



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Síntesis de compuestos análogos al omeprazol
con posible capacidad de inactivar a la triosafosfato isomerasa
de *Giardia lamblia***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
BEATRIZ HERNÁNDEZ OCHOA

TUTOR PRINCIPAL
HORACIO REYES VIVAS
Instituto Nacional de Pediatría

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. MARIETTA TUENA SANGRI
Instituto de Fisiología Celular
DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO
Facultad de Química

Ciudad de México. Mayo, 2016



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.

PMDCB/1009/2015...1a

Beatriz Hernández Ochoa
Alumno (a) de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

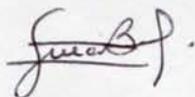
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 21 de septiembre del presente, conocieron su solicitud de **ASIGNACIÓN** de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRO (A) EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Síntesis de compuestos análogos al omeprazol con posible capacidad de inactivar a la trifosfato isomerasa de *Giardia lamblia***", dirigida por el Dr. Horacio Reyes Vivas

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Ruy Enrique Pérez Montfort
VOCAL	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
VOCAL	Dr. Agustín Plancarte Crespo
VOCAL	Dr. Gabriel Navarrete Vázquez
SECRETARIO	Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de septiembre de 2015.
COORDINADORA DEL SUBCOMITÉ ACADÉMICO



DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO

C.c.p. Tutor
C.c.p. Archivo
BGP*lgg

Dedicatorias

Porque me han demostrado que con amor

Se puede lograr todo,

Porque celebran cada paso que doy,

Cada logro como el triunfo del fruto de sus

Entrañas

Con cariño para mis padres

Ana María y José

Por su grandioso cariño y apoyo.

A mis hermanas

Adri, Gaby y Pau

Por todos los momentos compartidos

Porque como las ramas de un árbol, crecemos en

Distintas direcciones pero nuestra raíz continúa

Siendo una sola. Así, la vida de cada una será

Siempre una parte esencial de la vida de la otra.

Agradecimientos

Agradezco especialmente al **Dr. Horacio Reyes Vivas** no solo por su valiosa contribución a la realización de este trabajo, sino también por su amistad y confianza.

Agradezco al **Dr. Gabriel Navarrete Vázquez** por recibirme en su laboratorio y por su valiosa ayuda en la síntesis de los compuestos.

Agradezco al comité académico por las sugerencias y aportaciones realizadas para el enriquecimiento de este trabajo, **Dra. Marietta Tuena Sangri, Dr. José de Jesús García Trejo.**

Agradezco al **Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP)** por su apoyo para asistir al XXX Congreso Nacional Bioquímica.

Agradezco a cada uno de los miembros del laboratorio de Bioquímica Genética, por sus comentarios y acciones en apoyo a la realización de este trabajo.

Agradezco al **Dr. Calderón** por motivarme en mi crecimiento académico.

Agradezco a los miembros del laboratorio de Inmunoquímica, **Adrian, Arceli, Sandy, Rosalia y Romy**, por apoyarme en cumplir mis metas.

Agradezco al **M. en C. Fredy**, por hacerme ver luz donde no la hay, por ser la vela que se prende y me rescata de la oscuridad, por tenderme una mano cuando he necesitado apoyo.

Agradezco al **Dr. Saúl**, por hacerme ver que no hay saber más grande que creer en ti mismo y así no habrá nada que este fuera de tus posibilidades.

EL CORAZÓN ES EL CENTRO QUE SE DISPERSA EN PRISMAS PARA FORMAR UNA ESTRELLA, DE CUYA DORADA LUZ NACE EL GRAN VALOR DE LA VIDA. ESA ESTRELLA ES EL AMOR... Y ERES TU QUIEN LA ILUMINA.

**Emilio Rojas
Pequeño hombre**

CONTENIDO

1. Abreviaturas	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	7
3.1 Generalidades de <i>Giardia lamblia</i>	7
3.2 Tratamiento contra la Giardiasis	12
3.3 La triosafosfato isomerasa como blanco de antiparasitarios	16
3.4 Cisteína C222 como blanco para el diseño de fármacos	18
3.5 Omeprazol como compuesto inactivador de GITIM	21
4. Objetivos	23
4.1 Objetivo general	23
4.2 Objetivos particulares	23
5. Material y Métodos	24
5.1 Métodos Generales	24
5.2 Ensayos espectroscópicos	24
5.3 Síntesis de los intermediarios	25
5.3 Síntesis de los compuestos finales	26
5.4 Expresión y purificación de la enzima recombinante GITIM C202A	28
5.5 Reactividad de la GITIM al omeprazol y análogos	28
5.6 Determinación de la actividad enzimática	29
5.7 Experimentos de inactivación	30
5.8 Efecto de un agente reductor en GITIM previamente tratada con los compuestos sintetizados	32
5.9 Ensayos espectroscópicos	33
5.10 Ensayos de susceptibilidad sobre los trofozoitos de <i>Giardia lamblia</i>	33
6. Resultados	34
7. Discusión de Resultados	56
8. Conclusiones	65
9. Bibliografía	66

1. ABREVIATURAS

TIM	Triosafosfato isomerasa
TbTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
GITIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Giardia lamblia</i>
HuTIM	Triosafosfato isomerasa de Humano
CAT	Cloramina T
MMTS	Metilmetano tiosulfonato
DTNB	ácido bis-nitro benzoico
MTSCE	Carboxi etil metano tiosulfonato
ATP	Adenosina trifosfato
MTZ	Metronidazol
IC₅₀	Concentración inhibitoria 50
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
GAP	Gliceraldehído-3fosfato
RNAi	Ácido ribonucleico de interferencia
RMN ¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN ¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
Et₃N	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
CCF	Cromatografía en capa fina
V/V	Volumen/volumen
TMS	Tetrametilsilano
DMSO	Dimetilsulfóxico
ppm	Partes por millón
s	Singulete
d	Doblete
dd	Doble de dobles
t	Triplete
m	Multiplete
pf	Punto de fusión
LB	Luria Bertani
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
rpm	Revoluciones por minuto
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
DDT	Ditiotreitol
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido
α-GDH	α-glicerol 3-fosfato deshidrogenasa

2. INTRODUCCIÓN

Las parasitosis intestinales ocasionadas por protozoarios son un problema de salud pública principalmente en países en vías de desarrollo, su prevalencia es variable en países, estados y comunidades. La frecuencia aumenta en zonas geográficas donde las condiciones ecológicas, las características socioeconómicas, infraestructura de servicios públicos y nivel educativo de los padres son deficientes. Estos factores están presentes en América Latina representando en México una de las principales causas de morbilidad.

Dentro de estas infecciones, el parásito *Giardia lamblia* ocupa un lugar importante en las enfermedades producidas en el ser humano. Este protozoario, también conocido como *Giardia duodenalis* o *Giardia intestinalis*, es un parásito que se alberga en el intestino delgado, primordialmente en el duodeno, afectando principalmente a niños en edades de entre 1 a 5 años (Ali & Hill 2003). Los pacientes que la padecen presentan manifestaciones clínicas variables, desde la sintomatología de una enfermedad moderada, hasta la de una grave que puede poner en riesgo su vida, en donde se produce un síndrome de mala absorción intestinal que afecta la asimilación de hierro, azúcares, vitaminas liposolubles, ácido fólico y otros nutrientes. Esto provoca baja de peso y retardo en el crecimiento físico e intelectual (Hawrelak 2003). La giardiasis es una infección difícil de controlar debido a las diferentes formas en que el agente causal se transmite entre la población.

En el control de la enfermedad producida por *Giardia*, la prevención y la terapia juegan un papel muy importante. Los derivados nitroimidazólicos, en especial el metronidazol, [(2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etanol)], continúan siendo el tratamiento de elección contra la giardiasis (Busatti et al. 2009).

Aunque existen diversas opciones terapéuticas efectivas, está documentado que algunos de los medicamentos tienen considerables efectos tóxicos en el paciente (Upcroft 1998; Watkins & Eckmann 2014) además de existir evidencias del surgimiento de cepas resistentes a los medicamentos usados actualmente (Upcroft & Upcroft 2001). Esto conduce a la búsqueda de nuevos fármacos que presenten mayor efectividad y

especificidad contra el agente patógeno, pero con menos reacciones adversas en el hospedero. Esto será posible mediante nuevas estrategias experimentales y la búsqueda de nuevos blancos biológicos para el diseño racional de fármacos con actividad antigardiásica.

Algunos compuestos antihelmínticos del grupo de los bencimidazoles como el mebendazol fueron ensayados con resultados iniciales prometedores, sin embargo, estudios posteriores demostraron una baja eficacia (Gardner & Hill 2001; Kazimierczuk et al. 2002). Otros estudios señalaron una buena eficacia *in vitro* del antihelmíntico albendazol, pero ensayos posteriores demostraron que su eficacia es inferior a la de los fármacos antiardiásicos de elección (Gardner & Hill 2001). Análogos del albendazol y el mebendazol se han sintetizado y probado *in vitro* contra *G. lamblia*, encontrándose que algunos de estos análogos son tan activos como el metronidazol (Navarrete-Vázquez et al. 2003).

La triosafosfato isomerasa como blanco terapéutico para el diseño de fármacos antiparasitarios.

En las enfermedades infecciosas, el objetivo del diseño racional de fármacos es identificar una biomolécula fundamental para la supervivencia de un patógeno y que pueda considerarse como un blanco farmacológico. Esta evaluación puede realizarse sometiendo a la biomolécula a compuestos químicos que impidan su función para, posteriormente, desarrollar compuestos altamente selectivos contra dicha región de la biomolécula permitiendo generar fármacos más específicos (García-Torres et al. 2012; Cáceres et al. 2010)).

En ese contexto, la triosafosfato isomerasa (TIM), enzima de la vía glucolítica, ha sido ampliamente propuesta como un blanco antiparasitario. La TIM muestra un sitio activo y su estructura de barril alfa-beta altamente conservados; sin embargo, otras regiones son menos conservadas entre especies como la región interfacial. Por lo que, las diferencias estructurales en esta región se han utilizado para inhibir específicamente a la

TIM en parásitos (Gómez-Puyou et al. 1995; Pérez-Montfort et al. 1999; Olivares-Illana et al. 2006).

En el estudio realizado por Gómez-Puyou y colaboradores en 1995 se demostró que es posible inactivar de forma específica de especie a la TIM. Su hipótesis consideraba la existencia de residuos de aminoácidos no conservados entre organismos patógenos y hospederos, que fueran relevantes para mantener la actividad y estructura de la enzima, al considerar tales residuos se podrían desarrollar compuestos inactivadores específicos de especie.

Este grupo logró inactivar a la TIM de *Trypanosoma brucei* (TbTIM) usando cloramina T (CAT), compuesto que modifica químicamente residuos de Cisteína (Cys) y Metionina (Met). Identificando de esta forma un aminoácido no conservado (Cys 14), el cual es parte importante de la catálisis en TbTIM.

En un trabajo previo, Zubillaga y colaboradores en 1994 demostraron que, al utilizar CAT, la TIM de conejo se inactivó completamente, mientras que la TIM de levadura sólo un 50 %. Al analizar el contenido de residuos de Cys y Met de cada enzima, encontraron dos residuos de cisteínas equivalentes en la posición 42 y 126. Adicionalmente observaron que la TIM de conejo tiene tres residuos de Cys y dos de Met que no están en la TIM de levadura. Y concluyeron que la diferencia de sensibilidad de la TIM de conejo al CAT se debió a la oxidación de los residuos de Cys y Met ausentes en la levadura (Zubillaga et al. 1994).

Por otro lado, el trabajo de Gómez-Puyou demostró que la TbTIM, se inactivó con CAT de forma muy similar a la TIM de conejo. Este resultado sugirió que en las TIM de conejo y de *T. brucei* tendrían un residuo equivalente en posición que al modificarse conlleva a su inactivación, el único residuo que comparten en posición es el 14, siendo en TbTIM una Cys y en conejo una Met y la resistencia de la levadura se debería a la ausencia de dicho residuo.

A partir de estos resultados surgieron más trabajos en otras TIM donde se investigó la Cys 14 de interfase y otras cisteínas poco conservadas (Maithal et al. 2002; Garza-Ramos et al. 1996; Garza-Ramos et al. 1998)

En el laboratorio de Bioquímica Génética del Instituto Nacional de Pediatría se comenzó a estudiar a la TIM de *Giardia lamblia* (GITIM). Esta enzima posee en su secuencia primaria cinco cisteínas: Cys14, Cys127, Cys202, Cys222 y Cys228. Se realizaron ensayos de modificación química de estos residuos con compuestos reactivos de tioles para identificar regiones que al modificarse afectarían la actividad catalítica de la GITIM. Los resultados indicaron que la derivatización de la C222 inactiva específicamente a la enzima; este residuo no es interfacial y tampoco está conservado localizándose cerca de la superficie de la proteína (Enríquez-Flores et al. 2008). Ensayos de mutagénesis dirigida demostraron que a pesar de que la GITIM tiene otros cuatro residuos de cisteínas (C14, C202, C127 y C228), sólo la modificación de la C222 causa la inactivación de la enzima (Enríquez-Flores et al. 2011). La inactivación es específica de la GITIM porque, aunque la TIM de humano (HuTIM) tiene una cisteína equivalente (C217), su actividad prácticamente no se afecta por los compuestos reactivos de tioles (Enríquez-Flores et al. 2011). Análisis estructurales de la GITIM y HuTIM muestran que existen marcadas diferencias en las regiones vecinas de la C222 de la GITIM y la C217 de la HuTIM; sólo uno de los siete residuos alrededor de las dos cisteínas es común. Estos resultados apoyan la propuesta de que la región C222 puede utilizarse como un blanco específico para el diseño racional de fármacos (Hernández-Alcántara et al. 2013).

Respecto al mecanismo de inactivación de la GITIM por la modificación química de la C222, es relevante mencionar que cuando se derivatiza este residuo con pequeños grupos tiometilos no polares, como el metilmetanotiosulfonato (MMTS), la actividad catalítica de la GITIM se reduce a la mitad. En contraste, la actividad de la enzima fue completamente abolida por la introducción de grupos voluminosos como tiocarboxietil o tionitrobenzoatos cargados negativamente. Estos resultados sugieren que la inactivación

se correlaciona con las propiedades fisicoquímicas del agente derivatizante (Hernández-Alcántara et al. 2013)

El omeprazol es uno de los inhibidores más importantes de la bomba de protones (PPIs), inhibe irreversiblemente la H^+/K^+ ATPasa mediante la derivatización de la Cys 813. Debido a su mecanismo de inhibición previamente descrito para otras enzimas, se probó su utilidad como un inactivador de GITIM y eventualmente, como un potencial nuevo anti-giardiasis. En el estudio se realizaron los ensayos de inactivación de GITIM vs HuTIM a concentraciones crecientes de omeprazol y se corroboró que produce un efecto de inactivación especie-específico de manera similar a lo previamente reportado para derivatizantes como el DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzónico) y el MTSCC (Carboxietil metano tiosulfonato). De igual manera, al probar el omeprazol contra las mutantes de Cys de GITIM, se corroboró que en ausencia de la Cys 222, GITIM no se inactiva (Patente MX/a/2008/012900; Reyes-Vivas et al. 2014).

El omeprazol es un compuesto del tipo de los bencimidazoles, que ha mostrado actividad como inactivador de la triosafosfato isomerasa de *Giardia lamblia*. Su estructura química está formada por un anillo de bencimidazol y uno de piridina, en ellos se encuentran sustituyentes tales como un metoxilo en el bencimidazol, y dos metilos y un etoxilo en la piridina. Tomando en cuenta los resultados mencionados anteriormente se propone ahora la síntesis de análogos al omeprazol realizando modificaciones estructurales con el objetivo de potenciar su capacidad inactivante. Esto debido a que la modificación estructural de un compuesto bio-activo puede tener repercusiones importantes en sus propiedades fisicoquímicas y cambios en su actividad que pueden ir desde la potenciación hasta la desaparición total de la misma, y en algunos casos es posible la aparición de propiedades biológicas diferentes.

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades de *Giardia lamblia*

Biología

Giardia lamblia se encuentra clasificada dentro de la clase Zoomastigophorea, orden Diplomaida, familia Hexamitidae. Este rubro caracteriza a protozoarios que presentan axostilo, dos núcleos, simetría bilateral y tienen flagelos como medio de locomoción (Plutzer et al. 2010).

Este protozoario se ubica dentro del género *Giardia*, las especies de este protozoario se han clasificado tomando en cuenta criterios como: la variación morfológica, la posición de cuerpos mediales, la forma del parásito y la relación del disco suctor con el tamaño total del trofozoito, dividiéndose al género en tres grupos: *Giardia agilis* (anfibios), *Giardia muris* (roedores y aves) y *Giardia lamblia* que infecta mamíferos incluyendo al hombre.

Giardia lamblia tiene la capacidad de adoptar dos formas: trofozoito o forma móvil y quiste o forma infectante (Figura 1). Los trofozoitos de *G. lamblia* presentan forma de gota o lágrima con simetría bilateral, se caracteriza por ser binucleado, mide de 12 a 14 μm de largo por 7 a 9 μm de ancho y 1 a 2 μm de espesor, presentan 8 flagelos dispuestos en 4 pares simétricos, 2 anterolaterales, 2 postero-laterales, 2 ventrales y un par caudal. En la porción anterior se encuentra el disco suctor que mediante mecanismos de hidroadhesión, le confieren al parásito su capacidad de adherencia a la mucosa intestinal. La forma quística tiene forma ovoide y mide de 8 a 12 μm en su diámetro, circundado por una pared quística hialina que le confiere capacidad de resistencia al medio ambiente. Posee de 2 a 4 núcleos, dicho número dependerá del grado de madurez quística, los quistes inmaduros poseen 2 núcleos, mientras que los maduros tienen 4.

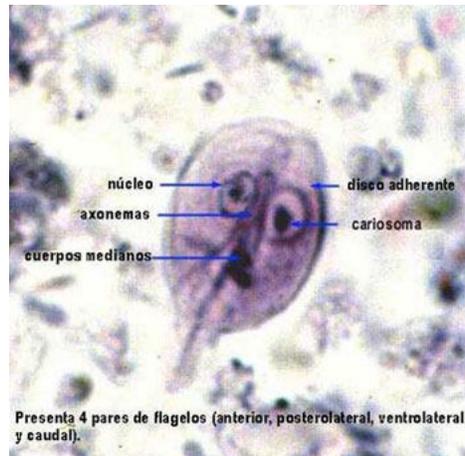


Figura 1. Trofozoito *G. duodenalis*. S.J. Upton, Kansas University

Metabolismo

Giardia lamblia tiene características aeróbicas y anaeróbicas, respira en presencia de oxígeno y se considera un organismo aerotolerante o microaerofílico. En su respiración no produce hidrógeno molecular ni moléculas con enlaces de alta energía. La respiración endógena es estimulada por la glucosa; su metabolismo está basado en la glucólisis que conduce a la producción de acetato, etanol, alanina y CO₂. Cataboliza la asparagina mediante la dihidrolasa de arginina con la producción de adenosin trifosfato (ATP). Es incapaz de sintetizar colesterol, sin embargo, tiene la capacidad de sintetizar farnesilo y geranilgeranilo en isoprenilatoproteínas. Asimismo, *Giardia* es incapaz de sintetizar purinas o pirimidinas y tiene la necesidad de recuperarlas del lumen intestinal (Adam 2001; Lujan 2011).

Por mucho tiempo se consideró a *G. lamblia* como un eucarionte amitocondriado, fue en el 2003 cuando Tovar y colaboradores demostraron la presencia de reductos mitocondriales denominados mitosomas (Tovar et al. 2003). Sin embargo, no existe evidencia de que *G. lamblia* realice fosforilación oxidativa, obteniendo su ATP principalmente mediante la vía glucolítica. Aunque se ha demostrado que el metabolismo de la arginina también produce energía, ésta no parece representar una fuente importante (Edwards et al. 1992; Stadelmann et al. 2013). Por todo lo anterior, se ha

sugerido que las enzimas de la glucólisis en *G. lamblia* pueden ser un buen blanco para dirigir compuestos que logren abatir al parásito.

Epidemiología

Giardia lamblia es el agente causal de la giardiasis, siendo uno de los parásitos más comunes que infecta el tracto intestinal del ser humano, mostrando una distribución mundial.

La infección por *Giardia* se ha asociado a condiciones higiénico-sanitarias deficientes en los países en vía de desarrollo (Hardy et al. 2002), así como en los países desarrollados donde las condiciones higiénicas favorecen infecciones relacionadas con fuentes de agua contaminadas. La infección requiere de la ingestión de quistes del parásito, por lo que los niveles de sanidad ambiental son inversamente proporcionales a la prevalencia de la enfermedad. Por ejemplo, se ha observado prevalencias más altas tanto en países en vías de desarrollo como en regiones tropicales y subtropicales, donde la contaminación de agua o alimentos con materia fecal es frecuente, traduciéndose en cifras de frecuencia de infección elevadas en niños y adultos (Ali & Hill 2003).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que aproximadamente 250 millones de personas en el mundo están infectadas y que se presentan 2.8 millones de nuevos casos por año, siendo una de las causas más comunes de diarrea en países industrializados, con una prevalencia del 15 – 30 % y del 20 – 60 % en países en vías de desarrollo (Eckmann 2003; Syed y Hill, 2003; Ag & Gre 2013). El Estado de Sonora ocupa el quinto lugar a nivel nacional con esta parasitosis reportándose que aproximadamente el 50 % de la población infantil está infectada con *G. lamblia* según el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica Dirección General de Epidemiología (SSA 2005).

Otros autores informan mayor frecuencia para el grupo de lactantes con cifras muy variables, incluso para el mismo lugar, lo que depende del grupo de población estudiada o

del método empleado; sin embargo, se observa que la infección es más común en grupos escolares de poblaciones rurales en relación a los de la urbana (Bouزيد et al. 2008; Cordero Bernabé et al. 2014).

La enfermedad puede transmitirse mediante tres mecanismos: a través del agua, mediante alimentos contaminados y mediante transmisión fecal oral directa. (Smith et al. 2006)

Ciclo Biológico

El ciclo biológico de transmisión se inicia con la ingestión por el humano de la forma infectante: quistes viables de *Giardia lamblia*. Estudios realizados por Rendtorff, indicaron que son necesarios entre 10 y 100 quistes para provocar la infección.

El mecanismo de infección puede llevarse a cabo por medio de materia fecal diseminada en el ambiente. Otro proceso involucrado en la transmisión es el consumo de alimentos mal lavados que fueron regados con aguas negras. Se han descrito brotes por transmisión a través del agua de consumo. En relación a este último mecanismo de transmisión, cabe mencionar la resistencia que presentan los quistes en soluciones hipotónicas tales como el agua. Se ha visto que en agua a 21 °C los quistes pueden sobrevivir alrededor de un mes y a 8 °C por más de dos meses; sin embargo, no resisten la desecación ni temperaturas mayores de 50 °C durante 15 minutos, aunque tienen gran resistencia ante los desinfectantes clorados (Bouزيد et al. 2008).

