



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

Evaluación de la eficacia y actividad *in vitro* e *in vivo* de
nuevos derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol ante
el parásito *Giardia duodenalis*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

DULCE ESTHER AVILA VEGA

ASESORES: DR. RAUL ARGÜELLO GARCIA
DRA. MA. GUADALUPE ORTEGA PIERRES
DR. ENRIQUE ANGELES ANGUIANO



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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



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 de la eficiencia y actividad in vitro e in vivo de
nuevos derivados del 3-metil-4-nitro-5-ostirilisoazol ante
el parásito Giardia duodenalis.

que presenta la pasante: Dulce Esther Avila Vega
con número de cuenta: 9852674-9 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

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 19 de Mayo de 2005

PRESIDENTE	<u>MVZ. Juan Pablo Martínez Labat</u>	<u>[Firma]</u>
VOCAL	<u>MC. Luisa Martínez Aguilar</u>	<u>[Firma]</u>
SECRETARIO	<u>Dr. Enrique Angeles Anguiano</u>	<u>[Firma]</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>MC. Lidia Rangel Trujano</u>	<u>[Firma]</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFB. Héctor Coas Garduño</u>	<u>[Firma]</u>

DEDICATORIAS

ESTE TRABAJO LO QUIERO DEDICAR CON TODO MI AMOR A:

DIOS

POR ACOMPAÑARME EN CADA DÍA DE MI VIDA, POR ESTAR AHÍ CUANDO MAS LO NECESITO, A VECES CAYADO Y A VECES PLATICANDO POR HORAS, POR EL GRAN AMOR QUE ME DEMUESTRA EN TODAS LAS PERSONAS, COSAS Y ACONTECIMIENTOS DE MI VIDA, PORQUE SIN ÈL YO NO ESTARÌA AQUÌ

A MI FAMILIA:

A TI MAMÁ PORQUE CON TU EJEMPLO HAS SIDO EL MEJOR ESTIMULANTE PARA SUPERARME COMO MUJER Y COMO PROFESIONISTA, GRACIAS A TU FORMA DE SER, A TU ESFUERZO Y SACRIFICIO YO HE PODIDO ALCANZAR GRANDES COSAS Y PUEDO SENTIRME SATISFECHA DE LO QUE HASTA AHORA HE LOGRADO E IMPACIENTE POR LO QUE FALTA RECORRER.

A TI "PA" PORQUE SI NO ME HUBIERAS DEMOSTRADO QUE SE PUEDE SER UNA EXCELENTE PERSONA A PESAR DE LOS PROBLEMAS QUE SE PUEDAN PRESENTAR, YO ME HUBIERA DADO POR VENCIDA A LA PRIMERA, GRACIAS POR ENSEÑARME CON TUS ACTOS QUE DEBO EXIGIRME CADA VEZ MÁS EN LAS COSAS QUE HAGO Y SIEMPRE DAR EL 100% DE MI ESFUERZO.

A TI GINA PORQUE CON TU EXPLOSIVIDAD HAS HECHO QUE ME ESFUERCE MÁS POR SER UNA MEJOR HERMANA; AUNQUE TENEMOS NUESTRAS DIFERENCIAS CREO QUE ÉSTAS HAN SIDO PARA QUE NOS COMPLEMENTEMOS Y CREZCAMOS JUNTAS, GRACIAS POR TU PERSONITA PORQUE SIN ELLA MI VIDA NO HUBIERA SIDO LA MISMA.

A JUAN

PORQUE SIN TU APOYO CONSTANTE Y TU AMOR NO HUBIERA PODIDO ALCANZAR ESTA GRAN LOGRO. POR TODOS LOS MOMENTOS MARAVILLOSOS QUE HEMOS PASADO JUNTOS Y SOBRE TODO POR TU COMPRESIÓN Y TU PACIENCIA ANTE LA INESTABILIDAD QUE ME CARACTERIZA, MUCHAS GRACIAS POR ESTAR DENTRO DE MI VIDA.

A MI SEGUNDA FAMILIA

HORIZONTES

PORQUE GRACIAS A USTEDES ME HE PODIDO CONOCER, Y GRAN PARTE DE MI SE LO DEBO A USTEDES, PORQUE AÚN SIN SER HERMANOS DE VERDAD, CREANME QUE LOS CONSIDERO COMO SI LO FUERAN; GRACIAS POR COMPARTIR MOMENTOS TAN ESPECIALES Y POR PERMITIRME APRENDER DE USTEDES CON SU VIDA, PORQUE ESO ES ALGO DE LO MÁS VALIOSO QUE ME HA OCURRIDO. GRACIAS A LO QUE HE VIVIDO JUNTO A USTEDES PUEDO TENER EN MIS MANOS ESTE GRAN TESORO, PERO SOBRE TODO GRACIAS A DIOS PORQUE EL FUE QUIEN PERMITIÓ QUE NOS CONOCIÉRAMOS.

GRACIAS CRISTO...

PORQUE ERES MI AMIGO Y MI GUÍA.

A MIS AMIGOS

TENGO, GRACIAS A DIOS, MUCHOS AMIGOS A LOS CUALES DEDICAR ESTA TESIS, EDGAR (GUANZARAS) POR TU GRAN ALEGRÍA QUE A PESAR DE LOS PEORES MOMENTO SIEMPRE SABES VER EL LADO NO TAN MALO, A LETY (LENTICIA) POR TU GRAN APOYO Y POR COMPARTIR CONMIGO TU VIDA Y LAS TRAVESURAS TAN EMOCIONANTES DE LA FACULTAD, A VIOLETA (VIEJA DEL MAL) POR SER TAN IMPETUOSA Y QUITADA DE LA PENA PORQUE GRACIAS A ESO APRENDÍ A SER MAS AUTENTICA, A ITZEL PORQUE A PESAR DE LAS DIFICULTADES, LOS BUENOS MOMENTOS HAN PERMITIDO QUE NUESTRA AMISTAD SIGA A PESAR DE LA DISTANCIA.

AGRADECIMIENTOS

DOY GRACIAS A TODAS LAS PERSONAS E INSTITUCIONES QUE HICIERON
POSIBLE LA REALIZACIÓN DE ÉSTE TRABAJO

A LA FES-CUAUTITLÁN –UNAM

GRACIAS POR SER LA INSTITUCIÓN QUE ME HIZO APRENDER COMO SER
UN BUEN ESTUDIANTE, POR BRINDARME LAS HERRAMIENTAS
NECESARIAS PARA PODER DESARROLLARME COMO PROFESIONISTA Y
POR SER MI SEGUNDA CASA YA QUE GRAN PARTE DE MI VIDA LA
PASAMOS JUNTAS.

A MIS PROFESORES DE LA FACULTAD

PORQUE GRACIAS A SU EJEMPLO ME DI CUENTA DE QUÉ CLASE
PROFESIONISTA QUERÍA SER, TOMANDO LO MEJOR DE USTEDES PERO
TAMBIÉN APRENDIENDO DE SUS ERRORES PARA NO COMETERLOS.
EN ESPECIAL MUCHÍSIMAS GRACIAS A:

PROF. ENRIQUE ANGELES

PORQUE GRACIAS A USTED LE ENCONTRÉ EL CARIÑO A LA QUÍMICA
ORGÁNICA Y A LA CARRERA PORQUE CUANDO MÁS DECEPCIONADA
ESTABA DE MI PARA SEGUIR EN ESTO, LLEGO SU CLASE Y ME DIO
ENERGÍA PARA CONTINUAR Y SOBRE TODO POR LA OPORTUNIDAD DE
DESARROLLAR ESTE BONITO TRABAJO. Y NO PUEDO DEJAR DE
NOMBRAR A: PROFA. MA. ESTHER REVUELTAS, PROFA. IDALIA AVILA,
PROF. PABLO LABAT, PROFA. ANDREA, PROFA. GUADALUPE SEVILLA,
MUCHAS GRACIAS POR SUS ENSEÑANZAS.

A LOS SINODALES

GRACIAS POR SU DISPOSICIÓN, APOYO, INTERÉS Y TIEMPO HACIA EL
PRESENTE TRABAJO.

AL CINVESTAV

POR SER UNA GRAN INSTITUCIÓN QUE ME PERMITIÓ REALIZAR ESTE TRABAJO Y BRINDARME TODAS LAS HERRAMIENTAS Y CONOCIMIENTOS PARA SACAR ADELANTE ESTE PROYECTO Y CONOCER EL HERMOSO LADO DE LA INVESTIGACIÓN.

A MI ASESOR RAÚL ARGÜELLO

PORQUE GRACIAS A SU PERSONA PUDE VER QUE LAS COSAS QUE SE HACEN, SE DEBEN HACER CON AMOR SEA CUAL SEA, PORQUE SIN AMOR NO TIENE CASO HACERLAS, PORQUE GRACIAS A SUS CONOCIMIENTOS Y ENSEÑANZAS ESTE TRABAJO SE PUDO LLEVAR A CABO, POR SU PACIENCIA Y DE DEDICACIÓN, PERO SOBRE TODO GRACIAS POR BRINDARME SU AMISTAD.

A LA DRA. GUADALUPE ORTEGA

GRACIAS POR SU GRAN APOYO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO Y POR BRINDARME LA OPORTUNIDAD DE APRENDER, QUE NO SOLO LA PARTE ACADÉMICA ES IMPORTANTE SINO TAMBIÉN LA CULTURAL Y LAS RELACIONES QUE PUEDES HACER CON LOS DEMÁS PARA QUE UN TRABAJO SEA DE CALIDAD.

A LOS INTEGRANTES DEL LABORATORIO 2

POR SU ENORME APOYO, PORQUE SIN SU AYUDA DEFINITIVAMENTE NO HUBIERA PODIDO EMPEZAR, DESARROLLAR Y CONCLUIR ESTE TRABAJO, MUCHAS GRACIAS POR COMPARTIR CONMIGO SUS CONOCIMIENTOS Y SU GRANITO O MEJOR DICHO GRANOTE DE ARENA PARA QUE ESTE TRABAJO SE PUDIERA REALIZAR, GRACIAS: LUISA, ROMEL, ARTURO, CLAUDIA, SARA, ROCIO, BLANQUITA, SR. RENE, CECILIA, JOSEFINA, AL PERSONAL DEL BIOTERIO: RAFA, LENIN. MUCHAS GRACIAS.

A LABORATORIOS LAFON S.A. DE C.V

PORQUE ME DIERON LA OPORTUNIDAD DE DESARROLLARME POR PRIMERA VEZ COMO PROFESIONISTA Y ME HAN APOYADO INCONDICIONALMENTE PARA LA CONCLUSIÓN DE ESTE TRABAJO, MUCHAS GRACIAS: DR. LAZARO OKON MILLAR, OMAR FARID, ANDREA, ANGELES, ALMA, LETY, LILI, ALEJANDRINA, VERO, HUGO, ELENA, GLORIA.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 2 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección del Dr. Raúl Argüello García Auxiliar de Investigación “I” y de la Dra. Guadalupe Ortega Pierres, Profesora Titular de tiempo completo y jefa del Departamento de Genética y Biología Molecular del mismo Centro, con la coasesoría del Dr. Enrique Angeles Anguiano, Profesor Titular “B” de tiempo completo de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	II
ABREVIATURAS.....	III
RESUMEN.....	IV
I. Introducción.....	1
1.1 Generalidades de <i>Giardia duodenalis</i> .	
1.2 Giardiasis. Patogenia y manifestaciones Clínicas.	
1.3 Diagnóstico de la giardiasis.	
1.4 Tratamiento de la giardiasis.	
1.5 Isoxazoles, preparación y usos clínicos	
1.6 Antecedentes directos	
II. Justificación	22
III. Objetivos	24
IV. Materiales y Métodos.....	25
4.1 Parásitos.	
4.2 Cultivo axénico de <i>Giardia duodenalis</i> .	
4.3 Agentes quimioterapéuticos.	
4.4 Determinación de CI ₅₀ y CLM de fármacos del grupo del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol.	
4.5 Técnica subcultivo en medio líquido.	
4.6 Ensayo de toxicidad en <i>Artemia salina</i> .	
4.7 Evaluación de la eficacia de isoxazoles en giardiosis experimental	
4.7.1 Animales experimentales	
4.7.2 Infección experimental de jerbos mongólicos (<i>Meriones unguiculatus</i>)	
4.7.3 Tratamiento con isoxazoles	
4.7.4 Cuantificación de trofozoítos en contenido de intestino delgado	
V. Resultados.....	33
5.1 Obtención de CI ₅₀ y CLM de fármacos del grupo del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol y su relación estructura actividad giardicida.	
5.2 Ensayo de toxicidad de los compuestos de la familia del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol con <i>Artemia salina</i>	
5.3 Eficacia terapéutica de compuestos del grupo del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol en jerbos mongólicos (<i>Meriones unguiculatus</i>) infectados con <i>G. duodenalis</i>	
VI. Discusión.....	49
VII. Conclusiones.....	55
VIII. Referencias.....	57
IX. Anexos.....	65

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla I	Dosis recomendadas y eficacia de los agentes usados contra <i>G. duodenalis</i>18
Tabla II	Estructuras químicas y pesos moleculares de los fármacos utilizados.26
Tabla III	Dosis usadas de los isoxazoles evaluados en el modelo de jerbos mongólicos30
Tabla IV	Datos obtenidos sobre la efectividad de los diferentes compuestos analizados contra trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> mostrando la probabilidad asociada con la prueba de <i>t</i> de student35
Tabla V	Actividad in vitro de nueve derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol contra trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i>37
Tabla VI	Actividad Tóxica de quince derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol sobre <i>Artemia salina</i>42
Tabla VII	Datos obtenidos sobre la efectividad de los diferentes compuestos analizados contra trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> en el modelo animal jerbos mongólicos mostrando la probabilidad asociada con la prueba de <i>t</i> de student para determinar si las medias de la muestra son diferentes.....47
Tabla VIII	Tabla comparativa de los fármacos más utilizados en el tratamiento contra <i>Giardia</i> y los isoxazoles.....52
Figura 1	Esquema representativo del Ciclo de vida de <i>Giardia duodenalis</i>3
Figuras 2 y 3	Morfología de quistes y trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i>4,5
Figura 4	Efecto de la concentración de quince derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol sobre la viabilidad de trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i>36
Figura 5	Efecto de la concentración de quince derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol sobre la viabilidad de nauplios de <i>Artemia salina</i>41
Figura 6	Efecto de diferentes dosis de tres derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol en jerbos mongólicos (<i>Meriones unguiculatus</i>) infectados con <i>G. duodenalis</i>48

ABREVIATURAS

°C	grados centígrados
CI ₅₀	concentración inhibitoria cincuenta
CLM/CI50	índice de concentración efectiva
DMSO	demetilsulfóxido
g	gramos
g	gravedades
h	horas
μl	microlitros
μM	micromolar
μm	micrómetros
mg	miligramos
M	concentración molar
CLM	concentración mínima letal
ml	mililitros
PBS	amortiguador de fosfatos salina
P.M.	Peso molecular
ppm	partes por millón
r	coeficiente de correlación
rpm	revoluciones por minuto
TYI-S-33	Medio con tripticasa (T) extracto de levadura (Y) Hierro (I) y Suero (S)

RESUMEN

Giardia duodenalis es un protozooario que afecta entre otros organismos a los humanos provocando alteraciones gastrointestinales. La giardiasis es adquirida por la ingestión de quistes generalmente por medio de agua o alimentos contaminados y una vez en el aparato digestivo se libera al trofozoíto cuyo hábitat es el duodeno. En países subdesarrollados la giardiasis es una de las causas de diarrea aguda persistente y se presenta predominantemente en niños. En algunas personas el gran número de parásitos que se fijan a la pared intestinal pueden causar irritación e inflamación de poca intensidad en la mucosa duodenal o yeyunal, con la consecuente diarrea aguda o crónica. Actualmente el tratamiento utilizado contra este parásito se basa en el uso de derivados nitroimidazólicos (5-nitroimidazoles) como metronidazol, tinidazol y ornidazol, además de la furazolidona, la nitazoxanida y el albendazol. Debido a que se cuenta con un reducido número de fármacos utilizados contra la giardiasis y al mal uso que en ocasiones se hace de ellos, particularmente en cuanto a la toma de la dosis recomendada, se ha ocasionado el desarrollo de resistencia en *Giardia* hacia dichos agentes.

