



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION EXPERIMENTAL DE LA ACTIVIDAD  
GIARDICIDA PREDICHA PARA COMPUESTOS  
HETEROCICLICOS POR EL MODELO DE COMPUTO  
 $k$ -NN QSAR

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

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

**YARELI ROJAS AGUIRRE**



MEXICO, D.F.



2005

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

m. 349460



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	ABEL GUTIÉRREZ RAMOS
VOCAL	FRANCISCO HERNÁNDEZ-LUIS
SECRETARIO	ALEJANDRO ORTIZ OSORNIO
1ER SUPLENTE	RUTH BUSTAMANTE GARCÍA
2DO SUPLENTE	BERTA ESPINOZA GUTIÉRREZ

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

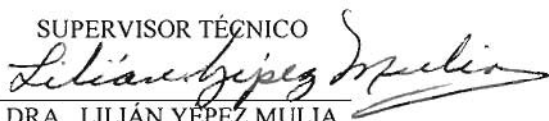
UNIDAD DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y PARASITARIAS, LABORATORIO DE  
PARASITOLOGÍA, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS.

DEPARTAMENTO DE FARMACIA, LABORATORIO 122, CONJUNTO E, FACULTAD DE  
QUÍMICA, UNAM.

ASESOR

  
DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ-LUIS

SUPERVISOR TÉCNICO

  
DRA. LILIÁN YÉPEZ MULIA

SUSTENTANTE

  
YARELI ROJAS AGUIRRE

*A mis padres*

*Por recibir de ustedes la mejor herencia: la educación*

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme crecer personal y profesionalmente.

Al laboratorio 122 por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y por el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

Al Subprograma 127 "Formación básica en investigación" por el apoyo económico brindado durante la realización de esta tesis

Al CONACYT (proyecto V43629-M) por el financiamiento otorgado para la compra de materiales y reactivos utilizados en este trabajo.

A la Dra. Lilián Yopez Mulia por el apoyo, los consejos, la orientación y la contribución al desarrollo de la parte biológica de este trabajo.

Al Dr. Francisco Hernández le agradezco el tiempo, la atención, la disposición, el apoyo y los valiosos consejos, tanto académicos como personales, recibidos de su parte. Muchas Gracias

A Beatriz Adriana Aceves, por su gran apoyo y compañía en los momentos difíciles además de sus consejos y su contribución a este trabajo.

A Fabián López por enseñarme y orientarme en algunos temas que forman parte de este escrito; por su apoyo y sus consejos; por su amistad y por compartir no solo este momento...

A Adriana y Araceli por acompañarme en todo momento y llegar conmigo al final de una de las etapas más importantes de mi vida. Muchas gracias!

A Pedro, por sus consejos y por el material bibliográfico proporcionado!

A Mónica, Emilio y a la Fam. Corleone porque el tiempo que compartimos fue de lo mejor.

A Brenda, Griselda, Berenice, Leo, Abraham, Jorge y Cristian les agradezco los buenos momentos y sobre todo el haber aprendido con ustedes que a la universidad no solo se viene a estudiar...

A mis padres por haber estado conmigo en todo momento, por su apoyo, confianza y motivación; por formar parte de este trabajo y por ayudarme a ser lo que soy ahora.

Y a esa 'personita' por transmitirme siempre su alegría

A Yankadi Makru  
Mingi moducué Nzambi  
Mono salaka acheogún ota

# ÍNDICE

Introducción.....	1
1. Antecedentes.....	3
1.1 <i>Giardia intestinalis</i> como agente causal de la giardiosis.....	3
1.1.1. Morfología.....	4
1.1.2. Ciclo de vida.....	5
1.1.3. Metabolismo.....	6
1.1.4. Patogenia.....	6
1.1.5. Manifestaciones clínicas de la giardiosis.....	7
1.1.6. Tratamiento.....	8
1.2. Los bencimidazoles como agentes antiparasitarios.....	11
1.2.1. Relaciones estructura-actividad en bencimidazoles antiparasitarios .....	12
1.3. Diseño asistido por computadora.....	13
1.3.1 Relación cuantitativa estructura-actividad.....	14
1.4. Análisis PROBIT.....	17
2. Planteamiento del problema.....	19
3. Hipótesis.....	19
4. Objetivos.....	19
4.1. Objetivo general.....	19
4.2. Objetivos particulares.....	19
5. Procedimientos experimentales.....	20
5.1. Curva de crecimiento de trofozoítos de <i>G. intestinalis</i> .....	20
5.2. Determinación de la actividad giardicida del albendazol por el método de subcultivo.....	20
5.3. Determinación de la actividad giardicida <i>in vitro</i> de 10 compuestos heterocíclicos .....	21
5.4. Exploración de la estabilidad de los compuestos en el medio de cultivo.....	21
6. Resultados y discusión.....	23
6.1. Curva de crecimiento de trofozoítos de <i>G. intestinalis</i> .....	23
6.2. Evaluación de la actividad giardicida de los compuestos heterocíclicos .....	23
6.3. Pruebas de estabilidad.....	27
7. Conclusiones.....	30

Bibliografía.....	32
Anexo 1. Métodos y materiales.....	35
Anexo 2. Tablas de Resultados.....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Datos epidemiológicos mensuales de la giardiosis en México en 2003.....	3
Figura 2. Trofozoíto (A) y quiste (B) de <i>G. intestinalis</i> .....	4
Figura 3. Ciclo de vida de <i>G. intestinalis</i> .....	7
Figura 4. Algunos fármacos utilizados para el tratamiento de la giardiosis.....	8
Figura 5. Anillo de bencimidazol.....	11
Figura 6. Equilibrio tautomérico del bencimidazol.....	11
Figura 7. Derivados del 1 <i>H</i> -bencimidazol-2-carbamato de metilo.....	12
Figura 8. Relación estructura actividad en el anillo bencimidazólico.....	12
Figura 9. Estrategia para el descubrimiento de compuestos con actividad giardicida a partir de modelos <i>k</i> -NN QSAR.....	15
Figura 10. Representación gráfica de la relación dosis-respuesta cuantal.....	17
Figura 11. Representación gráfica del cálculo de la CI <sub>50</sub> .....	18
Figura 12. Procedimiento para realizar la curva de crecimiento de los trofozoítos de <i>G. intestinalis</i> .....	20
Figura 13. Evaluación de la actividad giardicida por el método de subcultivo.....	22
Figura 14. Pruebas de estabilidad.....	22
Figura 15. Curva de crecimiento de los trofozoítos de <i>G. intestinalis</i> .....	23
Figura 16. Cromatogramas de los compuestos estudiados.....	28
Figura 17. Cámara de Neubauer.....	37

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dosis recomendadas y efectos adversos de los fármacos utilizados para tratar la giardiosis .....	10
Tabla 2. Compuestos heterocíclicos a evaluar.....	16
Tabla 3. Actividad giardicida <i>in vitro</i> de 10 compuestos heterocíclicos.....	24
Tabla 4. Curva de crecimiento de $50 \times 10^3$ trofozoítos de <i>G. intestinalis</i> .....	38
Tabla 5. Resultados de la curva de crecimiento de trofozoítos de <i>G. intestinalis</i> .....	42
Tabla 6. Resultados de actividad del compuesto NSC 195333. Ensayo 1.....	42
Tabla 7. Resultados de actividad del compuesto NSC 195333. Ensayo 2.....	43
Tabla 8. Resultados de actividad del compuesto NSC 3826. Ensayo 1.....	43
Tabla 9. Resultados de actividad del compuesto NSC 195333. Ensayo 2.....	43
Tabla 10. Resultados de actividad del compuesto NSC 401569. Ensayo 1.....	44
Tabla 11. Resultados de actividad del compuesto NSC 401569. Ensayo 2.....	44
Tabla 12. Resultados de actividad del compuesto NSC 525203. Ensayo 1.....	44
Tabla 13. Resultados de actividad del compuesto NSC 195333. Ensayo 2.....	45
Tabla 14. Resultados de actividad del compuesto FHL 210. Ensayo 1.....	45
Tabla 15. Resultados de actividad del compuesto FHL 210. Ensayo 2.....	45
Tabla 16. Resultados de actividad del compuesto FHL 211. Ensayo 1.....	46
Tabla 17. Resultados de actividad del compuesto FHL 211. Ensayo 2.....	46
Tabla 18. Resultados de actividad del compuesto FHL 212. Ensayo 1.....	46
Tabla 19. Resultados de actividad del compuesto FHL 212. Ensayo 2.....	47
Tabla 20. Resultados de actividad del compuesto FHL 213. Ensayo 1.....	47
Tabla 21. Resultados de actividad del compuesto FHL 213. Ensayo 2.....	47



Tabla 22. Resultados de actividad del compuesto FHL 214. Ensayo 1.....	48
Tabla 23. Resultados de actividad del compuesto FHL 214. Ensayo 2.....	48
Tabla 24. Resultados de actividad del compuesto FHL 215. Ensayo 1.....	49
Tabla 25. Resultados de actividad del compuesto FHL 215. Ensayo 2.....	49
Tabla 26. $CI_{50}$ obtenida para cada compuesto heterocíclico evaluado.....	50

## Introducción

Las enfermedades parasitarias constituyen uno de los problemas cruciales de salud pública en los países en vías de desarrollo. En la República Mexicana, estas infecciones son causa severa de morbilidad y mortalidad en la población infantil, ya que cerca del 45 % de los niños tienen parásitos. En varios de estos padecimientos los tratamientos con medicamentos disponibles no son totalmente satisfactorios ya que se presentan diversos efectos secundarios.

Dentro de las enfermedades parasitarias más comunes se encuentra la giardiosis causada por *Giardia intestinalis*, un protozoo flagelado que infecta principalmente la porción del duodeno y yeyuno del intestino delgado en el humano.

Esta enfermedad puede ser sintomática o asintomática. En el primer caso se presentan cuadros diarreicos agudos o crónicos, así como el síndrome de mala absorción, que afecta principalmente a los niños y altera gravemente el crecimiento y desarrollo de los mismos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año 280 millones de personas resultan afectadas en todo el mundo, aunque la incidencia puede ser más alta en la población infantil de los países en vías de desarrollo en donde prevalece hasta en un 30%. En México esta parasitosis es muy frecuente ya que se presenta entre un 20% y un 50% de los casos de infecciones intestinales.

Para tratar este padecimiento, el fármaco de elección es el metronidazol en administración oral por siete días. Aunque en términos generales resulta efectivo, este compuesto ocasiona efectos adversos en el paciente además de que su uso prolongado e indiscriminado genera resistencia de los parásitos. Por tal motivo surge la necesidad de desarrollar nuevos fármacos para combatir esta enfermedad.

El desarrollo de un nuevo fármaco comienza con el descubrimiento de una molécula con actividad biológica. Tradicionalmente este hallazgo se da en los laboratorios que estudian productos naturales o que sintetizan compuestos químicos. Sin embargo, son procesos largos, costosos y actualmente poco eficientes. Recientemente, a estos procedimientos se ha sumado el diseño molecular asistido por computadora como una herramienta para incrementar la eficiencia del descubrimiento y mejorar la optimización de principios activos. Una de estas herramientas es *k*-NN QSAR (relación estructura-actividad por asociación de estructuras vecinas), que busca moléculas biológicamente activas en bases de datos ya existentes. La forma en que trabaja es mediante la elaboración de modelos estadísticos para predecir la actividad biológica de diversas estructuras químicas.

En años recientes, nuestro grupo de investigación sintetizó y evaluó una serie de derivados del bencimidazol y benzoxazol contra *Giardia intestinalis*. Con la información adquirida, se desarrollaron algunos modelos de predicción *k*-NN QSAR para buscar otros compuestos que pudieran mostrar

actividad contra el protozooario en cuestión. Los compuestos seleccionados y comercialmente disponibles se adquirieron y los no disponibles se sintetizaron en nuestro laboratorio. Una vez que se contaba con los compuestos, fue necesario determinar la actividad giardicida experimental de los mismos para validar los modelos teóricos propuestos.

En este contexto se ubica el presente trabajo de tesis, el cual consistió en la evaluación experimental de la actividad giardicida predicha por el método *k*-NN QSAR para diez compuestos heterocíclicos comercialmente disponibles. Esto se realizó por medio de la evaluación de la actividad biológica *in vitro* contra *G. intestinalis* por medio del método de subcultivo. Posteriormente, por medio de un análisis PROBIT, se obtuvo la  $CI_{50}$  de dichos compuestos. Finalmente, con los resultados obtenidos, se observó la correlación existente entre la actividad predicha por el método *k*-NN QSAR y la actividad experimental.

## 1. Antecedentes

En este apartado se encuentra la información referencial del presente trabajo de tesis. La información está dividida en cuatro secciones principales: la primera contiene los aspectos relevantes de *Giardia intestinalis* como agente causal de la giardiosis; la segunda presenta algunas generalidades sobre los bencimidazoles como antiparasitarios, la tercera incluye los aspectos del diseño asistido por computadora y la cuarta describe las bases para el cálculo de la actividad giardicida.

### 1.1. *Giardia intestinalis* como agente causal de la giardiosis

La giardiosis es la infección por protozoarios más común a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud estima que cada año se infectan 280 millones de personas en todo el mundo (Upcroft, 2001).

En México, la giardiosis es una de las parasitosis más importantes. En el año 2003 se reportaron 53, 193 casos. En la población infantil es donde se observó el mayor número de casos, siendo los niños de entre 1 y 9 años los más afectados (Figura 1). El estado de Sonora, el Distrito Federal y el Estado de México son los que presentaron una mayor incidencia de giardiosis con 8 453, 4 286 y 3 709 casos respectivamente (Sistema Único de Información para la vigilancia epidemiológica, 2003).

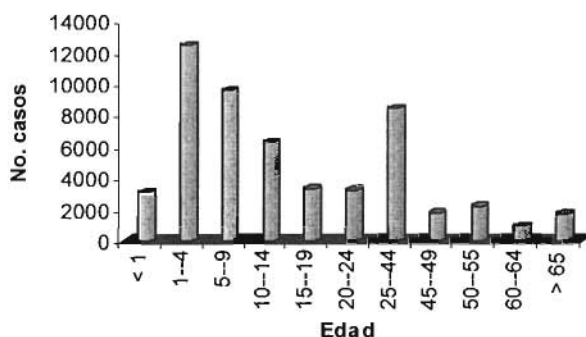


Figura 1. Datos epidemiológicos mensuales de la giardiosis en México en 2003

### 1.1.1. Morfología

Morfológicamente *G. intestinalis* adopta dos formas: el trofozoito y el quiste. El trofozoito es el que se encuentra como parásito en el intestino delgado del hombre; el quiste es el que va a salir con la materia fecal y se va a encontrar en el medio ambiente (Figura 2).

Este parásito pertenece a la clase *Mastigophora*, es decir, son protozoarios que presentan flagelos y membrana ondulantes. *G. intestinalis* tiene 4 pares de flagelos y estos se designan de acuerdo a su posición en: anterior, posterior, neutral y caudal. El trofozoito mide de 12 a 20  $\mu\text{m}$  de largo y de 6 a 15  $\mu\text{m}$  de ancho (Romero Cabello, 1999).

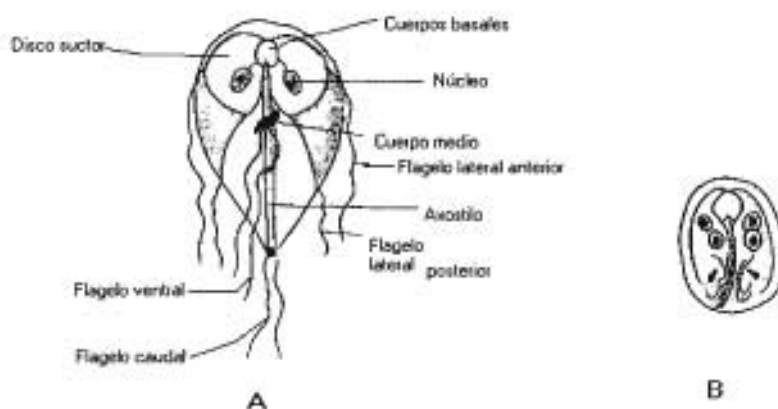


Figura 2. Trofozoito (A) y quiste (B) de *G. intestinalis*.