En la transmisión juegan un papel importante los fómites como pasamanos, dinero, sanitarios, juguetes, etc. Por otra parte, también se ha descrito la infección adquirida mediante el contacto sexual. Asimismo, los artrópodos como vectores mecánicos son importantes en la cadena de transmisión, ya está demostrado que los quistes de *Giardia lamblia* pueden sobrevivir varios días en el intestino de la cucaracha y que son capaces de atravesar el intestino de las moscas sin alteraciones (Smith et al. 2006).

Después de ser ingeridos, las formas quísticas infectantes sufren un proceso de desenquistamiento, mismo que es iniciado por el ácido gástrico a pH 2. El trofozoíto es intolerante a cambios de pH y sólo acepta un intervalo entre 6.4 y 7.4. El desenquistamiento se completa a nivel duodenal donde emerge a través de la pared quística, un trofozoito tetranucleado en proceso de división binaria dando lugar a dos trofozoítos binucleados.

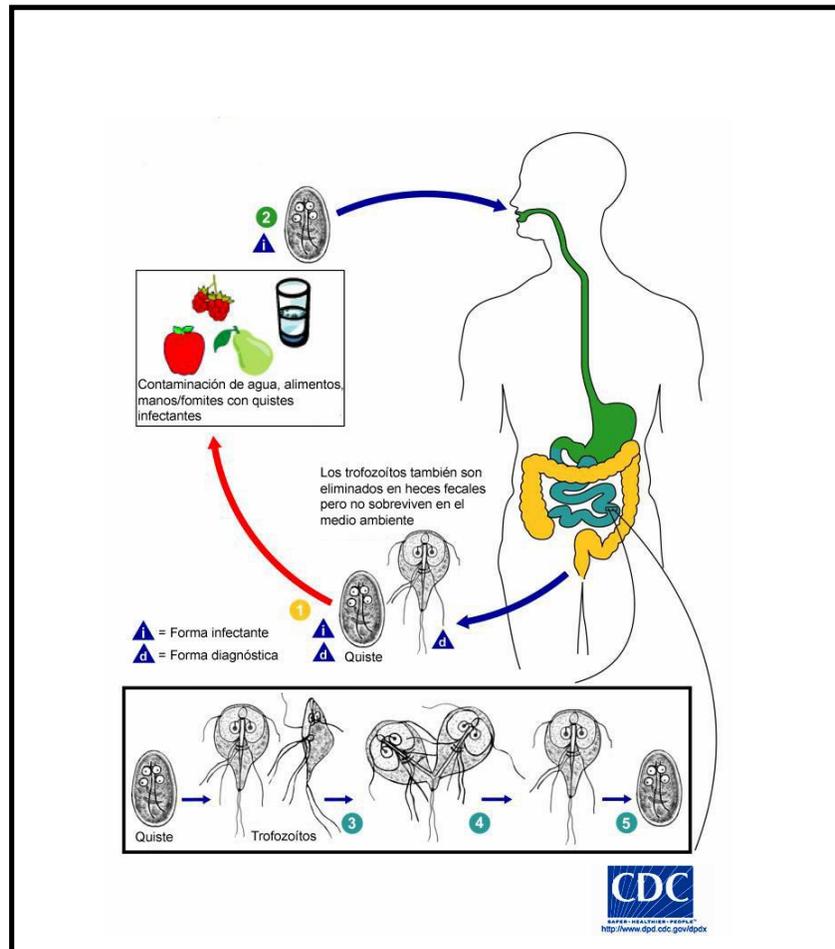


Figura 2. Ciclo de vida de *G. lamblia*. Una vez que el quiste entra al hospedero, este se desenquista alojándose en el duodeno. Posteriormente se dividen los trofozoítos. Algunos de ellos se enquistan y son excretados a través de las heces para ingerirse por un nuevo hospedero, cerrándose así el ciclo de vida de este parásito.

Cada trofozoíto se multiplica de manera activa por medio de un proceso de división longitudinal surgiendo un gran número de elementos en poco tiempo, estableciéndose los parásitos en su hábitat, constituido por el epitelio del intestino

delgado, formado en parte por duodeno y yeyuno. En su hábitat *Giardia* se fija a la mucosa mediante su disco suctor e inicia el proceso de división binaria reproduciéndose de manera activa comenzando a colonizar el epitelio intestinal generando “parches” de colonias. Esto provoca en el hospedero una mala absorción de nutrientes además de producir irritación mecánica (Hawrelak 2003). Algunas de esas formas vegetativas se desprenden del epitelio entrando de esta manera a la corriente fecal. Así, comienza el enquistamiento en el intestino delgado en donde el protozooario sufre retracción de sus flagelos y, más tarde, se rodea de una pared quística; mecanismo que regularmente ocurre en las porciones bajas del ileon (Farthing 1983). La excreción de los quistes es a través de las heces y permanecen en estado de latencia con baja actividad fisiológica. Los quistes como forma de resistencia toleran hasta cierto punto condiciones fuera de su microhabitat, lo que los hace susceptibles a ser ingeridos de nuevo por otro huésped, completándose así su ciclo de vida (Figura 2).

3.2 Tratamiento contra la Giardiasis

A pesar del reconocimiento de que *Giardia* es un patógeno del humano con importancia médica, existen pocos fármacos de uso común para combatirla. Frecuentemente se emplean los derivados del nitroimidazol, como el tinidazol y secnidazol, que son efectivos en una sola dosis (Gardner & Hill 2001).

Nitroimidazoles. Los agentes usados dentro de esta clase para la infección de *Giardia lamblia* incluyen el metronidazol, tinidazol, ornidazol y secnidazol. Estos compuestos se descubrieron en 1995 y se encontró que tienen acción sobre varios protozoarios. En 1962 Darbon *et. al.*, reportaron que el metronidazol podría ser usado para el tratamiento de la giardiasis.

En el mecanismo de acción de los nitroimidazoles se ha reportado que afectan el metabolismo anaeróbico presente en *Giardia*. El fármaco entra al trofozoito, una vez que se encuentra dentro del microorganismo, la proteína piruvato-ferredoxinoxidoreductasa

(PFOR; EC 1.2.7.1) del parásito dona electrones al grupo nitro del fármaco, reduciendo dicho grupo y activando al compuesto (Samuelson 1999). El metronidazol reducido actúa como un aceptor terminal de electrones, lo que provoca la unión covalente de este grupo al DNA y proteínas. Esto produce daño en el DNA haciendo que pierda su estructura helicoidal, con la subsecuente muerte del trofozoito. La resistencia del metronidazol se relaciona con una disminución en la actividad de la PFOR (Leitsch et al. 2011)

Los efectos secundarios comunes en el tratamiento con metronidazol incluyen dolor de cabeza, vértigo, náuseas y sabor metálico en la boca. En altas dosis se puede presentar toxicidad en el sistema nerviosos central y pancreatitis (Lau et al. 2012; Lamp et al. 1999). Incluso, se ha encontrado que el metronidazol es mutágeno en bacterias y carcinogénico en ratones y ratas cuando se administra en dosis altas por largos períodos (Lindmark & Mueller 1976)

Nitazoxanida. Es un derivado 5-nitrotiazol con actividad de amplio espectro contra parásitos, relativamente nuevo que salió al mercado para su uso en humanos en 1996. Algunos estudios en los que se ha evaluado este fármaco contra giardiasis enfatizan su utilidad para este fin. Esta droga y su derivado, la tizoxanida han probado ser más activas in vitro en el aislamiento en *Giardia lamblia* siendo 2,5 y 50 veces más potentes que albendazol y metronidazol, respectivamente. El fármaco debe reducirse para formar radicales tóxicos, que inactivan varias moléculas diana incluyendo PFORs. La nitazoxanida es generalmente bien tolerado, y no hay eventos adversos significativos observados en los ensayos en humanos. Los eventos adversos fueron leves y transitorios y principalmente relacionadas con el tracto gastrointestinal, tales como dolor abdominal, diarrea y náuseas (Fox & Saravolatz 2005; Gilles & Hoffman 2002).

Bencimidazoles. Dentro de esta clase de fármacos, dos miembros han sido usados en el tratamiento contra la giardiasis: albendazol y mebendazol (Katiyar et al. 1994). En relación al mecanismo de acción de estos fármacos, se sabe que su actividad toxica sobre *Giardia* es mediante unión a la β -tubulina inhibiendo su polimerización para formar el

citoesqueleto (Venkatesan 1998). Esto conduce un cambio ultraestructural importante que lleva a la pérdida de integridad del trofozoito, finalizando en muerte celular. De igual forma que el metronidazol, los bencimidazoles presentan desventajas en su uso como el surgimiento de cepas de *Giardia* resistentes hacia el albendazol inducida *in vitro* (Uproft 1998).

Aunque el fármaco de elección para el tratamiento de esta infección es el metronidazol (MTZ), el cual ha sido utilizado por más de 40 años, sus efectos colaterales en el paciente y el desarrollo de cepas resistentes ha estimulado el interés por la búsqueda de nuevos anti*giardi*asicos utilizando diferentes estrategias. Una de ellas es la síntesis de análogos a los fármacos que ya se encuentran en el mercado para mejorar su actividad. Desde que se reportó la actividad anti*giardi*ásica de compuestos 2-metilcarbamatos bencimidazol, albendazol y mebendazol, se ha trabajado en la síntesis y evaluación de derivados de bencimidazoles como agentes antiprotozoarios (Valdez et al. 2002; Navarrete-Vázquez et al. 2003; Shaharyar et al. 2011). Además, se han realizado estudios computacionales para buscar los requerimientos estructurales que un derivado de bencimidazol debe poseer para mostrar actividad antiprotozoaria. Como resultado de estos estudios, se encontró que los sustituyentes en la posición 2, 5 y 6 son importantes para la actividad antiprotozoaria (Pérez-Villanueva, Medina-Franco, et al. 2011)

Otro tipo de derivados de bencimidazol que se pretende utilizar en la terapéutica contra la giardiasis, son los inhibidores de la bomba de protones (PPIs): omeprazol, lanzoprazol, pantoprazol y rabeprazol (Figura 3). Estos fármacos han sido ampliamente usados para el tratamiento de ulcera péptica, reflujo gastroesofágico y erradicación de *Helicobacter pylori* en combinación con antibióticos. Interesantemente, los PPIs comparten características estructurales con los derivados de benzimidazol.

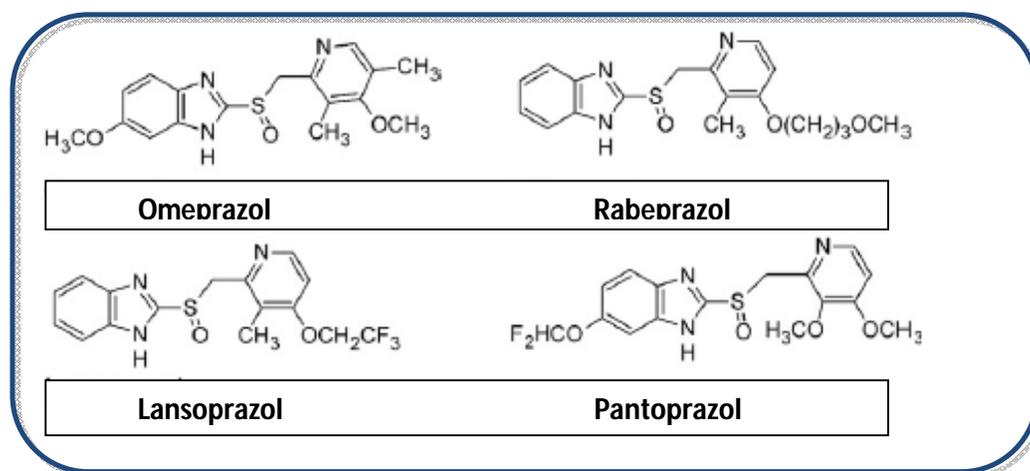


Figura 3. Inhibidores de la bomba de protones, de uso farmacéutico

Basándose en este criterio de similitud, se probó la actividad antiprotozoaria de los PPIs por el grupo de Jaime Pérez-Villanueva y cols. contra *T. vaginalis*, *G. intestinalis* y *E. histolytica*. Los resultados mostraron que todos los compuestos presentan buena actividad contra los tres parásitos exhibiendo una IC_{50} en el rango nanomolar, siendo los PPIs de 12 a 78 veces más activos contra *G. lamblia* que el metronidazol. (Pérez-Villanueva, Romo-Mancillas, et al. 2011).

Considerando una nueva actividad anti-giardiasica de los PPIs, estos agentes son candidatos para su reutilización farmacéutica. A favor de esta propuesta está el hecho de que su farmacocinética es conocida.

En resumen, considerando que las enfermedades parasitarias causadas por protozoarios son aún un importante problema de salud pública, durante los últimos años nuestros esfuerzos se han centrado en encontrar nuevos agentes antiprotozoarios. Derivado de lo anterior, nuestro grupo así como otros equipos de investigación evalúan la pertinencia de los PPIs como potenciales agentes anti-giardiasicos.

3.3 La triosafosfato isomerasa como blanco de antiparasitarios

La triosafosfato isomerasa (TIM o TPI) es una enzima de aproximadamente 247 residuos de aminoácidos, con un patrón estructural denominado barril α/β , posee 8 hebras β paralelas rodeadas por 8 helices α . La TIM estructuralmente es un homodímero en la mayoría de las especies, cada subunidad tiene un peso molecular de aproximadamente 27 KDa (Figura 4). No obstante, se ha reportado la presencia de tetrámeros en *Pyrococcus woesei*, *Methanothermus fervidus*, *Thermotoga maritima* y *Thermoproteus tenax*).

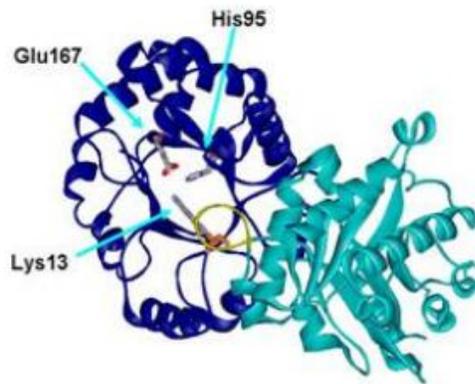


Figura 4. Estructura de la triosafosfato isomerasa (TIM). Se muestran las dos subunidades barril α/β

Esta enzima pertenece a la vía glucolítica, cataliza la isomerización entre la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (GAP) (Figura 5); ha sido ampliamente estudiada y se considera un catalizador perfecto, ya que su catálisis se encuentra limitada sólo por la difusión de los sustratos (Stroppolo et al. 2001).

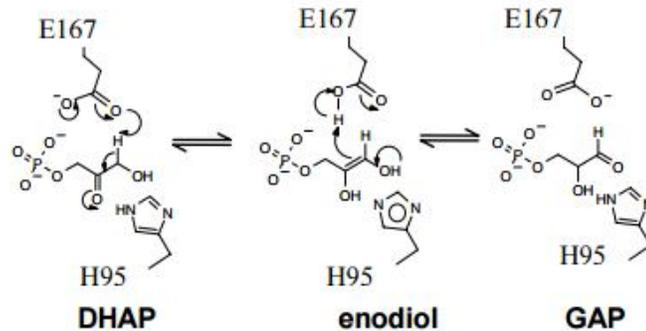


Figura 5. Mecanismo de Reacción de la Triosafosfato Isomerasa

La importancia de la TIM en la glucólisis radica en la aportación de una molécula más de GAP generándose 2 moléculas de GAP por cada molécula de glucosa que entra a la vía. El GAP puede continuar en la vía directa de la ruta siendo el sustrato para la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, que lleva a cabo la sexta reacción de la glucólisis. En consecuencia, esta aportación extra de GAP permite la producción neta de 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa que se procesa en la glucólisis. Una TIM ausente o inactiva daría como resultado el consumo de glucosa sin ganancia neta de ATP, además, se produciría una posible acumulación de sustratos. Por tanto, un organismo que basa su metabolismo en esta vía, vería seriamente amenazada su existencia. Esta conclusión es de particular importancia en *G. lamblia*, que es un organismo microaerofílico que depende en gran medida de la energía que le proporciona la glucólisis. Así, la TIM de este parásito se ha propuesto como un blanco para el diseño de antiparasitarios.

Algunas investigaciones demostraron la importancia de las enzimas de la glucólisis como potenciales blancos antiparasitarios utilizando la tecnología del RNA de interferencia (RNAi). Por ejemplo, se ha demostrado que si se bloquea parcial o completamente alguna de las enzimas de esta vía, se afecta significativamente al organismo en cuestión (Yongguang et al. 2007; (Kessler & Parsons 2005). En nuestro laboratorio se encontró que silenciar el gen que codifica la TIM en *Giardia* se induce la pérdida de viabilidad del parásito (Jaime Marcial enviado a publicación).

3.4 Cisteína C222 como blanco para el diseño de fármacos

La GITIM posee en su secuencia primaria cinco cisteínas: Cys14, Cys127, Cys202, Cys222 y Cys228A. Ensayos de modificación química de residuos de cisteínas con compuestos reactivos de tioles (derivatización de cisteínas) se realizaron para identificar regiones que al modificarse afectan la actividad catalítica de la GITIM (Enriquez-Flores et al. 2008b). Esto demostró que la GITIM podía inactivarse de manera especie-específica, ya que al incubar a la TIM de humano (HuTIM) y a la GITIM con compuestos como el ácido nitrobenzóico (DTNB) se encontró que la primera permanecía prácticamente sin cambios en su actividad, mientras que la segunda se encontraba prácticamente inactiva (Figura 6). La concentración de DTNB requerida para obtener el 50% de inactivación fue 180 veces más baja en GITIM ($C_{50DTNB} = 2.8 \mu\text{M}$) que en HuTIM ($C_{50DTNB} = 500 \mu\text{M}$). Las concentraciones probadas de MMTS y MTSCE inducen 50 y 97% de inactivación en GITIM mientras que en HuTIM sólo llegan a inactivar un 20% (Figura 6). Estos resultados también mostraron que la inactivación de la GITIM se relaciona con las propiedades fisicoquímicas del aducto unido a la cisteína modificada. Por ejemplo, al reaccionar el MMTS con la cisteínas de la enzima, le confiere al aminoácido un grupo metildisulfuro, relativamente pequeño y neutro; en contraste, el DTNB adiciona un grupo voluminoso y con carga negativa (Enriquez-Flores et al. 2008a)

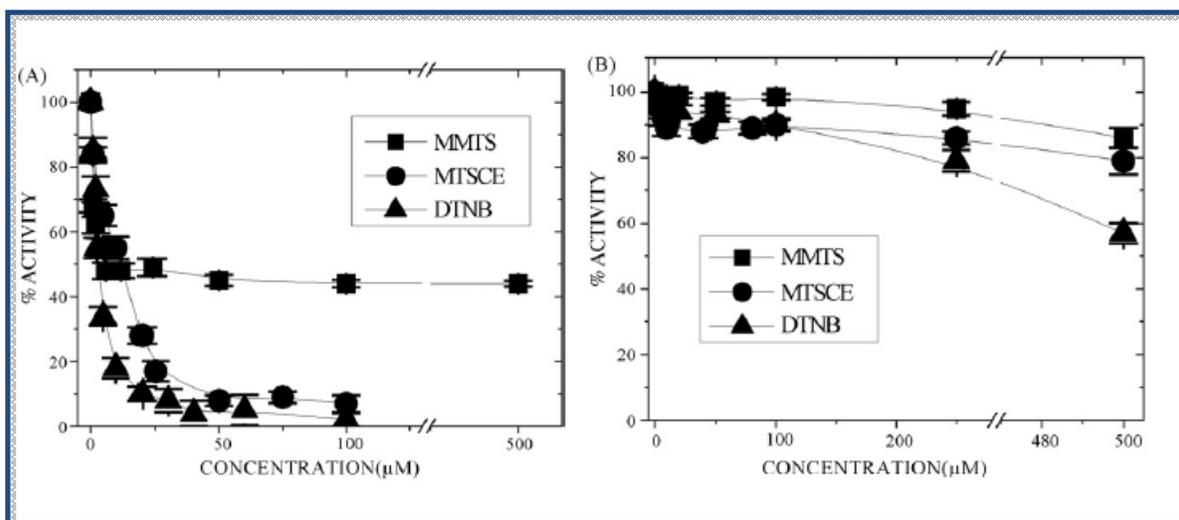


Figura 6. Derivatización de GITIM (panel A) y HuTIM (panel B). Las enzimas se derivatizaron con los agentes MMTS, MTSCE y DTNA a concentraciones crecientes durante 2 h a 25 °C. (Enriquez-Flores et al. 2008a)

Posteriormente, se realizó un estudio estructural y funcional para determinar el mecanismo por el cual se realiza la inactivación de la GITIM por los compuestos reactivos de tioles (Enríquez-Flores et al. 2011). Se construyeron cinco mutantes puntuales con el reemplazo de cada una de las cisteínas por una alanina, se midieron sus parámetros cinéticos para asegurarse de que las perturbaciones no fueran debidas a la mutación (Tabla 1).

Tabla 1. Constantes cinéticas de GITIM WT y sus mutantes simples.

GITIM	K_m (mM)	k_{cat} (10^5 min^{-1})	k_{cat}/k_m ($\text{min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$)	Tm_{app} ($^{\circ}\text{C}$)
WT ^a	0.78 ± 0.06	4.6 ± 0.16	5.9×10^5	57.5
C14A	0.4 ± 0.06	5 ± 0.16	12×10^5	55.1
C127A	0.36 ± 0.06	3.5 ± 0.1	9.7×10^5	52.6
C202A ^b	0.8 ± 0.09	2.9 ± 0.14	3.6×10^5	56.6
C222A ^b	1.8 ± 0.3	5 ± 0.4	2.8×10^5	58.6
C228A ^b	0.25 ± 0.07	1.87 ± 0.19	7.5×10^5	57.2

Al exponer las mutantes a los agentes derivatizantes, los resultados muestran que la inactivación es dependiente de la concentración de MTSCE ó DTNB utilizada. Además, se observó que en presencia de los agentes derivatizantes, cuatro de las mutantes (C14A, C127A, C202A y C228A) mostraron una susceptibilidad similar a la GITIM WT; sólo la mutante C222A fue completamente resistente a los efectos del MTSCE o DTNB (Figura 7). Esto indica que la derivatización de la C222 es responsable de la inactivación de la GITIM. Para confirmar el papel de la C222 como único blanco que promueve la inactivación, se determinó la reactividad de las cuatro Cys restantes en la GITIM C222A, encontrándose que después de la incubación con MTSCE o DTNB se derivatizaron tres cisteínas.