En el presente trabajo se decidió evaluar la eficacia farmacológica de nueve compuestos de una serie de quince derivados de los 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol. Los isoaxazoles evaluados fueron los isoaxazol 7, isoaxazol 8, isoaxazol 9, isoaxazol 10, isoaxazol 11, isoaxazol 13, isoaxazol 14 e isoaxazol 15. Así, se determinó *in vitro* para cada fármaco la CI_{50} y CLM contra trofozoítos de *G. duodenalis*. Estos parámetros se utilizaron para definir la potencia giardicida de estos. Así mismo se analizó la biotoxicidad de los quince derivados empleando *Artemia salina* obteniendo la CI_{50} y CLM para cada derivado. Finalmente se

evaluó la eficacia de tres de los derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol contra *G. duodenalis* empleando un modelo de infección experimental (*Mongolian gerbils*).

Los resultados mostraron distinta potencia giardicida *in vitro* para los nueve derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol sobre *G. duodenalis*, siendo el más eficaz el isoaxazol número 13. Sin embargo, este no superó la potencia del isoaxazol número 3 evaluado anteriormente (Ramírez Cruz, 2003) donde se analizó la eficacia farmacológica de los primeros seis fármacos (isoaxazol 1 al isoaxazol 6) de la serie de quince derivados.

Los ensayos de biotoxicidad se realizaron empleando el modelo de *Artemia salina* y se determinó la CLM y CI_{50} para los quince compuestos, obteniendo así que la mayoría de los fármacos son poco tóxicos para *Artemia salina*, a excepción del Isox 6 que presentó toxicidad a muy bajas concentraciones del compuesto.

Finalmente los resultados obtenidos en cuanto a la eficacia farmacológica *in vitro* permitieron establecer las bases para evaluar la eficacia de estos compuestos en un modelo experimental (*Mongolian gerbils*). Se evaluaron así 2 derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol que fueron los más eficaces contra *G. duodenalis* (isoaxazol 3 e isoaxazol 13) además del isoaxazol 2 que presentó una eficacia baja a comparación de los dos primeros. Se observó que el mejor derivado contra *G. duodenalis* en este modelo experimental fue el isoaxazol número 3, seguido del isoaxazol 13, mientras que el isoaxazol-2 no tuvo prácticamente eficacia en estas mismas condiciones. Esto nos indica que la variación de los sustituyentes hace que la eficacia y toxicidad se modifique ya sea aumentándola como en el caso de los sustituyentes del isoaxazol número 3 y 13 o que la disminuya como es el caso del isoaxazol 2.

I.- INTRODUCCIÓN

En el grupo de los protozoarios se encuentran cerca de 20 especies que son patógenas para el hombre, y que son causa principal de graves enfermedades y en algunos casos pueden provocar la muerte del hospedero que infectan (Stanier, 2002). Este hecho ha motivado que desde hace mucho tiempo se busquen opciones de tratamiento para las infecciones ocasionadas por estos microorganismos.

Se ha estimado que una tercera parte de la población mundial está infectada con parásitos y que el número anual de muertes debido a enfermedades parasitarias es del orden de varios millones (Warren, 1988). Las condiciones de pobreza extrema, los malos hábitos alimenticios y la falta de higiene hacen más susceptible a la población mexicana para contraer fácilmente las enfermedades provocadas por protozoarios parásitos los cuales tienen una organización unicelular simple pudiéndose replicar directamente en circulación sanguínea, en tracto intestinal o tejidos del hospedero. Entre estos destaca por su frecuencia de detección el parásito *Giardia duodenalis* también conocida como *G. lamblia*, o *G. intestinalis*.

G. duodenalis presenta dos fases en su ciclo de vida: el quiste, que es la forma latente o carente de movimiento y que presenta pared, y el trofozoíto que es la forma activa (Martínez, 1991). Algunos de los protozoarios presentan la característica de que parte de su ciclo de vida lo pasan dentro del hospedero y otra parte lo hacen fuera de éste. Es de gran importancia referirnos en este caso al protozoario *G. duodenalis* dado que es uno de los parásitos intestinales que se detectan con mayor frecuencia en individuos infectados en

nuestro país y es el modelo que se propuso para estudiar los efectos de compuestos químicos en la viabilidad de este organismo.

1.1 GENERALIDADES DE *Giardia duodenalis*

Giardia fue inicialmente descrita por Leeuwenhoek en 1681 cuando examinaba en el microscopio sus propias heces diarreicas. Este organismo fue descrito más detalladamente por Lambl en 1859, y lo nombró *Cercomonas intestinalis*. En 1988 Blanchard sugiere el nombre *Lambliia intestinalis* el cual fue cambiado por Stiles en 1920 por *Giardia duodenalis*. Actualmente existen sinónimos para este parásito como son: *Giardia lamblia*, *Giardia duodenalis*, *Giardia intestinalis* (Adam, 2001).

G. duodenalis es un protozoo que parasita el intestino delgado. *Giardia* infecta aproximadamente al 2% de adultos y del 6 al 8% de los niños en los países desarrollados del mundo (Gardner y Hill, 2001). A pesar de que se ha estudiado la enfermedad clínica causada por *G. duodenalis* los últimos 40 años, aproximadamente 5000 personas son hospitalizadas por giardiasis al año en Estados Unidos y millones son infectados a nivel mundial en Latino América, África, Asia y Rusia (Gardner y Hill, 2001).

El ciclo de vida de *G. duodenalis* tiene dos fases evolutivas: la de trofozoito y la de quiste. El quiste es la forma infectante y se ingiere por tomar agua o comer alimentos contaminados con el parásito o directamente por contacto oral -fecal. (Gardner y Hill, 2001) Se ha reportado que solo se requieren 10 quistes para que se pueda establecer la infección. Después de la ingestión ocurre el desenquistamiento y éste se inicia por la acción de los ácidos gástricos, con una secuencia coordinada de eventos que dan lugar a la formación de trofozoítos. El trofozoito infecta el duodeno y la parte alta del intestino el cual tiene un pH alcalino favorable para el establecimiento del parásito el cual causa una

sintomatología que incluye diarrea, dolor abdominal y pérdida rápida de peso. La reproducción en *Giardia* parece estar limitada sólo a la fisión binaria (Tibayrenc y cols., 1991). El trofozoíto pasa del intestino delgado a colon donde ocurre el enquistamiento. Este puede inducirse *in vitro* empleando un medio con baja concentración de colesterol o en un medio con alta concentración de bilis y un pH alcalino (Gillin y cols, 1987; Argüello García y cols., 2002). La inducción del enquistamiento se caracteriza por la producción de proteínas de la pared del quiste que se expresan, se almacenan dentro de vesículas y son transportadas a la pared de la célula aproximadamente de 14 a 16 h post inducción, formándose posteriormente la malla fibrilar de la pared gástrica (Reiner y cols ,1991; Erlandsen y cols,1996; Argüello García y cols, 2002) (Figura 1).

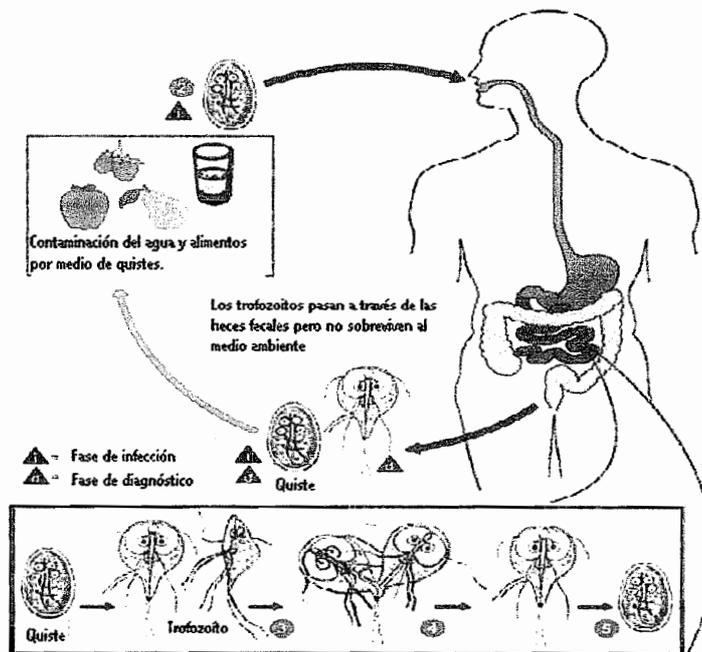


Figura 1: Ciclo de vida de *Giardia duodenalis*
(<http://images.google.com/>)

Estructura del quiste. Este mide aproximadamente 5 μm por 7 a 10 μm de diámetro y está cubierto por una pared que tiene 0.3 a 0.5 μm de espesor y que está compuesta de una capa exterior filamentososa y una capa interior membranosa. Esta es la forma más estable en el ambiente dentro del ciclo de vida de *Giardia*. (ver figura 2)

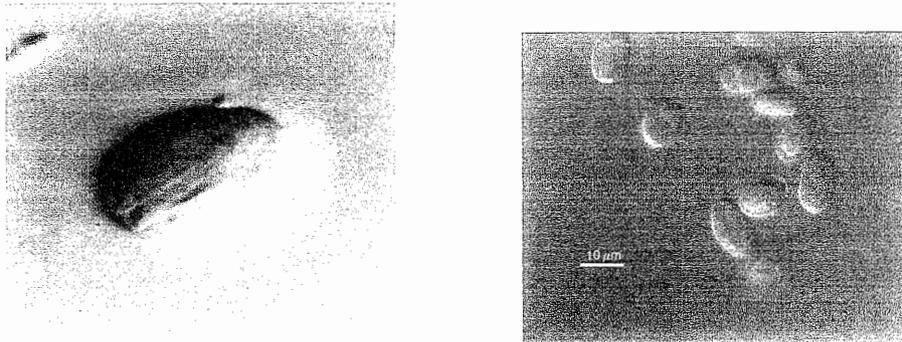


Figura 2.- Quistes de *Giardia duodenalis* observados bajo microscopio óptico (45x) (<http://images.google.com/>)

Estructura del trofozoíto. *G. duodenalis* tiene forma de pera aplanada ventralmente y mide aproximadamente de 12-15 μm de largo y de 5 a 9 μm de ancho. El citoesqueleto incluye un cuerpo medio, cuatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal y ventral), y un disco ventral que ocupa gran parte de la superficie ventral. Los trofozoítos tienen dos núcleos con cariosomas centrales prominentes y dos axostilos (organelos de soporte con aspectos de bastones), contienen vacuolas lisosomales, un ribosoma y gránulos presentes en el citoplasma, (Adam, 1991; Thompson y cols., 1993)(Figura3) así como mitosomas, los cuales no generan ATP, sino que son factores para el ensamble de hierro con azufre el cual se necesita para poder generar ATP(Tovar y cols 2003). El citoesqueleto es ahora

considerado una característica distintiva de las células eucariontes, precediendo y permitiendo la adquisición del núcleo en la evolución de las células eucariontes. El citoesqueleto se encuentra dividido en cuatro componentes básicos: (1) microtúbulos compuestos por tubulina y asociados con proteínas, (2) microfilamentos compuestos de actina y asociados a proteínas, (3) filamentos intermediarios asociados a proteínas; y (4) proteínas motoras asociadas con microfilamentos o microtúbulos (Elmendorf y cols., 2003). El disco ventral de *Giardia* tiene una forma cóncava y esta forma permite su adhesión al epitelio digestivo (Sousa y cols., 2001) (ver figura 3).

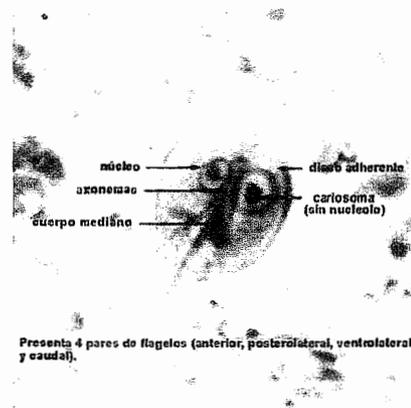


Figura 3: Estructura de un trofozoíto de *Giardia duodenalis*
(<http://images.google.com/>)

1.2 GIARDIASIS, PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La patogenia de *Giardia* no se ha caracterizado totalmente pero implica daño a las microvellosidades. Estos daños están relacionados con deficiencias en la actividad enzimática y de absorción, las cuales se restablecen después de haber seguido un

tratamiento. Una vez que desenquistamiento ocurre *Giardia* en su forma de trofozoíto usa su flajelo para dirigirse a las microvellosidades donde atacan a los enterocitos usando su disco ventral las lectinas que se encuentran en la superficie de *Giardia* se unen a los carbohidratos de los enterocitos y el daño comienza en las microvellosidades obstruyendo la absorción de nutrientes, este proceso ocasiona atrofia de las vellosidades, hiperplasia de las criptas, hiperpermeabilidad del intestino, estos efectos causan la reducción de la secreción de la enzima disacaridasa. Recientemente se ha demostrado que hay sustancias citopáticas como las glicoproteínas, proteinasas, y lectinas que causan directamente el daño en la mucosa intestinal (Hawrelak, 2003). *Giardia* presenta una gran variación antigénica tanto en número como en peso desde aproximadamente 50 a 200 kDa en un estudio de 19 isotipos. En cepa WB se identificó que presenta el antígeno llamado primeramente CRP170 pero ahora llamado VSPA6, *Giardia* expresa una gran variedad de VSP's en un rango de peso de 50 a 170 kDa. (Adam, 2001). Los síntomas que presentan las personas infectadas por este parásito son: diarrea, dolor abdominal y pérdida rápida de peso (Thompson, 1993). Se pueden encontrar quistes en gran cantidad en las heces de personas asintomáticas. Sin embargo, a veces el gran número de parásitos fijados a la pared intestinal puede causar irritación e inflamación de poca intensidad en la mucosa duodenal o yeyunal, con la consecuente diarrea aguda o crónica acompañada de hipertrofia de las criptas, atrofia y aplanamiento de las vellosidades y daño a las células epiteliales. A veces las heces son acuosas o semisólidas, grasosas, voluminosas y fétidas en diferentes momentos durante el curso de la infección. Puede presentarse malestar, debilidad, pérdida de peso, distensión, cólicos abdominales y flatulencia. Los niños son más susceptibles a la giardiasis que los adultos. Las personas inmunodeficientes se encuentran en riesgo especial de infección

masiva con manifestaciones clínicas graves. En estos pacientes, los síntomas pueden prolongarse durante mucho tiempo (Jawetz y cols., 1998).

En los casos con síntomas, estos aparecen aproximadamente entre 1 y 2 semanas después de la infección, después del cual se presenta un periodo de incubación cercano a los 8 días, presentándose los trastornos ya mencionados. Cuando estas personas no son tratadas, entre un 30 y 50 % de estos pacientes desarrollan esteatorrea y pérdida de peso. Se ha observado que una alta carga parasitaria interfiere con los mecanismos de absorción de grasas y vitaminas liposolubles, así como con la absorción de lactosa, glucosa, xilosa, vitamina A, B12 y ácido fólico (Olivares y cols., 2001).

G. duodenalis tiene distribución cosmopolita y es el parásito intestinal más común en los humanos. En Asia, África y Latino América cerca de 200 millones de personas tienen síntomas de giardiosis y cerca de 500,000 nuevos casos son reportados cada año (OMS, 1996). Así mismo es muy frecuente encontrar al parásito en animales domésticos especialmente en animales de granja, perros y gatos, y numerosas especies de animales salvajes (Thompson, 2000).

1.3 DIAGNOSTICO DE LA GIARDIASIS

El diagnóstico depende del hallazgo de quistes característicos en las heces formadas, o de quistes y trofozoitos en las heces líquidas mediante exámenes coproparasitológicos (CPS). (Wolf y cols., 1990) De forma reciente, el análisis de inmunoabsorción ligada a enzimas en las heces (coproELISA) disponible comercialmente, ha demostrado ser una herramienta rápida, sensible y específica (Seradyn Color Vue-Giardia: laboratorios LMD). Se ha estudiado y estandarizado el ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas para detectar

antígeno de *Giardia* en heces usando anticuerpos monoclonales de conejo (Duque y cols., 2002).

