



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación de la actividad antiprotozoaria
in vitro de derivados del bencimidazol.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A:

GUADALUPE IVONE ROSAS MARTÍNEZ



MEXICO, DF.

2006



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.

DEDICATORIA

Les dedico este trabajo principalmente a ustedes: **Papá y Mamá**, que con sus sacrificios, esfuerzos y oraciones me han llevado hasta donde estoy ahora. Gracias por darme la oportunidad de hacer todos mis sueños realidad. También agradezco a mis hermanos, **Víctor y Rodolfo**, por saber entenderme y soportarme en mis momentos de angustia. Gracias por estar siempre dispuestos a ayudarme para que pudiera terminar mis estudios.

Doy gracias a Dios por la familia que me brindo, ya que sin ellos no podría haber este sueño tan deseado. También doy gracias por darme el honor de brindarles a mis padres el orgullo de ver a su hija titulada.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos por el apoyo que me han brindado.

A CONACYT por la beca otorgada y por el apoyo económico para la realización del presente trabajo de tesis de licenciatura a través del proyecto V43629-M.

A la Dra. Lilián Yépez por haberme abierto las puertas del laboratorio, por sus consejos, por su tiempo. Gracias por todo.

Al Dr. Francisco por su confianza, por su gran paciencia, por compartir sus conocimientos, por sus consejos y por impulsarme a ser mejor cada día. Solo puedo decirle muchas gracias.

A Fernanda por ayudarme y apoyarme siempre para poder terminar exitosamente esta tesis. También agradezco tu amistad.

A todos los integrantes del laboratorio de Parasitología, Amparito, Rosita, Nancy, Lety, Chucho, Luz Ma., "Chela", Gabriel, Joel, por sus consejos, amistad y ayuda.

A mis amigos Lupita, Alicia, Sandra, Dulce, Citlalli y Martín, que cuando me veían en la duda, me daban ese empujoncito extra para seguir adelante. Gracias por su amistad y apoyo.

Al Dr. Castillo y la M. en C. Alicia por abrirme las puertas del laboratorio 122.

INDICE

Introducción	1
1. Antecedentes	3
1.1. <i>Giardia intestinalis</i>	3
1.1.1. Epidemiología	3
1.1.2. Taxonomía	4
1.1.3. Metabolismo	5
1.1.4. Morfología	6
1.1.5. Ciclo de vida	8
1.1.6. Patogenia	9
1.1.7. Manifestaciones clínicas	10
1.1.8. Tratamiento	11
1.2. <i>Trichomonas vaginalis</i>	13
1.2.1. Epidemiología	13
1.2.2. Taxonomía	14
1.2.3. Metabolismo	15
1.2.4. Morfología	15
1.2.5. Ciclo de vida	16
1.2.6. Patogenia	17
1.2.7. Manifestaciones clínicas	18
1.2.8. Tratamiento	19
1.3. Bencimidazoles y nitroheterociclos	20
1.3.1. Modificaciones al núcleo bencimidazólico	20
1.3.2. Mecanismo de acción de los bencimidazoles	26
1.3.3. Mecanismo de acción de nitroheterociclos	26
1.3.4. Híbridos de derivados bencimidazólicos	29
2. Planteamiento del problema	31
3. Hipótesis y objetivos	32
3.1. Hipótesis	32
3.2. Objetivo general	32
3.3. Objetivos particulares	33

4. Metodología	34
4.1. Cultivo de trofozoítos de <i>G. intestinalis</i> y <i>T. vaginalis</i>	34
4.2. Curva de crecimiento de <i>G. intestinalis</i> y <i>T. vaginalis</i>	35
4.3. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad giardicida y tricomonocida de los compuestos híbridos	36
4.4. Exploración de la estabilidad química de BZHNOS-3 en los medios de cultivo mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	39
5. Resultados y discusiones	41
5.1. Curva de crecimiento de <i>G. intestinalis</i>	41
5.2. Determinación de la CI_{50} y de la CI_{90} de los compuestos híbridos sobre trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	42
5.3. Curva de crecimiento de <i>T. vaginalis</i>	47
5.4. Determinación de la CI_{50} y de la CI_{90} de los compuestos híbridos sobre trofozoítos de <i>T vaginalis</i>	48
5.5. Exploración de la estabilidad química del compuesto BZHNOS-3 mediante CLAR	53
6. Conclusiones	58
7. Referencias	60
Anexo 1. Desarrollo del procedimiento experimental	65
Anexo 2. Desglose de datos experimentales	79

1. ANTECEDENTES

Este capítulo contiene la información referencial del presente trabajo de investigación. La información se organizó en tres apartados principales, el primero presenta generalidades de *G. intestinalis*, el segundo abarca lo relacionado a *T. vaginalis* y el tercero trata sobre generalidades de bencimidazoles y nitroheterociclos.

1.1. *Giardia intestinalis*

1.1.1. Epidemiología

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.⁵

En México, la Secretaría de Salud informó en el año 2004, que las protozoosis de mayor incidencia eran la amebiasis intestinal y la giardiosis, con 834, 601 y 40, 906 casos, respectivamente. De esta última, en el mes de agosto se registró el mayor número de casos (4, 487 casos). Por tal motivo la giardiosis ha adquirido el segundo lugar dentro de las enfermedades infecto-parasitarias.²

De acuerdo a datos epidemiológicos, la población infantil de 1-9 años es la población más susceptible a la giardiosis (Figura 1). Los estados de Sinaloa, Distrito Federal, Estado de México, Chiapas, Veracruz y Yucatán son los de mayor incidencia.

La transmisión fundamentalmente es fecal-oral a través del consumo de aguas o alimentos contaminados con quistes. El reservorio fundamental es el hombre, enfermo o portador asintomático; sin embargo, es frecuente en animales domésticos como perros, gatos, pájaros, caballos, cabras, vacas.³

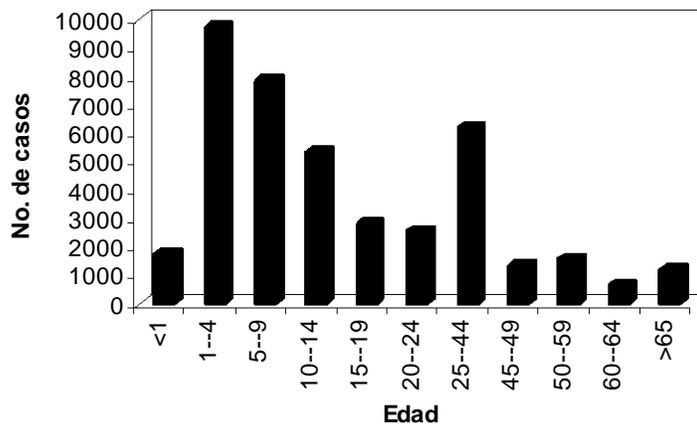


Figura 1. Datos epidemiológicos por edad en 2004.

1.1.2. Taxonomía

En la clasificación de los protozoos (Cuadro 1), *G. intestinalis* es un protozoario que forma parte del reino Protista, se incluye en el phylum *Sarcomastigophora* (locomoción por flagelos y/o seudópodos), subphylum *Mastigophora* (locomoción por flagelos), clase *Zoomastigophorea* (cloroplastos ausentes), orden *Diplomonadida* (organelos duplicados con simetría bilateral con dos núcleos y seis a ocho flagelos), subclase *Diplomonadida*, familia *Hexamitidae* que incluye un único género, *Giardia*.⁶

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *G. intestinalis*

Reino	Protista
Subreino	<i>Protozoa</i>
Phylum	<i>Sarcomastigophora</i>
Subphylum	<i>Mastigophora</i>
Clase	<i>Zoomastigophorea</i>
Orden	<i>Diplomonadida</i>
Subclase	<i>Diplomonadida</i>
Familia	<i>Hexamitidae</i>
Género	<i>Giardia</i>
Especie	<i>intestinalis</i>

1.1.3. Metabolismo

Giardia intestinalis es un anaerobio microaerotolerante, carece de mitocondria y biotransforma la glucosa a etanol, acetato y CO₂. Su metabolismo es glicolítico y fermentativo. La parte terminal de la ruta glicolítica la ejecuta la piruvato-ferredoxin oxidoreductasa (PFOR), enzima análoga a la piruvato deshidrogenasa que se encuentra en los 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 tricarboxílicos 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 CO₂, 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.⁵

1.1.4. Morfología

Como otras especies de este género, *G. intestinalis* incluye dos fases o estadios: el trofozoíto (forma vegetativa) cuyo hábitat es el intestino delgado (duodeno y yeyuno), siendo responsable de las manifestaciones clínicas y el quiste (forma de resistencia e infecciosa) responsable de la transmisión del parásito.

El trofozoíto de *G. intestinalis* (Figura 2) tiene una morfología periforme, de 10-12 µm de largo y 5-7 µm de ancho, convexo dorsalmente y con una concavidad ventral (disco ventral). Posee dos núcleos ovoides, situados simétricamente a cada lado de la línea media. El citoesqueleto consta del disco ventral, los cuerpos medios y los cuatro pares de flagelos. El disco ventral es una estructura cóncava de 0,4 µm rígida que contacta con las microvellosidades intestinales. Los cuerpos medios están localizados en la línea media del trofozoíto y dorsal al flagelo caudal. Este parásito presenta cuatro pares de flagelos (antero-lateral, postero-lateral, caudal y ventral) que se originan de cuatro pares de cuerpos basales o blefaroplastos en la cara ventral del cuerpo del trofozoíto con sus correspondientes axonemas. Otros organelos presentes en el citoplasma son los ribosomas, los lisosomas, que contienen hidrolasas, DNAsas, RNAsas, cistein-proteasas y el retículo endoplásmico. Carecen de otros organelos características de las células eucariotas como son las mitocondrias.^{7, 8, 9}

Los quistes de *G. intestinalis* (Figura 2), tienen una morfología elipsoidal, de 8- 12 μm de longitud y 5-8 μm de ancho. Poseen un citoplasma granular, fino, claramente separado de una pared quística de 0,3 μm de espesor adosada a la membrana plasmática del parásito. La pared del quiste es refráctil y su porción externa presenta una estructura fibrilar compuesta por 7 a 20 filamentos, mientras, la porción interna es membranosa. Ambas se encuentran separadas por el espacio periplásmico. La pared externa del quiste esta constituida por galactosa y quitina. También se observan numerosos ribosomas, vacuolas y fragmentos del disco ventral.^{7,9}

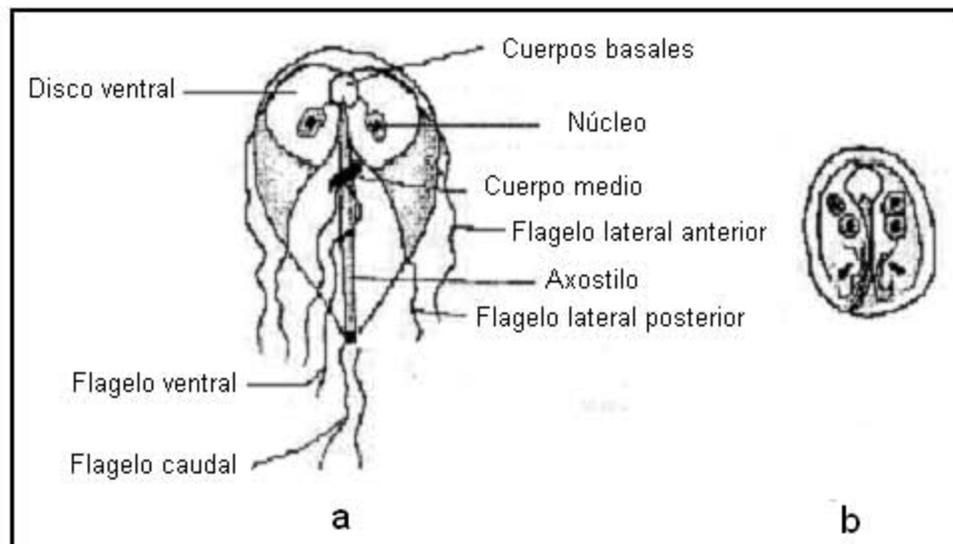


Figura 2. Trofozoíto (a) y quiste (b) de *G. intestinalis*.

1.1.5. Ciclo de vida

La infección del huésped inicia por la ingestión del quiste vía oral. La fuente de infección es la materia fecal. Ya ingerido el quiste pasa por la parte alta del tubo digestivo y llega al estómago. En este órgano se inicia el desenquistamiento al reblandecerse la pared quística por acción de las propias hidrolasas de *G. intestinalis*. Después se libera al trofozoíto en el duodeno, la pared quística se rompe y da lugar a una fase intermedia entre el quiste y el trofozoíto, llamado exquizoíto. Se fija a la pared intestinal (mucosa de duodeno y yeyuno) mediante su disco ventral, se multiplica por fisión binaria longitudinal y ahí vive hasta que es arrastrado por el tránsito intestinal, al avanzar hacia intestino grueso, se va transformando debido a que se deshidrata y entra en contacto con las sales biliares, dejando de ser trofozoíto para transformarse en quiste, a este proceso se le conoce como enquistación. El quiste es eliminado en la materia fecal, permaneciendo viables en el suelo húmedo o en el agua por meses, repitiéndose el ciclo de vida varias veces (Figura 3). Cuando el proceso de enquistación no se lleva a cabo sale como trofozoíto, debido a que el tránsito intestinal es acelerado, al salir como trofozoíto se desintegra por que no tiene las condiciones para resistir el ambiente.^{6, 7, 8}

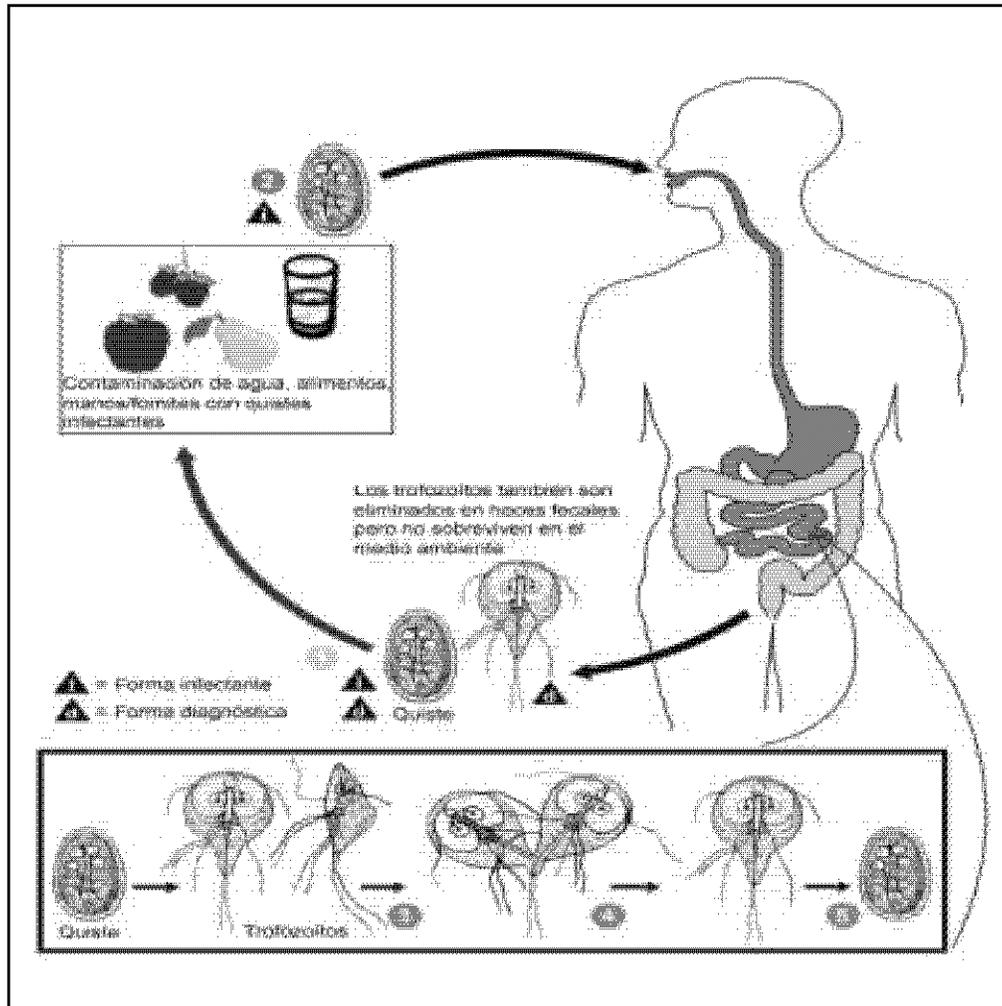


Figura 3. Ciclo de vida de *G. intestinalis*.

1.1.6. Patogenia

El mecanismo patogénico es multifactorial y se han implicado a factores dependientes tanto del parásito como del hospedero.¹⁰ En primer lugar, ciertas alteraciones histoquímicas de la mucosa intestinal, debidas a la fijación y desprendimiento de los flagelos mediante su disco ventral, que se traducen en una atrofia de las microvellosidades intestinales, lo que lleva consigo a una pérdida o disminución de la actividad de las disacaridasas (lactasa,

maltasa, sacarasa y otras), una disminución de la absorción de vitamina B₁₂, una alteración en el transporte de glucosa-sodio y en la absorción de D-xilosa y una reducción de la absorción de solutos.^{3,7}

1.1.7. Manifestaciones clínicas

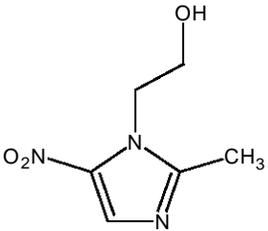
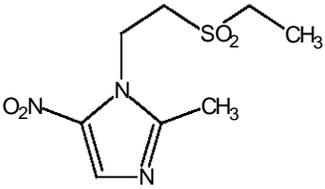
En los pacientes con giardiosis la sintomatología clínica difiere de persona a persona, dependiendo de muchos factores como el tamaño del inóculo, duración de la infección, la respuesta inmunitaria y la virulencia de la cepa. La mayoría de los pacientes infectados son asintomáticos.^{3,8}

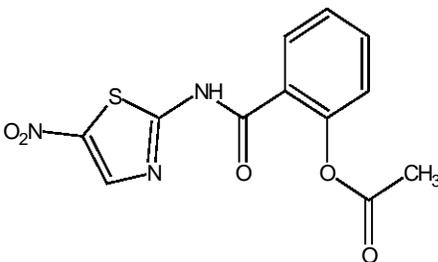
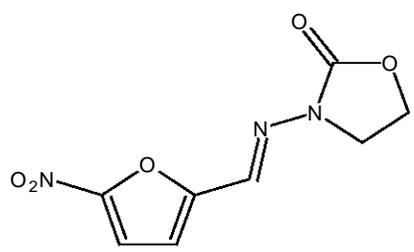
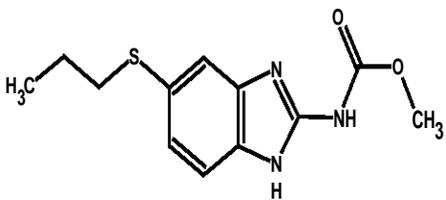
El tiempo de incubación de *G. intestinalis* varía aproximadamente entre 9-15 días. La infección puede evolucionar de forma aguda, subaguda o crónica. La sintomatología gastrointestinal para infecciones agudas y crónicas comprenden las siguientes manifestaciones: diarrea, estreñimiento, flatulencias, dolor, distensión abdominal, fatiga, anorexia, náusea, pérdida de peso, vómito, moco en heces, sangre en heces, fiebre y déficit de absorción de lactosa, glucosa, grasa, xilosa, vitamina A, vitamina B₁₂/fólico.³ Sin embargo, cabe mencionar que en giardiosis crónicas la sintomatología predominante es malestar abdominal acompañado con el dolor epigástrico difuso.^{3,7}

1.1.8. Tratamiento

Se han utilizado diversos fármacos para tratar la giardiosis, entre ellos algunos derivados del nitroimidazol como el metronidazol y tinidazol, un nitrofurano: furazolidona y recientemente un derivado del nitrotiazol: nitazoxanida (Cuadro 2). Así mismo se han utilizado algunos bencimidazoles como el albendazol y mebendazol en el tratamiento de estas parasitosis.^{5, 11, 12, 13}

Cuadro 2. Fármacos utilizados para el tratamiento de la Giardiosis

Fármaco	Dosis Adulto	Dosis niños	Efectos adversos
metronidazol 	750 mg -1 g/día por 5 días 2 g/día por 3 días	20 mg/kg/día en 3 dosis por 5 días	Dolor de cabeza, vértigo, náusea, sabor metálico, urticaria. Reacción de tipo disulfiram cuando se ingiere alcohol. Se han informado 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 en dosis única	50-75 mg/Kg/día dosis única (máximo 2 g)	Náuseas, anorexia, sabor metálico. Leucopenia y reacciones de hipersensibilidad, ocasionalmente se manifiesta fatiga, cefalea y orina oscura.