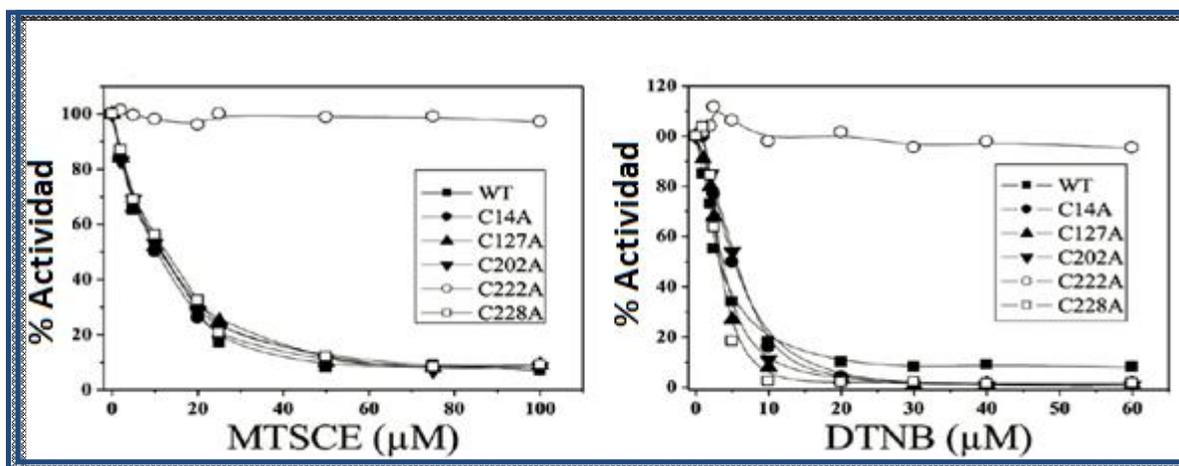


Figura 7. Derivatización de GITIM WT y sus mutantes, con agentes reactivos de cisteínas.

Los ensayos de mutagénesis dirigida demostraron que a pesar de que GITIM tiene otros cuatro residuos de cisteína (C14, C202, C127 y C228), sólo la modificación de la C222 causa la inactivación de la enzima (Enríquez-Flores et al. 2011). Además, la inactivación de la GITIM es específica de la especie, aunque la HuTIM tiene una cisteína equivalente (C217), su actividad prácticamente no se afecta por los reactivos de tioles. Análisis estructurales de la GITIM y HuTIM muestran que hay marcadas diferencias en las regiones vecinas de la C222 de la GITIM y la C217 de la HuTIM; sólo uno de los siete residuos alrededor de las dos cisteínas es común. Estas evidencias bioquímicas soportan la proposición de que la región C222 puede utilizarse como un blanco específico para el diseño racional de fármacos.

Con el fin de entender los efectos estructurales y funcionales producidos por la modificación de la C222 en la GITIM, se construyeron seis mutantes para esta posición con cadenas laterales que poseen características fisicoquímicas diferentes. Los datos muestran que la mutagénesis de C222 mimetiza el efecto de la modificación química. La polaridad, carga y volumen de la cadena lateral en cada una de las mutantes alteró diferencialmente la actividad, afinidad, estabilidad y estructura de la enzima. La cinética de las seis variantes también se afectó de manera diferente dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de su cadena lateral (Tabla 2). La Tabla 2 muestra los resultados cinéticos y de afinidad donde

es importante resaltar que la introducción de la valina, un residuo no polar ligeramente más grande que la cisteína, no afecta las propiedades cinéticas de la enzima. En contraste, el cambio de la cisteína por una metionina disminuyó la eficiencia catalítica de la enzima ocho veces, esta mutación se asemeja estructuralmente con la modificación química de la C222 con MMTS el cual introduce un tiometilo, grupo no polar y pequeño.

Tabla 2. Constantes cinéticas de GITIM WT y mutantes C222

Proteína	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_m (mM)	$k_{cat} \times 10^5$ (min^{-1})	$k_{cat}/K_m \times 10^5$ ($\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	K_i (μM)	K_d (μM)
GITIM	8050 ± 444	0.62 ± 0.22	4.4	7	87 ± 15	26.4 ± 2.6
C222V	9560 ± 467	0.96 ± 0.12	5.2	5.4	98 ± 10	57.4 ± 7.1
C222M	3100 ± 170	1.85 ± 0.46	1.68	0.91	325 ± 50	79.4 ± 8.5
C222N	3653 ± 107	2.79 ± 0.73	1.99	0.71	560 ± 59	113.3 ± 41.7
C222D	3717 ± 421	4.88 ± 0.81	2	0.415	1479 ± 168	n.a
C222F	1665 ± 163	3.9 ± 0.46	0.9	0.23	7280 ± 2010	n.a
C222K	255 ± 33	3.1 ± 0.64	0.13	0.044	n.a	n.a

3.5 Omeprazol como compuesto inactivador de GITIM

El omeprazol es uno de los inhibidores más importantes de las bombas de protones (PPIs) e inhibe de forma irreversible la H⁺K⁺ ATPasa mediante la derivatización de su Cys 813. Debido a su mecanismo de inhibición previamente descrito en la bomba gástrica, se probó su utilidad como un inactivador de GITIM y eventualmente, como posible nuevo antiulceroso. En el estudio, se realizaron los ensayos de inactivación de GITIM vs HuTIM a concentraciones crecientes de omeprazol y se corroboró que produce un efecto de inactivación especie-específico de manera similar a la que previamente se reportó para derivatizantes como el DTNB o el MTSCE (Carboxietil metano tiosulfonato) Figura 8. De igual manera, al probar el omeprazol contra las mutantes de Cys de GITIM, se corroboró que en ausencia de la Cys 222, la GITIM no se inactiva (Patente MX/a/2008/012900; (Reyes-Vivas et al. 2014).

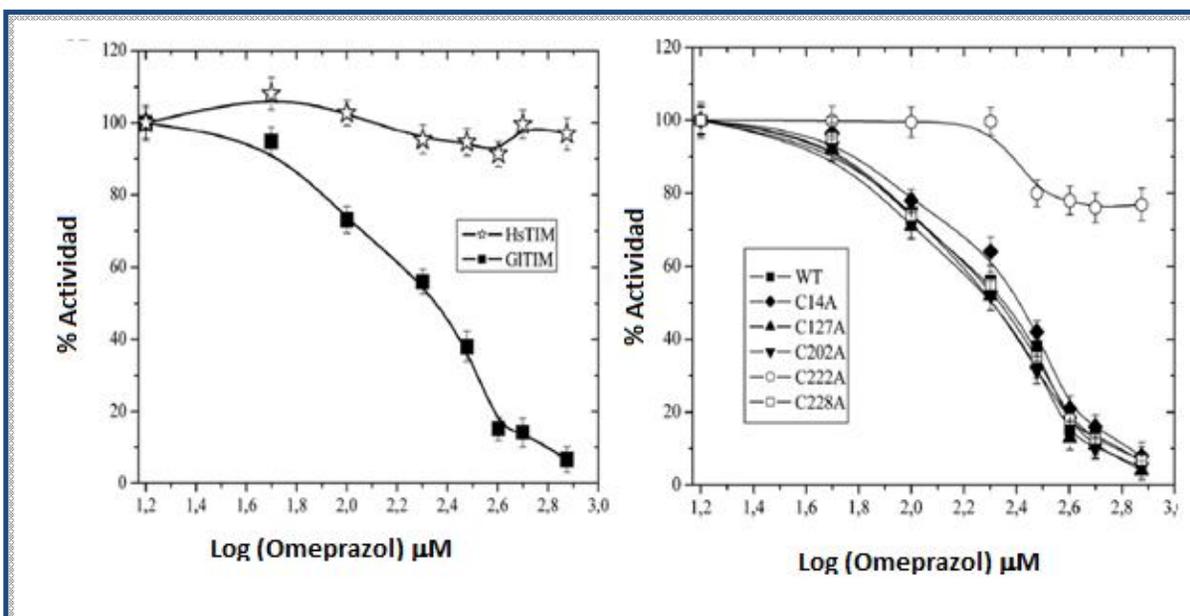


Figura 8. Inactivación de GITIM por Omeprazol

Con los resultados mencionados en los trabajos anteriores y teniendo presente que a pesar de que existen tratamientos eficaces actuales que utilizan fármacos del grupo de los nitroimidazoles y nitrotiazoles para combatir la giardiasis, se ha reportado que estos producen efectos secundarios, además de que han surgido cepas de *Giardia* resistentes a tales fármacos. Esta situación ha generado la búsqueda de nuevas estrategias para desarrollar anti-giardíasicos más eficientes. La investigación científica puede conducir a la obtención de nuevos medicamentos mediante diversas estrategias, dentro de las cuales están: la manipulación genética de microorganismos para la producción de moléculas bio-activas, la síntesis química de análogos a fármacos que ya se utilizan en el mercado, la búsqueda de blancos farmacológicos, incluso la búsqueda de analitos con actividad biológica presente en productos naturales como plantas, fluidos biológicos, etc.

En este trabajo se combinan dos de las estrategias mencionadas, la utilización de la trifosfato isomerasa como un blanco farmacológico en *Giardia lamblia*, y la síntesis de análogos a compuestos con utilidad farmacológica, ya que al modificar estructuralmente compuestos, se puede lograr potenciar su actividad. Por tanto, se decidió plantear la síntesis de compuestos análogos al omeprazol realizando modificaciones estructurales sobre los sustituyentes en el anillo de bencimidazol y piridina.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar, purificar y caracterizar por técnicas espectroscópicas compuestos análogos al omeprazol, para su posterior evaluación como agentes inactivantes de GITIM.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Sintetizar y purificar análogos del omeprazol, modificando los sustituyentes del anillo bencimidazólico y de piridina.
- Caracterizar espectrométricamente por Resonancia Magnética Nuclear de protón y de carbono 13 (RMN¹H, RMN¹³C) los compuestos sintetizados.
- Estudiar la cinética de inactivación en la GITIM C202A recombinante para cada uno de los compuestos sintetizados seleccionando aquellos con mejor capacidad de inactivación.
- Determinar la capacidad de inactivación para HuTIM de aquellos compuestos seleccionados.
- Probar los compuestos que presentaron mejor capacidad inactivante sobre GITIM en cultivos de trofozoitos de *G. lamblia*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Métodos Generales

Empleando técnicas convencionales, los disolventes anhidros utilizados se destilaron bajo atmosfera de argón antes de usarse, de la siguiente manera: Et₃N, fue destilada sobre CaH₂, tetrahidrofurano (THF) sobre el cetilo de sodio de la benzofenona, CH₂Cl₂ sobre CaH₂; tolueno sobre sodio metálico. Hexano, acetato de etilo y metanol se destilaron bajo Na₂SO₄ previo a su utilización. El baño para las reacciones a baja temperatura fue: hielo-agua (0 °C).

El avance de las reacciones y pureza de los productos obtenidos, se determinaron por cromatografía en capa fina (CCF) en placas de aluminio de 2.5 x 4 cm, recubiertas con gel de sílice Alugram SILG/UV254 (Macherey-Nagel). La detección de los compuestos se llevó a cabo por visualización bajo una lámpara de luz ultravioleta UV-254/366 nm y por exposición a vapores de yodo. Las cromatografías en columna flash se llevaron a cabo de acuerdo al procedimiento reportado por Leonard utilizando sílica gel (340-400 mallas; Macherey Nagel). Todas las mezclas de disolventes usadas como eluyentes se reportan como soluciones v/v.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato marca SRS, modelo EZ-melt MPA120 y no están corregidos.

5.2 Ensayos espectroscópicos

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono (RMN¹H y RMN¹³C) se determinaron en un equipo Varian INOVA 200 MHz y 400 MHz, usando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna (Me₄Siδ= 0 ppm) dimetil sulfóxido deuterado (DMSO-d₆) como disolvente, los desplazamientos químicos (δ) están

reportados en partes por millón (ppm) y la multiplicidad de las señales se indican por medio de las siguientes abreviaturas: (s) singulete, (d) doble, (dd) doble de doble, (t) triplete, (q) cuarteto y (m) multiplete. Los espectros de masas modalidad CI⁺ y FAB⁺, se determinaron en un espectrómetro de masas de alta resolución marca JOEL modelo JMStation 700, con intervalo espectral de 1 a 5000 m/z.

5.3 Procedimiento Experimental

5.3.1 Síntesis de los intermediarios

Los tres intermediarios del tipo 5-metil-2-[(piridin-2-ilmetil)tio]-1-*H*-bencimidazol **BHO-4**, **BHO-5** y **BHO-6**, se prepararon empleando 5-metil-2-mercaptobencimidazol, hidróxido de potasio, 1,2-dimetoxietano, agua y la 2-clorometilpiridina apropiadamente sustituida.

En un matraz redondo equipado con agitación magnética, se colocaron 0.5 g (3.04 mmoles) de 2-mercaptobencimidazol y se disolvió en 5 mL de 1,2-dimetoxietano. Lentamente, se adicionó gota a gota 0.34 g (6 mmoles) de hidróxido de potasio disuelto en la mínima cantidad de agua, la mezcla se dejó en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una reacción de sustitución nucleofílica sobre la 2-clorometilpiridina correspondiente, se adicionaron 0.55 g (3.3 mmoles) de la piridina correspondiente; la reacción se llevó a reflujo, agitación y atmósfera de nitrógeno. El avance de la reacción se monitoreó por CCF hasta que se comprobó la conversión total de la materia prima (6-12 horas). El dimetoxietano se evaporó en un rotavapor a 60°C, el residuo se disolvió en 4 mL de agua fría, se colocó en agitación en un baño de hielo durante 30 minutos, se filtró y el sólido obtenido se purificó por cromatografía en columna (cloruro de metileno:metanol 95:5).

El compuesto **BHO-4** 6-metil-2-[(piridin-2-ylmetil)sulfanil]-1-*H*-bencimidazol se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 75%, pf 121.3-122.9 °C. RMN ¹H

(300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.45 (3H s, CH₃); 4.35 (2H s, CH₂); 7.05-8.72 (7H m Ar-CH); 12.52 (1H m, NH). RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 21.58 (CH₃); 37.8 (CH₂); 122 (CH); 123 (CH); 125 (CH); 132 (CH); 136 (CH); 138 (CH); 149 (CH); 151 (CH); 158 (CH).

El compuesto **BHO-5** 2-[[4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-yl)metil]sulfanil]6-metil-1*H*-bencimidazol se obtuvo como un sólido color blanco con un rendimiento de 85%, pf 152.8-154.1 °C. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.28 (3H s, CH₃); 2.32 (3H s, CH₃); 2.45 (3H s, CH₃); 3.78 (3H s, CH₃); 4.35 (2H s, CH₂); 7.0-8.30 (4H m, Ar-CH). RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 11.3 (CH₃); 13.5 (CH₃); 21.2 (CH₃); 35.8 (CH₂); 59.8 (CH₃); 123.3 (CH); 125.3 (CH); 126.8 (CH); 132.5 (C); 148 (C); 151.5 (CH); 156.2 (C); 165.5 (C).

El compuesto **BHO-6** 6-metil-2-[[[3-metil-4-(2,2,2-trifluoroetoxi)piridin-2-yl)metil]sulfanil]-1*H*-bencimidazol se obtuvo como cristales color blanco con un rendimiento del 85%, pf 158.4-159.9 °C. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.23 (3H s, CH₃); 2.37 (3H s, CH₃); 4.36-4.37 (2H M, CH₂); 4.43 (2H S, CH₂); 6.65-8.31(4H M, Ar-CH). RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 10.71(CH₃); 21.64 (CH₃); 35.49 (CH₂); 39.93 (CH₂); 105.9 (CH); 121.67 (C); 123.2 (CH); 131.5 (C); 147.6 (C); 150.4 (CH); 157.2 (C); 162.2 (C).

5.3.2 Síntesis de los compuestos finales

Los tres compuestos finales del tipo sulfóxido **BHO-1**, **BHO-2** y **BHO-3**, se prepararon empleando ácido 3-cloroperoxibenzóico como se describe a continuación. En un matraz bola equipado con agitación magnética y baño de hielo, se mezclaron 0.2 g (0.78 mmoles) del intermediario correspondiente en 3.5 mL de cloroformo. Lentamente se adicionó gota a gota 0.19 g (1.12 mmoles) de ácido 3-cloroperoxibenzóico disueltos en 7 mL de cloroformo. La reacción se monitoreó cada 500 microlitros de adición mediante CCF, hasta observar la conversión total de la materia prima. Posteriormente, la reacción se neutralizó con una solución concentrada de bicarbonato de sodio y el producto se extrajo con cloroformo. La fase clorofórmica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a

sequedad, produciéndose un sólido color café. En todos los casos fue necesario realizar una purificación de los compuestos por medio de una cromatografía en columna.

El compuesto **BHO-1** 6-metil-2-[(piridin-2-ylmetil)sulfinil]-1*H*-bencimidazol se obtuvo como un sólido café claro con un rendimiento del 75%, pf 121.3-122.9 °C. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.45 (3H s, CH₃); 4.35 (2H s, CH₂); 7.05-8.72 (7H m Ar-CH); 12.52 (1H m, NH). RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 21.58 (CH₃); 37.8 (CH₂); 122 (CH); 123 (CH); 125 (CH); 132 (CH); 136 (CH); 138 (CH); 149 (CH); 151 (CH); 158 (CH).

El compuesto **BHO-2** 6-metil-2-[[[(4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-yl)metil]sulfinil]6-metil-1*H*-bencimidazol se obtuvo como un sólido café claro con un rendimiento del 70%, pf 221.4-222.8 °C. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.13 (3H s, CH₃); 2.25 (3H s, CH₃); 2.51 (3H s, CH₃); 3.65 (3H s, CH₃); 4.65-4.82 (2H m, CH₂); 7.15-8.20 (4H m, Ar-CH). RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 11.64 (CH₃); 13.48 (CH₃); 21.87 (CH₃); 60 (CH₂); 60.85 (CH₃); 111.96 (C); 119.99 (CH); 126.27 (C); 126.54 (C); 127.15 (C); 148.7 (C); 149.83 (CH); 152.5 (C); 164.5 (C).

El compuesto **BHO-3** 6-metil-2-[[[3-metil-4-(2,2,2-trifluoroetoxi)piridin-2-yl)metil]sulfinil]-1*H*-bencimidazol se obtuvo como un sólido café claro con un rendimiento del 75%, pf 228.5-229.8 °C. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.13 (3H s, CH₃); 2.25 (3H s, CH₃); 2.51 (3H s, CH₃); 3.65 (3H s, CH₃); 4.65-4.82 (2H m, CH₂); 7.15-8.22 (4H m, Ar-CH). RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 11.64 (CH₃); 13.48 (CH₃); 21.87 (CH₃); 60.01 (CH₂); 60.85 (CH₃); 111.96 (C); 119.9 (CH); 126.27 (CH); 126.54 (C); 127.15 (C); 148.7 (C); 149.83 (CH); 152.53 (C); 164.51 (C).

5.4 Expresión y purificación de la enzima recombinante GITIM C202A

Crecimiento celular. Para expresar la proteína recombinante, se realizó un precultivo de células de *E.coli* BL21(DE3)pLys que contienen el plásmido más el gen de la TIM. El medio líquido Luria Bertani (LB) (5 mL) con 100 µg/mL de ampicilina se incubó toda la noche a 37 °C; a este medio se denominó como precultivo. Posteriormente, se tomó una alícuota del precultivo y se añadió a 500 mL de medio LB con 100 µg/mL de ampicilina, se incubó a 37 °C con agitación constante hasta alcanzar una A_{600nm} de 0.8-1.0 (6-8 horas). La incubación permitió obtener un cultivo que se encuentra en la fase logarítmica de crecimiento y lograr una mayor inducción.

Inducción. Para realizar la inducción se adicionó 0.4 mM IPTG y se incubó el medio toda la noche a 30 °C. Posteriormente, las células se centrifugaron a 5,000 rpm/10 min a 4 °C, el botón obtenido se resuspendió en 30 mL de un amortiguador de lisis que contenía 50 mM de Tris, 1 mM de EDTA, 0.2 mM de PMSF, a pH de 7.9. Una vez resuspendidas en el buffer, las células se lisaron por sonicación en frío (seis ciclos de 45 seg con descansos de 75 seg) y se centrifugaron a 9,000 rpm/30 minutos a 4 °C.

Purificación. La enzima fue purificada mediante cromatografía de afinidad por níquel. Posteriormente, la enzima se incubó en presencia de la proteasa del virus del tabaco, con el propósito de eliminar los residuos de aminoácido extra. Nuevamente se utilizó la columna de níquel para separar a la GITIM y eliminar la proteasa y aminoácidos extra, correspondientes a la etiqueta de histidina y sitio de reconocimiento de la proteasa. La pureza y eliminación de la etiqueta de His se corroboró por geles SDS-PAGE al 16 %.

5.5 Reactividad de la GITIM al omeprazol y análogos

Debido a la capacidad de la GITIM para formar especies oligoméricas mayores al dímero mediante la formación de puentes disulfuro entre cisteínas C202 (López-Velázquez et al. 2004) se decidió trabajar con la mutante GITIM C202A. Esta mutante también forma enlaces disulfuro intramonómicos entre la C222 y C228, por lo que previo a cada

experimento la enzima se incubó con ditioneitol (DTT), mediante el siguiente procedimiento de reducción.

5.5.1 Reducción de los puentes disulfuro en GITIM

Previo a cada experimento, la enzima se incubó con 5 mM de DTT a 4 °C durante 30 minutos, de esta forma se aseguró trabajar con la enzima en su forma reducida y así tener las cuatro cisteínas libres. Al término de la incubación, la enzima se hizo pasar por una columna de filtración (Penefsky 1977) con el propósito de eliminar el DTT. Para preparar la columna, se empleó resina Sephadex G-25 fina (Amersham-Pharmacia); previamente hidratada y se empacó en jeringas de 3 mL. Las columnas se equilibraron con buffer TE y se centrifugaron a 2,000 rpm durante 2 minutos para compactarlas y secarlas. Las muestras de las enzimas disueltas en un volumen de 250 µL se añadieron a la columna y se centrifugaron durante 75 segundos a 2000 rpm. Después de la filtración, la concentración de la enzima se volvió a determinar.

5.5.2 Determinación de la concentración de proteína.

La concentración de la enzima se midió por su absorbancia a 280 nm. Se consideró un $\epsilon_{280}=26,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, el cual se calculó de acuerdo a la secuencia de aminoácidos como describen Pace y colaboradores (1995).