El trofozoito tiene simetría bilateral, es periforme, con un extremo anterior ancho y un extremo posterior muy delgado. En la parte anterior o más alta, tiene una estructura llamada disco ventral con una parte central rígida llamada axonema o axostilo que funciona como esqueleto; en la parte donde está el disco ventral hay dos núcleos idénticos con una enorme masa de cromatina central; sobre el axostilo se encuentran unas estructuras que se conocen como cuerpos basales. El disco ventral es la estructura más distintiva del parásito, es una estructura larga y rígida estabilizada por numerosos enlaces entrecruzados entre sus componentes y sirve para unirse al intestino delgado (Romero Cabello, 1999). El disco ventral está constituido por microtúbulos que son cilindros formados por

heterodímeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ - tubulina (Elmendorf et al., 2002). Los cuerpos basales son los centros de organización de los microtúbulos. Cada uno de los ocho flagelos se origina a partir de un cuerpo basal. Los cuatro cuerpos basales centrales están unidos directamente al disco (Gillin et al., 1996).

El quiste es una estructura ovalada más pequeña, que puede medir desde 7 hasta 12  $\mu\text{m}$  y tiene como carácter fundamental ser la fase de resistencia que le permite vivir en el medio ambiente (Romero Cabello, 1999). En los quistes se observan por lo general cuatro núcleos, restos de flagelos y el axonema (Marquardt, 2000). El quiste contiene altas concentraciones de carbohidratos, de los cuales casi el 90% es galactosamina, en la forma de *N*-acetilgalactosamina (Adam, 2001) la cual sólo se encuentra en las células enquistadas; las enzimas responsables de la síntesis de galactosamina a partir de la glucosa sólo son inducidas durante el enquistamiento (Svärd et al., 2002).

#### 1.1.2. Ciclo de vida

La infección comienza después de la ingestión de agua contaminada con quistes, por contacto persona-persona, contacto con animales infectados y por ingesta de comida contaminada. Se necesitan entre 10 a 25 quistes para establecer la infección (Mandell, 1997).

Una vez ingerido, el quiste pasa por la parte alta del tubo digestivo; en el estómago se reblandece la pared quística, después se rompe la pared y se libera el trofozoíto en el duodeno. El parásito que está emergiendo, pronto se divide en dos trofozoítos binucleados los cuales se unen específicamente al intestino delgado. Los trofozoítos se unen a las células epiteliales del intestino a través del disco ventral. Allí crecen y se multiplican por fisión binaria longitudinal. Los trofozoítos pueden persistir en el intestino delgado por semanas o por años (Romero Cabello, 1999).

Los trofozoítos se empiezan a enquistar cuando migran a la parte baja del intestino delgado donde el pH es mayor (pH de 7.8) y cuando están en presencia de sales biliares primarias, en especial los conjugados de taurina y glicina con ácido cólico y ácido quenodesoxicólico. También en presencia de ácido grasos, como ácido oleico y ácido mirístico. Los quistes permiten la continuidad de las infecciones a través de la contaminación del agua y alimentos (Figura 3) (Ortega Pierres y Argüello, 1995).

Del ciclo de vida se puede decir que existen al menos dos puntos vulnerables para combatir a este parásito. El control de la ingestión de quistes por medidas sanitarias y la eliminación de trofozoítos por sustancias químicas.

### 1.1.3. Metabolismo

*G. intestinalis* es un anaerobio microaerotolerante, carece de mitocondria y biotransforma la glucosa a etanol, acetato y CO<sub>2</sub>. Su metabolismo es glicolítico y fermentativo. La parte terminal de la ruta glicolítica la ejecuta la piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (PFOR), enzima análoga a la piruvato dehidrogenasa que se encuentra los en organismos aeróbicos. La PFOR cataliza la descarboxilación del piruvato a acetyl CoA. El ATP es generado a nivel de fosforilación de sustrato; la ruta de los ácidos tricarbóxicos que se encuentra en los eucariotes está ausente, aunque la malato deshidrogenasa está presente. No se han encontrado citocromos. Una oxidasa terminal que convierte el oxígeno directamente a agua elimina el oxígeno de este organismo microaerotolerante para proteger a la PFOR y a las ferredoxinas. Los productos finales de la fermentación son CO<sub>2</sub>, acetato, alanina y etanol, los cuales pueden variar de acuerdo a las condiciones de crecimiento. Los mecanismos convencionales del manejo de estrés oxidante, incluyendo la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, peroxidasa y glutatión están ausentes en *Giardia* pero son reemplazados por tioredoxin reductasas (Upcroft y Upcroft 2001). Los aspectos metabólicos aquí señalados podrían ser aprovechados en la búsqueda de compuestos giardicidas de acción selectiva.

### 1.1.4. Patogenia

La adherencia de *G. intestinalis* al intestino delgado se lleva a cabo por la unión del disco ventral al ribete de cepillo de los enterocitos mediante un mecanismo de succión. Aunque se piensa que el trofozoito interfiere con la integridad del borde de cepillo en la parte alta del intestino delgado, los mecanismos patogénicos específicos no están del todo claros. Todavía no se entiende por qué algunos individuos infectados permanecen asintomáticos mientras que otros desarrollan la enfermedad. Algunos datos indican que los trofozoitos producen una obstrucción mecánica bloqueando las actividades de absorción relacionadas a las grasas y a las vitaminas, mientras que otros atribuyen la irritación de las vellosidades y de la mucosa a la unión directa del organismo por medio de su disco ventral. Otros estudios han mostrado que el daño a la mucosa da lugar a deficiencias de lactasa, sucrasa y xilasa. La digestión reducida y absorción de los solutos pueden causar diarrea osmótica con formación de gas como resultado del rompimiento de azúcares por parte de las bacterias. Factores como la dieta, la motilidad intestinal y el estado nutricional del individuo influyen en patogénesis de la giardiosis (Wolfe, 1992).

### 1.1.5. Manifestaciones clínicas de la giardiasis

La sintomatología difiere de persona a persona, dependiendo del individuo, de la duración de la infección, y de los factores del parásito.

Después de la ingestión de los quistes hay un periodo de incubación de 1-2 semanas antes del comienzo de los síntomas. El lapso desde la ingestión de los quistes hasta la detección de éstos en las heces puede variar y ser más prolongado que el periodo de incubación. Por lo tanto, el examen de las heces en el comienzo de los síntomas puede ser negativo (Mandell et al., 1997).

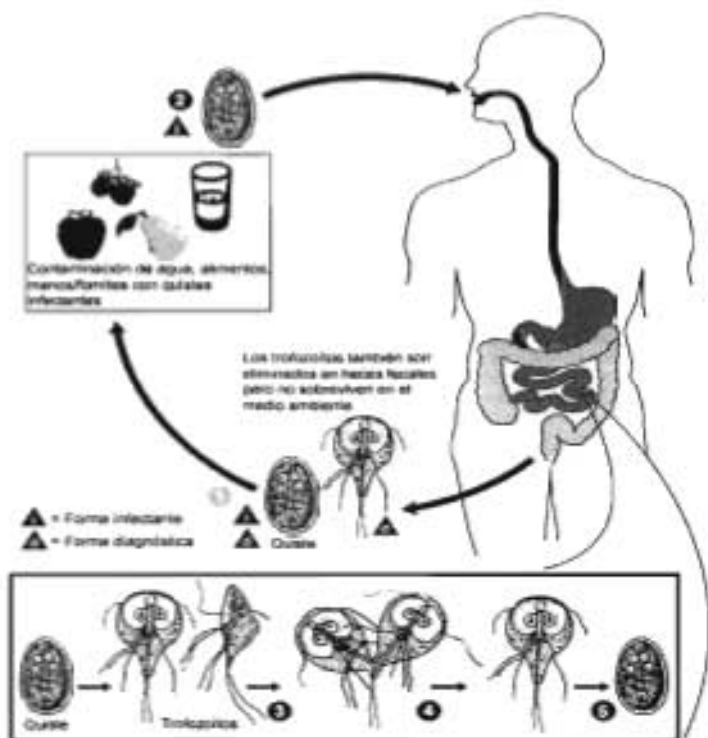


Figura 3. Ciclo de vida de *Giardia intestinalis*.



La giardiosis sintomática se caracteriza por diarrea de comienzo agudo, cólicos abdominales, distensión y flatulencia. El paciente en general presenta sensación de malestar general, náuseas, anorexia y eructos sulfúricos. El vómito y la fiebre son menos frecuentes. Al comienzo las heces pueden ser abundantes y acuosas pero luego son grasosas, malolientes y pueden flotar (Mandell et al., 1997). Por lo general, macroscópicamente no se observa sangre, pus o moco. Algunas infecciones agudas pueden desaparecer espontáneamente, pero en otros casos se pueden convertir en una infección crónica (Wolfe, 1992). Los pacientes que evolucionan hasta desarrollar una diarrea crónica tienen un marcado malestar general, cefaleas ocasionales y malestar abdominal. En general hay pérdida de peso. Los periodos de diarrea pueden alternarse con periodos de constipación con altibajos del síndrome durante meses hasta que se administra el tratamiento o se produce la resolución espontánea (Wolfe, 1992).

#### 1.1.6. Tratamiento

Se han utilizado diversos fármacos para tratar la giardiosis, entre ellos algunos derivados del nitroimidazol (metronidazol y tinidazol), un nitrofurano (furazolidona) y recientemente un derivado del tiazol (nitazoxanida) (Figura 4) (Tabla 1). Así mismo se han utilizado algunos bencimidazoles, (albendazol y mebendazol) aunque ninguno de ellos se ha diseñado específicamente con ese propósito.

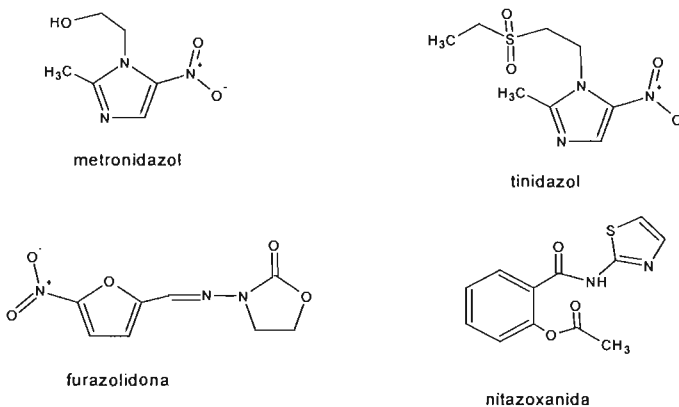


Figura 4. Algunos fármacos utilizados en el tratamiento de la giardiosis

Inicialmente, el metronidazol [1-( $\beta$ -hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol] se usó para tratar infecciones provocadas por *Trichomonas vaginalis*. Posteriormente se demostró que el metronidazol también era efectivo contra *Entamoeba histolytica* y contra *G. intestinalis*. A partir de ese momento, el metronidazol es el fármaco más ampliamente utilizado para tratar la giardiosis, aparte de la trichomoniosis y amibiosis (Morgan et al., 1992; Upcroft y Upcroft., 1998).

El metronidazol es administrado en su forma inactiva y entra a la célula por difusión pasiva. Una vez dentro de la célula, la proteína transportadora de electrones ferredoxina dona electrones al grupo nitro del fármaco, el cual se activa por esta reducción (Johnson, 1993). El metronidazol reducido sirve como aceptor terminal de electrones y se une covalentemente al DNA, provocando que éste pierda su estructura helicoidal causando así la muerte del trofozoíto. Además, la activación del metronidazol también puede llevar a la formación de radicales libres tóxicos que reaccionan con los componentes celulares. Los quistes son menos afectados por los nitroimidazoles debido a la pobre penetración del fármaco a través de la pared quística.

El metronidazol se absorbe rápida y completamente después de la administración oral y penetra a los tejidos y secreciones como saliva, leche materna, semen y secreciones vaginales. Se metaboliza principalmente en el hígado y se excreta en la orina. Los efectos adversos más comunes del metronidazol incluyen dolor de cabeza, náuseas, vértigo y sabor metálico en la boca. Este fármaco inhibe la aldehído deshidrogenasa, por lo que los pacientes que están en tratamiento con este fármaco deben evitar ingerir bebidas alcohólicas, de lo contrario pueden presentar vómito, dolor de cabeza y dolor gastrointestinal. El metronidazol es mutagénico en bacterias y carcinogénico en ratones a altas dosis y por períodos largos. Sin embargo no se ha informado sobre mutagenicidad en humanos (Gardner y Hill, 2001).

Se ha observado que *G. intestinalis* es capaz de desarrollar resistencia al metronidazol y a otros fármacos *in vitro* por medio de varios mecanismos. También se ha observado resistencia *in vivo* y es claro que dicha resistencia se debe al uso inapropiado de estos medicamentos y una disminución de la actividad de la PFOR involucrada en la activación del fármaco (Johnson, 1993).

La furazolidona [3-(5-nitrofurfurildeneamino)-2-oxozolidona] es ampliamente aceptada para tratar la giardiosis en niños debido a que está disponible en suspensión. El mecanismo de acción de la furazolidona en *G. intestinalis* no se ha explicado completamente. Se piensa que el fármaco sufre una activación al sufrir una reducción en el trofozoíto de *G. intestinalis* pero, a diferencia del metronidazol, la reducción ocurre vía NADH oxidasa. Los productos reducidos son muy tóxicos y

pueden causar daño importante a los componentes de la célula incluyendo el ADN (Crouch, et al., 1986; Gardner y Hill, 2001). La furazolidona se absorbe rápidamente por el tracto gastrointestinal y se metaboliza en tejidos, por lo que se encuentra en bajas concentraciones en suero y orina (Gardner, 2001).

La nitazoxanida [2-(acetililoxi)-*N*-(5-nitro 2-tiazolil) benzamida] ha mostrado ser efectivo *in vivo* contra *G. intestinalis* (Cedillo et al., 2002). Recientemente ha sido aprobada por la FDA para el tratamiento de la giardiosis en niños debido a que se comercializa como una formulación líquida.

La utilización de estos fármacos para combatir la giardiosis ha sido de gran apoyo, sin embargo, se han realizado pocas innovaciones al respecto para incrementar su eficacia. Por lo tanto, es primordial el desarrollo de nuevos fármacos para tratar este padecimiento.

Tabla 1. Dosis recomendadas y efectos adversos de los fármacos utilizados para tratar la giardiosis

Fármaco	Dosis adulto	Dosis pediátrica	Efectos adversos
metronidazol	250 mg tres veces al día por 7 días	5mg/kg tres veces al día por 7días	Dolor de cabeza, vértigo, náusea, sabor metálico, urticaria. Reacción de tipo disulfiram cuando se ingiere alcohol. Se han reportado algunos casos de pancreatitis, toxicidad al sistema nervioso central, neutropenia reversible y neuropatía periférica. No hay pruebas de mutagenicidad y carcinogenicidad en humanos.
tinidazol	2 g dosis única	50 mg/kg, dosis única (max. 2g)	Similares al metronidazol
ornidazol	2 g dosis única	40-50 mg/kg, dosis única (max, 2g)	Similares al metronidazol
furazolidona	100 mg cuatro veces al día por 7-10 días	2 mg/kg cuatro veces al día por 10 días	Náusea, vómito, diarrea, reacción tipo disulfiram cuando se ingiere alcohol. No hay pruebas de carcinogenicidad en humanos.
albendazol	400 mg una vez al día por 5 días	15mg/kg/día por 5-7 días (max, 400 mg)	Anorexia y constipación.
Nitazoxanida	500 mg dos veces al día por 3 días	7.5 mg/kg dos veces al día por 3 días	Náuseas, cefaleas y dolor abdominal en algunos casos.

(Tomado de Gardner y Hill, 2000)

## 1.2. Los bencimidazoles como agentes antiparasitarios

La estructura del bencimidazol consiste en un sistema anular bicíclico, en donde un anillo de benceno se encuentra unido a las posiciones 4 y 5 de un anillo de imidazol (Figura 5).

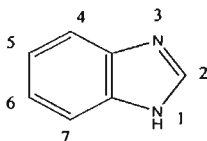


Figura 5. Anillo de bencimidazol.

Los 1-*H* bencimidazoles existen como mezcla de 2 compuestos debido al equilibrio tautomérico que presenta este heterociclo. Este fenómeno que se explica por la migración del hidrógeno 1 a la posición 3 afecta las posiciones 5 y 6 de la molécula (Figura 6).

