



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**BÚSQUEDA Y EVALUACIÓN DE NUEVAS ESTRUCTURAS MOLECULARES  
CON POTENCIAL ACTIVIDAD GIARDICIDA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**Maestro en Ciencias**

PRESENTA:

**Q.F.B. JUAN CARLOS AURIOSTIGUE BAUTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

**DR. HORACIO REYES VIVAS**  
[Instituto Nacional de Pediatría](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO**  
[Instituto de Química, UNAM](#)

**DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO**  
[Facultad de Química, UNAM](#)

**Ciudad Universitaria, CD. MX. Septiembre, 2021**



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.

*El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Bioquímica-Genética del Instituto Nacional de Pediatría, bajo la dirección del Doctor Horacio Reyes Vivas; en colaboración con el Laboratorio de Parasitología Experimental del mismo instituto y con el Instituto de Química de la UNAM.*

*El autor de este escrito recibió una beca CONACYT para la realización de sus estudios de maestría, con número de becario 589503 y número de CVU 703301.*

*Los resultados de este trabajo fueron presentados en el XXXII Congreso Nacional de Bioquímica gracias al financiamiento otorgado por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM.*

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco al Dr. Horacio Reyes Vivas por su guía durante mis estudios de maestría. Has sido un excelente mentor y me has ayudado a seguir descubriendo mi vocación científica.*

*Gracias a la Dra. Martha Ponce Macotela y a la M. en C. Yadira Rufino González, miembros del Laboratorio de Parasitología Experimental del INP, por todas las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis.*

*Agradezco al Dr. Luis Demetrio Miranda Gutiérrez, del Instituto de Química de la UNAM, por la biblioteca de compuestos químicos brindada para la realización de este proyecto de investigación.*

*Gracias a la Dra. Adela Rodríguez Romero y al Dr. José de Jesús García Trejo por todos sus consejos y correcciones durante las evaluaciones tutorales.*

*A los miembros del Jurado: Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, Dr. Roberto José Rafael Hernández Fernández, Dra. Emma Cecilia Saavedra Lira, Dra. Laura Domínguez Dueñas, y Dr. José Guadalupe López Cortés, por la atenta revisión de esta tesis. Sus comentarios fueron de gran ayuda para enriquecer este escrito.*

*Gracias al CONACYT y al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM por el financiamiento para realizar mis estudios de maestría.*

*Madre y Padre, estoy en deuda infinita con ustedes por toda la ayuda incondicional y la confianza brindada para poder continuar con mis objetivos profesionales y personales.*

*A todos los integrantes del laboratorio de Bioquímica Genética del INP gracias por los momentos que compartimos juntos, por los consejos y las observaciones.*

*A la UNAM, por permitirme formar parte de su comunidad de estudiantes y darme las mejores herramientas para crecer en el ámbito científico, profesional y personal.*

# ÍNDICE GENERAL

<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO</b>	<b>4</b>
<b>3.1 Biología de <i>Giardia lamblia</i></b>	<b>4</b>
3.1.1 Morfología celular	4
3.1.2 Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i>	6
3.1.3 Metabolismo de <i>Giardia lamblia</i> y cultivo	8
<b>3.2 Terapia anti<i>giardi</i>ásica y sus limitaciones</b>	<b>10</b>
3.2.1 Fármacos anti <i>giardi</i> ásicos	10
3.2.2 Limitaciones de la terapia anti <i>giardi</i> ásica	13
<b>3.3 Búsqueda de nuevos fármacos anti<i>giardi</i>ásicos</b>	<b>15</b>
3.3.1 Estrategias para el descubrimiento de nuevos fármacos.	15
3.3.2 El cribado molecular como parte del desarrollo farmacológico	16
3.3.3 Nuevos compuestos con actividad anti <i>giardi</i> ásica	18
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>22</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b>	<b>22</b>
<b>6. OBJETIVO</b>	<b>23</b>
<b>7. MÉTODOS</b>	<b>24</b>
<b>7.1 Cribado farmacológico</b>	<b>24</b>
7.1.1 Biblioteca química	24
7.1.2 Parásitos y cultivo	26
7.1.3 Ensayo de microcitotoxicidad <i>in vitro</i>	27
<b>7.2 Confirmación de los hits</b>	<b>29</b>
<b>7.3 Evaluación de la actividad giardicida de los andamios identificados</b>	<b>29</b>
<b>7.4 Cálculo de los valores de IC50</b>	<b>29</b>
<b>7.5 Evaluación de la actividad citotóxica en células de mamífero</b>	<b>29</b>
7.5.1 Línea celular y cultivo	30
7.5.2 Montaje del ensayo	30
<b>7.6 Estudios morfológicos sobre el trofozoito de <i>Giardia lamblia</i></b>	<b>31</b>
7.6.1 Microscopía óptica de campo claro	31
7.6.2 Microscopía electrónica de transmisión	31
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>33</b>
<b>8.1 Cribado molecular primario</b>	<b>33</b>

8.2	Validación de la actividad giardicida de los andamios identificados.	36
8.3	El andamio benzopirrolizidinico como punto de inicio para el desarrollo de nuevos fármacos anti giardiásicos	38
8.4	Estudio del mecanismo de acción de los hits.	43
9.	<b>CONCLUSIÓN</b>	55
10.	<b>PERSPECTIVAS</b>	56
11.	<b>REFERENCIAS</b>	57

