



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

Evaluación “**in vitro**” de la actividad biológica de análogos de la nitazoxanida
contra trofozoítos de *Giardia intestinalis*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

EDUARDO ANTONIO OLVERA YAÑEZ

ASESORES:

**M en C. JUAN PABLO MARTÍNEZ LABAT
DRA. LILIÁN YÉPEZ MULIA**

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

2005



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.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:


Evaluación in vitro de la actividad biológica de análogos de la nitazoxanida contra trofozoítos de Giardia intestinalis


que presenta el pasante: Eduardo Antonio Olvera Yañez
con número de cuenta: 09951354-2 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo


Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.


ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

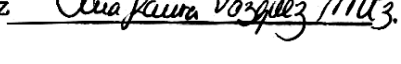
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Noviembre de 2005

PRESIDENTE M.C. Juan Pablo Martínez Labat 

VOCAL Dra. Luisa Martínez Aguilar  L.M.A.

SECRETARIO MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes 

PRIMER SUPLENTE QFB. Rene Damian Santos 

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Ana Laura Vázquez Martínez 

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por proporcionarme salud e inteligencia suficiente para concluir satisfactoriamente mis estudios académicos y poder realizar uno de mis sueños más apreciados “ formar parte de la UNAM” ; además, de permitirme crecer como persona y brindarme el apoyo de una **hermosa familia**.

A mis padres: Melitón Olvera Zamudio y Ofelia Yañez Ochoa, por haberme dado la vida y no conforme con ello, se esforzaron por brindarme lo mejor que pudieran incluyendo una buena educación y un amor incondicional. Gracias por todos aquellos sacrificios que realizaron para ayudarme; por soportarme en los momentos malos y celebrar conmigo aquellos buenos; no me alcanzará la vida para agradecerles por todo y que Dios los bendiga y proteja siempre.

A mis hermanos: Josué y Brenda, que en muchas ocasiones soportaron mi mal humor y malos momentos; y a cambio me brindaban una sonrisa, una palmada en la espalda, un abrazo, una muestra de cariño, pero sobre todo, gracias por preocuparse por mí, ya que sin ustedes sería imposible lograr tan anhelado sueño.

Al Dr. Angel Guzmán, por proporcionarme los compuestos análogos de la nitazoxanida que fueron evaluados en este trabajo de tesis.

A la Dra. Lilián Yépez Mulia, por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su equipo temporalmente, brindarme un apoyo incondicional, un trato agradable y especialmente por haber confiado en mí como persona y profesionista.

Al personal del Laboratorio de Parasitología de la UIMEIP-Pediatría, CMN Siglo XXI: Luz María, Jesús, Nancy, Leticia, Francisco y en especial a Amparo y Rosa Maria; que me apoyaron en los momentos difíciles y me brindaron las facilidades necesarias para concluir prontamente este trabajo.

A mis compañeros y amigos de Laboratorio: Vanesa: por haberme ayudado durante mi adiestramiento. A José: por ayudarme a mejorar como persona y por corregir mis errores profesionales. A Beatriz: por brindarme su amistad, su compañerismo y por apoyarme aún fuera de la institución. Finalmente a mis dos mejores amigos: Claudia y Miguel Angel, que reapoyaron inmensamente en aquellos momentos difíciles y me celebraron los momentos más felices; gracias a ambos y les recuerdo, que así como ustedes me brindaron su amistad, espero sepan cuentan con la mía para toda la vida.

A todos mis amigos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1; por su ayuda, guía, apoyo, consejos y cariño de hermanos que me brindaron durante el transcurso de mi vida estudiantil: Jesús Z., Jesús S., Vladimir, Ruth, Karla, Carmen, David C., Angel, Merit y finalmente a Olga, que me enseñó que la amistad es algo perdurable.

INDICE.

1. Resumen.....	01
2. Introducción.....	03
3. Antecedentes.....	06
4. Generalidades de los protozoarios.....	11
5. Generalidades de <i>Giardia intestinalis</i>	13
6. Giardiosis.....	17
7. Tratamiento.....	20
8. Nitazoxanida.....	28
9. Planteamiento del problema	37
10. Hipótesis.....	40
11. Objetivos generales.....	40
12. Objetivos particulares.....	41
13. Materiales.....	42
14. Metodología.....	44
15. Diagrama de flujo.....	48
16. Resultados y discusión.....	49
17. Conclusiones.....	57
18. Anexo A.....	58
19. Anexo B.....	60
20. Bibliografía.....	68

1. RESUMEN

Actualmente, una alternativa en el tratamiento de la giardiosis es la nitazoxanida, la cual es un excelente antiparasitario de amplio espectro y sus efectos secundarios son menores en comparación con aquellos presentados por el albendazol, metronidazol, quinacrina y furazolidona. Además de ser el único fármaco con el cual no se ha detectado desarrollo de resistencia por este parásito; por ello resulta de interés desarrollar y sintetizar análogos de la nitazoxanida, cuya finalidad sea incrementar su actividad farmacológica contra los trofozoítos de *Giardia intestinalis*.

Para incrementar la actividad farmacológica, se realizó un estudio de estructura-actividad de manera explorativa que permitió definir nuevas moléculas con actividad antiparasitaria. A este respecto, en el Instituto de Química de la UNAM, el grupo de investigación del Dr. Angel Guzmán, ha realizado la síntesis de 5 análogos de la nitazoxanida (AG-2 al AG-6), respetando como estructura base la molécula 5-nitro-2-aminotiazol y añadiendo los grupos sustituyentes con densidad electrónica variable. Evaluando su actividad giardicida mediante un ensayo “*in vitro*”, en el cual, se colocaron en tubos Ependorf, 5×10^4 trofozoítos de *Giardia intestinalis* a diversas concentraciones (0.005 hasta 0.5 $\mu\text{g/mL}$) de los compuestos análogos de la nitazoxanida, testigos positivos (Metronidazol, Albendazol y Nitazoxanida); además de testigos negativos. Posteriormente, se incubaron 48 h a 37 °C, después se colocaron en baño de hielo durante 1 h, para realizar cambio de medio fresco y nuevamente volver a incubar a las condiciones anteriores. Una vez transcurrido el tiempo de incubación necesario, se colocaron en baño de hielo por 1 h y se agitaron los tubos Ependorf para colocar 12 μL de cada uno de los tubos en la cámara de Neubauer y contar el número de trofozoítos vivos de los cuadrantes secundarios de la cámara.

Finalmente, se calculó el número de trofozoítos muertos de las concentraciones antes mencionadas y se introdujeron los datos en el programa Probit, para obtener las CI_{50} requeridas para cada uno de los compuestos análogos de la nitazoxanida y controles respectivos. (Cedillo y Muñoz, 1992).

De los 5 compuestos análogos de la nitazoxanida sintetizados por el Dr. Angel Guzmán, los compuestos AG-2 y AG-5, resultaron ser aquellos que presentaron una mayor actividad antiparasitaria en comparación con el albendazol y metronidazol. Sin embargo, los compuestos AG-3 y AG-4, fueron más activos que el metronidazol y menos activos que el albendazol. Finalmente el compuesto AG-6, resultó ser menos activo que el albendazol e igualmente activo que el metronidazol.

En conclusión todos los compuestos fueron menos activos que la nitazoxanida, aunque, los compuestos AG-2 y AG-5; al haber obtenido valores de actividad giardicida muy cercanos a los establecidos por la nitazoxanida, pueden ser evaluados en un modelo de giardiosis, en un próximo proyecto de investigación.

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias son de gran importancia, ya que son muy frecuentes y en consecuencia una parte muy numerosa de la población mundial se encuentra infectada. De acuerdo a estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1998), 280 millones de personas son infectadas cada año. La incidencia puede ser alta en niños de países desarrollados y disminuye 2-7% en algunas naciones industrializadas. Recientemente, la OMS estimó que 3 millones de personas viven en el medio ambiente y la propagación de la giardiosis entre ellos es aproximadamente del 30%, sugiriendo así, que existen aproximadamente 1 millón de casos de giardiosis contribuyendo con 2.5 millones de muertos anualmente por enfermedades diarreicas.

Estimaciones realizadas por la OMS en el 2002, han hecho notar que más de la mitad de la población mundial padece de alguna infección parasitaria causada por helmintos y/o protozoarios. Desde el punto de vista de daño, las parasitosis presentan una enorme gama de posibilidades, que van desde cursar asintomáticas, hasta casos fatales; también la localización de los parásitos en el hospedero humano es muy variable, desde parásitos que no van más allá del estrato córneo, hasta localizaciones viscerales a nivel prácticamente de todo el organismo.

Por otro lado, por sus implicaciones sociales y económicas, las parasitosis producen daños de enorme trascendencia en una comunidad, población y país. Estas se pueden clasificar por su localización; así hablamos de enfermedades intestinales y extraintestinales.

De igual forma, podemos señalar que existen 2 grandes grupos de enfermedades parasitarias, esto dependiendo de los agentes que las produzcan, éstos pueden ser protozoos y helmintos, esta clasificación a su vez genera que las protozoosis y helmintiosis se clasifiquen de acuerdo con su dinámica de transmisión. Así, tenemos entonces que estos parásitos pueden transmitirse por: fecalismo, artrópodos, transfusión, vía transplacentaria, contacto directo de mucosas y por vía respiratoria (Romero, 1999).

En el caso específico de *Giardia*, éste es un parásito protozoario que habita el tubo digestivo de vertebrados y produce la enfermedad conocida como giardiosis. Se han encontrado en el hombre, monos, varias especies de roedores, perros, gatos, bueyes, caballos, cabras; muchas especies de aves, anfibios, váranos y peces. *Giardia intestinalis* (También llamada *Giardia duodenalis* y *Giardia lamblia*), afecta al hombre y presenta en la actualidad una prevalencia creciente tanto en países tropicales como no tropicales (Goldsmith, 1995; Romero, 1999). Además, *G. intestinalis* afecta predominantemente a niños causando el síndrome de mala absorción.

El fármaco de elección en el tratamiento de la giardiosis es el metronidazol. Sin embargo, hay reportes de falla terapéutica, la cual puede deberse, por un lado, a que los pacientes no completan la terapia debido principalmente a los efectos secundarios que ocasiona el metronidazol y por otro lado, a la resistencia de cepas de *G. intestinalis* al fármaco. Se ha reportado un 20% de resistencia de *G. intestinalis* al metronidazol (Upcroft y Upcroft, 2001).

Una alternativa en el tratamiento de giardiosis ha sido el empleo de los bencimidazol-2-carbamatos, como el albendazol y el mebendazol que han resultado ser más activos “*in vitro*” que el metronidazol o tinidazol contra trofozoítos de *G. intestinalis* (Cedillo y Muñoz, 1992; Chávez et al., 1992). Además, presentan pocos efectos laterales cuando se usan como agentes antihelmínticos, antiprotozoarios y no afectan la flora intestinal normal. Los ensayos clínicos, han demostrado que el albendazol es tan efectivo como el metronidazol en el tratamiento de la giardiosis (Rodríguez et al., 1999).

Actualmente la nitazoxanida ha sido empleada en el tratamiento de la giardiosis. Este fármaco es un antiparasitario de amplio espectro efectivo contra protozoarios y helmintos intestinales, además de algunas bacterias aerobias y anaerobias. A la fecha no se ha reportado el desarrollo de resistencia a este fármaco en *G. intestinalis*.

En un estudio realizado en Colima (México), la nitazoxanida tuvo la mayor eficacia de erradicación en el tratamiento de *Hymenolepis nana* (90-100%) y en el tratamiento de *G. intestinalis* (56.2-73.9%). Los resultados con quinfamida y mebendazol fueron un poco inferiores a los mostrados con la nitazoxanida. También se mostró una erradicación de parasitosis únicas del 70.8% y una erradicación de parasitosis múltiples del 79.2% (Gutiérrez et al., 2002).

Considerando la aparición de resistencia en los parásitos a los fármacos empleados, resulta de interés contar con nuevos antiparasitarios, por lo que es posible considerar a la nitazoxanida como molécula líder y realizar diferentes sustituciones en diferentes posiciones de la molécula base con la finalidad de realizar estudios de estructura-actividad que lleven a la obtención de moléculas de amplio espectro de actividad, con mejores características fisicoquímicas y que no tengan efectos secundarios.

3. ANTECEDENTES

La parasitología ha estado presente desde épocas muy remotas, se menciona así el famoso papiro de Ebers (1600 antes de J.C.) que describe un gusano, probablemente el céstodo de los bovinos (*Taenia saginata*), como patógeno del hombre y prescribe como tratamiento para sacarlo la infusión de corteza de granada. También se menciona a Moisés que recibió instrucción médica de los sacerdotes egipcios; además, dictó leyes sanitarias para protegerse contra las plagas transmitidas por insectos y contra la carne animal infectada (Walter y Davies, 1984).

En Grecia, en tiempo de Aristóteles se conocían los céstodos. Hipócrates diagnosticó el quiste hidatídico y describió una técnica para extirparlo del cuerpo humano. El médico persa Avicena (981-1037) descubrió gusanos que probablemente eran: *Ascaris lumbricoides*, *Taenia saginata*, *Enterobius vermicularis* y posiblemente también *Ancylostoma duodenale* (Walter y Davies, 1984).

Más adelante se publicó en 1684, el primer libro dedicado a la parasitología por Redi, en el cual incluyó descripciones de los órganos reproductores de *Ascaris lumbricoides* y de los huevos del parásito. Goldfuss en 1817, usó por primera vez el término **protozoo**, al cual Siebold le dió sentido moderno en 1845 (Walter y Davies, 1984).

También durante la década de 1940, Stoll estimaba que 150 millones de personas deberían estar infectadas por *Giardia intestinalis*, 30 millones por *Entamoeba histolytica*, 100,000 por *Balantidium coli* y 39 millones por *Taenia saginata*. En esos años la población era inferior a este número de personas, lo cual se explicaba por la existencia de multiparasitismo, es decir, más de un parásito presente en un individuo (Walter y Davies, 1984; Romero, 1999).