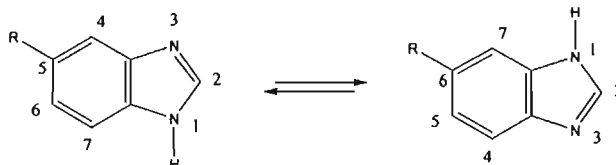


Figura 6. Equilibrio tautomérico del bencimidazol.

Dos bencimidazoles derivados del carbendazim (1*H*-bencimidazol-2-carbamato de metilo), el albendazol y el mebendazol (Figura 7) se han usado exitosamente por muchos años como antihelmínticos y se sabe que su mecanismo de acción es a través de su interacción con la tubulina, una proteína del citoesqueleto de estos parásitos. Por otro lado, conforme se avanzó en los estudios sobre la biología de *G. intestinalis*, se encontró que la tubulina también era el principal componente del citoesqueleto de este protozoario (Morgan, et al., 1993), por lo que el albendazol y mebendazol resultaron atractivos para su evaluación giardicida (Chávez, et al., 1992; Oxberry, et al., 1994)

En estudios *in vitro*, el albendazol mostró una mayor potencia giardicida que el metronidazol (Meloni, et al., 1990; Cedillo y Muñoz, 1992). Los valores de  $CI_{50}$  (concentración inhibitoria media) fueron de 0.010  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el albendazol y 0.210  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el metronidazol (Cedillo y Muñoz, 1992). Sin embargo, en estudios *in vivo* la actividad del albendazol fue similar a la del metronidazol;

esto al parecer se debe a dos factores importantes: la baja solubilidad acuosa del albendazol (0.004 mg/mL) y el corto tiempo de exposición del parásito al fármaco. Como ya se mencionó, *G. intestinalis* coloniza el duodeno y el yeyuno donde el tiempo de permanencia del contenido intestinal es de 2 a 2.5 horas (Balimane et al., 2000).

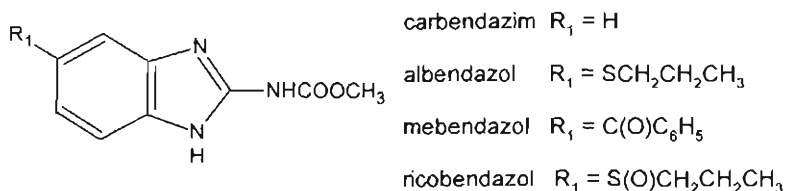


Figura 7. Derivados del 1*H*-bencimidazol-2-carbamato de metilo

### 1.2.1. Relaciones estructura-actividad en bencimidazoles antiparasitarios

Con la finalidad de enfrentar la inactivación metabólica y de conocer los efectos de los sustituyentes en las diferentes posiciones del anillo bencimidazólico se empezaron a realizar diversos estudios de modificación estructural en el anillo de bencimidazol en las posiciones 1, 2, 5 y 6 permitiendo con ello establecer la siguiente información (Figura 8):

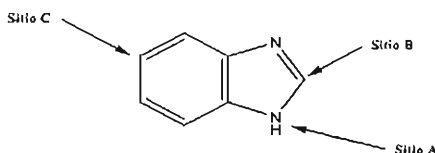


Figura 8. Relación estructura actividad en el anillo bencimidazólico.

#### Sitio A

Se han sintetizado una enorme cantidad de 1-alkil, 1-aryl, 1-arylalquil y 1-acilbencimidazoles con la intención de entender el papel del átomo de hidrógeno en la actividad antiparasitaria, además de evitar el efecto tautomérico que sufre la molécula de bencimidazol (Sharma, 1994; Sharma, 1997; Navarrete, 2004). Los resultados indican que para conservar la actividad antiparasitaria por inhibición de la polimerización de la tubulina, debe haber un hidrógeno en la posición 1. Sin embargo,

recientemente se encontró que derivados bencimidazólicos que no presentaban este sustituyente fueron igual o más activos que el metronidazol y el albendazol aunque no interfirieron con la polimerización de la tubulina (Sánchez-Díaz, 1999; Navarrete et al., 2001; Valdez et al., 2002, Navarrete et al., 2003;). Para estos derivados del bencimidazol no se conoce su mecanismo de acción.

### Sitio B

La presencia de un grupo carbamato de metilo es esencial para potenciar la actividad antiparasitaria. Por lo tanto, los cambios en la naturaleza y tamaño de los sustituyentes de la posición 2 (H, CH<sub>3</sub>, NHCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, SH, SCH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>) pueden ser determinantes para que se presente actividad (Sharma, 1994; Sharma, 1997; Navarrete, 2004). Asimismo el incremento en el tamaño del carbamato de metilo a etilo puede incrementar la actividad hasta 2 veces (Alcántara, 2000).

### Sitio C

Se ha observado que un sustituyente en esta posición es un factor determinante para la actividad biológica de un bencimidazol. Además, los sustituyentes en esta posición previenen que la molécula sufra de metabolismo y pérdida actividad (Sharma, 1994; Sharma, 1997; Navarrete, 2004).

Estudios recientes mostraron que sustituyentes con carácter electroatrayente en las posiciones 2, 5 y 6 presentaron buena actividad giardicida, por lo tanto, sustituyentes con carácter electrodonador provocaron disminución de la misma (Navarrete et al., 2001; Valdez et al., 2002; Navarrete et al., 2003; López-Balbiaux, 2005).

Por otro lado, otros estudios muestran que cuando hay sustituyentes en las posiciones 4 y 7 del anillo bencimidazólico no se presenta actividad giardicida, razón por la cual las posiciones 1, 2, 5 y 6 son las que resultan de interés para una modificación estructural.

### 1.3. Diseño asistido por computadora

El diseño molecular asistido consiste en aplicar algún procedimiento realizado por una computadora para relacionar la actividad de un compuesto con su estructura (Hopfinger, 1985). Sus objetivos principales son: descubrir nuevos principios activos, optimizar los ya existentes y seleccionar, de un cierto grupo de moléculas, a los candidatos que tienen mayor o menor probabilidad de convertirse en fármacos exitosos.

### 1.3.1. Relación cuantitativa estructura-actividad

Dentro del diseño molecular asistido por computadora se pueden encontrar diversos métodos para el diseño de un nuevo fármaco. Uno de estos métodos es QSAR (relación cuantitativa estructura-actividad), el cual se basa en que la actividad biológica de un compuesto depende de las propiedades estructurales del mismo, por ejemplo, solubilidad, liposolubilidad, efectos electrónicos y energía de ionización. Un método QSAR puede definirse como la aplicación de procedimientos matemáticos y estadísticos para encontrar relaciones (modelos QSAR) de la forma  $P_i = k(D_1, D_2 \dots D_n)$ , donde  $P_i$  es la actividad biológica de la molécula;  $D_1, D_2 \dots D_n$  son las propiedades estructurales calculadas (o algunas veces medidas experimentalmente) de los compuestos y se les conoce comúnmente con el nombre de descriptores;  $k$  representa alguna transformación matemática establecida empíricamente que habría que aplicar a los descriptores para calcular el valor  $P_i$  de las moléculas. La relación entre los descriptores y  $P_i$  puede ser lineal o no lineal. Cuando la relación es lineal,  $P_i$  puede calcularse directamente a partir del valor de los descriptores.

Cuando la relación es no lineal, el valor de los descriptores se utiliza para caracterizar la similitud química entre las moléculas, la cual se utiliza para predecir la propiedad  $P_i$  de los compuestos (Tropsha, 2003). Un ejemplo de este último caso es  $k$ -NN QSAR (Relación cuantitativa estructura-actividad por asociación de estructuras vecinas) (Zheng y Tropsha 2000), el cual se basa en el establecimiento de modelos estadísticos construidos con la información de datos de actividad experimental de diversos compuestos y que se utilizan para predecir la actividad biológica de otras sustancias.

Con el propósito de encontrar los requerimientos básicos para la actividad giardicida de los derivados de bencimidazol, se han sintetizado y evaluado experimentalmente más de 100 compuestos (Andrzejewska et al., 2002; Andrzejewska et al., 2004; Navarrete et al., 2001; Navarrete et al., 2003; Navarrete et al., 2004; Sánchez, 1999; Valdéz et al., 2002). Recientemente también se han sintetizado y evaluado derivados del benzoxazol (Arroyo, 2003; Luna, 2004). Con la información obtenida, nuestro grupo de investigación desarrolló algunos modelos de predicción  $k$ -NN QSAR para buscar nuevos compuestos que pudiesen presentar actividad giardicida.

Con los modelos se realizó una búsqueda virtual en la base de datos del Instituto Nacional de Cáncer de Norteamérica para encontrar compuestos que se ajustaran a dichos modelos (Medina, 2005). De esta búsqueda forman parte los compuestos que aparecen en la Tabla 2. Los cuatro primeros fueron predichos con buena actividad giardicida ( $CI_{50} < 1\mu M$ ) y los restantes con  $CI_{50}$

mayores a 100  $\mu\text{M}$ . Todos los compuestos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Entonces, para dar validez a los modelos propuestos, fue necesario realizar la evaluación experimental de estos compuestos (Figura 9).

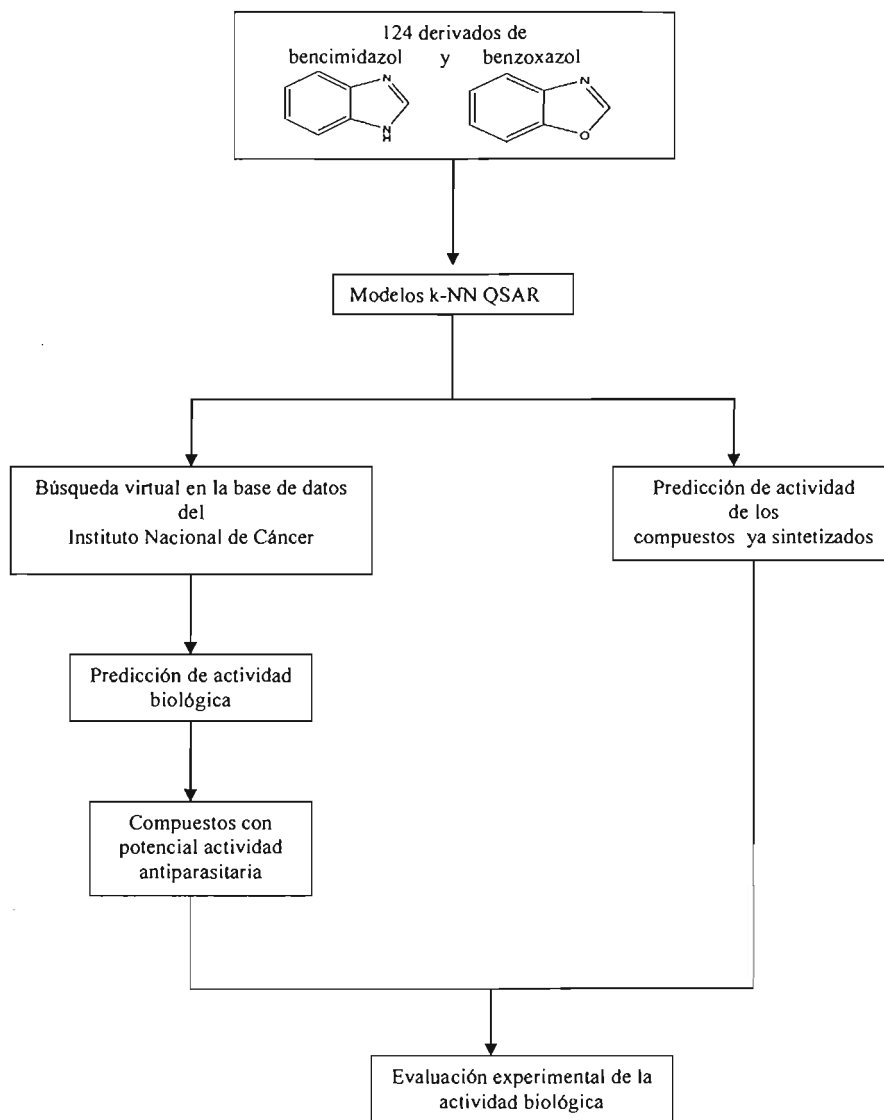
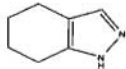
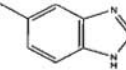
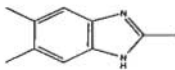
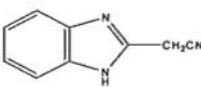
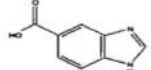
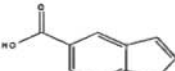
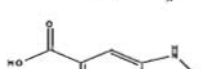
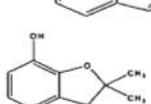
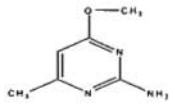
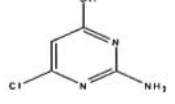
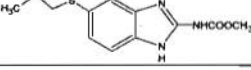


Figura 9. Estrategia para el descubrimiento de compuestos con actividad giardicida a partir de modelos k-NN QSAR



Tabla 2. Compuestos heterociclos a evaluar

Clave	Estructura	Peso molecular	Nombre	Solubilidad* (g/L)	log P*
NSC 195333		122.17	4,5,6,7-tetrahidro-1 <i>H</i> -indazol	3.2	2.0
NSC 3826		137.170	5-metil-1 <i>H</i> -bencimidazol	5.39	1.85
NSC 401569		160.22	2,5,6-trimetil-1 <i>H</i> -bencimidazol	1.06	2.49
NSC 525203		157.18	(2-bencimidazolil)acetnitrilo	80.3	0.94
FHL 210		162.140	ácido 1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico	59.1	1.06
FHL 211		161.157	ácido 1 <i>H</i> -indol-5-carboxílico	7.07	1.82
FHL 212		161.57	ácido 1 <i>H</i> -indol-6-carboxílico	7.07	1.82
FHL 213		164.201	2,2-dimetil-2,3-dihidro-1-benzofuran-7-ol	2.31	2.23
FHL 214		139.155	6-metil-4-metoxipirimidin-2-amina	50.5	1.06
FHL 215		145.547	2-amino-6-cloropirimidin-4-ol	74.8	0.11
albendazol		265.333	5-(propiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo	0.004	3.01

\*Los valores de solubilidad y log P fueron calculados por el programa ACD/Log P DB (ACD/Log P Versión 4.55, Mayo 2000)

#### 1.4. Análisis Probit

La determinación de la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) requiere de la estadística cuantil (se presenta o no se presenta el efecto) y para calcularla generalmente se usa el análisis Probit. Para evaluar el efecto de un compuesto sobre *G. intestinalis*, se administra dicho compuesto a diferentes concentraciones,  $C$  en este caso, se observa la respuesta y se tiene, entonces, lo siguiente:

- Número de individuos ( $n$ ).
- Número de organismos muertos o afectados ( $r$ ).
- Porcentaje de efecto ( $p$ ).

$$p = \left( \frac{r}{n} \right) \times 100$$

La representación gráfica de  $p$  vs.  $C$ , o muestra la relación existente entre un compuesto al cual se expone un organismo y el consecuente efecto que le produce (relación dosis-respuesta). Esta relación genera una curva parabólica que muchas veces presenta dificultades en la construcción de un modelo lineal. Una forma de enfrentar este problema es transformando  $C$  a una escala logarítmica ( $X = \log_{10}(C)$ ), lo cual muestra una relación dosis-respuesta de forma sigmoidea (Figura 10).