5.6 Determinación de la actividad enzimática.

La actividad se determinó mediante un ensayo acoplado en dirección gliceraldehído 3-fosfato (GAP) hacia dihidroxiacetona fosfato (DHAP). La reacción se llevó a cabo en una mezcla de reacción estándar que contenía: 100 mM de trietanolamina, 10 mM de EDTA, pH 7.4, 1 mM de GAP, 0.2 mM de NADH y 0.9 U de α -glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (α GDH) (Gómez-Puyou et al. 1995). La actividad se monitoreó espectrofotométricamente, siguiendo la disminución de la absorbancia del NADH a 340

nm, a una temperatura de 25 °C. La concentración de la GITIM que se utilizó para los ensayos fue de 5 ng/mL. La Figura 7 muestra los pasos de la reacción acoplada:

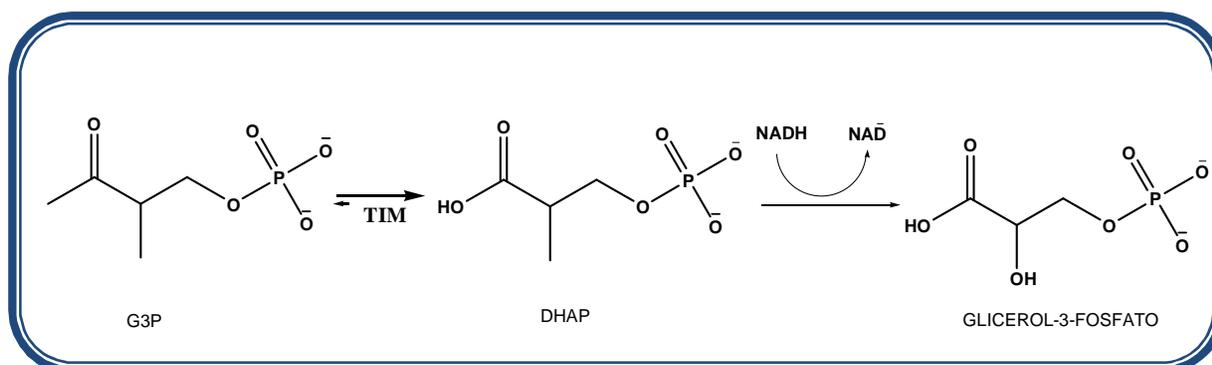


Figura 7. Reacción acoplada en dirección GAP a DHAP. La reacción es monitoreada por el decaimiento en la absorbancia del NADH.

Se utilizó un coeficiente de extinción molar a 340 nm (ϵ_{340}) de $6,220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el NADH. Los resultados se expresan como el porcentaje de actividad residual vs concentración del compuesto. El 100 % de actividad se obtuvo por la enzima incubada en las mismas condiciones pero en ausencia de compuestos.

5.7 Experimentos de inactivación

Los experimentos que a continuación se mencionan se realizaron por triplicado. Al término de la incubación, la enzima se filtró con el propósito de eliminar el compuesto que no reaccionó con la enzima, utilizando la columna de Penefsky anteriormente descrita.

La técnica empleada para determinar el efecto del omeprazol y los análogos sintetizados sobre la actividad de la GITIM fue similar para todos los casos. Estos ensayos se realizaron utilizando una concentración de proteína de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (7.2 nM), en buffer de TE (Trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM, pH 7.4). Usando diferentes concentraciones de los compuestos (0 a 500 μM) la proteína se incubó a 37 °C durante dos horas. Las soluciones stock de omeprazol (Sigma-Aldrich) y los análogos, se prepararon al momento

de realizar cada ensayo disolviéndose en dimetil sulfoxido (DMSO) para obtener una solución stock de 25 mM. Las soluciones de los compuestos usados en cada ensayo contenían 5 % de DMSO, concentración a la cual no se afecta la actividad de la GITIM. Después de incubarla durante 2 h a 37 °C, se tomó una alícuota de cada muestra y se diluyó 10,000 veces con la finalidad de detener la inactivación. La actividad residual de la GITIM se midió inmediatamente después de diluirla.

5.7.1 Determinación de las constantes de inactivación

Constantes de pseudoprimer orden. Las constantes de inactivación de pseudoprimer orden se obtuvieron en un intervalo de concentración de los compuestos de 100-500 μM ; la concentración de la GITIM fue de 0.2 mg/mL en buffer de TE a 37 °C. Cada 10 minutos (de 0 a 120 minutos) se tomaron alícuotas de la muestra para medir la actividad residual en una mezcla de reacción estándar. Los datos se ajustaron a un modelo de decaimiento monoexponencial $A_R = A_0(e^{-kt})$, donde A_R es la actividad residual al tiempo t , A_0 es la actividad a tiempo cero y k es la constante de inactivación de pseudoprimer orden.

Constantes de segundo orden. Los valores de pseudoprimer orden se graficaron contra las concentraciones de los compuestos; las constantes de inactivación de segundo orden se calcularon a partir de la pendiente de las gráficas obtenidas.

5.7.2 Determinación del número de cisteínas derivatizadas

Para determinar el número de Cys derivatizadas con los reactivos, se incubaron 4 mg de la enzima con exceso del compuesto (500 μM), en buffer TE durante 2 h a 37 °C. Al término de la incubación, la enzima se filtró a través de una columna de Penefsky utilizando el procedimiento antes mencionado. Se volvió a estimar la concentración de la enzima después de la filtración.

Para la cuantificación de Cys se utilizó el método de titulación de Ellman, éste consiste en hacer reaccionar el DTNB con los grupos sulfhidrilos de las cisteínas, lo que genera una molécula de TNB libre. Este compuesto tiene un máximo de absorbancia a 412 nm y puede seguirse espectrofotométricamente (Ellman 1958). La estequiometría indica que por cada molécula de TNB que se forme habrá una Cys derivatizada.

De esta forma, el TNB se puede usar como un indicador de las Cys libres. Las enzimas modificadas y el control (sin derivatizar) se añadieron a una mezcla con SDS al 5 % (p/V) y DTNB 1 mM. El SDS desnatura las proteínas y expone las Cys originalmente inaccesibles, con las que el DTNB reaccionará (grupos sulfhidrilo libres de estas Cys), generando moléculas de TNB. El contenido de Cys, se calculó utilizando un $\epsilon_{412}=13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ del TNB (Eyera *et al.*, 2003), considerándose además el cambio de absorbancia por dilución producido por adicionarse la proteína a la mezcla de SDS-DTNB.

5.8 EFECTO DE UN AGENTE REDUCTOR EN GITIM PREVIAMENTE TRATADA CON LOS COMPUESTOS.

Con el propósito de conocer si existía reversibilidad en la inactivación de la GITIM con los compuestos, 200 $\mu\text{g/mL}$ de la proteína se incubaron con 500, 400 y 200 μM de omeprazol, **BHO-3** y **BHO-2**, respectivamente, a 37 °C y en los tiempos en que se alcanzaba un 25, 50 y 75% de inactivación. Posteriormente, se les adicionó 5 mM de DTT y se tomaron alícuotas en distintos tiempos para determinar la actividad.

5.9 ENSAYOS ESPECTROSCÓPICOS

5.9.1 Fluorescencia Intrínseca

El experimento consistió en incubar 100 µg/mL de la GITIM C202A con 500 µM de los compuestos durante 2 h a 37 °C en buffer de TE; se incluyó un control de la GITIM en buffer de TE sin inactivadores incubado también durante 2 h a 37°C para restar el posible efecto que pudiera producir la incubación sobre la actividad. Al final de la incubación, se registró la intensidad de la fluorescencia a distintas longitudes de onda excitando a 295 nm utilizando un fluorómetro Perkin-Elmer LS-55. Los datos se expresan como porcentaje de fluorescencia vs longitud de onda en nm.

5.9.2 Dicroísmo Circular

Los ensayos de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-810. Se obtuvieron espectros de 200 a 260 nm a intervalos de 1 nm, a 25 °C con 100 µg/mL de enzima previamente incubada con los compuestos.

La estabilidad térmica (Tm_{app}) de las proteínas se evaluó por el cambio en la señal de dicroísmo circular (DC) a 222 nm, en un intervalo de temperatura de 25 a 70 °C, con una tasa de calentamiento de 1 °C/min.

5.10 Ensayos de susceptibilidad sobre los trofozoitos de *Giardia lamblia*

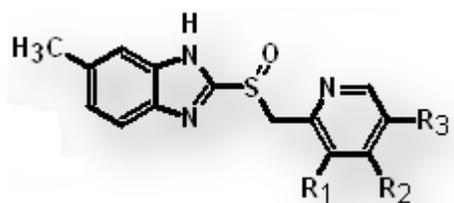
Se realizaron ensayos de susceptibilidad *in vitro* utilizando cepas de *Giardia lamblia* WB, mediante el método de resiembra. Cultivos con 150,000 trofozoitos/mL se incubaron por 48 horas a 37°C en medio TYI-S-33 con cada uno de los compuestos en un intervalo de concentración entre 32.5 y 500 µM. Después del tiempo de incubación, las muestras se enfriaron durante 20 minutos y se resuspendieron en medio fresco. Posteriormente, se tomó una alícuota de 75 µL de cada una de las muestras y se diluyó en 1.5 mL de medio TYI-S-33 fresco sin omeprazol en donde se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Al término de esto, los trofozoitos se contaron por método manual y posteriormente, se calculó el porcentaje de viabilidad de las células que se incubaron en cada uno de los compuestos.

5. RESULTADOS

5.1 Síntesis de los análogos del omeprazol

En este estudio, se sintetizaron y evaluaron como agentes inactivantes de la GITIM a tres nuevos derivados 5-metil-2-[(piridin-2-ilmetil)sulfinil]-1-*H*-bencimidazol, análogos del omeprazol. Las características principales de estos compuestos fueron la sustitución del grupo metoxilo por un grupo metilo en la posición cinco del anillo de bencimidazol, así como la sustitución con diferentes grupos a los presentes en el omeprazol en el anillo de piridina (Tabla 1).

Tabla 1. 5-metil-2-[(piridin-2-ilmetil)sulfinil]-1-*H*-bencimidazol sintetizados

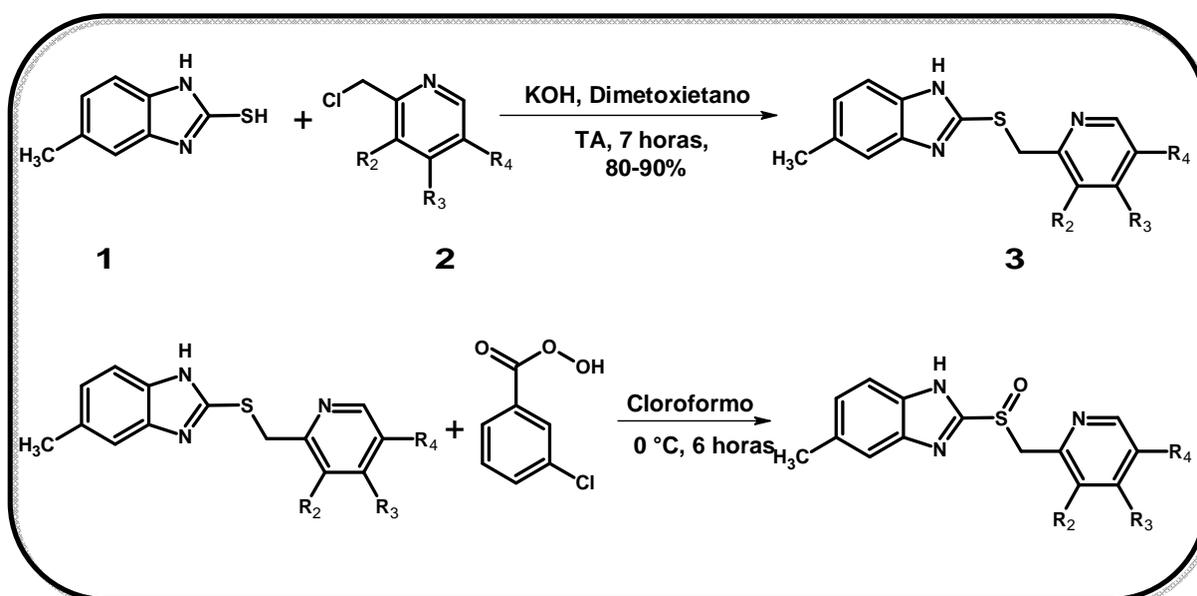


Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
BHO-1	H	H	H
BHO-2	CH ₃	OCH ₃	CH ₃
BHO-3	CH ₃	CH ₂ CF ₃	H

El esquema 1 muestra la secuencia de reacciones para sintetizar los compuestos. La preparación de los compuestos inició con la síntesis de los intermediarios del tipo 5-metil-2-[(piridin-2-ilmetil)tio]-1-*H*-bencimidazol (Esq. 1, Fig. 3), a través de una sustitución nucleofílica entre el 5-metil-2-mercaptobencimidazol (Esq. 1, Fig. 1) y la 2-clorometilpiridina apropiadamente sustituida (Esq. 1, Fig. 2) en un medio fuertemente alcalino. El avance de la reacción se monitoreó por CCF hasta la conversión total de la materia prima.

Los derivados metilto (Esq. 1, Fig. 3) se oxidaron mediante la utilización del perácido 3-cloroperoxibenzóico (Esq. 1, Fig. 4) manteniendo una temperatura de 0 °C para evitar la descomposición del producto. La reacción se monitoreó cada 30 minutos mediante CCF hasta observar la conversión total de la materia prima en el correspondiente sulfóxido (Esq. 1, Fig. 5). La purificación de los compuestos se realizó por cromatografía en columna.

Esquema 1. Síntesis general de los compuestos



5.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS

Los intermediarios obtenidos y los productos finales se caracterizaron utilizando técnicas espectroscópicas: resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H) y resonancia magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C).

Compuesto BHO-1. En los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C , se observaron características comunes para todos los compuestos debido a que poseen la misma estructura base. Para fines de claridad, los átomos de carbono se encuentran enumerados y son equivalentes en todas las figuras de los espectros. La figura 8 muestra el espectro de

resonancia magnética nuclear de protón del compuesto **BHO-1**. Como señales características se encuentran un singulete a 4.37 ppm, que integra para los dos protones del metileno (C11), responsable de la unión entre el derivado de 2-mercaptobencimidazol y el anillo de piridina. También detectamos un singulete a 2.5 ppm, señal que corresponde a los tres protones del metilo sustituyente en el anillo de bencimidazol (C19). Las señales de los protones aromáticos se encontraron en el campo bajo del espectro, donde destaca la señal a 8.65 ppm que corresponde al protón (C15) contiguo al átomo de nitrógeno.

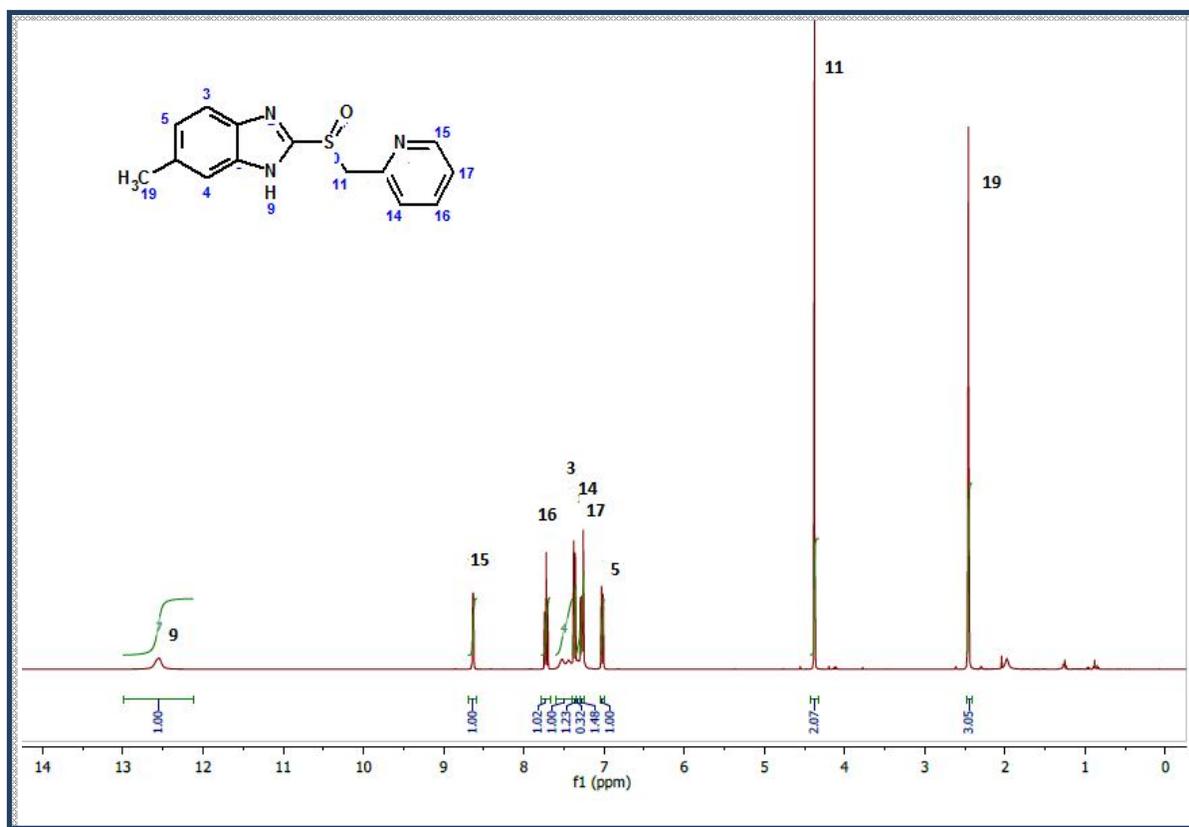


Figura 8. Espectro de RMN ^1H del compuesto BHO-1

En el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono RMN ^{13}C (Figura 9), observamos 12 señales que representan los 14 carbonos del compuesto BHO-1, esto debido a que las señales de los carbonos 1 y 2 se traslapan mostrando una señal a 138 ppm, y los carbonos 3 y 4 muestran una señal a 123 ppm. A campo alto se aprecian dos señales, una en 21.64 ppm correspondiente al grupo metilo (C19) sustituyente en el anillo

de bencimidazol y la otra señal a 37.15 ppm que corresponde al carbono de metileno (C11). En el campo bajo del espectro se aprecian diez señales, las cuales corresponden a los carbonos aromáticos de los anillos en la estructura de la molécula.

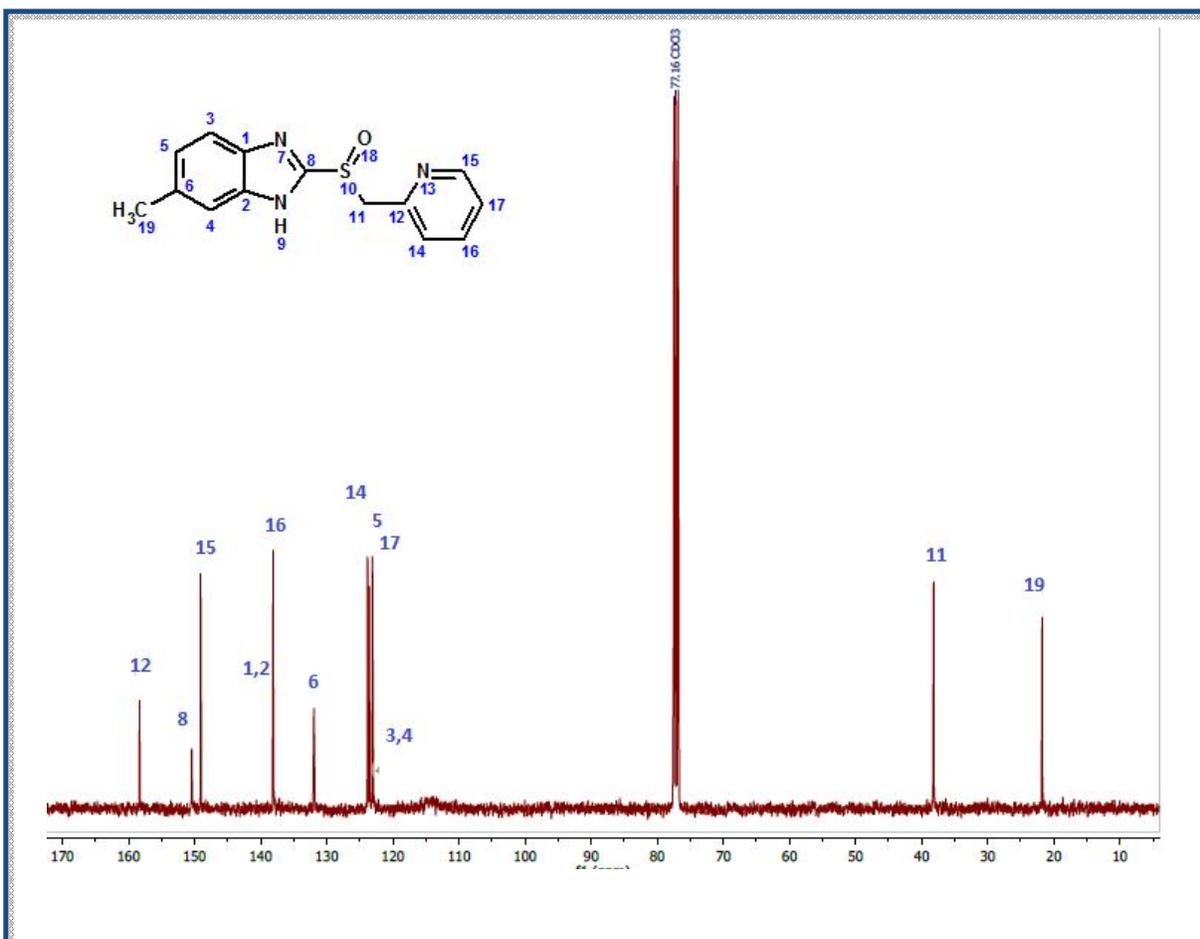


Figura 9. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto BHO-1.

Compuesto BHO-2. En la figura 10 se muestra el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Protón RMN ^1H del compuesto. De igual forma, como señal característica se pueden observar un doblete a 4.62-4.82 ppm correspondiente a los dos protones del metileno (C11), así como un singulete a 2.5 ppm correspondientes a los tres protones del grupo metilo del anillo de bencimidazol (C19). Las señales correspondientes a los protones de los dos grupos metilo del anillo de la piridina al ser grupos alifáticos, también se observan en un campo alto dando la señal de un singulete a 2.12 (C20) y otro

en 2.25 ppm (C21). La señal que pertenecen a los tres protones del grupo metoxilo (C23), se encuentra en 3.62 ppm como un singlete. Por último, las señales de los protones aromáticos de los anillos se encuentran en el campo bajo entre 7.25 y 8.25 ppm.