Fármaco	Dosis Adulto	Dosis niños	Efectos adversos
<p>nitazoxanida</p> 	1 g/día en 2 dosis por 3 días	15 mg/kg/día en 2 dosis por 3 días	Náuseas, cefaleas y dolor abdominal en algunos casos.
<p>furazolidona</p> 	400 mg/día en 4 dosis por 7-10 días	6 mg/Kg/día en 4 dosis por 7-10 días.	Náusea, fiebre, dolor gastrointestinal, orina café, vómito, diarrea, reacción tipo disulfiram cuando se ingiere alcohol.
<p>albendazol</p> 	400 mg/día por 5 días	15 mg/Kg/día por 5-7 días (máximo 400 mg)	Mareos, astenia, cefalea, anorexia y constipación.

1.2. *Trichomonas vaginalis*

1.2.1. Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud ha estimado que 120-180 millones de personas se infectan anualmente en el mundo con *T. vaginalis*, que es un parásito de distribución cosmopolita y se presenta en todos los grupos raciales y niveles socioeconómicos.¹⁴

En México, la Secretaría de Salud informó que en el año 2004, la tricomoniosis ocupó el segundo lugar dentro de las enfermedades de transmisión sexual con 172,772 casos. Se presenta con la misma frecuencia durante todo el año.²

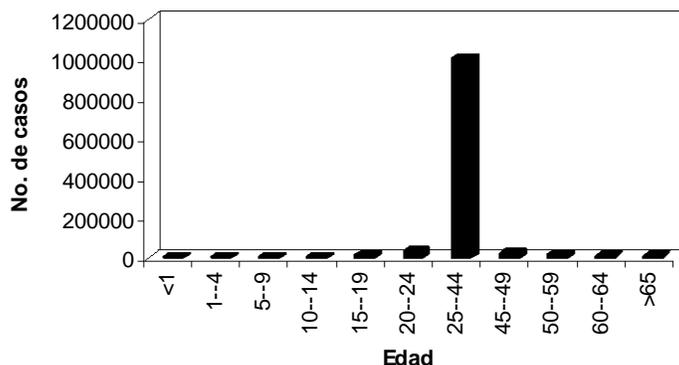


Figura 4. Datos epidemiológicos por edades 2004

De acuerdo a datos epidemiológicos, la tricomoniosis tiene una alta prevalencia en adultos entre 25-44 años, de edad, con 1,006,822 casos (Figura 4). Los estados de la República Mexicana con mayor incidencia son: Estado de México (13,245 casos), Chiapas (13,019 casos), Puebla (12,073 casos) y Oaxaca (10,834 casos),

La transmisión es a través de contacto sexual y el humano es el huésped natural. La presencia de síntomas es más frecuente e importante en el sexo femenino.¹⁵

1.2.2 . Taxonomía

En la clasificación de los protozoos (Cuadro 3) *T. vaginalis* es un protozoario que forma parte del reino Protista, se incluye en el phylum *Zoomastigina*, subphylum *Mastigophora* (locomoción por flagelos) , clase *Zoomastigophorea* (cloroplastos ausentes), orden *Trichomonadida*, familia *Trichomonadidae* que incluye un único género *Trichomonas*, especie *vaginalis*.^{15, 16}

Cuadro 3. Clasificación taxonómica de *T. vaginalis*

Reino	Protista
Subreino	<i>Protozoa</i>
Phylum	<i>Zoomatigina</i>
Subphylum	<i>Mastigophora</i>
Clase	<i>Zoomastigophorea</i>
Orden	<i>Trichomonadida</i>
Familia	<i>Trichomonadidae</i>
Género	<i>Trichomonas</i>
Especie	<i>vaginalis</i>

1.2.3. Metabolismo

Trichomonas vaginalis es un parásito anaerobio aerotolerante que carece de mitocondria y enzimas mitocondriales (excepto algunas malato deshidrogenasas). No presenta ciclo de Krebs, transporte de electrones mediado por citocromos o fosforilación oxidativa, por lo que su metabolismo es glicolítico y fermentativo. La vía glicolítica de glucosa a piruvato se localiza en el citosol; los productos finales de esta etapa son lactato y glicerol. La parte final de la vía glicolítica se lleva a cabo en el hidrogenosoma y la ejecuta la PFOR, la cual transfiere los electrones a la ferredoxina y ésta a su vez a la enzima hidrogenasa; los productos finales del metabolismo fermentativo de *T. vaginalis* en el hidrogenosoma son: acetato, hidrógeno y dióxido de carbono.^{5, 17}

1.2.4. Morfología

Trichomonas vaginalis es un protozoario de forma ovoide o periforme que mide de 7–30 µm de longitud y de 5–15 µm de ancho (Figura 5). El trofozoíto se caracteriza por presentar cuatro flagelos dispuestos de dos en dos en la parte anterior y un flagelo recurrente que forma la membrana ondulante, que no llega a la parte posterior del cuerpo. El flagelo libre y la membrana ondulante le confieren al parásito la motilidad espasmódica característica.¹⁸

Los quistes no existen, observándose sólo el estadio de trofozoítos, sin embargo aunque carece de formas de resistencia, la quitina asociada a estructuras de superficie le permiten sobrevivir en condiciones ácidas (pH 4.0-4.5).

La célula presenta un núcleo grande, ovalado, excéntrico y localizado en el extremo anterior, un citoplasma rico en carbohidratos, con gran número de vacuolas (incluyendo liposomas). *T. vaginalis* no posee mitocondrias, pero sí hidrogenosomas, que son organelos sin ADN formados por 3 gránulos cromáticos.^{15, 16, 18}

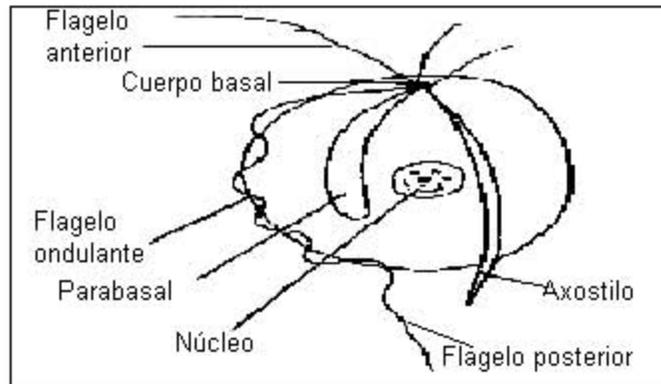


Figura 5. Trofozoíto de *T. vaginalis*

1.2.5. Ciclo biológico

El ciclo de vida de *T. vaginalis* (Figura 6) inicia con la transmisión del trofozoíto de persona a persona por contacto sexual y se establece en la mucosa vaginal, uretra femenina o masculina y próstata. Se divide por fisión binaria en el lumen y en la superficie de la mucosa del tracto urogenital.^{6, 19}

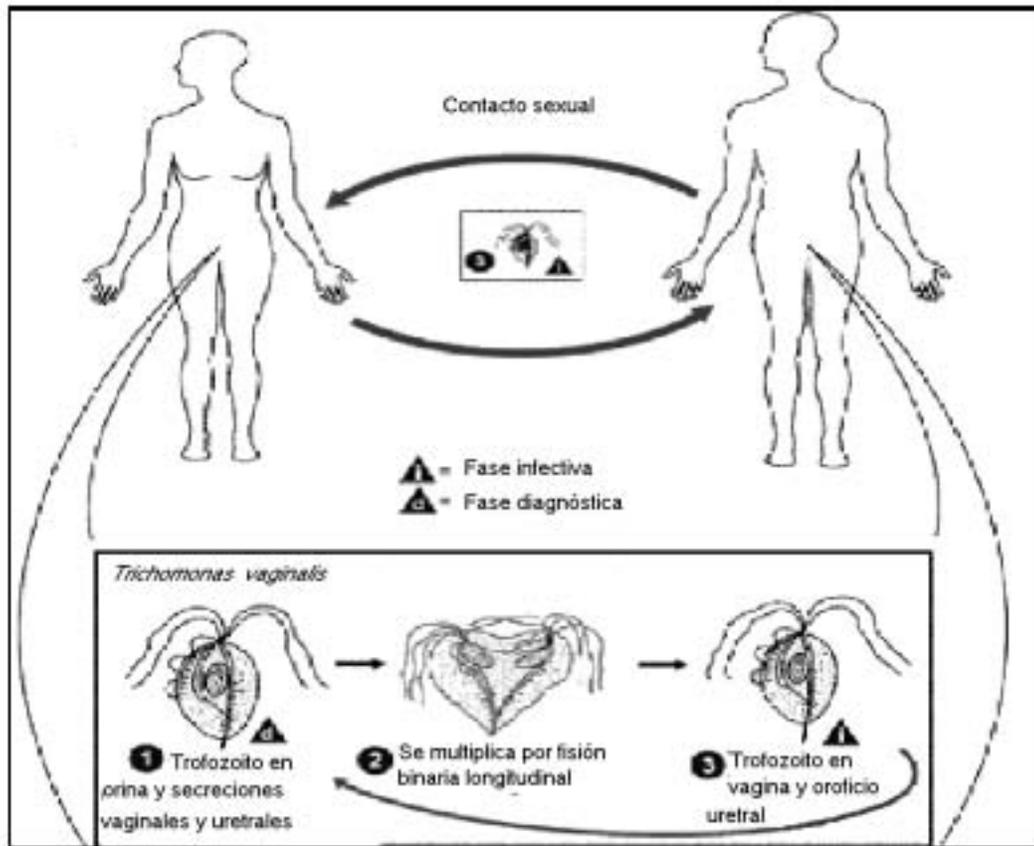


Figura 6. Ciclo biológico de *T. vaginalis*.

1.2.6. Patogenia

Trichomonas vaginalis posee una elevada especificidad para unirse solamente a las células epiteliales de la mucosa del tracto genitourinario; proceso mediado por proteasas que se encuentran en la superficie del parásito y que son determinantes en el establecimiento de la infección así como de la patogenicidad del mismo.^{6,20} Una vez implantado el microorganismo en la vagina, es capaz de obtener nutrientes a partir de las bacterias y leucocitos presentes en el medio, además de destruir las células del hospedero. El ataque del parásito a la célula hospedera es un pre-requisito para el establecimiento de la infección,

tal que el organismo pueda vencer la constante secreción de la vagina.²⁰ Residuos de azúcares, en particular alfa-D-manosa y N-acetilglucosamina, presentes en el parásito, están involucradas en el proceso de ataque de *T. vaginalis* a la célula epitelial del hospedero por lo que remover estos azúcares de la superficie del parásito previene del ataque y con ello el daño de las células epiteliales. Varios autores han sugerido que una señal de virulencia puede estar dada por la capacidad de *T. vaginalis* de cambiar de forma redondeada a la ameboidea y en otros estudios se ha mostrado que este parásito en esta forma ameboidea contiene una densa red de microfilamentos en el lugar de contacto con la célula epitelial.^{15, 16, 18} Se ha identificado y caracterizado una cisteín proteinasa de 30 kDa (CP30), como la proteinasa necesaria para que se lleve a cabo la adhesión del parásito a su célula blanco en la vagina y ectocérvix.²¹ Como *T. vaginalis* carece de la propiedad para sintetizar lípidos, los eritrocitos pueden ser una fuente de ácidos grasos para el parásito.²⁰

1.2.7. Manifestaciones clínicas

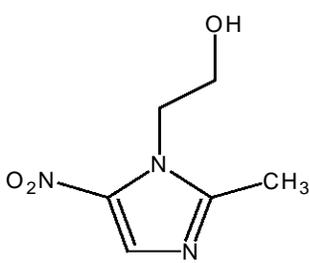
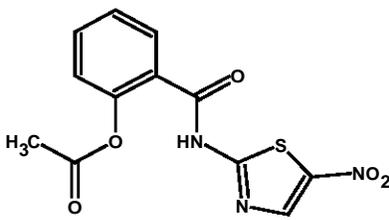
Los síntomas se desarrollan de 4 a 30 días después de la infección, la presencia de síntomas es más frecuente e importante en el sexo femenino. Las variadas formas clínicas de la enfermedad dependen probablemente del número, de la virulencia del parásito y de la resistencia del hospedero. Se plantea que los síntomas son mayores cuanto mayor es el número de parásitos y cuanto más alcalino sea el pH vaginal. La infección se puede presentar de tres formas: vaginitis asintomática, vulvovaginitis aguda o crónica y uretritis. La manifestación clínica más frecuente es la vulvovaginitis de evolución aguda o crónica y el signo o síntoma más común es la leucorrea, que se presenta como una secreción de tipo purulenta y espumosa. La leucorrea puede ser variable en cantidad, de color

amarillento, verdoso o gris inodora o de un olor fuerte. Otros síntomas son el prurito vulvar, el ardor y la irritación genital dolorosa. En el hombre la tricomoniosis es a menudo asintomática, o puede causar uretritis, prostatitis, cistitis, epididimítis, esterilidad y a veces es responsable de una irritación persistente.^{15, 16}

1.2.8 Tratamiento

El fármaco de elección para tratar la tricomoniosis (Cuadro 4), es un derivado del nitroimidazol: el metronidazol y recientemente un derivado del nitrotiazol: la nitazoxanida. Sin embargo existen otros fármacos para el tratamiento de la tricomoniosis como el tinidazol, ornidazol y secnidazol.^{5, 11, 12, 13}

Cuadro 4. Fármacos utilizados para el tratamiento de Tricomoniosis

Fármaco	Dosis Adulto	Efectos adversos
<p>metronidazol</p> 	<p>2 g en dosis única</p> <p>1 g/día cada 12 h por 1 día</p> <p>250 mg cada 8 h por 7 días</p>	<p>Dolor de cabeza, vértigo, náusea, sabor metálico, urticaria. Reacción de tipo disulfiram cuando se ingiere alcohol. Se han informado algunos casos de pancreatitis, toxicidad al sistema nervioso central, neutropenia reversible y neuropatía periférica. No hay pruebas de mutagenicidad y carcinogenicidad en humanos.</p>
<p>nitazoxanida</p> 	<p>45 mg/Kg dosis única(máximo 3 g)</p> <p>500 mg cada 12 h por 3 días</p> <p>2 g en dosis única</p>	<p>Náuseas, cefaleas y dolor abdominal en algunos casos</p>

1.3. Bencimidazoles y nitroheterociclos

1.3.1 Modificaciones al núcleo bencimidazólico

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 7). El núcleo bencimidazólico es un heterociclo versátil debido a su amplio espectro de actividad biológica: antifúngica, antiparasitaria, antiviral, antimicrobiana, entre otros.²² El descubrimiento de un derivado bencimidazólico, el tiabendazol, como fármaco antiparasitario, abrió una nueva era en el tratamiento de las enfermedades gastrointestinales causadas por helmintos.²³

Diversas modificaciones estructurales al tiabendazol dieron lugar a una nueva generación de compuestos antihelmínticos, conocidos como los bencimidazoles-2-carbamato de metilo, de los cuales el albendazol y el mebendazol son los más representativos de este grupo.

En estudios *in vitro*, el albendazol mostró una mayor potencia giardicida que el metronidazol.^{24, 25} Los valores de CI_{50} (concentración inhibitoria media) fueron de 0.010 $\mu\text{g/mL}$ para el albendazol y 0.210 $\mu\text{g/mL}$ para el metronidazol.²⁵ Sin embargo, en estudios *in vivo* la actividad del albendazol fue similar a la del metronidazol al requerirse en ambos casos de 7 a 10 días de tratamiento en dosis similares;¹¹ esto al parecer se debe a dos factores importantes: la baja solubilidad acuosa del albendazol y el corto tiempo de

exposición del parásito al fármaco; como ya se mencionó, *G. intestinalis* coloniza duodeno y yeyuno donde el tiempo de permanencia del contenido intestinal es de 2 a 2.5 h.²⁶

El efecto sistémico del albendazol se debe a su metabolito principal, el sulfóxido de albendazol, el cual se forma rápidamente en el hígado después de la absorción.²⁷ Las ventajas en el tratamiento del albendazol son: sus pocos efectos adversos y su amplio espectro contra nemátodos, céstodos y tremátodos además de *G. intestinalis*.^{24, 28} Por estos motivos, los bencimidazoles han despertado gran interés en el área de la Química Farmacéutica como estructuras para ser modificadas en busca de nuevos agentes antiparasitarios.^{29, 30}

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. Los sitios donde se ha llevado a cabo las principales modificaciones moleculares en el núcleo bencimidazólico se presenta en la Figura 7.

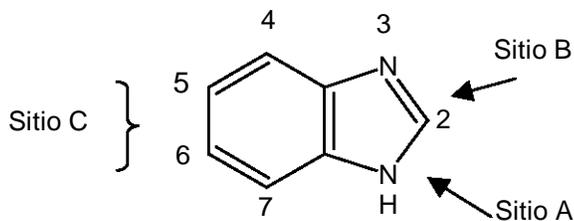


Figura 7. Sitios de modificación molecular al núcleo bencimidazólico

Se han realizado modificaciones en el sitio A, posición 1, incluyendo como sustituyente al grupo -CH₃ y en el sitio B, posición 2, como sustituyente al grupo CF₃. Los resultados de actividad giardicida (Cuadro 5) indican que el átomo de hidrógeno en posición 1, no es indispensable para la actividad antiparasitaria. La presencia de un grupo metilo en posición 1, incrementa la actividad antiparasitaria de la molécula, la cual puede ser aumentada si se incluye un átomo de cloro en posición 5 (Compuesto **20**, Cuadro 5).³¹

Cuadro 5. Actividad giardicida *in vitro* de derivados del 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol

COMPUESTO	R ₁	R ₂	R ₃	CI ₅₀ (μM)
16	H	H	H	0.107
17	Cl	H	H	1.282
18	Cl	Cl	H	0.078
19	H	H	CH ₃	0.064
20	Cl	H	CH ₃	0.042
22	H	Cl	CH ₃	0.260

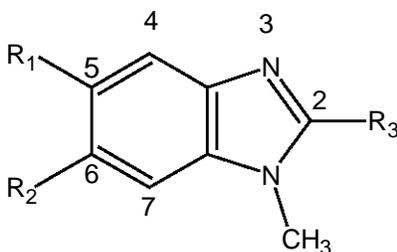
Todos los compuestos evaluados con excepción del compuesto **17**, tuvieron una actividad giardicida superior al metronidazol (CI₅₀ 1.220 μM), sólo el compuesto **20** fue tan activo como el albendazol (CI₅₀ 0.037 μM).