En ocasiones se requiere examen del contenido duodenal para establecer el diagnóstico, puesto que la producción de quistes puede ser esporádica y estos no se encuentran en las heces cuando se practica un frotis fecal en búsqueda de quistes y trofozoítos. Por lo tanto, se recomienda una serie de tres o más exámenes en días alternos ya que se ha observado que la expulsión de quistes ocurre en forma intermitente. La aspiración duodenal o la técnica con cápsula duodenal (Entero-Test) puede ser superior al examen fecal para el diagnóstico. (Jawetz, 1998).

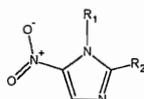
1.4 TRATAMIENTO DE LA GIARDIASIS

Al paso del tiempo se han buscado nuevas opciones de tratamiento para la giardiasis debido a que muchos de los fármacos utilizados causan efectos adversos en el paciente, así como una resistencia desarrollada por el parásito debido en parte a que los pacientes no cumplen con el régimen indicado para el tratamiento; es por eso que a continuación se describen algunos de los agentes usados contra *Giardia*.

Nitroimidazoles

Dentro de estos se encuentran el metronidazol, tinidazol, ornidazol, y secnidazol. Esta clase de compuestos fueron descubiertos en 1955 y se encontró que funcionaban contra una gran variedad de protozoarios, entre ellos *Giardia duodenalis*. El aislamiento del antibiótico azomicina (2-nitroimidazol) a partir de un estreptomiceto por Maeda y colaboradores en 1953, y la demostración de sus propiedades tricomocidas por Horie (1956) condujeron a la síntesis química y a las pruebas biológicas de muchos nitroimidazoles (Goodman, 2003).

Un compuesto, el 1-(β-hidroxietil)- 2-metil- 5nitroimidazol, ahora denominado metronidazol tuvo actividad en especial alta *in vitro* e *in vivo* contra los protozoarios *T. vaginalis* y *E. histolytica* (Cosar y cols., 1961). Estudios posteriores revelaron que el metronidazol, tuvo actividad clínica en extremo útil contra diversos anaerobios patógenos que incluyeron bacterias tanto gramnegativas como grampositivas, además del protozoario *G. duodenalis*. Además del metronidazol se dispone de otros 5-nitroimidazoles eficaces en el tratamiento de la giardiosis en humanos y cuya actividad y estructura es muy similar a la del metronidazol y las cuales se muestran a continuación (Litter, 1984):



Estructura general de los Nitroimidazoles

DERIVADOS	R ₁	R ₂
Metronidazol		CH ₃
Ornidazol		CH ₃
Tinidazol		CH ₃
Secnidazol		CH ₃
Ronidazol	CH ₃	CH ₂ OOCNH ₂

CUADRO A: Estructuras químicas de los derivados del nitroimidazol

El metronidazol ha sido el más estudiado en cuanto a la forma de acción. Este agente utiliza el metabolismo anaeróbico presente en *Giardia*. El fármaco entra al trofozoito y una vez que ha penetrado, la proteína ferredoxina dona electrones al grupo nitro del fármaco,

activándola por la reducción de este grupo. El metronidazol se absorbe rápido y completamente después de la administración oral y penetra a los tejidos del cuerpo y secreciones como saliva, semen y secreciones vaginales. El fármaco es metabolizado por el hígado y es excretada por la orina (Gardner y Hill, 2001).

El metronidazol y otros nitroimidazoles sensibilizan células tumorales y tóxicas a los efectos de la radiación ionizante, pero el compuesto en cuestión no se ha usado en seres humanos para tal finalidad (Goodman y cols., 2003)

Efectos adversos. Se han efectuado revisiones de la toxicidad del metronidazol (Roe, 1977; Lau y cols., 1992). Los efectos adversos sólo en contadas ocasiones alcanzan intensidad suficiente para interrumpir el fármaco. Los más comunes son cefaleas, náuseas, xerostomía y un sabor metálico. A veces surgen vómitos, diarrea, y molestia abdominal. Durante la terapéutica puede observarse lengua saburral, glositis y estomatitis y estas se acompañan de una intensificación repentina de moniliasis. Entre los efectos neurotóxicos que obligan a interrumpir el tratamiento con metronidazol están mareos, vértigos y, en pocas ocasiones, encefalopatía, convulsiones, incoordinación y ataxia (Goodman y cols., 2003).

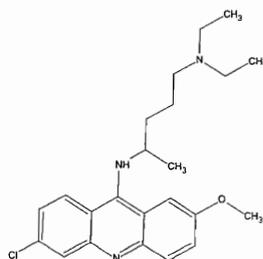
El metronidazol a dosis altas y por largo tiempo es carcinógeno en roedores; en bacterias también es mutágeno (Lau y cols., 1992). La actividad mutágena es propia del metronidazol y de varios metabolitos que aparecen en la orina de sujetos tratados con dosis terapéuticas del medicamento (Goodman y cols., 2003).

Derivados de Acridina

Quinacrina: Es un colorante de origen sintético de color amarillo que deriva de la acridina y se emplea como clorhidrato. La quinacrina posee una potente acción tenífuga en las infecciones por céstodos como la *Taenia saginata*, *T. solium* e *Hymenolempis nana*, a los cuales no mata, sino que deprime, relaja el escólex y los desprende de la mucosa duodenal,

eliminándose luego el cestodo generalmente vivo y teñido de amarillo por el colorante (Litter, 1984). Este compuesto fue introducido por primera vez como un agente, contra la malaria en 1930. El modo de acción de este agente no ha sido descrito totalmente, sin embargo, se sabe que el fármaco se intercala en el DNA de *G. duodenalis* y esta interacción es la causa de la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos. Se ha reportado que *in vitro* la quinacrina reduce la viabilidad de los quistes y su desenquistamiento. En otros estudios realizados *in vitro* se ha observado que la eficacia de la quinacrina y metronidazol es la misma (Gardner y Hill, 2001).

Efectos adversos. La quinacrina a dosis elevadas, por su acción estimulante central produce convulsiones epileptiformes, psicosis tóxicas e inclusive la muerte por parálisis respiratoria. Dado que este compuesto es irritante local, cuando se administra por vía oral puede producir náuseas, vómitos y diarrea con bastante frecuencia. Así mismo se ha observado que tiene efecto sobre el sistema cardiovascular, ya que produce depresión de la contractilidad cardíaca, de la conducción auriculoventricular, y posee acción antifibrilante. La inyección intravenosa rápida produce caída de la presión arterial por depresión cardíaca y del centro vasomotor que puede ocasionar la muerte (Litter, 1984).



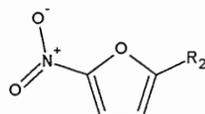
Estructura química de la Quinacrina

Nitrofuranos

Los nitrofuranos son fármacos sintéticos derivados del furano. El agregar un grupo nitro en la posición 5 del furano, le confiere acciones antimicrobianas, que le son reforzadas por la adición de cadenas laterales en la posición dos: así nació la nitrofurazona; la inducción del núcleo de la hidantoína en la cadena lateral da la nitrofurantoina y el remplazo de la hidantoína por la oxazolidinona produce la furazolidona. A continuación se muestran sus estructuras (Litter, 1984).



Furano



Nitrofurano

DERIVADOS	R ₂
Nitrofurazona	
Nitrofurantoina	 hidantoína
Furazolidona	 oxazolidinona

CUADRO B: Estructura química de los derivados del nitrofurano

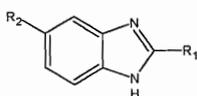
Furazolidona: Este es uno de los compuestos dentro del grupo de los nitrofuranos usados desde que fueron descubiertos en 1940. Este es muy efectivo contra muchas bacterias; entre ellas se encuentran *Klebsiella spp.*, *Clostridium spp.* y *Escherichia coli* y fue aprobada en Estados Unidos como tratamiento contra *Giardia*.

El mecanismo de acción de este fármaco no está completamente dilucidado. El fármaco se activa dentro del trofozoito de *Giardia* por medio de una reducción que ocurre por la vía NADH oxidasa. Este compuesto tiene un efecto mortal que está relacionado con la toxicidad de los productos reducidos que tienen un daño importante en los componentes celulares incluyendo el DNA. Este fármaco es más activa que la quinacrina, es mutagénica en bacterias y se ha demostrado que causa tumores mamarios en ratas y tumores pulmonares en ratón cuando se les administra en grandes dosis (Gardner y Hill, 2001).

Efectos adversos. Náuseas, vómito, diarrea, orina con coloración oscura, reacción inhibitoria de la monoamino oxidasa, hemólisis en pacientes con deficiencia de G6PDH, debilidad y atrofia en los miembros. (Gardner y Hill, 2001)

Bencimidazoles

En 1961 se introdujeron en el tratamiento de infecciones parasitarias un importante grupo de antihelmínticos, como el bencimidazol, el tiabendazol y aún se siguen usando; posteriormente aparecieron el mebendazol y albendazol y son usados en gran cantidad de países (Edlind y cols., 1990), sus estructuras se presentan en el siguiente cuadro (Goodman y cols., 2003).



Bencimidazol

DERIVADOS	R ₁	R ₂
Tiabendazol		H-
Mebendazol	-NHCO ₂ CH ₃	
Albendazol	-NHCO ₂ CH ₃	CH ₃ CH ₂ CH ₂ S-

CUADRO C: Estructura química de los derivados del bencimidazol

Los bencimidazoles ejercen su efecto tóxico sobre *Giardia* uniéndose a la β-tubulina presente en el citoesqueleto. Esta unión causa una inhibición de la polimerización del citoesqueleto y altera la retoma de glucosa. La combinación de albendazol y metronidazol presenta un 100% de efectividad en pacientes que presentaban trofozoítos resistentes a metronidazol (Cocopardo y cols, 2001). Otra ventaja de los bencimidazoles es que presentan pocos efectos adversos (Gardner y Hill, 2001).

Efectos adversos. El uso clínico del tiabendazol tiene como factor restrictivo su toxicidad.

Los efectos adversos que suelen aparecer con dosis terapéuticas del fármaco son anorexia, náuseas, vómito y mareos. Con menor frecuencia hay diarrea, cansancio, somnolencia, inquietud y cefalea. También se ha señalado a veces cristaluria, sin hematuria que desaparece al interrumpir el tratamiento (Goodman y cols., 2003).

A diferencia del tiabendazol, el mebendazol no ocasiona toxicidad sistémica notable con el uso habitual, incluso en casos de anemia y desnutrición; ello quizá es consecuencia de su poca biodisponibilidad sistémica (Goodman y cols. 2003).

Entre los efectos adversos poco frecuentes de personas que reciben dosis altas de mebendazol están reacciones alérgicas, alopecia, neutropenia reversible, agranulocitosis e hipospermia. El mebendazol es un embriotóxico y teratógeno potente en animales de laboratorio y puede ejercer sus efectos en ratas preñadas con dosis orales únicas, incluso de 10 mg/Kg de peso (Goodman y cols., 2003).

El albendazol ocasiona pocos efectos adversos si se utiliza por corto tiempo contra la helmintiasis gastrointestinal. En ocasiones hay dolor abdominal, diarrea, náuseas, mareos, y cefalea transitorios. Los bencimidazoles como grupo muestran notoriamente pocas interacciones importantes con otros fármacos (Goodman y cols., 2003).

Nitrotiazoles

La nitazoxanida es un derivado del 5-nitrotiazol con un amplio espectro de actividad contra protozoarios, helmintos, y algunas bacterias (Gardner y Hill, 2001).

La nitazoxanida reporta una CI_{50} de 0.004 $\mu\text{g/ml}$ y una IC_{90} de 0.067 $\mu\text{g/ml}$ contra *G. duodenalis* obtenidas por el método de subcultivo, en el cual la nitazoxanida resultó ser mas eficaz contra *G. duodenalis* que el metronidazol (Cedillo y cols., 2002)

La nitazoxanida es un fármaco relativamente nuevo pues fue lanzado al mercado en 1996.

La nitazoxanida es un inhibidor de la ferredoxín óxido reductasa descrita en 1984 para su utilización en el tratamiento de infecciones por *Taenia saginata* e *Hymenolepis nana*.

Recientemente se hicieron estudios que probaron su eficacia contra protozoarios y bacterias anaerobias, específicamente *Trichomonas vaginalis*, *E. histolytica* y *Clostridium perfringens* y en el organismo microaerofílico *Helicobacter pylori*.

La nitazoxanida se ha probado en diferentes estudios doble ciego en infecciones con *E. histolytica*, *E. dispar* y *G. duodenalis*. Los resultados muestran que el 81% de los pacientes

tratados con el fármaco controlan la diarrea y los síntomas asociados siete días después del inicio del tratamiento, comparado con el 40% de los individuos tratados con placebo ($P=0.0002$). El fármaco también muestra actividad contra *C. parvum*. Las dosis recomendadas y probadas en los estudios mencionados fueron de 7.5 mg/kg de peso administrados cada 12 horas durante 3 días, lo que corresponde en adultos y adolescentes a 500 mg durante 3 días, 200 mg en niños de 4- 11 años y 100 mg en menores de 3 años .

Otra de las peculiaridades de la nitazoxanida es su actividad contra helmintos comunes. En Perú se realizó un estudio clínico controlado en enfermos con ascariasis, donde se encontró que la nitazoxanida tiene efectos comparables a las dosis terapéuticas del praziquantel en himenolepiasis, y mostró una tasa de curación más alta que el albendazol en la tricuriasis . En México y Egipto se evaluó también la eficiencia de la nitazoxanida en infecciones por protozoarios y helmintos en 246 y 546 pacientes, respectivamente, obteniendo tasas de curación entre el 71 y 100% en protozoarios y 75 y 100% en helmintos, en este último caso la tasa de reducción del número de huevos excretados en muestras fecales fue de 99 a 100% (Ximénez, 2002).

En noviembre y diciembre de 2002 se llevó a cabo una campaña de desparasitación con nitazoxanida en la población derechohabiente de Petróleos Mexicanos, en Minatitlán, Veracruz, y realizamos un estudio transversal descriptivo para evaluar la prevalencia e intensidad de reacciones adversas hacia dicho fármaco. Presentando las siguientes reacciones adversas, sobre todo por urticaria, vómito, diarrea (Rodríguez, 2004).

Para alcanzar el 100% de mortalidad (sensibilidad o susceptibilidad) se necesitó una concentración de 1 a 7 $\mu\text{g/mL}$ de Nitazoxanida. Cuando se comparó la susceptibilidad de los aislados a la Nitazoxanida se encontraron diferencias significativas entre ellos ($P <$:

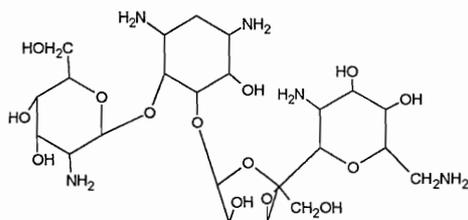
0.001). Los fármacos produjeron aumento de volumen y menor electrodensidad del citoplasma y núcleos en *Giardia*. La sensibilidad *in vitro* de *G. duodenalis* a Nitazoxanida, en aislados de diferentes huéspedes Debido a la deformación de los trofozoítos, se sugiere que la Nitazoxanida induce modificaciones en la membrana y lisis celular. (Ponce, 2001).

Aminoglucósidos

Son antibióticos de espectro reducido y predominantemente bactericidas que igual que la estreptomina, son glucósidos con dos o tres moléculas de azúcares que llevan grupos aminos (Litter, 1984). Dentro de los aminoglucósidos se encuentra la paromomicina, aislado a partir de cultivos de *Streptomyces rimosus*, que muestra relación estructural con la neomicina, y comparte la mayor parte de las propiedades antibacterianas de otros antibióticos de esta clase. De hecho, la paromomicina está autorizada en Europa para el tratamiento por vía parenteral de infecciones bacterianas que se cree muestran respuesta a los aminoglucósidos. La paromomicina actúa de manera directa en amibas pero también posee actividad antibacteriana contra microorganismos normales y patógenos en vías gastrointestinales. Además de su utilidad en el tratamiento de la amibiasis, la paromomicina tiene empleo en la terapéutica de otras infecciones generadas por protozoarios como es el caso de *G. duodenalis* (Goodman y cols., 2003).