Tay et al., en 1977, reportaron la frecuencia de enfermedades parasitarias en 20 años. Aunque estos datos no reflejan la situación de todos los Estados de la República Mexicana, se estimó que de cada 100 mexicanos, existen 19 con giardiosis y 16 con amibiosis. Por esos años se suman los trabajos realizados por Martuscelli en la población asistente al Hospital Pediátrico del Centro Médico Nacional (IMSS), en los cuales se reporta un 20% de giardiásicos, más de 10% con amibiosis y 40% de los niños con tricocefalosis, uncinariosis y ascariosis (Romero, 1999).

La Dirección General de Estadística Informática y Evaluación, en el Anuario Estadístico de 1995-2000, en el capítulo segundo y tercero, reservado al tema “Daños a la Salud” (Tabla 1), refiere el número de individuos afectados por enfermedades de notificación obligatoria, informados por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica. En la Tabla 2, se presentan las cifras de individuos infectados con *Giardia*, *Entamoeba* y helmintos en general, en los diferentes Estados de la República Mexicana. Esta información pone en evidencia que tanto la amibiosis como la giardiosis representan un problema de salud pública en nuestro país.

Tabla 1.- Número de individuos infectados con diferentes parásitos en el período de 1995-2000.

PARASITOSIS	TOTAL DE CASOS	TASA POR 100,000 HBTS
Amibiosis intestinal	1,106,364	1,274.98
Absceso Hepático Amibiano	3,074	3.54
Ancilostomiosis y Necatoriosis	3,420	3.94
Ascariosis	469,951	527.22
Giardiosis	76,577	88.25
Oxiuriasis	152,499	175.74
Teniosis	9,495	10.94
Cisticercosis	691	0.70
Tricuriosis	10,468	11.83
Marcadas como otras parasitosis intestinales	123,308	142.10
Otras infecciones intestinales	1,834,283	3,266.26

Fuente: SS-EPI-11 Dirección General de Epidemiología.

Tabla 2.- Número de individuos con giardiosis, amibiosis y helmintosis en el período 1995-2000 en los diferentes Estados de la República Mexicana.

ESTADO	GIARDIOSIS, AMIBIOSIS	HELMINTIOSIS	TASA POR 100,000 HBTS*
Aguascalientes	13,083	6,254	1,642.31
Baja California	8,770	1,353	468.58
Baja California Sur	10,454	1,180	3,043.75
Campeche	10,020	8,915	1,767.31
Coahuila	18,717	6,485	888.82
Colima	18,714	31	4,046.72
Chiapas	25,822	16,056	754.46
Chihuahua	11,498	5,094	431.09
Distrito Federal	51,297	31,580	918.64
Durango	9,130	4,416	639.20
Guanajuato	35,841	11,135	838.80
Guerrero	42,123	38,497	1,518.18
Hidalgo	25,993	14,748	1,292.33
Jalisco	80,841	28,708	1,423.24
Estado de México	132,065	36,100	1,222.72
Michoacán	36,573	19,530	963.03
Morelos	44,156	22,150	3,394.68
Nayarit	33,488	14,495	3,806.72
Nuevo León	46,680	13,289	1,396.89
Oaxaca	52,631	29,605	1,644.18
Puebla	38,008	24,462	859.99
Querétaro	23,492	8,183	2,083.27
Quintana Roo	12,561	14,418	2,630.45
San Luis Potosí	28,421	16,487	1,329.79
Sinaloa	48,851	18,362	2,088.28
Sonora	13,079	6,768	677.45
Tabasco	48,246	54,165	3,025.95
Tamaulipas	22,383	27,758	922.58
Tlaxcala	24,559	12,353	2,995.59
Veracruz	57,794	96,986	2,041.85
Yucatán	44,427	33,465	5,140.52
Zacatecas	39,231	15,375	2,894.47

*En esta tasa, se incluyen helmintos y protozoarios.

Fuente: SS-EPI-11 Dirección General de Epidemiología.

De acuerdo a los datos aportados por la Dirección General de Epidemiología (Tablas 1 y 2), la giardiosis tiene niveles elevados dentro del territorio mexicano; tanto en Estados de la República Mexicana donde el clima es cálido, como en aquellos cuyo clima es húmedo.

Cabe señalar que el Estado de México, es aquel estado que presenta una mayor cantidad de individuos con giardiosis y amibiosis intestinal; seguida de Veracruz, Oaxaca, Tabasco, Nuevo León, Yucatán y Guerrero. Además, de ser una de las parasitosis más elevadas dentro del período 1995-2000, junto con amibiosis intestinal, ascariosis, oxiuriasis, tricuriasis y otras infecciones intestinales. Lo cual, indica que este protozooario es uno de los parásitos patógenos más cosmopolitas y comunes dentro de la población de la República Mexicana.

Además, hay que señalar que las amibiosis representan un índice elevado, debido a que dentro de este grupo; se encuentran tanto la *Entamoeba histolytica* que es un parásito como la *Entamoeba dispar* que es un comensal.

4. GENERALIDADES DE LOS PROTOZOARIOS

Las enfermedades parasitarias, tanto las protozoosis como las helmintiosis, siguen siendo uno de los principales problemas de salud pública en el mundo y principalmente en países en vías de desarrollo. En nuestro país, la población infantil es la que se ve mayormente afectada por infecciones helmínticas, lo cual ha llevado a las campañas de desparasitación nacional como lo recomienda la OMS. Por otro lado, llama la atención que en México, para las infecciones causadas por protozoarios no se han implementado campañas similares (<http://www.ssa.gob.mx>)

Los protozoarios son animales unicelulares, eucariotas, la mayor parte son de vida libre, algunos actúan como parásitos adaptándose a las condiciones de vida que le provee su hospedero. Su tamaño es variable entre 2 y 100 μm , el protoplasma está rodeado por una membrana celular y contiene numerosos organelos, como un núcleo rodeado por membrana, retículo endoplásmico, gránulos de almacenamiento de nutrientes y vacuolas, tanto contráctiles como digestivas. Los órganos de motilidad varían desde extensiones citoplasmáticas simples hasta estructuras más complejas, como cilios o flagelos. La reproducción se hace en general por fisión binaria simple, aunque el ciclo vital de algunos protozoarios incluye fases de fisión múltiple, alternando con un período de reproducción sexual (Boreham et al., 1988). Casi todos los protozoarios poseen un metabolismo anaerobio, el O_2 que pudieran llegar a necesitar, lo obtienen a partir de acción enzimática. Algunos protozoarios presentan 2 fases, la de quiste y la de trofozoíto; la primera es necesaria para la sobrevivencia.

Según la nueva clasificación, son considerados como un subreino del reino Protista y son reconocidos 7 Phyla en el subreino Protozoa: Sarcomastigophora, Labyrinthomorpha, Apicomplexa, Microspora, Acetospora, Myxospora y Ciliopora.

Las infecciones causadas por protozoarios intestinales del tipo *Entamoeba histolytica* y *Giardia intestinalis* continúan siendo un problema de salud pública. Estos parásitos son los agentes causales de la amibiosis intestinal, del absceso hepático amibiano y de la giardiosis respectivamente.

5. GENERALIDADES DE *Giardia intestinalis*

Giardia ha sido ubicada en la familia Sarcocystidophora, clase Zoomastigophorea, y ha sido clasificada en el orden Diplomonadida. El criterio morfológico ha dividido el género *Giardia* en tres especies: *Giardia agilis*, *Giardia muris* y *Giardia intestinalis*. *Giardia agilis*, se diferencia porque el cuerpo del trofozoito mide 20 x 4.5 μm de largo y ancho respectivamente, el cuerpo parabasal tiene forma de lágrima colocado en paralelo a lo largo del axostilo; infecta principalmente anfibios. *Giardia muris*, se caracteriza por tener dos pequeños cuerpos centrales parabasales en forma de pera, los trofozoítos miden aproximadamente 10 μm de largo por 7 μm de ancho; infecta roedores, pájaros y reptiles. *Giardia intestinalis* también llamada (*Giardia lamblia* o *Giardia duodenalis*), se distingue por su cuerpo parabasal en forma de coma, descansa transversalmente a través del axostilo, usualmente se observan dos cuerpos parabasales aunque algunas veces solamente se encuentra uno. La morfología representativa de este tipo difiere entre el animal hospedero variando de 11-16 μm de largo y 5-9 μm de ancho; infecta una variedad de mamíferos, incluyendo al humano, también pájaros, reptiles, ente otras especies.

G. intestinalis, es un protozoario flagelado del tracto gastrointestinal. Este parásito se presenta en las fases de trofozoíto y de quiste (Figura 1). El trofozoíto es redondo en su parte anterior y afilado en la parte posterior, es convexo dorsoventralmente y en su posición ventral está provisto de una cavidad superficial y ligeramente ranurada (disco ventral) que ocupa casi toda la mitad anterior del cuerpo del parásito. El tamaño es variable entre límites muy amplios (de 9 a 21 μm de largo por 5 a 15 μm de ancho y de 2 a 4 μm de espesor), tiene 2 núcleos que son ovoides y contienen un cariosoma central; además, de tener 4 pares de flagelos que se originan de organelos superficiales en la cara ventral del cuerpo.

Los trofozoítos se dividen mediante un complicado proceso de fisión binaria longitudinal que incluye la división del núcleo, después del aparato neuromotor y el disco ventral, enseguida de la separación del citoplasma, de tal manera que se forman 2 trofozoítos hijos y finalmente estos tienen la capacidad de translación con movimientos lentos, vibratorios y a la vez rotatorios.

Por otra parte, los quistes son ovoides, miden de 8 a 12 μm de largo y 7 a 10 μm de ancho. Tienen un citoplasma granular fino claramente separado de la delgada pared quística, en su forma inmadura poseen 2 núcleos y los maduros 4 (Chin, 2001).

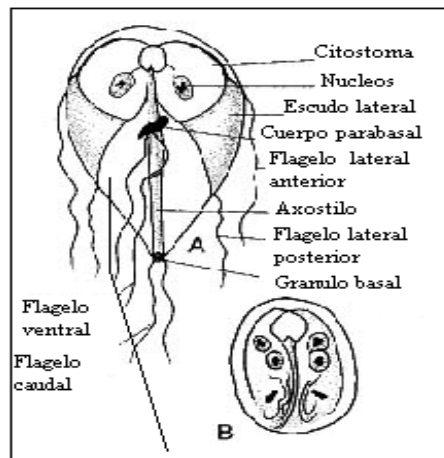


Figura 4. Estructuras del (A) trofozoíto y (B) quiste de *G. intestinalis*.

Fuente: www.merksource.com/pp/us/cns/cns_hl_dolands

Los trofozoítos de *G. intestinalis* se localizan en el intestino delgado, adheridos a la mucosa, principalmente en el duodeno y yeyuno; además, aquellos que caen a la luz intestinal dan origen a los quistes. Estos últimos son eliminados en las materias fecales y pueden permanecer viables en el suelo húmedo o en el agua por varios meses. La giardiosis ocurre por la ingestión de los quistes presentes en el agua o alimentos contaminados y por la vía oral-fecal (manos o fomites); una vez ingeridos los quistes comienza la exquistación (paso 3 y 4; Figura 2) en el intestino delgado, pudiéndose observar así la presencia de los trofozoítos que se adhieren a la mucosa intestinal mediante el disco ventral; aquellos trofozoítos que continúan su ruta comienzan a enquistarse (Paso 5; Figura 2) cuando llegan al colon y finalmente éstos son eliminados en las heces pudiendo contaminar otra vez alimentos, agua o bien por la vía oral-fecal volver a iniciar su ciclo de vida e infectar a otro hospedero (Figura 2) (Romero, 1999; Chin, 2001).

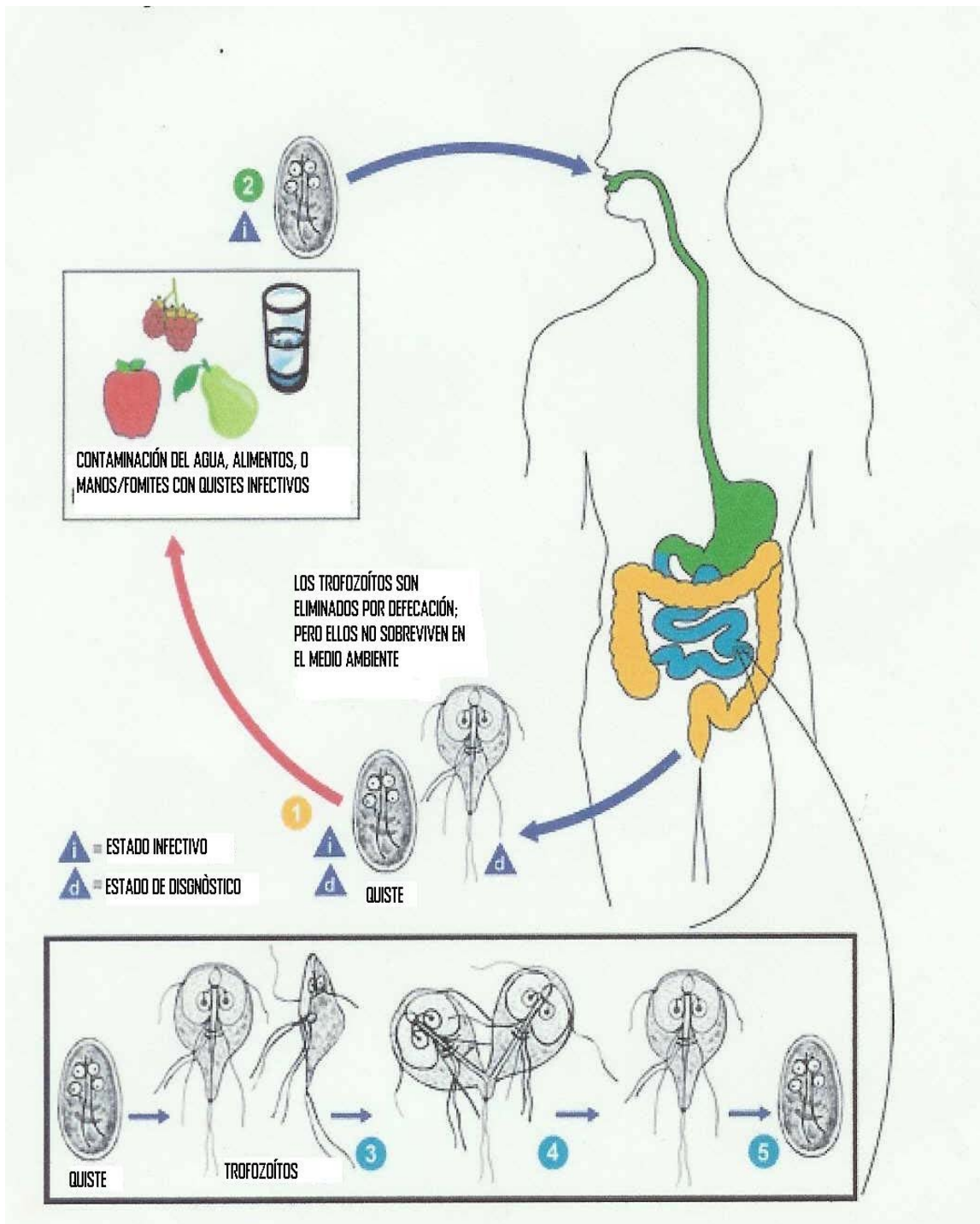


Figura 2.- Ciclo de vida de *Giardia intestinalis*

Fuente: DPDX\HTML\Giardiasis.htm

6. GIARDIOSIS

Algunas de las manifestaciones clínicas que se presentan en la giardiosis se sitúan de acuerdo al grado de daño provocado en el organismo, por lo cual, las **formas leves** se caracterizan por dolor epigástrico de poca intensidad y alteración en el ritmo de la defecación. Las **formas moderadas** se manifiestan por un cuadro de duodenitis, con dolor frecuente en región epigástrica, a veces náuseas, flatulencia y diarrea. La **giardiosis severa** presenta además de la duodenitis, esteatorrea o lientería con heces abundantes, pastosas o líquidas de muy mal olor, lo que se asocia con flatulencia. (Romero, 1999; Chin, 2001). Existen también individuos asintomáticos que eliminan quistes en las heces.