Por otro lado, el tamaño de los sustituyentes en el sitio B, posición 2 (H, CH₃, NHCO₂CH₃, SH, SCH₃, CF₃) pueden ser determinantes para que se presente actividad giardicida. En el Cuadro 6 se observa que el grupo -SH en posición 2, confiere mayor actividad giardicida a la molécula.^{31, 32}

Todos lo compuestos evaluados con excepción del compuesto **RSD-2**, tienen una actividad giardicida superior al metronidazol (Cl₅₀ 1.220 μM), el compuesto **RSD-9** es tan activo como el albendazol y el compuesto **RSD-3** es más activo que el albendazol (Cl₅₀ 0.037 μM).

Cuadro 6. Actividad giardicida *in vitro* de derivados del 1-metilbencimidazoles

COMPUESTO	R ₁	R ₂	R ₃	Cl ₅₀ (μM)
RSD-1	H	H	CH ₃	0.089
RSD-2	H	H	NH ₂	1.306
RSD-3	H	H	SH	0.018
RSD-9	H	H	SCH ₃	0.033
19	H	H	CF ₃	0.064

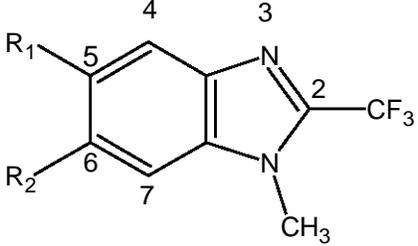


Finalmente se observó que modificaciones en el sitio C; posición 5 y 6 es un factor determinante para la actividad biológica de un bencimidazol. Además, los sustituyentes en estas posiciones previenen que la molécula sufra de metabolismo y pierda actividad. Estudios recientes han mostrado que sustituyentes con carácter electroatractor en las posiciones 2, 5 y 6 presentan buena actividad giardicida. Por lo tanto, sustituyentes con carácter electrodonador en estas posiciones provocan disminución en la actividad giardicida (Cuadro 7).²³

En la Cuadro 7 se observa que sólo el compuesto **14** fue tan activo como el albendazol (0.037 μM). Los compuestos **10**, **11**, **12**, **13** y **15** tienen la misma potencia que el metronidazol (1.220 μM).

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.

Cuadro 7. Actividad giardicida *in vitro* de derivados del 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol

			
Compuesto	R ₁	R ₂	CI ₅₀ (μM)
8	propiltio	H	10.45
9	propilsulfinilo	H	28.89
10	feniltio	H	0.935
11	fenilsulfiniltio	H	0.095
12	benzoílo	H	1.098
13	CF ₃	H	1.144
14	2,3-diclorofenoxi	H	0.030
15	H	propiltio	1.403
16	H	propilsulfinilo	4.312
17	H	feniltio	83.452
18	H	fenilsulfiniltio	18.978
19	H	benzoílo	8.856
20	H	CF ₃	8.856
21	H	2,3-diclorofenoxi	0.064

1.3.2 Mecanismo de acción de los bencimidazoles

Dos miembros de este grupo son el albendazol y el mebendazol que han sido usados para el tratamiento de giardiosis. Estos compuestos interaccionan con la β -tubulina, una proteína formadora de microtúbulos y constituyente del citoesqueleto de *G. intestinalis*. Esta unión causa inhibición de la polimerización de la tubulina e inhibe la incorporación de glucosa, produciendo primero la inmovilización del parásito y posteriormente, la muerte. Se ha sugerido que el albendazol y el metronidazol deben poseer un hidrógeno en la posición 1 del heterociclo para ejercer su efecto sobre la tubulina.^{33, 34, 35} Se ha observado que compuestos derivados del 2-trifluorometil-bencimidazol no llevan a cabo la polimerización de tubulina, estos resultados soportan la idea que uno de los requerimientos para actuar sobre tubulina de 5(6)-sustituidos bencimidazoles es la presencia de un átomo de hidrógeno en posición 1 y un carbamato de metilo en posición 2.³⁶

1.3.4 Mecanismo de acción de nitroheterociclos

Se incluyen a varios heterociclos con un grupo nitro como sustituyente común. Algunos de estos heterociclos son los 5-nitroimidazoles. Dentro de este grupo de compuestos se encuentra el metronidazol, tinidazol, ornidazol, secnidazol, siendo el metronidazol el compuesto más utilizado para el tratamiento de la giardiosis y la tricomoniosis. El metronidazol interfiere en la formación de acetato a partir de la oxidación del ácido pirúvico, donde participa la enzima piruvato-ferredoxin oxidoreductasa (PFOR), la cual utiliza ferredoxina como aceptor final de electrones. Al parecer los 5-nitroimidazoles oxidan a la ferredoxina interfiriendo en la vía metabólica. Por otro lado el grupo nitro es

reducido a anión-radical, puede formar productos citotóxicos que induce la pérdida de la estructura helicoidal y ruptura del ADN del parásito (Figura 8).³⁷

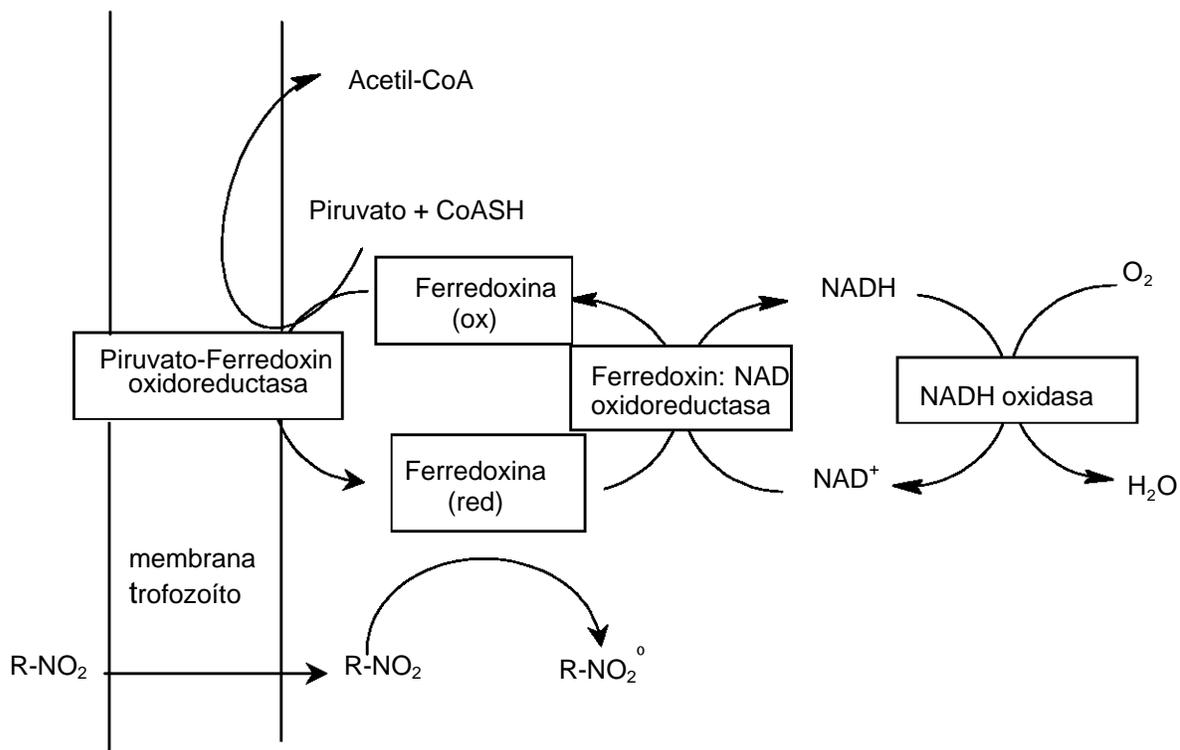


Figura 8. Mecanismo de acción de 5-nitroimidazoles.

Dentro de los nitrofuranos, la furazolidona al igual que el metronidazol requiere activación por reducción para ejercer su acción antiparasitaria, pero a diferencia de los 5-nitroimidazoles se activa a través de una NADH oxidasa, originando productos citotóxicos que dañan el ADN y a otros componentes celulares del parásito.^{7, 11, 16}

Otro nitroheterociclo de uso clínico, es un derivado del 5-nitrotiazol, la nitazoxanida. Este es un antiparasitario de amplio espectro, el cual se absorbe parcialmente en el tracto gastrointestinal y se metaboliza rápidamente a tizoxanida, metabolito activo in vivo (Figura 9).^{4, 12}

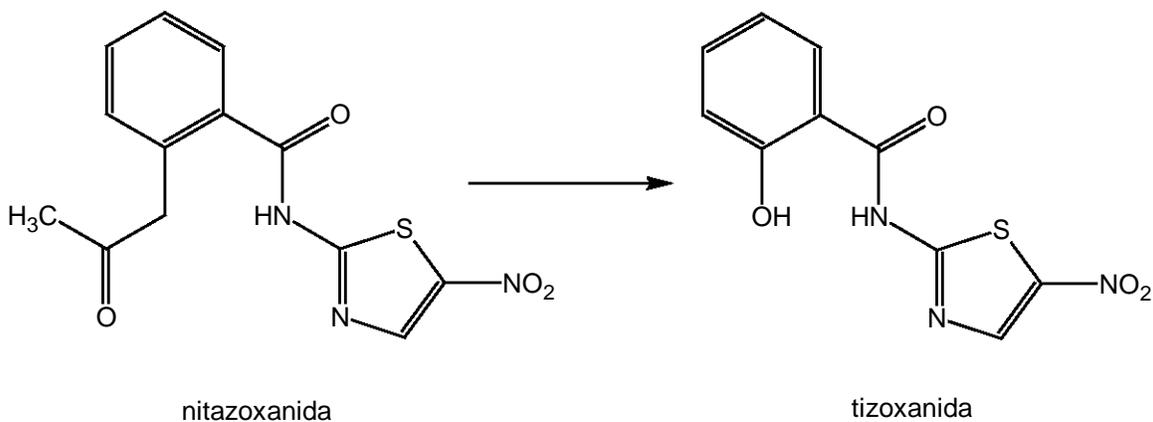


Figura 9. Estructura de la nitazoxanida y la tizoxanida.

Los trofozoítos de *G. intestinalis* tratados con nitazoxanida presentan alteraciones en la membrana plasmática y en el citoplasma. Al comparar la actividad giardicida del albendazol y el metronidazol (CI_{50} 1.220 μ M y CI_{50} 0.037 μ M) contra la actividad de la nitazoxanida, esta resultó ser más activa (CI_{50} 0.004 μ M).³⁸ El mecanismo de acción de la nitazoxanida posiblemente este mediado por la inhibición de la PFOR y no depende de la Ferredoxina; la reducción del grupo nitro no es indispensable para la actividad de este fármaco y los productos formados durante la activación de la nitazoxanida no inducen mutaciones en el ADN, a diferencia de lo observado con los otros nitroheterociclos.^{12, 39}

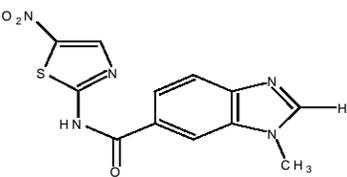
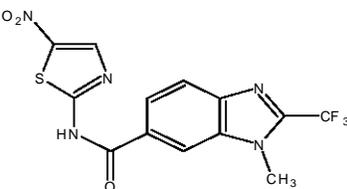
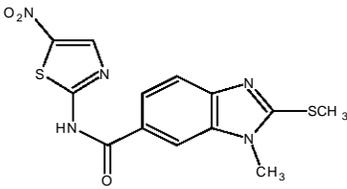
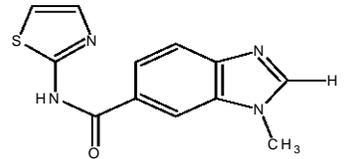
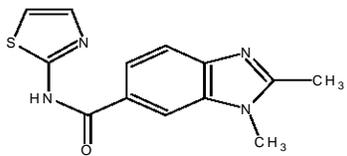
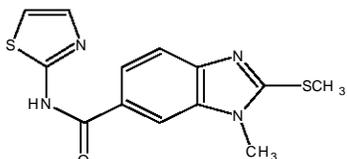
1.3.5 Híbridos de derivados bencimidazólicos.

Dentro de los métodos generales para la obtención de fármacos mediante modificación molecular se encuentra el proceso de asociación molecular, el cual se basa en la unión de dos estructuras con una determinada actividad, con el fin de potenciarla. La nueva molécula formada incorpora algunas o todas las agrupaciones de los compuestos originales; cuando la asociación es de partes distintas o mixtas por formación de enlace covalente entonces dicho proceso se denomina hibridación molecular.^{40, 41}

Para el diseño y síntesis de este tipo de moléculas híbridas se consideraron algunos derivados del 2-trifluorometil, 2-metil y del 2-metiltio bencimidazol; así como del grupo 2-amino-5-nitrotiazol el cual forma parte de la nitazoxanida y de su metabolito activo, la tizoxanida.

En el presente trabajo de tesis se evaluó la actividad giardicida y tricomonicida de seis derivados híbridos; tres compuestos nitrados (**BZHNOS-1**, **BZHNOS-3** y **BZHPOS-4**) y tres compuestos no nitrados (**BZHNPOS-12**, **BZHNPOS-16** y **BZHNPOS-25**) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Compuestos a evaluar

Estructura y clave	Nombre químico	Peso molecular	Solubilidad (g/L)*	Log P*
<p>BZHNOS-1</p> 	1-metil- <i>N</i> -(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-1 <i>H</i> -bencimidazol-6-carboxamida	303.298	134	1.01±1.10
<p>BZHNOS-3</p> 	1-metil- <i>N</i> -(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol-6-carboxamida	371.296	4.73	2.27±1.42
<p>BZHPOS-4</p> 	1-metil-2-(metiltio)- <i>N</i> -(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-1 <i>H</i> -bencimidazol-6-carboxamida	349.390	4.24	2.29±1.17
<p>BZHNPOS-12</p> 	1-metil- <i>N</i> -1,3-tiazol-2-il-1 <i>H</i> -bencimidazol-6-carboxamida	258.300	54.29	1.28±0.84
<p>BZHPNOS-16</p> 	1,2-dimetil- <i>N</i> -1,3-tiazol-2-il-1 <i>H</i> -bencimidazol-6-carboxamida	272.327	28.1	1.53±0.92
<p>BZHNPOS-25</p> 	1-metil-2-(metiltio)- <i>N</i> -1,3-tiazol-2-il-1 <i>H</i> -bencimidazol-6-carboxamida	304.393	1.75	2.53±0.93

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

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el tratamiento de la giardiosis y la tricomoniosis se emplea como fármaco de elección al metronidazol, sin embargo, existen informes de falla terapéutica, debido al abandono del tratamiento causado por los efectos secundarios de éste, así como también a la presencia de parásitos resistentes al fármaco.

Actualmente se emplean de manera alternativa al albendazol y a la nitazoxanida en el tratamiento de estas parasitosis. En nuestro grupo de investigación se han diseñado y sintetizado moléculas híbridas que contienen los grupos farmacóforicos presentes en el albendazol y la nitazoxanida. De esta forma se tienen moléculas híbridas del bencimidazol y del 2-amino-5-nitrotiazol, por lo que resulta de interés determinar si: ¿La unión de estos farmacofóros potenciará la actividad giardicida y tricomonocida de las moléculas híbridas? ¿Tiene efecto el grupo nitro en la actividad biológica de la molécula híbrida?

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Las moléculas híbridas del bencimidazol y el grupo 2-amino-5-nitrotiazol presentarán una actividad antiparasitaria similar o mayor a la observada en los fármacos utilizados para estas parasitosis.

3.2. Objetivo general

Evaluar la actividad giardicida y tricomonocida *in vitro* de compuestos híbridos derivados del bencimidazol y del 2-amino-5-nitrotiazol y 2-aminotiazol con el propósito de conocer si estos híbridos moleculares presentan mayor o igual potencia antiprotozoaria que los fármacos utilizados para el tratamiento de estas parasitosis.

3.3. Objetivos particulares

- Obtener las curvas de crecimiento para determinar el tiempo en cual se encuentran en la fase exponencial de crecimiento de *G. intestinalis* y *T. vaginalis*.
- Determinar la CI_{50} y la CI_{90} de albendazol, nitazoxanida, tizoxanida, metronidazol, **BZHNOS-1**, **BZHNOS-3**, **BZHPOS-4**, **BZHNPOS-12**, **BZHNPOS-16** y **BZHNPOS-25** contra *G. intestinalis* y *T. vaginalis*, mediante el método de subcultivo y utilizando análisis Probit.
- Explorar la estabilidad química del compuesto **BZHNOS-3** en los medios de cultivo utilizados mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).
- En este grupo de trabajo se tiene el interés del desarrollo de moléculas híbridas entre el anillo benzimidazólico y el 2-amino-5-nitrotiazol, con posible actividad antiparasitaria para determinar el efecto sobre la actividad biológica que tendrá la unión de la parte farmacofórica proveniente de moléculas que han presentado muy buena actividad antiparasitaria.

4. METODOLOGÍA

En este apartado se explica de manera general los procedimientos realizados para alcanzar los objetivos planteados en el presente trabajo. La descripción detallada de cada uno de ellos se presenta en el Anexo 1.

4.1. Cultivo axénico de trofozoítos de *G. intestinalis* y *T. vaginalis*.

Trofozoítos de *G. intestinalis*, cepa IMSS:1090:1 y trofozoítos de *T. vaginalis* cepa GT3 fueron empleados en este estudio. Los trofozoítos de *G. intestinalis* se cultivaron axénicamente a 37 C en medio TYI-S-33 modificado, adicionado con 10% de suero fetal de ternera y 1 mL de mezcla de antibiótico penicilina-estreptomicina. Se efectuaron subcultivos dos veces por semana. Para *T. vaginalis* se utilizó medio TYI-S-33 adicionado con 10% de suero fetal de ternera, 3 mL de Tween80-vitaminas y 1 mL de mezcla de antibiótico penicilina estreptomicina. Se efectuaron subcultivos tres veces por semana (Figura 10).

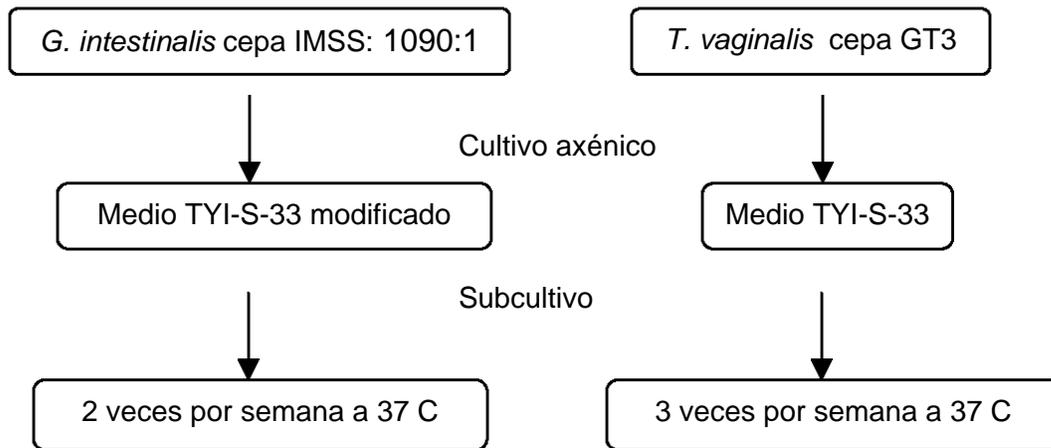


Figura 10. Cultivo axénico de trofozoítos de *G. intestinalis* y *T. vaginalis*.