La paromomicina es utilizada como tratamiento contra *Giardia* cuando por este parásito presenta resistencia a los compuestos generalmente utilizados como el metronidazol o albendazol, y se utiliza también en el embarazo. La paromomicina es absorbida muy poco en intestino aún en dosis prolongadas se presenta en concentraciones mínimas en sangre y orina en pacientes con función renal normal. La paromomicina inhibe la síntesis de proteínas de *G. duodenalis* por interferencia de la subunidad ribosomal 50S y 30S y causa

una mala traducción del RNA mensajero. La actividad de la paromomicina es generalmente baja en comparación con los nitroimidazoles, quinanicrina o furazolidona (Gardner y Hill, 2001).



Estructura de la Paromomicina

Efectos adversos. Ototoxicidad, nefrotoxicidad, bloqueo neuromuscular. En general, los aminoglucósidos poseen escaso potencial alérgico y son infrecuentes la anafilaxia y las erupciones cutáneas. Se han señalado reacciones ocasionales de hipersensibilidad que incluyen erupciones, eosinofilia, fiebre, angioedema, estomatitis y choque anafiláctico.

Tabla I: Dosis recomendadas y eficacia de los agentes usados contra *G. duodenalis*. (Gardner y Hill, 2001)

AGENTE	DOSIS ADULTO	DOSIS PEDIATRICA	EFICACIA
Metronidazol	250mg tres veces al día x 7 días	5mg 3 veces al día x 5-7 días	90-100%
Ornidazol	Dosis única de 2g	Dosis única de 40-50	92-100%
Tinidazol	Dosis única de 2 g	Dosis única de 50mg	86-100%
Quinanicrina	100mg 3 veces al día x 5-7días	2mg 3 veces al día x 7 días	95-100%
Furazolidona	100mg 4 veces al día x 7 días	2mg 4 veces al día x 10 días	80-96%
Albendazol	Dosis de 400mg x 5 días	15mgx 5-7 días (max. 400mg)	94-100%
Paromomicina	500mg 3 veces al día x 5-7 días	30 mg/Kg/día en tres dosis por 5-10 días	55-88%

1.5 ISOXAZOLES, PREPARACION Y USOS CLÍNICOS

Los isoxazoles son compuestos relativamente nuevos en el mercado. Hay pocos estudios acerca de ellos y sus usos pueden ser variados, dado que los isoxazoles son importantes intermediarios sintéticos (Grünanger, 1991; Lang, 1984). La explotación de una simple molécula con diferentes funciones para la síntesis de heterociclos es una valiosa contribución en la química heterocíclica. Existen numerosos métodos sintéticos para la preparación de isoxazoles: uno de ellos es utilizando el 6-carbetox-3,5 diarilciclohexano que ha sido usado como materia prima en algunos procesos de síntesis de benzoselenodiazoles/tiadiazoles, espirociclohexanos (Padmavathi,1999), derivados del carbazo (Padmavathi,1999), y en la fusión de isoxazoles y pirazoles (Padmavathi,1999). El método más utilizado para la preparación de isoxazoles es la 1,3 cicloadición en olefinas o acetilenos con óxido de nitrilo (Grundmann, 1971; Paton, 1995). Algunos isoxazoles con una actividad biológica son los que presentan sustitución en la posición 3,5 y como ejemplo se encuentran el muscimol (Chiarino, 1986), el dihidromuscimol (De Amici, 2004) y la cicloserina entre otros. Algunos usos reportados de diferentes isoxazoles son: como antiviral específicamente sobre el virus de herpes (HSV-1) (de Julian-Ortiz, 1999), en desórdenes cardiovasculares (Odo Norio, 1988) y como antihelmíntico en dosis de 16 a 500 mg/Kg administrado oralmente en ratas (Carr, 1977).

Los derivados de isoxazoles se han sintetizado con la finalidad de estudiar su actividad biológica en numerosas investigaciones químicas. Algunos de estos compuestos se usan en el tratamiento de algunas infecciones (Patterson y cols., 1992). En cuanto a su potencial farmacológico, algunos han sido estudiados en ensayos clínicos (Knecht y cols., 1998). Otros actúan como agonistas muscarínicos (Lenz y cols., 1994), anticonvulsivos

(Eddington y cols., 2002), antiinflamatorios (Mazzei y cols.,1999), fungicidas (Raffa y cols.,1999), antitrombóticos (Batra y cols.2004) y agentes con actividad inmunológica. Esta acción ha sido investigada experimentalmente en numerosos ensayos *in vitro* e *in vivo* en modelos en ratones y en humanos (Jeziarska y cols., 2004).

Los isoxazoles que se evaluaron en este trabajo pertenecen a los estirilisoaxoles, los cuales poseen una base similar al nitroimidazol el cual se encuentra presente en el metronidazol, tinidazol y ornidazol actualmente utilizados para el tratamiento de *Giardia duodenalis*. Es por esto que se decidió estudiar a los isoxazoles ya que pueden ser una nueva alternativa para el tratamiento de la giardiosis.

1.6 ANTECEDENTES DIRECTOS

Como antecedente directo a este trabajo se encuentra un estudio previo que se llevó a cabo en nuestro grupo de investigación (Ramírez Cruz, 2003) en el cual se evaluó la eficacia de los seis primeros derivados del grupo del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol de una serie de quince compuestos (Tabla II), determinándose para cada fármaco la CI_{50} y la CLM como parámetros de la potencia de estos. Así mismo se analizó el modo de acción del compuesto más eficaz sobre *Giardia duodenalis*, el cual resulto ser el isoxazol 3 [3-metil-4-nitro-5-(2-*p* hidroxifenil)etenil] isoxazol . Para ello se emplearon tres métodos bioquímicos, que incluyeron tinción con azul de tripano (AT), reducción de sales de tetrazolio (MTT) y tinción de colorantes fluorogénicos (FDA-PI). Finalmente se determinó de manera preliminar la posible toxicidad de dichos compuestos empleando el modelo de *Artemia salina*.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluyó que los seis derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilsoxazol poseen actividad antiparasitaria contra *G. duodenalis*, presentando una eficacia distinta en función de los sustituyentes en la posiciones 4 y 5.

Con base en los valores de CI_{50} y CLM experimentales, el derivado de mayor eficacia *in vitro* fue el isoxazol 3 [3-metil-4-nitro-5-(2- *p*- hidroxifenil)etenil] isoxazol cuyo principal modo de acción es a nivel de membrana celular de *G. duodenalis*. Los datos sobre toxicidad con *Artemia salina* sugirieron que los isoxazoles 1 (3,5dimetilisoxazol) y el isoxazo 2 (3,5-dimetil-4-nitroisoxazol) presentaron mayor toxicidad que el resto de los compuestos que presentaron una toxicidad relativamente menor. Tomando en cuenta el efecto biotóxico y giardicida de estos derivados, es posible que el sustituyente nitro en posición 4 le confiera menor toxicidad a estos compuestos, mientras que el efecto giardicida radica en la posición 5 del anillo.

De acuerdo a estos antecedentes, se hace necesario dar continuidad al estudio de los isoxazoles, específicamente de los derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilsoxazol y poder empezar a sentar las bases para buscar la aplicación de este tipo de compuestos a nivel terapéutico.

II.- JUSTIFICACIÓN

Debido al impacto que poseen actualmente las enfermedades parasitarias en el campo de la salud y sobre todo en los países en desarrollo como es el caso de México, es necesario buscar alternativas para el tratamiento de aquellas enfermedades que cada vez son más frecuentes y que son causa de morbilidad a nivel mundial como es el caso de la giardiasis. Actualmente, *Giardia duodenalis* es el parásito intestinal más común identificado a nivel mundial. En los países industrializados las infecciones por *G. duodenalis* abarcan de 2 al 7 % considerando que en países como México la prevalencia abarca del 20 al 60% (Thompson, 1990). Actualmente dentro de los antiparasitarios eficientes en el tratamiento de giardiasis se encuentran los mencionados en la tabla I. En años recientes, desafortunadamente, se han reportado casos de resistencia en particular al metronidazol que han sido asociados a una tasa de recurrencia del 90 % y una prevalencia de resistencia de un 20 % (Upcroft, 2001); además de que algunos fármacos están contraindicados en determinadas situaciones clínicas y poseen varios efectos secundarios muy serios a tal grado que en países como Estados Unidos se encuentra prohibido su consumo. Tal es el caso del ornidazol, el tinidazol y la quinacrina (Gardner 2001). Por lo anterior, es necesario llevar a cabo la síntesis y la evaluación de nuevos fármacos para el tratamiento de la giardiasis. En este contexto, se propone evaluar un nuevo grupo de compuestos químicos como es el caso de los derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol. Una de las razones por la que es importante evaluar estos compuestos contra de *G. duodenalis* es porque este tipo de compuestos son actualmente utilizados como fungicidas y bactericidas (Kai, 1999), aunque también se ha reportado que poseen un efecto antihelmíntico (Carr y cols, 1977), e incluso antiviral (De Julian y cols., 1999). Actualmente la información disponible es moderada, por lo que se requiere realizar más estudios que permitan valorar su utilidad en

el tratamiento de la giardiasis. En este contexto, en el presente trabajo se evaluaron nuevos compuestos con posible uso en el tratamiento de la giardiasis. Este nuevo grupo de agentes químicos llamados isoxazoles, tienen una estructura similar a la del nitroimidazol y poseen una gran variedad de grupos funcionales que podrían aumentar la actividad biológica eficazmente. Así en este estudio, se seleccionaron los mejores compuestos de acuerdo a los resultados obtenidos en cuanto a eficacia, potencia y baja toxicidad. También se propuso obtener una complementariedad con trabajos anteriores donde ya se han evaluado este tipo de compuestos (Ramírez Cruz, 2003), a fin de establecer una base para trabajos posteriores donde se podrían evaluar la genotoxicidad, el diseño de una presentación farmacéutica y la determinación de posibles posologías para su uso en humanos.

III.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad de algunos derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoazol contra el parásito *Giardia duodenalis* tanto en cultivos *in vitro* de trofozoítos como en un modelo de infección experimental (*Meriones unguiculatus*), así como evaluar la biotoxicidad de estos compuestos en el modelo de *Artemia salina*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- a) Estudiar la actividad de los diferentes grupos funcionales unidos al farmacóforo 3-metil-4-nitro-5-estirilisoazol, así como su potencia antiparasitaria contra *G. duodenalis*.
- b) Evaluar la biotoxicidad de los derivados de los 3-metil-4-nitro-5-estirilisoazol en el modelo de *Artemia salina*.
- c) Evaluar la eficacia de algunos derivados de los 3-metil-4-nitro-5-estirilisoazol contra *G. duodenalis* empleando un modelo de infección experimental (*Meriones unguiculatus*).

IV.-MATERIAL Y METODOS

4.1 Parásitos

La cepa de *G. duodenalis* que se usó en estos experimentos es la cepa WB, aislada por F. Gillin en el National Institutes for Health (NIH) a partir de fluido duodenal de un paciente de sexo masculino de 27 años de edad, con giardiasis sintomática con una duración de 2.5 años, la cual adquirió en Afganistán (Smith y cols., 1982). El tratamiento falló en este paciente, después de cuatro terapias de metronidazol y 3 de quinacrina (Smith y cols., 1982). Dicha cepa fue proporcionada por E. Weinbach del propio NIH en Bethesda, MD (E.U.A.).

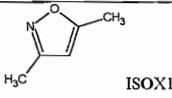
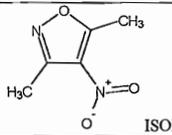
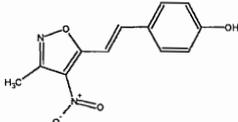
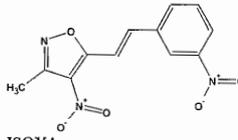
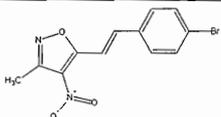
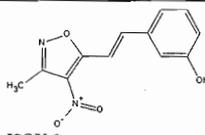
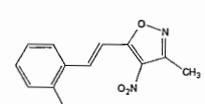
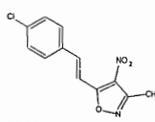
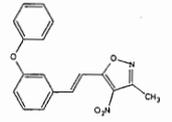
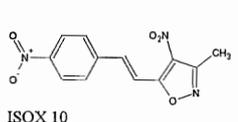
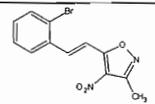
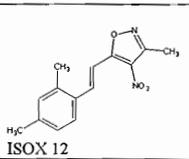
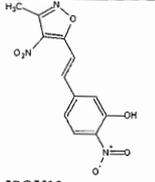
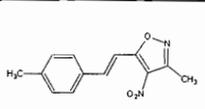
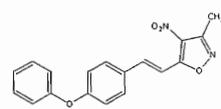
4.2 Cultivo axénico de *Giardia duodenalis*:

Los trofozoítos de la cepa WB se cultivaron axénicamente (subcultivándose 2 veces semanalmente) en botellas de plástico de fondo plano de 40 ml a 37°C (incubadora Precision Modelo 4EG) en medio TYI-S-33, suplementado con suero bovino al 10 % y con antibiótico (penicilina 50mg/L) (Keisten, 1983). Los trofozoítos se cosecharon mediante enfriamiento de las botellas en baño de agua –hielo durante 30 minutos.

4.3 Agentes quimioterapéuticos:

Los agentes químicos que se emplearon corresponden a compuestos adicionales de la serie de isoxazoles previamente evaluados (Ramírez Cruz, 2003) los cuales fueron los isoxazoles del 1 al 6. En la presente investigación se evaluaron la serie de isoxazoles del 7 al 15, los cuales fueron sintetizados en el laboratorio de Química Medicinal del área de Postgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, por el Dr. Enrique Angeles Anguiano. Dichos fármacos se almacenaron a temperatura ambiente protegidos de la luz. Estos compuestos se muestran en la Tabla II.

Tabla II.- ESTRUCTURAS QUIMICAS Y PESOS MOLECULARES DE LOS COMPUESTOS QUIMICOS.

ESTRUCTURA QUIMICA	NOMBRE Y PESO MOLECULAR	ESTRUCTURA QUÍMICA	NOMBRE Y PESO MOLECULAR
 ISOX1	3-metil-4-nitro-5-estirilisoazol P.M.=97.115	 ISOX2	3,5-dimetil-4-nitroisoxazol P.M.=142.113
 ISOX3	4-[(<i>E</i>)-2-(3-metil-4-nitroisoxazol-5-il)vinil]fenol P.M.=246.219	 ISOX4	3-metil-4-nitro-5-[(<i>E</i>)-2-(3-nitrofenil)vinil]isoxazol P.M.=275.21
 ISOX5	5-[(<i>E</i>)-2-(4-bromofenil)vinil]-3-metil-4-nitroisoxazol P.M.=309.116	 ISOX6	3-[(<i>E</i>)-2-(3-metil-4-nitroisoxazol-5-il)vinil]fenol P.M.=246.219
 ISOX7	5-[(<i>E</i>)-2-(2-clorofenil)vinil]-3-metil-4-nitroisoxazol P.M.=264.664	 ISOX8	5-[(<i>E</i>)-2-(4-clorofenil)vinil]-3-metil-4-nitroisoxazol P.M.=264.664
 ISOX9	3-metil-4-nitro-5-[(<i>E</i>)-2-(3-fenoxifenil)vinil]isoxazol P.M.= 322.315	 ISOX10	3-metil-4-nitro-5-[(<i>E</i>)-2-(4-nitrofenil)vinil]isoxazol P.M.=275.217
 ISOX11	5-[(<i>E</i>)-2-(2-bromofenil)vinil]-3-metil-4-nitroisoxazol P.M.=309.116	 ISOX12	5-[(<i>E</i>)-2-(2,4-dimetilfenil)vinil]-3-metil-4-nitroisoxazol P.M.= 258.273
 ISOX13	5-[(<i>E</i>)-2-(3-metil-4-nitroisoxazol-5-il)vinil]-2-nitrofenol P.M.=291.216	 ISOX14	3-metil-5-[(<i>E</i>)-2-(4-metilfenil)vinil]-4-nitroisoxazol P.M.=244.246
 ISOX15	3-metil-4-nitro-5-[(<i>E</i>)-2-(4-fenoxifenil)vinil]isoxazol P.M.=322.315		

4.4 Determinación de CI_{50} y CLM de fármacos del grupo 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol.

Para este fin se realizaron una serie de ensayos mediante la técnica de subcultivo líquido, en los cuales se crecieron los trofozoítos en presencia de diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos, con la finalidad de obtener una curva Concentración – Respuesta en la que se graficó la concentración en μM del compuesto contra el % de Viabilidad de los trofozoítos (el número de células vivas). Así por medio de la regresión lineal se obtuvieron dos parámetros de gran importancia que son la CI_{50} (Concentración inhibitoria cincuenta) y la CLM (Concentración Letal Mínima).