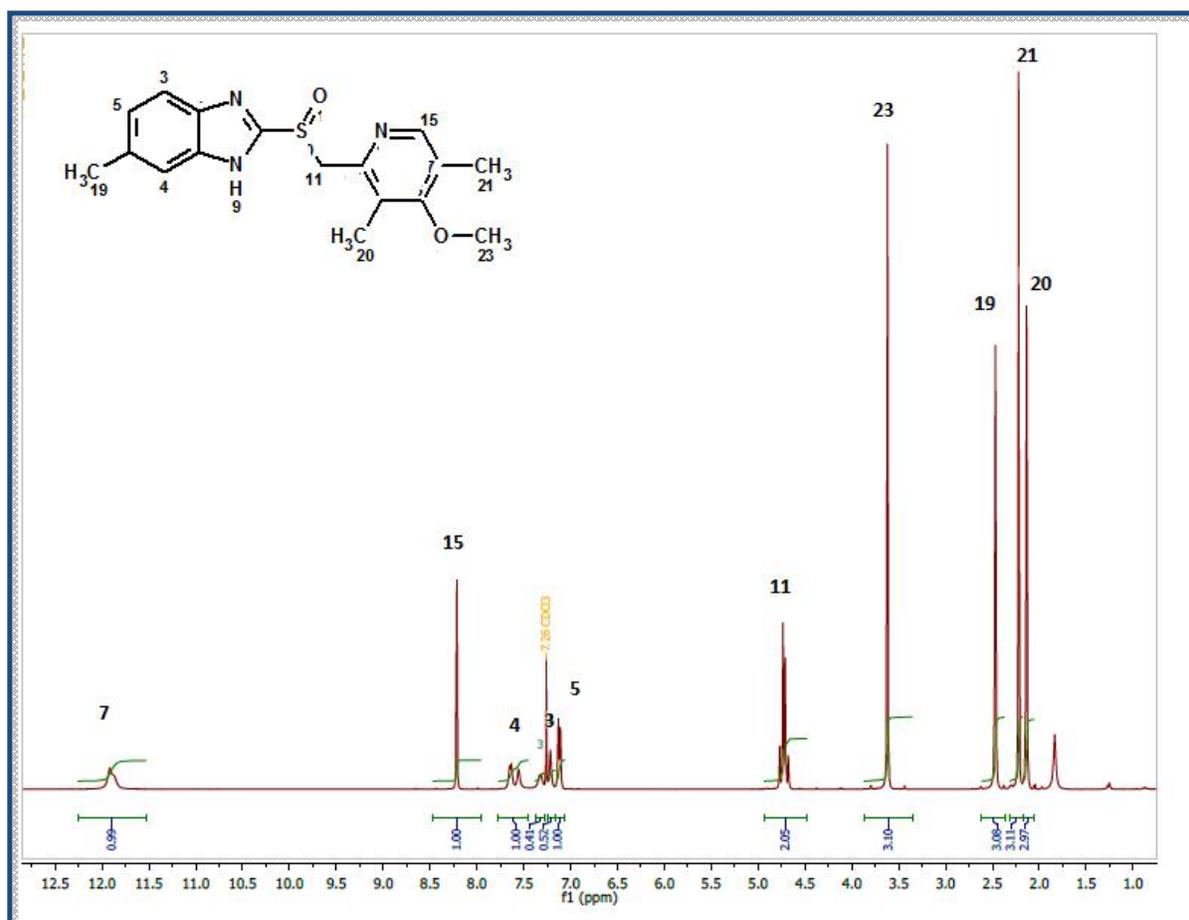


Figura 10. Espectro de Resonancia Magnética nuclear de Protón del compuesto BHO-2.

En el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono RMN ^{13}C (Figura 11), se observan 15 señales que representan los 17 carbonos del compuesto **BHO-2**, debido a que los carbonos 3 y 4 presentan una señal a 199 ppm y los carbonos 13 y 17 muestran una señal para ambos átomos a 126.54 ppm. A campo alto, se aprecian tres señales en 11.64, 13.48 y 21.87 ppm correspondientes a los tres grupos metilo presentes en la molécula.

(C20, C21 y C19), respectivamente. De igual manera, se aprecia una señal a 60.01 ppm que pertenece al carbono del grupo metoxilo (C23) y una señal en 60.85 ppm correspondiente al carbono (C11) que une el anillo de bencimidazol y piridina.

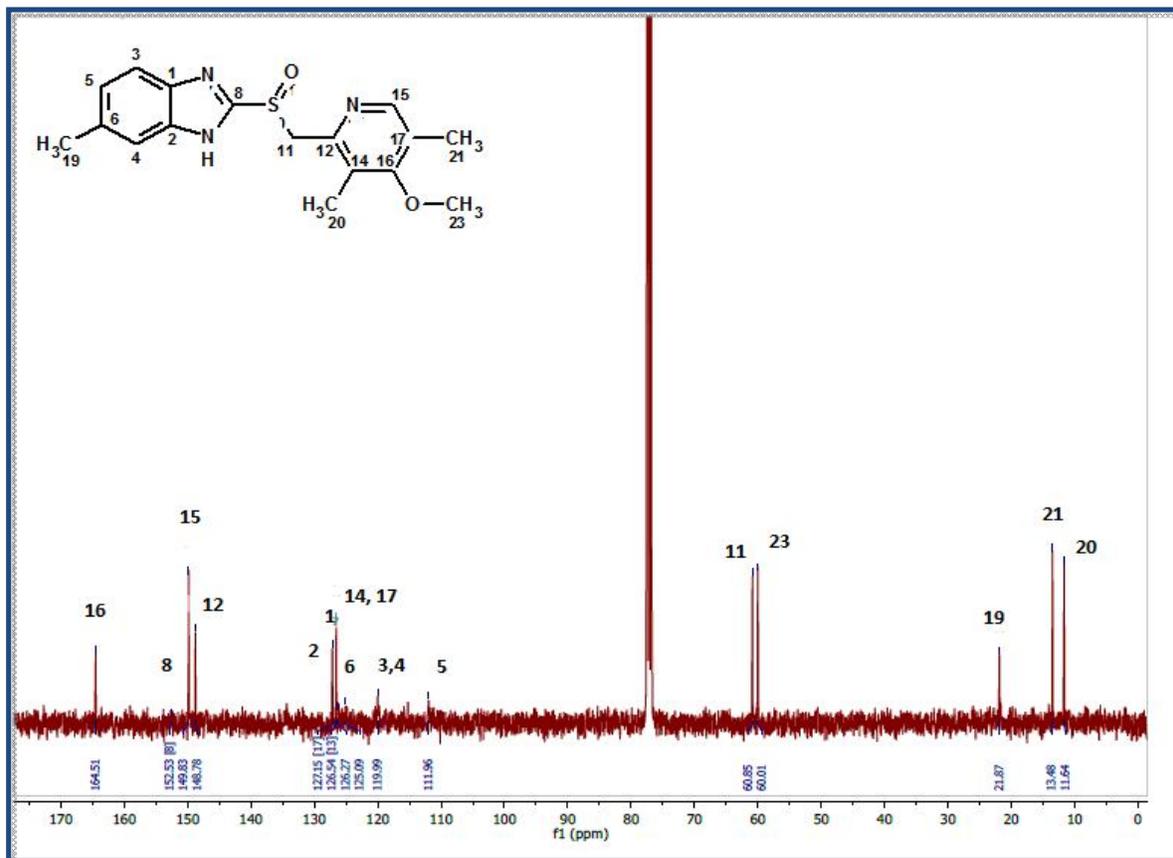


Figura 11. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto BHO-2

Compuesto BHO-3. De manera similar a lo anterior, este compuesto mostró las señales comunes en su espectro de RMN ^1H (figura 12): la presencia de dos señales entre 4.68 y 4.83 ppm correspondiente al carbonilo (C11), así como dos singuletes a 2.20 y 2.48 ppm de los protones del grupo metilo del anillo de piridina (C20) y de bencimidazol (C19), respectivamente. Además, se observa la presencia de un multiplete en 4.33-4.39 que corresponde a los dos protones del grupo trifluoroetoxi (C22), así como las señales en campo bajo que corresponden a los protones aromáticos de los anillos.

En su espectro de RMN ^{13}C (figura 13), se observan 10 señales que representan los 16 carbonos que tiene la molécula. En campo bajo se aprecian las señales de los carbonos aromáticos del compuesto sobresaliendo en 148.53 y 150.69 ppm los carbonos que se encuentran cerca del nitrógeno en el anillo de la piridina (C12 y C15). Además, se observa la señal a 123.54 ppm correspondiente al carbono aromático que tiene como sustituyente un grupo metilo (C14). Por otra parte, en 11.13 y 21.86 ppm, se encuentran las señales que corresponden a los carbonos de los grupos metilo que tiene la molécula (C20 y C19, respectivamente).

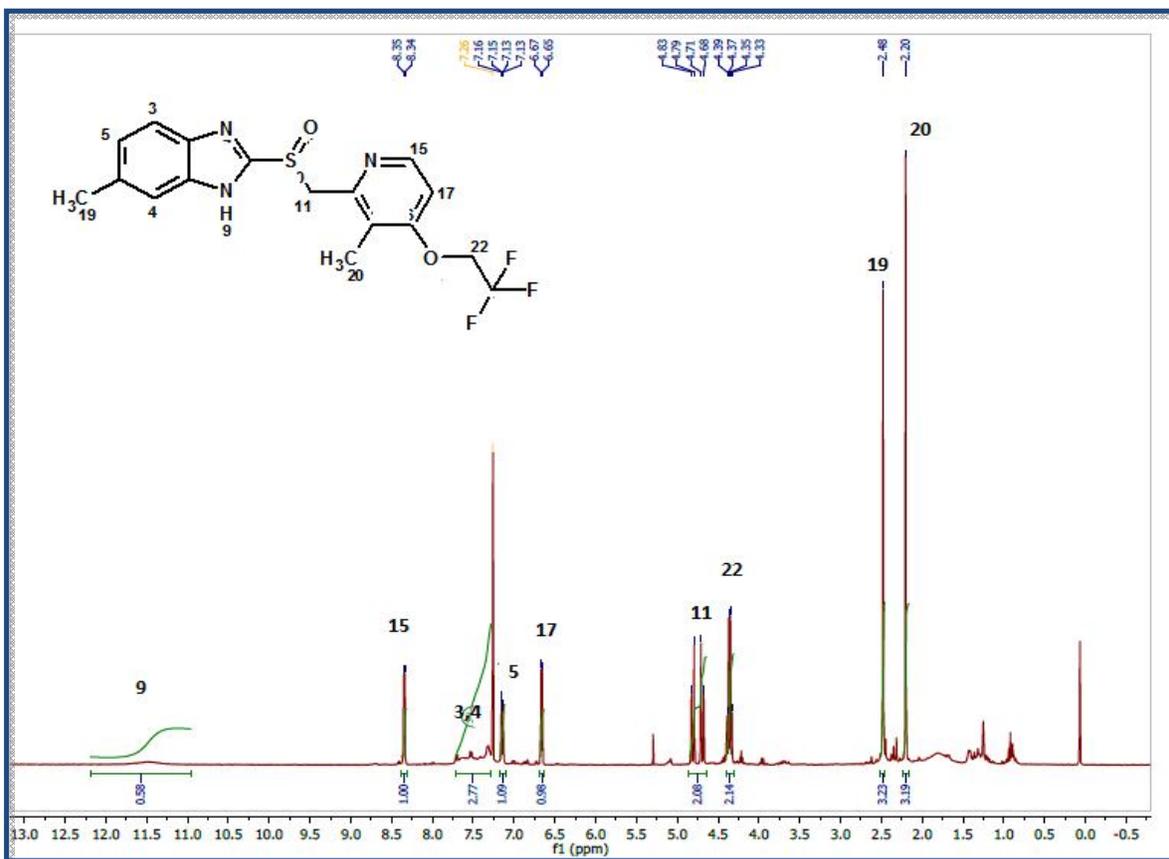


Figura 12. Espectro de Resonancia Magnética nuclear de Protón del compuesto BHO-3

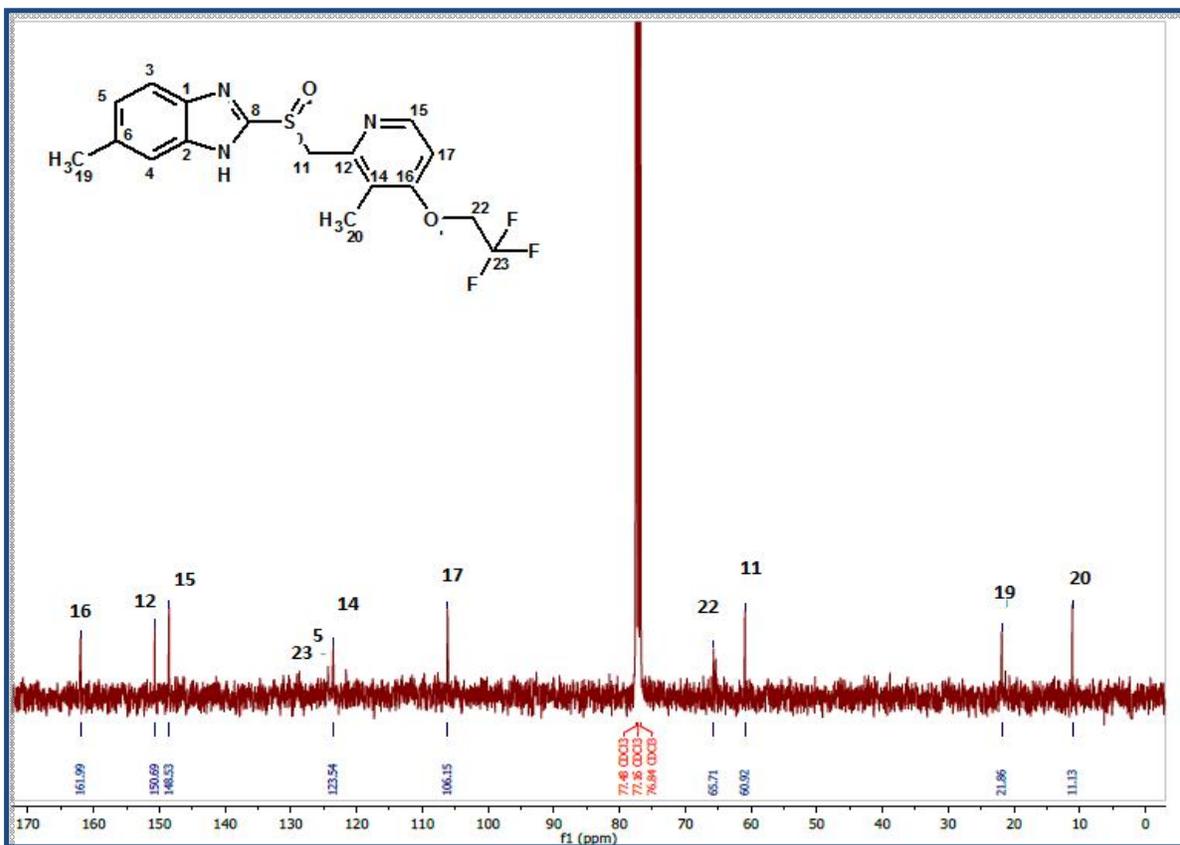


Figura 13. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono del compuesto BHO-3

5.3 COEFICIENTES DE EXTINCIÓN MOLAR Y DE ABSORTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS

Con la finalidad de preparar las soluciones stock de cada uno de los compuestos con precisión, se determinó el coeficiente de extinción molar y de absorptividad tanto para el omeprazol como para los análogos. Al realizar el barrido de absorbancia en el rango de longitud de onda de 190 a 800 nm (figura 14), se encontró que el omeprazol presenta una absorbancia máxima a 306 nm, mientras que para los análogos su máxima absorbancia se encuentra en 299 nm. Con estas longitudes de onda, se procedió a trabajar para la determinación del coeficiente de extinción molar. Se encontró que en la literatura se reporta una absorbancia máxima a 296 nm para el omeprazol, **Gennaro 2003**), sin embargo; es conocido que diversos factores como pH, concentración de sales y el disolvente, alteran la carga de las moléculas y provocan desplazamientos de los espectros

de UV. Cabe mencionar que para estos experimentos se trabajó en un medio ligeramente alcalino (0.1 % NaOH), ya que el omeprazol es lábil en medio ácido.

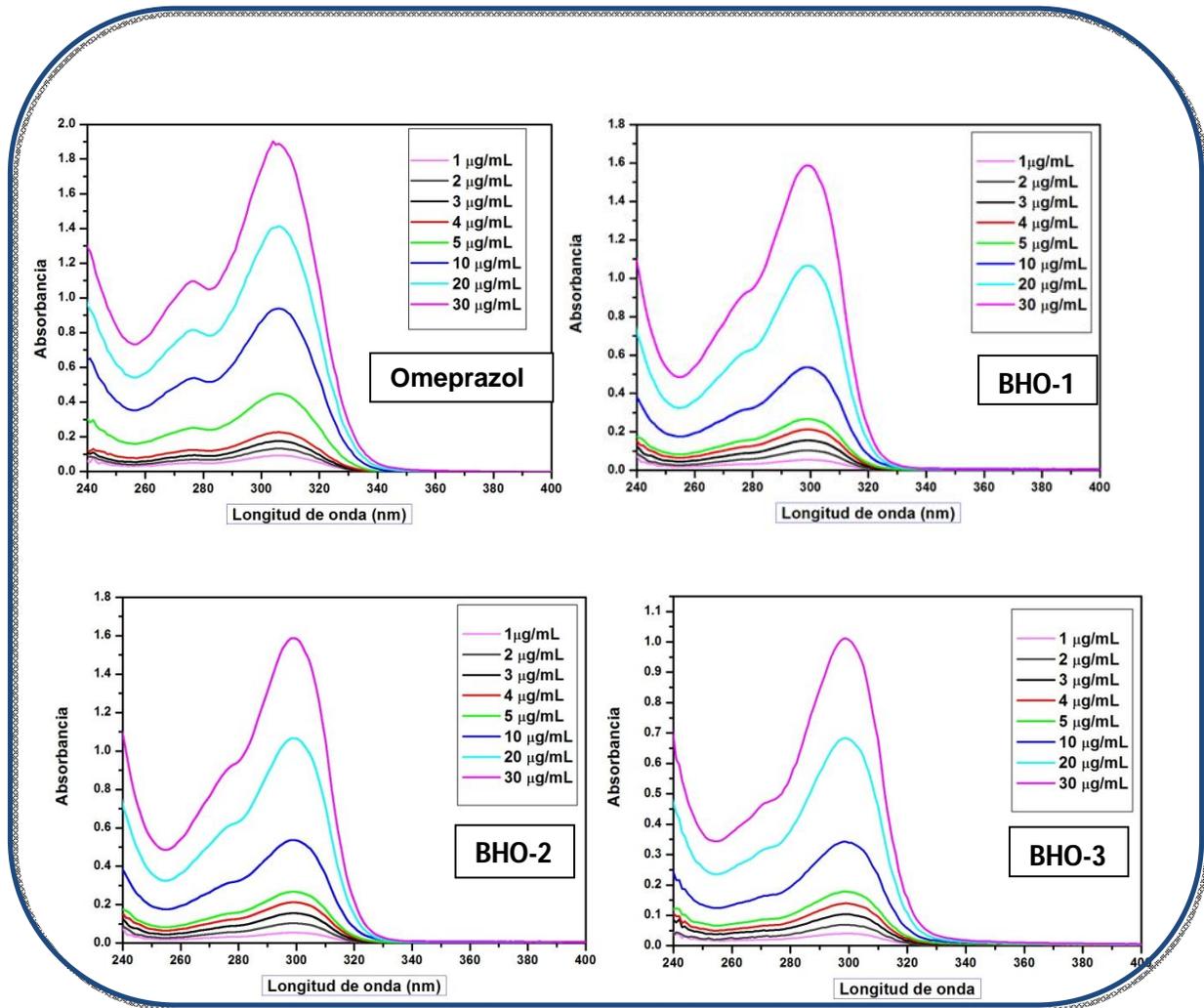


Figura 14. Espectros de Absorción del Omeprazol y análogos sintetizados,

Para determinar el coeficiente de extinción molar de cada uno de los compuestos, trabajamos con un grupo de disoluciones con concentraciones de 2 a 10 µg/mL, rango en el cual se cumplía la Ley de Beer-Lambert. Esto permitió obtener los resultados de absorbancia de cada concentración para después estandarizar dicho resultado de absorbancia a una concentración de 1 mg/mL y obtener el resultado final (Tabla 3).

Tabla 3. Coeficiente de extinción molar del omeprazol y de los análogos, determinado en un medio básico (0.1% de NaOH).

Compuesto	Longitud de onda (nm)	0.1%, 1 cm	$\epsilon_{0.1\%NaOH}$
Omeprazol	306	44.8	15 474
BHO1	299	45.7	15 456
BHO-2	299	52.53	17 304
BHO-3	299	34.70	13 790

El resultado de los coeficientes obtenidos se utilizó para preparar las soluciones de los compuestos a la concentración necesaria en cada uno de los experimentos posteriores.

Inactivación de la mutante GITIM C202A por modificación química de sus residuos de cisteína por el omeprazol y análogos

Con el propósito de conocer el efecto tanto de los productos finales como de los intermediarios sobre la actividad de GITIM, se realizó un primer ensayo de inactivación con el omeprazol, los intermediarios y los compuestos finales a una concentración fija. La tabla 4 muestra los resultados de la inactivación.

Tabla 4. Actividad residual de GITIM después incubarse a 37 °C, 2 horas con los compuestos a una concentración de 100 μ M

Compuesto 100 μ M	% Actividad residual GITIM	% Inactivación
Omeprazol	72	28
BHO-1	97	3
BHO-2	28	78
BHO-3	51	49
BHO-4	98	2
BHO-5	98	2
BHO-6	100	0

Los resultados muestran que los intermediarios **BHO-4**, **BHO-5** y **BHO-6** no tienen la capacidad de inactivar a la GITIM, mientras que el **omeprazol** y dos de los análogos (**BHO-2** y **BHO-3**) inactivaron a la GITIM un 28, 72 y 49 %, respectivamente. Estos resultados son importantes ya que nos indican que la presencia del grupo sulfóxido en la estructura de los compuestos es importante para su reactividad sobre las cisteínas y, de esta manera, desempeñar su actividad como agentes inactivantes en la enzima. A pesar de que el compuesto **BHO-1** no inactivó a la enzima a la concentración probada, se

realizaron pruebas de inactivación con concentraciones más altas del compuesto para corroborar si era posible observar una inactivación, resultados que se muestran más adelante.

Inactivación de las enzimas recombinantes GITIM C202A, C222A y HsTIM.