4.2. Curva de crecimiento de *G. intestinalis* y *T. vaginalis*.

Se incubaron 50×10^3 trofozoítos de *G. intestinalis* en medio TYI-S-33 modificado y 6×10^3 trofozoítos de *T. vaginalis* en medio TYI-S-33 a 37 C utilizando tubos eppendorf de 1.5 mL, a diferentes periodos de tiempo (24, 48, 72, 62 y 120 h), cada uno por duplicado. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se colocaron en baño de hielo por 1 h, para su posterior conteo en cámara de Neubauer (Figura 11).

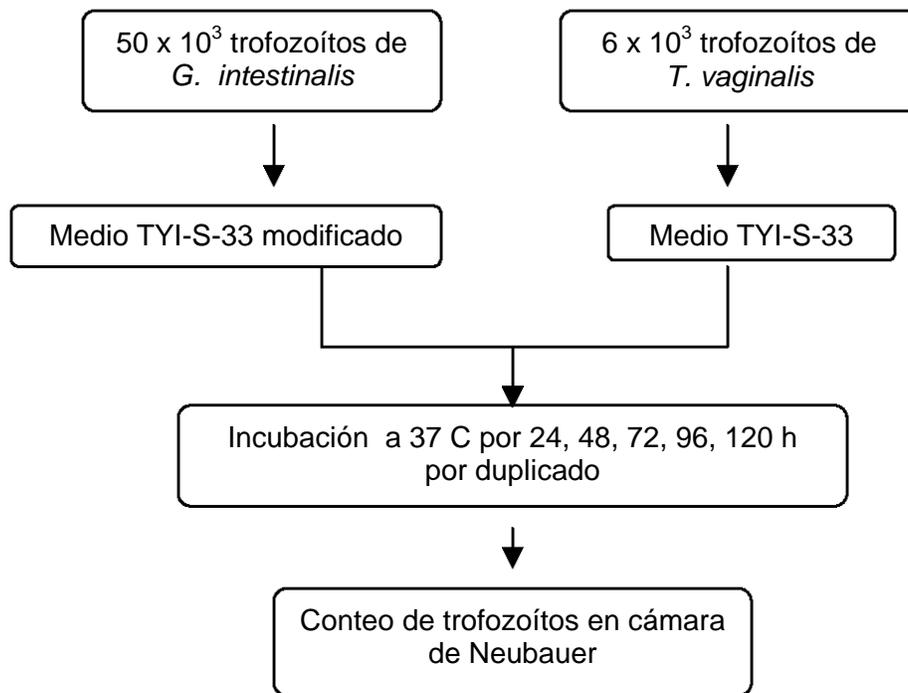


Figura 11. Curva de crecimiento de *G. intestinalis* y *T. vaginalis*.

4.3. Evaluación *in vitro* de la actividad giardicida y tricomonocida de los compuestos híbridos.

Para la determinación de la actividad giardicida y tricomonocida de los compuesto **BZHNOS-1, BZHNOS-3, BZHPOS-4, BZHNPOS-12, BZHNPOS-16 Y BZHNPOS-25** se empleó el método de subcultivo descrito por Cedillo y Muñoz²⁵ (Figura 12). Para ello, se preparó una solución de 10 mg/mL cada uno de los compuestos con dimetilsulfóxido (DMSO). A partir de estas soluciones se realizaron las diluciones pertinentes para cada uno de los compuestos (ver Anexo 1) y así obtener concentraciones finales de 0.001 µg/mL, 0.005 µg/mL,

0.010 µg/mL, 0.050 µg/mL, 0.100 µg/mL, 0.500 µg/mL, 1.000 µg/mL y 1.500 µg/mL en un volumen final de 1 mL.

Como controles positivos se incluyeron: albendazol, metronidazol, nitazoxanida y tizoxanida a las mismas concentraciones. Como control negativo, sólo se empleó medio TYI-S-33 modificado libre de compuesto.

Se incubaron 50×10^3 trofozoítos de *G. intestinalis* y 6×10^3 trofozoítos de *T. vaginalis* en medio TYI-S-33 modificado y en medio TYI-S-33, respectivamente, conteniendo las diferentes concentraciones de los compuestos a 37 C por 48 h. Después de la incubación, se colocaron los tubos en baño de hielo por 1 h y de cada tubo se tomaron 50 µL que colocaron en un tubo con medio de cultivo libre de compuesto y se subcultivaron por 48 h a 37 C. Transcurrido este tiempo, nuevamente los tubos se colocaron en baño de hielo por 1 h y se determinó el número de trofozoítos en cada concentración empleando la cámara de Neubauer y un microscopio invertido. El ensayo se realizó 3 veces por duplicado.

Una vez que se determinó el número de trofozoítos presentes en el control negativo, controles positivos y en cada una de las concentraciones de los compuestos, se calculó el número de trofozoítos muertos en cada una de las concentraciones de los compuestos a los que fueron expuestos.

Estos resultados se introdujeron al análisis Probit y con ello se determinó la CI_{50} y la CI_{90} de los compuestos híbridos, así como de los controles positivos. 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).

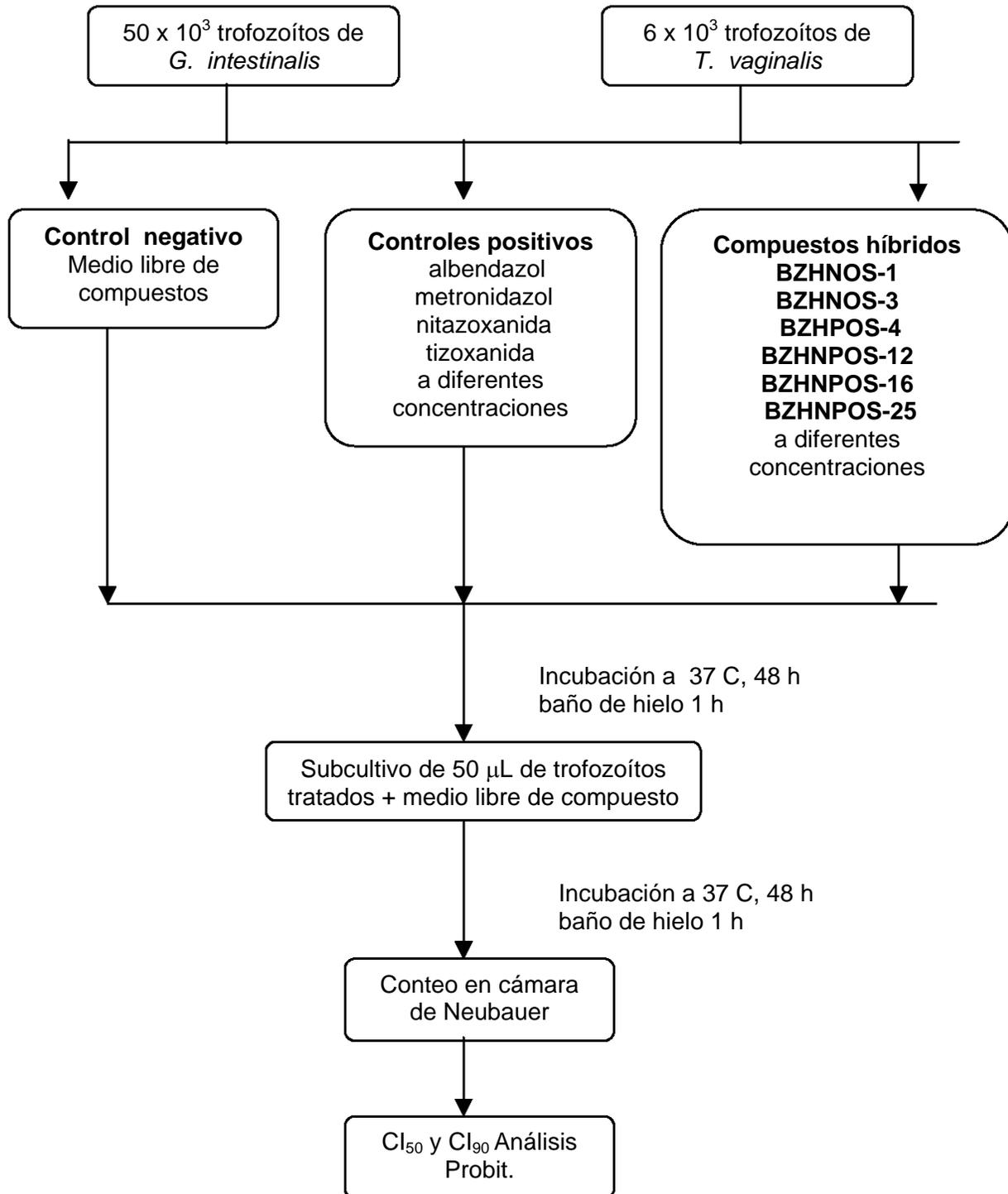


Figura 12. Método de Subcultivo de *G. intestinalis* y *T. vaginalis*

4.4. Exploración de la estabilidad química del compuesto **BZHNOS-3** en los medios de cultivo mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

Para realizar la exploración de la estabilidad química de BZHNOS-3 en los medios de cultivo, TYI-S-33 y TYI-S-33 modificado; se utilizó una columna Symmetry Shield RP₁₈; como fase móvil una mezcla acetonitrilo/agua con 0.5% de ácido acético, un flujo de 0.5mL/min con gradiente (Anexo1), una longitud de onda de 350 nm y un tiempo de muestreo de 19 min.

Se inyectaron 100 µL del compuesto **BZHNOS-3** o del 2-amino-5-nitrotiazol disueltos en acetonitrilo, para obtener el cromatograma de cada uno de ellos. A continuación se llevó a cabo la preparación de la mezcla del compuesto **BZHNOS-3** y del 2-amino-5-nitrotiazol disueltos en acetonitrilo y se inyectaron 100 µL. Posteriormente el compuesto **BZHNOS-3** se incubó tanto en medio TYI-S-33 modificado como en medio TYI-S-33, a una concentración de 1 µg/mL. También se incubaron los medios (TYI-S-33 modificado y TYI-S-33) libres de compuesto en tubos eppendorf. Los tubos se incubaron a 37 C por 48 h, simulando las condiciones de trabajo manejadas durante la evaluación de la actividad biológica (Método de subcultivo). Transcurrido el tiempo de incubación, a 100 µL de cada tubo se adicionaron 300 µL de acetonitrilo; posteriormente fue centrifugado a 11 C por 10 min a una velocidad de 8000 rpm. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.45 µm, inyectando 100 µL del filtrado a la columna de

cromatografía. El procedimiento anterior sirvió para determinar si durante el tiempo de incubación el compuesto **BZHNOS-3** sufrió ruptura en el enlace amida y generar como posible metabolito al 2-amino-5-nitrotiazol, a través de alguna reacción de hidrólisis (Figura 13).

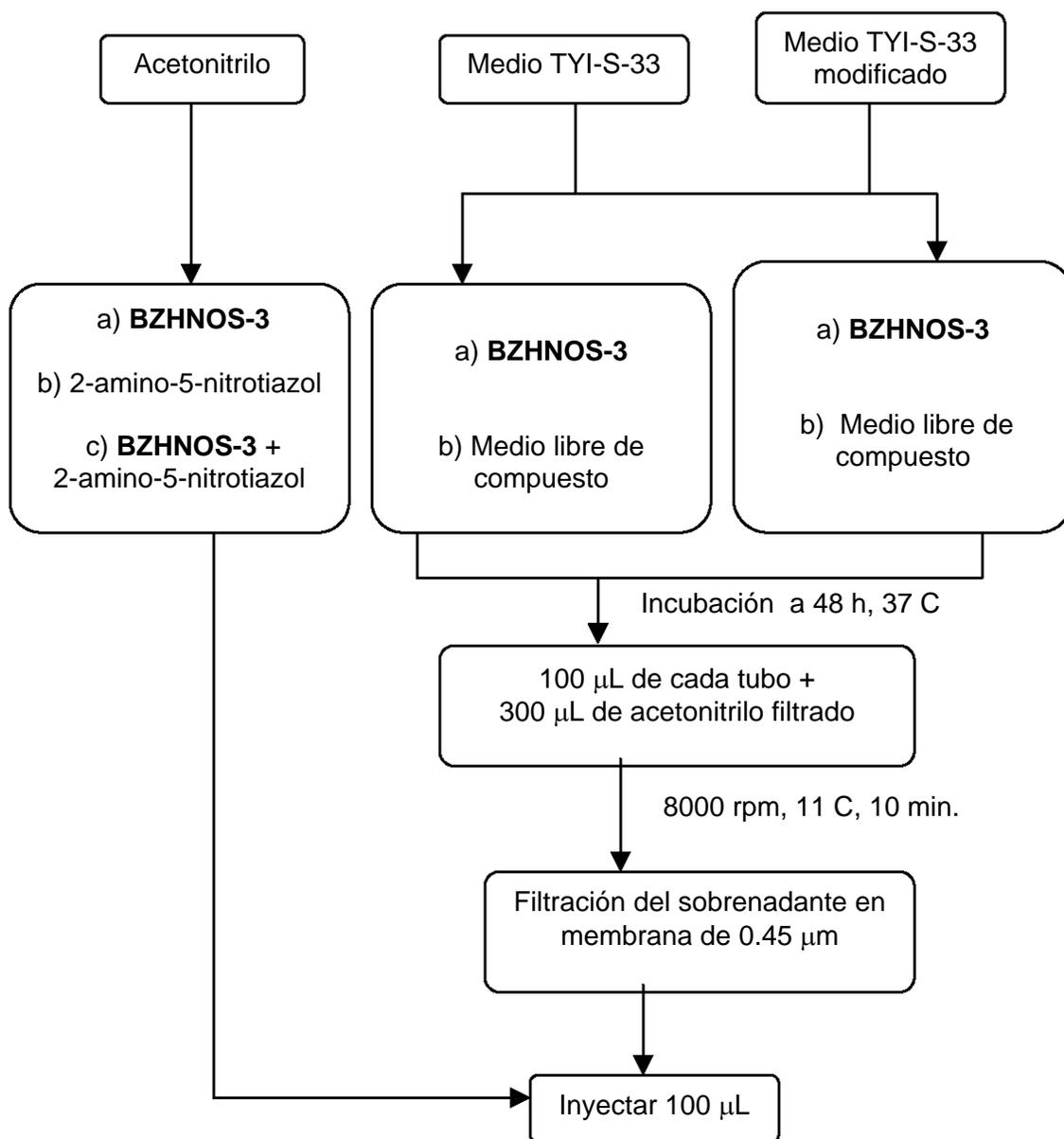


Figura 13. Estabilidad química del compuesto **BZHNOS-3**

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La primera sección incluye los resultados obtenidos con *G. intestinalis* y la segunda sección los resultados con *T. vaginalis*.

5.1. Curva de crecimiento de *G. intestinalis*

Para determinar el crecimiento de los trofozoítos de *G. intestinalis* y el tiempo de cultivo en el que el parásito se encuentra en la fase exponencial se realizó la curva de crecimiento del parásito.

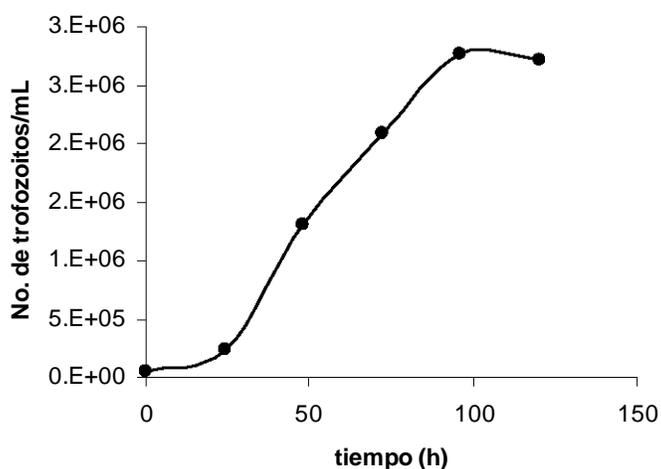


Figura14. Curva de crecimiento de *G. intestinalis* con un inóculo inicial de 50×10^3 trofozoítos.

En la Figura 14 se muestra la curva de crecimiento de los trofozoítos de *G. intestinalis*. Como puede observarse, la fase logarítmica de crecimiento se inició antes de las 48 h, donde la población era ya 26 veces mayor a la inicial. La fase estacionaria empezó después de las 96 h.

Los resultados anteriores sirvieron como base para determinar el tiempo de incubación que se emplearía en el método de subcultivo. En base a la curva de crecimiento se decidió emplear 48 h, tiempo en el cual los parásitos deben encontrarse en la fase logarítmica de crecimiento y se pone de manifiesto si los compuestos presentaron efecto sobre el crecimiento del parásito.

5.2 Determinación de la CI_{50} y de la CI_{90} de los compuestos híbridos sobre trofozoítos de *G. intestinalis*.

A continuación se presentan los resultados de la actividad giardicida obtenidos por el método de subcultivo. En la Cuadro 9 se muestran los datos correspondientes a la CI_{50} y la CI_{90} de los compuestos evaluados, y en las Figuras 15 a 18 se presentan las gráficas de potencia de cada uno de ellos.

Cuadro 9. Actividad giardicida de los compuestos (CI_{50} y CI_{90})

Compuesto	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
BZHNOS-1	0.077	0.254	0.646	2.129
BZHNOS-3	0.071	0.190	0.832	2.240
BZHPOS-4	0.076	0.218	0.833	2.384
BZHNPOS-12	0.182	0.703	3.721	14.407
BZHNPOS-16	2.203	0.747	2.972	10.915
BZHNPOS-25	0.151	0.497	2.040	6.701
albendazol	0.014	0.052	0.090	0.339
nitazoxanida	0.052	0.170	0.351	1.142
tizoxanida	0.056	0.211	0.881	3.320
metronidazol	0.213	1.243	3.510	20.507

Considerando las CI_{50} obtenidas (Cuadro 9) se observa que todos los compuestos mostraron una potencia giardicida superior al metronidazol, fármaco de elección en el tratamiento de la giardiosis. Los compuestos **BZHNOS-1**, **BZHNOS-3** y **BZHPOS-4**, fueron 4.9, 6.5 y 5.7 veces más potentes que metronidazol. Lo anterior corrobora que los derivados híbridos del bencimidazol y del 2-amino-5-nitrotiazol pueden ser una buena opción sobre los nitroimidazoles (Figura 15).

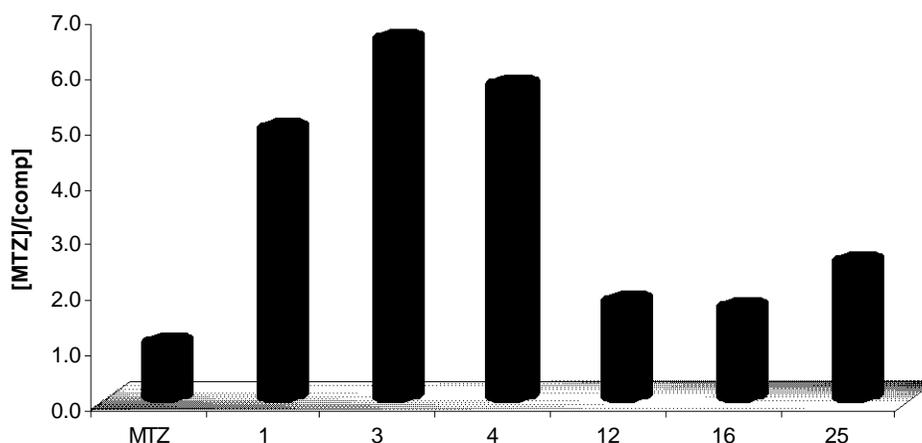


Figura 15. Coeficiente de potencia de los compuestos en estudio.