Giardia intestinalis habita en el duodeno y yeyuno superior donde el pH alcalino es favorable para su desarrollo e invasión. El principal mecanismo de patogénesis en la giardiosis, se debe a la acción mecánica de los trofozoítos sobre la mucosa del intestino delgado. Esta acción se hace por fijación de los trofozoítos en la pared intestinal por medio del disco ventral; obstruyendo una pequeña porción de la superficie y si a esto se agrega la irritación que produce el parásito adherido en la pared, ocasionando así la producción de moco, que también se queda en la superficie. Generándose así, una doble obstrucción para la absorción (por un lado, los trofozoítos adheridos a la superficie, y por otro, el moco que se esta produciendo). Sin embargo, sí el número de trofozoítos es elevado pueden presentarse atrofas parciales de las microvellosidades (causando deficiencia de disacaridasas como lactasa y xilasa, actividad de la enteropeptidasa e hidrolasa peptídica y absorción de grasas y vitamina B₁₂), hipertrofia críptica, daño de células epiteliales hasta llegar a presentar una inflamación que ocasiona la presencia del síndrome de mala absorción en el hospedero infectado, principalmente niños.

El diagnóstico de esta enfermedad anteriormente, se realizaba empleando la **cápsula de Beal o de la cuerda de nylon**, que es una cápsula de gelatina como la de los fármacos, pero en su interior tiene un hilo de nylon y de algodón. El hilo se traga en ayunas y se deja todo el día, se pide al paciente que camine, que se acueste un rato del lado derecho para ayudar así que llegue al duodeno y 4 ó 5 horas después se extrae el hilo que se ha pegado en la mejilla del paciente; si el líquido es amarillo verdoso es que ha llegado al duodeno, a continuación se exprime y el material se lleva al microscopio en un examen directo en fresco para observar la presencia de trofozoítos. Actualmente se realiza por **fluoroscopia**, mediante la cual, se descubre hipermotilidad del duodeno y yeyuno. Las **radiografías** revelan en algunos casos defectos en la mucosa (esta última técnica es empleada para observar la presencia de trofozoítos y quistes). El **estudio microscópico del líquido duodenal** obtenido por sondaje, puede demostrar la presencia de los trofozoítos. También se puede emplear la **biopsia intestinal** que muestra los cambios en las vellosidades y ocasionalmente permite ver los parásitos.

Sin embargo, si existe una baja cantidad de quistes, las técnicas más empleadas actualmente son **los métodos coproparasitológicos de concentración por flotación** (Método de Faust, Willis y Ferreira), que dan excelentes resultados para encontrarlos. Además de algunos **test o pruebas**, que tienen como fundamento técnicas inmunológicas. (Chin, 2001).

A pesar de lo antes mencionado, la diarrea aguda de la giardiosis se puede confundir con aquella causada por patógenos como virus (causantes de cuadros agudos), bacterias y protozoarios. El diagnóstico se sospecha ante la presencia de dolor abdominal superior, distensión, heces con mal olor y flatulencia, con ausencia de moco o sangre.

La diarrea crónica puede semejarse a una amibiosis u otras infecciones por protozoarios intestinales patógenos como *Dientameba fragilis*, *Cryptosporidium sp.* e *Isospora belli* (estos son parásitos oportunistas y sus cuadros son severos), así como también por el nemátodo *Strogylodes stercolaris*, y una enfermedad intestinal inflamatoria o colon irritable. Cuando la giardiosis provoca molestia abdominal superior, sensación urente, pirosis y gorgorismos se debe diferenciar de la úlcera duodenal, hernia hiatal y enfermedades vesiculares y pancreáticas. La diarrea crónica por giardiosis en niños puede ocasionar mala absorción y pérdida de peso (Goldsmith, 1995).

La eosinofilia y síntomas intestinales cuando se presentan juntos, pocas veces se deben a giardiosis, es más frecuente que sean causadas por ancilostomas o por *S. stercolaris*, *D. fragilis* o *I. belli*.

7. TRATAMIENTO

La enfermedad ocasionada por *G. intestinalis* ha sido tratada con medicamentos eficaces que tienen la capacidad de fungir como fármacos antiparasitarios; tal es el caso del tinidazol, quinacrina, furazolidona y metronidazol.

El **Tinidazol**, aunque no se encuentra disponible en Estados Unidos de Norteamérica (E.U.A.), en otros países se ha demostrado que tiene ventajas usándose a dosis únicas; en comparación con otros medicamentos a dosis múltiples, siendo su posología de 2g para adultos y de 30 a 35 mg/kg para niños, además de que es muy bien tolerado. El 10% de los pacientes presentan malestar gastrointestinal leve y cefalea como efectos secundarios, en pocas ocasiones se ha informado de vértigo. Como otros nitroimidazoles no debe tomarse con alcohol, puesto que tiene un efecto similar al disulfiram.

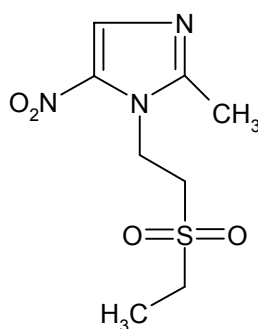


Figura 3: Estructura química del Tinidazol

Fuente: Flores y Armijio, 1992 ; Tomoko et al., 2003.

La **Quinacrina**, es un derivado acridínico que se utilizó ampliamente en la Segunda Guerra Mundial como antipalúdico (Goodman y Gilman, 2003). Su uso actual queda restringido sobre todo en adultos, ya que los niños no la toleran. Este medicamento se intercala en las cadenas del DNA inhibiendo así la síntesis de ácidos nucleicos. Se absorbe bien por vía oral, se distribuye por todos los tejidos y se elimina lentamente por lo que se acumula con facilidad. Es excretado en la orina, donde persiste aún 2 meses después de suspendido el tratamiento.

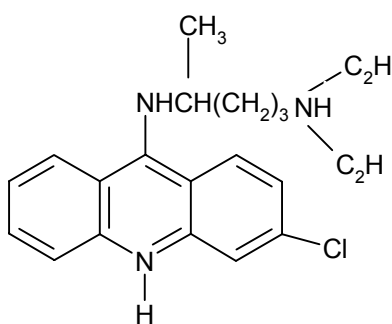


Figura 4: Estructura química de la Quinacrina

Fuente: Flores y Armijio, 1992; Tomoko et al., 2003.

El clorhidrato de quinacrina es muy eficaz contra *G. intestinalis* y con él se logran cifras de curación del 92-95%. Este fármaco está contraindicado en enfermos con psoriasis porque la exacerba y no se debe dar a mujeres embarazadas por riesgo a inducir teratogenia. Puede provocar también anemia aplásica, dermatitis exfoliativa, liquen plano atípico, necrosis hepática y efectos oculares similares a la cloroquina. Además de presentar efectos secundarios tales como cáncer en el tracto respiratorio, desarrollo de lesiones uterinas, embarazo ectópico, amenorrea, mareos, dolor de cabeza, vómito, respuesta psicótica (Flores y Armijio, 1992).

La **Furazolidona**, es un derivado de nitrofuranos aprobado en 1995 por la Food and Drugs Administration (FDA), principalmente para el tratamiento de diarrea, enteritis bacterial y protozoal (Tomoko et al., 2003). La Furazolidona a menudo se prescribe para niños por que se encuentra disponible en una presentación líquida de sabor agradable (Goodman y Gilman, 2003). Este medicamento pertenece al grupo de los nitrofuranos; su espectro abarca *Giardia intestinalis*, bacterias Gram positivas y negativas tales como estafilococos, enterococos, *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* (Litter, 1984; Goldsmith, 1995; Romero, 1999; Rang, 2000).

Este fármaco tiene un mecanismo de acción estructural y funcional similar a los inhibidores de Monoamino Oxidasa (MAO) y la forma reducida de la furazolidona interfiere con algunos constituyentes celulares del protozoario como su DNA (Flores y Armijio, 1992).

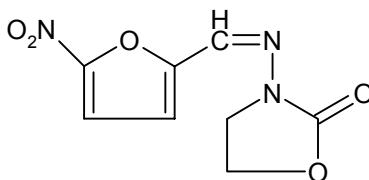


Figura 5: Estructura química de la Furazolidona

Fuente: Flores y Armijio, 1992; Tomoko et al., 2003.

El porcentaje de erradicación parasitaria de la furazolidona comprende un 80-89%. Sin embargo, al igual que otros medicamentos también se presentan algunos efectos adversos como disturbios gastrointestinales, anemia hemolítica, reacciones de hipersensibilidad y coloración de la orina.

La introducción de compuestos nitroheterocíclicos en 1950 y 1960 anunció una nueva era en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram positivas y negativas, además, de actividad sobre un rango de parásitos protozoarios patógenos. El antibiótico amomizina (2-nitroimidazol), aislado en Japón de un estreptomiceto, fue el primer nitroimidazol descubierto; el cual fue la referencia base para la síntesis del nitroimidazol "Metronidazol".

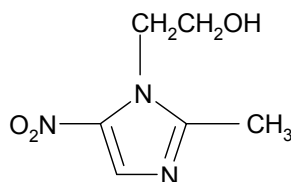


Figura 6: Estructura química del Metronidazol

Fuente: Flores y Armijio, 1992; Tomoko et al., 2003.

El **Metronidazol**, es un profármaco que requiere activación reductiva del grupo nitro por los microorganismos susceptibles. Su toxicidad selectiva hacia microorganismos patógenos anaerobios y microaerofílicos, como los protozoarios amitocondriados, *T. vaginalis*, *E. histolytica* y *G. intestinalis*, además de diversas bacterias anaerobias, se deriva de su metabolismo de energía que difiere del de las células aerobias (Upcroft et al., 1999). Estos microorganismos, al contrario de sus homólogos aerobios, contienen compuestos de transporte de electrones, como ferredoxinas, proteínas Fe-s pequeñas que tienen un potencial de oxidorreducción lo suficientemente negativo para donar electrones al metronidazol. La transferencia del electrón único forma un radical nitro muy reactivo que mata a microorganismos susceptibles por mecanismos mediados por radicales que se dirigen al DNA y tal vez a otras biomoléculas vitales.

El metronidazol se recicla mediante mecanismos catalíticos. Sin embargo, la pérdida del electrón del metabolito activo regenera el compuesto original. Las concentraciones cada vez más altas de O_2 inhiben la citotoxicidad inducida por el metronidazol, por que el O_2 compite con este último par de electrones generados por el metabolismo de energía. Así, el O_2 puede tanto disminuir la activación reductiva del metronidazol, como aumentar el reciclado del fármaco activado. Los microorganismos anaerobios o microaerofílicos susceptibles al metronidazol obtienen energía a partir de la fermentación oxidativa de cetoácidos como el piruvato. La descarboxilación del piruvato, catalizada por la oxidoreductasa de piruvato-ferredoxina (PFOR), produce electrones que reducen a la ferredoxina (Figura 7), que dona mediante mecanismos catalíticos sus electrones hacia el metronidazol (Upcroft y Upcroft 2001; Goodman y Gilman, 2003).