La actividad de las enzimas se determinó en dirección Gliceraldehido 3-fosfato (GAP) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) usando un sistema acoplado siguiendo el decaimiento del NADH a 340 nm a 25°C; la GITIM se utilizó a una concentración de 5 ng/mL. Es importante mencionar que las soluciones stock de omeprazol y los análogos se prepararon en fresco antes de realizar cada ensayo; los compuestos se disolvieron en dimetilsulfoxido (DMSO) para obtener una solución stock 25 mM. Las soluciones de los compuestos usados en cada ensayo contenían 5 % de DMSO, concentración a la cual no se ve afectada la actividad de la GITIM

Estudios previos demostraron que la modificación química de la cisteína 222 con agentes derivatizantes, induce la disminución o pérdida total en la actividad de la enzima. Esta inactivación se correlaciona con las propiedades fisicoquímicas del agente derivatizante. Para confirmar si la Cys 222 también está implicada en la inactivación de la GITIM por los análogos al omeprazol, probamos los compuestos sobre la mutante de GITIM C222A. Los datos mostraron que en ausencia de tal residuo no existe inactivación de la enzima sugiriendo que uno de los blancos de los compuestos es este residuo (figura 15).

La selectividad de los compuestos se corroboró probando sus efectos sobre la HsTIM. Los resultados indican que tanto el omeprazol como los tres análogos, resultaron ser agentes inactivantes en GITIM de manera selectiva, ya que sobre HsTIM sólo se presenta una inactivación máxima del 15%.

La figura 8 también muestra los resultados obtenidos con la GITIM C202A, encontrándose que los compuestos **BHO-2** y **BHO-3** fueron capaces de inactivarla de

manera dependiente de concentración. El **BHO-2** induce una inactivación del 92 % a partir de 200 μM ; posteriormente, el porcentaje de actividad residual fluctuó entre un 5 a 2 % al aumentar las concentraciones del compuesto. Con el compuesto **BHO-3** se alcanzó una inactivación del 94% a una concentración de 500 μM , mientras que con el compuesto **BHO-1**, la actividad de la GITIM disminuyó aproximadamente 20% con 200 μM del compuesto; sin embargo, el uso de concentraciones mayores no modificó más la actividad (figura 15).

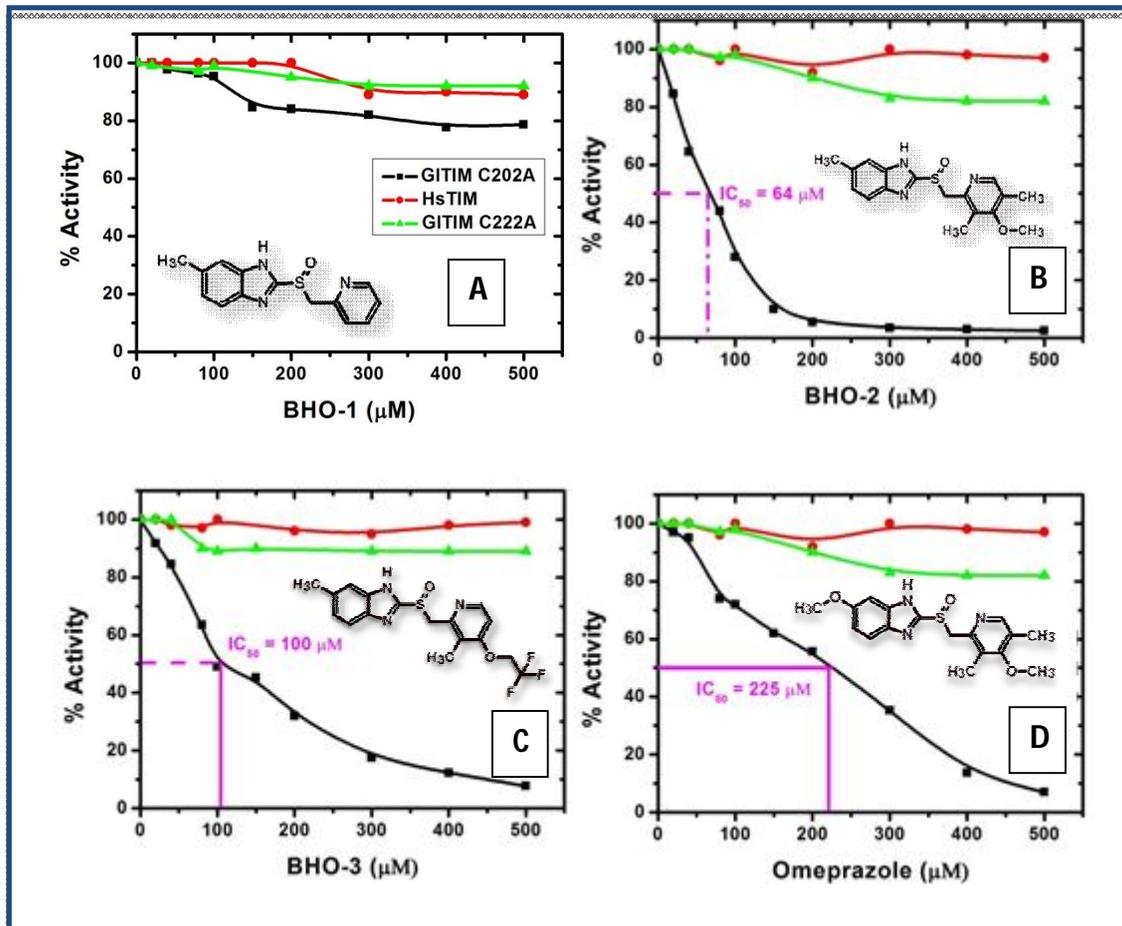


Figura 15. Gráficas de inactivación de GITIM C202A, C222A y HsTIM, después de incubarse durante 2 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ con concentraciones crecientes de los compuestos.

Estos resultados sugieren que la inactivación de la GITIM por los compuestos depende de sus características estructurales y que la inactivación es dependiente de concentración. En particular, el compuesto denominado **BHO-2** logró un 100% de inactivación a las concentraciones del ensayo (**figura 8B**). La IC_{50} de este compuesto se obtuvo sobre la GITIM siendo 3.5 veces menor que la determinada para el **omeprazol**; con respecto a **BHO-3**, presentó una IC_{50} 1.5 veces menor (**figura 8C**), mientras que el análogo denominado **BHO-1**, sólo mostró una inactivación máxima de 20 %. Esto sugiere que los sustituyentes sobre el templado del omeprazol presentan efectos importantes sobre la inactivación de la enzima. La diferencia entre el omeprazol y **BHO-2**, es que éste último posee un metilo en lugar de un metoxilo en la posición 5 del anillo de bencimidazol, sugiriendo que la introducción de grupos pequeños en esta posición aumenta la reactividad del compuesto sobre la GITIM

A pesar de que **BHO-3** también posee un grupo metilo en la posición 5 en el anillo de bencimidazol mostrando un incremento en la capacidad inactivante, hay una diferencia más sobre el anillo de piridina comparándolo con el omeprazol. **BHO-3** posee un grupo trifluoroetoxilo en la posición 4 del anillo a diferencia del omeprazol que tiene un metoxilo. El resultado sugiere que un sustituyente de mayor volumen junto con el reemplazo de los átomos de hidrógeno por átomos de halógeno, como es el caso del fluor, disminuyó la capacidad reactiva de este compuesto.

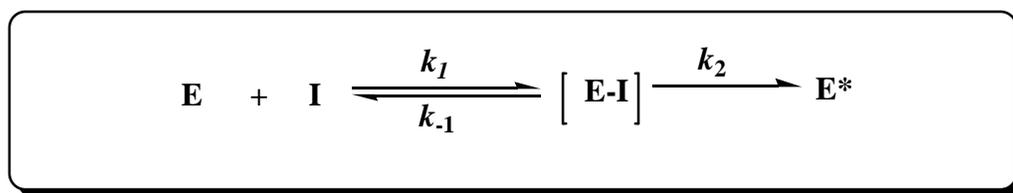
Tomando en cuenta estos resultados, procedimos a calcular las constantes de inactivación de segundo orden para los compuestos.

5.6 CONSTANTES DE INACTIVACIÓN

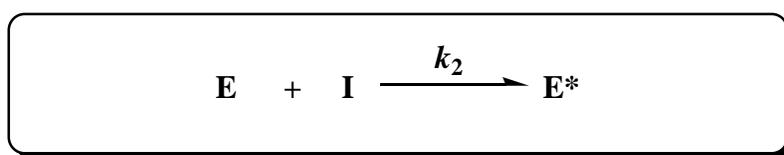
Las constantes de inactivación de segundo orden (k_2) de cada compuesto se calcularon utilizando la estrategia de determinar primero las constantes de inactivación de pseudoprimer orden (k) a diferentes concentraciones fijas de los compuestos (Figura 16 A, C y F). Posteriormente, estas constantes se graficaron en función de la concentración del

compuesto; los valores de k_2 se calcularon a partir de la pendiente de éstas últimas gráficas (Figura 16 B, D y F).

Los resultados muestran que las cinéticas de inactivación usando diferentes concentraciones de **BHO-2**, **BHO-3** y **omeprazol**, siguieron un decaimiento monoexponencial (Figura 16 A, C y F, respectivamente). Analizando las gráficas de las constantes de pseudoprimer orden vs concentración de los compuestos, se observa un comportamiento lineal, sugiriendo que la reacción entre los compuestos y la enzima presentaría un intermediario reversible efímero (Esquema 2). En ese sentido, es posible que el valor de k_2 sea muchas veces mayor que k_1 o k_{-1} . Observando estas características, el sistema se puede simplificar a un esquema 3.



Esquema 2.



Esquema 3.

La Tabla 5 muestra los valores de k_2 calculados para cada compuesto. Como se observa, el omeprazol mostró un valor de $0.8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Este valor es menor con respecto a las constantes calculadas para los análogos sintetizados, indicando que nuestros compuestos son mejores agentes inactivantes de la GITIM. El análogo **BHO-2** resultó ser el mejor, pues muestra una capacidad de inactivar cerca del 10% a la enzima cada minuto a una concentración de 1 mM, mientras que el omeprazol a la misma concentración y tiempo, la inactivaría sólo un 5%.

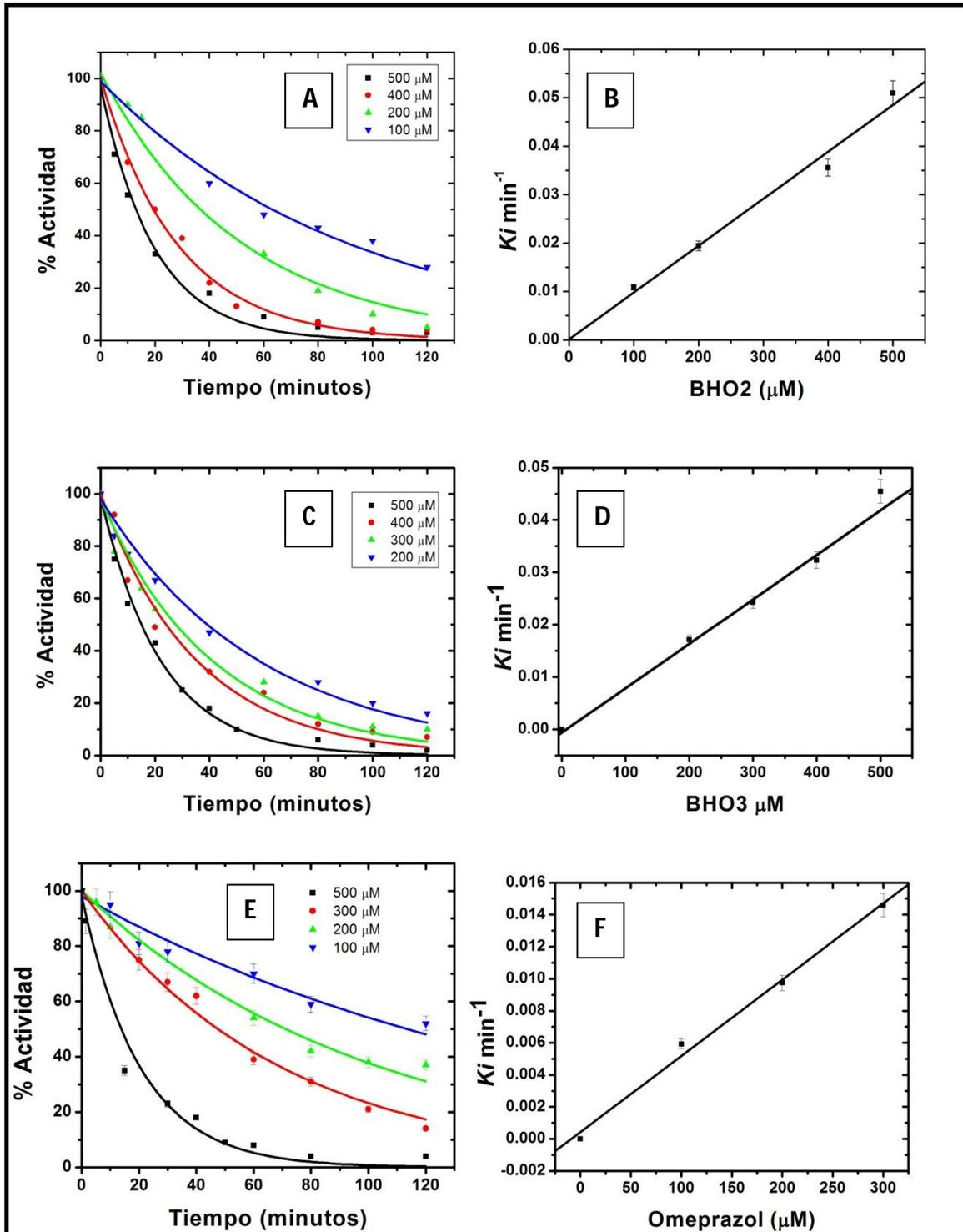


FIGURA 16. Inactivación de la mutante GITIM C202A por el omeprazol (E), análogo BHO-2 (A) y BHO-3 (C). A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas para determinar la actividad residual, las líneas obtenidas representan los datos experimentales de la ecuación $A_R = A_0(e^{-kt})$. Las gráficas B, D y F, representan la pendiente lineal obtenida a partir de las constantes de pseudoprimer orden.

Tabla 5. Constantes de segundo orden

Compuesto	$k_2(M^{-1} s^{-1})$
Omeprazol	0.78 ± 0.016
BHO2	1.6 ± 0.10
BHO3	1.2 ± 0.061

Con los datos obtenidos anteriormente, que incluyen los valores de las IC_{50} y las constantes de segundo orden para cada uno de los compuestos, decidimos corroborar si la inactivación de la enzima producida por los agentes probados seguía un comportamiento irreversible. Por tanto, decidimos evaluar el efecto del DTT sobre la GITIM incubada con cada uno de los compuestos.

ENSAYOS DE REVERSIBILIDAD

Con el objetivo de investigar si la modificación química producida por los compuestos podía revertirse, se decidió estudiar el efecto inducido por la adición de DTT. Se ha observado que a mayor grado de alteración estructural por los agentes derivatizantes, la capacidad de revertir la inactivación disminuye. Por ejemplo, los estudios con la TIM de tripanosomátidos tratados con MMTS mostraron sólo un 10 % de reversibilidad, coincidiendo con un grado de alteración estructural muy importante (Gómez-Puyou et al. 1995).

Para realizar estos experimentos, se realizó un ensayo común de inactivación, utilizando una concentración de 500 μM , 400 μM , y 200 μM de **omeprazol, BHO-3 y BHO-2**, respectivamente. La inactivación se monitoreó hasta obtener tres diferentes porcentajes de inactivación (25, 50 y 75 %) en cada uno de los compuestos, momento en el cual se adicionó a las muestras DTT en exceso (1 mM) y se continuó con la medición de la actividad residual.

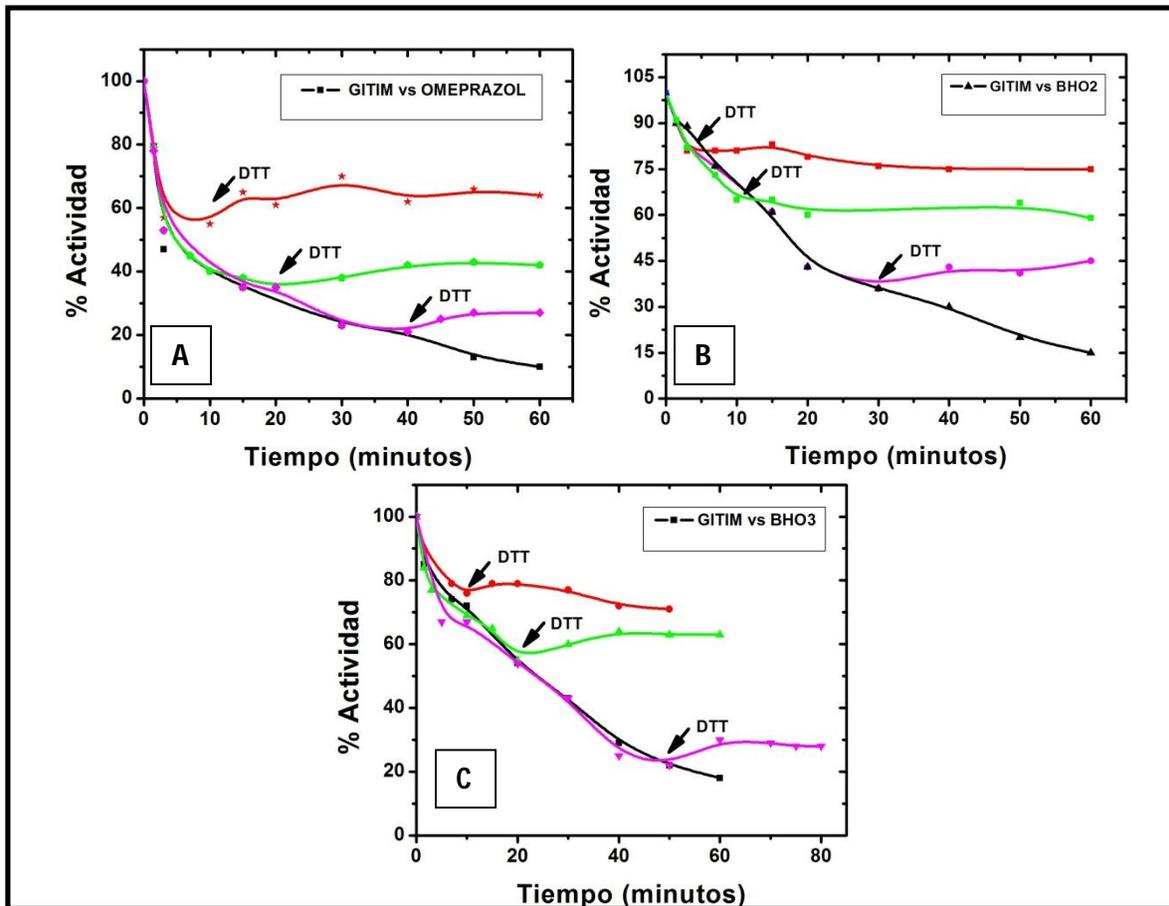


Figura 17. Inactivación de la mutante GITIM C202A por el omeprazol (A), análogo BHO-2 (B) y BHO-3 (C). El tiempo de adición de DTT se realizó cuando se había alcanzado un 25, 50 y 75 % de inactivación y se señala en cada gráfica con una flecha,

Los resultados obtenidos muestran que al adicionar un exceso de DTT a la reacción de inactivación, en ningún caso se recuperó la actividad de la enzima (Figura 17), en cambio, su actividad prácticamente se conservó en el porcentaje de inactivación alcanzada en ese tiempo. Esto nos sugirió que, a pesar de que los compuestos se separaban de la enzima, la GITIM probablemente sufría ciertos cambios conformacionales irreversibles que no le permitían recuperar su actividad. Esta idea se generó suponiendo que el enlace formado entre los compuestos y la cisteínas de la enzima eran del tipo disulfuro, como el que se reporta para la bomba de protones (Jain et al. 2007).

Posteriormente, se realizó la cuantificación de cisteínas antes de exponer a la enzima con los compuestos, después de modificarse con los compuestos y también

después de incubar a la enzima modificada con DTT. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Número de cisteínas que se cuantificaron, antes de exponer la enzima a los compuestos, después de derivatizar y después de adicionar DTT.

	No. de Cys libres GITIM C202A	No. de Cys libres después exponer a la enzima con el compuesto	No. de Cys después de incubar con DTT
Omeprazol	4	2	2
BHO2	4	2	2
BHO3	4	2	2

Estos resultados muestran que las cisteínas no se liberan y continúan unidas a los compuestos, esto sugiere que probablemente se esté generando un enlace diferente a un puente disulfuro, por lo que el DTT no lo puede romper.

DATOS ESTRUCTURALES

Es importante contar con datos estructurales que establezcan una relación entre la inactivación y la posible desestabilización estructural en la enzima. Con este objetivo en mente, realizamos ensayos de Dicroísmo circular, Fluorescencia Intrínseca y Cromatografía de exclusión molecular. Los resultados se describen a continuación.

Estudio de la estructura secundaria.

Para estudiar la estructura secundaria de la GITIM, se obtuvieron los espectros de Dicroísmo circular (CD) tanto de la GITIM sin modificar (control), como de la enzima después de incubarse por 2 horas con el omeprazol y los análogos a concentraciones que inducen la inactivación máxima de la enzima. Los espectros de CD de la GITIM derivatizada con los compuestos fueron muy similares al del control, indicando que la derivatización no induce cambios o modificaciones significativas sobre la estructura secundaria de la enzima (Figura 18).