MTZ: metronidazol; 1:**BZHNOS-1**; 3:**BZHNOS-3**; 4:**BZHPOS-4**; 12:**BZHNPOS-12**;16: **BZHNPOS-16**; 25: **BZHNPOS-25**.

Los compuestos **BZHNOS-1**, **BZHNOS-3** y **BZHPOS-4**, presentaron una potencia de 0.7, 0.9 y 0.8 con respecto a la nitazoxanida (Figura 16). Lo compuestos **BZHNOS-3** y **BZHPOS-4** tienen valores de CI_{50} similares a la tizoxanida, sin embargo sus valores de CI_{90} fueron más bajos que la tizoxanida.

Los compuestos **BZHNPOS-12**, **BZHNPOS-16** y **BZHNPOS-25** presentaron potencias más bajas que la nitazoxanida y la tizoxanida (Figura 17).

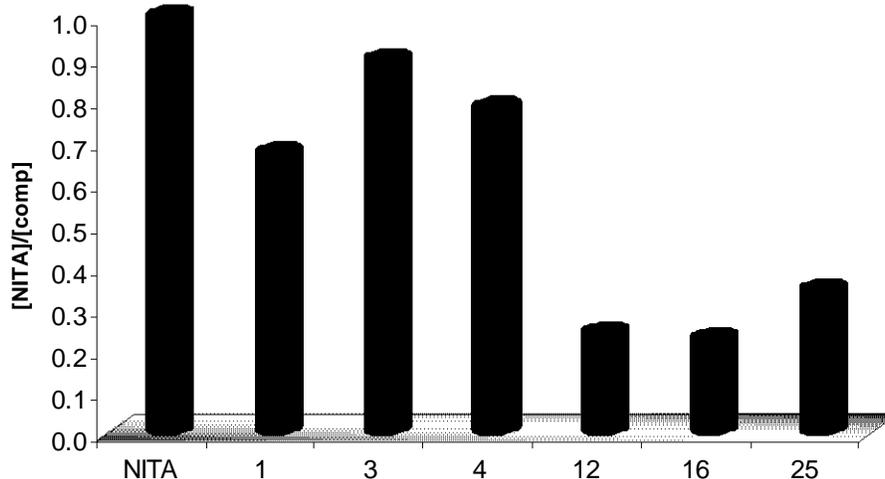


Figura 16. Coeficiente de potencia de los compuestos en estudio.

NITA: nitazoxanida; 1: **BZHNOS-1**; 3: **BZHNOS-3**; 4: **BZHPOS-4**; 12: **BZHNPOS-12**; 16: **BZHNPOS-16**; 25: **BZHNPOS-25**.

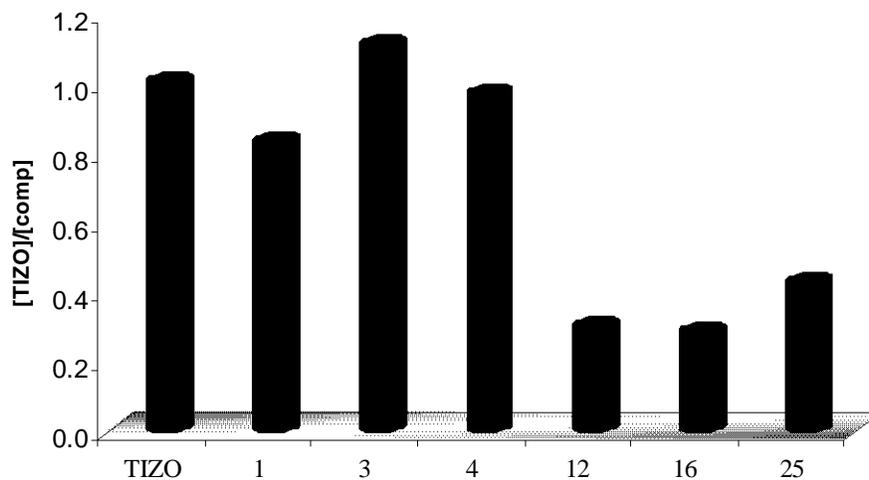


Figura 17. Coeficiente de potencia de los compuestos en estudio.

TIZO: tizoxanida; 1:**BZHNOS-1**; 3:**BZHNOS-3**; 4:**BZHPOS-4**; 12:**BZHNPOS-12**;16: **BZHNPOS-16**; 25: **BZHNPOS-25**.

Ninguno de los compuestos mostró potencias comparables al albendazol (Figura18).

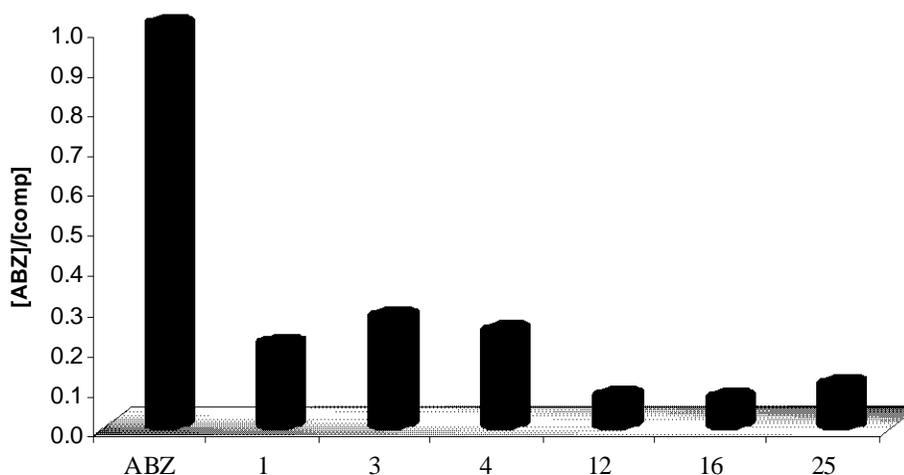


Figura 18 Coeficiente de potencia de los compuestos en estudio.

ABZ: albendazol; 1:**BZHNOS-1**; 3:**BZHNOS-3**; 4:**BZHPOS-4**; 12:**BZHNPOS-12**;16: **BZHNPOS-16**; 25: **BZHNPOS-25**.

Considerando la relación estructura-actividad se observó que el compuesto **BZHPOS-4** derivado del 2-metiltio bencimidazol fué 2 veces más potente que su análogo no nitrado, el híbrido **BZHNPOS-25**. El compuesto **BZHNOS-1** el cual no presenta sustitución en posición 2 fue 2.7 veces más potente que su análogo no nitrado, el híbrido **BZHNPOS-12**. Lo anterior indica que el grupo nitro es importante en la actividad giardicida. Las actividades observadas en los compuesto **BZHNOS-1**, **BZHNOS-3** y **BZHPOS-4**, (compuestos nitrados) es

similar, lo que sugiere que los sustituyentes en posición 2 (-H, -CF₃ y -SCH₃) no intervienen de manera importante en la actividad giardicida de estas moléculas. Lo mismo sucede en los compuestos **BZHNPOS-12**, **BZHNPOS-16** y **BZHNPOS-25** y sus sustituyentes en posición 2 (-H, -CH₃ y -SCH₃).

Sin embargo, el compuesto **BZHNOS-3**, compuesto nitrado, con sustituyente CF₃ en posición 2 presentó relativamente una mejor actividad giardicida.

En la Figura 19 se presenta la gráfica de efectividad de los compuestos evaluados contra trofozoítos de *G. intestinalis* representada por el inverso de la CI₅₀ (μM) de cada compuesto. De acuerdo a lo anterior, la actividad antiprotozoaria será mayor mientras mayor sea el valor del inverso de la concentración.

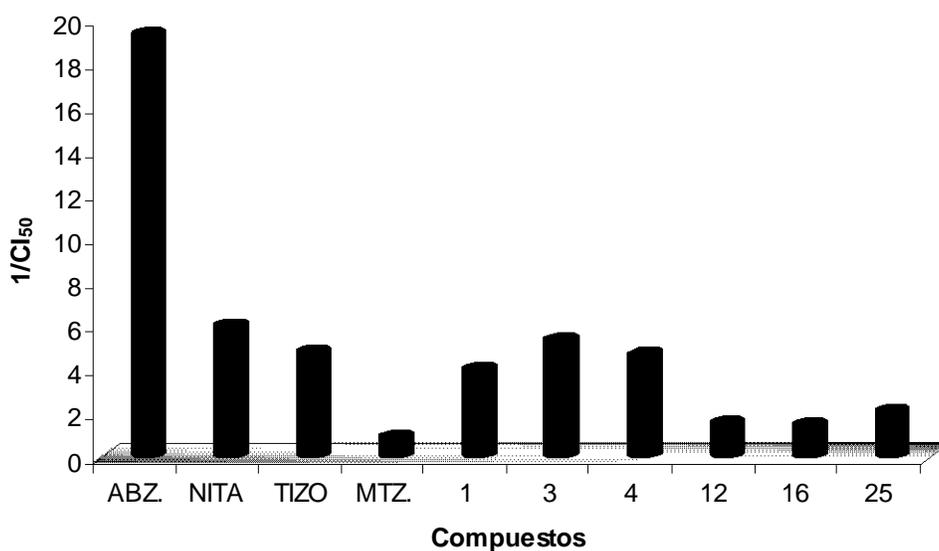


Figura 19. Efectividad de los compuestos evaluados contra trofozoítos de *G. intestinalis* representado por el inverso de la CI_{50} .

ABZ: albendazol; NITA: nitazoxanida; TIZO: tizoxanida; MTZ: metronidazol; 1:**BZHNOS-1**; 3:**BZHNOS-3**; 4:**BZHPOS-4**; 12:**BZHNPOS-12**;16: **BZHNPOS-16**; 25: **BZHNPOS-25**.

Como puede observarse en la Figura 19, de los compuestos evaluados, el albendazol es el compuesto más activo, seguido de la nitazoxanida y de los compuestos en el siguiente orden **BZHNOS-3**>**BZHPOS-4**>**BZHNOS-1**.

Los valores de CI_{90} (Figura 37) (Anexo 2) presentarán un comportamiento similar a lo observado con las CI_{50} de éstos.

5.3. Curva de crecimiento de los trofozoítos de *T. vaginalis*.

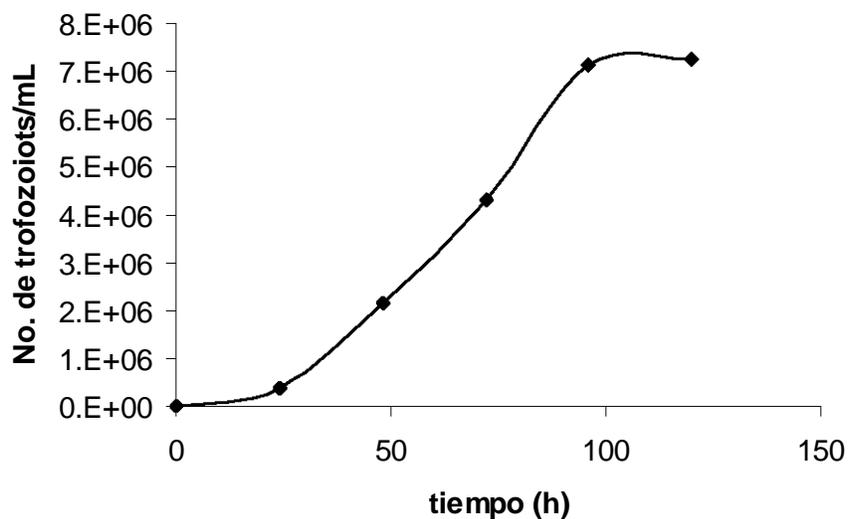


Figura 20. Curva de crecimiento de *T. vaginalis* con un inóculo inicial de 6×10^3 trofozoítos.

En la Figura 20 se muestra el crecimiento de los trofozoítos de *T. vaginalis* a diferentes tiempos. Como puede observarse, la fase logarítmica de crecimiento se inició antes de las 48 h, donde la población era ya 358 veces mayor a la inicial. La fase estacionaria empezó después de las 96 h de incubación.

Los resultados anteriores sirvieron como base para determinar el tiempo de incubación que se emplearía en el método de subcultivo. Con base en la curva de crecimiento se decidió emplear 48 h, tiempo en el cual los parásitos deben encontrarse en la fase logarítmica de crecimiento y se pone de manifiesto si los compuestos tuvieron efecto sobre el crecimiento del parásito.

5.4 Determinación de la CI_{50} y de la CI_{90} de los compuestos híbridos sobre trofozoítos de *T. vaginalis*.

En la Cuadro 10 se presentan los resultados (CI_{50} y CI_{90}) de la actividad tricomonocida de los compuestos evaluados obtenidos por el Método de Subcultivo. Las gráficas de potencia de cada uno de ellos se presentan en las Figuras 21 a 24.

Cuadro 10. Actividad tricomonocida de los compuestos híbridos (CI_{50} y CI_{90}).

Compuesto	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
BZHNOS-1	0.103	0.304	1.046	3.449
BZHNOS-3	0.132	0.356	0.732	1.971
BZHPOS-4	0.073	0.208	0.859	2.459
BZHNPOS-12	0.105	0.405	2.020	7.819
BZHNPOS-16	0.142	0.523	6.865	25.209

BZHNPOS-25	0.193	0.634	2.507	8.235
albendazol	0.226	0.851	5.260	19.825
nitazoxanida	0.057	0.184	0.796	2.590
tizoxanida	0.080	0.300	1.602	6.040
metronidazol	0.056	0.327	0.434	2.534

Considerando los valores de CI_{50} obtenidos (Cuadro 10), se observa que todos los compuestos presentaron una actividad tricomonocida superior al albendazol. Los compuestos **BZHNOS-1**, **BZHNOS-3** y **BZHPOS-4**, fueron 2.8, 2.4, y 4.1 veces más potentes que albendazol (Figura 21).

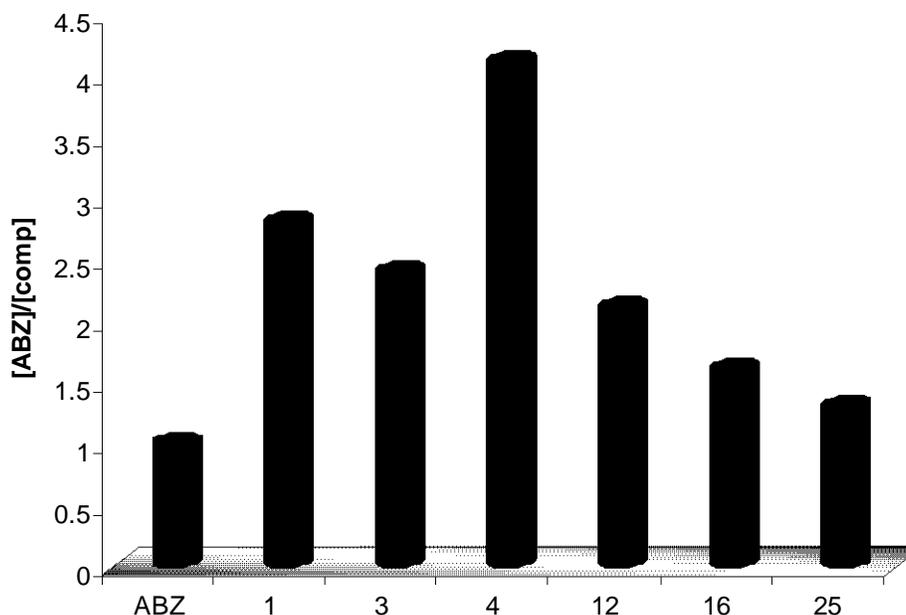


Figura 21. Coeficiente de potencia de los compuestos en estudio

ABZ: albendazol; 1:**BZHNOS-1**; 3:**BZHNOS-3**; 4:**BZHPOS-4**; 12:**BZHNPOS-12**;16: **BZHNPOS-16**; 25: **BZHNPOS-25**.

Los compuestos **BZHNOS-1** y **BZHNOS-3** mostraron potencias similares al metronidazol y a la tizoxanida. Sin embargo, el compuesto **BZHPOS-4** fue 1.6 y

1.4 veces más potentes que el metronidazol y la tizoxanida respectivamente. Los compuestos **BZHNPOS-12**, **BZHNPOS-16** y **BZHNPOS-25** presentaron menor potencia tricomonocida que el metronidazol y la tizoxanida (Figuras 22 y 23).

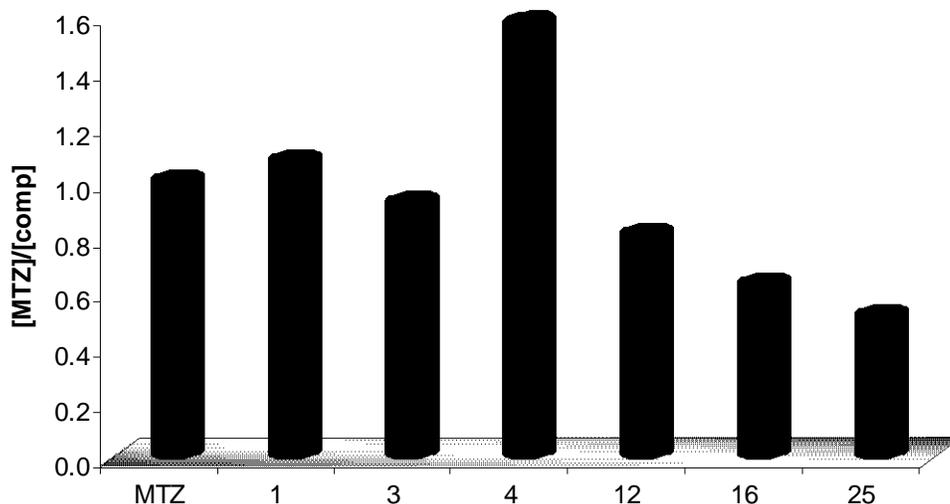


Figura 22. Coeficiente de potencia de los compuestos en estudio.

MTZ: metronidazol; 1: BZHNOS-1; 3: BZHNOS-3; 4: BZHPOS-4; 12: BZHNPOS-12; 16: BZHNPOS-16; 25: BZHNPOS-25.

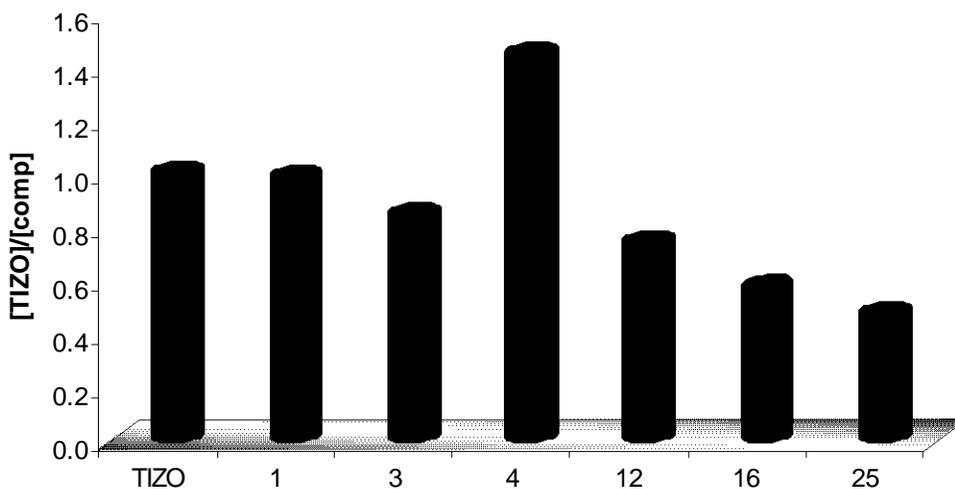


Figura 23. Coeficiente de potencia de los compuestos en estudio.