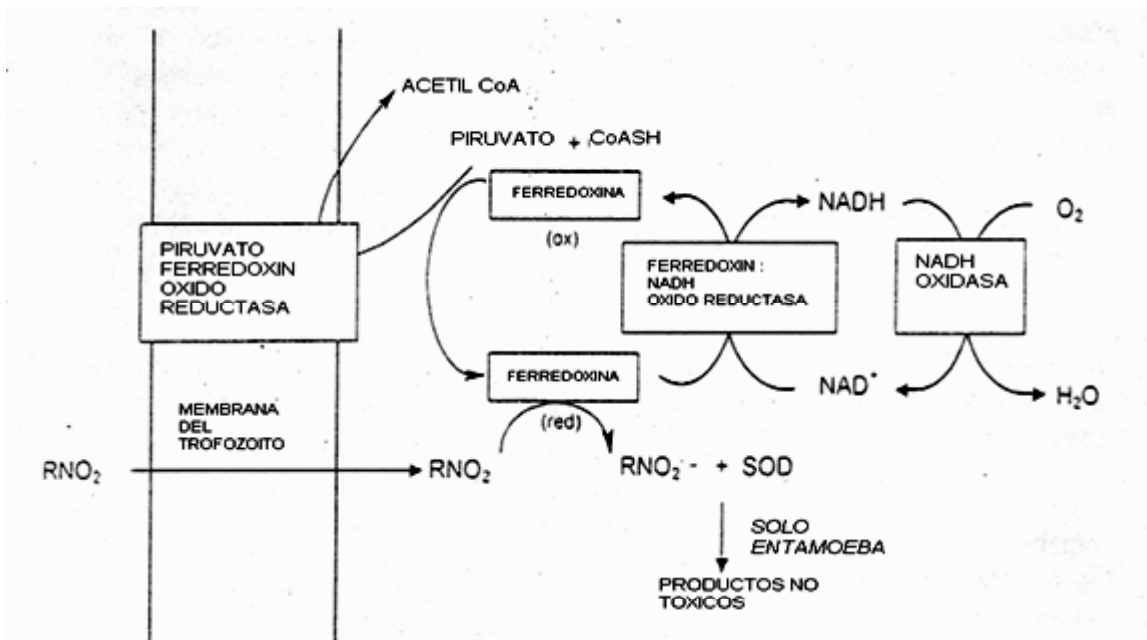


Figura 7.- Mecanismo propuesto para la activación del metronidazol por *G. intestinalis* y *E. histolytica*.

Fuente: Upcroft y Upcroft, 2001.

La dosis en caso de giardiosis en adultos es de 250-500 mg por vía oral y en niños de 5mg/kg en 3 tomas.

Una limitante actual en el tratamiento de la giardiosis con metronidazol son sus efectos secundarios que en muchas ocasiones llevan a la falla terapéutica por el abandono del tratamiento. Otra causa de la falla terapéutica observada con el metronidazol, es la presencia de parásitos resistentes al fármaco, la cual ha sido demostrada en aislados de *G. intestinalis* provenientes de pacientes refractarios al tratamiento (Johnson, 1993; Upcroft et al., 1996; Boreham et al., 1998; Upcroft y Upcroft, 2001).

Un fármaco recientemente utilizado en el tratamiento de la giardiosis es el **Albendazol**, que es un carbamato de bencimidazol que se ha utilizado a nivel mundial, de manera primaria contra diversos nemátodos intestinales y de tejidos, pero también contra formas larvarias de ciertos céstodos.

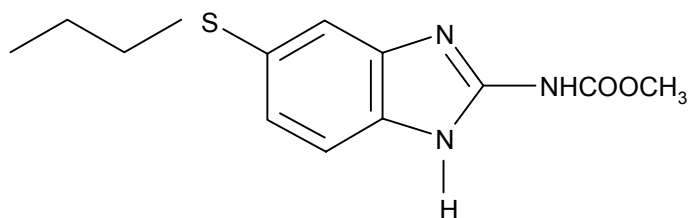


Figura 8: Estructura química del Albendazol

Fuente: Flores y Armijio, 1992; Tomoko et al., 2003.

El albendazol también tiene cierta eficacia contra protozoarios anaerobios como *T. vaginalis*, *Entamoeba histolytica* y *G. intestinalis*. Este fármaco inhibe el crecimiento “*in vivo*” de los trofozoítos de *G. intestinalis* y su adhesión a cultivos de células epiteliales intestinales a través de cambios conformacionales en la formación de microtúbulos y microlistones en el disco ventral de los trofozoítos. El albendazol se une a la β -tubulina del parásito inhibiendo de esta forma la polimerización de los microtúbulos, con una cascada de otros efectos metabólicos resultado de ellos (Upcroft et al., 1999). El primer estudio realizado en humanos fue el de Bangladesh, donde el promedio de erradicación parasitaria fue de 62-95% comparado con el 97% del metronidazol. El albendazol eventualmente es aceptado en lugar del metronidazol particularmente en casos de fallas con este último (Upcroft y Upcroft, 2001). Como en el caso del metronidazol, la resistencia al albendazol ha sido reportada “*in vitro*” (Linguist, 1996; Upcroft et al., 1996); sin embargo, tal resistencia se desarrolla más fácilmente en cepas resistentes a la furazolidona, además estas cepas también presentan resistencia a múltiples fármacos.

Al evaluar la actividad “*in vitro*” del albendazol y mebendazol contra trofozoítos de *G. intestinalis*, se observó que estos fármacos fueron 30 a 50 veces más activos que el metronidazol y 4 a 40 veces más activos que la quinacrina; además, a concentraciones bajas de mebendazol se logró tener una actividad bloqueadora de la reproducción y no parasiticida sobre los trofozoítos de *G. intestinalis*, lo que implica la existencia de una reacción reversible hacia la molécula blanco del parásito de *G. intestinalis* (Thomas et al., 1990).

Cedillo y Muñoz (1992) reportaron para *Giardia intestinalis* una concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) del albendazol de 0.01mg/L y una concentración mínima letal (CML) de 0.04mg/L, en comparación con el mebendazol que fue de 0.06mg/L y de 0.5mg/L respectivamente; demostrando así, que tanto el albendazol como el mebendazol son excelentes candidatos para uso clínico.

En un estudio realizado en pacientes adultos con síntomas de giardiosis tratados con albendazol (grupo 1) y metronidazol (grupo 2), se observó al realizar un examen fecal a los 7 días de post-tratamiento que ninguno de los 2 grupos presentó quistes de *G. intestinalis*; pero, a los 15 días de post-tratamiento, 1 paciente fue positivo para *G. intestinalis* con albendazol (grupo 1) y 9 pacientes positivos para el metronidazol (grupo 2), demostrando así que el albendazol es más efectivo que el metronidazol en giardiosis en adultos, además, de presentar menos efectos laterales que el metronidazol (Karabay et al., 2004).

Otros derivados bencimidazólicos (IRE 6-A e IRE 7-B) han mostrado actividad giardicida “*in vitro*” comparable al albendazol (Jiménez et al., 2003) sugiriéndose como alternativa en el tratamiento de cepas de *G. intestinalis* resistentes al metronidazol.

8. NITAZOXANIDA

Desde 1996, los laboratorios Columbia, introdujeron en México un nuevo medicamento alternativo para el tratamiento de la giardiosis y cuyo nombre comercial es Daxon (nitazoxanida), el cual ha presentado una acción antiparasitaria de amplio espectro (Fox y Saravolatz, 2005).

De igual forma, los laboratorios Romark, en diciembre del 2002 obtuvieron la autorización de la FDA para comercializar Alina (nitazoxanida), como una suspensión oral para el tratamiento de niños con diarrea causada por los microorganismos *Cryptosporidium parvum* y *Giardia intestinalis*. En julio del 2004, la nitazoxanida fue aprobada para el tratamiento de diarrea causada por *Giardia intestinalis* en adultos. Alina y Daxon, son los únicos medicamentos aprobados por la FDA para infecciones de *Cryptosporidium* y las primeras innovaciones en el ámbito de *G. intestinalis* en más de 40 años (Fox y Saravolatz, 2005).

La nitazoxanida [2-(acetililoxi)-N-(5-nitro-2-tiazolil) benzamidal] ó N-2-(5-nitrotiazolil) acetilsalicimida, es un derivado del 5-nitrotiazol, sintetizado por primera vez por Rossignol y Cavier en 1976 (Boletín Informativo de Laboratorios Columbia, 1996; Ximénez et al., 2000).

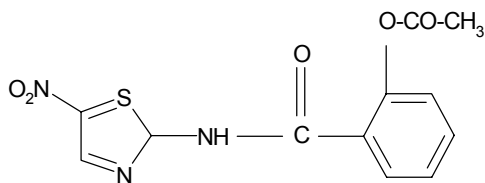


Figura 9: Estructura química de la Nitazoxanida

Fuente: Flores y Armijio, 1992; Tomoko et al; 2003.

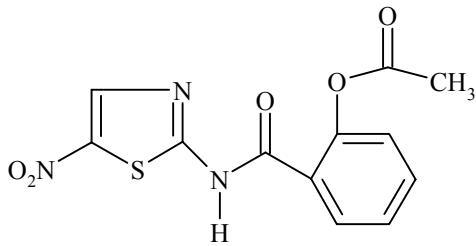
En esta molécula de estructura nitrotiazol, un átomo de sulfuro reemplaza al de nitrógeno en el anillo, siendo el responsable de algunas detoxificaciones en los nitroderivados de esta familia, de esta manera se aumenta su espectro, su eficacia y se disminuye la toxicidad (Boletín Informativo de Laboratorios Columbia, 1996; Ximénez et al., 2000).

La nitazoxanida es un agente antiparasitario de amplio espectro efectivo contra protozoarios y helmintos intestinales; además, de algunas bacterias anaerobias y aerobias. Este fármaco fue primeramente reportado como un agente anticestódico en ovejas, perros y gatos, con poca eficacia contra nemátodos tales como: *Uncinaria stenocephala*, *Trichuris vulpis* en perros y es ineficaz contra *Syphacia obvelata* en ratón. Rossignol y Cavier reportaron por primera vez en 1976, que a una dosis de 50 mg/kg de peso, fue 100% efectiva en el tratamiento de *Hymenolepis nana* var. *fraterna*, en ratones. Euzeby et al., en 1980 obtuvieron un 100% de cura tratando infecciones por *Dipylidium caninum* y *Taenia pisiformis* en perros, *Taenia taeniaformis* en gatos y *Moniezia expansa*, *Avitellina centripunctata*, *Stilesia globipunctata* y *Thysaniezia ovilla* en ovejas, todas con dosis únicas orales de 75-200 mg/kg.

En la definición terapéutica de la nitazoxanida, se ha estudiado el efecto sobre los helmintos, nemátodos, céstodos y tremátodos que infectan al humano, encontrando que interfiere con el metabolismo de la glucosa del parásito, por alteración de sustancias secretoras del Aparato de Golgi, secreción de acetilcolinesterasa y el consumo de la glucosa del parásito; creando así un agotamiento en el glucógeno y una acidosis láctica en el parásito, lo que ocasiona, finalmente la muerte de éste (Boletín Informativo de Laboratorios Columbia, 1996).

La actividad de la nitazoxanida contra organismos anaerobios, ha sido estudiada (Sisson et al., 2002; Gilles y Hoffman, 2002), demostrándose que ésta, se debe a la competencia existente entre la nitazoxanida y los NADP liberados al llevarse a cabo la descarboxilación oxidativa del piruvato, por los electrones equivalentes; impidiendo la reducción del NADP a NADPH y por lo tanto, inhibiendo enzimas vitales del metabolismo energético como la PFOR. A diferencia del metronidazol, la nitazoxanida no induce mutaciones en el DNA.

En cuanto a la farmacocinética y farmacodinamia de este fármaco; se puede mencionar que se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal, aproximadamente 48 h post-dosis. Es metabolizada por la carboxil-esterasa del intestino y esterases del plasma, en su derivado desacetilado [Tizoxanida], el cual se puede titular en sangre y orina (Figura 10 y Figura 11). La vida media se calcula en 1.11 h, se une altamente a proteínas plasmáticas y la proporción no unida es muy baja (Olea Rodríguez, 1999).

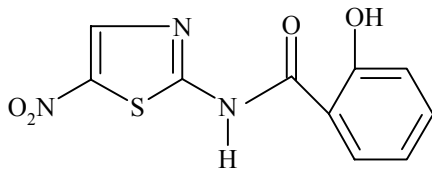


NITAZOXANIDA

La nitazoxanida no es identificada en plasma, orina y heces humanas



La tizoxanida es identificada en plasma orina, bilis y heces de humanos



TIZOXANIDA

Metabolitos menores: Acido salicílico, sulfato de tizoxanida, y trazas de hidroxil-tizoxanida en orina. Salicilato en heces.



GLUCORÓNIDO DE TIZOXANIDA

El glucorónido de tizoxanida es identificado en plasma, orina y bilis del hombre

Figura 10.- Resumen del metabolismo de la nitazoxanida en el organismo humano

Fuente: Fox y Saravolatz, 2005.

La excreción de nitazoxanida por vía renal es de 38% y por heces 52%. Los metabolitos (Figura 11) encontrados en plasma y en orina después de la administración de nitazoxanida son: desacetil-nitazoxanida o tizoxanida (DN ó TIZ), aminonitrotiazol (ANT), ácido salicílico (S), ácido salicilúrico (SU) y ácido gentísico (G) (Stockis et al., 1996; Yamamoto et al., 1999).

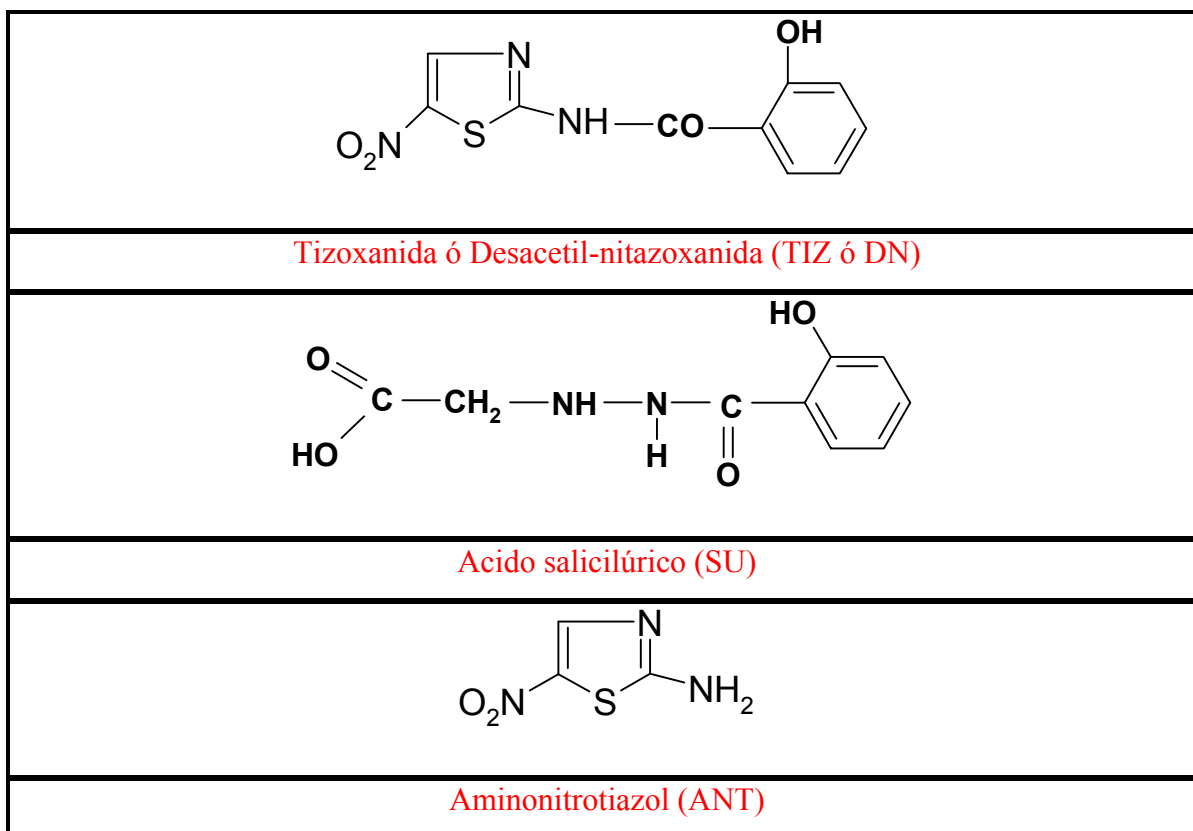


Figura 11.- Algunos metabolitos de la nitazoxanida

Fuente: Stockis et al., 1996; Yoshimasa et al., 1999.