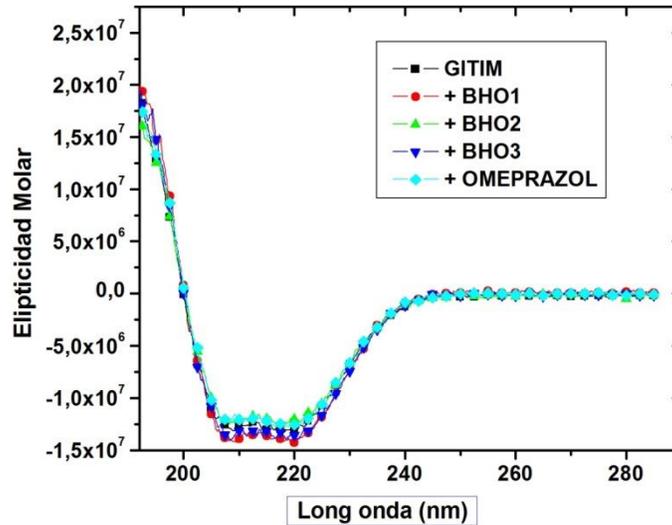
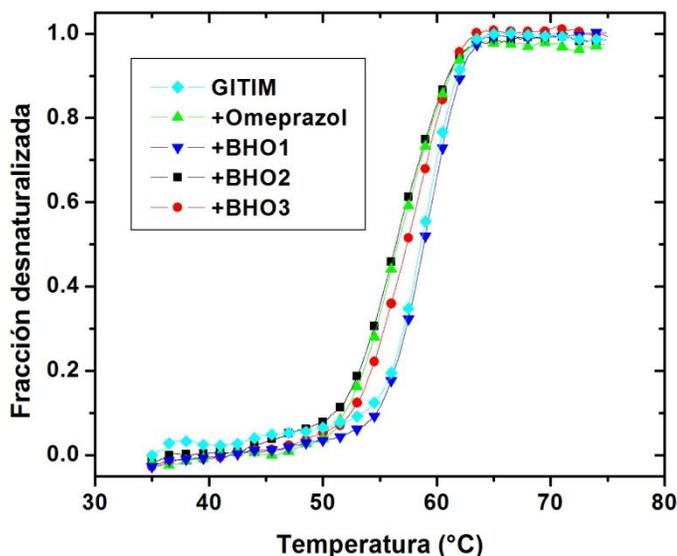


Figura 18. Efecto del omeprazol y análogos sobre la estructura secundaria de GITIM.

Igualmente, la estabilidad de las enzimas modificadas se determinó siguiendo su desnaturalización térmica. Se encontró que en ausencia de los compuestos la GITIM presenta una $T_{m_{app}}$ de $58.7\text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que al exponer la enzima con el omeprazol y el compuesto **BHO-2**, el valor disminuye $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ mostrando un valor de $56.4\text{ }^{\circ}\text{C}$; en el caso del compuesto **BHO-3**, la T_m disminuyó $1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, no se encontraron diferencias en los valores de $T_{m_{app}}$ entre la enzima sin derivatizar y derivatizada con **BHO-1** (Figura 19). En conjunto, estos datos indican que la termoestabilidad de la GITIM sin modificar y las modificadas es similar.



Enzima	$T_{m_{app}}$ ($^{\circ}\text{C}$)
GITIM	58.7 ± 0.03
+ Omeprazol	56.4 ± 0.3
+ BHO1	58.7 ± 0.03
+ BHO2	56.4 ± 0.03
+ BHO3	57.2 ± 0.03

Figura 19. Efecto del omeprazol y análogos sobre la termoestabilidad de GITIM.

Estudio de la estructura terciaria

Para estudiar la estructura terciaria de la enzima, se obtuvieron los espectros de fluorescencia intrínseca de la GITIM C202A sin modificar y de la enzima derivatizada. La figura 20 muestra que el espectro de emisión de la enzima modificada con los compuestos presenta una reducción en la intensidad de fluorescencia con respecto a la GITIM control; sin embargo, el máximo de emisión no se ve afectado en ningún caso. Estos resultados sugieren que la estructura terciaria global no se modifica una vez que la enzima se expone a los compuestos.

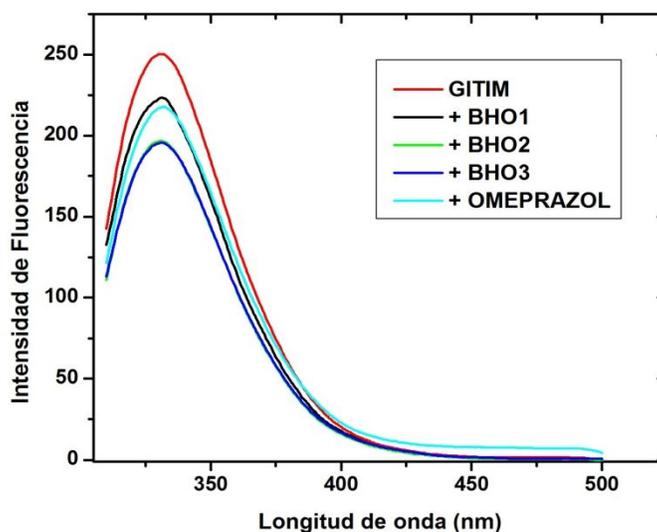


Figura 20. Efecto del omeprazol y sus análogos sobre el espectro de emisión de fluorescencia de GITIM.

Estudio de la estructura cuaternaria de la enzima

Con el objetivo de investigar si al exponer la enzima con los compuestos se producía la disociación del dímero y, en consecuencia, pudiera existir una mezcla dímero-monómero al finalizar la reacción de derivatización, se llevaron a cabo experimentos de cromatografía de exclusión molecular, obteniéndose el perfil cromatográfico tanto de la enzima libre de compuesto, como de la enzima derivatizada con cada uno de ellos. Los datos indican que sólo se encuentra presente el dímero en todos los casos, ya que el cromatograma mostró el perfil correspondiente al peso molecular del dímero sin

observarse pico alguno que sugiriera la presencia del monómero (Tabla 7). Al comparar estos resultados con los reportados en estudios previos donde se expuso a la enzima con agentes derivatizantes de cisteínas, se encontró que cuando cuatro cisteínas se habían modificado con DTNB, se producía la disociación del dímero y en consecuencia, aumentaba el porcentaje de monómero. Al realizar la determinación del número de cisteínas que derivatizaban tanto el omeprazol como nuestros análogos, se encontró que reaccionan con dos cisteínas en la GITIM C202A, probablemente por tal motivo no se llegue a la disociación de la enzima.

Tabla 7. Peso molecular obtenido, después de derivatizar la GITIM con el omeprazol o con sus análogos y realizar la cromatografía de exclusión molecular.

	Peso Molecular
GITIM	52 980
GITIM+Omeprazol	53 011
GITIM+BHO1	52 598
GITIM+BHO2	53 103
GITIM+BHO3	54 178

ENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD

Se realizaron ensayos de susceptibilidad *in vitro* utilizando cepas de *Giardia lamblia* WB, mediante el método de resiembra. La gráfica de la figura 21 muestra que, después de incubar los trofozoitos de *Giardia* con los compuestos, la viabilidad del parásito disminuyó de una manera dosis dependiente. Por lo tanto, se concluye que tanto el omeprazol como los compuestos tienen un efecto citotóxico en las cepas de *Giardia lamblia*. Sin embargo, el efecto citotóxico es mayor con los análogos sintetizados.

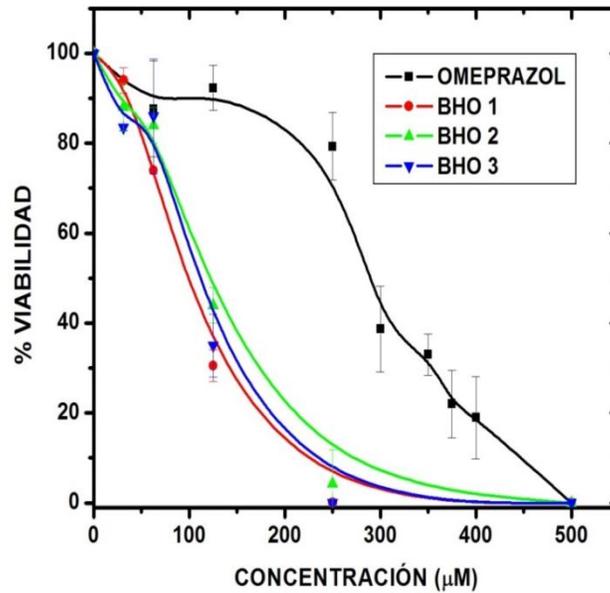


Figura 21. Efecto citotóxico del omeprazol y análogos sobre cepas de *Giardia lamblia*.

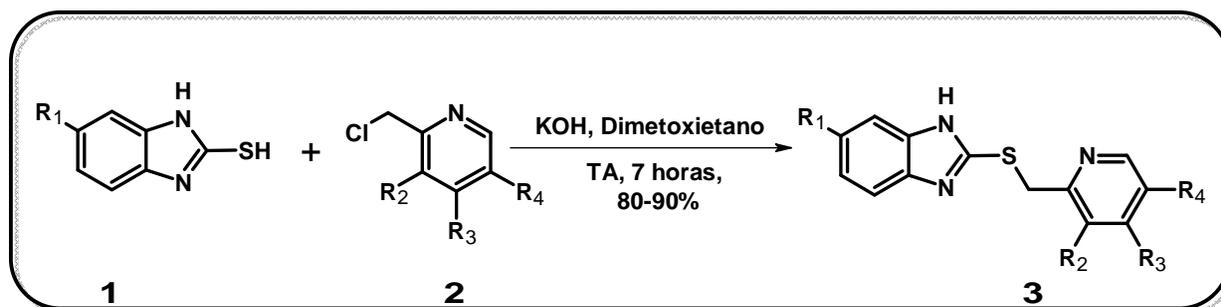
Aunque los análogos del omeprazol mostraron un mayor efecto deletéreo sobre los trofozoitos de *G.lamblia* en comparación con el omeprazol, se observa que los tres muestran el mismo comportamiento incluyendo el **BHO-1**, que anteriormente había sólo inactivado un 20 % a la GITIM. Con estos resultados se sugiere que podrían existir otros blancos biológicos sobre los que están actuando los compuestos.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Debido a que los medicamentos usados en el tratamiento para combatir la giardiasis presentan efectos adversos, además de que el parásito ha generado cierta resistencia, surge la necesidad de buscar e investigar nuevos medicamentos anti-giardíacos. En particular, se ha enfocado principal interés en la triosafosfato isomerasa de *Giardia lamblia* como un blanco molecular para el diseño de fármacos. Anteriormente, se ha propuesto al omeprazol como fármaco con capacidad de inactivar a la GITIM y matar a los trofozoitos. En el presente trabajo, se propuso la síntesis de análogos al omeprazol con la intención de mejorar la capacidad de inactivación sobre GITIM. Realizamos sobre los análogos modificaciones estructurales mediante la sustitución del grupo metoxilo por un grupo de menor tamaño y no polar, en este caso, un metilo en la posición cinco del anillo de benzimidazol. Este cambio se realizó en los tres análogos que se sintetizaron; por el lado de la piridina, en **BHO-1** se cambiaron los tres sustituyentes presentes en este anillo por átomos de hidrógeno. **BHO-2** conservó los mismos sustituyentes que posee el omeprazol (dos metilos y un metoxi). Finalmente, en **BHO-3** se cambió un metilo por un hidrógeno y el metoxi se sustituyó por un grupo de mayor tamaño y con 3 átomos electronegativos: el trifluoroetoxi.

La síntesis de los análogos del omeprazol **BHO 1-3** se muestra en el esquema 4, inició con la formación de los intermediarios (**BHO 4-6**), empleando una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2), donde ocurrió un desplazamiento del átomo de cloro en la cloropiridina (Esq. 4, fig. 2) por el nucleófilo tiol del benzimidazol (Esq. 4, fig. 1), para obtener los compuestos finales del tipo sulfuros de benzimidazoles (Esq. 4, fig. 3). La reacción se llevó a cabo en un medio básico utilizando hidróxido de potasio, además de que fue importante utilizar un disolvente polar aprótico (1,2-Dimetoxietano). De esta forma, logramos disolver a la materia prima sin solvatar al nucleófilo dejándole libertad para atacar al sustrato. Lo anterior permitió obtener los compuestos en rendimientos elevados (80 al 90%), que concuerdan con los reportados en otros trabajos (Maharvi et al. 2013), donde se obtuvieron rendimientos del 95 % utilizando las condiciones antes

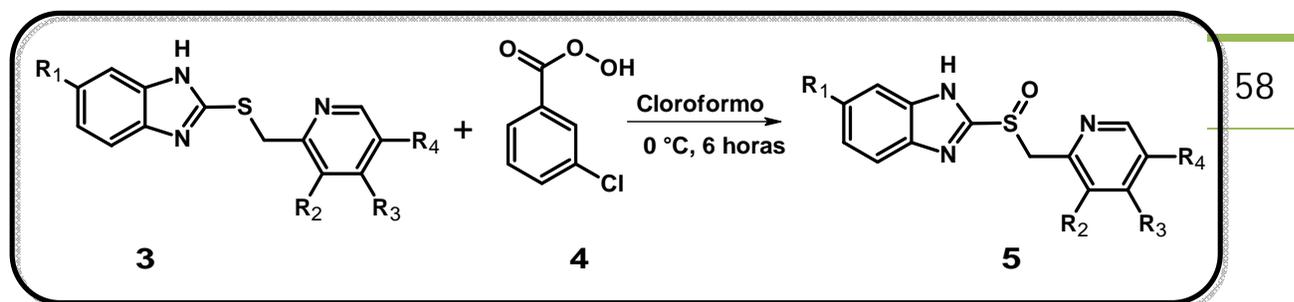
mencionadas. Sin embargo, en dicho trabajo Maharvi utiliza como base trietilamina y acetonitrilo como disolvente. En nuestro caso no fue posible utilizar acetonitrilo ya que la materia prima era insoluble en dicho disolvente, por lo cual, se utilizó 1,2-Dimetoxietano.



Esquema 4. Síntesis de los intermediarios

Bajo las condiciones antes mencionadas, se obtuvieron los tres intermediarios que fueron purificados por cromatografía en columna. Para corroborar el peso molecular y la estructura de los intermediarios, se emplearon técnicas espectroscópicas.

Una vez que se lograron obtener los intermediarios puros, se realizó la oxidación del átomo de azufre para la obtención de los productos finales del tipo sulfóxido (**BHO1-3**), para lo cual se empleó como agente oxidante ácido *m*-cloroperbenzóico (*m*-CPBA) Esquema 5. Este agente se decidió utilizar debido a que en trabajos anteriores se ha reportado la obtención de sulfóxidos con altos rendimientos utilizando dicho reactivo (Yan et al. 2011), (Maharvi et al. 2013). Sin embargo, se han descrito diversos procedimientos de oxidación tales como el que se menciona en la patente EP-174726, que se refiere a la síntesis del lanzoprazol usando un procedimiento de oxidación de sulfuro con uno de los ácidos *m*-cloroperbenzoico, peracético, trifluoroperacético o permálico, bromito sódico o hipoclorito sódico, o peróxido de hidrógeno. Sin embargo, al analizar algunos de los inconvenientes de otros agentes oxidantes, se encontró que en algunas de las reacciones se produce precipitación del producto; en otras, las oxidaciones son incompletas bajando el rendimiento, además de que es necesario emplear catalizadores como molibdeno o vanadio los cuales son tóxicos (Soria-Arteche et al. 2005).



Esquema 5. Reacción de oxidación del grupo tioéter a sulfoxido

Normalmente los métodos generales de *S*-oxidación no son fáciles de llevar a cabo, o bien, fallan debido a problemas de insolubilidad, que a menudo conduce a mezclas de sulfóxidos y sulfonas que son difíciles de separar. Por lo tanto, fue importante mantener la reacción a una temperatura de 0 °C, además de que la adición de *m*-CPBA se realizó lentamente, de esta manera se logró obtener el sulfóxido como producto mayoritario. Para la purificación de los productos finales, fue necesario realizar la cromatografía en columna de los productos para asegurar la eliminación de materia prima sin reaccionar por mínima que esta fuera. Cuando sólo se emplearon recristalizaciones para purificar, los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono revelaban que se encontraba materia prima mezclada con el producto.

Para la caracterización de la estructura de las moléculas, nos basamos en la resonancia magnética nuclear de protón y carbono (RMN ^1H y ^{13}C). Analizando el espectro de RMN ^1H podemos observar que las señales y desplazamientos de los protones del bencimidazol son constantes (H4, H5 y H7), ya que en este anillo el metilo en la posición cinco permanece constante en los tres intermediarios. En el caso de las señales y desplazamientos de los protones del anillo de piridina, dependerán de los sustituyentes incluidos sobre este anillo. Asimismo, observamos como señales y desplazamientos constantes a los protones del metilo del bencimidazol, los cuales mostraron una señal

entre 2.23 y 2.45 ppm, mientras que la señal para el metileno se encontró en 4.35 ppm para los tres compuestos.

De igual forma, en el caso de RMN ^{13}C encontramos señales constantes que corresponden a los carbonos del bencimidazol, metilo y metileno, mientras que las señales de carbono para el anillo de piridina también van a depender de los sustituyentes del anillo.

Una vez que nos aseguramos de la pureza de los compuestos sintetizados, se procedió a realizar los experimentos para estudiar su efecto sobre la GITIM. Para probar los compuestos, primero se hizo un screening tanto de los intermediarios como de los compuestos finales a una concentración fija, obteniéndose resultados de inactivación sólo para los compuestos finales, 50% de actividad residual con **BHO-3** y 28% para **BHO-2** a las concentraciones probadas. Estos resultados indican que el grupo sulfóxido es importante para la reactividad de la molécula y su capacidad inactivante en la GITIM. Esto probablemente se deba a que el grupo sulfóxido es una especie con mayor reactividad comparada con un grupo tioéter. Aunque el sulfóxido posiblemente no tiene actividad intrínseca con el azufre de la cisteína presente en la enzima, se ha postulado que bajo ligeras condiciones ácidas el sulfóxido se rearregla a una especie activa denominada ácido sulfénico. Esta especie activa es de naturaleza tiofílica y es la que se une covalentemente al grupo tiol de los residuos de cisteína generando enlaces disulfuro, causando la inactivación de la ATPasa, el mecanismo de reacción se puede observar en la figura 21, (Jain et al. 2007).

En esta propuesta, la especie activa es tiofílica uniéndose covalentemente al grupo tiol del residuo de cisteína generando un enlace disulfuro con la enzima, causando así su inactivación. La formación del intermediario "espiro" (figura 15, estructura 8) que es el compuesto bicíclico formado por la generación de un anillo conectado a través de un carbono cuaternario, se genera mediante una transposición de tipo smiles, que es la reacción intramolecular entre el átomo de nitrógeno de la piridina y el carbono del bencimidazol para formar un nuevo anillo como se muestra en la figura 15.

Posteriormente, hay un equilibrio donde se rompe un enlace S-C, abriéndose nuevamente el anillo donde se genera el ácido sulfénico.

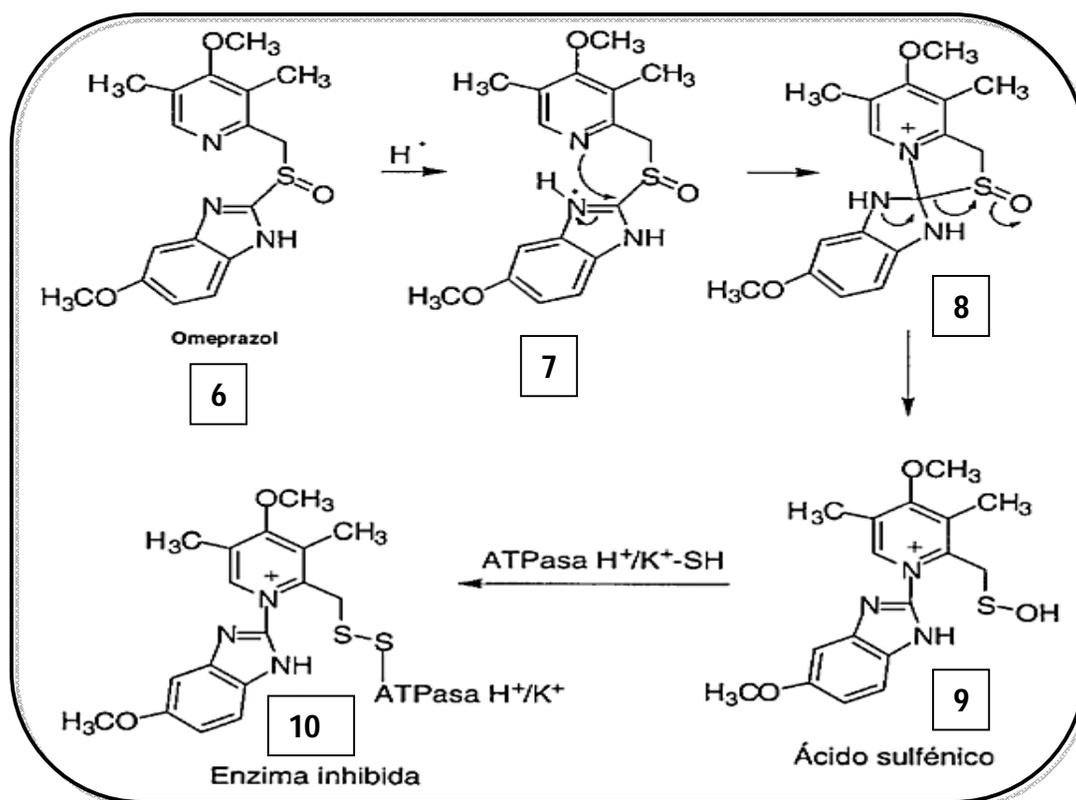


Figura 21. Mecanismo de transformación ácida de los derivados del tipo 2-(2-piridilmetil)sulfinil]benzimidazol. Como primer paso, en el ambiente ácido el anillo de piridina se protona para generar un intermediario. Posteriormente, por medio de un rearrreglo químico se genera el ácido sulfénico siendo este último el inhibidor de la enzima.

Al no observar actividad inactivante de los intermediarios sobre GITIM, se encuentra que el grupo sulfóxido desempeña un papel importante sobre la reactividad de la molécula. De esta manera, pensamos que probablemente los intermediarios sólo se quedan en los primeros pasos de la reacción, donde se protona la piridina permitiendo la formación del anillo intramolecular; sin embargo, al no estar presente el oxígeno la reacción ya no continúa al equilibrio donde se rompe el enlace S-C. Consecuentemente, no se genera la sulfenamida, especie activa que es el inhibidor de la enzima.

Con los compuestos sintetizados logramos obtener valores de IC_{50} menores al del omeprazol, con lo que se observa que los sustituyentes sobre el templado de éste último tienen efectos importantes sobre la inactivación de la enzima. El compuesto **BHO-3** mostró una potencia 2.2 veces mayor que el omeprazol; sin embargo, **BHO-2** mostró el mejor resultado siendo 3.5 veces más potente que el omeprazol para inactivar a la GITIM. El compuesto **BHO-1**, el cual no tiene sustituyentes sobre el anillo de piridina, sólo logró una inactivación del 20 % a la concentración más alta.

La diferencia entre el omeprazol y **BHO-2** es que éste último posee un metilo en lugar de un metoxilo en la posición 5 del anillo del bencimidazol, lo que hace pensar que la introducción de grupos pequeños y no polares en dicha posición sobre el anillo mejora la actividad del compuesto sobre la GITIM.