4.5 Técnica de Subcultivo en medio líquido

Este método fue reportado por Hill y cols. (1986) y consiste en inocular primeramente 1×10^6 de trofozoítos en viales de borosilicato de 4.5 ml con medio fresco incompleto TYI-S-33 los cuales posteriormente se pusieron en contacto con el fármaco, agregando a cada vial diferentes concentraciones del mismo. Para cada fármaco se utilizaron 8 concentraciones diferentes (ver figura 4). Los tubos se incubaron a 37 °C durante 24 horas y una vez transcurrido este tiempo estos se pusieron en baño de hielo durante 30 minutos y se realizó el conteo de trofozoítos en la cámara de Neubauer (Reichert Bright Line). Una vez definido el número de trofozoítos se prosiguió a la resiembra tomando de cada vial 100,000 trofozoítos de *Giardia duodenalis* que se inocularon en viales de vidrio de borosilicato de 4.5ml los cuales contenían medio TYI-S-33 fresco, y estos se incubaron a una temperatura de 37°C durante 48 horas. Pasado este tiempo, los viales se enfriaron en baño de hielo durante 30 minutos y se realizó el conteo celular en la cámara de Neubauer (Reichert Bright Line). Una vez obtenidos los datos, estos se interpolaron en una curva de

calibración colocando en el eje de las abscisas el número de trofozoítos inoculado inicialmente, que abarca desde 5000 hasta 200,000 trofozoítos y en el eje de las ordenadas el número de trofozoítos obtenidos a las 48 horas. El número obtenido de parásitos viables en los ensayos con fármaco, se extrapolaron en la curva de calibración usando el número total corregido a las 48 horas. Finalmente el porcentaje de viabilidad se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ VIABILIDAD} = \frac{n}{100,000} \times 100$$

donde n corresponde al número de trofozoítos obtenidos a partir de la curva de calibración. Este ensayo se realizó con cuatro repeticiones para cada fármaco.

4.6 Ensayo de Toxicidad con *Artemia salina*

En este caso se siguió el protocolo adaptado en nuestro grupo (Cortez-González S., 2004). Este ensayo se realizó para cada uno de los 15 fármacos que se evaluaron, y consiste en colocar 30 nauplios (fase joven) de *Artemia* en viales de 20 ml adicionando medio salino (PBS) exponiéndolas a diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos. Los viales se dejaron a temperatura ambiente durante 24 horas. Finalmente se realizó el recuento de *Artemias* muertas y vivas. Cada ensayo se realizó con cuatro experimentos independientes para cada fármaco, con lo cual se pudo determinar la CI_{50} y la CLM para cada fármaco. Los fármacos fueron disueltos en DMSO.

4.7 Evaluación de la eficacia de isoxazoles en giardiosis experimental

4.7.1 Animales experimentales

Para el ensayo de efectividad *in vivo* de los agentes que se estudiaron se empleó el modelo de jerbos mongólicos (*Meriones unguiculatus*). En cada ensayo se emplearon grupos de 5 animales machos, con un peso de 45 - 60 g, y con una edad de 5 a 6 semanas, los cuales se mantuvieron en jaulas individuales, desinfectándolas previamente con cloro y alcohol. A los animales se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*. Se prosiguió a verificar que los animales se encontraran desparasitados. Para ello se sacrificaban dos de ellos al azar, y se obtenía el contenido de intestino delgado para verificar si el animal estaba desparasitado (ver apartado 4.7.4), si los animales presentaban algún tipo de protozoarios en el intestino, se administraba una dosis de 80 mg/Kg de metronidazol para eliminar cualquier parásito presente. Se evaluó la eficacia de este tratamiento a los 4 días sacrificando otros animales y examinando el contenido de intestino delgado.

4.7.2 Infección experimental de jerbos mongolicos (*M. unguiculatus*)

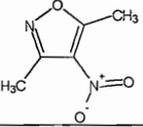
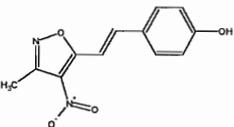
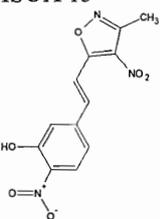
Para llevar a cabo la infección de los animales se cosecharon trofozoítos cultivados en botellas de plástico de 40 ml con medio TYI-S-33, colocándoles en baño de hielo durante 30 minutos y se cosechó el contenido en un tubo de fondo cónico de 50 ml. Este último se centrifugó a 650 x g a 4°C por 10 minutos, con la finalidad de poder separar los trofozoítos de la pared del tubo y poder concentrarlos para realizar su conteo. Posteriormente se quitó el sobrenadante hasta dejar aproximadamente 1 ml y la pastilla celular; se lavó 3 veces con 4 ml de PBS y en cada lavado se centrifugó a las condiciones ya mencionadas. Al término del último lavado se extrajo el sobrenadante, se dejó 1ml aproximadamente y se aforó a 5 ml con PBS. A partir de esta solución se hizo una dilución de 1:10 y se realizó el conteo de

células en cámara de Neubauer (Reichert Bright Line) para determinar el número de trofozoítos por mililitro y poder saber que cantidad se necesitaba para administrar 1×10^6 trofozoítos a los animales como dosis infectiva, por medio de una cánula metálica unida a una jeringa administrando por vía oral el número de trofozoítos.

4.7.3 Tratamiento con isoxazoles

Al décimo día después de la infección, considerando como día “0” el día de la infección, (apartado 4.7.2) se administró el tratamiento con los isoxazoles; de estos se probaron exclusivamente el isoxazol 13, isoxazol 2 e isoxazol 3. Los dos últimos habían sido evaluados por la técnica de Subcultivo en Medio líquido y se determinó su CI_{50} y CLM (Ramírez Cruz, 2003). Las dosis usadas de los compuestos anteriores se muestran en la tabla III

Tabla III.- Dosis usadas de los isoxazoles evaluados en el modelo de jerbos mongólicos

COMPUESTO	DOSIS EN mg/Kg
ISOX 2 	1 Dosis 83.33 1 Dosis 166.66 2 Dosis 166.66 (1 cada 24hrs) 2 Dosis 333.66 (1 cada 24hrs) 2 Dosis 666.66 (1 cada 24hrs)
ISOX 3 	1 Dosis 83.33 1 Dosis 166.66 2 Dosis 166.66(1 cada 24hrs) 2 Dosis 333.66(1 cada 24hrs) 2 Dosis 666.66(1 cada 24hrs)
ISOX 13 	1 Dosis 83.33 2 Dosis 83.33 (1 cada 24hrs) 1 Dosis 166.66 2 Dosis 166.66 (1 cada 24hrs) 2 Dosis 333.66 (1 cada 24hrs) 2 Dosis 666.66 (1 cada 24hrs)

La administración de estos fármacos fue por vía oral, por medio de una cánula metálica unida a una jeringa e introduciéndola por vía intragástrica y administrando el fármaco en dosis dobles, la primera se administró en el décimo día y la segunda en el onceavo día después de la infección. Para cada dosis se contó con cinco animales y se consideró también, el tener animales como controles a los cuales se les administró 1ml de disolvente (agua).

4.7.4 Cuantificación de trofozoítos en contenido de intestino delgado

Al día 13 después de la infección se realizó la obtención y preparación de intestino delgado de los animales tratados y del grupo control y se realizó el conteo de trofozoítos de *Giardia duodenalis* en el intestino, a fin de evaluar la eficacia de los fármacos empleados.

Para poder evaluar la eficacia se realizó el siguiente procedimiento:

- 1- Se introdujo al jerbo en una cámara con un algodón con cloroformo con la finalidad de sacrificar al animal.
- 2- Se sacó al animal y se preparó en una plancha para hacer una disección, se limpió el abdomen con alcohol y se tomó el pelaje con las pinzas, con tijeras se prosiguió hacer una incisión abdominal para exponer las vísceras.
- 3- Se identificó el intestino delgado y se cortó al inicio y al final de este para poder extirparlos.
- 4- Se colocó el intestino en una caja petri ya preparada con una solución de PBS (20 ml) contenida en un baño de hielo.
- 5- Con las pinzas y tijeras se abrió longitudinalmente el intestino y se colocó la caja petri en agitación a 4°C durante 20min, con el propósito de que los parásitos presentes en el intestino se separaran de la pared intestinal.

-
- 6- Pasado este tiempo se decantó el PBS en un tubo de fondo cónico de 50ml.
 - 7- Se centrifugaron los tubos a $360 \times g$ a $4^\circ C$ por 10 minutos, a fin de sedimentar a los parásitos presentes en el intestino y facilitar su conteo.
 - 8- Se retiró el sobrenadante hasta dejar aproximadamente 1 ml.
 - 9- Se resuspendió la pastilla y se observó en la cámara de Neubauer para realizar el conteo de trofozoítos presentes.

V.- RESULTADOS

5.1 Obtención de CI_{50} y CLM de fármacos del grupo de los 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol

En el presente trabajo se realizó la determinación de la CI_{50} y la CLM, parámetros necesarios para poder determinar la dosis exacta que se necesita para eliminar al 50 % de la población de trofozoítos y la dosis mínima que se requiere para que se presente la muerte del total de las células *in vitro*. Para su determinación, se probaron diferentes concentraciones de 9 derivados de los 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol (serie del isoxazol 7 al isoxazol 15), tomándose en consideración el trabajo realizado anteriormente por Ramírez Cruz (2003), en el cual se evaluó la serie del isoxazol 1 al isoxazol 6 de los derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol. Así se tuvo una referencia sobre las concentraciones que se podían usar en la evaluación de los isoxazoles restantes. La evaluación de la efectividad de los fármacos se realizó por medio de la técnica de subcultivo líquido, mediante la cual se determina la capacidad que tienen las células para replicarse después de haber sido expuestas a un agente tóxico. Esta técnica se describe en la sección de materiales y métodos (apartado 4.4 y 4.5). Los resultados obtenidos se reportan en la figura 4, en donde se representan las diferentes curvas de concentración-respuesta para cada uno de los derivados utilizados. En esta, se observó que a medida que aumentó la concentración de los compuestos, el porcentaje de viabilidad de los trofozoítos disminuyó. Como resultado de este gráfico, se puede visualizar que el isoxazol 13 fue con el que a bajas concentraciones el número de trofozoítos disminuyó notablemente, no así para el isoxazol número 12 ($P=NS$), con el que se observó que fue necesario emplear concentraciones más elevadas para poder disminuir el porcentaje de viabilidad celular. Los resultados obtenidos para

cada compuesto, se analizaron por regresión lineal para poder obtener la CI_{50} y la CLM correspondiente a cada fármaco evaluado, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla III. De acuerdo a estos resultados, el isoxazol 13 presentó el mayor grado de efectividad de los nueve derivados probados, presentando valores para CI_{50} de 10.858 μM y para CLM de 14.393 μM . Dentro de los isoxazoles con una efectividad intermedia se encontraron el isoxazol 7 ($P < 0.05$), isoxazol 8 ($P < 0.05$), isoxazol 9 ($P < 0.05$), isoxazol 10 ($P < 0.05$), isoxazol 11 ($P < 0.05$), isoxazol 14 ($P < 0.05$), isoxazol 15 ($P < 0.05$) y el isoxazol 12 ($P = \text{NS}$) el cual presentó la CI_{50} y la CLM más elevadas en comparación de los demás compuestos (36.23 μM y 49.998 μM respectivamente). En los resultados que se muestran en la tabla III se pueden observar las CI_{50} y las CLM para cada compuesto así como la relación que hay entre la CLM y la CI_{50} (CLM/CI_{50}) que fue muy estrecha abarcando desde 1.325 (isox13) hasta 1.584 (isox 9). Debido a que el isoxazol 13 junto con el isoxazol 3 fueron de los compuestos que presentaron una mayor potencia, en comparación con los demás derivados, se eligieron estos para realizar estudios posteriores que nos permitieran evaluar su efectividad tanto *in vitro* como *in vivo* contra *Giardia duodenalis* empleando en este último caso un modelo animal.

Tabla IV .- Datos obtenidos sobre la efectividad de los diferentes compuestos analizados contra trofozoítos de *G. duodenalis* mostrando la probabilidad asociada con la prueba de t de student . Para determinar si las medias de la muestra son diferentes. Si los valores de P son menores a 0.05 o el valor P es igual a NS (no significativo) nos indica que estadísticamente las medias son diferentes.

COMPUESTO	VALORES DE CLM (μM)	VALORES DE P (prueba t student) VS ISOX13	VALORES DE P (prueba t student) VS ISOX7
ISOXAZOL 13	14.393		0.00143156
ISOXAZOL 7	31.65	0.00143156	
ISOXAZOL 8	34.25	0.001515093	NS
ISOXAZOL 9	36.13	0.000807021	NS
ISOXAZOL 10	37.21	0.000315415	NS
ISOXAZOL 11	24.70	0.007248422	NS
ISOXAZOL 12	49.99	NS	0.044985958
ISOXAZOL 14	40.80	0.00052451	0.042120991
ISOXAZOL 15	39.05	0.000588909	NS

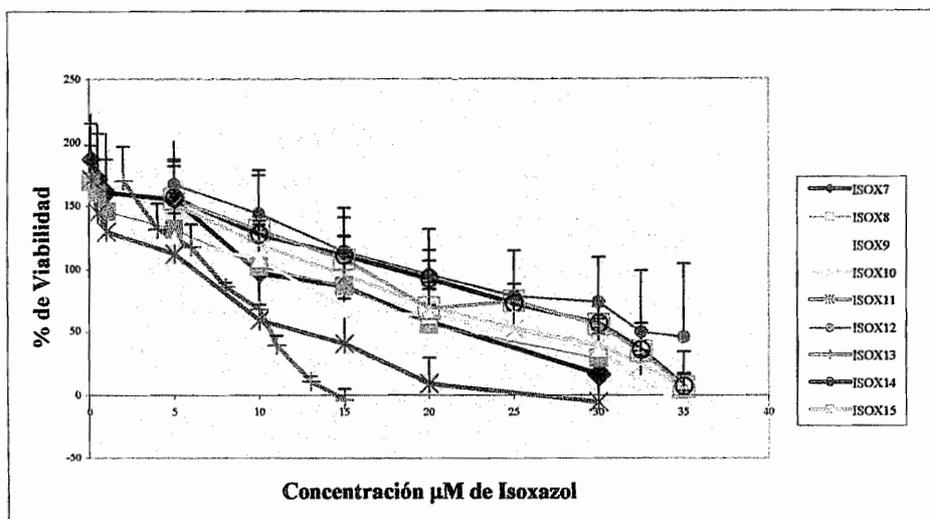
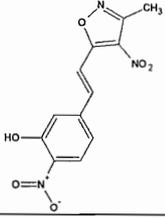
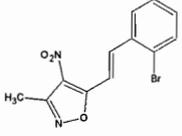
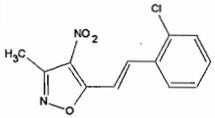
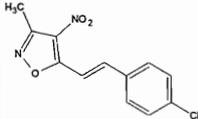
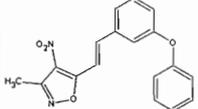
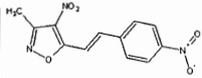
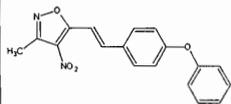
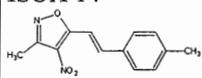
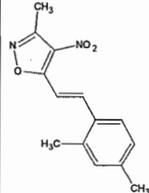


Figura 4 Determinación del efecto de nueve derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoxazol sobre la viabilidad de trofozoítos de *Giardia duodenalis*. En este ensayo 1×10^6 trofozoítos de la cepa WB se expusieron a diferentes concentraciones de los compuestos durante 24 h a 37°C , después de este tiempo se realizó una resiembra de 100,000 trofozoítos/ml incubándolos a 37°C por 48 h. La viabilidad celular se determinó mediante el conteo celular en la cámara de Neubauer (Reichert Bright Line). Una vez obtenidos los datos, estos se interpolaron en una curva de calibración colocando en el eje de las abscisas el número de trofozoítos inoculado inicialmente, que abarca desde 5000 hasta 200,000 trofozoítos y en el eje de las ordenadas el número de trofozoítos obtenidos a las 48 horas. El número obtenido de parásitos viables en los ensayos con fármaco, se extrapolaron en la curva de calibración usando el número total corregido a las 48 horas.