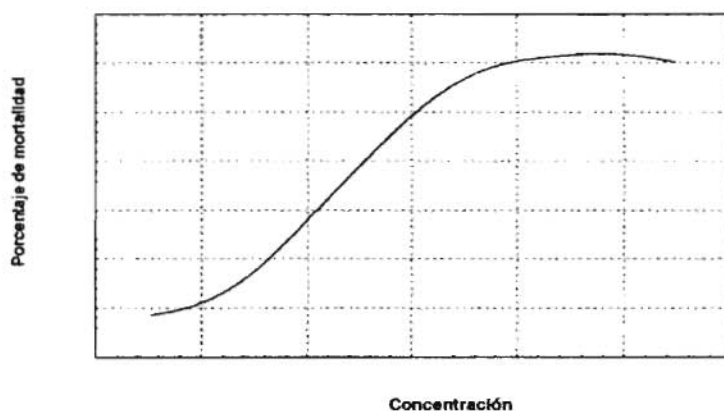


Figura 10. Representación gráfica de la relación dosis-respuesta cuantil

Posteriormente, mediante las tablas de Probit se transforma  $p$  a unidades Probit (se busca en una tabla de distribución normal el valor de  $z$  correspondiente a una probabilidad acumulada igual a  $p$  y a continuación se suman cinco unidades) y se obtiene así una distribución de puntos en un sistema de tipo lineal, los cuales se procesan según un análisis de regresión típico, para obtener de esta forma la  $CI_{50}$ . Con estos datos se elabora una gráfica colocando en el eje  $X$  el logaritmo de las concentraciones y en el eje  $Y$  el Probit. En la gráfica se traza una línea a partir del Probit 5,0 hasta cortar la línea trazada; el valor correspondiente en el eje  $X$  se denomina  $m$  y el antilogaritmo de este valor corresponderá a la  $CI_{50}$  (Figura 11) (Finney, 1977).

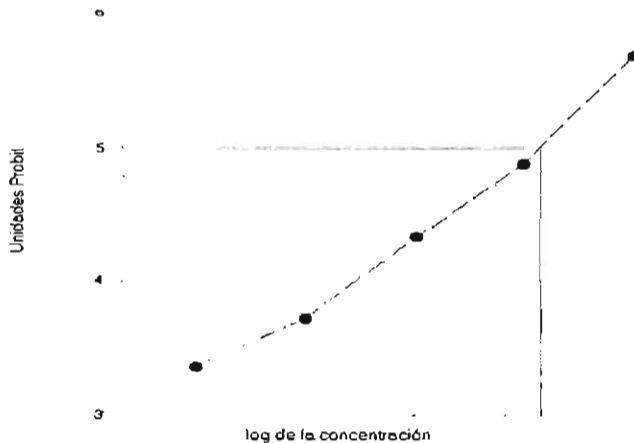


Figura 11. Representación gráfica del cálculo de la  $CI_{50}$

## 2. Planteamiento del problema

El desarrollo de un nuevo fármaco es un proceso largo y costoso, por tal motivo el diseño molecular asistido por computadora es una poderosa alternativa para el descubrimiento de nuevos principios activos.

Dentro del diseño molecular asistido por computadora existen diversos métodos para el desarrollo de nuevos compuestos. Uno de estos métodos es *k*-NN QSAR, el cual busca moléculas biológicamente activas en bases de datos ya existentes. Así, un modelo QSAR se puede utilizar para predecir la actividad biológica de diversas estructuras químicas. Pero, ¿la actividad biológica de un compuesto predicha por *k*-NN QSAR corresponde a la actividad biológica experimentalmente determinada?

## 3. Hipótesis

La actividad giardicida predicha por los modelos *k*-NN QSAR para un grupo de compuestos heterocíclicos será semejante a la actividad giardicida determinada experimentalmente.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Determinar la actividad giardicida *in vitro* para 10 compuestos heterocíclicos que fueron seleccionados por el modelo *k*-NN QSAR.

### 4.2 Objetivos particulares

4.2.1. Establecer la curva de crecimiento de los trofozoítos de *Giardia intestinalis*

4.2.2. Determinar de la actividad giardicida del albendazol por el método de subcultivo

4.2.3. Determinar la actividad giardicida *in vitro* de los 10 compuestos heterocíclicos presentados en la Tabla 2.

4.2.4. Determinar la correlación existente entre la actividad predicha por los modelos *k*-NN QSAR y la actividad experimental de los 10 compuestos heterocíclicos ya mencionados.

## 5. Procedimientos experimentales

En este apartado se presentan brevemente los procesos operativos que nos permitirán alcanzar los objetivos particulares previamente descritos. Los detalles de estos procedimientos se describen en los anexos.

### 5.1. Curva de crecimiento de trofozoítos de *G. intestinalis*

Para la realización de este trabajo se empleó un cultivo axénico de trofozoítos de *G. intestinalis* cepa IMSS 3. Para mantener el cultivo axénico, los trofozoítos se cultivaron en medio TYI-S-33 modificado (Keister, 1983) adicionado con suero fetal bovino al 10% y con 1 mL de una mezcla de penicilina/estreptomicina (10 000 U/ $\mu$ g/mL) y se resembraron cada 2 y 5 días; la incubación entre cada resiembra fue a una temperatura de 37° C.

Se incubaron  $50 \times 10^3$  trofozoítos en el medio de cultivo a 37° C durante 24, 48, 72 y 96 h. Una vez transcurridos los diferentes tiempos de incubación, se contaron los trofozoítos en un hemocitómetro. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado. Después se construyó la curva de crecimiento graficando el número de trofozoítos observados vs tiempo (Figura 12).

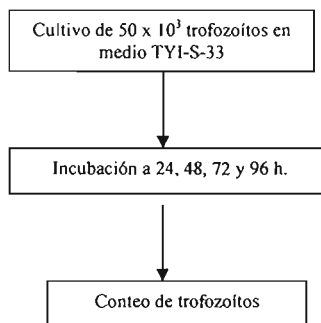


Figura 12. Procedimiento para realizar la curva de crecimiento de los trofozoítos de *G. intestinalis*

### 5.2. Determinación de la actividad giardicida del albendazol por el método de subcultivo

Se cultivaron  $50 \times 10^3$  trofozoítos de *G. intestinalis* en medio TYI-S-33 en presencia de diferentes concentraciones del albendazol: 0.001, 0.005, 0.01, 0.05 y 0.1  $\mu$ g/mL. Los trofozoítos se incubaron durante 48 h a 37 °C. Por cada ensayo realizado se utilizó un testigo negativo. El testigo negativo consistió en incubar a los trofozoítos en medio libre de albendazol.

Después del tiempo de incubación, se subcultivaron 50  $\mu$ L de trofozoítos en medio libre de albendazol e incubaron nuevamente por 48 h a 37 °C. Al término, se determinó el número de trofozoítos muertos (# de trofozoítos en el testigo negativo - # de trofozoítos presentes en cada concentración), y con estos datos se calculó la  $CI_{50}$  de cada compuesto por medio de análisis Probit (Cedillo y Muñoz, 1992). Para realizar el análisis Probit se utilizó un programa de cómputo (Programa Probit del Laboratorio de Control Biológico del Centro Universitario de Investigación y Desarrollo Agropecuario, Universidad de Colima).

### 5.3. Determinación de la actividad giardicida *in vitro* de 10 compuestos heterocíclicos.

La determinación de la actividad giardicida se realizó como se describe en el apartado anterior, sólo que en esta ocasión se adicionaron los compuestos heterocíclicos. En estos estudios se utilizó, además del testigo negativo, un testigo positivo que consistió en incubar trofozoítos a 37 °C durante 48 horas en presencia de albendazol a diferentes concentraciones: 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0  $\mu$ g/mL (Figura12).

### 5.4. Exploración de la estabilidad de los compuestos en el medio de cultivo

Se realizaron pruebas exploratorias de estabilidad para los compuestos **NSC 195333**, **NSC401569**, **NSC 3826** y **NSC 525203** por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Se partió de una solución patrón de 10 mg/mL de cada compuesto para realizar las pruebas. De estas soluciones se tomaron 25  $\mu$ L y se llevaron a un volumen final de 500  $\mu$ L con medio de cultivo. De esta manera los cuatro compuestos se incubaron con agitación a 37 °C durante 48 h en medio de cultivo TYI-S-33. Transcurrido el tiempo, de cada muestra se tomaron nuevamente 25  $\mu$ L y se colocaron en un microtubo cónico de 2 mL, en donde se adicionaron 25  $\mu$ L de agua y 950  $\mu$ L de acetonitrilo. Después, estas muestras se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min. a 4° C. El sobrenadante obtenido se pasó por un filtro de nylon Millex (Millipore) de 0.22 micras. El filtrado se inyectó en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución. Estas pruebas se hicieron por triplicado para cada compuesto (Figura 14).

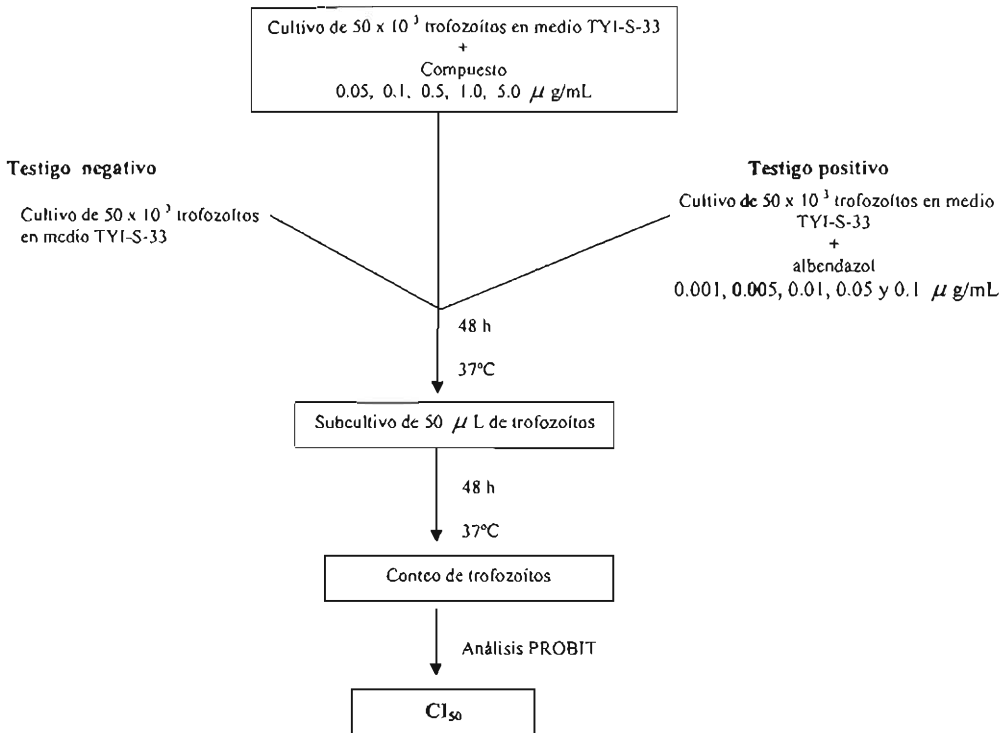


Figura 13. Evaluación de la actividad giardicida por el método de subcultivo

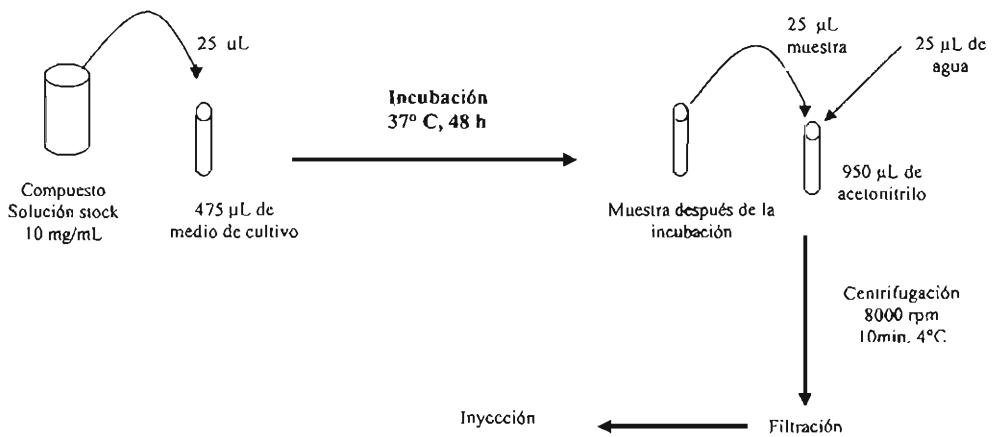


Figura 14. Pruebas de estabilidad

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Curva de crecimiento de trofozoítos de *G. intestinalis*

Con la finalidad de determinar el comportamiento del crecimiento de los trofozoítos de *G. intestinalis* en medio TYI-S-33 modificado (Keister, 1988), se realizó una curva de crecimiento antes de llevar a cabo la evaluación *in vitro* de la actividad giardicida de los compuestos. En la Figura 15 se muestra la curva de crecimiento.

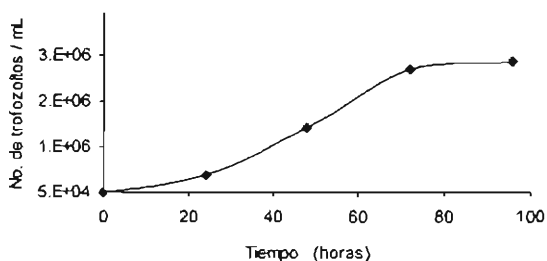


Figura 15. Curva de crecimiento de los trofozoítos de *G. intestinalis*.

En esta figura se puede observar que la fase logarítmica de crecimiento comenzó antes de las 48 h, ya que la población existente era ya 20 veces mayor que la población inicial (50 000 trofozoítos). La fase estacionaria inició a partir de las 72 h aproximadamente, donde la población era unas 45 veces mayor que la inicial pero a partir de aquí es evidente que el crecimiento es mucho más lento.

### 6.2. Evaluación de la actividad giardicida de los compuestos heterocíclicos


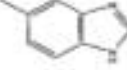

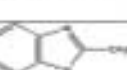
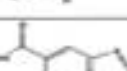



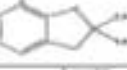
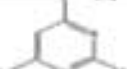
En la Tabla 3 se muestran los resultados de la actividad *in vitro* obtenidos para los 10 compuestos heterocíclicos evaluados contra los trofozoítos de *G. intestinalis* por medio del método de subcultivo. Se observa que para los primeros cuatro compuestos existe una gran diferencia entre la actividad predicha y la actividad experimental.

El comportamiento del compuesto **NSC 195333**, el cual pertenece a la familia de los indazoles, se debe posiblemente a que dentro del grupo de compuestos con los que se construyeron los modelos no hubo indazoles. El comportamiento del compuesto **NSC 3826** y **NSC 401569** se puede explicar, en parte, a la falta de compuestos con un grupo metilo en las posiciones 5 y 6 del anillo de bencimidazol



en el grupo inicial de compuestos con los que se construyeron los modelos. Lo mismo sucede con el compuesto NSC 525203, ya que en el grupo de datos iniciales no hay sustituyentes en posición 2 con el grupo acetonitrilo.

Tabla 3. Actividad giardicida *in vitro* de 10 compuestos heterocíclicos

Compuesto	Estructura	CI <sub>50</sub> predicha (μM)	CI <sub>50</sub> experimental (μM)
NSC 195333		0.04 - 0.25	218.916
NSC 3826		0.06 - 0.28	317.772
NSC 401569		0.06 - 0.17	31.959
NSC 525203		0.06 - 0.39	231.835
FHL 210		>100	602.634
FHL 211		>100	47.075
FHL 212		>100	56.995
FHL 213		>100	25.154
FHL 214		>100	524.461
FHL 215		>100	2281.923
albendazol			0.0381

Además, los modelos k-NN QSAR no toman en cuenta el medio (disolvente, medio de cultivo, iones e impurezas) en el cual la molécula ejercerá su actividad. Esto es de gran relevancia y debe ser un factor que siempre debe estar presente ya que los modelos k-NN QSAR dicen si una molécula es activa o no, pero no se sabe qué pasa mientras la molécula llega al sitio de acción.

Dentro de este grupo de compuestos, el que presentó mejor actividad fue el compuesto **NSC 401569**. El compuesto menos activo fue el **NSC 3826**. La diferencia entre estos dos compuestos radica en que el **NSC 3826** tiene un grupo metilo en posición 5, mientras que el compuesto **NSC 401569** tiene grupos metilo en las posiciones 2, 5 y 6, lo que sugiere que los sustituyentes en posición 2 y en 6 influyen de manera importante en la actividad giardicida que pueda presentar un compuesto.

También se observa que el compuesto **NSC 525203** presentó muy poca actividad aunque tiene un sustituyente en posición 2, lo que indica la importancia de sustituyentes en las posiciones 5 y 6. Trabajos anteriores, han informado que sustituyentes de carácter electroatrayente en las posiciones 2, 5 y 6 mejoran la actividad biológica, pero el grupo acetonitrilo, el cual es un electroatrayente débil, presente en el compuesto **NSC 525203** parece no contribuir a la actividad biológica.

