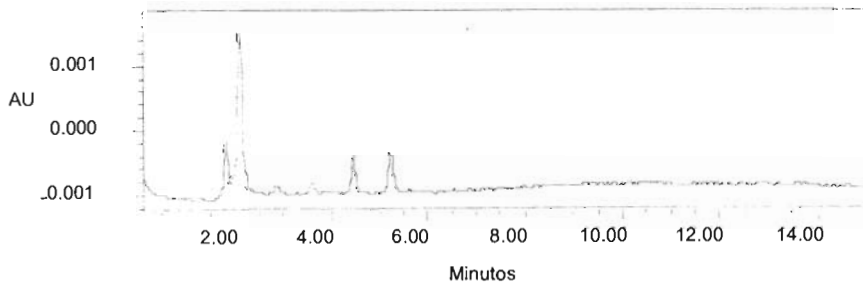
Cromatograma 8. Medio TYI-S-33 suplementado con 10% de suero bovino



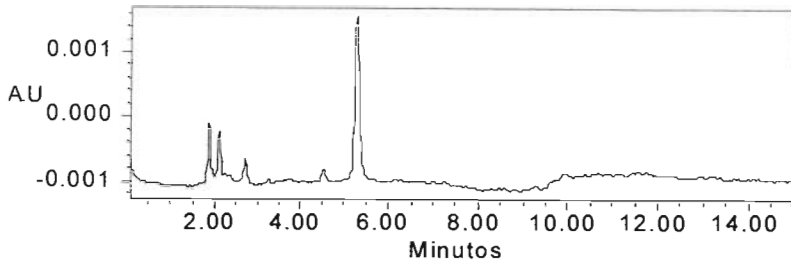
Cromatograma 9. Primer sobrenadante (Medio) del control



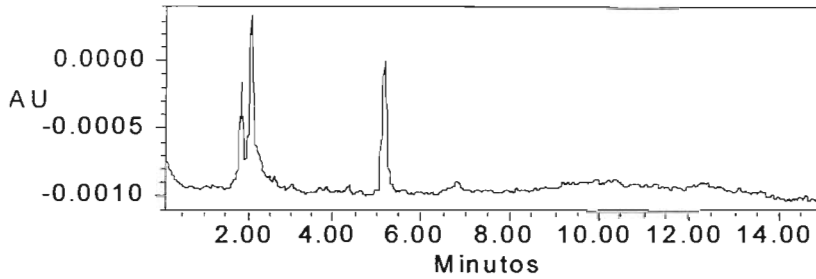
Cromatograma 10. Lavado 1 del control



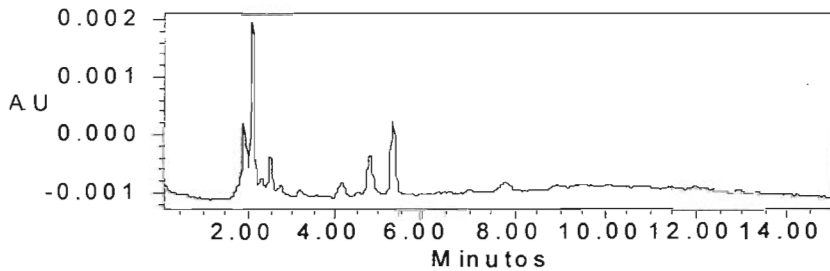
Cromatograma 11. Lavado 2 del control



Cromatograma 12. Lavado 3 del control



Cromatograma 13. Fluído de *G. intestinalis*



Los trofozoítos de *G. intestinalis* fueron expuestos con MLA-OH por 3 h y se hizo un muestreo de los sobrenadantes de los tres lavados y del fluído de trofozoítos.