Tabla V Actividad *in vitro* de nueve derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol contra trofozoítos de *Giardia duodenalis*. Los valores se presentan como la media +/- desviación estándar de 4 ensayos independientes.

ISOXAZOLES PROBADOS	CI₅₀ (μM)	CLM (μM)	CLM/ CI₅₀
ISOX 13 	10.858+0.7139	14.393+0.4010	1.325
ISOX 11 	15.74+2.845	24.707+3.371	1.569
ISOX7 	22.183+3.028	31.658+3.178	1.386
ISOX 8 	22.78+3.875	34.25+3.837	1.503
ISOX9 	22.80+3.015	36.13+3.555	1.584

Continuación Tabla V Actividad *in vitro* de nueve derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoxazol contra trofozoítos de *Giardia duodenalis*. Los valores se presentan como la media +/- desviación estándar de 4 ensayos independientes.

ISOXAZOLES PROBADOS	CI₅₀ (μM)	CLM (μM)	CLM/ CI₅₀
ISOX 10 	26.02+-2.452	37.210+-2.423	1.430
ISOX 15 	27.615+-4.9312	39.05+-3.906	1.414
ISOX 14 	29.10+-1.708	40.80+-3.906	1.402
ISOX 12 	36.23+-12.86	49.998+-16.61	1.380

5.2 Ensayo de toxicidad de los compuestos de la familia del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol en el modelo de *Artemia salina*.

Los resultados correspondientes a este ensayo fueron evaluados de acuerdo al apartado 4.6 en material y métodos. De manera general, se observó que los compuestos fueron relativamente inocuos, tomando en cuenta que las concentraciones usadas en este ensayo, a las cuales los fármacos son tóxicos, son mucho más elevadas que las obtenidas como CI₅₀ y CLM en el ensayo de subcultivo en medio líquido para *G.duodenalis* (Tabla V). Así, en la Tabla VI se muestran los resultados obtenidos para el ensayo de toxicidad, en donde se puede observar que los compuestos que presentaron una CLM con un valor superior a 10,000 µM presentaron una toxicidad muy baja; en este rango, el compuesto con menor toxicidad para *Artemia salina* fue el isoxazol 15 que presentó una CI₅₀ de 13219.63 µM y una CLM de 26692.0 µM, el isoxazol 14 con una CI₅₀ de 12334.42 µM y una CLM de 26624 µM, el isoxazol 4 con una CI₅₀ de 11376 y una CLM de 24835.28, seguido del isoxazol 5 con una CI₅₀ de 4064.62 µM y una CLM 10509.56 µM. Dentro de los compuestos que presentaron una baja toxicidad se encuentran aquellos que tuvieron una CLM mayor o igual a 1000 µM. Dentro de este valor se encuentra el isoxazol 9 con una CI₅₀ de 1879.51 y una CLM de 4062.92, el isoxazol 12 con una CI₅₀ de 1158.3 µM y una CLM de 2282.4 µM, el isoxazol 8 con una CI₅₀ de 1007.88 µM y una CLM de 2260.44 µM, el isoxazol 7 con una CI₅₀ de 805.72 µM y una CLM de 1972.22 µM, el isoxazol 2 con una CI₅₀ de 890.14 µM y una CLM de 1719.03, el isoxazol 11 con una CI₅₀ de 512.74 y una CLM 1623.19, el isoxazol 10 con CI₅₀ de 595.545 y una CLM de 1477.32 µM, el isoxazol 13 con una CI₅₀ de 398.51 µM y una CLM de 1383.9 µM y el isoxazol 3 con una CI₅₀ de 293.41 µM y una CLM de 1463.23 µM. Dentro de este ensayo,

el compuesto con la mayor toxicidad fue el isoxazol 6 que presentó una CI_{50} de 91.46 μ M y una CLM de 205.26.

En este ensayo se pudo observar que, en los compuestos estudiados, el efecto letal fue directamente proporcional a la concentración de éste, es decir, mientras las concentraciones de los fármacos fueron en aumento el efecto tóxico aumentaba, por lo tanto, el porcentaje de viabilidad disminuyó como se muestra en la figura 5, donde se observa la relación que existe entre la concentración del compuesto y la viabilidad de *A. Salina*.

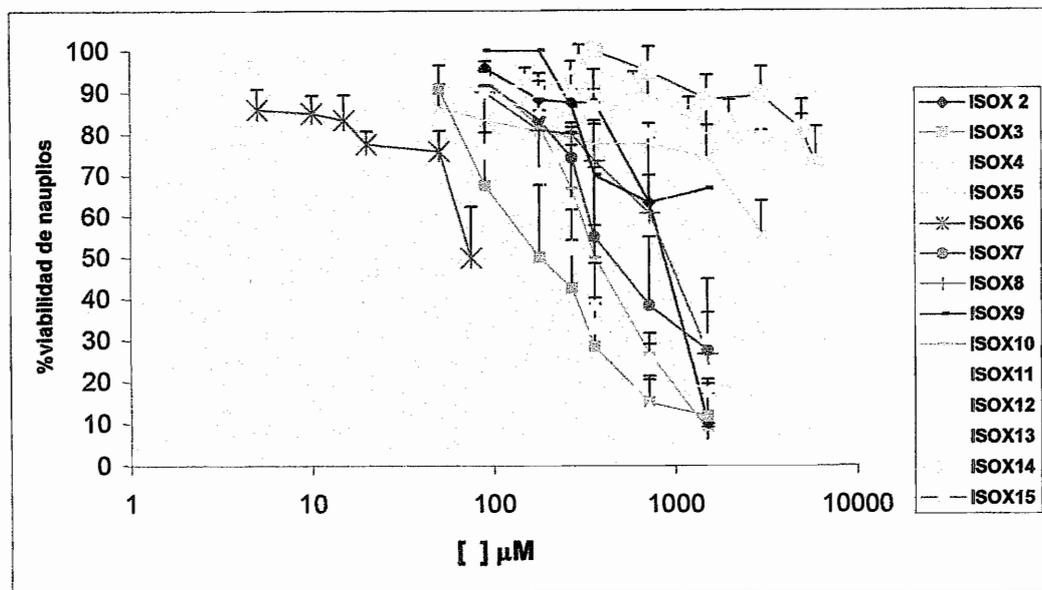
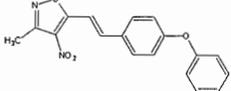
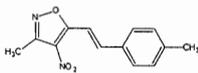
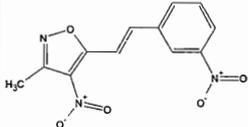
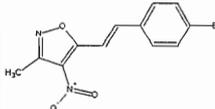
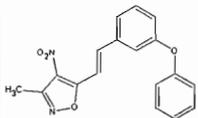
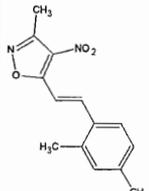
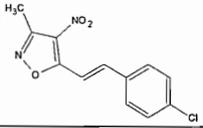
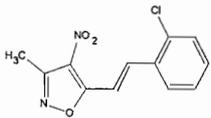
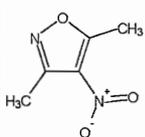
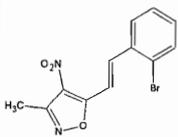
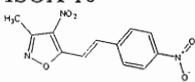
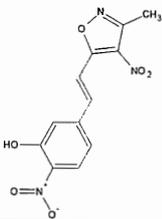


FIGURA 5 .- Efecto de la concentración de quince derivados del 3-metil-4 nitro-5-estirilisoaxazol sobre la viabilidad de nauplios de *Artemia salina*. En este ensayo que se realizó para cada uno de los fármacos que se evaluaron, se colocaron 30 *Artemias* en viales de 20ml adicionando medio salino (PBS) exponiéndolas a diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos. Los viales se dejaron a temperatura ambiente durante 24 horas. Finalmente se realizó el recuento de *Artemias* muertas y vivas una vez transcurrido este tiempo. En este ensayo se pudo observar que, en los compuestos estudiados, el efecto letal fue directamente proporcional a la concentración de éste, es decir, mientras las concentraciones de los fármacos fueron en aumento el efecto tóxico aumentaba, por lo tanto, el porcentaje de viabilidad disminuyó como se muestra en esta figura, donde se observa la relación que existe entre la concentración del compuesto y la viabilidad de *A. salina*.

Tabla VI Actividad Tóxica de quince derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol sobre *Artemia salina*. Los valores se presentan como la media +/- desviación estándar de 4 ensayos independientes.

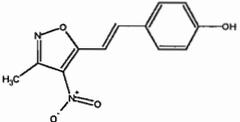
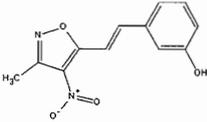
ISOXAZOLES PROBADOS	CI ₅₀ (μM)	CLM (μM)	CLM/ CI ₅₀
ISOX 15 	13219.63+-3817.8	26692.0+-7778.4	2.019
ISOX 14 	12334.42+-5884.0	26624.025+-12569.4	2.15851
ISOX 4 	11376.36+-918.19	24835.28+-2434.02	2.183
ISOX 5 	4064.62+-1060.48	10509.56+-2643.36	2.585
ISOX9 	1879.51	4062.92	2.1617
ISOX 12 	1158.3	2284.4	1.972

Continuación Tabla VI Actividad Tóxica de quince derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoxazol sobre *Artemia salina*. Los valores se presentan como la media +/- desviación estándar de 4 ensayos independientes.

ISOXAZOLES PROBADOS	CI₅₀ (μM)	CLM (μM)	CLM/ CI₅₀
ISOX 8 	1007.88 +193.19	2260.44 +506.11	2.242
ISOX7 	805.72 +173.75	1972.22 +315.01	2.447
ISOX2 	890.14 +86.66	1719.03 +160.03	1.931
ISOX 11 	512.74 +141.29	1623.19 +61.09	3.165
ISOX 10 	595.545 +139.34	1477.32 +132.09	2.480
ISOX 13 	328.51 +101.005	1383.9 +95.88	4.212



Continuación Tabla VI Actividad Tóxica de quince derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoxazol sobre *Artemia salina*. Los valores se presentan como la media +/- desviación estándar de 4 ensayos independientes.

ISOXAZOLES PROBADOS	CI₅₀ (μM)	CLM (μM)	CLM/ CI₅₀
ISOX 3 	293.41+-171.45	1463.23+-158.50	4.986
ISOX 6 	91.46+-25.699	205.26+-50.745	2.244

5.3 Eficacia terapéutica de compuestos del grupo del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol en jerbos mongólicos (*Meriones unguiculatus*) infectados con *G. duodenalis*.

Los resultados en esta parte del trabajo fueron obtenidos aplicando la técnica descrita en material y métodos en el apartado 4.7, para evaluar la eficacia terapéutica de tres compuestos derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol en jerbos mongólicos infectados con *G. duodenalis*. Los compuestos usados para esta evaluación fueron el isoxazol 3 e isoxazol 13, los cuales presentaron la mínima CI_{50} y bajas CLM con respecto a los trece derivados restantes empleados en la evaluación por medio de la técnica de subcultivo líquido, indicando así que son dos de los compuestos más potentes a bajas concentraciones contra *Giardia in vitro*. El tercer fármaco a evaluar fue el isoxazol 2, el cual tuvo una de las concentraciones más altas en CI_{50} y CLM, es decir, fue uno de los menos eficaces contra *Giardia* en el ensayo de subcultivo líquido, por lo que fue útil para contrastar la actividad de dos compuestos altamente eficaces contra este protozooario.

Los resultados obtenidos dentro de este ensayo (figura 6), sugirieron que el isoxazol número 3 fue el más eficaz contra la giardiasis experimental inducida en jerbos mongólicos en comparación con el isoxazol 13 e isoxazol 2, ya que el número de trofozoítos en intestino disminuyó considerablemente conforme la concentración de este fármaco aumentaba, obteniéndose así que con el uso de una dosis de 83.33 mg/Kg, que fue la dosis más baja utilizada para la evaluación de cada uno de los fármacos, el número de trofozoítos se redujo de 1×10^6 (inoculados en el modelo animal) a 89,450. Con el uso de la dosis de 166.66 mg/Kg el número se redujo a 26,500, presentando un animal totalmente curado sin trofozoítos en contenido intestinal. Al emplear una dosis de 166.66 mg/Kg administrada en dos ocasiones la cantidad de trofozoítos en intestino se redujo a 12,500,

obteniéndose un animal con cero trofozoítos. Con el uso de una dosis de 333.33 mg/Kg administrada en dos ocasiones los trofozoítos se redujeron a 10,750, presentándose dos animales curados de los cinco animales utilizados. Al emplear una dosis de 666.66 mg/Kg administrada en dos tomas el número de trofozoítos disminuyó a 7,500 presentando dos animales curados.

Con respecto al isoxazol 13, los resultados obtenidos fueron los siguientes: cuando se empleo una dosis de 83.33 mg/Kg el número de trofozoítos se redujo de 1×10^6 (inoculados en el modelo animal) a 314,583. Al emplear la dosis de 166.66 mg/Kg el número de parásitos se redujo a 185,750. Con el uso de una dosis de 166.66 mg/Kg administrada en dos tomas, el número de trofozoítos se redujo a 78,750. Para el caso del uso de la dosis de 333.33 mg/Kg administrada en dos ocasiones, el número de parásitos se redujo a 62,240, presentándose un animal curado de los cinco animales utilizados. Al emplear la dosis de 666.66 mg/Kg administrada en dos tomas, el número de trofozoítos disminuyó a 8750, presentándose dos animales curados.

Los resultados obtenidos para el isoxazol 2 fueron los siguientes: para una dosis de 83.33 mg/Kg, el número de trofozoítos se redujo de 1×10^6 (inoculados en el modelo animal) a 512,187. En el caso de la dosis de 166.66 mg/Kg el número se redujo a 519,218; con el uso de la dosis de 166.66mg/Kg administrada en dos ocasiones, los parásitos se redujeron a 210,740. Para el uso de la dosis de 333.33 mg/Kg administrada en dos tomas, el número de trofozoítos se redujo a 364,750, y finalmente al emplear la dosis de 666.66 mg/Kg administrada en dos tomas, el número de trofozoítos disminuyó a 365,625.

En lo referente al lote control, este presentó una reducción en el número de trofozoítos, de 1×10^6 (inoculo) a 460,566 cantidad total a los 13 días post-infección.

Tabla VII .- Datos obtenidos sobre la efectividad de los diferentes compuestos analizados contra trofozoítos de *G. duodenalis* en el modelo animal jerbos mongólicos mostrando la probabilidad asociada con la prueba de *t* de student para determinar si las medias de la muestra son diferentes.