El compuesto **NSC 195333** tampoco mostró buena actividad, hecho que indica que un indazol no es el mejor compuesto para ejercer actividad giardicida.

La  $CI_{50}$  predicha para los otros seis compuestos que aparecen en la Tabla 3 fue mayor a 100  $\mu$ M. Para el caso de **FHL 210**, sí se encontró correlación entre el valor de actividad experimental y el valor de la predicción. Aunque estructuralmente es difícil explicar la baja actividad que presenta este compuesto, ya que es un bencimidazol que tiene un grupo fuertemente electroatrayente en posición 5; sin embargo, en este trabajo se muestra que un ácido carboxílico en esta posición no contribuye al hecho de que esta molécula ejerza un efecto giardicida. Debido a que este compuesto se encuentra en forma ionizada en el medio de cultivo ( $pH = 7.2$ ), es posible no esté entrando a la célula y a esto se deba la baja actividad.

Los compuestos **FHL 211** y **FHL212**, fueron seleccionados con la finalidad de determinar la importancia de ambos nitrógenos en el anillo del bencimidazol y su relación con los sustituyentes en 5 y 6. Los resultados mostraron que estos indoles presentaron valores de actividad biológica experimental menores a los valores de actividad predicha. Se pudo observar que los dos nitrógenos son muy importantes para que exista actividad giardicida. En cuanto a la relación que guarda el nitrógeno con los sustituyentes en 5 y en 6 se observó que el compuesto **FHL 212** presentó menor actividad que el compuesto **FHL 211**.

El compuesto **FHL 213** se seleccionó porque previamente se informó de su buena actividad contra protozoarios del género *Leishmania* ( $CI_{50} = 0.006\mu\text{M}$  para *L. donovani* y  $CI_{50} = 0.005\mu\text{M}$  para *L. major*) (Tapia, et al., 2003). Experimentalmente, éste fue el compuesto que mostró mejor actividad contra *G. intestinalis*, aunque los valores de  $CI_{50}$  son mayores que las que se reportan con *Leishmania*. Este comportamiento se puede explicar partiendo del hecho de que aunque *Leishmania* y *Giardia* son protozoarios flagelados, existen grandes diferencias en los componentes de membrana de estos parásitos, lo cual puede afectar la entrada del compuesto a la célula.

Los compuestos **FHL 214** y **FHL 215** resultaron con muy baja actividad giardicida tal como fue predicho por *k*-NN QSAR. Aunque estos compuestos no son bencimidazoles, se incluyeron en este trabajo porque estudios recientes han mostrado que bencimidazoles con un sustituyente de tipo guanidino presentan potencial actividad antiprotozoaria y estos compuestos, de la familia de las pirimidinas, presentan este grupo, además de presentar un átomo de cloro y al grupo hidroxilo (OH) dentro de su estructura, ya que tanto el cloro al ser sustituyente del bencimidazol le confiere actividad antiparasitaria y el grupo OH presente en derivados fenólicos les da características antimicrobianas. Así que estas pirimidinas, las cuales presentan los sustituyentes antes mencionados se evaluaron contra *G. intestinalis*. Sin embargo, con estos resultados se observa que estas pirimidinas, a pesar de presentar las características ya mencionadas presentan muy poca actividad, lo que sugiere el anillo de bencimidazol es esencial para que exista actividad y se debe seguir trabajando con esa molécula.

La solubilidad es un parámetro importante que se debe considerar, así como el log P, el cual indica la facilidad con la que una sustancia sin carga puede transportarse a través de las membranas biológicas. En la Tabla 2 se observan los valores de solubilidad y de log P para cada uno de los compuestos. Con respecto a esto, se observa que el compuesto **NSC 401569** es el que presenta el valor de log P más alto, lo que indica que está entrando a la célula y ejerciendo su actividad. Resalta el caso del compuesto **FHL 213**, el cual también presenta un valor alto de log P, y esto se refleja en el hecho de que fue el compuesto más activo de todos. El otro compuesto que tiene un valor alto de log P es el **NSC 195333** pero el resultado indica que aunque entra a la célula, este compuesto ejerce muy poca actividad. Los compuestos **NSC 525203**, **FHL 210**, **FHL 214** y **FHL 215** son los más solubles pero por esta razón puede ser que muy poca cantidad de estos atraviese la membrana del parásito.

### 6.3. Pruebas exploratorias de estabilidad

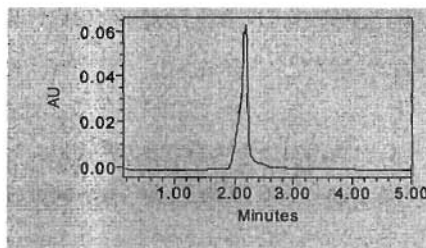
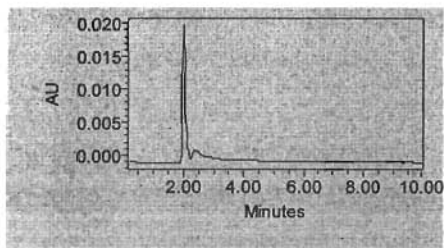
Con la finalidad de encontrar una explicación al comportamiento de los primeros cuatro compuestos que aparecen en la Tabla 2, se realizaron pruebas de estabilidad, en las cuales los compuestos fueron sometidos a las condiciones bajo las cuales estuvieron durante la evaluación *in vitro* de la actividad giardicida.

A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos antes y después de la incubación de cada compuesto.

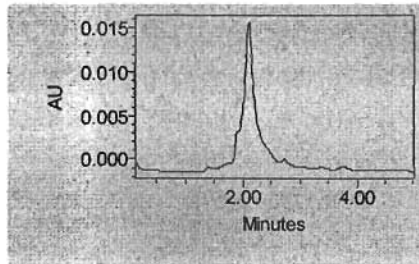
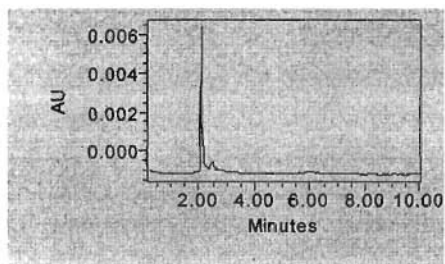
Antes de la incubación

Después de la incubación

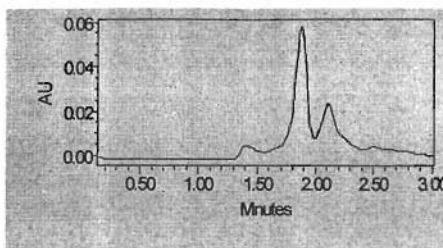
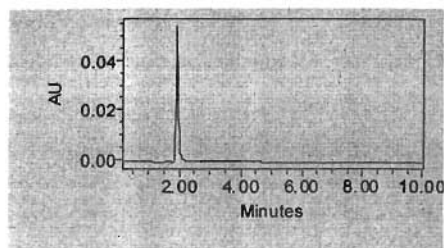
**NSC 3826**



**NSC 195333**



## NSC 401569



## NSC 525203

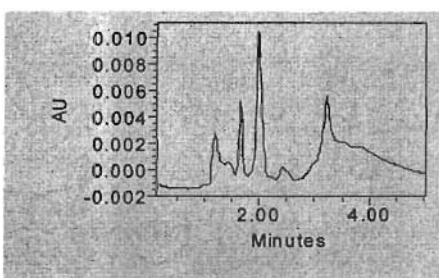
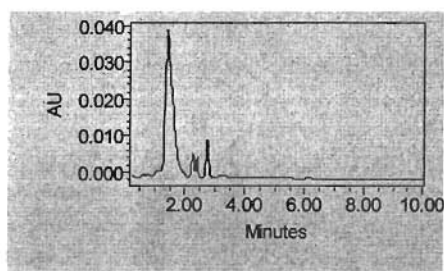


Figura 16. Cromatogramas de los compuestos estudiados

Como se observa en los cromatogramas, el compuesto **NSC 3826** y el **NSC 195333** no presentaron cambios antes y después de la incubación. Esto indica que los compuestos son estables a una temperatura de 37 °C durante un tiempo de 48 h., además de que el medio de cultivo no influyó para la descomposición de este compuesto.

Por otro lado, se observa que después de la incubación del compuesto **NSC 401569** aparecen otros 2 picos. Para tener un poco más de información sobre esto, se realizó un espectro de masas a la misma muestra de la cual se inyectó al cromatógrafo. Desafortunadamente no se obtuvo información ya que el compuesto no volatilizó debido al alto punto de fusión que este presenta (239-240 °C). Sin embargo, es posible que los grupos metilo que presenta este compuesto en la posición 5 y 6 hayan sufrido alguna reacción de oxidación después de haber estado bajo las condiciones ya mencionadas. Esta información resulta interesante ya que este fue uno de los compuestos más activos y no se sabe si dicha actividad se deba al compuesto inicial o al compuesto ya degradado.

En cuanto al compuesto **NSC 525203**, se observan varios picos antes de la incubación y después de ésta, se observan varios picos más. Cabe señalar, que todos los compuestos se

mantuvieron siempre en refrigeración, así que posiblemente, los picos que se observan antes de la incubación son impurezas que vienen desde la síntesis del compuesto. También se intentó obtener más información sobre los picos que aparecen después de la incubación pero, al igual que el compuesto anterior, no se obtuvo nada ya que no volatilizó el compuesto debido a su alto punto de fusión (205-207 °C). En este caso tampoco es posible saber si estas impurezas influyeron en la actividad giardicida que presentó esta molécula.

## 7. Conclusiones

Se evaluó la actividad giardicida de 10 compuestos heterocíclicos pero no se pudo dar validez a los modelos ya que no se observó una buena correlación entre los valores predichos por los modelos *k*-NN QSAR y los valores obtenidos experimentalmente, posiblemente porque en el diseño de fármacos asistido por computadora no se toma en cuenta el medio (disolvente, iones e impurezas) en el cual la molécula ejercerá su actividad.

Las características estructurales de los compuestos evaluados en este trabajo no fueron las mejores para ejercer actividad contra *G. intestinalis*. Sin embargo, destaca el hecho de que la actividad biológica mejora cuando un bencimidazol tiene sustituyentes en las posiciones 2, 5 y 6 ya que el compuesto NSC 401569, el único con las características mencionadas, fue uno de los más activos.

El FHL 213 fue el más activo de todos, por lo que surge el interés por estudiar o diseñar modelos con este tipo de moléculas y de esta manera descubrir nuevos compuestos con potencial actividad.

Finalmente, la información generada en este trabajo ofrece la posibilidad de construir modelos QSAR con características más específicas para optimizar así la búsqueda de nuevos compuestos con posible actividad giardicida, para que, de esta manera, se tengan otras alternativas para tratar este padecimiento que afecta a una gran parte de la población a nivel mundial.

## Bibliografia



## Bibliografía

- Adam, R. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Review* **2001**, *14*, 447-475.
- Alcántara, E. Estudios de unión y afinidad del albendazol en tres modelos diferentes de tubulina. Tesis de Maestría. UNAM, México D.F. **2000**.
- Andrzejewska, M.; Yépez-Mulia, L.; Cedillo Rivera, R.; Tapia, A.; Vilpo, L.; Vilpo, J.; Kazimierczuk, Z. Synthesis, antiprotozoal and anticancer activity of substituted 2-trifluoromethyl and 2-pentafluoroethylbenzimidazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *37*, 973-978.
- Andrzejewska, M.; Yépez-Mulia, L.; Cedillo Rivera, R.; Tapia, A.; Laudy, A. E.; Starosciak, B. J.; Kazimierczuk, Z. Synthesis, and antiprotozoal and antibacterial activities of S-substituted 4,6-dibromo- and 4,6-dichloro-2-mercaptobenzimidazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *21*, 323-329.
- Arroyo Sánchez, V. Síntesis de benzoxazoles sustituidos en posición 2 con potencial actividad antiparasitaria. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México D.F. **2003**.
- Balimane, P.; Morrison, R.; Chong, S. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2000**, *44*, 301-312.
- Boreham, P.; Phillips, R.; Shepherd, R. Altered uptake of metronidazole in vitro by stocks of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1988**, *82*, 104-106.
- Cedillo Rivera, R.; Muñoz, O. In vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *Journal of Medical Microbiology* **1992**, *37*, 221-224.
- Chávez, B.; Cedillo-Rivera, R.; Martínez-Palomo, A. *Giardia lamblia*: Ultraestructural study of the in vitro effect of benzimidazoles. *Journal of Protozoology* **1992**, *39*, 510-515.
- Crouch, A.; Seow, W.; Thong Y. Effect of twenty-three chemotherapeutic agents on the adherence and growth of *Giardia lamblia* in vitro. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1986**, *80*, 893-896.
- Elmendorf, H.; Dawson, S ; McCaffery, M. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology* **2003**, *33*, 3-28.
- Finney, D.; Statistical Method in Biological Assay; 3<sup>a</sup> edición. Cambridge University Press. New York, **1977**. pp 20-39
- Gardner, T; Hill, D. Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology Review*. **2001**, *14*, 114-128.
- Gillin, F; Reiner, D. Cell Biology of the Primitive Eukariote *Giardia lamblia*. *Annual Review of Microbiology* **1996**, *50*, 679-205.
- Hopfinger, A. J. Computer-assisted drug design. *Journal of Medicinal Chemistry* **1985**, *28*, 1133-1139.
- Johnson, P. Metronidazole and drug resistance. *Parasitology Today* **1993**, *9*, 183-186.
- Keister, D. Axenic cultura of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1983**, *77*, 487-488.
- López Balbiaux, N. Diseño, síntesis y actividad antiparasitaria de nuevas carboxamidas 1-metilbenzimidazólicas. Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM. México D.F. **2005**.
- Luna González, A. Síntesis y actividad antiprotozoaria contra *G. lamblia* de 5-clorobenzoxazoles 2-sustituidos. Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM. México D.F. **2004**.

- Mandell, Douglas y Bennett. Enfermedades infecciosas, principios y práctica.. 4ª edición. Ed. Médica Panamericana. Tomo II. Argentina, 1997. pp 2789-2794.
- Marquardt, William; Demaree, R; Grieve, R. Parasitology Vector Biology.. 2ª edición. Ed. Academia Press. USA, 2000. pp 89-96.
- Medina, J. L.; Diseño de fármacos asistido por computadora. Inhibidores de la transcriptasa reversa del virus del VIH, hipocolesterolemiantes y antiparasitarios. Tesis doctoral. Facultad de Química. UNAM. México D.F. 2005.
- Meloni, B.; Thompson, R.; Reynoldson, J.; Seville, P. Albendazole: a more effective anti-giardial agent in vitro than metronidazole or tinidazole. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1990, 84, 375-379.
- Mineno, T.; Avery, M.A. Giardiasis: Recent progress in chemotherapy and drug development. *Currents Pharmaceutical Design* 2003, 9, 841-855.
- Morgan, U; Reynoldson, J. A.; Thompson, R. Activities of several benzimidazoles and tubuline inhibitors against *Giardia* spp. in vitro. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 1993, 37, 328-331.
- Navarrete Vázquez, G.; Cedillo, R.; HernándezCampos, A.; Yépez, 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, L.; Hernández Campos, A.; Tapia, A.; Hernández-Luis, F.; Cedillo, R.; González, J.; Martínez-Fernández, A.; Martínez-Grueiro, M.; Castillo, R. Synthesis and antiparasitic activity of albendazole and mebendazole analogues. *Bioorganic Medicinal Chemistry* 2003, 11, 4615-4622.
- Navarrete Vázquez, G. Diseño, síntesis y actividad antiparasitaria de derivados del 2-(trifluorometil)bencimidazol. Tesis doctoral. Facultad de Química, UNAM, México D.F. 2004.
- Ortega Pierres, M.G.; Arguello, R. Formación del quiste de *Giardia lamblia*: un análisis molecular con perspectivas para el control de la giardiosis. *Avance y Perspectivas*, 1995, 14, 42-47.
- Oxberry, M.; Thompson, R.; Reynoldson, J. 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 of Parasitology* 1994, 24, 695-703.
- Reynoldson, J. A.; Thompson R.; Horton, R. Albendazole as a future anti-giardial agent. *Parasitology Today*. 1992, 8, 412-414.
- Romero Cabello. Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas. 2ª edición. Ed. Médica Panamericana. México, 1999.
- Sánchez Díaz, M. Tesis de Maestría. Síntesis de derivados del 1-metilbencimidazol con actividad antihelmíntica potencial. Facultad de Química, UNAM, 1999.
- Sharma, S. Design new drugs for helminth diseases: Lead optimization in benzimidazoles. *Advances in Drug Research* 1994, 25, 105-163.
- Sharma, S. Approaches to design and synthesis of antiparasitic drugs. Pharmacochimistry Library, Vol 25, Elsevier Science, Holanda, 1997.
- Sistema Único de Información para la vigilancia epidemiológica, 2003. <http://www.ssa.gob.mx>
- Svård, S; Hagblom, Per; Palm, D. *Giardia lamblia*: a model organism for eukariotic cell differentiation. *FEMS Microbiology Letters*. 2003, 218, 3-7.