En caso de una sobredosificación de la nitazoxanida puede inducirse el vómito y administrarse antiácidos de hidróxido de aluminio con magnesio; además al interactuar con anticoagulantes cumarínicos puede incrementar los niveles plasmáticos de éstos y prolongar el tiempo de protrombina (Índice Farmacéutico Medicohompage.com: nitazoxanida_pa).

En un estudio realizado con 6 voluntarios a los que se les administró de forma oral nitazoxanida, se encontró que en plasma y orina los metabolitos de la nitazoxanida como DN, ANT, S, SU, y G. El metabolito más importante y activo de la nitazoxanida, la tizoxanida (TIZ ó DN), se encontró a una concentración máxima de 1.9 mg/L [rango 1.1-2.5 mg/L] (Stockis et al., 1996).

Cedillo Rivera et al. (2002), evaluaron el efecto “*in vitro*” de la nitazoxanida contra trofozoítos de *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis*. Las CI_{50} y CI_{90} obtenidas para el fármaco contra estos 3 parásitos se muestran en la Tabla 3. Como se puede observar la nitazoxanida fue más activa que el metronidazol contra estos 3 parásitos. Por microscopía electrónica se observó que este fármaco no ocasionaba cambios ultraestructurales en el disco ventral de *G. intestinalis* y en el caso de *T. vaginalis* y *E. histolytica* se observó la formación de enormes vacuolas y redistribución de ellas dentro del citoplasma; además de ocasionar cambios en la membrana plasmática de los trofozoítos de estos tres protozoarios. Otros cambios estructurales observados en los trofozoítos de *G. intestinalis* tratados con la nitazoxanida incluyen: pérdida del complejo vacuolar de la membrana dorsal, aumento del volumen (dando a los trofozoítos forma globosa), glucocálix y citoplasma menos electrodenso (Ponce-Macotela et al., 2001; Elmendorf et al., 2003).

También se han desarrollado estudios sobre los cambios estructurales causados por la nitazoxanida en quistes de *G. intestinalis*; observando por microscopía electrónica de transmisión, la presencia de áreas con alto contenido granular y una ubicación inusual de los componentes del citoplasma en el espacio peritrófico, sugiriendo una posible ruptura de la membrana (Bernal et al., 2004).

En un estudio realizado con 546 pacientes con infecciones de helmintos y protozoarios en Egipto; administrándoles nitazoxanida y basados en la reexaminación fecal después de 4 días de terminar el tratamiento, la erradicación fue de 81% (127-156 pacientes), 94% (130-139 pacientes) y 77% (10-13 pacientes) para amibiasis, giardiosis y balantidiosis respectivamente.

La nitazoxanida fue bien tolerada y solo 14.5% de los pacientes presentaron algunos efectos adversos tales como dolor abdominal leve, náusea, mareo, vómito, cefalea y debilidad (Abaza et al., 1998).

En la Unidad de Medicina Familiar No. 91 de la Ciudad de México, se realizó un estudio con 272 niños con una edad promedio entre 2 a 14 años infectados con helmintos y protozoarios. Para confirmar las parasitosis, se realizaron exámenes de muestras fecales con técnicas coproparasitoscópicas como Ferreira y tinciones como la de Kinyoun. Al ser tratados con nitazoxanida 121 pacientes, se obtuvo que aproximadamente el 84% de parásitos protozoarios y el 95% de helmintos son eliminados completamente de esos pacientes (Díaz et al., 2003).

Otro estudio realizado en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM, se examinaron 1824 muestras fecales de adultos y niños, de los cuales 246 pacientes adultos y niños, resultaron infectados con protozoarios y helmintos. Al administrarse 7.5mg/kg de nitazoxanida cada 12 h por 3 días consecutivos y examinando las heces fecales en los días 6, 7, 8, 13, 14 y 15 post-tratamiento mediante la técnica de Kato-Katz; se obtuvo de un 71 a 100% de eliminación de *Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, *Giardia intestinalis*, *Blastocystis hominis*, *Isospora belli*, *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *Hymenolepis nana*. Además, sólo el 6.1% presentó algunas reacciones adversas (Romero et al., 1997).

La nitazoxanida como una forma alternativa de tratamiento para la giardiosis, ha sido administrada por periodos prolongados, tanto en pacientes con anemia, enfermedades concomitantes, desnutrición o SIDA, sin mostrar efectos secundarios de importancia. Su eficacia de erradicación parasitaria en casos clínicos varía entre un 70 a un 90%, según las características de cada paciente (Dumbo et al., 1997; Romero, 1999; Rodríguez et al., 1999).

Tabla 3.- Concentración inhibitoria del 50% de crecimiento (CI₅₀) de la nitazoxanida, albendazol y metronidazol contra *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*.

FÁRMACO	CI ₅₀ (µg/mL)	Límites de Confianza	CI ₉₀ (µg/mL)	Límites de Confianza
<i>Entamoeba histolytica</i>				
Nitazoxanida	0.017	0.012-0.022	0.776	0.500-1.004
Albendazol	15.0	10.0-20.0	>20.0	N/A ^a
Metronidazol	0.060			
<i>Giardia intestinalis</i>				
Nitazoxanida	0.004	0.003-0.005	0.067	0.050-0.106
Albendazol	0.010	0.008-0.012	0.020	0.015-0.024
Metronidazol	0.210	0.150-0.270	1.280	0.880-1.680
<i>Trichomonas vaginalis</i>				
Nitazoxanida	0.034	0.025-0.046	2.046	1.020-4.104
Albendazol	0.422	0.419-0.425	3.290	1.805-5.435
Metronidazol	0.037	0.035-0.040	0.169	0.160-0.178

N/A^a no aplica.

Fuente: Cedillo et al., 2002.

Para **amibiosis**, **giardiosis**, tricomoniosis y helmintiosis (ascariosis, hymenolepiosis y trichiuriasis), la dosis recomendada es de 500mg, dos veces al día, por 3 días consecutivos en adultos y en niños es de 7.5 mg/kg de peso cada 12 h por 3 días consecutivos (Ximénez et al; 2000; Indice Farmaceutico Medicohomepage.com). En el caso de facioloris en adultos, la dosis es 500mg, cada 12 h, por 7 días consecutivos y en niños es de 7.5mg/kg, cada 12 h, por 7 días consecutivos. En el caso de los niños, también puede emplearse tabletas dispersables de 200 mg ó suspensión oral con sabor a fresa con una posología de 100 mg por cada 5 mL. Por lo cual, la dosis adecuada es una tableta dispersable o bien, 1 ó 2 cucharaditas según sea el caso; una en la mañana y una en la noche durante 3 días.

Los efectos secundarios presentes al administrar nitazoxanida como una forma de tratamiento de giardiosis son: dolor abdominal leve, náusea, mareo, vómito, cefalea y debilidad.

9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente los medicamentos más prescritos en el tratamiento de giardiosis son la quinacrina, la furazolidona, metronidazol y albendazol principalmente. Donde estos 2 últimos fármacos han sido empleados dentro del cuadro de desparasitación del IMSS. Sin embargo, todos estos agentes quimioterapéuticos provocan diversas alteraciones en el organismo humano, iniciando con efectos adversos indeseables, actividad contra la flora bacteriana normal, teratogenicidad y carcinogenicidad (Thomas et al., 1990). Además, en los individuos giardiásicos se presentan fallas terapéuticas provocadas por el abandono del tratamiento que comprende largos períodos de administración farmacológica y por la resistencia de los trofozoítos de *G. intestinalis* contra estos fármacos (Linquist, 1996; Upcroft et al., 1996; Upcroft y Upcroft, 2001).

Una alternativa en el tratamiento de la giardiosis es la nitazoxanida, la cual es un excelente antiparasitario, sus efectos secundarios son menores en comparación con aquellos presentados por el albendazol, metronidazol, quinacrina y furazolidona. Además, no se ha detectado desarrollo de resistencia al fármaco por este parásito.

En virtud de que la nitazoxanida es una sustancia relativamente nueva con amplio espectro de actividad antiparasitaria, que causa menos efectos secundarios, resulta de interés la síntesis de análogos de la nitazoxanida. Lo anterior, con la finalidad de realizar un estudio de estructura-actividad que permita definir nuevas moléculas con actividad antiparasitaria. A este respecto, en el Instituto de Química de la UNAM, el grupo de investigación del Dr. Angel Guzmán, ha realizado la síntesis de 5 análogos de la nitazoxanida, respetando como estructura base la molécula 5-nitro-2-aminotiazol (Figura 12) y añadiendo los grupos sustituyentes con densidad electrónica variable como se indica en la Tabla 4.

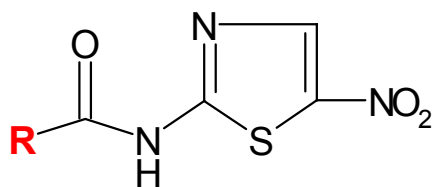
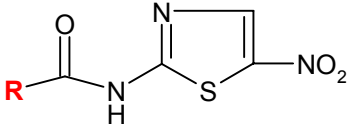
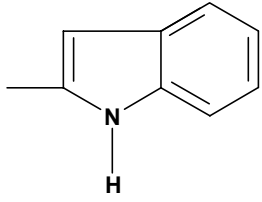
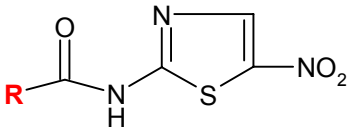
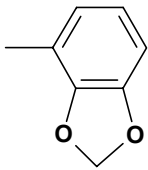
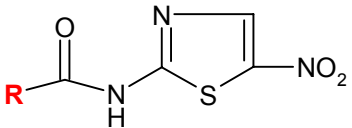
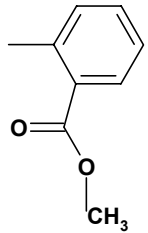


Figura 12.- Molécula 5-nitro-2-aminotiazol (Estructura base para el diseño y síntesis de los compuestos análogos de la nitazoxanida).

Tabla 4.- Compuestos análogos de la nitazoxanida.

COMPUESTO	PESO MOLECULAR DE LA MOLECULA COMPLETA (g/mol)	GRUPO SUSTITUYENTE "R"
<p>AG-2</p>	343.26	<p>Metil-sulfonil-oxifenil</p>
<p>AG-3</p>	306.296	<p>4-Acetamidofenil</p>

<p style="text-align: center;">AG-4</p> 	<p>288.281</p>	 <p style="text-align: center;">2-Indonil</p>
<p style="text-align: center;">AG-5</p> 	<p>293.254</p>	 <p style="text-align: center;">1,3-Benzodioxol</p>
<p style="text-align: center;">AG-6</p> 	<p>307.281</p>	 <p style="text-align: center;">Metoxicarbonil</p>

10. HIPOTESIS

- La molécula del 5-nitro-2-aminotiazol representa la parte activa de la nitazoxanida, debido a que los análogos de la nitazoxanida (Compuesto AG-2 al AG-6) la conservan, éstos tendrían una mayor actividad giardicida.

11. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad biológica “**in vitro**” de los compuestos análogos de la nitazoxanida contra trofozoítos de *G. intestinalis*

12. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la actividad biológica de 5 compuestos análogos de la nitazoxanida (AG-2 al AG-6) sobre los trofozoítos de *G. intestinalis* por medio del método de subcultivo.
- Determinar la CI_{50} de cada uno de los compuestos análogos de la nitazoxanida (AG-2 al AG-6) en contra de trofozoítos de *G. intestinalis* mediante el programa Probit.
- Comparar la actividad biológica de los compuestos análogos de la nitazoxanida (AG-2 al AG-6) con la del Albendazol, Nitazoxanida y Metronidazol contra trofozoítos de *G. intestinalis*.
- Relacionar la estructura-actividad de cada uno de los compuestos análogos de la nitazoxanida (AG-2 al AG-6) con su actividad giardicida

13. MATERIALES EMPLEADOS

Material de vidrio

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

Materiales de plástico

- Micropipetas de 20, 100, 200 y 1000 μ L (Gilson)
- Puntas para micropipetas (Aerosol Barrier Tips)
- Gradillas de 96 pozos (Axygen)
- Tubos Eppendorf (Axygen)
- Tubos Falcon de 10 mL (Corning)
- Guantes (TITAN)

Otros materiales

- Propipeta (AKKU)
- Piseta con alcohol al 70%
- Pinzas (Ateo)
- Microscopio invertidos (Axiovert 25)
- Espátula (Ateo)
- Incubadora (REVCO)
- Agitador (Vortex)
- Autoclave (Falcon)
- Balanza granataria (OHAUS)
- Balanza analítica (Scientech inc)
- Filtros (Millipore)
- Potenciómetro (Bekman)
- Contenedor criogénico (MVE Cryogenics)
- Nitrógeno líquido (INFRA)

Sales puras

- Nitazoxanida (Laboratorios Columbia)
- Albendazol (Smith Kline Beeckham)
- Metronidazol (SIGMA)

Otras sustancias

- Agua destilada
- Alcohol al 70%
- DMSO (J.T. Backer)
- Medio TYI-S-33 (Anexo 1)
- Suero Fetal Bovino (Hyclone)
- Cloro (Clorox)

14. METODOLOGÍA

1.-CULTIVO AXÉNICO DE *G. intestinalis*

1. Se descongeló la cepa WB de *G. intestinalis*, conservada a -70°C , manteniéndola a temperatura ambiente.
2. En los tubos de ensaye estériles de 13x100, se añadieron 3 mL de medio TYI-S-33 (Anexo A) complementado con suero de ternera (ST) al 10% y se repartió el contenido del criovial en los diferentes tubos centrifugándose a 1500 rpm durante 5 min.
3. El sobrenadante se desechó y se añadieron 6 ó 7 mL de medio de cultivo.
4. Cada uno de los tubos se taparon y se homogeneizaron lentamente, después se etiquetaron, sellaron con parafilm e incubaron 48 h a 37°C .
5. Los tubos se observaron al microscopio con el objetivo de 40X, dependiendo del grado de confluencia, se cambió el medio de cultivo y se volvió a resembrar colocando medio de cultivo fresco en cada tubo.
6. Los tubos se incubaron nuevamente 48 h a 37°C para obtener los parásitos en confluencia para ser empleados en la curva de crecimiento y en los ensayos de actividad parasitaria.