COMPUESTO	VALOR DE P (prueba <i>t</i> student) VS LOTE CONTROL
CONTROL	
ISOXAZOL 3	0.001914905 (P<0.005)
ISOXAZOL 13	0.006950643 (P<0.05)
ISOXAZOL 2	NS

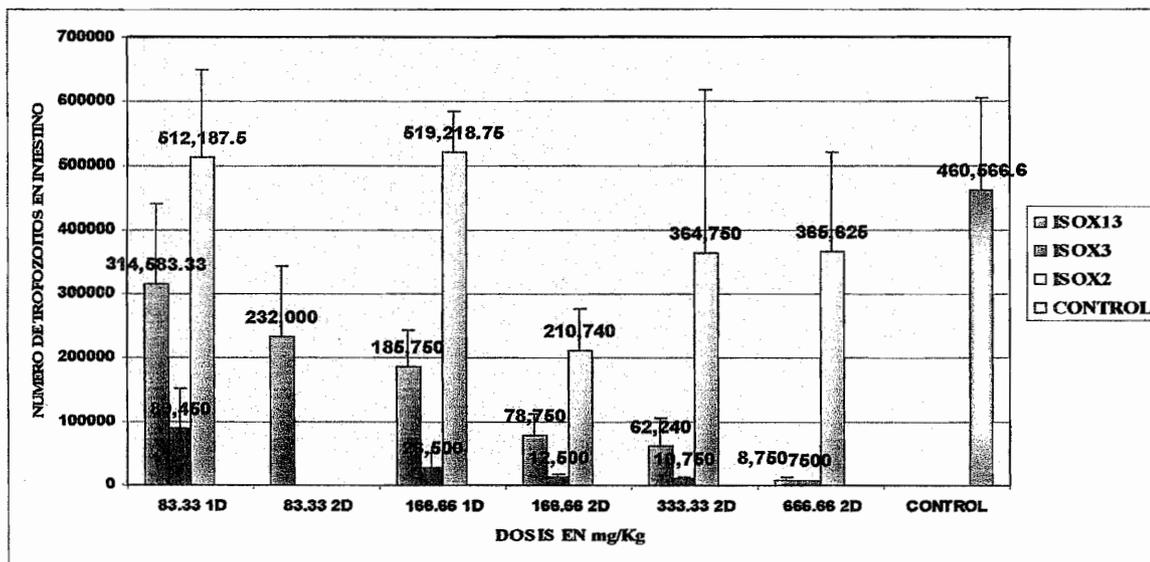


FIGURA 6.- Efecto de diferentes dosis de tres derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilsoxazol en gerbos mongólicos (*Meriones unguiculatus*) infectados con *G. duodenalis*. Estos resultados se obtuvieron mediante la determinación del número de trofozoítos en contenido intestinal después de administrado el tratamiento.

VI.-DISCUSIÓN

La giardiasis es una de las enfermedades parasitarias más frecuentes y que son causa de morbilidad a nivel mundial, debido al impacto que tiene en el campo de la salud sobre todo en países en desarrollo como México. Para el tratamiento de esta enfermedad se utilizan actualmente fármacos como los del grupo de los nitroimidazoles, bencimidazoles, derivados de acridina, nitrotiazoles, nitrofuranos y aminoglucósidos. Sin embargo, estos grupos de fármacos no fueron creados específicamente para el tratamiento de la giardiasis, sino que son usados para múltiples enfermedades causadas por diversos microorganismos.

En años recientes, desafortunadamente, se han reportado casos de resistencia en particular al metronidazol, que han sido asociados a una tasa de recurrencia del 90 % y una prevalencia de resistencia de un 20 % (Upcroft, 2001); además de que algunos fármacos están contraindicados en determinadas situaciones clínicas, y poseen varios efectos secundarios muy serios, a tal grado que en países como Estados Unidos se encuentra prohibido su consumo (Garner y Hill, 2001).

Es por esta situación que se hace necesario el desarrollo de nuevos fármacos, pero esta necesidad no se considera aun prioritaria para destinar presupuesto al desarrollo de esta área de investigación, la cual es abordada principalmente por empresas transnacionales farmacéuticas. En nuestro país se han formado grupos de investigación dedicadas a esta área como es el caso de la Facultad de Estudios de Cuautitlán (FES-C UNAM), en la que en el laboratorio de Química Medicinal del área de postgrado, se desarrollan líneas de investigación sobre la síntesis de nuevos compuestos con actividad biológica. En este grupo de investigación se sintetizaron un nuevo grupo de compuestos químicos (isoxazoles).

La gama de los isoxazoles es amplia ya que éstos tienen variedad de funciones, algunos de ellos fueron sintetizados y probados como antibacterianos y fungicidas. Se observó que esta actividad no era citotóxica (Aiello,2000), algo también importante es que se ha observado que algunos isoxazoles presentan actividad lipofílica (Aiello,2000). Otros isoxazoles han sido evaluados *in vitro* contra Rinovirus humano observándose que los sustituyentes en posición 2 aumentaron su actividad comparados con isoxazoles no sustituidos (Diana, 1987), La actividad antiviral de algunos isoxazoles se relaciona en la inhibición de la replicación de el virus Adenovirus (Akgun ,1998). En los estudios sobre los isoxazoles se ha observado que inhiben la lipólisis como es el caso del dimetil-isoxazol (Schulz, 1971). Debido a lo anterior se hace importante ahondar más en el estudio de la relación estructura-actividad de los isoxazoles, los cuales fueron de interés en este trabajo para evaluar su efecto sobre trofozoitos de *G.duodenalis*. Para esto, se utilizaron cultivos axénicos del parásito debido a que dicha técnica ha demostrado ser muy útil para mantener el ciclo de vida de *G.duodenalis in vitro*. La actividad antiparasitaria de los isoxazoles (de la serie del 7 al 15), representada en los resultados de la técnica de subcultivo líquido como la CI_{50} y la CLM, variaron ampliamente. Tomando en cuenta la CLM (concentración de fármaco que causa la completa inhibición del crecimiento del parásito, expresada como concentración micromolar) los compuestos que presentaron el valor más elevado tenían una menor actividad antiparasitaria por lo que en orden ascendente el rango de actividad fue: el isox 12 < isox 14 < isox 15 < isox10 < isox 9 < isox 8 < isox 7 < isox 11 < isox 13. Se puede observar que el compuesto con una menor CLM fue el isox 13, que por lo tanto resultó ser el que presentó una mayor actividad giardicida. La variación en los valores de la CLM se debe a que los compuestos poseen diferentes grupos funcionales en su estructura química, los cuales podemos observar en la tabla V en donde la base de los compuestos evaluados es

el 3-metil-4-nitro-5-estirilisoaxazol (isox1). Todos los demás derivados poseen un grupo nitro en la posición 4; a partir de este, los demás compuestos presentan un sustituyente diferente en la posición 5. El aumento de la actividad antiparasitaria se relacionó con el sustituyente en la posición 5 y esto se vió reflejado en los valores de CI_{50} y la CLM. Los resultados obtenidos mostraron que el isox 13 (5-[(*E*)-2-(3-metil-4-nitroisoxazol-5-il)vinil]-2-nitrofenol) fue el que presentó una mayor actividad antiparasitaria, debido a la presencia del grupo OH que pudiera estar interactuando con los dobles enlaces del benceno, haciendo a la molécula más reactiva contra los trofozoitos de *G. duodenalis*. Sin embargo, este compuesto no rebasó la actividad antiparasitaria del isox 3 (4-[(*E*)-2-(3-metil-4-nitroisoxazol-5-il)vinil]fenol) evaluado en estudios anteriores (Ramírez-Cruz, 2003) y esto se puede atribuir a la presencia del grupo nitro unido al benceno, que hace que la interacción del OH sea menor y por lo tanto la eficacia disminuya, lo cual se vió reflejado en los valores de la CI_{50} y la CLM. Sin embargo, de los compuestos evaluados en este trabajo, el isox 13 fue el más efectivo contra *G. duodenalis*, seguido del isox 11, isox7 y el isox 8, los cuales presentan un elemento halógeno en su estructura como el bromo en el caso del isox 11 y el cloro en el isox 7 y 8. La presencia de estos elementos también influye en el aumento de la actividad antiparasitaria; pero no rebasan la influencia que posee el grupo hidroxilo sobre la actividad giardicida. En cuanto al índice de concentración efectiva presentado en la tabla III, los valores altos de este índice sugieren que se tiene un margen de actividad más grande en tanto que los valores más pequeños indican lo contrario. Los compuestos evaluados presentaron un margen de seguridad pequeño que va desde 1.325 a 1.580, esto sugiere que al tener una modificación pequeña se puede pasar más fácilmente a los efectos citocidas de cualquier fármaco, siendo uno de los más importantes su biotoxicidad contra parásitos como *G. duodenalis*.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede realizar una comparación de la CLM de los grupos más representativos usados para el tratamiento contra *Giardia* y los isoxazoles 3 y 13. (Tabla VIII)

Tabla VIII.- Comparación de los fármacos mas usados contra *Giardia* y los isoxazoles mas efectivos (Romero, 1996; Cruz, 2001; Arce en preparación; Molina, en preparación; Velásquez; en preparación)

FAMILIA QUÍMICA	FARMACO	CLM (μM)
BENCIMIDAZOL	ALBENDAZOL	0.154
5-NITROTIAZOL	NITAZOXANIDA	1.589
5-NITROIMIDAZOL	METRONIDAZOL	4.50
5-NITROFURANOS	FURAZOLIDONA	4.83
ACRIDINAS	QUINACRINA	12.35
ESTIRILISOXAZOLES	ISOXAZOL 3	7.5
ESTIRILISOXAZOLES	ISOXAZOL 13	14.39

Se puede observar que los isoxazoles tienen muy buena eficacia contra *Giardia* ya que presentan una CLM baja, si bien no superior a los fármacos más usados si como una posible alternativa para el tratamiento contra *Giardia* en casos de resistencia a metronidazol por ejemplo, ya que la actividad de los isoxazoles no se encuentran relacionada con el anillo heterocíclico como el metronidazol sino que se relaciona con los sustituyentes presentes en la estructura heterocíclica (Ramírez-Cruz, 2003).

Otro aspecto que se estudió en el presente trabajo fue la prueba de biotoxicidad empleando como modelo nauplios de *Artemia salina* para los 15 derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilsoxazol (isox 1-isox15) obteniéndose para cada uno la CI_{50} y la CLM. Estos ensayos mostraron que los derivados de los isoxazoles presentaron poca toxicidad debido a que las concentraciones en que estos compuestos pueden ser tóxicos en organismos vivos son muy elevadas, y están por encima casi 3 ordenes de magnitud de las concentraciones obtenidas para la CLM en trofozoítos de *G. duodenalis*. Se obtuvo así un rango ascendente de biotoxicidad: isox15 < isox14 < isox4 < isox5 < isox 9 < isox12 < isox8 < isox7 < isox2 < isox11 < isox10 < isox3 < isox13 < isox 6.

Se puede observar que la presencia del grupo OH en la molécula de los compuestos isox3, isox13 e isox6 incrementó la biotoxicidad de los compuestos, siendo éstos los que presentaron una CLM menor a los demás compuestos. También se observó que la presencia del grupo nitro en la molécula del isox13 incrementó la toxicidad de ésta, y que la posición del OH también afectó la biotoxicidad, ya que en la posición *para* del benceno incrementó considerablemente la biotoxicidad de la molécula. En este caso se encuentra el isox6.

Para realizar un estudio de estos compuestos a nivel *in vivo*, se evaluó su eficacia terapéutica en un modelo de infección experimental. En este caso se emplearon jerbos (*Meriones unguiculatus*), los cuales son un modelo adecuado para poder establecer la infección por *G. duodenalis*. Debido a su bajo peristaltismo intestinal, se permite que los trofozoítos de *Giardia* se adhieran fácilmente a la mucosa intestinal. Dentro de este estudio se evaluaron tres compuestos derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilsoxazol los cuales fueron el isox 3, isox 13 e isox 2, los dos primeros con una eficacia giardicida importante *in vitro* y el tercero con una baja eficacia contra *Giardia in vitro*. Los fármacos se administraron en forma de emulsión en agua.

Los resultados obtenidos confirmaron los resultados *in vitro*. El isoxazol número 3 fue con el cual el número de trofozoítos en contenido intestinal disminuyó desde la primera dosis administrada (83.33 mg/Kg), como se muestra en la figura 6, seguido del isoxazol número 13 el cual ocasionó una disminución menos marcada de los trofozoítos en contenido intestinal desde la primera dosis administrada, pero con números de trofozoítos en intestino muy bajos. En el último régimen administrado a los animales (666.66 mg/Kg / 2dosis) se confirmó que el isox 3 e isox 13 fueron los más eficaces para el tratamiento de la giardiasis experimental. En cuanto al isoxazol número 2, el número de trofozoítos disminuyó muy poco en comparación con los dos isoxazoles anteriores, confirmando así que el isoxazol 2 es uno de los compuestos con menor eficacia giardicida.

Algo importante de comentar en cuanto a este estudio es la posibilidad de optimizar los resultados si se encuentra un mejor vehículo de administración, ya que los compuestos son poco solubles en agua, (en los estudios *in vitro* se empleó DMSO como solvente, sin embargo, este compuesto no es de empleo común en experimentos con animales). Si se analizan diferentes vehículos para este tipo de compuestos y su aplicación en modelos animales, se podría llegar a una disminución de las dosis y hacer que los compuestos sean aún más eficaces contra *Giardia*.

Como perspectivas adicionales a este trabajo se incluyen estudios de estos compuestos en cuanto a su genotoxicidad, el diseño de una presentación farmacéutica y la determinación de posibles posologías para su uso en humanos.

VII.-CONCLUSIONES

Con base en los resultados se obtienen las siguientes conclusiones:

- Los seis compuestos derivados del 3-metil-4-nitro-5-estirilisoxazol, evaluados *in vitro* en este trabajo (isox7-isox 15) presentaron actividad antiparasitaria contra *G.duodenalis*, presentando eficacia distinta en función de los sustituyentes en la posición 5.
- Basándose en los valores de CI50 y CLM experimentales, el compuesto de mayor eficacia *in vitro* en este estudio fue el isox13(5-[(*E*)-2-(3-metil-4-nitroisoxazol-5-il)vinil]-2-nitrofenol)
- El grupo que le confirió una mayor actividad antiparasitaria a estos compuestos fue el [2-p-hidroxifenil etenil] como sustituyente en posición 5, como es el caso de isox 3, isox6, e isox 13.
- Los ensayos de biotoxicidad con *A. salina* sugieren que, del grupo de isoxazoles evaluados en este trabajo, el compuesto más tóxico fue el isoxazol 6 (3-[(*E*)-2-(3-metil-4-nitroisoxazol-5-il)vinil]fenol) seguido por el isoxazol 13 (5-[(*E*)-2-(3-metil-4-nitroisoxazol-5-il)vinil]-2-nitrofenol) y por el isoxazol 3 (4-[(*E*)-2-(3-metil-4-nitroisoxazol-5-il)vinil]fenol).

-
-
- El grupo que le confirió una mayor biotoxicidad en *A. salina* a este grupo de 3-metil-4-nitro-5-estirilsoxazoles fue el [2-p-hidroxifenil etenil], presente en el isox 6, isox 13 e isox 3.
 - Tomando en cuenta el efecto tóxico de estos derivados, es posible que la posición del grupo hidroxilo en el fenol de la estructura del isox 6 e isox 3 modifique su biotoxicidad, ya que la presencia de este grupo en la posición *para* de la molécula incrementa la biotoxicidad del compuesto.
 - En cuanto a los resultados en el modelo de infección experimental, el isoxazol con un mayor efecto giardicida fue el isoxazol 3, disminuyendo considerablemente el número de trofozoítos en contenido intestinal, desde la primera dosis de 83.33 mg/Kg. El isoxazol 2, por el contrario, no presentó eficacia giardicida en este modelo. Así, los datos obtenidos tuvieron correlación con los estudios *in vitro* realizados previamente.