- Tapia, R.; Alegria, L. Pessoa, C.; Salas, C.; Cortés, M.; Valderrama, J.; Sarciron, M.; Pautet, F.; Walchshofer, N.; Fillion, H. Synthesis and antiprotozoal activity of naphthofuranquinones and Naphthothiophenequinones containing a fused thiazole ring. *Bioorganic Medicinal Chemistry* **2003**, *11*, 2175-2182.
- Thompson, R. C. Giardiasis as re-emerging infectious disease and its zoonotic potencial. *International Journal of Parasitology*. **2000**, *30*, 1259-1267.
- Tropsha, A. Recent trends in quantitative structure-activity relationships. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. Abraham, D. J., Ed.; John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey, **2003**; Vol. 1, pp 49-76.
- Upcroft, P.; Upcroft Jacqueline A. Drug resistance in *Giardia*: clinical versus laboratory isolates. *Drug Resistances Updates*. **1998**, *1*, 166-168.
- Upcroft Peter; Upcroft Jacqueline A. Drug targets and mechanisms of resistance in anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Review* **2001**, *14*, 150-164.
- Valdez, J.; Cedillo, R.; Hernández Campos, A.; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Navarrete, G.; Morales, R.; Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R. Synthesis and antiparasitic activity of 1H-benzimidazole derivatives. *Bioorganic Medicinal Chemistry* **2002**, *12*, 2221-2224.
- Wolfe, M. Giardiasis. *Clinical Microbiology Review* **1992**, *5*, 93-100.
- Cedillo Rivera, R.; Chávez, B.; González-Robles, A.; Yépez-Mulia, L. In vitro effect of nitazoxanide against *Entamoeba Histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Journal Eukaryotic Microbiology* **2002**, *49*, 201-208.
- Zheng, W.; Tropsha, A. Novel variable selection quantitative structure- property relationship approach based on the *k*-Nearest-Neighbor principle. *Journal Chemistry Information Computer Science* **2000**, *40*, 185-194.

## Anexo 1

### Reactivos y equipos

#### Reactivos

- albendazol (Smith-Kline, Beechman, México)
- dimetil sulfóxido (Baker, México)
- cloruro de potasio (Merk, México)
- fosfato de potasio dibásico (Baker, México)
- fosfato de potasio 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/estreptomicina (In vitro lab)
- suero fetal bovino (Invitrogen Corporation, Nueva Zelanda)
- acetonitrilo CLAR (Baker, México)
- ácido acético glacial (Baker, México)
- agua grado CLAR

#### Equipo

- gabinete de seguridad biológica, Clase II (UN-425-400, Nuaire)
- incubadora de 37°C (Hbitat, Revco)
- balanza analítica (Sartorius Analytic)
- microscopio invertido (Axiovert 25, Zeizz)
- potenciómetro (φ720 pHMeter, Beckman)
- criocervador (XLC 500, Cryogenics)
- congelador -18°C a -25°C (Thermo Forma, Lab Pharmacy Freezer)
- centrífuga para tubos eppendorf (5840 R, Brinkmann)
- agitador para tubos eppendorf (Thatrmomixer R)
- desgasificador (Branson 2510)
- bombas Binarias (1525, Waters)
- detector de fotodiodos (996, Waters)
- columna Nova-Pak C<sub>18</sub> 39 x 150 mm (Waters)
- columna Symmetry Shield RP<sub>18</sub> 39 x 150 mm (Waters)

Para la realización de este trabajo se utilizaron trofozoítos de *G. intestinalis* cepa WB (IMSS:0989:1)

### **Preparación del medio TYI-S-33 para el cultivo de *G. intestinalis* (Keister, 1983)**

Para preparar 1 L de medio de cultivo se pesaron en una balanza analítica los componentes que a continuación se indican:

- cloruro de sodio.....2.0 g
- fosfato de potasio dibásico.....1.0 g
- fosfato de potasio monobásico.....0.6 g
- biosate, peptona.....30.0 g
- D-(+)-Glucosa.....10.0 g
- L-cisteína.....2.0 g
- L-ácido ascórbico.....0.2 g
- citrato férrico.....0.0228 g
- bilis.....0.8 g

Estos componentes se disolvieron con agitación en 700 mL de agua bidestilada. Se ajustó el pH a 7-7.2 en un potenciómetro  $\phi$ 720 pHMeter con NaOH 1M y se llevó al aforo en un matraz de 1 l. Posteriormente el medio se esterilizó por filtración utilizando una membrana de 0.45 $\mu$ m y se recolectó en frascos estériles Schcott de 500 mL. Finalmente el medio se sometió a prueba de esterilidad.

### **Prueba de esterilidad**

Dentro del Gabinete de Seguridad Biológica se tomó una alícuota de 4  $\mu$ L del medio y se sembró en una placa de agar-sangre, después se incubó a 37 °C por 48 h. También el medio de cultivo, perfectamente sellado, se incubó bajo las mismas condiciones. Al término del tiempo de incubación no se observó ningún tipo de crecimiento bacteriano o fúngico en la placa ni turbidez en el medio (prueba negativa), entonces el medio se almacenó a – 20 °C hasta su uso posterior.

### **Preparación de medio TYI-S-33 suplementado para el cultivo de trofozoítos de *G. intestinalis***

Para cultivar a los trofozoítos de *G. intestinalis*, se adicionaron 10 mL de suero fetal bovino descomplementado ( para descomplementar el suero fetal bovino, éste se coloca en un baño de agua a 56 °C durante 30 min) a cada 100 mL de medio TYI-S33; también se agregó una mezcla de antibiótico penicilina/estreptomicina 10 000 U/  $\mu$ g/mL, para evitar una posible contaminación del medio de cultivo, el cual quedó, de esta manera, listo para su uso.

### **Descongelación de trofozoitos de *G. intestinalis***

Del crioservidor se obtuvo un criovial de 1 mL con trofozoitos de *G. intestinalis*, cepa IMSS 3 en 0.1 % de DMSO. Los trofozoitos se descongelaron a temperatura ambiente y se repartió el contenido en dos tubos de 18 x 100 mm con 3 mL de medio de cultivo cada uno. Ambos tubos se centrifugaron a 1500 rpm, 5 min. a 4° C para eliminar el DMSO. El sobrenadante se descartó y el paquete celular (trofozoitos) se resuspendió en 8 mL de medio de cultivo fresco. Después se incubaron los trofozoitos a 37°C durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se decantó el medio de cultivo de cada uno de los tubos y adicionaron 8 mL de medio de cultivo fresco. Los trofozoitos se incubaron bajo las mismas condiciones. Al término del tiempo, se observó la confluencia (monocapa de trofozoitos adheridos a la pared del tubo de cultivo y ausencia de espacio entre célula y célula) en un microscopio invertido. Con una confluencia del 90 al 100 % en los tubos con trofozoitos, se procedió a realizar el mantenimiento del cultivo axénico.

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

Cuando se observó una confluencia del 90 al 100%, entonces se decantó el medio de cultivo de cada uno de los dos tubos y se reconstituyó con 8 mL de medio de cultivo fresco. Después, se colocaron en un baño de hielo por 10 min. para despegar a los trofozoitos de las paredes del tubo. Al término de este tiempo, se sacaron los tubos del baño de hielo y agitaron suavemente. De uno de los tubos, se tomó un inóculo de 15 µL y se colocó en otro tubo con 8 mL de medio fresco. El procedimiento se llevó a cabo por triplicado. Los trofozoitos se incubaron durante 48 h a 37°C y se sembraron cada 2 y 5 días.

### **Conteo de trofozoitos de *G. intestinalis* en la cámara de Neubauer**

Para contar a los trofozoitos se utilizó una cámara de Neubauer (también conocido como hemocitómetro), la cual se muestra en la Figura 17.

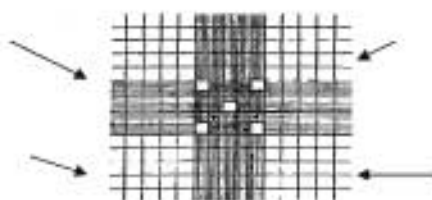


Figura 17. Cámara de Neubauer

En esta cámara, se colocaron por capilaridad 12  $\mu\text{L}$  de una dilución de trofozoítos ( 100  $\mu\text{L}$  en 900  $\mu\text{L}$  de PBS) los cuales se observaron después en un microscopio invertido. Para obtener el número de trofozoítos/mL, se contaron solamente los trofozoítos presentes en los cuadrantes señalados con un flecha en la Figura 17. El número total de trofozoítos se dividió en cuatro (# de cuadrantes) y se multiplicó por 10 000 /factor de la cámara) y después se multiplicó por el inverso de la dilución, entonces,

$$\text{Trofozoítos / mL} = [\#\text{trofozoítos} / \# \text{ cuadrantes leídos}] [10\ 000] [\text{inverso de la dilución}]$$

### Curva de crecimiento de trofozoítos de *G. intestinalis*

De los cultivos axénicos de trofozoítos se escogió un tubo que presentara una confluencia del 100%. Este tubo se colocó en un baño de hielo por 10 min. para separar a los trofozoítos de las paredes del tubo y dentro del gabinete de seguridad biológica se hizo una dilución 1:10 con medio de cultivo fresco (10  $\mu\text{L}$  de trofozoítos + 90  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo) utilizando un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se contaron los trofozoítos y se determinó así el volumen requerido para obtener  $50 \times 10^3$  trofozoítos/mL, los cuales se incubaron durante diferentes períodos de tiempo en el medio TYI-S33 en tubos eppendorff de 1.5 mL. Una vez transcurrido el período de incubación correspondiente, se colocaron los tubos en un baño de hielo durante 1 h. y se contaron los trofozoítos en un hemocitómetro. El procedimiento se llevó a cabo por triplicado. Los tiempos de incubación se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Curva de crecimiento de  $50 \times 10^3$  trofozoítos de *G. intestinalis*

No. Tubos	Inóculo de trofozoítos ( $\times 10^3$ )	Periodo de incubación (h)
3	50	24
3	50	48
3	50	72
3	50	96

Finalmente, para construir la curva de crecimiento se graficó el número de trofozoítos *V*s tiempo y de esta manera se pudo observar el comportamiento del crecimiento de los trofozoítos de *G. intestinalis*, así como el tiempo que necesitan los trofozoítos para alcanzar la fase logarítmica de y la fase estacionaria de crecimiento.

### Preparación de soluciones de albendazol

Las concentraciones con las que se trabajó el albendazol fueron de 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 y a 0.5  $\mu\text{g/mL}$ . Para llegar a estas concentraciones se partió de una solución stock de 10 mg/mL. Para preparar esta solución, se pesaron 10 mg de albendazol en una balanza analítica y se disolvieron en 1 mL de DMSO. A partir de esta solución se hicieron las diluciones correspondientes para llegar a las concentraciones antes mencionadas.

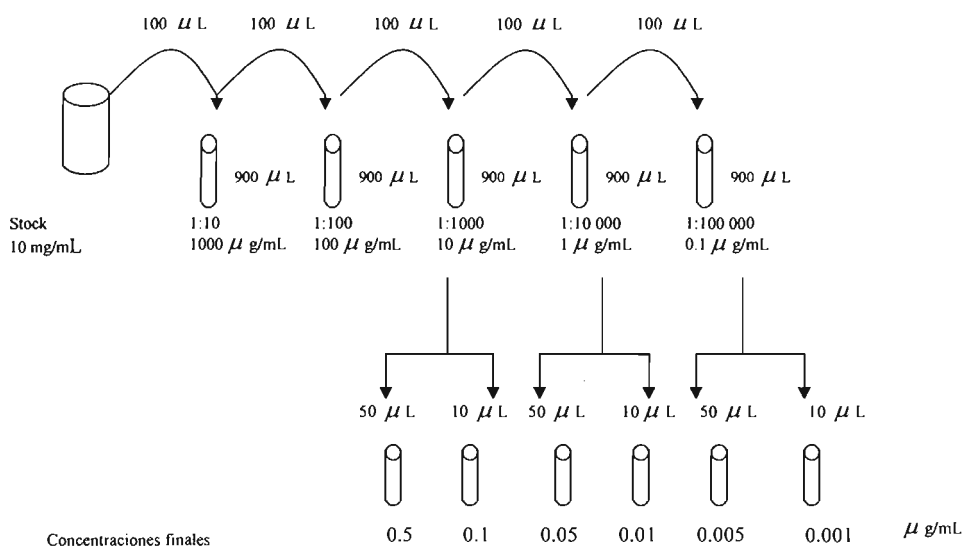


Figura 18. Preparación de soluciones de albendazol

### Preparación de soluciones de los compuestos heterocíclicos

Para los compuestos heterocíclicos las concentraciones que se utilizaron fueron de 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0  $\mu\text{g/mL}$ . Para llegar a estas concentraciones se partió de una solución patrón de 10 mg/mL. Para preparar esta solución, se pesaron 10 mg del compuesto en una balanza analítica y se disolvieron en 1 mL de DMSO. A partir de esta solución se hicieron las diluciones correspondientes para llegar a las concentraciones antes mencionadas.



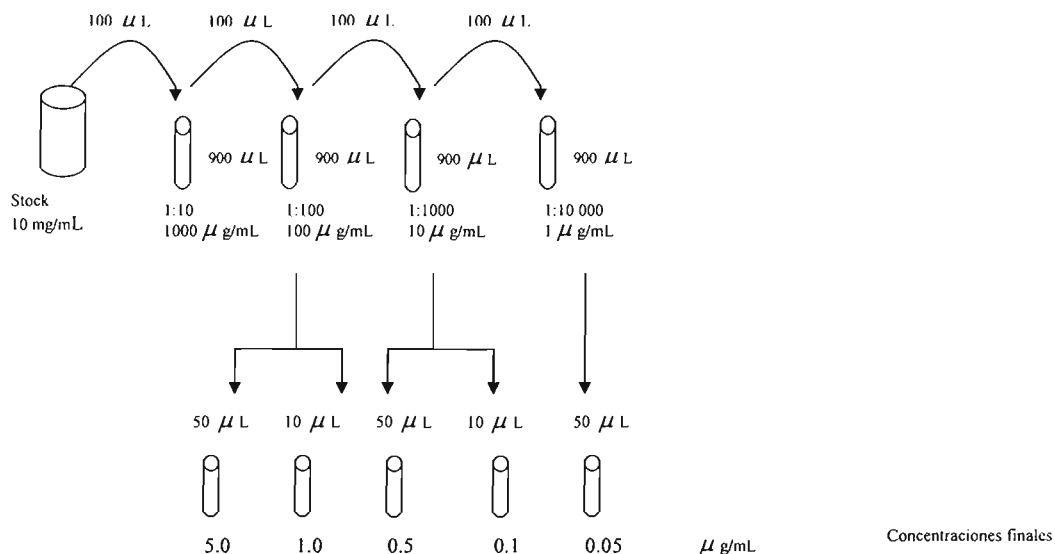


Figura 19. Preparación de soluciones de compuestos heterocíclicos

### Evaluación *in vitro* de la actividad de los compuestos heterocíclicos contra *G. intestinalis* por el método de subcultivo

Se cultivaron  $50 \times 10^3$  trofozoítos de *G. intestinalis* en medio TYI-S-33 en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos heterocíclicos utilizando tubos eppendorff de 1.5mL. Las concentraciones utilizadas fueron de 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 µg/mL. Los trofozoítos se incubaron durante 48 h a 37°C. Por cada ensayo realizado se utilizó un control negativo y un control positivo. El control negativo consistió en incubar a los trofozoítos en medio libre de fármaco. En el control positivo los trofozoítos se incubaron en presencia de albendazol a diferentes concentraciones: 0.001, 0.005, 0.01, 0.05 y 0.1 µg/mL.