## 1. RESUMEN

El protozoo flagelado *Giardia lamblia* (también conocido como *G. intestinalis* o *G. duodenalis*) es uno de los principales parásitos que afectan el tracto gastrointestinal del hombre, alrededor del mundo. Este organismo es el agente causal de la giardiasis, una enfermedad diarreica con amplias manifestaciones clínicas que afecta principalmente a niños, personas desnutridas e inmunosuprimidas. Las terapias farmacológicas con las que actualmente se cuenta, incluyen la utilización de nitroimidazoles, nitrotiazoles, nitrofuranos y benzimidazoles. Sin embargo, la acción limitada y los efectos adversos de estos compuestos, así como la resistencia emergente por parte del parásito hacia la acción de estos medicamentos, generan la necesidad de desarrollar nuevas clases de fármacos anti-giardíacos a través del diseño de moléculas activas novedosas y del descubrimiento de nuevos blancos farmacológicos.

Debido a lo anterior, el presente estudio se centró en el descubrimiento de nuevas estructuras moleculares con actividad giardicida, que fueran totalmente diferentes de los fármacos actualmente aprobados y comercializados, siguiendo el enfoque del cribado farmacológico de bibliotecas químicas de diversidad. A través de la utilización de un ensayo de microcitotoxicidad *in vitro* sobre trofozoítos de *G. lamblia* cepa WB se identificaron tres nuevos andamios moleculares con actividad giardicida, cuya actividad antiparasitaria no ha sido reportada previamente. De entre estos compuestos, los derivados benzopirrolizidínicos fueron los que mostraron la mejor actividad giardicida, al presentar actividades citotóxicas sobre trofozoítos del parásito muy cercanas a los valores para el metronidazol y el tinidazol, dos fármacos ampliamente utilizados para tratar esta parasitosis. Además presentaron una baja citotoxicidad en células de mamífero. Se observó que estos compuestos causan alteraciones estructurales en el parásito a nivel citoplasmático y nuclear, cambios totalmente diferentes a los ocasionados por los fármacos ya comercializados u otras moléculas antiparasitarias que actualmente se encuentran en estudio. En conjunto estos resultados permiten plantear la posibilidad de utilizar el andamio benzopirrolizidínico como punto de inicio para el desarrollo de nuevos agentes anti-giardíacos.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las parasitosis intestinales causantes de enfermedades diarreicas constituyen uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo. Dentro de estas enfermedades encontramos a la giardiasis; una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita con alta prevalencia en países en desarrollo, que se encuentra categorizada dentro del grupo de las enfermedades desatendidas por la OMS (Savioli et al., 2006). A nivel mundial se estima que se presentan 280 millones casos anualmente; siendo los niños, los ancianos y las personas inmunosuprimidas los más afectados (Lane and Lloyd, 2002). En México la frecuencia de la giardiasis es muy variable con tasas que van del 2% al 39%. Los últimos reportes indican que la incidencia promedio de esta enfermedad fue del 12.9% durante el periodo comprendido entre 2011-2015, y que el mayor número de casos se presentó en los niños de entre 1 y 12 años de edad (Ibáñez-Cervantes et al., 2018).

El agente causal de esta parasitosis es el protozooario flagelado *Giardia lamblia*, también conocido como *Giardia intestinalis* o *Giardia duodenalis*, el cual es uno de los principales parásitos intestinales que afecta al hombre. Antonie van Leeuwenhoek fue el primero en identificar al parásito en sus propias heces diarreicas en 1681, sin embargo, no fue hasta 1981 cuando el protozooario fue reconocido oficialmente por la Organización Mundial de la Salud como un microorganismo patógeno (Bartelt & Sartor, 2015).

La giardiasis presenta una amplia variedad de manifestaciones clínicas y puede ir desde una infección gastrointestinal aguda, hasta un estado de portador asintomático. Los síntomas típicos de la infección aguda se presentan de 1 a 2 semanas posteriores a la ingestión del parásito y estos se caracterizan por náuseas, anorexia, diarrea, deposiciones grasosas, flatulencias, dolor abdominal y malestar en general. La infección aguda tiende a auto-limitarse por sí misma, sin embargo puede volverse crónica, en cuyo caso se presentan diarreas intermitentes, anorexia, síndrome de malabsorción y pérdida de masa corporal; teniendo esto un remarcado



impacto en el desarrollo físico e intelectual-cognitivo de los niños en crecimiento (Bartelt & Sartor, 2015; Wolfe, 1992).

El repertorio de medicamentos que existe hoy en día para tratar esta enfermedad es bastante amplio; no obstante, la mayoría de estos fármacos presentan actividad anti giardiásica limitada y efectos secundarios que restringen su uso. Además, se ha observado una resistencia emergente hacia la acción de estos medicamentos por parte del parásito, que ha traído como consecuencia fallas en los tratamientos. Todo esto ha conllevado a que actualmente se estén buscando nuevos blancos terapéuticos y se estén diseñando nuevas moléculas antiparasitarias para combatir a este microorganismo (Gardner & Hill, 2001).