Tabla 27. Determinación del MLA-OH del primer sobrenadante (Medio)

Parámetro	tr			Área			Conc(μ M)
	*X	d.e	%CV	*X	d.e	%CV	
E1	3.744	0.0095	0.25	55056	10554.692	19.17	716.3
E2	3.736	0.0075	0.20	55697	11135.282	19.99	721.01
E3	3.763	0.0109	0.28	49935	5792.827	11.60	678.74
E4	3.736	0.0054	0.14	40908	9197.984	22.48	612.52

*Obtenido de cuatro inyecciones

Tabla 28. Determinación de MLA-OH en el L1

Parámetro	tr			Área			Conc(μ M)
	*X	d.e	%CV	*X	d.e	%CV	
E1	3.758	0.0252	0.67	3500	1054.855	30.13	338.13
E2	3.737	0.0087	0.87	4361	1267.71	29.06	344.45
E3	3.739	0.0147	0.39	1013	113.562	11.21	319.89
E4	3.742	0.0066	0.17	1204	250.871	20.83	321.29

*Obtenido de cuatro inyecciones

Tabla 29. Determinación de MLA-OH en L2

Parámetro	tr			Área			Conc(μ M)
	*X	d.e	%CV	*X	d.e	%CV	
E1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E3	3.737	0.0226	0.6	659	100.762	15.29	317.29
E4	3.753	0.0071	0.18	715	157.306	22	317.7

*Obtenido de cuatro inyecciones

Tabla 30. Determinación de MLA-OH en L3

Parámetro	tr			Área			Conc(μ M)
	*X	d.e	%CV	*X	d.e	%CV	
E1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla 31. Determinación de MLA-OH en Sn

Parámetro	tr			Área			Conc(μ M)
	*X	d.e	%CV	*X	d.e	%CV	
E1	3.747	0.00495	0.13	2315	182.872	7.89	329.44
E2	3.767	0.0217	0.57	4412	598.412	13.56	344.82
E3	3.726	0.0081	0.21	2063	250.891	12.16	327.66
E4	3.737	0.0078	0.21	1843	181.474	9.84	325.98

*Obtenido de cuatro inyecciones

Tabla 32. Determinación del MLA-OH en Paquete celular (P.C)

Parámetro	tr			Área			Conc(μ M)
	*X	d.e	%CV	*X	d.e	%CV	
E1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla 33. Porcentaje total de MLA-OH detectado en lavados y en el interior de los trofozoítos de *G. intestinalis*

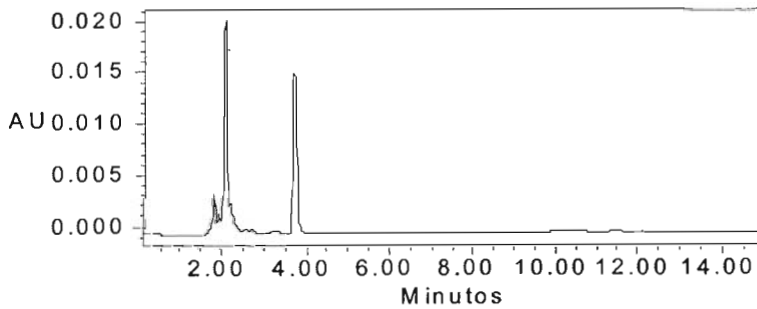
Ensayo	% no ingreso	% ingreso
E1	70.55	29.45
E2	71.25	28.75
E3	88.03	11.97
E4	83.73	16.27

Tabla 34. Recuperación total del MLA-OH en cada ensayo

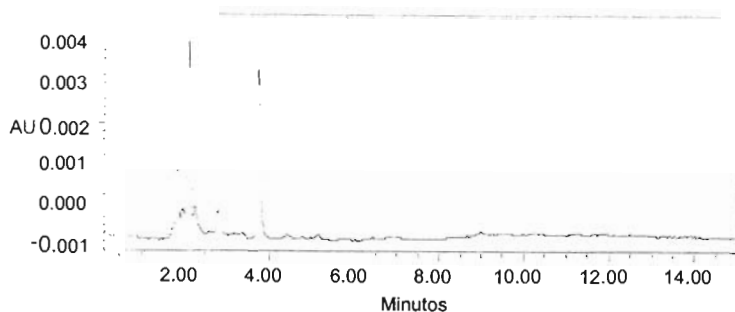
	Conc(uM)	%Recup	%Pérdida
E1	1386.87	92.72	7.28
E2	1410.28	94.32	5.68
E3	1643.58	NA	NA
E4	1577.49	NA	NA