Una vez transcurrido el período de incubación, los tubos se colocaron 1 h en una bañõ de hielo, para permitir el desprendimiento de los trofozoítos de las paredes del tubo. Después se subcultivaron 50 µL de trofozoítos los cuales se distribuyeron en 950 µL de medio libre de fármaco; los trofozoítos se incubaron nuevamente por 48 h a 37°C. Al término del tiempo de incubación se colocaron los tubos en un bañõ de hielo durante 1 h y se procedió a contar los trofozoítos vivos en un

hemocitómetro. El número de trofozoitos vivos presentes en cada tubo se restó del número de trofozoitos presentes en el control negativo para obtener el número de trofozoitos muertos y con los valores resultantes, se calculó la  $CI_{50}$  de los compuestos por medio de análisis PROBIT. Para cada compuesto se realizaron 2 ensayos por triplicado cada uno.

### **Pruebas de estabilidad**

Se realizaron las pruebas de estabilidad para los compuestos NSC 195333, NSC401569, NSC 3826 y NSC 525203. Estas pruebas se realizaron por medio de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) y consistieron en someter a cada uno de los compuestos ya mencionados a las mismas condiciones bajo las cuales se mantuvieron dichos compuestos durante las pruebas de evaluación *in vitro* de la actividad giardicida.

Para los compuestos NSC 195333, NSC401569 y NSC 3826 se utilizó una columna Symmetry Shield RP<sub>18</sub> 39 x 150 mm y para el compuesto NSC 525203 se utilizó una Columna Nova-Pak C<sub>18</sub> 39 x 150 mm. La fase móvil fue agua-acetonitrilo-ácido acético 0.5% con un flujo de 0.6 min/mL; el tiempo de muestreo fue de 5 min. para los primeros 3 compuestos; para el compuesto NSC 525203 el tiempo de muestreo fue de 10 min.

Se partió de una solución patrón de 10 mg/mL (el disolvente fue DMSO) de cada compuesto para realizar las pruebas.

A partir de estas soluciones se hicieron las diluciones correspondientes de tal forma que se conservara la proporción 95:5 en un volumen final de 1 mL de muestra.

Como se observa en el diagrama 6, se tomaron 25 µL del compuesto y los cuales se llevaron a un volumen final de 500 µL con medio de cultivo. De esta manera los cuatro compuestos se incubaron a 37° C durante 48 h en medio de cultivo TYI-S-33 en agitación. Las concentraciones finales de cada compuesto estuvieron entre 80 y 100 µM.

Transcurrido el tiempo de incubación, de cada muestra se tomaron nuevamente 25 µL y se colocaron en un tubo eppendorff, en donde se adicionaron también 25 µL de agua y 950 µL de acetonitrilo.

Después, estas muestras se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min. a 4° C. El sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa de 0.45 µm de diámetro de poro. El filtrado se inyectó en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución. Estas pruebas se hicieron por triplicado para cada compuesto.

## Anexo 2

### Curva de crecimiento de trofozoítos de *G. intestinalis*

A continuación se presentan los datos experimentales obtenidos durante la realización de la curva de crecimiento de trofozoítos de *G. intestinalis* con un inóculo inicial de  $50 \times 10^3$  trofozoítos.

Tabla 5. Resultados de la curva de crecimiento de trofozoítos de *G. intestinalis*

Tiempo (h)	No. de trofozoítos	D. E.	% C.V.
0	50000	--	--
2	416 666	15320	3.67
48	1 475 000	127475.48	8.6
72	2 741 666	23570.22	1.04
96	2 925 000	61237.24	2.09

\*Valores promedio obtenidos de tres ensayos

### Evaluación *in vitro* de la actividad giardicida de los compuestos heterocíclicos

En este apartado se muestran los valores del número de trofozoítos vivos, número de trofozoítos muertos y  $CI_{50}$  obtenidos en cada uno de los ensayos realizados para cada compuesto evaluado; también se muestra la  $CI_{50}$  del albendazol, el cual se utilizó como control positivo.

#### Compuesto NSC 195333

Tabla 6. Resultados de actividad del compuesto NSC 195333. Ensayo 1

Concentración ( $\mu$ g/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% mortalidad	Probit calculado
0.05	2 200 000	150 000	6.4	3.490
0.1	1 975 000	375 000	16.00	4.030
0.5	1 825 000	525 000	22.3	4.250
1.0	1 800 000	550 000	23.4	4.270
5.0	1 525 000	825 000	35.10	4.620
Control	2 350 000 trofozoítos/mL			
$CI_{50}$	28.255 $\mu$ g/mL			
$CI_{50}$ albendazol	0.011 $\mu$ g/mL			
Intervalo de confianza	28.567 – 27.955 $\mu$ g/mL			

Tabla 7. Resultados de actividad del compuesto NSC 195333. Ensayo 2

Concentración ( $\mu$ g/mL)	No. de trofozoitos vivos	No. de trofozoitos muertos	% mortalidad	Probit calculado
0.05	2 450 000	187 500	7.10	3.550
0.1	2 187 500	450 000	17.10	4.090
0.5	2 075 000	562 500	21.30	4.200
1.0	1 975 000	662 500	25.10	4.330
5.0	1 675 000	962 500	36.50	4.660
Control	2 637 500 trofozoitos /mL			
<b>CI<sub>50</sub></b>	<b>25.235 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>CI<sub>50</sub> albendazol</b>	<b>0.008 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>Intervalo de confianza</b>	<b>25.488 – 24.987 <math>\mu</math> g/mL</b>			

### Compuesto NSC 3826

Tabla 8. Resultados de actividad del compuesto NSC 3826. Ensayo 1

Concentración ( $\mu$ g/mL)	No. de trofozoitos vivos	No. de trofozoitos muertos	% mortalidad	Probit calculado
0.05	2 150 000	250 000	10.40	3.740
0.1	2 100 000	300 000	12.50	3.850
0.5	1 800 000	600 000	25.00	4.330
1.0	1 725 000	675 000	28.10	4.430
5.0	1 675 000	775 000	32.30	4.540
Control	2 400 000 trofozoitos/mL			
<b>CI<sub>50</sub></b>	<b>42.179 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>CI<sub>50</sub> albendazol</b>	<b>0.010 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>Intervalo de confianza</b>	<b>42.747 – 41.625 <math>\mu</math> g/mL</b>			

Tabla 9. Resultados de actividad del compuesto NSC 3826. Ensayo 2

Concentración ( $\mu$ g/mL)	No. de trofozoitos vivos	No. de trofozoitos muertos	% mortalidad	Probit calculado
0.05	3 475 000	425 000	10.90	3.770
0.1	3 350 000	550 000	14.10	3.920
0.5	3 075 000	825 000	21.20	4.200
1.0	2 750 000	1 150 000	29.50	4.470
5.0	2 600 000	1 300 000	33.30	4.570
Control	3 900 000 trofozoitos/mL			
<b>CI<sub>50</sub></b>	<b>44.999 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>CI<sub>50</sub> albendazol</b>	<b>0.013 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>Intervalo de confianza</b>	<b>45.486 – 44.517 <math>\mu</math> g/mL</b>			

**Compuesto NSC 401569**

**Tabla 10. Resultados de actividad del compuesto NSC 401569. Ensayo 1**

Concentración ( $\mu$ g/mL)	No. de trofozoitos vivos	No. de trofozoitos muertos	% mortalidad	Probit calculado
0.05	2 750 000	150 000	5.20	3.470
0.1	2 150 000	750 000	25.90	4.350
0.5	1 800 000	1 100 000	37.90	4.690
1.0	1 637 500	1 262 500	43.50	4.840
5.0	1 525 000	1 375 000	47.40	4.940
Control	2 900 000 trofozoitos/mL			
CI <sub>50</sub>	5.036 $\mu$ g/mL			
CI <sub>50</sub> albendazol	0.011 $\mu$ g/mL			
Intervalo de confianza	5.078 – 4.994 $\mu$ g/mL			

**Tabla 11. Resultados de actividad del compuesto NSC 401569. Ensayo 2**

Concentración ( $\mu$ g/mL)	No. de trofozoitos vivos	No. de trofozoitos muertos	% mortalidad	Probit calculado
0.05	2 225 000	100 000	4.30	3.39
0.1	1 762 500	575 000	24.20	4.390
0.5	1 475 000	850 000	38.70	4.720
1.0	1 325 000	1000 000	44.10	4.850
5.0	1 225 000	1 100 000	50.50	5.010
Control	2 325 000 trofozoitos/mL			
CI <sub>50</sub>	5.205 $\mu$ g/mL			
CI <sub>50</sub> albendazol	0.007 $\mu$ g/mL			
Intervalo de confianza	5.253 – 5.158 $\mu$ g/mL			

**Compuesto NSC 525203**

**Tabla 12. Resultados de actividad del compuesto NSC 525203. Ensayo 1**

Concentración ( $\mu$ g/mL)	No. de trofozoitos vivos	No. de trofozoitos muertos	% mortalidad	Probit calculado
0.05	3 850 000	550 000	12.50	3.860
0.1	3 825 000	575 000	13.10	3.880
0.5	3 766 666	633 334	14.40	3.950
1.0	3 500 000	900 000	20.50	4.180
5.0	2 683 333	1 716 667	39.00	4.720
Control	4 400 000 trofozoitos/mL			
CI <sub>50</sub>	37.958 $\mu$ g/mL			
CI <sub>50</sub> albendazol	0.008 $\mu$ g/mL			
Intervalo de confianza	38.292 – 37.622 $\mu$ g/mL			

Tabla 13. Resultados de actividad del compuesto NSC 525203. Ensayo 2

Concentración ( $\mu$ g/mL)	No. de trofozoitos vivos	No. de trofozoitos muertos	% mortalidad	Probit calculado
0.05	2 737 500	262 500	8.80	3.650
0.1	2 637 500	362 500	12.10	3.830
0.5	2 525 000	475 000	15.80	4.000
1.0	2 283 333	716 667	23.90	4.290
5.0	1 950 000	1 050 000	35.00	4.610
Control	3000 000 trofozoitos/mL			
CI <sub>50</sub>	34.922 $\mu$ g/mL			
CI <sub>50</sub> albendazol	0.007 $\mu$ g/mL			
Intervalo de confianza	35.266 – 34.578 $\mu$ g/mL			

### Compuesto FHL 210

Tabla 14. Resultados de actividad del compuesto FHL 210. Ensayo 1

Concentración ( $\mu$ g/mL)	No. de trofozoitos vivos	No. de trofozoitos muertos	% mortalidad	Probit calculado
0.05	2 950 000	275 000	8.50	3.630
0.1	2 875 000	350 000	10.90	3.770
0.5	2 800 000	425 000	13.20	3.890
1.0	2 612 500	612 500	19.00	4.120
5.0	2 250 000	975 000	30.20	4.480
Control	3 225 000 trofozoitos/mL			
CI <sub>50</sub>	104.954 $\mu$ g/mL			
CI <sub>50</sub> albendazol	0.010 $\mu$ g/mL			
Intervalo de confianza	106.387 – 03.551 $\mu$ g/mL			

Tabla 15. Resultados de actividad del compuesto FHL 210. Ensayo 2

Concentración ( $\mu$ g/mL)	No. de trofozoitos vivos	No. de trofozoitos muertos	% mortalidad	Probit calculado
0.05	3 725 000	362 500	8.90	3.670
0.1	3 675 000	412 500	10.10	3.720
0.5	3 600 000	487 500	11.90	3.840
1.0	3 400 000	657 500	19.30	4.130
5.0	2 825 000	1 262 500	30.90	4.500
Control	4 087 500 trofozoitos/mL			
CI <sub>50</sub>	90.469 $\mu$ g/mL			
CI <sub>50</sub> albendazol	0.015 $\mu$ g/mL			
Intervalo de confianza	91.511 – 89.450 $\mu$ g/mL			

## Compuesto FHL 211

Tabla 16. Resultados de actividad del compuesto FHL 211. Ensayo 1

Concentración ( $\mu$ g/mL)	No. de trofozoitos vivos	No. de trofozoitos muertos	% mortalidad	Probit calculado
0.05	3 425 000	262 500	7.10	3.530
0.1	3 275 000	412 500	11.20	3.790
0.5	2 937 500	750 000	20.30	4.170
1.0	2 625 000	1 062 500	28.80	4.440
5.0	1 975 000	1 712 500	46.40	4.910
<b>Control</b>	<b>3 687 500 trofozoitos/mL</b>			
<b>CI<sub>50</sub></b>	<b>7.008 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>CI<sub>50</sub> albendazol</b>	<b>0.010 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>Intervalo de confianza</b>	<b>7.037 – 6.98 <math>\mu</math> g/mL</b>			

Tabla 17. Resultados de actividad del compuesto FHL 211. Ensayo 2

Concentración ( $\mu$ g/mL)	No. de trofozoitos vivos	No. de trofozoitos muertos	% mortalidad	Probit calculado
0.05	2 000 000	225 000	10.10	3.730
0.1	1 925 000	300 000	13.50	3.900
0.5	1 612 500	612 500	27.50	4.410
1.0	1 475 000	750 000	33.70	4.580
5.0	1 275 000	950 000	42.70	4.820
<b>Control</b>	<b>2 225 000 trofozoitos/mL</b>			
<b>CI<sub>50</sub></b>	<b>8.183 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>CI<sub>50</sub> albendazol</b>	<b>0.007 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>Intervalo de confianza</b>	<b>8.238 – 8.129 <math>\mu</math> g/mL</b>			

## Compuesto FHL 212

Tabla 18. Resultados de actividad del compuesto FHL 212. Ensayo 1

Concentración ( $\mu$ g/mL)	No. de trofozoitos vivos	No. de trofozoitos muertos	% mortalidad	Probit calculado
0.05	2 150 000	425 000	16.5	4.03
0.1	1 962 500	612 500	23.80	4.290
0.5	1 825 000	750 000	29.10	4.450
1.0	1 550 000	1 025 000	39.80	4.750
5.0	1 425 000	1 150 000	44.7	4.870
<b>Control</b>	<b>2 575 000 trofozoitos/mL</b>			
<b>CI<sub>50</sub></b>	<b>8.111 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>CI<sub>50</sub> albendazol</b>	<b>0.015 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>Intervalo de confianza</b>	<b>8.179 – 8.045 <math>\mu</math> g/mL</b>			

Tabla 19. Resultados de actividad del compuesto FHL 212. Ensayo 2

Concentración ( $\mu$ g/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% mortalidad	Probit calculado
0.05	1 912 500	312 500	14.00	3.920
0.1	1 787 500	437 500	19.70	4.150
0.5	1 675 000	550 000	24.70	4.320
1.0	1 462 500	762 500	34.30	4.600
5.0	1 275 000	950 000	42.70	4.820
<b>Control</b>	<b>2 225 000 trofozoítos/mL</b>			
<b>CI<sub>50</sub></b>	<b>12.408 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>CI<sub>50</sub> albendazol</b>	<b>0.010 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>Intervalo de confianza</b>	<b>12.525 – 12.293 <math>\mu</math> g/mL</b>			

### Compuesto FHL 213

Tabla 20. Resultados de actividad del compuesto FHL 213. Ensayo 1

Concentración ( $\mu$ g/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% mortalidad	Probit calculado
0.05	2 950 000	225 000	7.10	3.530
0.1	2 725 000	450 000	14.20	3.94
0.5	2 450 000	725 000	22.80	4.260
1.0	2 200 000	975 000	30.70	4.500
5.0	1 450 000	1 725 000	54.30	5.11
<b>Control</b>	<b>3 175 000 trofozoítos/mL</b>			
<b>CI<sub>50</sub></b>	<b>4.055 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>CI<sub>50</sub> albendazol</b>	<b>0.010 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>Intervalo de confianza</b>	<b>4.069 – 4.042 <math>\mu</math> g/mL</b>			