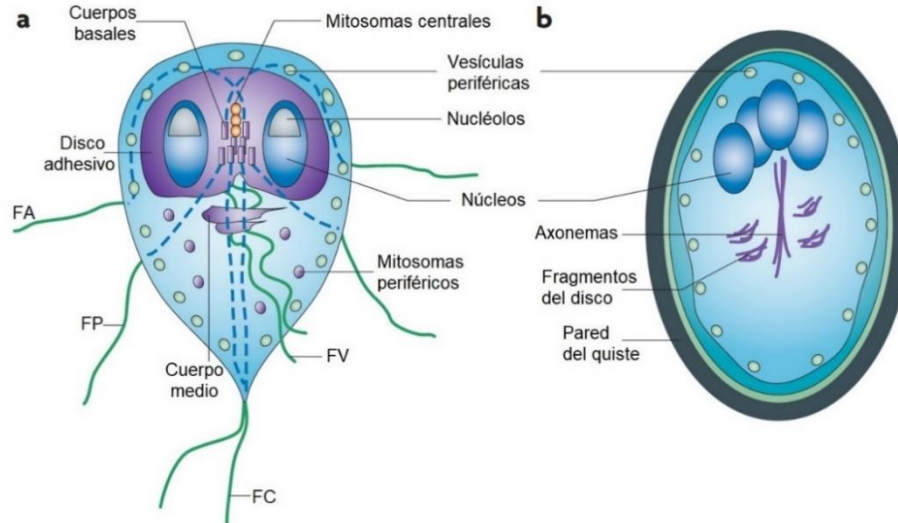
En los últimos años, el laboratorio de Bioquímica-Genética del Instituto Nacional de Pediatría, se ha sumado a la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos y nuevas moléculas con actividad anti giardiásica. Las investigaciones realizadas hasta el momento han seguido el enfoque del diseño racional de fármacos en conjunto con el reposicionamiento farmacológico. Como resultado, se ha demostrado que el omeprazol (inhibidor de la bomba de protones gástrica) y el disulfiram (inhibidor de la acetaldéhidó deshidrogenasa) presentan actividad giardicida. Datos de nuestro laboratorio sugieren que uno de los mecanismos antiparasitarios de estas moléculas podría ser a través de la inactivación de la triosafosfato isomerasa del parásito *Giardia lamblia* (GITIM), la cual es una enzima que participa en la vía de la glucólisis (Castillo-Villanueva et al., 2017; Hernández-Ochoa et al., 2017). Los resultados obtenidos de estas investigaciones nos han alentado a hacer uso de nuevas estrategias para identificar y evaluar estructuras moleculares novedosas con potencial actividad giardicida.

## 3. MARCO TEÓRICO

### 3.1 Biología de *Giardia lamblia*

#### 3.1.1 Morfología celular

*Giardia lamblia* el agente causal de la giardiasis, es un protozoo perteneciente al grupo filogenético de los diplomonádidos, los cuales se caracterizan por ser organismos unicelulares binucleados que poseen ocho flagelos. Además, a pesar de ser un organismo que posee núcleos delimitados por una doble membrana nuclear, un citoesqueleto y un sistema endomembranoso, carece de organelos que universalmente se encuentran en los organismos eucariontes como peroxisomas, mitocondrias o un sistema de Golgi bien definido. Así mismo, *Giardia* presenta dos estadios en su ciclo de vida: el trofozoíto, que es la forma vegetativa que parasita el intestino del hospedero, y el quiste que es la forma infectante (Figura 1) (Adam, 2001).



**Figura 1. Morfología celular de *Giardia lamblia*.** a) **Trofozoíto.** Trofozoíto visto desde el lado central. La forma vegetativa del parásito tiene 4 pares de flagelos: FA (flagelos anteriores), FP (Flagelos Posteriores), FV (flagelos ventrales), FC (Flagelos caudales); las líneas punteadas indican estructuras internas. La célula posee varias vesículas periféricas que son parecidas a lisosomas y que se encuentran debajo de la membrana plasmática. b) **Quiste.** El quiste de *G. lamblia* se caracteriza por poseer una pared altamente resistente al medio ambiente, cuatro núcleos, vesículas periféricas y diversas estructuras que forman parte del citoesqueleto celular. Imagen tomada de (Ankarklev et al., 2010).

Los trofozoítos de *G. lamblia* son periformes y miden aproximadamente de 12 a 15  $\mu\text{m}$  de largo por 5 a 9  $\mu\text{m}$  de ancho y de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de espesor. Poseen dos núcleos que son simétricos con respecto al eje longitudinal y un citoesqueleto complejo en el que figuran flagelos, un disco ventral y un cuerpo medio. Estas estructuras son importantes para el mantenimiento de la forma del parásito, para su movilidad y para la adherencia a las paredes intestinales del hospedero (Carranza & Lujan, 2010).

La forma vegetativa del parásito tiene cuatro pares de flagelos cuyos axonemas están constituidos por microtúbulos que presentan el típico arreglo “9+2” de los eucariontes, y que se originan en dos conjuntos de cuerpos basales localizados entre los dos núcleos celulares. Los flagelos emergen como pares bilaterales simétricos de las regiones anterior, posterior, ventral y caudal del trofozoíto (Dawson & House, 2010).