TIZO: tizoxanida; 1:**BZHNOS-1**; 3:**BZHNOS-3**; 4:**BZHPOS-4**; 12:**BZHNPOS-12**;16: **BZHNPOS-16**; 25: **BZHNPOS-25**.

Ninguno de los compuestos fue más potente que la nitazoxanida. Sin embargo, el compuesto **BZHNPO-4** tiene una potencia similar a ésta (Figura 24).

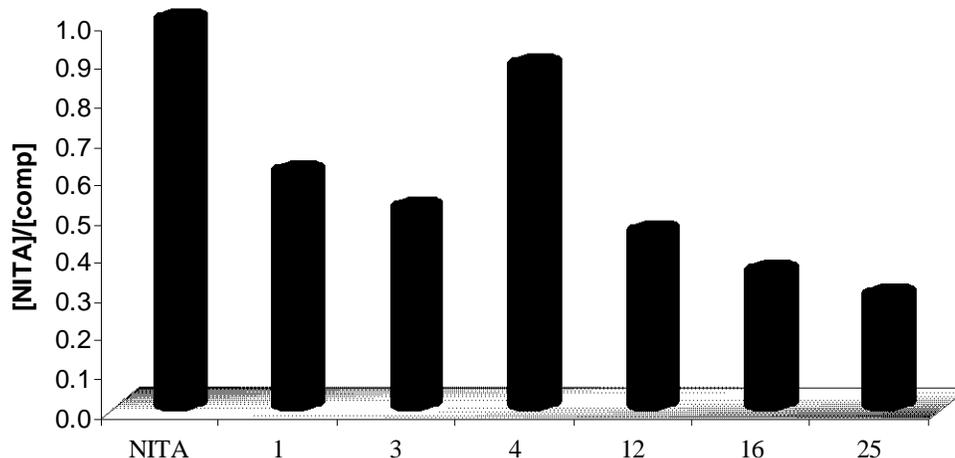


Figura 24. Coeficiente de potencia de los compuestos en estudio.

NITA: nitazoxanida; 1:**BZHNOS-1**; 3:**BZHNOS-3**; 4:**BZHPOS-4**; 12:**BZHNPOS-12**;16: **BZHNPOS-16**; 25: **BZHNPOS-25**.

Considerando la relación estructura-actividad tenemos que el compuesto **BZHPOS-4**, derivado 2-metiltio bencimidazol fue 3 veces más potente que su análogo no nitrado, el híbrido **BZHNPOS-25**. El compuesto **BZHNOS-1** el cual no presenta sustitución en posición 2 presentó una potencia similar que su análogo no nitrado, el híbrido **BZHPOS-12**. El compuesto **BZHPOS-4** presentó potencias moderada con respecto a sus análogos nitrados, **BZHNOS-1** y **BZHNOS-3**. Lo anterior indica que el grupo nitro es importante en la actividad tricomonocida y que el sustituyente en posición 2 (-H, CF₃ y SCH₃) no participa de manera importante. Lo mismo ocurre con los compuestos **BZHNPOS-12**, **BZHNPOS-16** y **BZHNPOS-**

25 y sus sustituyente en posición 2 (-H, -CH₃ y -SCH₃), esto nos indica nuevamente que el sustituyente en posición 2 no interviene de manera considerable para la actividad tricomonocida.

Con respecto a los compuestos no nitrados, **BZHNPOS-12**, **BZHNPOS-16**, **BZHNOS-25**, éstos presentaron actividades similares, independientemente de los sustituyente, aunque el compuesto **BZHNPOS-12** tuvo la Cl₅₀ menor de ellos.

En la Figura 25, se observa que la nitazoxanida mostró la mejor actividad tricomonocida de los compuesto evaluados, seguida del compuesto **BZHPOS-4**.

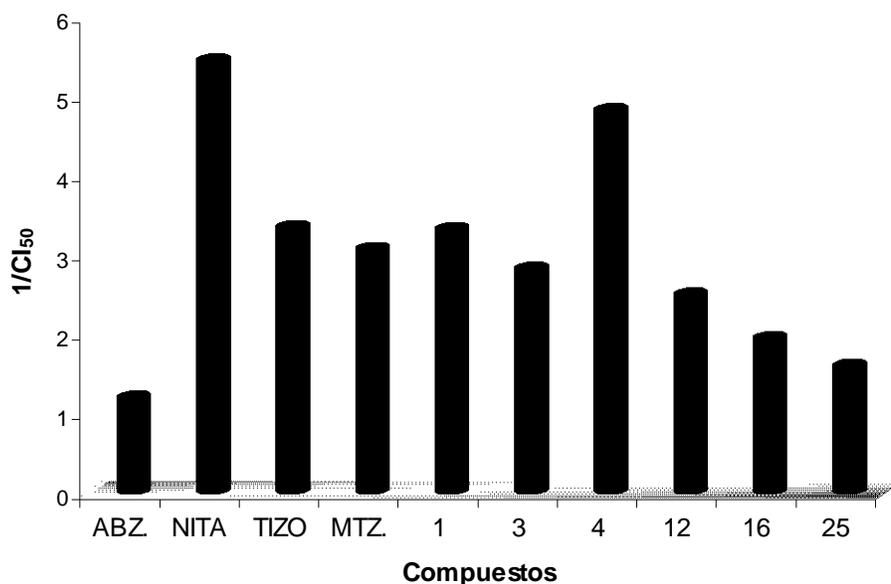


Figura 25. Efectividad de los compuestos evaluados contra trofozoítos de *T. vaginalis* representado por el inverso de la Cl₅₀.

ABZ: albendazol; NITA: nitazoxanida; TIZO: tizoxanida; MTZ: metronidazol; 1:**BZHNOS-1**; 3:**BZHNOS-3**; 4:**BZHPOS-4**; 12:**BZHNPOS-12**; 16: **BZHNPOS-16**; 25: **BZHNPOS-25**.

Considerando los valores de Cl_{90} tenemos que el compuesto **BZHNOS-3** presentó la mejor actividad tricomonocida siendo mejor que la nitazoxanida.

El compuesto **BZHPOS-4** mostró la actividad tricomonocida más alta (Cl_{50}) de los compuestos híbridos evaluados, siendo importante resaltar que este compuesto presentó un valor de Cl_{90} similar al de la nitazoxanida y por debajo al de la tizoxanida. A este respecto el compuesto **BZHNOS-3** también tuvo una Cl_{90} más pequeña que la nitazoxanida y la tizoxanida.

Sin embargo, resulta importante mencionar que el compuesto **BZHNOS-3** y el compuesto **BZHPOS-4** presentaron problemas de solubilidad en los ensayo de actividad biológica, por lo que fué necesario calentar la solución aproximadamente a 35 C. El grupo nitro es el principal responsable de los problemas de solubilidad que presentan estos compuestos, sin embargo es necesario este grupo por que aumenta la actividad giardicida y tricomonocida aproximadamente el doble.

5.5 Exploración de la estabilidad química del compuesto **BZHNOS-3** mediante cromatografía de líquidos de alta resolución CLAR.

Considerando que el compuesto **BZHNOS-3** mostró tener buena actividad giardicida y tricomonocida, resultó de interés analizar su estabilidad química, ya que por hidrólisis la molécula puede liberar al metabolito 2-amino-5-nitrotiazol.

A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos durante la evaluación de la estabilidad química del compuesto **BZHNOS-3**, también se muestra el cromatograma del compuesto 2-amino-5-nitrotiazol posible metabolito del compuesto evaluado y de los medios de cultivo utilizados en la evaluación de la actividad biológica (Figuras 26-32).

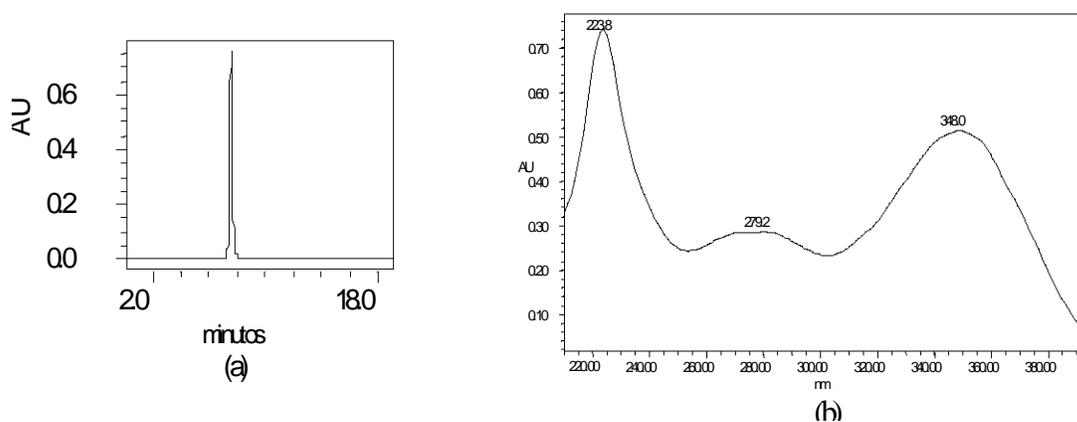


Figura 26 .Cromatograma (a) y espectro (b) de **BZHNOS-3** en ACN a 350 nm.

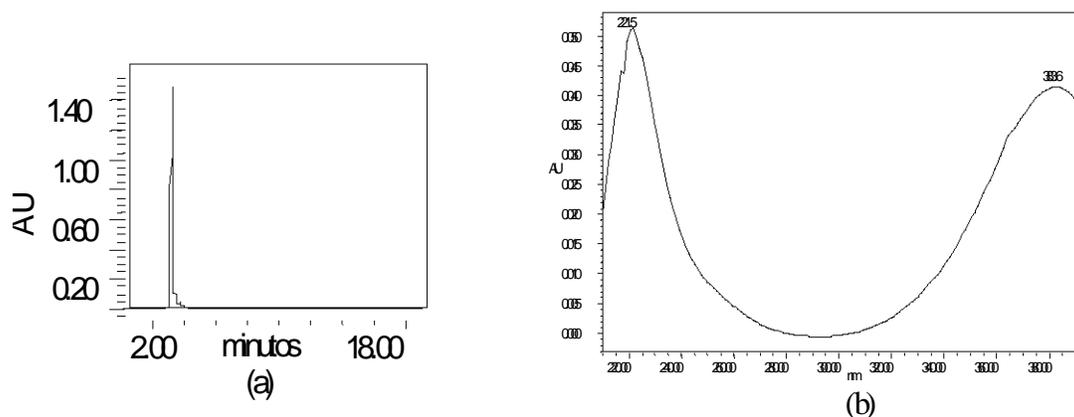


Figura 27.Cromatograma (a) y espectro (b) del 2-amino-5-nitrotiazol en ACN a 350nm.

Las Figuras 26 y 27 corresponden a los cromatogramas y espectros tanto del compuesto **BZHNOS-3** como del 2-amino-5-nitrotiazol disueltos en acetonitrilo. Estos cromatogramas nos sirvieron como referencia para comparar el compuesto después de las 48 h de incubación en medio de cultivo.

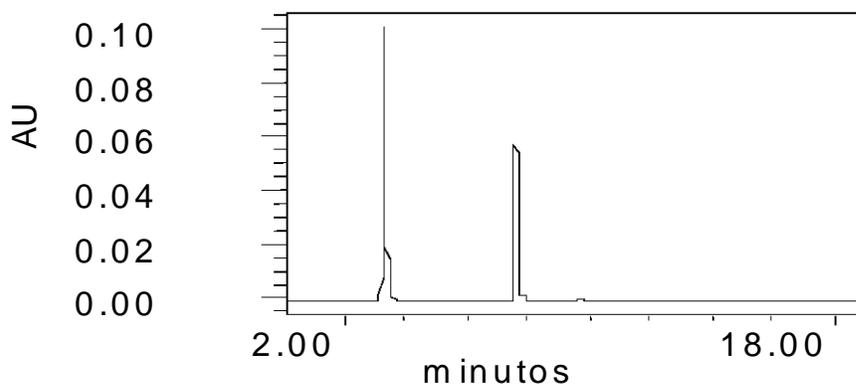


Figura 28. Mezcla del **BZHNOS-3** y 2-amino-5-nitrotiazol en ACN a 350 nm.

En la Figura 28 se muestra una mezcla de **BZHNOS-3** y 2-amino-5-nitrotiazol disueltos en acetonitrilo, el cual nos muestra que no existe interferencia entre las señales siendo el tiempo de retención de 7.799 y 3.327 min respectivamente.

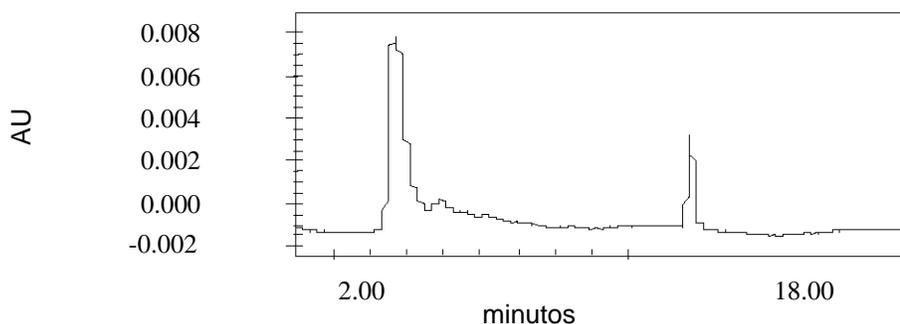


Figura 29. Cromatograma medio TYI-S-33 para cultivo de *G. intestinalis* a 350 nm

En las Figura 29 se muestran el cromatograma del medio TYI-S-33 modificado; medio de cultivo utilizado durante la evaluación de la actividad giardicida; este cromatograma sirve para determinar si existen señales que intervengan durante el análisis químico para la evaluación de los compuestos (Figura 28). No se observó ninguna señal que interfiera durante el análisis químico.

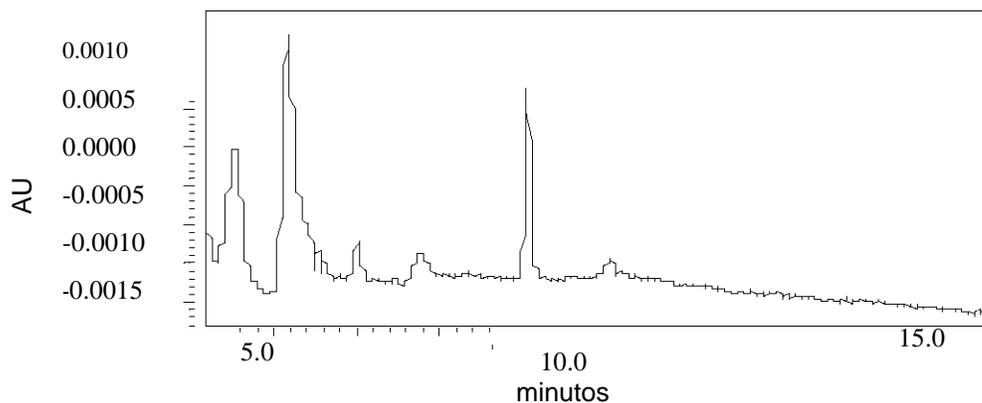


Figura 30. Cromatograma del compuesto **BZHNOS-3** en medio TYI-S-33 para cultivo de *G. intestinalis* a 350 nm.

Cuando se realizó el análisis el compuesto **BZHNOS-3** incubado en medio TYI-S-33 para *G. intestinalis*, se observó una señal a los 7.996 min, que corresponde al mismo. Esto indica que el compuesto **BZHNOS-3** permaneció como tal al término de la incubación.

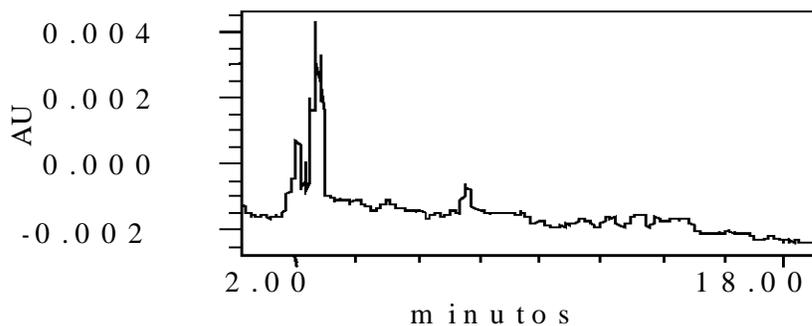


Figura 31. Cromatograma medio TYI-S-33 para cultivo de *T. vaginalis* a 350 nm

En las Figuras 31 se muestran el cromatograma del medio TYI-S-33 para cultivo de *T. vaginalis*, se aprecian las señales correspondientes a los componentes del medio de cultivo utilizado en la evaluación de la actividad biológica; misma que no se observó en los demás cromatogramas (Figura 28), lo que indica que los componentes del medio de cultivo no interfirieron durante el análisis de estabilidad del compuesto **BZHNOS-3**.

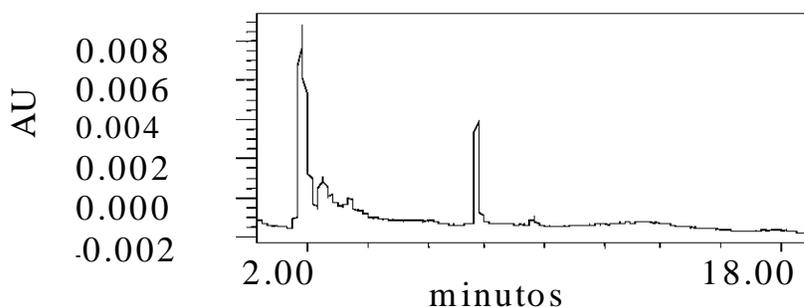


Figura 32. Cromatograma del compuesto **BZHNOS-3** en medio TYI-S-33 para cultivo de *T. vaginalis* a 350 nm.

En el cromatograma del compuesto **BZHNOS-3** incubado en medio TYI-S-33 (Figura 32) se observa una señal a los 7.799 min que corresponde al compuesto **BZHNOS-3**. Se pudo detectar una pequeña señal de poca importancia a los 3.615 min que podría indicar la presencia de pequeñas trazas del 2-amino-5-nitrotiazol hidrolizado.

6. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en este estudio permitieron comprobar la hipótesis de trabajo, ya que algunos de los compuestos evaluados presentaron actividad antiprotozoaria igual o mayor a la observada con algunos de los fármacos utilizados en el tratamiento de la giardiosis.
- Considerando los valores de la CI_{50} en ninguno de los compuestos híbridos evaluados se observó una actividad giardicida comparable a la del albendazol. Sin embargo, todos los compuestos presentaron una mayor actividad tricomonocida que el albendazol.
- Todos los híbridos evaluados tuvieron mayor actividad giardicida que el metronidazol y su actividad tricomonocida fue mayor o similar.
- Los compuestos **BZHNOS-1** y **BZHNOS-3** mostraron una actividad giardicida similar cercana a la nitazoxanida y la tizoxanida. Los compuestos **BZHNOS-1** y **BZHNOS-3** y **BZHPOS-4** mostraron una actividad tricomonocida similar a la tizoxanida y el compuesto **BZHPOS-4** mostró una actividad tricomonocida cercana a la nitazoxanida.
- La actividad giardicida y tricomonocida de los híbridos evaluados depende de la unión del derivado bencimidazólico con el 2-amino-5 nitrotiazol ya que el sustituyente en la posición 2 no influye de manera considerable en la actividad antiprotozoaria de los híbridos.
- El compuesto **BZNHOS-3** en ambos medios de cultivo prácticamente permaneció íntegro. Por lo tanto podemos concluir que la actividad antiprotozoaria se debe al híbrido y no a su posible producto de hidrólisis.