Tabla 21. Resultados de actividad del compuesto FHL 213. Ensayo 2

Concentración ( $\mu$ g/mL)	No. de trofozoítos vivos	No. de trofozoítos muertos	% mortalidad	Probit calculado
0.05	3 100 000	287 500	8.50	3.630
0.1	2 800 000	587 500	17.30	4.070
0.5	2 600 000	787 500	23.20	4.270
1.0	2 337 500	1 050 000	31.00	4.510
5.0	1 537 500	1 850 000	54.60	5.120
<b>Control</b>	<b>3 387 500 trofozoítos/mL</b>			
<b>CI<sub>50</sub></b>	<b>4.209 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>CI<sub>50</sub> albendazol</b>	<b>0.007 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>Intervalo de confianza</b>	<b>4.225 – 4.195 <math>\mu</math> g/mL</b>			



## Compuesto FHL 214

Tabla 22. Resultados de actividad del compuesto **FHL 214**. Ensayo 1

Concentración ( $\mu$ g/mL)	No. de trofozoitos vivos	No. de trofozoitos muertos	% mortalidad	Probit calculado
0.05	3 650 000	437 500	10.70	3.760
0.1	3 425 000	662 500	16.20	4.020
0.5	3 150 000	937 500	22.90	4.260
1.0	3 000 000	1 087 500	26.60	4.380
5.0	2 775 000	1 312 500	32.10	4.540
Control	4 087 500 trofozoitos/mL			
<b>CI<sub>50</sub></b>	<b>74.645 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>CI<sub>50</sub> albendazol</b>	<b>0.010 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>Intervalo de confianza</b>	<b>75.608 – 73.688 <math>\mu</math> g/mL</b>			

Tabla 23. Resultados de actividad del compuesto **FHL 214**. Ensayo 2

Concentración ( $\mu$ g/mL)	No. de trofozoitos vivos	No. de trofozoitos muertos	% mortalidad	Probit calculado
0.05	3 350 000	375 000	10.10	3.730
0.1	3 125 000	600 000	16.10	4.020
0.5	2 925 000	800 000	21.50	4.210
1.0	2 750 000	975 000	26.20	4.360
5.0	2 525 000	1 200 000	32.20	4.540
Control	3 725 000 trofozoitos/mL			
<b>CI<sub>50</sub></b>	<b>71.318 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>CI<sub>50</sub> albendazol</b>	<b>0.007 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>Intervalo de confianza</b>	<b>72.241 – 70.397 <math>\mu</math> g/mL</b>			

## Compuesto FHL 215

Tabla 24. Resultados de actividad del compuesto FHL 215. Ensayo 1

Concentración ( $\mu$ g/mL)	No. de trofozoitos vivos	No. de trofozoitos muertos	% mortalidad	Probit calculado
0.05	3 800 000	212 500	5.30	3.390
0.1	3 583 333	429 167	10.70	3.770
0.5	3 462 500	550 000	13.70	3.910
1.0	3 275 000	737 500	18.40	4.100
5.0	3 125 000	887 500	22.10	4.230
Control	4 012 500 trofozoitos/mL			
<b>CI<sub>50</sub></b>	<b>352.939 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>CI<sub>50</sub> albendazol</b>	<b>0.015 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>Intervalo de confianza</b>	<b>359.812 – 46.165 <math>\mu</math> g/mL</b>			

Tabla 25. Resultados de actividad del compuesto FHL 215. Ensayo 2

Concentración ( $\mu$ g/mL)	No. de trofozoitos vivos	No. de trofozoitos muertos	% mortalidad	Probit calculado
0.05	2 137 500	137 500	6.00	3.450
0.1	2 050 000	225 000	9.90	3.720
0.5	2 000 000	275 000	12.10	3.830
1.0	1 850 000	425 000	18.70	4.120
5.0	1 750 000	525 000	23.10	4.260
Control	2 275 000 trofozoitos/mL			
<b>CI<sub>50</sub></b>	<b>311.315 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>CI<sub>50</sub> albendazol</b>	<b>0.010 <math>\mu</math> g/mL</b>			
<b>Intervalo de confianza</b>	<b>319.111 – 03.823 <math>\mu</math> g/mL</b>			

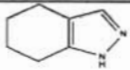
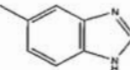
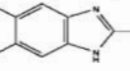
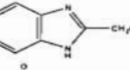
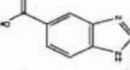
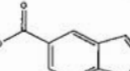
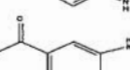
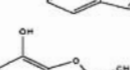
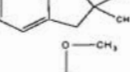
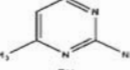
El promedio de los valores de CI<sub>50</sub> del control positivo fue:

Promedio	0.01005 $\mu$ g/mL
Desviación estándar	0.0026
Coficiente de variación	26.2269

En la Tabla 26 se muestra la estructura y el peso molecular de cada compuesto así como el promedio de los dos valores de la CI<sub>50</sub> obtenida para cada uno de ellos.

ESTA TESIS NO SALI  
DE LA BIBLIOTECA

Tabla 26.  $CI_{50}$  obtenida para cada compuesto heterociclico evaluado

Compuesto	Estructura	Peso molecular	$CI_{50}$ $\mu$ g/mL	$CI_{50}$ $\mu$ M
NSC 195333		122.17	26.745	218.91
NSC 3826		137.170	43.589	317.772
NSC 401569		160.22	36.44	231.83
NSC 525203		157.18	5.120	31.958
FHL 210		162.140	97.7115	602.636
FHL 211		161.157	7.595	47.045
FHL 212		161.57	10.259	56.995
FHL 213		164.201	4.132	25.164
FHL 214		139.155	72.981	524.46
FHL 215		145.547	332.127	2281.92

( TIC )

Data : 0110635-NSC-195333\_003

Date : 08-Sep-2005 11:19

Sample :

Note :

Inlet : GC

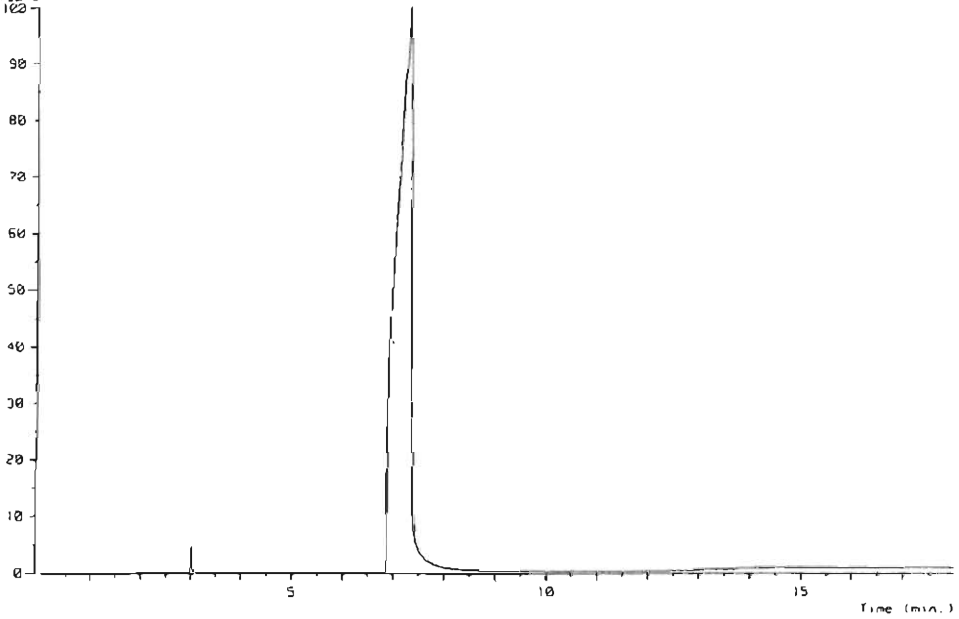
Ion Mode : FID

Ion Species : Normal Ion (19° Linear)

TIC Range : m/z 33 to 800

Output (T) Range : 0.02 to 18.02 min

150979243



( Mass Spectrum )

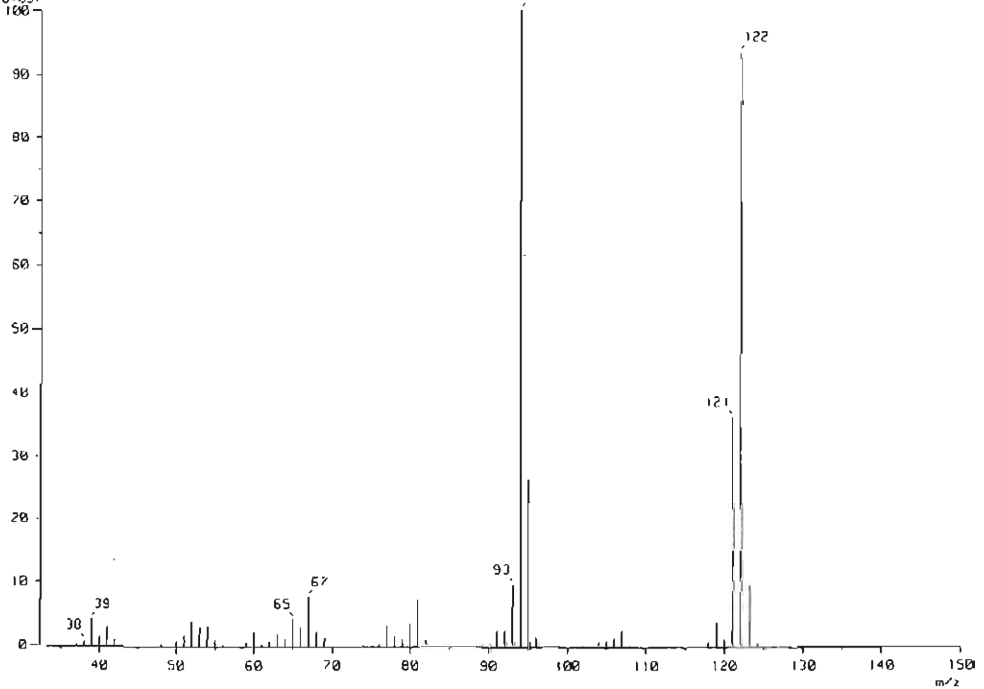
RT : 6.88 min

Scan# : (253,256)-k1(207,310)(k=1.0)

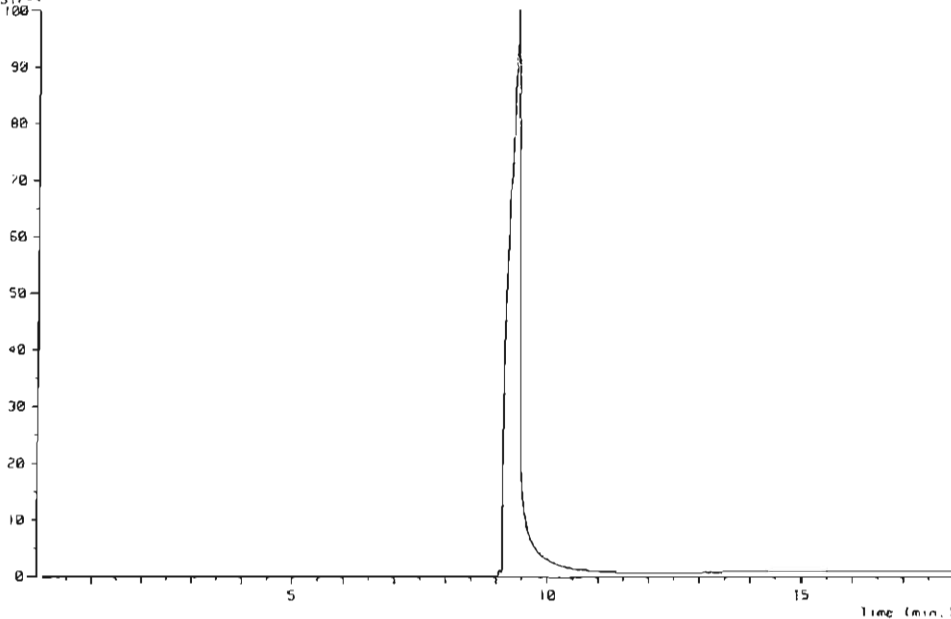
Ion Mode : CI+

Int. : 1154.34

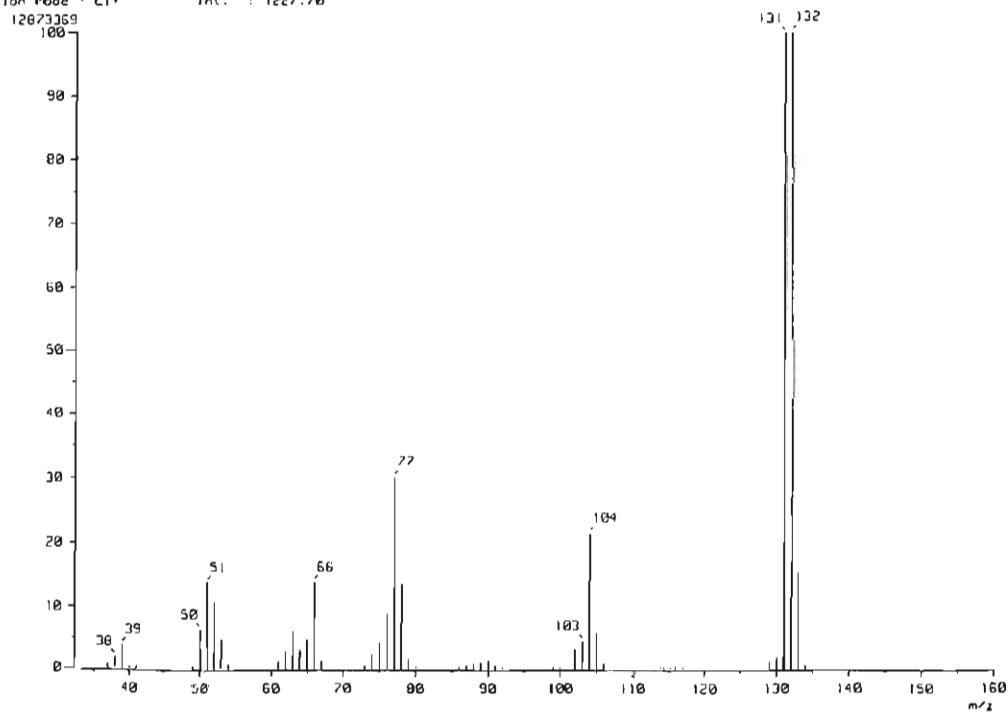
12104037



( TIC )  
Data : 0110536-NSC-3026\_002 Date : 08-Sep-2005 12:05  
Sample : -  
Note : -  
Inlet : GC Ion Mode : EI+  
Ion Species : Normal Ion (MF-Linear)  
IIC Range : m/z 33 to 800 Output RT Range : 0.00 to 18.00 min  
141531744



( Mass Spectrum )  
RT : 9.44 min Scan# : (348,349)-k((367,385))(k=1.0)  
Ion Mode : EI+ Int. : 1227.70



[ TIC ]

Data : 0710527\_USC401569\_001

Date : 17-Aug-2005 16:29

Sample :

Note : -

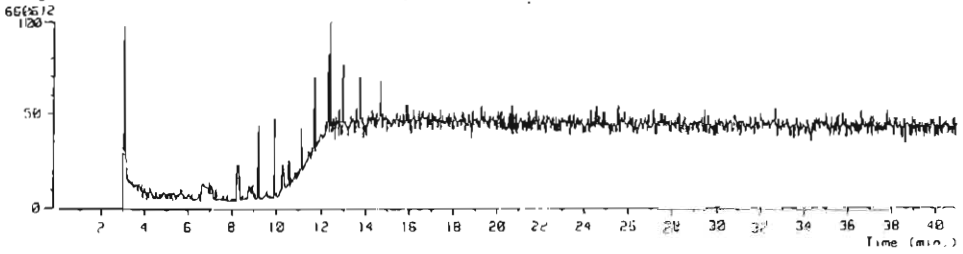
Inlet : GC

Ion Mode : EI+

Ion Species : Normal (on MS-Linear)

TIC Range : m/z 33 to 600

Output RI Range : 0.00 to 41.00 min



i TIC )

Date : 0110620\_NSC525203\_001

Date : 17-Aug-2005 18:21

Sample : -

Note : -

Inlet : GC

Ion Mode : ESI

Ion Species : Normal (un iPE-Linear)

TIC Range : m/z 33 to 800

Output RT Range : 0.00 to 41.00 min