2.- CURVA DE CRECIMIENTO

1.- Se tomaron 100 μL del tubo original donde se encontraban los trofozoítos de *G. intestinalis* suspendidos en medio TYI-S-33 y se diluyeron con 900 μL de amortiguador de fosfatos salino 1X (PBS).

2.- Posteriormente, se colocaron 12 μL en la cámara de Neubauer y se observaron los trofozoítos existentes en cada una de las cuadrículas secundarias de la cámara (Anexo B); si la cantidad era elevada, se realizaba una dilución 1:10.

3.- Se colocaron 12 μL de la dilución anterior y se contaron los trofozoítos situados en las cuadrículas secundarias de la cámara de Neubauer calculándose el número total de trofozoítos/mL.

4.- Se incubaron 5×10^4 trofozoítos/mL en medio TYI-S-33 complementado con ST al 10% a 37°C .

5.- El número de trofozoítos se determinó a diferentes tiempos de incubación, con la finalidad de obtener el tiempo al cual se encontraban los trofozoítos en fase de crecimiento exponencial. Este tiempo será utilizado en los ensayos de subcultivo.

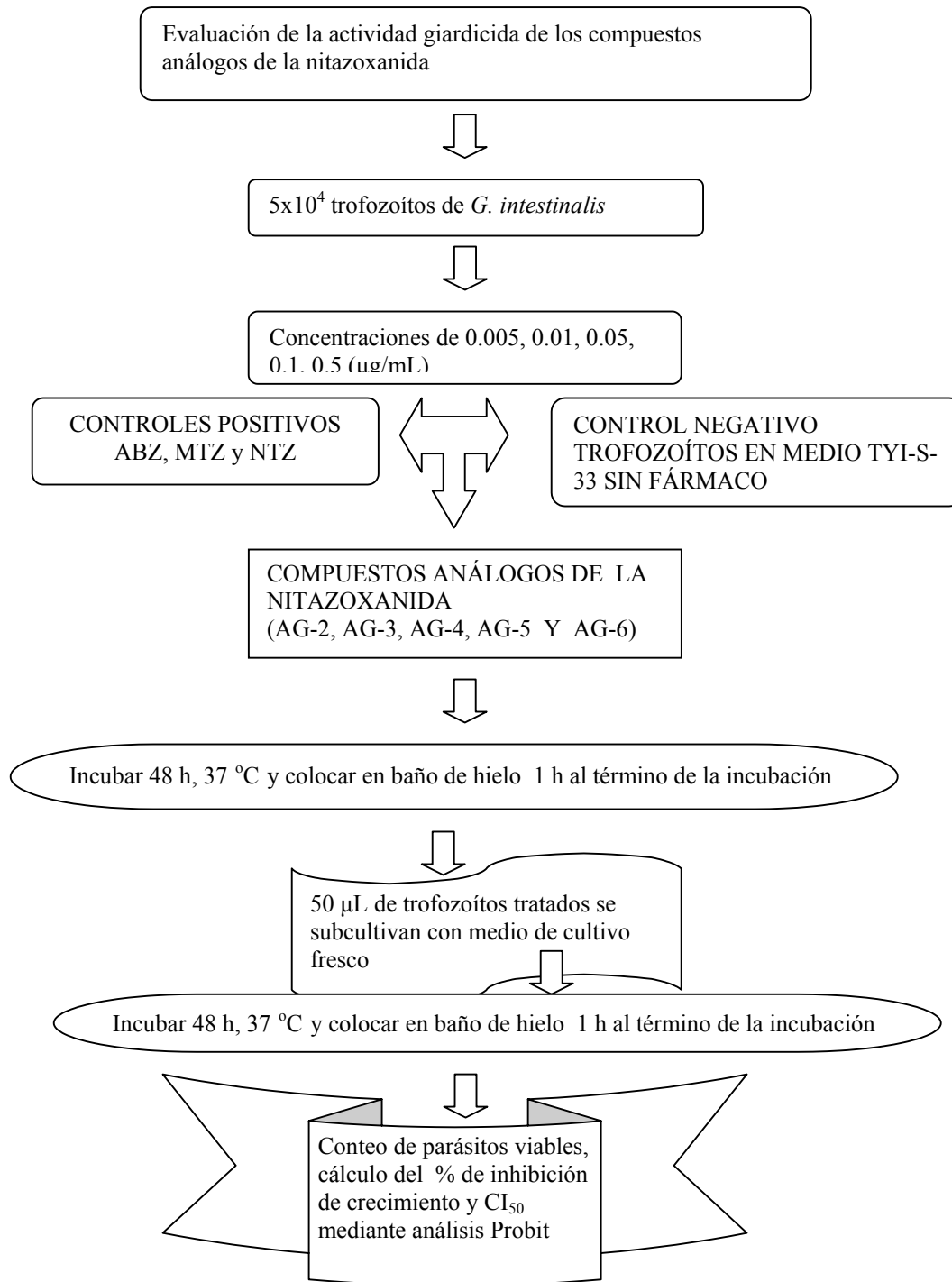
3.-EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GIARDICIDA DE LOS ANÁLOGOS DE LA NITAZOXANIDA

Se determinó la actividad biológica de los 5 compuestos análogos de la nitazoxanida (AG-2 al AG-6) contra los trofozoítos de *G. intestinalis*, empleando el método de subcultivo (Cedillo y Muñoz, 1992).

1. Se prepararon los stocks (10 mg/mL) de cada uno de los compuestos análogos de la nitazoxanida y a partir de éstos, se realizaron las correspondientes diluciones para obtener diferentes concentraciones de los compuestos (0.001-0.50 µg/mL), empleando como diluyente dimetilsulfóxido (DMSO) al 1-2% como máximo (Anexo B).
2. A 50×10^4 trofozoítos en medio TYI-S-33 complementado con ST al 10%, se les añadieron los compuestos a las diferentes concentraciones llevándose a volumen final de 1 mL y se incubaron a 37 °C por 48 h. Como control negativo se incubaron los trofozoítos en medio libre de compuestos y como control positivo se emplearon el albendazol, metronidazol y nitazoxanida a las mismas concentraciones que las usadas con los compuestos análogos de la nitazoxanida.
3. Una vez concluida la incubación, se enfriaron en baño de hielo por 1 h, se tomaron 50 µL y se adicionaron en otro tubo que contenía 900 µL de medio de cultivo sin compuestos.
4. Se incubaron nuevamente a 37 °C por 48 h y una vez transcurrido el tiempo se enfriaron los tubos con hielo por 1 h y se realizó una dilución 1:10 con PBS 1X, pH 7.0, para realizar un conteo confiable.

5. Se colocaron 12 μ L de la dilución anterior en la cámara de Neubauer, se observaron al microscopio con el objetivo 40X y se contaron los trofozoítos vivos situados en los cuadrantes secundarios de la cámara.
6. Se calculó el número de trofozoítos muertos (Número de trofozoítos vivos en los controles - Número de trofozoítos vivos en todas las concentraciones de cada uno de los compuestos = Número de trofozoítos muertos) y se introdujeron al programa Probit para obtener las CI_{50} correspondientes para cada uno de los compuestos análogos de la nitazoxanida.
7. Este ensayo se llevó a cabo 3 veces por duplicado.

15. DIAGRAMA DE FLUJO



ABZ = Albendazol
MTZ = Metronidazol
NTZ = Nitazoxanida

16. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MÉTODO ESTADÍSTICO.

El método estadístico empleado para manejar los datos obtenidos durante la experimentación es aquel denominado como **Probit**, el cual, se fundamenta en una de las distribuciones más importantes de la estadística “*Distribución normal ó Distribución de Gauss*” y cuya finalidad es transformar los datos situados dentro de una campana de Gauss (Figura 13) a una ecuación lineal (Figura 13), proporcionando así, los valores correspondientes a la CI_{50} y CI_{90} . Además de una desviación estándar y un coeficiente de variación cuyo objetivo es demostrar el comportamiento verdadero de los compuestos análogos de la nitazoxanida sobre los trofozoítos de *Giardia intestinalis*.

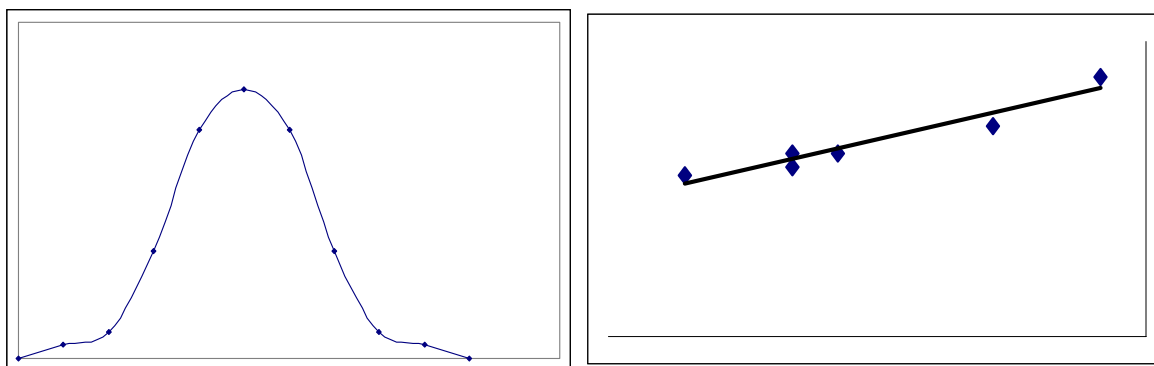
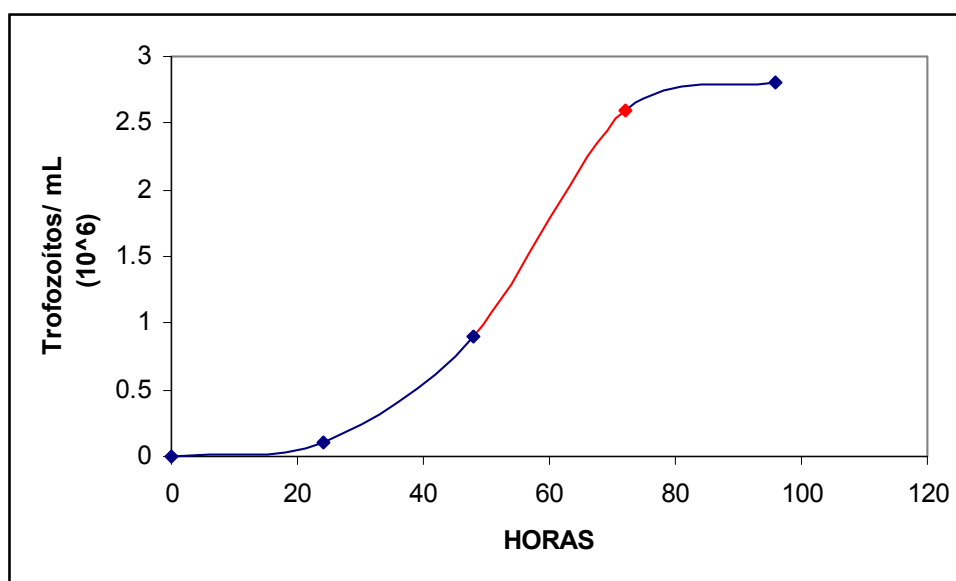


Figura 13.- Representación grafica simbólica de los datos obtenidos experimentalmente transformando un gráfico de campana de Gauss a un gráfico lineal

CURVA DE CRECIMIENTO DE LOS TROFOZOÍTOS DE *G. intestinalis*.

Se realizaron experimentos para obtener la curva de crecimiento de los trofozoítos de *G. intestinalis* (Figura 14), para posteriormente determinar la actividad giardicida de los compuestos análogos de la nitazoxanida. De esta manera, se observó que los trofozoítos de *G. intestinalis* se encuentran dentro de la fase exponencial ó logarítmica de crecimiento entre 48 y 72 h. Considerando lo anterior, los ensayos de evaluación de la actividad giardicida de los compuestos análogos de la nitazoxanida, se realizaron mediante el método de subcultivo tomando como alícuota 5×10^4 trofozoítos en 1 mL.



$10^6 = 10^6$ trofozoítos /mL.

Figura 14.- Curva de crecimiento de *G. intestinalis* empleando un inóculo de 5×10^4 trofozoítos / mL.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE TROFOZOÍTOS DE *G. intestinalis*.