NA, no aplica

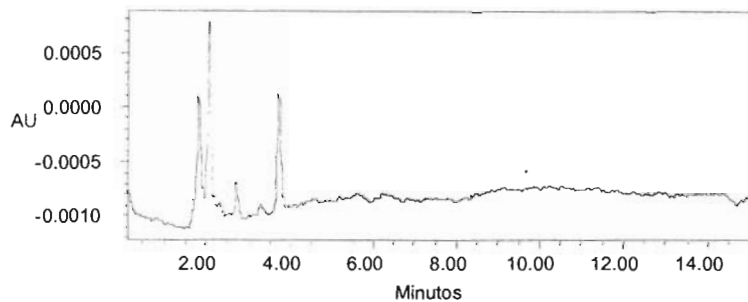
Cromatograma 14. Primer sobrenadante (Medio) de trofozoítos tratados con MLA-OH



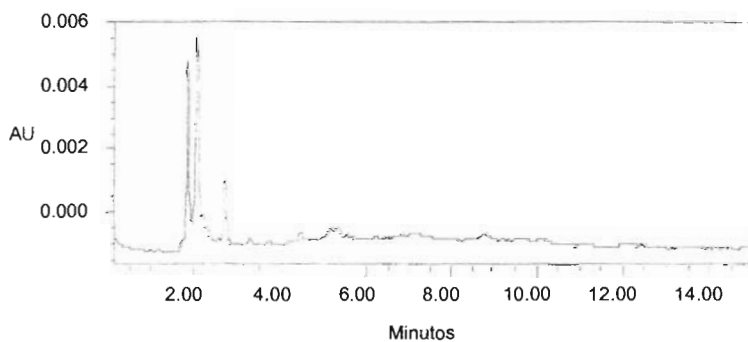
Cromatograma 15. Lavado 1 de trofozoítos tratados con MLA-OH



Cromatograma 16. Lavado 2 de trofozoítos tratados con MLA-OH

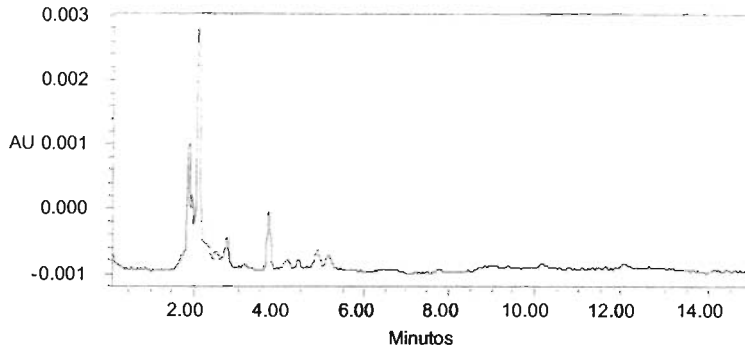


Cromatograma 17. Lavado 3 de trofozoítos tratados con MLA-OH



ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Cromatograma 18. Fluído de trofozoítos de *G. intestinalis* (Sn)



De igual forma, los trofozoítos de *G. intestinalis* fueron expuestos por 3h y se realizó el muestreo de los sobrenadantes en las lavados, flúidos y en el paquete celular para identificar la presencia del MLA-CO y MLA-OH.

Tabla 35. Determinación de MLA-CO en el primer Sn (M)

Parámetro	tr			Área			Conc(μM)
	*X	d.e	%CV	*X	d.e	%CV	
E1	5.251	0.0007	0.013	402133	31095.727	7.73	1801.39
E2	5.267	0.012	0.227	376516	26908.565	7.15	1692.1
E3	5.199	0.0269	0.517	370404	6817.923	1.84	1666.02
E4	5.259	0.0254	0.484	372052	1905.652	0.51	1673.05
E5	5.375	0.0225	0.418	352543	3437.251	0.97	1590.05
E6	5.237	0.0283	0.54	338285	22989.264	6.79	1528.99
E7	5.221	0.0078	0.149	323386	10688.626	3.31	1465.41

*Obtenido de cuatro inyecciones

M= medio

Tabla 36. Determinación de MLA-CO en L1

Parámetro	tr			Área			Conc(μM)
	*X	d.e	%CV	*X	d.e	%CV	
E1	5.262	0.0368	0.69	20412	3440.419	16.85	172.79
E2	5.263	0.0225	0.42	19067	4713.602	24.72	167.05
E3	5.315	0.0491	0.92	16443	2469.609	15.02	155.85
E4	5.232	0.0056	0.1	8516	1291.939	15.17	122.03
E5	5.2	0.0247	0.47	15173	3131.422	20.64	150.43
E6	5.209	0.014	0.26	17224	2701.525	15.68	159.18
E7	5.23	0.0326	0.62	20001	3678.059	18.39	171.03