El disco ventral es una estructura celular única observable solamente en los miembros del género *Giardia*. Este cubre la mitad anterior de la región ventral del trofozoíto y le permite unirse fuertemente a las microvellosidades intestinales para llevar a cabo la colonización y evitar el flujo peristáltico (Elmendorf et al., 2003). El disco ventral está compuesto por un arreglo en espiral de microtúbulos paralelos que se encuentra rodeado por una estructura fibrilar llamada cresta lateral. En la parte central del disco ventral se encuentra el área desnuda, una región desprovista de microtúbulos pero que en su lugar se presentan numerosas vesículas (Schwartz et al., 2012).

El cuerpo medio de *Giardia* es la estructura menos definida del citoesqueleto y su función no está bien establecida. Mediante microscopia electrónica se observa como un arreglo desordenado de microtúbulos posteriores a los dos núcleos. La morfología del cuerpo medio es importante para diferenciar las distintas especies de *Giardias*; específicamente, los trofozoítos de *G. lamblia* se caracterizan por poseer dos cuerpos medios alargados e inclinados sobre los flagelos caudales (Elmendorf et al., 2003), que le confieren al parásito la apariencia de estar sonriendo cuando se tiñen con Giemsa (Ankarklev et al., 2010).

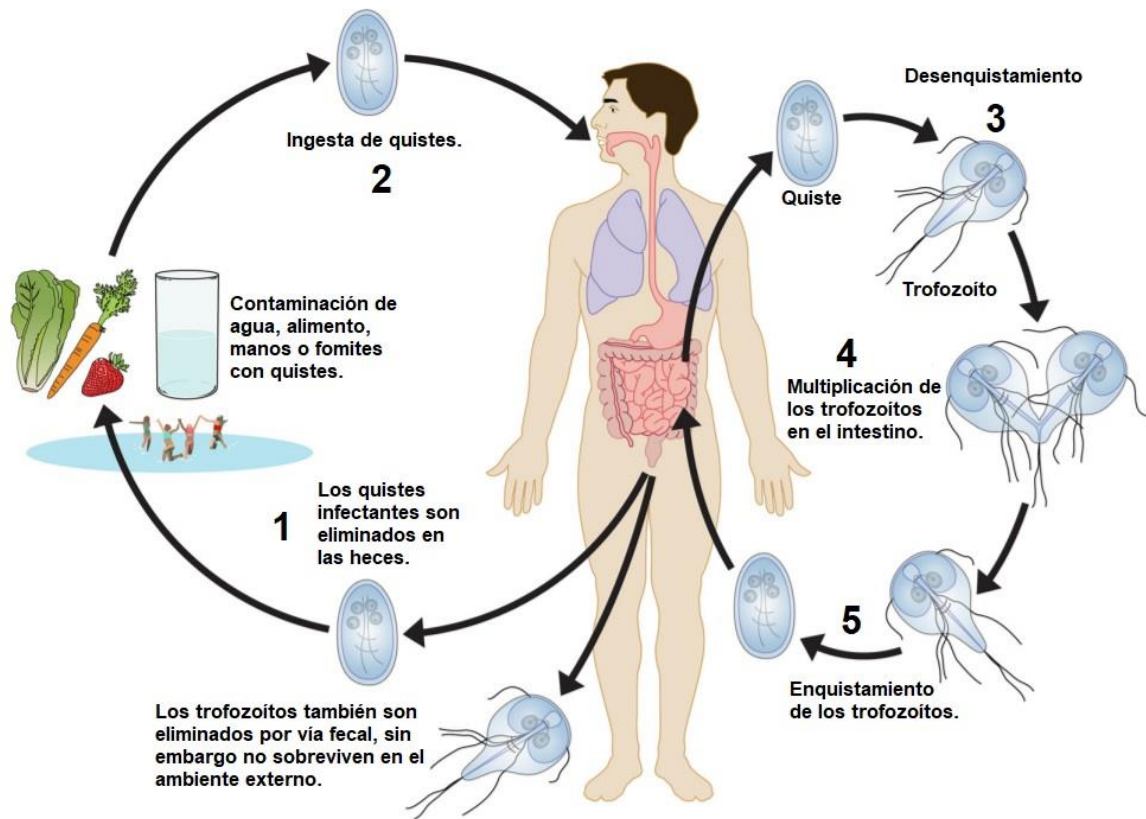
Los quistes de *G. lamblia* tienen forma ovalada, con un tamaño promedio que va de 6  $\mu\text{m}$  de ancho por 10  $\mu\text{m}$  de largo. La pared del quiste tiene un espesor que varía entre 0.3 a 0.5  $\mu\text{m}$  y está constituida por una capa filamentosa externa y una capa interna formada por dos membranas. A nivel ultraestructural, el quiste maduro contiene dos o cuatro núcleos dependiendo de su estado de maduración, generalmente orientados hacia un mismo extremo, flagelos contraídos y fragmentos del disco ventral (Carranza & Lujan, 2010). El quiste es altamente resistente al medio ambiente y puede sobrevivir a concentraciones estándares de cloro usadas para potabilizar el agua (Wolfe, 1992).