A pesar de que **BHO-3** también posee un grupo metilo en la posición 5 en el anillo de bencimidazol y que de igual forma mostró una mejoría en la capacidad de inactivación, hay una diferencia extra sobre el anillo de piridina comparándolo con el omeprazol. **BHO-3** posee un grupo trifluoroetoxilo en la posición 4 del anillo a diferencia del omeprazol que tiene un etoxilo. Aparentemente la presencia de un sustituyente de mayor volumen junto con el reemplazo de los átomos de hidrógeno por átomos de halógeno, en el caso de los fluor no fueron adecuados para inactivar a la GITIM.

Los resultados de inactivación se corroboraron al calcular las constantes de segundo orden. Se confirmó que **BHO-2** resultó ser el mejor compuesto, pues mostró una velocidad de inactivación del 10% cada minuto a una concentración de 1 mM. En comparación, el omeprazol inactivó a la GITIM a la mitad de la velocidad del **BHO-2**. En este sentido, también podría estar influyendo la constante de velocidad para la formación del intermediario "spiro" en el mecanismo de reacción de estos compuestos, ya que su constante de velocidad para el omeprazol y sus análogos depende de los sustituyentes en el anillo de piridina.

En el presente trabajo, se propuso la síntesis de análogos al omeprazol con la intención de mejorar la capacidad de inactivación de la GITIM, demostrándose que fue posible alcanzar dicho objetivo, además de que la inactivación es especie-específica, con un efecto deletéreo cuando la Cys 222 es modificada por los compuestos. La inactivación depende de las características estructurales de los compuestos, encontrándose que es importante la introducción de un grupo no polar pequeño en la posición 5 del anillo de bencimidazol, lográndose obtener una IC_{50} de 64 μ M siendo 3.5 veces más potente que el omeprazol.

Los resultados obtenidos muestran que al adicionar un exceso de DTT a la reacción de inactivación, en ningún caso se recuperó la actividad de la enzima, pues una vez agregado el agente reductor, la actividad de la enzima prácticamente queda en el porcentaje de inactivación alcanzada en ese tiempo. Este comportamiento se obtuvo a pesar de que el DTT actúa reduciendo los posibles enlaces disulfuro formados entre los grupos tioles de los residuos de cisteína y los compuestos, ya que se utilizó el agente reductor en exceso para conducir el equilibrio hacia la ruptura de los enlaces y liberar a la enzima de los agentes inactivantes. Al ser el DTT un agente reductor, consideramos que su adición a la enzima derivatizada liberaría a los compuestos de la enzima. Sin embargo, al realizar la cuantificación de cisteínas después de exponer a la enzima con los compuestos, se encontró que se tenían dos cisteínas libres; posteriormente, al incubar esta misma enzima con DTT y volver a cuantificar las cisteínas, descubrimos que se tenía el mismo número de cisteínas libres. Estos datos indicaron que no se liberaron los compuestos unidos a los residuos de cisteína que fueron modificados. Aún desconocemos cuáles la parte de la molécula que se está uniendo a la enzima, sin embargo, estos resultados sugieren que se está generando otro tipo de enlace diferente a un puente disulfuro. En este sentido, Wha Bin Im y colaboradores proponen dos mecanismos de acción del omeprazol, uno en pH ácido y otro en pH neutro, examinan la reactividad química del omeprazol con etilmercaptano en ausencia y presencia de 2 M de HCl. Bajo condiciones ácidas, se identifica la formación de un nuevo compuesto que se encuentra como una mezcla de isómeros (compuesto IA), siendo el N-1, C-2 y N-3 sitios de

sustitución para el grupo mercaptilo (Figura 22) (Im et al. 1985). Si se formara este tipo de enlace entre los compuestos y la cisteínas de la GITIM, entonces el DTT es incapaz de liberar a los compuestos.

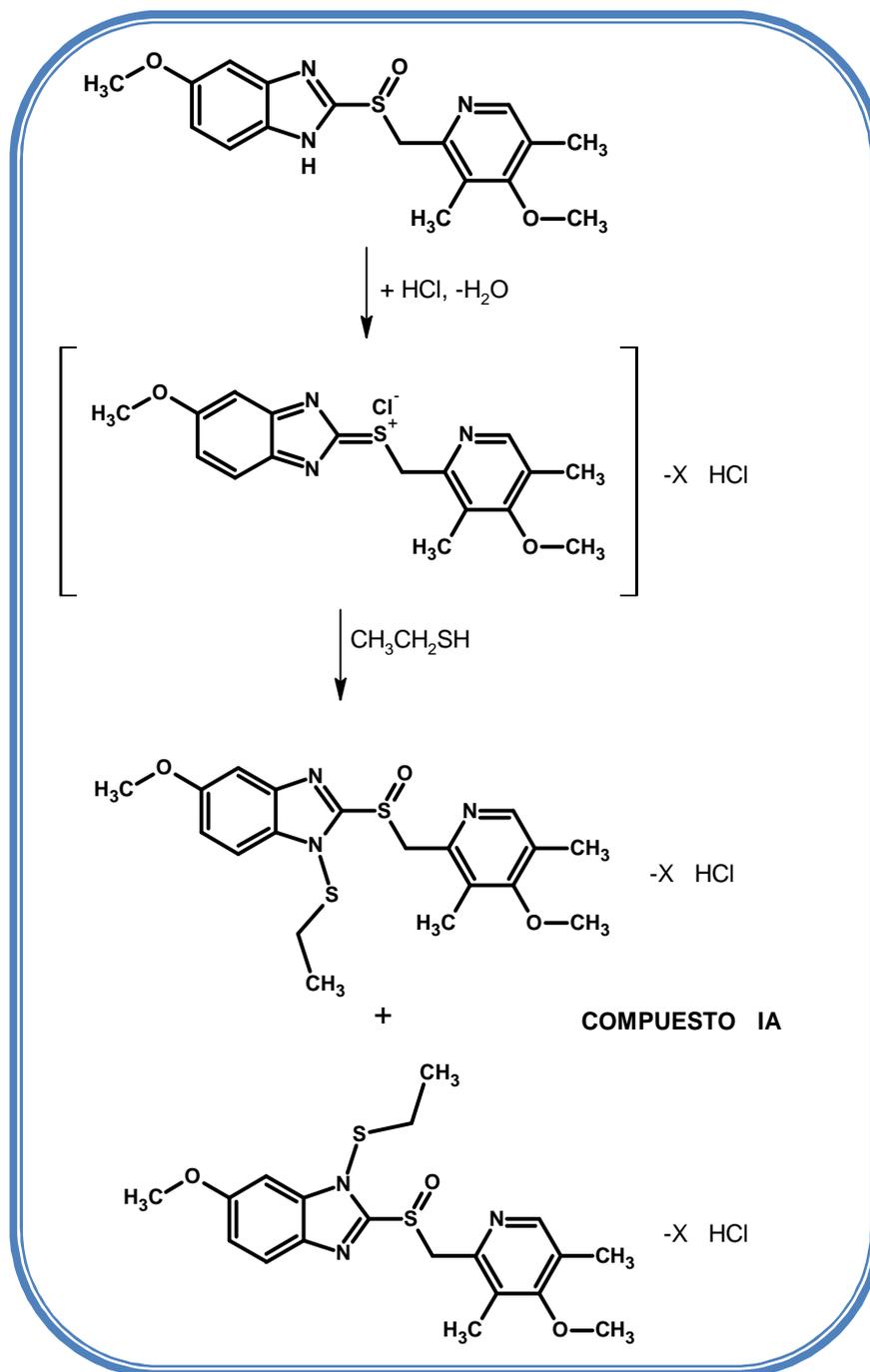


Figura 22. Reacción del omeprazol con etilmercaptano en pH ácido.

El mecanismo que se ha propuesto en un medio neutro, indica que la molécula del omeprazol se rompe, para generar un enlace carbono azufre entre el C-2 del anillo de bencimidazol y el azufre de la enzima, generando la especie que se observa en la figura 23. De manera similar, este tipo de enlace propuesto que se forma no lo eliminaría el DTT.

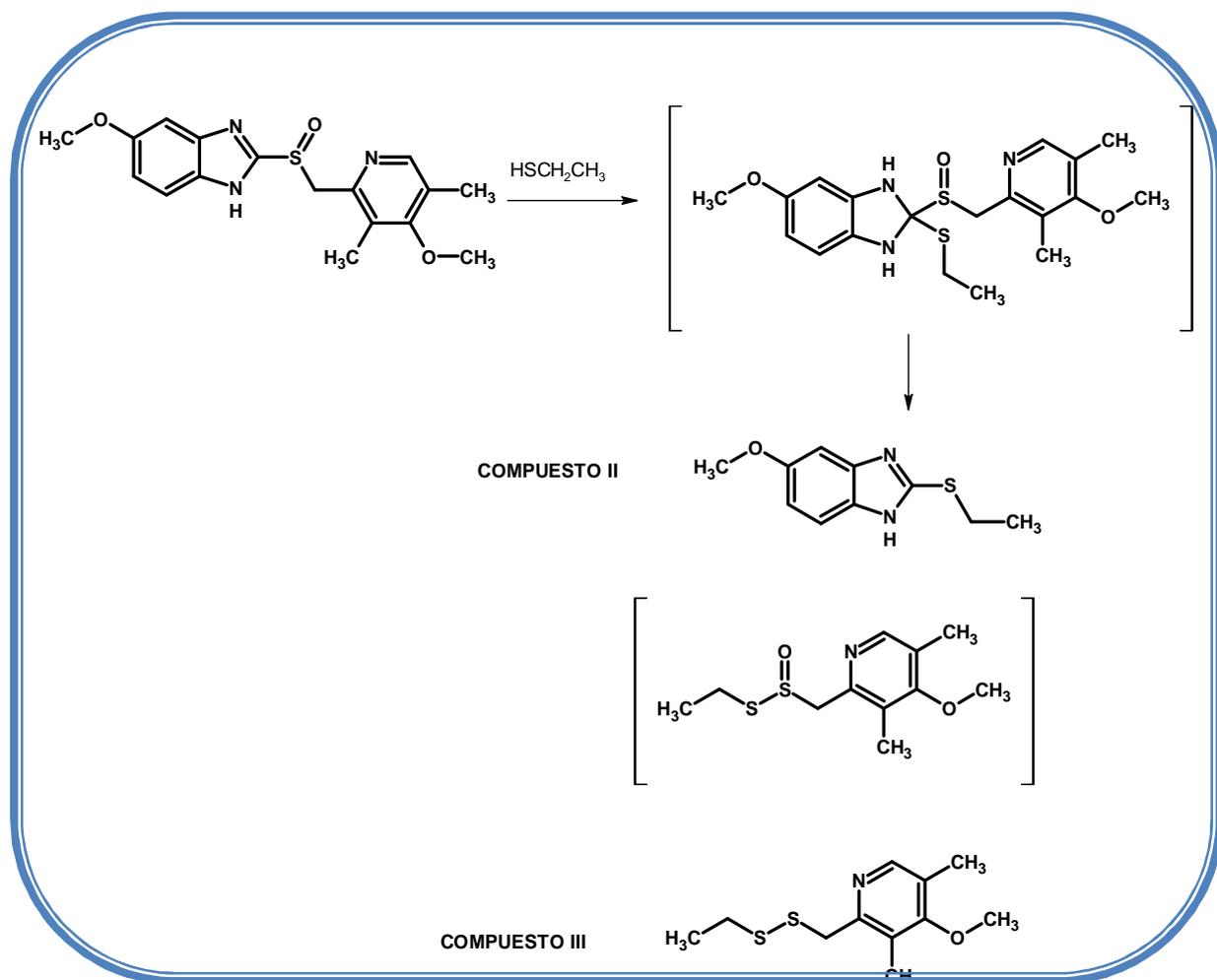


Figura 23. Reacción del omeprazol con etilmercapano en pH neutro.

La inactivación de la GITIM con el omeprazol y los análogos sintetizados no afectan la estructura secundaria ni producen la disociación del dímero. Sin embargo, la modificación de las cisteínas disminuye la estabilidad térmica de la enzima en 2 °C cuando es expuesta a Omeprazol y a los compuestos **BHO-2** y **BHO-3**. En conjunto, estos datos indican que no existe evidencia de modificaciones estructurales en la enzima derivatizada, que la perturbación que se realiza es únicamente local.

7. CONCLUSIONES

En este estudio se describe la síntesis de análogos al omeprazol y los cambios estructurales que se realizaron para lograr una mayor inactivación sobre la enzima de GITIM, la inactivación depende de las características estructurales de los compuestos, encontrándose que es importante la introducción de un grupo no polar pequeño en la posición cinco del anillo de bencimidazol, lográndose obtener un compuesto 3.5 veces más activo, con un valor de IC_{50} menor al que se obtiene con el omeprazol.

La enzima sufre alteraciones locales que no le permiten recuperar su actividad.

Es importante continuar con el estudio para dilucidar el mecanismo por el cual los compuestos están inactivando a la enzima, pues los mecanismos propuestos para la bomba de protones son en medios fuertemente ácidos, no estamos seguros de que este mecanismo sea el mismo en la GITIM pues al realizar los experimentos de reversibilidad se encontró que el aducto no es liberado de las cisteínas, probablemente porque lo que se forma no es un enlace disulfuro.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adam, R.D., 2001. Biology of Giardia lamblia. *Clinical microbiology reviews*, 14(3), pp.447–469.
- Ag, B. & Gre, C.E.D., 2013. & 1 / 7. *Design*, pp.1–7.
- Ali, S. a & Hill, D.R., 2003a. Giardia intestinalis. *Curr Opin Infect Dis*, 16(5), pp.453–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14501998>.
- Bouzid, M., Steverding, D. & Tyler, K.M., 2008. Detection and surveillance of waterborne protozoan parasites. *Current Opinion in Biotechnology*.
- Busatti, H.G., Santos, J.F. & Gomes, M. a, 2009. The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: Where are we? *Biologics targets therapy*, 3, pp.273–287. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2726062&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cáceres, A.J., Michels, P.A.M. & Hannaert, V., 2010. Genetic validation of aldolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as drug targets in Trypanosoma brucei. *Molecular and Biochemical Parasitology*.
- Cordero Bernabé, R. et al., 2014. Amebiasis, giardiasis y tricomoniasis. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(54), pp.3181–3193. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304541214707577>
- Edwards, M.R. et al., 1992. Arginine metabolism during culture of Giardia intestinalis. *Molecular and Biochemical Parasitology*.
- Ellman, G.L., 1958. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.
- Enriquez-Flores, S. et al., 2008b. Species-specific inhibition of Giardia lamblia triosephosphate isomerase by localized perturbation of the homodimer. *Molecular and ...*, 157(2), pp.179–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077010> \n <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685107003064>.
- Enriquez-Flores, S. et al., 2011. Determining the molecular mechanism of inactivation by chemical modification of triosephosphate isomerase from the human parasite Giardia lamblia: A study for antiparasitic drug design. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 79(9), pp.2711–2724.
- Fox, L.M. & Saravolatz, L.D., 2005. Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent. *Clinical infectious diseases*, 40, pp.1173–1180.
- Gardner, T.B. & Hill, D.R., 2001. Treatment of Giardiasis. , 14(1), pp.114–128.
- Garza-Ramos, G. et al., 1996. Species-Specific Inhibition of Homologous Enzymes by

- Modification of Nonconserved Amino Acids Residues. The cysteine residues of triosephosphate isomerase. *European Journal of Biochemistry*, 241(1), pp.114–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8898895> \n <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-1033.1996.0114t.x>.
- Garza-Ramos, G. et al., 1998. Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity. *European Journal of Biochemistry*, 253(3), pp.684–691. Available at: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2530684.x>.
- Gilles, H.M. & Hoffman, P.S., 2002. Treatment of intestinal parasitic infections: a review of nitazoxanide. *Trends in Parasitology*, 18(3), pp.95–97. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147149220102205X>.
- Gómez-Puyou, a et al., 1995. Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action--studies with triosephosphate isomerase. *Chemistry & biology*, 2, pp.847–855.
- Hardy, R.W. et al., 2002. Letter to the Editor: The effects of hyperlipidaemia, hyperbilirubinaemia and haemolysis on tests performed by the Olympus AU 5000 multiple analyser. *The Journal of automatic chemistry*, 32(2), pp.229–231. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2547791&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hawrelak, J., 2003. Giardiasis : Pathophysiology and Management. , 8(2).
- Hernández-Alcántara, G. et al., 2013. Structural and Functional Perturbation of Giardia lamblia Triosephosphate Isomerase by Modification of a Non-Catalytic, Non-Conserved Region. *PLoS ONE*, 8(7), p.e69031. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3718800&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Im, W. Bin et al., 1985. Omeprazole , a Specific Inhibitor of Gastric (H⁺ -K⁺) -ATPase , Is a H⁺ -activated Oxidizing Agent of Sulfhydryl Groups *. *The Journal of biological chemistry*, 260(8), pp.4591–4597.
- Jain, K.S. et al., 2007. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(3), pp.1181–1205.
- Katiyar, S.K. et al., 1994. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with ??- tubulin sequence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(9), pp.2086–2090.
- Kazimierczuk, Z. et al., 2002. Synthesis, antiprotozoal and antibacterial activity of nitro- and halogeno-substituted benzimidazole derivatives. *Acta biochimica Polonica*, 49(1), pp.185–195.
- Kessler, P.S. & Parsons, M., 2005. Probing the role of compartmentation of glycolysis in procyclic form Trypanosoma brucei: RNA interference studies of PEX14, hexokinase,

- and phosphofructokinase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), pp.9030–9036.
- Lamp, K.C. et al., 1999. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials. *Clinical Pharmacokinetics*, 36(5), pp.353–373.
- Lau, A.H. et al., 2012. Clinical Pharmacokinetics of Metronidazole and Other Nitroimidazole Anti-Infectives. *Clinical Pharmacokinetics*, 23(5), pp.328–364. Available at: <http://dx.doi.org/10.2165/00003088-199223050-00002>.
- Leitsch, D. et al., 2011. Pyruvate: Ferredoxin oxidoreductase and thioredoxin reductase are involved in 5-nitroimidazole activation while flavin metabolism is linked to 5-nitroimidazole resistance in *Giardia lamblia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(8), pp.1756–1765.
- Lindmark, D.G. & Mueller, M., 1976. Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 10(3), pp.476–482.
- López-Velázquez, G. et al., 2004. An unusual triosephosphate isomerase from the early divergent eukaryote *Giardia lamblia*. *Proteins: Structure, Function and Genetics*.
- Lujan, H.D., 2011. Mechanisms of adaptation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Essays Biochem*, 51, pp.177–191.
- Maharvi, G.M., Bharucha, A.E. & Fauq, A.H., 2013. Synthesis of a DOTA (Gd³⁺)-conjugate of proton-pump inhibitor pantoprazole for gastric wall imaging studies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(9), pp.2808–2811. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.06.051>.
- Maithal, K. et al., 2002. Inhibition of *Plasmodium falciparum* triose-phosphate isomerase by chemical modification of an interface cysteine: Electrospray ionization mass spectrometric analysis of differential cysteine reactivities. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), pp.25106–25114.
- Navarrete-Vázquez, G. et al., 2003. Synthesis and antiparasitic activity of Albendazole and Mebendazole analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*.
- Olivares-Illana, V. et al., 2006. Structural differences in triosephosphate isomerase from different species and discovery of a multitypanosomatid inhibitor. *Biochemistry*, 45(8), pp.2556–2560.
- Penefsky, H., 1977. 1976-Penefsky-Reversible Binding of Pi by Beef Heart Mitochondrial. *The journal of biological chemistry*, 252(2), pp.2891–2899.
- Pérez-Montfort, R. et al., 1999. Derivatization of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface. *Biochemistry*.
- Pérez-Villanueva, J., Romo-Mancillas, A., et al., 2011. Antiprotozoal activity of proton-pump inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*.

- Pérez-Villanueva, J., Medina-Franco, J.L., et al., 2011. Comparative molecular field analysis (CoMFA) and comparative molecular similarity indices analysis (CoMSIA) of some benzimidazole derivatives with trichomonocidal activity. *European journal of medicinal chemistry*, 46(8), pp.3499–508. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523411003783>.
- Plutzer, J., Ongerth, J. & Karanis, P., 2010. Giardia taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International journal of hygiene and environmental health*, 213(5), pp.321–33. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S143846391000082>.
- Reyes-Vivas, H. et al., 2014. Giardial triosephosphate isomerase as possible target of the cytotoxic effect of omeprazole in Giardia lamblia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(12), pp.7072–7082.
- Shaharyar, M. et al., 2011. Synthesis, characterization and pharmacological screening of novel benzimidazole derivatives. *Arabian Journal of Chemistry*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535211001183>.
- Smith, H. V. et al., 2006. Tools for investigating the environmental transmission of Cryptosporidium and Giardia infections in humans. *Trends in Parasitology*.
- Soria-Arteche, O. et al., 2005. Studies on the Selective S-oxidation of Albendazole , Fenbendazole , Triclabendazole , and Other Benzimidazole Sulfides. *Reactions*, 49(4), pp.353–358. Available at: <http://www.jmcs.org.mx/OLD/PDFS/V49/N4/08-Arteche.pdf>.
- Stadelmann, B. et al., 2013. The role of arginine and arginine-metabolizing enzymes during Giardia - host cell interactions in vitro. *BMC microbiology*, 13, p.256. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4225669&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Stroppolo, M.E. et al., 2001. Superefficient enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(10), pp.1451–1460. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/PL00000788>.
- Tovar, J. et al., 2003. Mitochondrial remnant organelles of Giardia function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*, 426(6963), pp.172–176.
- Upcroft, P., 1998. Drug resistance in Giardia: clinical versus laboratory isolates. *Drug Resistance Updates*.
- Upcroft, P. & Upcroft, J. a, 2001. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. *Clin Microbiol Rev*, 14(1), pp.150–164.
- Valdez, J. et al., 2002. Synthesis and antiparasitic activity of 1H-benzimidazole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 12(16), pp.2221–2224. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X02003463>.
- Venkatesan, P., 1998. Albendazole. , pp.145–147.

- Watkins, R.R. & Eckmann, L., 2014. Treatment of giardiasis: current status and future directions. *Current infectious disease reports*, 16(2), p.396. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24493628>. 70
- Yan, Y. et al., 2011. A reverse method for diversity introduction of benzimidazole to synthesize H⁺/K⁺-ATP enzyme inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*.
- Yongguang, Z. et al., 2007. Deletion of the CgTPI gene encoding triose phosphate isomerase of *Candida glycerinogenes* inhibits the biosynthesis of glycerol. *Current Microbiology*.
- Zubillaga, R.A., Perezmontfort, R. & Gomezpuyou, A., 1994. Differential Inactivation of Rabbit and Yeast Triosephosphate Isomerase: Effect of Oxidations Produced by Chloramine-T. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 313(2), pp.328–336. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986184713956>.