En la Tabla 5, se presentan las CI_{50} de los compuestos empleados como testigos positivos y de los compuestos análogos de la nitazoxanida evaluados contra los trofozoítos de *G. intestinalis*. Al analizar las CI_{50} obtenidas, se pone de manifiesto que los compuestos análogos AG-2 y AG-5 ($CI_{50} = 0.0063$ y 0.0083 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) tienen una actividad muy cercana a la de la nitazoxanida ($CI_{50} = 0.0043$ $\mu\text{g/mL}$). Estos mismos compuestos fueron más activos contra *G. intestinalis*, que el albendazol ($CI_{50} = 0.0147$ $\mu\text{g/mL}$) y el metronidazol ($CI_{50} = 0.210$ $\mu\text{g/mL}$). El compuesto AG-6 resultó ser el menos activo de los compuestos evaluados ($CI_{50} = 0.234$ $\mu\text{g/mL}$), siendo menos activo que el albendazol y la nitazoxanida, pero con actividad similar al metronidazol.

Tabla 5.- Actividad biológica de los compuestos análogos de la nitazoxanida sobre los trofozoítos de *Giardia intestinalis*.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 (CI_{50})	COEFICIENTE DE VARIACION (C.V)	DESVIACIÓN ESTANDAR (σ)
METRONIDAZOL	0.210	8.166	0.022
ALBENDAZOL	0.0147	3.936	0.0005
NITAZOXANIDA	0.0043	48.038	0.002
AG-2	0.0063	39.735	0.002
AG-3	0.0287	64.542	0.018
AG-4	0.054	49.828	0.026
AG-5	0.008	27.712	0.002
AG-6	0.234	96.685	0.226

Estos valores representan el promedio obtenido de 3 ensayos realizados para cada uno de los compuestos análogos de la nitazoxanida. Las CI_{50} fueron obtenidas mediante un programa estadístico de computadora denominado Probit

De los 5 compuestos análogos de la nitazoxanida evaluados se calculó su coeficiente de potencia con respecto al albendazol, metronidazol y nitazoxanida (Tabla 6, Figuras 15-17).

Tabla 6.- Coeficientes de potencia de cada uno de los compuestos análogos de la nitazoxanida contra trofozoítos de *G. intestinalis*, obtenidos con respecto al Metronidazol, Albendazol y Nitazoxanida.

COEFICIENTES DE POTENCIA CON RESPECTO AL METRONIDAZOL	
AG-2	33.33
AG-3	7.317
AG-4	3.888
AG-5	25.301
AG-6	0.897
MTZ	1.00
COEFICIENTES DE POTENCIA CON RESPECTO AL ALBENDAZOL	
AG-2	2.333
AG-3	0.512
AG-4	0.272
AG-5	1.771
AG-6	0.0628
ABZ	1.00
COEFICIENTES DE POTENCIA CON RESPECTO A LA NITAZOXANIDA	
AG-2	0.683
AG-3	0.150
AG-4	0.080
AG-5	0.518
AG-6	0.018
NTZ	1.00

MTZ: Metronidazol

ABZ: Albendazol

NTZ: Nitazoxanida

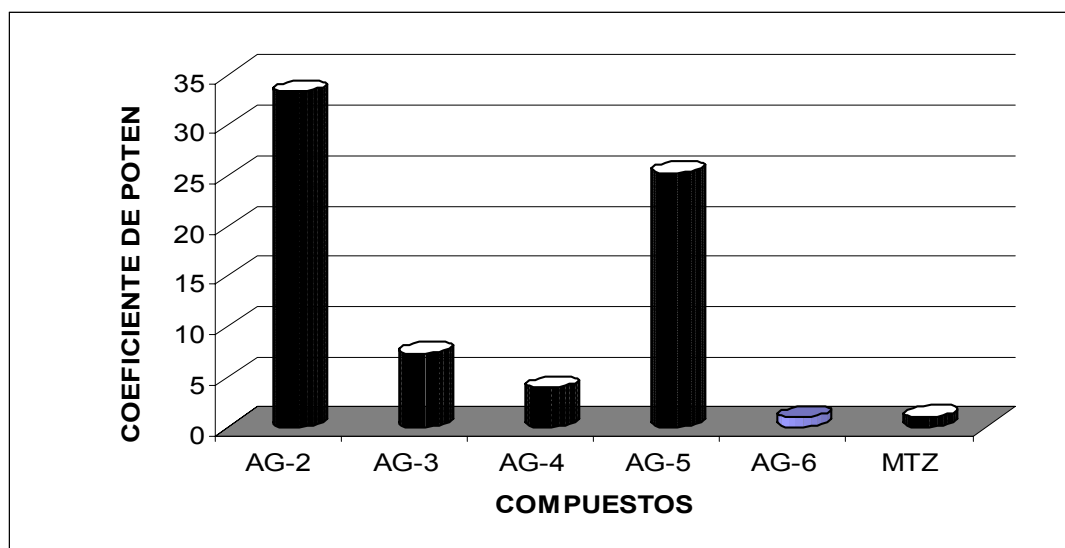


Figura 15. Coeficiente de potencia contra trofozoítos de *Giardia intestinalis*, dado por la relación de CI_{50} entre el Metronidazol (MTZ) y cada uno de los compuestos análogos sintetizados.

Se puede observar en la Figura 15, que los compuestos análogos de la nitazoxanida AG-2, AG-3, AG-4 y AG-5 resultaron ser más activos que el metronidazol. Los compuestos AG-2 y AG-5 resultaron 33.3 y 25.3 veces más activos que el metronidazol. El compuesto AG-6 fue igual de activo que el metronidazol.

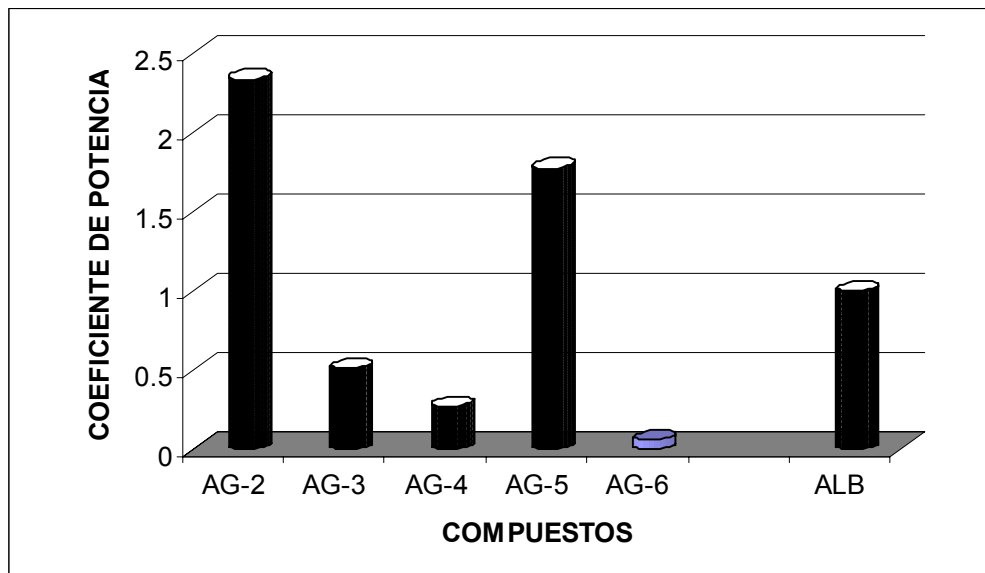


Figura 16. Coeficiente de potencia contra trofozoítos de *Giardia intestinalis*, dado por la relación de CI_{50} entre el Albendazol (ABZ) y cada uno de los compuestos análogos sintetizados.

Los compuestos AG-2 y AG-5 fueron más activos que el albendazol (Figura 16), con un coeficiente de potencia de 2.33 y 1.777 respectivamente. De esta forma AG-2 y AG-5 fueron 2.3 y 1.77 veces más activos que el albendazol.

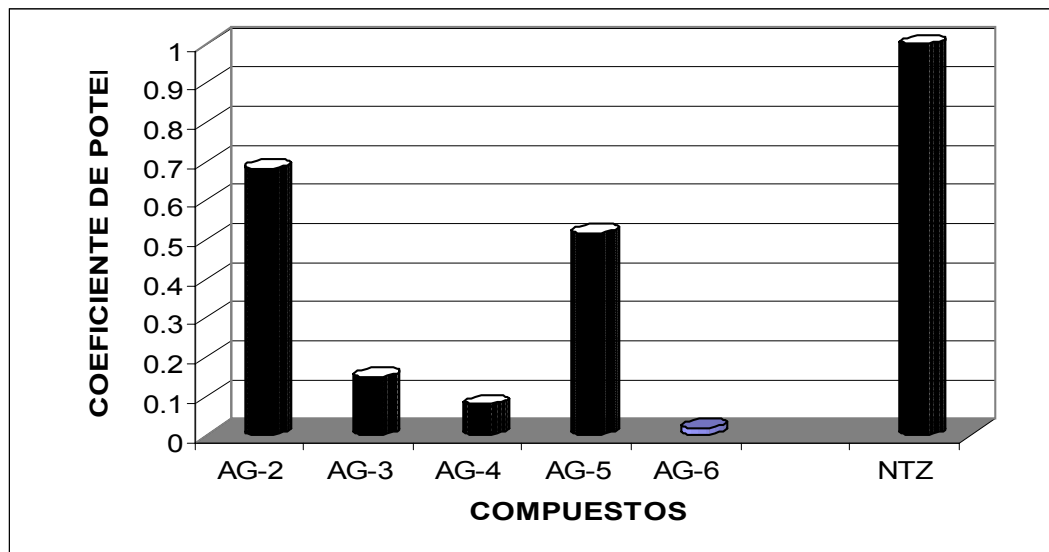


Figura 17. Coeficiente de potencia contra trofozoítos de *Giardia intestinalis*, dado por la relación de CI_{50} entre la Nitazoxanida (NTZ) y cada uno de los compuestos análogos sintetizados.

Ninguno de los compuestos análogos de la nitazoxanida tuvo mejor actividad que la misma nitazoxanida (Figura 17). Sin embargo, los compuestos AG-2 y AG-5 tuvieron los mejores coeficientes de potencia (0.68 y 0.518 respectivamente). El compuesto AG-6 fue el menos activo con un coeficiente de potencia de 0.018.

De acuerdo a las CI_{50} obtenidas de los compuestos análogos de la nitazoxanida, así como el coeficiente de potencia calculado en relación al albendazol y metronidazol, resulta de interés que en todos los casos, los compuestos AG-2 y AG-5 mostraron ser más activos, no siendo así para la nitazoxanida.

Considerando que los compuestos AG-2 y AG-5 fueron más activos que el albendazol y el metronidazol, estos dos compuestos pueden seleccionarse para continuar con una evaluación de su actividad “*in vivo*” empleando un modelo de giardiosis.

Con respecto a la relación estructura-actividad, podemos observar que todos los compuestos análogos de la nitazoxanida han sido diseñados y sintetizados a partir de la molécula 5-nitro-2-aminotiazol y los grupos sustituyentes “**R**”, son grupos aromáticos con radicales que le confieren una densidad electrónica variable y con la cual, se buscó incrementar la actividad biológica de los compuestos análogos de la nitazoxanida (Tabla 4).

Es importante mencionar que los sustituyentes metil-sulfonil-oxifenil y 1,3-benzodioxol de los compuestos AG-2 y AG-5 respectivamente, tienen características de electrodonadores.

Los sustituyentes 4-acetamidofenil y 2-indonil de los compuestos AG-3 y AG-4 respectivamente, tienen carácter de electrodonadores débiles.

Finalmente, el sustituyente metoxicarbonil en posición orto (*o*), del compuesto AG-6 tiene carácter de electroatractor.

De lo anterior y con relación a la actividad mostrada para cada uno de los compuestos evaluados, podemos concluir que el sustituyente en posición orto (*o*) con carácter de electrodonadores como el grupo metil-sulfonil-oxifenil y el 1,3-benzodioxol, confieren a los compuestos AG-2 y AG-6 una mayor actividad giardicida en comparación con el sustituyente metoxicarbonil con carácter de electroatractor presente en el compuesto AG-6, el cual disminuyó la actividad giardicida de la molécula.

17. CONCLUSIONES

- 1) Los compuestos análogos AG-2 y AG-5 fueron más activos que el albendazol y el metronidazol contra trofozoítos de *G. intestinalis*.
- 2) Los compuestos análogos AG-3 y AG-4 fueron más activos que el metronidazol, pero menos activos que el albendazol.
- 3) El compuesto AG-6, resultó ser menos activo que el albendazol y similarmente activo que el metronidazol.
- 4) Todos los compuestos análogos de la nitazoxanida fueron menos activos que la misma nitazoxanida.
- 5) Los compuestos AG-2 y AG-5, tienen grupos sustituyentes (metil-sulfonil-oxifenil y 1,3-benzodioxol respectivamente) con características electrodonadoras en posición orto (*o*); que le confirieron una mayor actividad biológica contra los trofozoítos de *G. intestinalis*.
- 6) De acuerdo a la actividad biológica giardicida, los compuestos AG-2 y AG-5 son candidatos a evaluarse en modelos murinos.

ANEXO A

1.-Preparación del medio de cultivo

Para la preparación de 1 L de medio de cultivo (TYI-S-33) se adicionan los siguientes reactivos:

- I. Cloruro de Sodio (2 g / MERCK)
- II. Fosfato de Potasio Dibásico (1 g / J.T. Backer)
- III. Fosfato de Potasio Monobásico (1 g / J.T.Backer)
- IV. Glucosa (10g / SIGMA)
- V. Biosate (30 g / SIGMA)
- VI. L-cisteína (2 g / INC)
- VII. Ácido Ascórbico (0.2 g / SIGMA)
- VIII. Citrato Férrico (0.022 g / SIGMA)
- IX. Bilis (0.8 g / SIMA)

- a) Una vez que se adicionan los reactivos para formar el medio de cultivo, se ajusta el pH entre 7-7.2.
- b) Después, se filtra a través de una membrana de 0.45 μm , se almacena en frascos de vidrio previamente esterilizados con capacidad de 500 mL y se realiza prueba de esterilidad del medio de cultivo, para esto se toma una alícuota de 4 μL y se inoculan en una caja con agar sangre incubando por 24 h a 37 °C.