### 3.1.2 Ciclo de vida de *Giardia lamblia*

La infección de un hospedero se inicia cuando los quistes del parásito son ingeridos a través del consumo de agua o alimento contaminado. La dosis infecciosa de *G. lamblia* es bastante baja ya que para que un humano se infecte sólo basta con que ingiera 10 quistes (Esch & Petersen, 2013). Después de la exposición al ambiente ácido del estómago y facilitado por la acción de las proteasas pancreáticas, se libera cerca del intestino delgado un excizoito por cada quiste maduro, el cual tras dos divisiones celulares consecutivas (sin replicación de DNA entre cada división) genera cuatro trofozoítos con dos núcleos diploides cada uno. Los exciziotos se diferencian de los trofozoítos por el hecho de que no presentan un disco ventral ensamblado y tienen cuatro núcleos tetraploides. Se ha encontrado que enzimas del tipo cisteín-proteasas liberadas a partir de las vesículas periféricas, tienen un papel importante en el proceso de desenquistamiento, ya que participan en la degradación la pared del quiste desde el interior (Ankarklev et al., 2010).

Los trofozoítos liberados colonizan el intestino delgado del hospedero, predominantemente en el duodeno y en el yeyuno medio, donde el pH alcalino es favorable para su crecimiento. Estos se adhieren a la pared del intestino, a través de sus discos de succión y flagelos, de donde obtienen los nutrientes necesarios para su desarrollo y proliferación. Una vez que los trofozoítos se instalan, se multiplican por fisión binaria a través de su plano longitudinal (Wolfe, 1992).

Finalmente, debido a la exposición a los fluidos biliares, a bajos niveles de colesterol y al pH alcalino, algunos de los trofozoítos forman quistes en el yeyuno y pasan hacia las heces, permitiendo de esta manera que se complete el ciclo de transmisión del parásito (Figura 2) (Ankarklev et al., 2010).



**Figura 2. Ciclo biológico de *Giardia lamblia*.** Los quistes son la forma infectante del parásito, estos se encuentran en las heces de personas infectadas (1). La infección de un nuevo hospedero se inicia por la ingestión de agua o alimento contaminado (2). En el intestino delgado cada quiste libera cuatro trofozoítos durante el proceso de desenquistamiento (3). Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria longitudinal y se adhieren a la pared intestinal a través de sus discos adhesivos (4). La enquistación del parásito ocurre durante el tránsito por el colon (5) y son eliminados a través de las heces (1); iniciándose así el ciclo nuevamente. Imagen tomada de (Esch & Petersen, 2013).

### 3.1.3 Metabolismo de *Giardia lamblia* y cultivo

A pesar de que se ha descrito que *Giardia* posee remanentes mitocondriales denominados mitosomas que participan en la maduración de proteínas que contienen centros de hierro-azufre (Tovar et al., 2003), carece como tal de mitocondrias y de cualquier componente relacionado con la fosforilación oxidativa. Esto restringe al parásito a tener un metabolismo de tipo anaerobio en donde las principales vías que utiliza para producir energía en forma de ATP son la glucólisis, y a través del metabolismo de los aminoácidos arginina y aspartato.

Como resultado de la vía glucolítica de *Giardia* se genera piruvato y ATP, este último por fosforilación a nivel de sustrato. Posteriormente, el piruvato es convertido a acetil coenzima A (acetil-CoA), por la piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR), para finalmente generar los productos acetato, etanol, alanina y CO<sub>2</sub>. El balance de estos productos finales obtenidos del metabolismo de la glucosa depende principalmente de la tensión de oxígeno y de la concentración de glucosa en el medio extracelular.

La obtención de energía a través de la arginina se lleva a cabo a través de la vía de la arginina dihidrolasa. En esta vía, la arginina es convertida a ornitina y amonio, con la generación de ATP por fosforilación a nivel de sustrato. La ornitina formada es subsecuentemente intercambiada por arginina extracelular a través de un transportador. El aspartato por otra parte, se metaboliza por una vía intermediaria en donde participa la aspartato transaminasa que lo transforma a oxalacetato, el cual es posteriormente metabolizado a malato para finalmente generar piruvato (Adam, 2001).

Los trofozoítos de *G. lamblia* no tienen la capacidad de sintetizar *de novo* ácidos grasos y colesterol, por lo que para satisfacer sus requerimientos los deben de obtener del entorno externo. También dependen de vías de recuperación para obtener nucleótidos del medio extracelular, ya que carecen de vías metabólicas para la síntesis de purinas y pirimidinas (Adam, 2001).

*Giardia lamblia* es un parásito que puede cultivarse axénicamente *in vitro* sin mayores complicaciones. El medio más utilizado para este propósito es el medio TYI-S-33 modificado, suplementado con suero fetal bovino al 10%. Los principales constituyentes de este medio son: digerido de caseína (tripticaseína), extracto de levadura, glucosa, una alta concentración del aminoácido L-cisteína y lípidos exógenos que son proporcionados a través del suero fetal bovino. Los trofozoítos son cultivados generalmente en tubos de borosilicato a 37 °C y en condiciones de baja tensión de oxígeno (Davids & Gillin, 2011); condiciones bajo las cuales los trofozoítos crecen adheridos a la superficie de los tubos hasta alcanzar una densidad de aproximadamente 1-2 millones de trofozoítos por mililitro de cultivo (Elmendorf et al., 2003).