-
- Considerando los valores de CI_{50} y CI_{90} se concluye que los compuesto híbridos **BZHNOS-3** y **BZHNPOS-4** tuvieron una actividad giardicida y tricomonocida que los hacen buenos candidatos para continuar con sus estudios farmacológicos.

ANEXO 1. Desarrollo del procedimiento experimental

Reactivos y equipo

Reactivos

- Albendazol (Smith-Kline Beechman, México)
- Metronidazol (Sigma, México)
- Nitazoxanida
- Tizoxanida
- Cloruro de sodio (Merck, México)
- Fosfato de potasio dibásico (Baker, México)
- Fosfato de sodio monobásico (Baker, México)
- Biosate, peptona (BBL)
- D-(+)-Glucosa (Sigma, México)
- L-cisteína (ICN Biochemicals)
- L-ácido ascórbico (Sigma, México)
- Bilis (Sigma, México)
- Citrato férrico (Sigma, México)
- Mezcla de antibiótico penicilina/estreptomicina (In vitro s.a.)
- Mezcla de vitaminas-Twwen 80 (In vitro s.a.)
- Suero fetal de ternera (Hyclone)
- DMSO (J.T. Baker)
- Acetonitrilo HPLC (Baker, México)
- Ácido acético glacial (Baker, México)
- Agua HPLC

Equipo

- Gabinete de Seguridad Biológica, Clase II (Un-425-400, Nuaire)
- Incubadora de 37 C (Habitat, Revco)
- Balanza Analítica Scientech (SA 210, Scientech)
- Microscopio invertido (axiovert 25, Zeizz)
- Potenciometro (ϕ 720 pHmeter, Beckman)
- Centrifuga de tubos eppendorf (5804R, brinkman)
- Vortex (Genie, Fisher)
- Congelador de -20 (TermoForma, LabPharmacy Freezer)
- Detector de fotodiodos (1525, Waters)
- Columna Symmetry Shield RP₁₈ 3.9 x 150 mm

Preparación del medio TYI-S-33 modificado por Keister, 1983

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

Cloruro de sodio	2.0 g
Fosfato de potasio dibásico	1.0 g
Fosfato de sodio monobásico	0.6 g
Biosote, peptona	30.0 g
D-(+)-Glucosa	10.0 g
L-cisteína	2.0 g
L-ácido ascórbico	0.2 g
Citrato férrico de amonio	0.0228 g
Bilis de buey	0.8 g

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

Preparación del medio TYI-S-33

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

Cloruro de sodio	2.0 g
Fosfato de potasio dibásico	1.0 g
Fosfato de sodio monobásico	0.6 g
Biosote, peptona	30.0 g
D-(+)-Glucosa	10.0 g
L-cisteína	1.0 g
L-ácido ascórbico	0.2 g
Citrato férrico de amonio	0.0228 g

Se disolvieron con agitación cada uno de los componentes en 650 mL de agua bidestilada, posteriormente se llevó a aforo en un matraz de 1 L. Se ajustó el pH a 6.8 en un potenciómetro ϕ 720 pHMeter con NaOH 1M, se esterilizó en autoclave a 15 lb de presión, 120 C durante 20 min. El medio fue recolectado en frasco Schott de 100 mL estériles, utilizando el 80% de su capacidad y después fue sometido a un control de esterilidad.

Preparación de PBS 10 x

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

Cloruro de sodio	8.0 g
Cloruro de potasio	2.0 g
Fosfato de potasio dibásico	2.0g
Fosfato de sodio monobásico	21.5 g

Se disolvieron con agitación cada uno de los componentes en 500 mL de agua bidestilada, posteriormente se llevó a aforo en un matraz de 1 L. Se ajustó el pH a 7.2 en un potenciómetro ϕ 720 pHMeter con NaOH o HCL 1M, para después ser esterilizado en autoclave (15 lb, 120 C, durante 20 min). El PBS 10 x fue recolectado en frasco un Schott de 1000 mL estériles.

Control de esterilidad

Para realizar el control de esterilidad se tomó una alícuota de 4 μ L medio (TYI-S-33 y TYI-S-33 modificado) de cada uno de los frascos Schott dentro del gabinete de Seguridad Biológica y se sembró en una placa de agar-sangre, se incubó a 37 C por 48 h al igual que los medios perfectamente sellados, con la finalidad de permitir un posible crecimiento bacteriano o fúngico, en caso de existir contaminación. Una vez que se concluyó el período de incubación, se observó si existía turbidez en el medio y se revisó la placa para determinar si se

presentaba una posible contaminación. Si tanto el control del medio como la placa fueron negativas, los medios se almacenaron a -20 C hasta su posterior uso.

Preparación del medio TYI-S-33 modificado para trofozoítos de *G. intestinalis* (Keister, 1983).⁴³

Una vez que los medios pasaron el control de esterilidad, cada 100 mL de medio TYI-S-33 se complementó con 10 mL suero fetal de ternera descomplementado (56 C, 30 min) y se agregó 1 mL de una mezcla de antibiótico penicilina/estreptomicina 10 000 U/ μ g/mL, con la finalidad de permitir el adecuado crecimiento de los trofozoítos de *G. intestinalis* y evitar una posible contaminación durante su uso. Se homogenizó y se etiquetó adecuadamente

Preparación del medio TYI-S-33 para trofozoítos de *T. vaginalis* (Diamond, 1978).⁴⁴

Una vez que los medios pasaron el control de esterilidad, cada 100 mL de medio TYI-S-33 se complemento con 10 mL suero fetal de ternera descomplementado (56 C, 30 minutos), 3 mL de una mezcla de vitaminas-Tween80 y se agregó 1 mL de una mezcla de antibiótico penicilina/estreptomicina 10 000 U/ μ g/mL, con la finalidad de permitir el adecuado crecimiento de los trofozoítos de *T. vaginalis* y evitar una posible contaminación durante su uso. Se homogeneizó y se etiquetó adecuadamente.

Mantenimiento de cultivo axénico de *G. intestinalis* y *T. vaginalis*

Para el mantenimiento de la cepa de trofozoítos *G. intestinalis* cepa IMSS:1090:1 se observaron los tubos para determinar si tenían confluencia de 100-90 %. De los tubos con trofozoítos se realizó un cambio de medio dos veces a la semana, el cual consistía en decantar el medio de cultivo del tubo y reconstituirlo con 6 mL de medio de cultivo fresco, estos se colocaron en un baño de hielo durante 10 min. De manera paralela, se agregaron 6 mL de medio de cultivo fresco (medio TYI-S-33 modificado) a 6 tubos de ensaye y se inoculó cada tubo con 15 μ L de trofozoítos provenientes cada uno de los tubos que se estaba enfriando. Los tubos se sellaron con parafilm, se etiquetaron y se incubaron a 37 C de 72 a 96 h. El mantenimiento se realizó 2 veces por semana.

Para el mantenimiento de los trofozoítos de *T. Vaginalis*, cepa GT3, se observaron los tubos para determinar si tenían confluencia de 100-90 %. De los tubos con trofozoítos se realizó un cambio de medio cada tres días. Se colocaron 6 tubos de ensaye, se adicionaron 6 mL de medio de cultivo fresco (medio TYI-S-33), luego se colocó a cada tubo un inóculo de 10 μ L de trofozoítos provenientes cada uno de los tubos que presentaban de 100-90% de confluencia. Los tubos se sellaron con parafilm, se etiquetaron y se incubaron a 37 C por 48 h. El mantenimiento se realizó 3 veces por semana.

Conteo de trofozoítos de *G. intestinalis* y *T. vaginalis* en la cámara de Neubauer

Para el conteo de trofozoítos de *G. intestinalis* y *T. vaginalis* se realizaron diluciones 1:10 para cada uno de los tubos eppendorf con PBS y se colocó por capilaridad aproximadamente 10 μ L de estas diluciones en una cámara de Neubauer. La cámara de Neubauer; también conocida como hematocitómetro (Figura 33) esta constituido por dos cámaras, cada cámara subdividida en cinco cuadrantes, cuatro de ellos divididos en 16 cuadrantes y el cuadrante restante esta formado por 25 cuadrantes . Para su observación se utilizó un microscopio invertido y se utilizó el objetivo de 10 X.

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

Así que, $\text{No. de trofozoítos/mL} = [\text{No. de trofozoítos} / 4] [10\ 000] [10]$

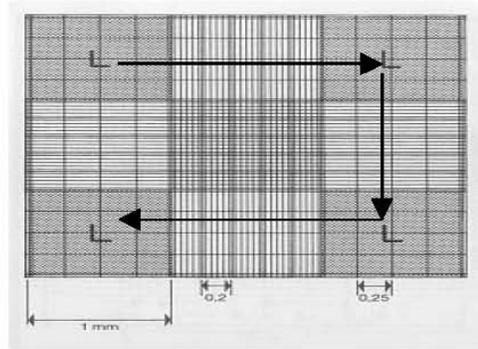


Figura 33. Cámara de Neubauer

Curva de crecimiento de trofozoítos de *G. intestinalis* y *T. vaginalis*

De los cultivos axénicos de trofozoítos tanto *G. intestinalis* como de *T. vaginalis* se eligió un tubo con 100% de confluencia, se colocó en baño de hielo 10 min. Dentro del gabinete de seguridad biológica se realizó una dilución 1:10 en un tubo eppendorf con PBS (100 μ L de trofozoítos + 900 μ L medio). Se contó el número de trofozoítos en el microscopio invertido y finalmente se determinó el volumen requerido para obtener 50×10^3 trofozoítos de *G. intestinalis* y 6×10^3 trofozoítos *T. vaginalis*.

Una vez calculados los μ L necesarios para obtener 50×10^3 trofozoítos de *G. intestinalis* y 6×10^3 trofozoítos *T. vaginalis* se incubaron en medio TYI-S-33 modificado y medio TYI-S-33 respectivamente, utilizando tubos eppendorf de 1.5 mL limpios y estériles, los tubos se etiquetaron en los tiempos determinados y se incubaron a 37 C en los tiempos asignados (Cuadro 11).

Cuadro 11. Curva de crecimiento de 50×10^3 trofozoítos *G. intestinalis* y de 6×10^3 trofozoítos *T. vaginalis*

No. de tubos	Periodo de incubación (h)	Inóculo de trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	Inóculo de trofozoítos de <i>T. vaginalis</i>
2	24	50 000	6 000
2	48	50 000	6 000
2	72	50 000	6 000
2	96	50 000	6 000
2	120	50 000	6 000

Transcurrido el período de incubación, se colocaron los tubos en baño de hielo 1 h para el posterior conteo de los trofozoítos. Se graficó el número de trofozoítos contra tiempo para determinar el tiempo al cual los trofozoítos alcanzaron la fase logarítmica y la estacionaria.

Preparación de diluciones de albendazol, nitazoxanida, tizoxanida, metronidazol, BZHNOS-1, BZHNOS-3, BZHPOS-4, BZHNPOS-12, BZHNPOS-16 Y BZHNPOS-25.

Para obtener una solución patrón de $10\,000 \mu\text{g/mL}$ se pesaron 10 mg en balanza analítica de cada compuesto (materias primas) y se disolvieron en 1 mL con DMSO se utilizaron tubos eppendorf. A partir de la solución patrón se realizaron las diluciones correspondientes para obtener de cada compuesto concentraciones desde $0.001 \mu\text{g/mL}$ a $1.5 \mu\text{g/mL}$ en medio de cultivo fresco (Figura 34).

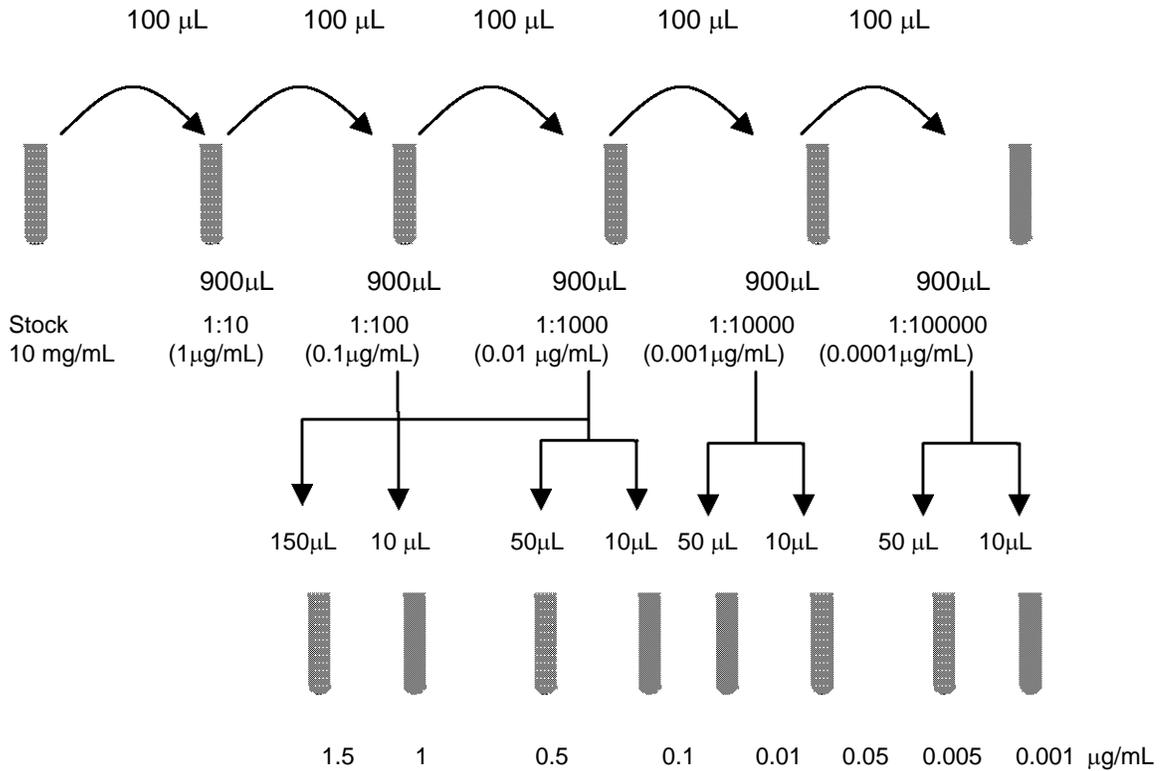


Figura 34. Diluciones de albendazol, nitazoxanida, tizoxanida, metronidazol, **BZHNOS-1, BZHNOS-3, BZHNPOS-12, BZHNPOS-16, BZHNPOS-25** y **BZHPOS-4**

Método de subcultivo

Para evaluar la actividad giardicida y tricomonocida tanto de albendazol, nitazoxanida, tizoxanida, metronidazol, **BZHNOS-1, BZHNOS-3, BZHNPOS-12, BZHNPOS-16, BZHNPOS-25 Y BZHPOS-4** se incubaron 50×10^3 trofozoítos de *G. intestinalis* en medio TYI-S-33 modificado con las diferentes concentraciones de cada compuesto (Cuadro 9) a 37 C, 48 h y 6×10^3 trofozoítos de *T. vaginalis* en medio TYI-S-33 con las diferentes concentraciones (Cuadro 12) de cada compuesto a 37 C, 48 h .

Cuadro 12. Concentraciones de los compuestos utilizados en la evaluación contra *G. intestinalis* y *T. vaginalis*

Compuestos	Concentración en µg/mL	
	<i>G. intestinalis</i>	<i>T. vaginalis</i>
BZHNOS-1	0.005, 0.010, 0.050	0.005, 0.010, 0.050
BZHNOS-3		0.100, 0.500, 1.000
BZHPOS-4		
BZHNPOS-12	0.100, 0.500, 1.000	0.010, 0.050, 0.100
BZHNPOS-16		0.500, 1.000, 1.500
BZHNPOS-25		
albendazol	0.001, 0.005, 0.010 0.050, 0.100, 0.500	0.005, 0.010, 0.050 0.100, 0.500, 1.000
nitazoxanida	0.005, 0.010, 0.050	
tizoxanida	0.100, 0.500, 1.000	
metronidazol		

También se realizó un control negativo el cual consistió en trofozoítos de *G. intestinalis* y *T. vaginalis* cultivados en su respectivo medio de cultivo fresco libre de compuestos y como controles positivos se utilizaron trofozoítos cultivados en albendazol, nitazoxanida, tizoxanida y metronidazol en su respectivo medio de cultivo fresco. Después de la incubación se colocaron los tubos eppendorf en una baño de hielo por 1 h para permitir el desprendimiento de los trofozoítos de la pared del tubo y se subcultivaron 50 µL de trofozoítos en su respectivo medio de cultivo libre de compuestos, estos tubos fueron incubados a 37 C, 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se colocaron en una baño de hielo por 1 h y

mediante el uso de una cámara de Neubauer se determinó el número de trofozoítos presentes en cada una de las concentraciones utilizadas, empleando un microscopio invertido. El ensayo se realizó tres veces por duplicado.

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

Exploración de la estabilidad química de BZHNOS-3

Para realizar la exploración de la estabilidad química del híbrido evaluado se utilizó una columna Symmetry Shield RP₁₈; como fase móvil una mezcla acetonitrilo-agua con 0.5% de ácido acético; un flujo de 0.5 mL/min por gradiente (Cuadro 13), una longitud de onda de 350 nm y un tiempo de muestreo de 19 min.

Cuadro 13. Gradiente de la fase móvil

Tiempo (min.)	Agua (%)	Acetonitrilo (%)
0	50	50
8	25	75
18	50	50

Análisis Probit

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

Número de individuos (n).

Número de organismos muertos o afectados (r).

Porcentaje de efecto (p).

$$p = [r / n] \times 100$$

La representación gráfica de p contra C , 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 35).

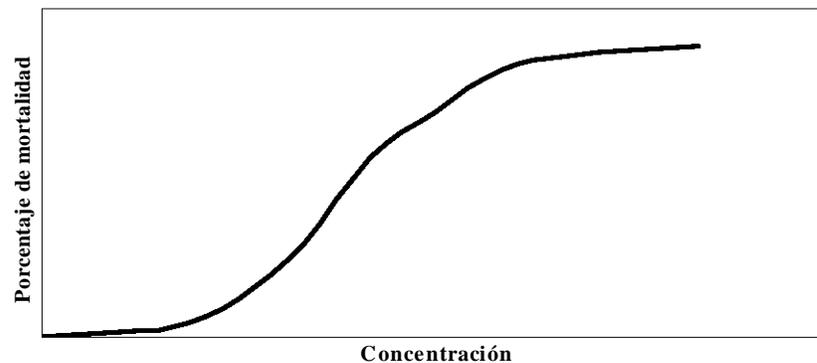


Figura 35. Representación gráfica de la relación dosis-respuesta cuantil.