*Obtenido de cuatro inyecciones

Tabla 37. Determinación de MLA-CO en L2

Parámetro	tr			Área			Conc(μM)
	*X	d.e	%CV	*X	d.e	%CV	
E1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E2	5.21	0.0662	1.271	8367	1587.551	18.97	121.4
E3	5.291	0.0764	1.443	6639	285.412	4.29	144.02
E4	5.307	0.0141	0.266	6395	1436.13	22.45	122.98
E5	5.175	0.036	0.696	11684	1449.75	9.84	135.55
E6	5.161	0.0424	0.822	4782	879.11	18.31	106.1
E7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*Obtenido de cuatro inyecciones

Tabla 38. Determinación de MLA-CO en L3

Parámetro	tr			Area			Conc(μ M)
	*X	d.e	%CV	*X	d.e	%CV	
E1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E2	5.194	0.0339	0.652	3472	638.455	18.39	100.51
E3	5.264	0.0225	0.433	2595	478.084	18.42	96.77
E4	5.257	0.0307	0.583	13331	1875.954	14.07	142.57
E5	5.183	0.0473	0.911	11903	450.427	3.78	136.48
E6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*Obtenido de cuatro inyecciones

Tabla 39. Determinación de MLA-CO en Sn

Parámetro	tr			Area			Conc(μ M)
	*X	d.e	%CV	*X	d.e	%CV	
E1	5.294	0.0191	0.366	16355	895.197	5.47	155.48
E2	5.201	0.0265	0.51	8261	453.361	5.48	120.94
E3	5.146	0.0125	0.244	4868	454.939	9.34	106.47
E4	5.193	0.0113	0.217	12551	989.712	7.88	139.25
E5	5.176	0.0431	0.833	12244	887.371	7.25	137.93
E6	5.167	0.0275	0.533	6319	286.378	4.53	112.66
E7	5.171	0.0136	0.264	4336	501.324	11.56	104.2

*Obtenido de cuatro inyecciones

Tabla 40. Determinación de MLA-CO y MLA-OH en Paquete celular

Parámetro	tr			Area			Conc(μ M)
	*X	d.e	%CV	*X	d.e	%CV	
E1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E3-MLA-CO	5.17	0.0191	0.366	12575.66	631.666	5.02	139.35
E3-MLA-OH	3.178	0.0042	0.114	2404	137.178	5.71	330.09
E4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E6-MLA-CO	5.178	0.0162	0.314	25641	1659.428	6.47	237.76
E7 MLA-OH	3.706	0.0556	0.0015	9948	576.292	5.79	385.42

*Obtenido de cuatro inyecciones

Tabla 41. Determinación de MLA-OH en trofozoitos tratados con MLA-CO

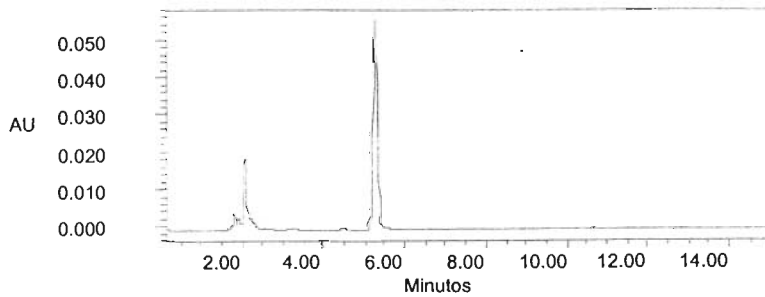
Parámetro	tr			Area			Conc(μ M)
	*X	d.e	%CV	*X	d.e	%CV	
E1-Sn	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E2-Sn	4.494	0.0459	0.102	3931	762.261	19.39	341.3
E3-Sn	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E4-Sn	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E5-Sn	4.469	0.00495	0.117	5982	130.405	2.18	356.34
E6-Sn	4.576	0.0657	1.436	8789	2168.696	24.67	376.93
E7-Sn	4.621	0.0155	0.33	5532	1053.365	19.04	353.04