## 3.2 Terapia anti giardiásica y sus limitaciones

### 3.2.1 Fármacos anti giardiásicos

El repertorio de fármacos anti giardiásicos aprobados con los que se cuenta actualmente es bastante amplio. Entre estos agentes quimioterapéuticos encontramos a los compuestos que contienen grupos nitro (como los nitroimidazoles, los nitrotiazoles y los nitrofuranos), a los benzimidazoles, la quinacrina, la paromomicina y la bacitracina (Figura 3) (Escobedo & Cimerman, 2007).

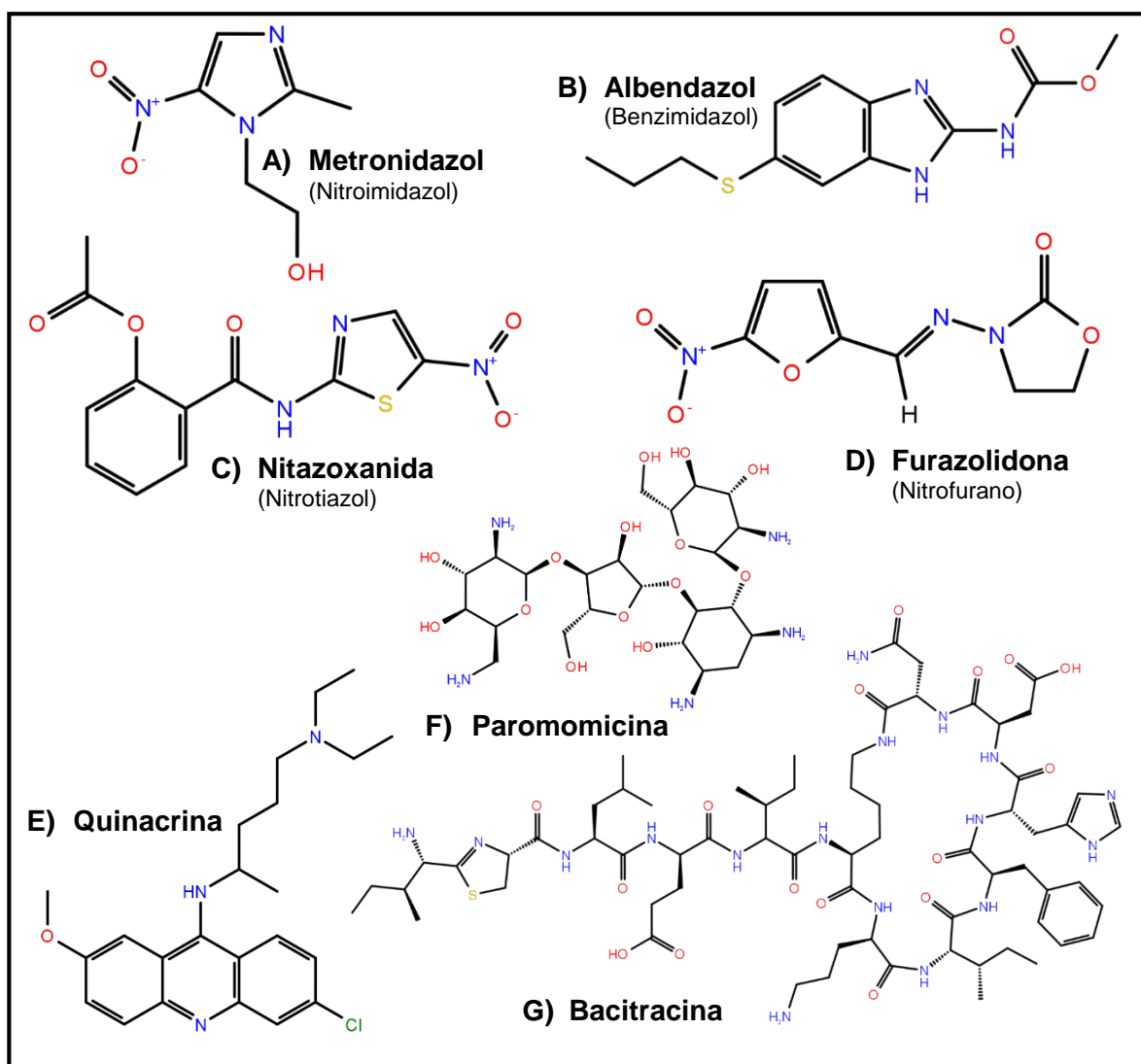


Figura 3. Quimioterapia anti giardiásica. Estructuras moleculares de los fármacos utilizados en el tratamiento de la Giardiasis.



## A) Nitroimidazoles

Dentro de la clase de los fármacos nitroimidazoles empleados para el tratamiento de la giardiasis se encuentran el metronidazol, tinidazol, ornidazol y secnidazol, siendo el primero el mejor estudiado y el más utilizado en la práctica médica (Figura 3A) (Escobedo & Cimerman, 2007). De hecho, es tal la importancia del metronidazol como agente antiparasitario que se encuentra dentro de la lista de los medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2019).

Los nitroimidazoles son profármacos que necesitan ser activados en el interior de la célula parasitaria para poder llevar a cabo su función. La activación de estos compuestos se da por la reducción de sus grupos nitro, a través de enzimas reductoras del parásito que les donan electrones. Dentro de estas enzimas se encuentran el sistema ferredoxina-PFOR (piruvato ferredoxina oxidorreductasa), la tiorredoxina-reductasa y la nitroreductasa 1 de *Giardia*. Los nitroimidazoles reducidos son especies altamente reactivas que dañan el DNA y las proteínas, causando la subsecuente muerte del parásito (Leitsch et al., 2011; Leitsch et al., 2016).