- c) Los frascos con medio de cultivo se rotulan (nombre del medio, nombre de quien lo elaboró, fecha de su preparación) y finalmente si pasan la prueba de esterilidad se congela el medio a -20 °C.

- d) Para crecer el parásito bajo condiciones de esterilidad se complementa el medio de cultivo TYI-S-33 con 10% de suero de ternera descomplementado (Hyclone) y 0.5 mL de antibiótico penicilina- estreptomicina 10 000 U/ μ g/mL.

ANEXO B

CUENTA DE TROFOZOÍTOS CON CÁMARA DE NEWBAUER

1. El recuento presupone un conocimiento exacto de las líneas límite de las cámaras de conteo utilizadas.
2. Los trofozoítos, que se encontraban en o cerca de las líneas de limitación, no se contaran dos veces o se sobrepasara el conteo, se siguieron determinadas reglas.
3. Se contaron todas las células dentro de una zona de medición definida.
4. También se contaron las células (marcadas en negro), que se apoyan o tocan en las 2 caras, por ejemplo en la línea de media izquierda y superior (Figura 18).
5. Esto también fue válido para el tipo de la operación de conteo propiamente dicho, que se efectuó en forma de meandro. Se efectuó en el ángulo superior izquierdo en dirección de la flecha (Figura 19).

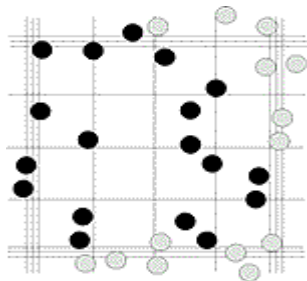


Figura 18. Líneas de limitación y ejemplo de trofozoítos a ser contados.

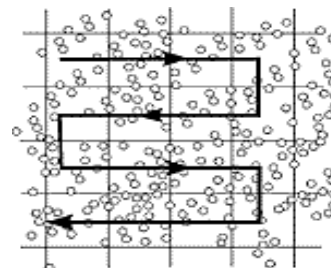


Figura 19. Conteo a manera de meandro.

1. Fuente: http://www.superior.de/pgr06_info_s.htm

6. En los conteos de cámaras, el diagrama del condensador en el microscopio invertido (Olympus CK2) se encontraba cerrado en gran parte.
7. La diferencia de las células contadas en los cuadrados grandes y en los cuadrados de grupos no podrá ser superior a 10 células. En todos los conteos de células, se realizaron dobles determinaciones. Después del recuento de la red de conteo superior, se recuenta como control también la red de conteo inferior. Se tuvo cuidado de que la cámara no estuviera reseca.
8. Si en alguna de las redes se contaba mas de 50 trofozoítos se hacia una dilución 1:10, en donde se colocaban 100 μL de la muestra y 900 μL de PBS.
9. Al terminar de contar los trofozoítos en las cuatro redes, el total de estos se divide entre cuatro (obteniendo el promedio) el resultado es multiplicado por el factor de dilución y por **10 000**. Con ello el número de trofozoítos por mL.

Este **10 000** se debe a que cada cuadrante tiene de superficie 0.1 mm, y cada lado 1mm por lo que tenemos entonces.

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

$$\begin{array}{r} \text{Trofozoitos por cuadrante} \qquad \qquad \qquad 0.1\mu\text{l} \\ \text{X} \text{-----} 1000\mu\text{l} \end{array}$$

Donde X = **10 000**

DILUCIONES EMPLEADAS EN EL MÉTODO DE RESIEMBRA

Se partió de una solución patrón donde se disolvieron 10mg/ml del compuesto en DMSO (Baker). Se cuidó que la concentración final del DMSO en los tubos de ensayo no rebasara el 1% de la concentración total con la finalidad de que el parásito no se viera afectado en su crecimiento debido a dicho disolvente.

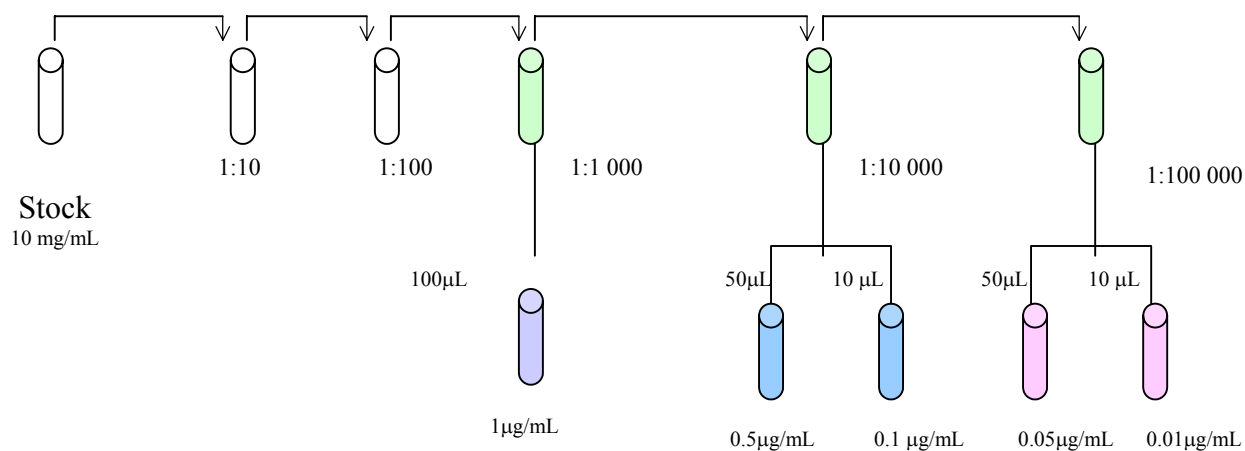


Figura 20. Diagrama de diluciones empleadas en el método de subcultivo.

17. BIBLIOGRAFIA

- Abaza H. El-Zayadi A. (1998). *Nitazoxanide in the treatment of patients of intestinal protozoan and helminthic infections: a report on 546 patients in Egypt*. Current Therap. Reserch. 54: 116-121.
- Bernal R. R., Martínez M. L. G., Mendoza Ch. A., Velasco P. D. y Chávez M. B. (2004). *Evaluation of the in vitro effect of albendazole, metronidazole and nitazoxanide on viability and structure of Giardia lamblia cysts*. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 36 (3-4): 241-245.
- Beck W. J. y Davies J. E. (1984). *Parasitología Médica*. 3^a Edición; Editorial Interamericana; México. Pp. 35-36, 52-60.
- Boletín Informativo Laboratorios Columbia. (1996). *Monografía de la Nitazoxanida*. Laboratorios Columbia; México. Pp 1-59.
- Boreham P., Phillips R., Sthepherd R. (1988). *Altered uptake of metronidazole in vitro by stocks of Giardia intestinalis with different drug sensitivities*. Transact. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 82: 104-106.
- Cedillo R. R. y Muñoz O. (1992). *In Vitro susceptibility of Giardia lamblia to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents*. J. Med. Microb. 37:221-223.
- Cedillo R. R., Chávez B., Gonzáles R. A., Tapia A., Yépez M. L. (2002). *In vitro Effect of Nitazoxanide Against Entamoeba histolytica, Giardia intestinalis and Trichomona vaginalis Trophozoites*. J. Euka. Microbiol. 49(3):201-208.

- Chin J. (2001). *El control de las Enfermedades Transmisibles*. 17ª edición; Publicación Científica y Técnica; USA. Pp. 317-319.
- Díaz E., Mondragón J., Ramirez E., Bernal R. (2003). *Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide children in Mexico*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 68(4):382-385.
- Doumbo O., Rossignol J., Pichard D., Traore H., Dembele M., Diakite M., Traore F. y Diallo. (1997). *Nitazoxanide in treatment of Cryptosporidiosis in 24 AIDS patients with chronic diarrhea in Mali*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 56: 637-639.
- Elmendorf H., Dawson S., Mc Caffery M.J. (2003). *The cytoskeleton of Giardia lamblia*. Inter. J. Parasitol. 33:3-28.
- Euzeby J., Prom Tep S., Rossignol J.F. (1980). *Experimentation des proprietes anthelminthiques de la nitazoxanida chez le chien, le chat et les ovins*. Revw. Med. Vet. 131: 987-696.
- Fox LeAnne M. y Saravolatz L. (2005). *Nitazoxanide: A new thiazolide antiparasitic agent*. Clin. Infect. Diss. 40: 1173-1180.
- Flores J. y Armijio J. A. (1992). *Farmacología huamana*, 2ª Edición; Ediciones Científicas y Técnicas, S.A., Barcelona España. Pp. 1119-1125.
- Gilles H. M. y Hoffman P. S. (2002). *Treatment of intestinal parasitic infections: a review of nitazoxanide*. Parasitol. Res. 18(3): 95-97.
- Goldsmith R. (1995). *Parasitología y Medicina Tropical*. 1ª Edición; Editorial Manual Moderno; México D.F. Pp 314-322.

- Goodman y Gilman. (2003). *Las bases de la terapéutica*. 10ª Edición; Editorial Mac Graw-Hill, volumen II; México DF. Pp. 1113-1145.
- Gutiérrez C., Trujillo H. C., Huerta N. (2002). *Nitazoxanide compared with Quinifamide and mebendazole in the treatment of helminthic infectious and intestinal protozoa in children*. J. Trop. Med. Hyg. 66(3):251-254.
- Jiménez C. E., Luna A., Angeles E. (2003). *In vitro anti-giardial activity of IRE-6A and IRE-7B, two ethyl-phenylcarbamate derivatives*. Rev. Inv. Clin. 55(4): 444-447.
- Johnson P.J. (1993). *Metronidazole and drug resistance*. Parasitol. Today 9(5):183-186.
- Karabay O., Tamer Ali, Gunduz H., Kayaz D., Arinc H. y Celebi Harika. (2004). *Albendazol versus metronidazol treatment of adult giardiasis: An open randomized clinical study*. W. J. Gastro. 10(8): 1215-1217.
- Linqvist, H.D. (1996). *Induction of albendazole resistance in Giardia lamblia*. Microb. Drug Resist. 2: 433-434.
- Litter Manuel. (1984). *Compendio de farmacología*. 3ª Edición; El Ateneo; Buenos Aires Argentina. Pp 680-681.
- Olea Rodríguez María Concepción. (1999). *Valoración del efecto antiparasitario de la nitazoxanida*. Tesis de Maestría. Facultad de Química UNAM.
- Ponce Macotela M., Gómez G. J., Gonzáles M. A., Robles R. R., Anislado T. V., Martínez G. M. N. (2001). *Determinación in vitro a la susceptibilidad a la nitazoxanida de cuatro aislados de Giardia duodenalis obtenidos de diferentes huéspedes*. Clin. Invet. Rev. 53:41-45.

- Rang H.P. (2000). *Farmacología*. 4ª Edición; Editorial Elsevier Science; Barcelona España. Pp 791-801.
- Rodríguez García R., Rodríguez G. L. y Cruz A. (1999). *Rev. Gastroenterol. Mex.* 64: 122-126.
- Romero C., Guerrero L. R., Muñoz G. M., Geyne C. A. (1997). *Nitazoxanide for treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in Mexico*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91 (6): 701-703.
- Romero C. (1999). *Microbiología y Parasitología Humana*. 2ª Edición; Médica Panamericana; México D.F. Pp 582-607.
- Sisson Gary, Goodwin A., Raudonikiene A., Hughes J. N., Mukhopadhyay K. A., Berg E. D., Hoffman P. (2002). *Enzymes associated with reductive activation and action of Nitazoxanide, Nitrofurans and Metronidazole in Helicobacter pylori*. *Ame. Societ. Microb.* 46: 2116-21223.
- Stockis A., Rossignol J.F., Deroubaix R., Jeanbaptiste A., Calderon B. (1996). *Pharmacokinetics of nitazoxanida after single oral dose administration in 6 healthy volunteers*. *Int. J. Clin. Pharm. Therap.* 34: 349-351.
- Tomoko Mineno y Mitchell A. Avery. (2003). *Giardiasis: Recent Progress in chemotherapy and drug development*. 9: 841-855.
- Thomas D. Edlin , Hang Tu L., Prasanta R. Chakraborty. (1990). *Activity of the antihelminthic benzimidazoles against Giardia lamblia in vitro*. *J. Infect. Diseass.* 162:1408-1411.

- Upcroft J., Mitchell N., Upcroft P. (1996). *Albendazole resistance in Giardia is correlated with cytoskeletal changes but not with a mutation at amino acid 200 in β -tubulin*. Microb. Drug Resist. 2: 303-308.
- Upcroft P., Upcroft J., Campbell R., Benakli K., Vanelle P. (1999). *Efficacy of new 5-nitroimidazoles against metronidazole susceptible and resistant Giardia, Trichomona and Entamoeba spp.* Amer. Societ. Microbiol. 43(1):73-76.
- Upcroft P. y Upcroft J. (2001). *Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoo*. Clin. Microb. Reviews. 14(1): 150-164.
- Walter Beck y Davies J. (1984). *Parasitología Médica*. 3^a Edición; Editorial Interamericana; México. Pp 35-36, 53-56, 58-64.
- OMS- Organización Mundial de la Salud. (1998). *Intestinal parasites control: burden and trends*.
- OMS- Organización Mundial de la Salud. Division of Control of Tropical Diseases, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO-World Health Organization. (2002). *TDR Strategic emphases matrix for tropical disease research*. Switzerland.
- Ximénez C.G., Gómez A., Melendro E., Rangel F., Ramiro M., Ramos F., Moran P. (2000). *Las parasitosis intestinales en México*. Cuadernos Funsalud No. 36; México D.F. Pp 3-61.

- Yoshimasa Y., Rossignol F.J., Hoffman P. Friedman H. (1999). *Nitazoxanide a nitrothiazolide antiparasitic drug, is an Anti-Helicobacter pylori agent antivacuolating toxin activity*. Chem. 45: 303-312.

PAGINAS ELECTRONICAS EMPLEADAS

1. Indice Farmaceutico Medicohompage.com: nitazoxanida_pa
2. DPDX\HTML\Giardiasis.htm
3. www.imbiomed.com.mx
4. http://www.superior.de/pgr06_info_s.htm
5. www.merksource.com/pp/us/cns/cns_hl_dolands