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 la unidad Probit. En la gráfica se traza una línea a partir del Probit 5 hasta cortar la línea trazada; el valor correspondiente a en el eje X se denomina m y el antilogaritmo de este valor corresponde a la CI_{50} (Figura 36).⁴⁵

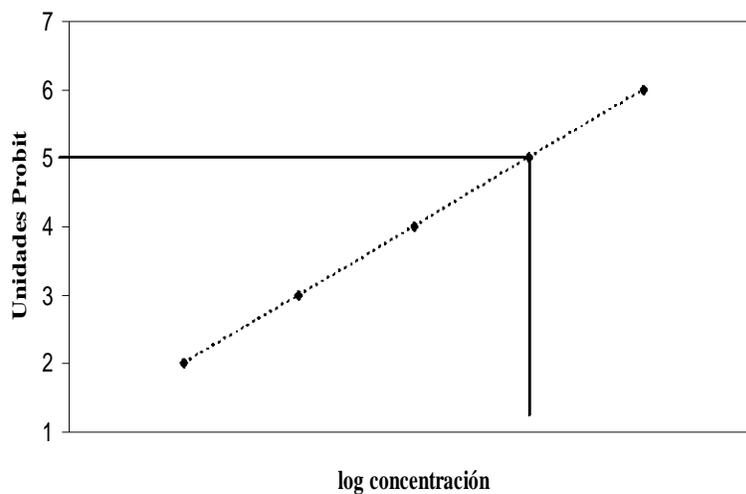


Figura 36. Representación gráfica del cálculo de la CI_{50}

ANEXO 2. Desglose de datos experimentales

En este apartado se presentan los valores obtenidos de las curvas de crecimiento de *G. intestinalis* y *T. vaginalis*; así como también se presentan los datos de los ensayos (CI_{50} y la CI_{90}) y las gráficas de cocientes, dado por la relación de CI_{50} entre los controles positivos y cada uno de compuestos utilizados y las gráficas de efectividad dadas por el inverso de la CI_{90} (μM).

Cuadro 14. Curva de crecimiento de 50×10^3 trofozoítos *G. intestinalis*

Tiempo (h)	Ensayo (No. De trofozoítos/mL)		Promedio*	DE	% CV
	1	2			
0	50000	50000	50000	-----	-----
24	232500	237500	235000	3535.53	1.504
48	1375000	1250000	1312500	88388.35	6.734
72	2100000	2075000	2087500	17677.67	0.847
96	2775000	2750000	2762500	17677.67	0.640
120	2725000	2700000	2712500	17677.67	0.652

*Obtenido de un ensayo por duplicado

Cuadro 15. Curva de crecimiento de 6×10^3 trofozoítos *T. vaginalis*.

Tiempo (h)	Ensayo (No. de trofozoítos/mL)		Promedio*	DE	% CV
	1	2			
0	6000	6000	6000	-----	-----
24	375000	355000	365000	14142.13	3.874
48	2200000	2100000	2150000	70710.36	3.288
72	4375000	4250000	4312500	88388.34	2.049
96	7175000	7100000	7137500	53033.01	0.743
120	7250000	7262500	7256250	8838.83	0.128

*Obtenido de un ensayo por duplicado Resultados obtenidos de los ensayos con trofozoítos de *G. intestinalis*.

Cuadro 16. Concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de **BZHNOS-1**

Ensayo	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
1	0.076	0.251	0.645	2.127
2	0.080	0.264	0.648	2.137
3	0.075	0.247	0.644	2.123
Promedio	0.077	0.254	0.646	2.129
DE	0.003		0.002	
%CV	3.436		0.322	

Cuadro 17. Concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de **BZHNOS-3**

Ensayo	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
1	0.071	0.191	0.829	2.233
2	0.070	0.189	0.831	2.238
3	0.071	0.191	0.835	2.249
Promedio	0.071	0.190	0.832	2.240
DE	0.001		0.003	
%CV	0.817		0.367	

Cuadro 18. Concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de **BZHPOS-4**

Ensayo	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
1	0.082	0.235	0.827	2.367
2	0.070	0.200	0.769	2.201
3	0.077	0.220	0.903	2.585
Promedio	0.076	0.218	0.833	2.384
DE	0.006		0.067	
%CV	7.897		8.067	

Cuadro 19. Concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de **BZHNPOS-12**

Ensayo	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
1	0.188	0.728	3.271	12.664
2	0.182	0.705	3.866	14.967
3	0.175	0.678	4.027	15.590
Promedio	0.182	0.703	3.721	14.407
DE	0.007		0.398	
%CV	3.582		10.701	

Cuadro 20. Concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de **BZHNPOS-16**

Ensayo	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
1	0.208	0.764	2.776	10.194
2	0.203	0.745	3.265	11.989
3	0.199	0.731	2.876	10.561
Promedio	0.203	0.747	2.972	10.915
DE	0.005		0.258	
%CV	2.218		8.692	

Cuadro 21. Concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de **BZHNPOS-25**

Ensayo	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
1	0.160	0.526	1.866	6.130
2	0.135	0.444	2.025	6.653
3	0.159	0.522	2.228	7.319
Promedio	0.151	0.497	2.040	6.701
DE	0.014		0.181	
%CV	9.353		8.896	

Cuadro 22. Concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de albendazol

Ensayo	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
1	0.013	0.049	0.094	0.354
2	0.014	0.053	0.087	0.328
3	0.014	0.053	0.089	0.335
Promedio	0.014	0.052	0.090	0.339
DE	0.001		0.004	
%CV	4.225		4.006	

Cuadro 23. Concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de nitazoxanida

Ensayo	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
1	0.051	0.166	0.345	1.123
2	0.053	0.172	0.326	1.061
3	0.053	0.172	0.382	1.243
Promedio	0.052	0.170	0.351	1.142
DE	0.001		0.028	
%CV	2.206		8.113	

Cuadro 24. Concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de tizoxanida

Ensayo	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
1	0.055	0.207	0.876	3.303
2	0.056	0.211	0.902	3.401
3	0.057	0.215	0.864	3.257
Promedio	0.056	0.211	0.881	3.320
DE	0.001		0.019	
%CV	1.786		2.206	

Cuadro 25. Concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de metronidazol

Ensayo	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
1	0.216	1.262	3.258	19.035
2	0.212	1.239	3.555	20.770
3	0.210	1.227	3.727	21.775
Promedio	0.213	1.243	3.513	20.527
DE	0.003		0.237	
%CV	1.437		6.753	

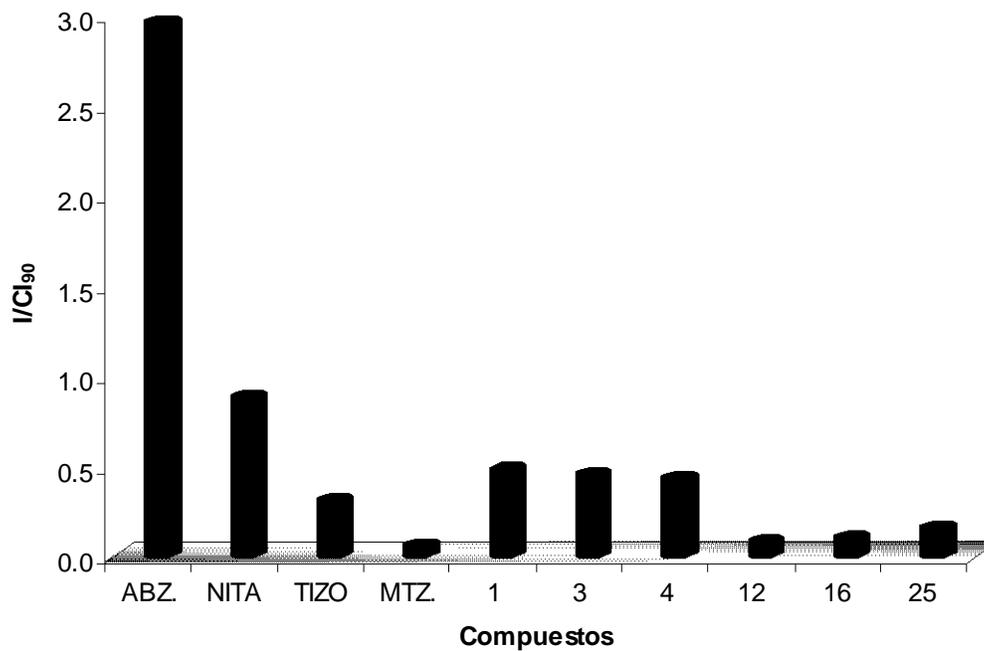


Figura 37. Efectividad de los compuestos evaluados contra trofozoítos de *Giardia intestinalis* representado por el inverso de la CI_{90} .

Resultados obtenidos de los ensayos con trofozoítos de *T. vaginalis*.

Cuadro 26. Concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de **BZHNOS-1**

Ensayo	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
1	0.102	0.336	1.063	3.505
2	0.099	0.326	1.089	3.591
3	0.108	0.356	0.986	3.251
Promedio	0.103	0.340	1.046	3.449
DE	0.005		0.054	
%CV	4.449		5.121	

Cuadro 27. Concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de **BZHNOS-3**

Ensayo	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
1	0.134	0.361	0.783	2.109
2	0.133	0.358	0.708	1.907
3	0.129	0.347	0.704	1.896
Promedio	0.132	0.356	0.732	1.971
DE	0.003		0.045	
%CV	2.004		6.082	

Cuadro 28. Concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de **BZHPOS-4**

Ensayo	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
1	0.074	0.212	0.978	2.799
2	0.070	0.200	0.723	2.069
3	0.074	0.212	0.876	2.507
Promedio	0.073	0.208	0.859	2.459
DE	0.002		0.128	
%CV	3.178		14.941	

Cuadro 29. Concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de **BZHNPOS-12**

Ensayo	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
1	0.109	0.422	2.396	9.276
2	0.108	0.418	1.957	7.576
3	0.097	0.376	1.706	6.605
Promedio	0.105	0.405	2.020	7.819
DE	0.007		0.349	
%CV	6.361		17.292	

Cuadro 30. Concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de **BZHNPOS-16**

Ensayo	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
1	0.162	0.595	7.631	28.132
2	0.128	0.470	6.602	24.243
3	0.137	0.503	6.332	23.251
Promedio	1.142	0.523	6.865	25.209
DE	0.018		0.702	
%CV	12.377		10.232	

Cuadro 31. Concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de **BZHNPOS-25**

Ensayo	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
1	0.182	0.598	2.440	8.016
2	0.198	0.650	2.465	8.098
3	0.199	0.654	2.615	8.591
Promedio	0.193	0.634	2.507	8.235
DE	0.010		0.095	
%CV	4.943		3.776	

Cuadro 32. Concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de albendazol

Ensayo	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
1	0.228	0.859	5.242	19.756
2	0.215	0.810	4.673	17.612
3	0.234	0.882	5.866	22.108
Promedio	0.226	0.851	5.260	19.825
DE	0.010		0.597	
%CV	4.304		11.344	

Cuadro 33. Concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de nitazoxanida

Ensayo	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
1	0.054	0.176	0.736	2.395
2	0.058	0.189	0.840	2.734
3	0.058	0.189	0.812	2.643
Promedio	0.057	0.184	0.796	2.590
DE	0.002		0.054	
%CV	4.075		6.761	

Cuadro 34. Concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de tizoxanida

Ensayo	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
1	0.081	0.305	1.552	5.851
2	0.083	0.313	1.485	5.599
3	0.075	0.283	1.769	6.669
Promedio	0.080	0.300	1.602	6.040
DE	0.004		0.148	
%CV	5.226		9.267	

Cuadro 35. Concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de metronidazol

Ensayo	CI_{50}		CI_{90}	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
1	0.058	0.339	0.478	2.793
2	0.057	0.333	0.424	2.477
3	0.053	0.310	0.399	2.331
Promedio	0.056	0.327	0.434	2.534
DE	0.003		0.040	
%CV	4.725		9.311	

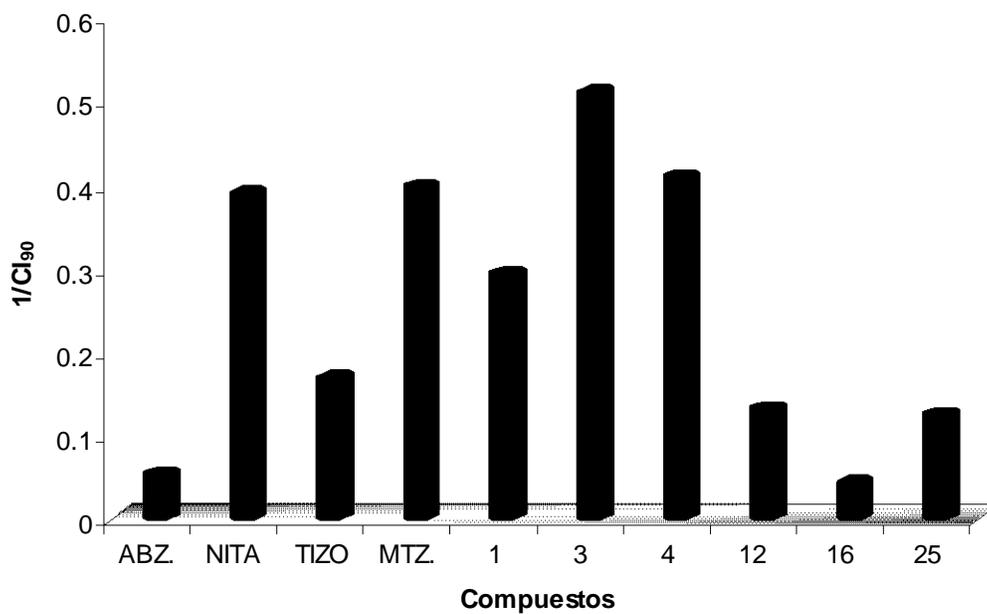


Figura 38. Efectividad de los compuestos evaluados contra trofozoítos de *Trichomonas vaginalis* representado por el inverso de la CI_{90} .

REFERENCIAS

1. Watkins, Bill. Drug the control of parasitic diseases: current status and develoment. *Trens in Parasitology*, **2003**, 19:477-479.
2. Sistema Único de Información Epidemiológica; www.dgepi.salud.gob.mx 25, 11,2004.
3. Wolfe, Martin; Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, **1992**, 5:93-100
4. Fox, L.; Saravolatz, L. Nitaxozanide: A New Thiazole Antipatasitc Agent. *Clinical Infectious Diseases*, **2005**, 40:1173-80
5. Upcroft, P.; Upcroft, J. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. *Clinical Microbiology Reviews*, **2001**, 14:150-164.
6. Marquardt, W.; Demaree, R.; Grieté, R. Parasitology Vector Biology. 2ª ed., USA, Academis Press, **2000**:89-99.
7. Adam, R. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews* **2001**, 14:447-475.
8. Mandell, Douglas y Bennett. Enfermedades infecciosas, Principios y Práctica. 4ª ed., Argentina, ed. Médica Panamericana, **1997**.
9. Romero Cabello, Raúl. Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas. 2ª ed., México, Ed. Médica Panamericana, **1999**
10. Thompson, R. C. Andrew, Giardiasis as a re-emergin infectious disease and its zoonotic potential, *International Journal for Parasitology*, **2000**, 30:1259-1267.
11. Gardner, T.; Hill, D. Treatment of Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, **2001**, 14:114-128.
12. Raether, W.; Hänel, H. Nitroheterocyclic drugs with broad-spectrum activity. *Parasitology Research*, **2003**, 90:S19-S39.
13. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas 2005 http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo.php?bib_vv=6. 06,04,06

-
14. Swygar, A; Seña A.; Hobbs, M.; Cohen M. Trichomoniasis manifestations, diagnosis and management. *Sexual. Transmission. Infection*, **2004**,80:91-95.
 15. Schwerbke J.; Buergess D. Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, **2004**, 17:794-803.
 16. Shore García, L. Diagnostic Medical Parasitology. 4^a ed., USA, ASM PRESS, 2001.
 17. Kulda, J. Trichomonas, hydrogenosomes and drug resistance. *International Journal for Parasitology*, **1999**, 29:199-212.
 18. Petrin D.; Delgaty K.; Bhatt R.; Garber G. Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiological Reviews*. **1998**, 11:303-317.
 19. Tay, J.; Lara, R.; Velasco, O.; Gutiérrez, M. Parasitología Médica. 6^a ed., México, Méndez Editores, **1996**.
 20. Alderete, J.; Lehker, M.; Arroyo, R. The Mechanisms and Molecules Involved in Cytoadherence and Pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Today* **1995**, 11: 70-74.
 21. Mendoza, R.; Becerril, C.; Fattel-Facenda, L.; Avila L.; Ruíz, M.; Ortega, J. and Arroyo; R. **CP30**, a Cysteine Proteinase Involved in *Trichomonas vaginalis* Cytoadherence. *Infection and Immunity*, **2000**, 68:4907-4912.
 22. 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.
 23. Navarrete-Vázquez G. Diseño, síntesis y actividad antiparasitaria de derivados híbridos del 2-(trifluorometil)-bencimidazoles. Tesis Doctoral, México, Facultad de Química, UNAM, 2004.

-
24. 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.
 25. Cedillo, R.; Muñoz, O. In-vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *Journal of Medical Microbiology*, **1992**, 37:221-224.
 26. 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.
 27. Solana H.;Rodríguez J. and Lanusse C. Comparative metabolism of albendazole and albendazole sulfoxide by different parasites. *Parasitology Research*, **2001**,87:275-280.
 28. Reynoldson, J.; Thompson, R.; Horton, R. Albendazole as a Future Anti-giardial Agent. *Parasitology Today*, **1992**, 8:412-414.
 29. Chávez, B.; Cedillo, R.; Martínez, A. *Giardia lamblia*: Ultrastructural Study of the In Vitro Effect of Benzimidazoles. *Journal of Protozoology*, **1992**, 39:510-515.
 30. Oxberry, M.; Thompson, R.; Reynoldson, J. Evaluation of the effects of albendazole and metronidazole on the ultrastructure of *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Spironucleus muris* using transmission electron microscopy. *International Journal for Parasitology*, **1994**, 24:695-703.
 31. Navarrete-Vázquez, G.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A.; Yépez, L.; Hernández, F.; Valdez, J.; Morales, R.; Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R. Synthesis and Antiparasitic Activity of 2-(trifluoromethyl)-benzimidazole Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2001**, 11:187-190.
 32. Sanchez-Díaz, Ma. Síntesis de Derivados Híbridos del 1-metilbenzimidazol con actividad antihelmíntica potencial. Tesis de Maestría. México, Facultad de Química, UNAM, 1999.

-
33. Lacey, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal for Parasitology*, **1988**, 18:885-936.
 34. Lacey, E. Mode of Action of Benzimidazoles. *Parasitology Today*, **1990**, 6:112-115
 35. Lacey, E.; Gill, J. Biochemistry of benzimidazole resistance. *Acta Tropica*, **1994**, 56:245-262.
 36. Valdez J.; Cedillo R.; Hernández-Campos A.; Yépez L.; Hernández-Luis F.; Navarrete-Vázquez G.; Tapia A.; Cortés R.; Hernández M., Castillo R. Synthesis and Antiparasitic of 1H-Bemcimidazole Derivates. *Bioorganic & Medica Chemistry Letters*, **2002**, 12:2221-2224.
 37. Johnson, P. Metronidazole and Drug Resistance. *Parasitology Today*, **1993**, 9:183-186.
 38. Cedillo, R.; Chávez, B.; González, A.; Tapia, A.; Yépez, L. In Vitro Effect of Nitazoxanide Against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **2002**, 49:201-208.
 39. Gilles, H.; Hoffman, P. Treatment of intestinal parasitic infections: a review of nitazoxanide. *Trends in Parasitology*, **2002**, 18:95-97.
 40. Avendaño López, Ma. del Carmen. Introducción a la Química Farmacéutica. España, Ed. Interamericana McGraw-Hill, **1993**.
 41. Korolkovas, A.; Burckhalter, J. Compendio esencial de Química Farmacéutica. España, Ed. Reverté, **1979**.
 43. Keister, D. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **1983**, 77:487-488.
 44. Diamond, L.; Harlow, D.; Cunnick, C. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other entamoeba. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **1978**, 72:431-432.

45. Finney, D.; Statistical Method in Biological Assay, 3^a edición. Cambridge University Press. New York, **1977**, pp 20-39

<http://pathmicro.med.sc.edu/parasitology/Giardia-lc.gif>

www.mercksource.com

www.cdfound.to.it

<http://web.indstate.edu/thcme/micro/parasites/trichomon.gif>