## B) Benzimidazoles

Dentro de esta clase de compuestos encontramos al albendazol y al mebendazol, dos fármacos que presentan una alta actividad giardicida y que además, son utilizados ampliamente en el tratamiento antihelmíntico (Figura 3B). Al igual que los nitroimidazoles, estos compuestos son utilizados como fármacos de primera línea para tratar la giardiasis. Estos agentes actúan inhibiendo la polimerización del citoesqueleto del parásito por unión a las unidades de  $\beta$ -tubulina, lo que ocasiona severos defectos estructurales y pérdida de la capacidad de adherencia al epitelio intestinal (Gardner & Hill, 2001). Además, inducen la formación intracelular de especies reactivas de oxígeno que dañan el material genético de *G. lamblia* y que conllevan a eventos similares a los observados en la apoptosis (Martínez-Espinosa et al., 2015).

### C) Nitazoxanida

La nitazoxanida es un compuesto perteneciente a la clase de los nitrotiazoles que exhibe actividad antiparasitaria contra un amplio espectro de organismos como helmintos, protozoarios y bacterias entéricas, que infectan tanto al humano como a otros animales (Figura 3C). Al igual que los nitroimidazoles, el grupo nitro de estos compuestos debe ser reducido en el interior de la célula parasitaria para tener actividad. Se ha encontrado que el mecanismo de acción de este fármaco es a través de la inhibición de las enzimas PFOR (Hoffman et al., 2007) y Nitroreductasa 1 de *Giardia* (Muller et al., 2007). Además, se ha observado que a nivel estructural la nitazoxanida causa lesiones a nivel del disco ventral e induce vacuolización, comprometiendo así la integridad celular de *Giardia lamblia* (Muller et al., 2006).

### D) Furazolidona

Dentro de los nitrofuranos utilizados para tratar la giardiasis se encuentra la furazolidona (Figura 3D). El mecanismo de acción de este compuesto tampoco ha sido completamente elucidado; sin embargo, al igual que los nitroimidazoles su grupo nitro debe reducirse para que la molécula se vuelva activa, la cual entonces puede dañar componentes celulares del parásito como el DNA o las proteínas (Gardner & Hill, 2001).

### E) Quinacrina, Paromomicina y Bacitracina

La quinacrina, la paromomicina y la bacitracina son fármacos antiparasitarios que a pesar de tener actividad contra *Giardia* no son empleados comúnmente para este fin (Figura 3E, 3F y 3G). De hecho, la quinacrina y la paromomicina se utilizan solamente en combinación con los nitroimidazoles o los benzimidazoles para mejorar su efectividad.

La quinacrina es un compuesto derivado de la acridina que actúa por intercalamiento en las cadenas del DNA del parásito, inhibiendo así el proceso de replicación del material genético. Una de las ventajas que ofrece este fármaco en comparación con los anteriores es su capacidad para afectar la viabilidad de los quistes del parásito. En contraste, la paromomicina es un compuesto aminoglicósido que actúa a nivel traduccional al interferir con las subunidades ribosomales 50S y 30S de *Giardia*. Finalmente, la bacitracina es un antibiótico polipeptídico cuyo mecanismo de acción no se encuentra bien descrito (Leitsch, 2015).

### 3.2.2 Limitaciones de la terapia anti giardiásica

A pesar de que todos los agentes quimioterapéuticos ya descritos constituyen un número considerable de fármacos que pueden utilizarse para tratar la giardiasis, su uso se ve restringido por su actividad anti giardiásica limitada y por los efectos secundarios que presentan. Por ejemplo; el metronidazol y el albendazol, que constituyen los fármacos de primera línea utilizados para tratar esta parasitosis, no logran tener una efectividad del 100% (su efectividad promedio es del 90%) y no tienen la capacidad de afectar la viabilidad de los quistes del parásito. Además, se han descrito como agentes mutagénicos y carcinogénicos en modelos animales, por lo que su utilización en mujeres embarazadas se ve limitada (aunque hasta la fecha no se ha reportado alguna relación entre el uso de estos fármacos y el cáncer en humanos). Otros efectos adversos comunes observados por el uso de estos fármacos son; náuseas, vómito, anorexia, constipación, y en casos más severos, nefrotoxicidad y daño al sistema nervioso central (Escobedo & Cimerman, 2007).

Otro de los problemas que se presentan con el uso de estos agentes antiparasitarios, es la emergente resistencia por parte de *G. lamblia* hacia la acción de estos fármacos, que ha traído como consecuencia falla en los tratamientos. La resistencia farmacológica de *Giardia* se puede entender como la capacidad de este parásito para sobrevivir y desarrollarse, tanto *in vivo* como *in vitro*, en la presencia de una dosis de antiparasitario que normalmente podría matarlo o inhibir su crecimiento (Lalle & Hanevik, 2018).