VIII.- REFERENCIAS

- Adam D. Rodney (2001) Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews* 14,447-475.
- Aiello E, Aiello S, Mingoia F, Bacchi A, Pelizzi G, Musiu C, Stezu MG, Pani A, La Colla P, Marongiu ME (2000) Síntesis and antimicrobial activity of new 3-(1R-3(5)-methyl-4-nitroso-1H-5(3)-pyrazolyl)-5-methylisoxazoles. *Bioorganic Med. Chemistry*, 8(12):2719-28
- Akgun H, Balkan A, Erol K, Batu OS, (1998) New beta-diketone and 3,5-dimethylisoxazol derivatives of theophylline as potential bronchodilator agents. *Arzneimittelforschung*.(6):658-62
- Arce CG (en proceso) Determinación de la eficacia *in vitro* de fármacos de la familia de los tiazoles en trofozoítos de *Giardia duodenalis*. Tesis de licenciatura Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM ,México.
- Argüello- García R, Argüello-Lopez C, Gonzalez-Robles A, Castillo-Figueroa A and Ortega-Pierres MG (2002) Sequential exposure and assembly of cyst wall filaments on the surface of encysting *Giardia duodenalis*. *Parasitology*, 125,209-19
- Balkan A, Akgun H, Parali N, Ertan M, Acikgoz C, Ustacelebi S, (1996) New naphthoxyalkyl beta- diketone and 3,5-dimethylisoxazole derivatives as potential antiviral agents. *Farmacology* (8-9):589-94.
- Batra S., Roy A. K., Patra A. Baylis-Hillman (2004) Reaction assisted parallel synthesis of 3,5-disubstituted isoxazoles and their *in vivo* bioevaluation as antithrombotic agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 12, 2059-2077.

-
-
- Carr JB, Durham HG, Hass DK, (1977) Isoxazoles anthelmintics. *J. Med. Chem.* vol20, 934-9.
 - Cedillo-R. Chávez, B. González-Robles, Arturo, Tapia, Amparo, Yépez-Mulia, Lilián (2002) In Vitro Effect of Nitazoxanide Against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* Trophozoites. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 49 Issue: 3, 201-208.
 - Clavel A. (2002) Vitamin B12 and folic acid in children with Intestinal Parasitic Infection. *Journal of the American College of Nutrition* 21(2)109-113.
 - Cortez González S. (en proceso) Evaluación de la biotoxicidad de agentes terapéuticos utilizados en giardiosis empleando el crustáceo *Artemia salina*. Tecnológico de Tecámac.
 - Cosar, C., Ganter, P., and Juluo, L. (1972) Etude expérimentale du métronidazole activités trichomonacide et amoebaicede. Toxicité et propriétés pharmacologiques générales. *Presse Med.*, 1069.
 - Cruz SM (2001) Determinación en el protozooario *Giardia duodenalis*. Caracterización parcial de la resistencia a fármacos en el parásito. Tesis de Licenciatura. Escuela nacional de Estudios Profesionales Iztacala UNAM México
 - De Amici M, Funicello M, Conti P, De Micheli C, Mennini T, Gobbi M. (2004) Dissociation of [3H]L-glutamate uptake from L-glutamate-induced [3H]D-aspartate release by 3-hydroxy-4,5,6,6a-tetrahydro-3aH-pyrrolo[3,4-d]isoxazole-4-carboxylic acid and 3-hydroxy-4,5,6,6a-tetrahydro-3aH-pyrrolo[3,4-d]isoxazole-6-carboxylic acid, two conformationally constrained aspartate and glutamate analogs. *Mol Pharmacol.* ; 66(3):522-9.

-
- Diana GD, Oglesby RC, Akullian V, Garabateas PM, Cutcliffe D, Mallazo JP, Otto MJ, MacKinlay MA, Maliski EG, Michalec SJ. (1987) Structure-activity studies of 5-[[4-(4,5-dihydro-2-oxazol)phenoxy]alkyl]-3-methylisoxazoles: inhibitors of picornavirus uncoating. *Journal Medical Chemistry*. (2):383-8
 - Duque- Beltran Sofia, Nicholls R., Arévalo A., Guerrero R., Montenegro S., James M. (2002) Detection of *Giardia duodenalis* antigen in Human Fecal eluates by enzyme-linked Immunosorbent assay using polyclonal antibodies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 97(8):1165-1168
 - Eciind Thomas D. et. al. (1990) Activity of the Anthelmintic Benzimidazoles against *Giardia lamblia* *In vitro*. *Concise Communications* 162. 1408-1411
 - Eddington ND, Cox DS, Roberts RR, Butcher RJ, Edafiogho IO, Stables JP, Cooke N, Goodwin AM, Smith CA, Scott . (2002) Synthesis and anticonvulsant activity of enamines. 4. Investigations on isoxazole derivatives. *Eur J Med Chem.* ;37(8):635-48.
 - Elmendorf Heidi, Dawson Scott, McCaffery M. (2002) The cytoskeleton of *Giardia lamblia* , *Int. journal of Parasitology* 33 , 3-28
 - Gardner B. T. and Hill R, David (2001) Treatment of Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 14: 114-118.
 - Goodman Alfred . (2003) Las bases farmacológicas de la terapéutica, vol I y II, Décima Edición Editorial Mc.Graw Hill
 - Grundmann and Grünanger P. (1971), The Nitrile Oxides, *Springer-Verlag, New York*, vol 3 230-320.

-
- Grunanger P ,D'Alo G, Invernizzi L, (1969) [Research on 1,,4-oxadiazole-5-ones. 3. Acylation of 3-phenyl-5-amino-1,2,4-oxadiazole] *Boll Chim Farm.* Dec;108(12):792-800.P.
 - Hawrelak J, (2003) Giardiasis: Pathophysiology and Management.*Altern. Med. Rev.* Vol 8, 2,129-142
 - Henze, K. Martin,W. (2003) Essence of mitochondria. *Nature Publishing group.*426,127-128.
 - Horie H. (1956) Anti-*Trichomonas* effect af azomycin. *J. Antibiot* (Tokyo),9:168.
 - Jawetz, Melnick, Adelberg, (1998) Microbiologia médica, Capítulo 46, *Parasitologia Médica*;700-701
 - Jezierska A., Maczynski M., Koll A. (2004) Structure/Activity Investigations of 5-Substituted 3-Methylisoxazole [5,4-d]1,2,3-triazin-4-one derivatives, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, 337, 81-89.
 - Kai H., Ichiba T; Tomida M;Masuko M; (1999) Synthesis and fungicidal activities of 3-(alpha-alkoxyiminobenzyl)isoxazole derivates.*Journal of Pesticide Science.*
 - Knecht W, Loffler M. (1998) Species-related inhibition of human and rat dihydroorotate dehydrogenase by immunosuppressive isoxazol and cinchoninic acid derivatives. *Biochem Pharmacol.*Nov 1;56(9):1259-64.
 - Lang S.A., Jr. and Y.-I. Lin, A. R. Katritzky, C. W. Rees and K. T. Potts, eds (1984) *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*,, *Pergamon Press, Oxford*, , Vol. 6,
 - Lau, A.H., Lam N.P., Piscitelli,S.C., Wilkes,L. and Danziger, L.H. (1992) Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives. *Clin. Pharmacokinet.* 23:328-364.

-
- Lenz S, Ebert B ,Brehm L, Bregnedal P, Hansen JJ, Frederiksen K, Bogeso KP, Krogsgaard-Larsen P.(1994) Resolution, absolute stereochemistry, and pharmacology of the S-(+)- and R-(-)-isomers of the apparent partial AMPA receptor agonist (R,S)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-phenylisoxazol-4-yl)propionic acid [(R,S)-APPA]. *J Med Chem.* Apr 1;37(7):878-84.
 - Litter Manuel, (1984) Compendio de farmacología, Tercera Edición, Editorial El Ateneo.
 - Martin W, Hoffmeister M, Rotte C, Henze K. (2001). An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle. *Biol Chem* Nov;382(11):1521-39
 - Martínez. (1991) Manual de Parasitología para QFB, UNAM 51-52
 - Mazzei M, Sottofattori E, Dondero R, Ibrahim M, Melloni E, Michetti M. (1999)N,N-dialkylaminosubstituted chromones and isoxazoles as potential anti-inflammatory agents. *Farmaco.* Jul 30;54(7):452-60.
 - Molina Aguilar N (en proceso) Eficacia de compuestos derivados de Furano sobre trofozoítos de *Giardia duodenalis in vitro*. Caracterización parcial de la multirresistencia a fármacos utilizados contra este parásito Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
 - Odo, Yamashita, Hiroyuki; Hajime; Odate, Makoto; Kawamo, Hiroshi; Shiga, Yoshio; Yoshioka, Mutsuko(1988) (Mitsui Toatsu Chemicals, Inc., Japan). Treatment of cerebrovascular disorders by isoxazole derivatives and their preparation. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, <http://www.syphase.com>

-
- Padmavathi, V.; Sharmila, K.; Balaiah, A.; Somasekhar Reddy, A.; Bhaskar Reddy, D. Synth. Commun. (in press) . <http://www.syphase.com>
 - Padmavathi, V.; Sharmila, K.; Somasekhar Reddy, A.; Bhaskar Reddy, D. Indian J. Chem. (in press). <http://www.syphase.com>
 - Patterson JW, Cheung PS, Ernest MJ (1992). 3-Carboxy-5-methyl-N-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-isoxazolecarboxamide, a new prodrug for the antiarthritic agent 2-cyano-3-hydroxy-N-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-2-butenamide. *J Med Chem.* 7;35(3):507-10
 - Paton R. M., , Katritzky A. R., O. Meth-Cohn and C. W. Rees, eds., (1995) In Comprehensive Organic Functional Group ,*Transformations Chapter 3.20*, p 683.
 - Ponce M, Gómez J, González A, (2001) Determinación *in vitro* de la susceptibilidad a la nitazoxanida de cuatro aislados de *Giardia duodenalis* obtenidos de diferentes huéspedes. *Rev Invest Clin* ; 53(1): 41-45
 - Raffa D, Daidone G, Maggio B, Schillaci D, Plescia F, Torta L. (1999). Synthesis and antifungal activity of new N-isoxazolyl-2-iodobenzamides. *Farmaco*. Jan-Feb;54(1-2):90-4.
 - Ramirez Cruz Catalina,(2003) Evaluación de la actividad *in vitro* de derivados de 4-nitroisoxazol sobre trofozoítos de *Giardia duodenalis*. Tesis de Licenciatura Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
 - Rodríguez, R, Aguila A, Nitazoxanida, efectos adversos, Salud Publica de México, vol 46, no. 6. 496-497.
 - Roe, F.J. (1977) Metronidazole: review of uses and toxicity. *J. Antimicrob. Chemother.* 3:205-212

-
- Romero Montoya L. (1996) Determinación de la eficacia y actividad biológica *in vitro* de fármacos de la familia de los 5-nitroimidazol ante el protozooario *Giardia duodenalis*. Caracterización parcial de la resistencia a fármacos en este parásito Tesis de Licenciatura Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
 - Schulz R, Kewitz H (1971) Inhibition of lipolysis with dimethyl pyrazole for the tratament of ketoacidosis in cattle. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* (9)101-7.
 - Sogin, M. Gunderson, J, Elwood H. Science (1988) Phylogenetic meaning of kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science* 243, 75-77
 - Sousa, M.C. Goncalves C.A. (2001) Adherence of *Giardia lamblia* trofozoites to Int-407 intestinal cells *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 258-65
 - Stanier Roger (2002) Microbiología. 2ª de Edit. Reverté España 2002 pp 697
 - Thompson R.C.A. (2000) Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *International Journal for Parasitology* 30, 1252-1257.
 - Thompson RCA, Lymbery AJ Meloni BP (1990) Genetic variation in *Giardia* Kunster, 1882: taxonomic and epidemiological significance. *Protozool Abstracts* 14:1-28.
 - Thompson RCA, Reynoldson JA Mmendis AHW (1993) *Giardia* and giardiasis *Adv. Parasitology* ;32:71-160
 - Tibayrenc, M. Kjellberg F. Ayala F.J. A (1991) Clonal theory of parasitic protozoa *.Proc. Natl. Acad Sci USA* 87, 2414-8
 - Tovar J, León-Avila G, Sanchez LB, Sutak R, Tachezy J, van der Giezen M, Hernandez M, Muller M, Lucocq JM. . (2003) Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* Nov 13;426(6963):172-6.

-
- Uncroft P, Upcroft JA. (2001) Drug targets and mechanism of reference in the anaerobic protozoa. *Clin Microbiol Rev*;14:150-164
 - Velázquez D.L. (en proceso) Eficacia de compuestos derivados de acridina sobre trofozoítos de *Giardia duodenalis* in vitro .Caracterización fenotípica parcial de cultivos del parásito resistentes a distintos fármacos. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
 - Warren K.S. (1998) The biology of parasitism: a molecular and immunological approach, *New York*: 3-12.
 - WHO. The World health report 1996 Geneva : World Health Organization (1993)
 - Wolfe MS. (1990) Clinical symptoms and diagnosis by traditional methods . In EA Meyer, Giardiasis, vol 3. Human Parasitic Diases. *Elsevier Science Publishers Biomedical Division, Amsterdam*,p 175-185..
 - Ximénez C. (2002), Las parasitosis intestinales en México. *Fundación Mexicana para la salud*.58-59

IX.- ANEXOS

1.- Amortiguador de Fosfatos- Salina (PBS) Stock 10 x

Cloruro de Sodio	80.0g
Cloruro de Potasio	2.0g
Fosfato de sodio dibásico haptahidratado o dodecahidratado	21.7g

Disolver en agua destilada hasta 800 mL

Ajustar pH a 7.2 y aforar a 1 litro

Para su uso a 1x disolver 1:10 en agua destilada

2.- Medio TYI-S-33 Suplementado con bilis (ATCC#1404)

Bilis bovina bacteriológica (Sigms chem. Co.)	0.5g
Trypticasa (casein digest peptona,BBL)	20 g
Extracto de Levadura (BBL)	10 g
Dextrosa	10 g
Cloruro de sodio	2 g
Cisterna-monoclorohidrato	2 g
Acido ascórbico (Merck)	.1 g
Fosfato de potasio (Baker An)	.6 g
Fosfato de potasio monobásico (Baker An)	1 g
Citrato Feriico de amonio (Baker An)	23g

Metodología

Disolver en H₂O bidestilada aforando a 800 ml.

Ajustar pH a 6.8-6.9 y aforar a 900 ml.

Filtrar en membrana de .22 Mm de diámetro de poro.

Realizar prueba de esterilidad.

Completar con 100ml de suero bovino descomplementafo (HyClone)

y 1 ml de stock de penicilina (50,000 U) estreptomycin (50 mg)

Almacenar a 4°C hasta su uso.

3.- GLOSARIO

Alopecia: pérdida de cabello.

Angiodema: afección a nivel cardiaco

Anorexia: falta anormal de apetito o ganas de comer

Ataxia: perturbación de las funciones del sistema nervioso que incapacita para coordinar los movimientos voluntarios.

Convulsión epiléptica: es el imbalance entre potenciales postsinápticos excitatorios y potenciales postsinápticos inhibitorios, a favor de los primeros, que se traduce en una descarga (despolarización) excesiva y sincrónica de neuronas.

Cristaluria: presencia de cristales en la orina.

Encefalopatía: problema o disfunción de los órganos nerviosos de la cavidad craneal.

Eosinofilia: cuando el recuento de eosinófilos es igual o superior a $0,5 \times 10^9$ células/L y la eosinofilia puede ser arbitrariamente clasificada como baja o discreta (menos de $1,0 \times 10^9$ /L), moderada (entre $1,0$ y $3,0 \times 10^9$ /L) y elevada (más de $3,0 \times 10^9$ /L). El espectro etiológico de las eosinofilias es amplio y reconocen orígenes infecciosos, alérgicos, cutáneos, pulmonares, hematológicos, etc

Estomatitis: inflamación del estómago

Glositis: inflamación de la lengua

Hematuria: presencia de sangre en orina.

Lengua saburral: la lengua presenta una capa blanquesina a causa de la secreción mucosa que se acumula en las paredes del estómago.

Moniliasis: Esta es una enfermedad que afecta principalmente la parte superior del aparato digestivo, caracterizada por zonas engrosadas en el buche y proventrículo, erosión en la molleja e inflamación en el ano. Está causada por una levadura que parece un hongo, (*Candida albicans*).

Ototoxicidad: daño al oído.

Psicosis tóxica: se caracteriza por comportamiento maniaco que puede confundirse con status alcohólico

Xerostomía: endurecimiento del estomago.