*Obtenido de cuatro inyecciones

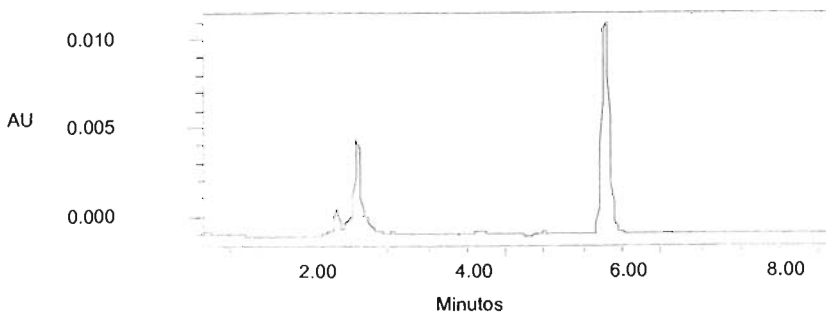
Tabla 42. Relación de MLA-CO detectado en lavados y fluido

Ensayo	Conc(μM)	Conc. Int		Biotrasf		Total
		(interior)	(P.C)	(interior)	(P.C)	
E1	1978.18	155.48	0	0	0	2133.66
E2	2080.06	120.94	0	344.32	0	2545.32
E3	2062.66	106.47	139.35	0	333.01	2641.49
E4	2060.33	139.25	0	0	0	2199.58
E5	2012.51	137.93	0	359.49	0	2509.93
E6	1794.27	112.66	237.76	380.26	0	2524.95
E7	1636.44	104.2	0	356.16	388.83	2485.63

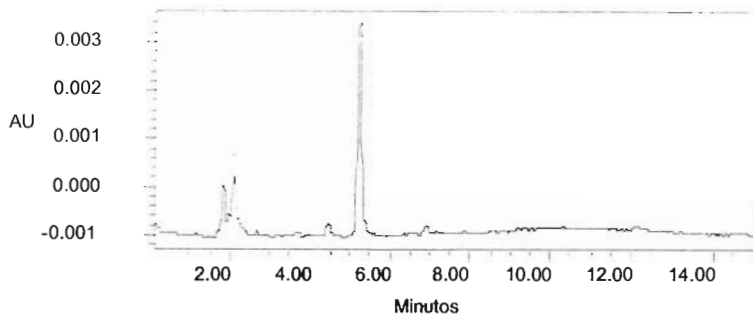
Cromatograma 19. Primer sobrenadante (M) de trofozoítos tratados con MLA-CO



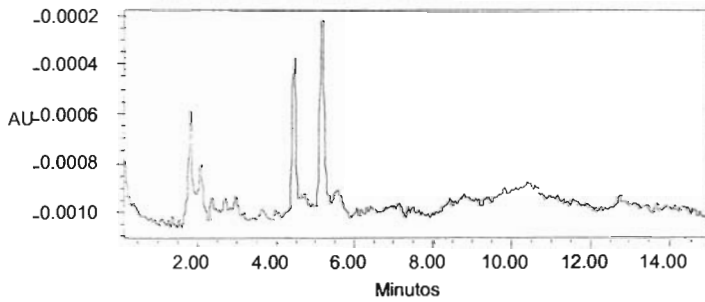
Cromatograma 20. Lavado 1 de trofozoítos tratados con MLA-CO



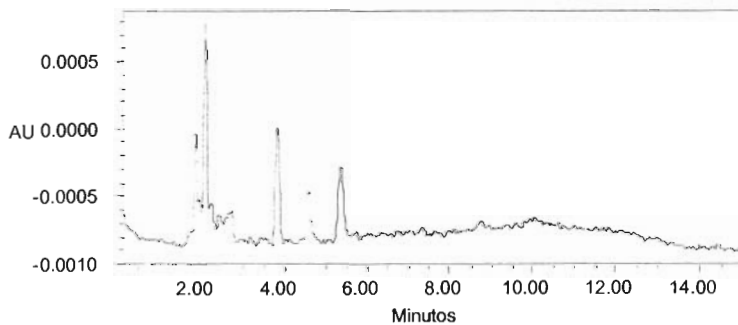
Cromatograma 21. Lavado 2 de trofozoitos tratados con MLA-CO



Cromatograma 22. Lavado 3 de trofozoitos tratados con MLA-CO



Cromatograma 23. Fluído de trofozoitos tratados con MLA-CO



Cromatograma 24. Fluido de trofozoítos tratados con MLA-CO