La resistencia hacia la acción de los nitroimidazoles, tanto *in vivo* como *in vitro*, ha sido la más documentada; aunque también ha sido reportada hacia los demás fármacos anti-giardíasicos disponibles (Leitsch, 2015). Dentro de las estadísticas se tiene que aproximadamente el 20% de los casos clínicos se ven involucrados en resistencia hacia nitroimidazoles, y que en general la resistencia hacia los fármacos anti-giardíasicos va en aumento. En Londres Inglaterra por ejemplo, las fallas en los tratamientos incrementaron del 15.1% en 2008 al 40.2% en 2013 (Carter et al., 2018).

### 3.3 Búsqueda de nuevos fármacos anti giardiásicos

#### 3.3.1 Estrategias para el descubrimiento de nuevos fármacos.

Las diferentes estrategias que existen actualmente para descubrir nuevos fármacos pueden ser clasificadas bajo tres enfoques principales: basado en analogía, enfoque “*de novo*”, y por tamizaje o cribado farmacológico.

El enfoque basado en analogía considera estructuras moleculares líderes con propiedades terapéuticas bien definidas (tales como productos naturales, sustratos de enzimas o fármacos) y que, a través de la síntesis de moléculas análogas a ellas se puede lograr el desarrollo de nuevos medicamentos.

En el enfoque “*de novo*”, el diseño de moléculas con actividad biológica se lleva a cabo tomando en consideración la estructura de un blanco farmacológico específico, cuya modulación de su actividad dará como resultado el efecto terapéutico deseado. En esta estrategia toma gran relevancia los estudios estructurales de los posibles blancos farmacológicos y el entendimiento de cómo las interacciones que se den entre el ligando diseñado y la proteína de interés pueden modular la actividad de esta (Ettmayer et al., 2017).

Finalmente, se puede entender como cribado farmacológico al proceso bien establecido mediante el cual se evalúan bibliotecas de compuestos químicos, a través de la utilización de ensayos biológicos o bioquímicos, con el fin de identificar aquellos que presentan alguna actividad biológica deseada. El cribado molecular es generalmente el punto de inicio del proceso que conlleva al desarrollo de nuevos fármacos y este puede llevarse a cabo una o más veces durante el desarrollo farmacológico. Además, es importante entender que mediante el cribado molecular casi nunca se descubren nuevos fármacos como tal; sin embargo, es importante para identificar estructuras químicas líderes o de inicio a partir de las cuales se puedan desarrollar nuevos fármacos (Wildey et al., 2017).

Es importante mencionar que los tres enfoques para el descubrimiento de nuevos fármacos se encuentran apoyados fuertemente del diseño de fármacos asistido por computadora y la quimioinformática. Las cuales brindan herramientas y técnicas computacionales que ayudan en las diferentes etapas del desarrollo farmacológico y que permite reducir los costos y el tiempo de investigación (Macalino et al., 2015).

Además, en los últimos años el reposicionamiento farmacológico, que es otra estrategia utilizada para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos, ha tenido una gran relevancia. El reposicionamiento consiste en utilizar fármacos que ya se encuentran en el mercado, para tratar enfermedades distintas para las que fueron diseñados. La ventaja que se obtiene de esta estrategia es que al tratarse de medicamentos ya aprobados, los costos y los tiempos de duración de los ensayos preclínicos y clínicos se reducen enormemente (Ashburn & Thor, 2004).

### **3.3.2 El cribado molecular como parte del desarrollo farmacológico**

El descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos puede clasificarse de forma general en dos categorías: descubrimiento de fármacos basados en la fisiología de la enfermedad y descubrimiento de fármacos basados en un blanco terapéutico. La principal diferencia entre estas dos categorías radica en la importancia que tenga un blanco farmacológico específico para iniciar la búsqueda de nuevas moléculas con actividad biológica. En el desarrollo farmacológico basado en la fisiología, no es relevante conocer un blanco molecular específico para comenzar el cribado, de hecho, la identificación del blanco prosigue de la identificación de los compuestos activos. Por lo tanto, el cribado molecular se basa en evaluar la capacidad que tienen los compuestos de influir sobre las manifestaciones de la enfermedad (fenotipo); y esto se realiza mediante la utilización de ensayos celulares o modelos animales (Eckstein, 2005).

Por el contrario, el desarrollo de fármacos basado en un blanco terapéutico se inicia con la identificación y la validación de un blanco molecular, cuya actividad es fundamental para la manifestación de la enfermedad (fenotipo). Para poder identificar un blanco molecular adecuado es necesario conocer el mecanismo de la enfermedad, y los genes o productos génicos involucrados en esta. La validación del blanco requiere la demostración de que el blanco está involucrado directamente en el proceso de la enfermedad y de que su modulación tiene efectos terapéuticos. Por lo tanto, el cribado molecular que se realiza en este tipo de desarrollo farmacológico se basa en evaluar la capacidad que tienen los compuestos de modular la actividad del blanco biológico; y para ello se hace uso de ensayos bioquímicos (Eckstein, 2005; Sittampalam et al., 2004).

Una vez que se tiene identificado y validado un blanco biológico (cuando sea el caso) y se ha desarrollado un ensayo que permita evaluar la biblioteca química, se prosigue a realizar el cribado. Un primer cribado es llevado a cabo para identificar todos aquellos compuestos dentro de la biblioteca, que presentan actividad biológica. En términos técnicos, a estas moléculas identificadas con actividad se les denomina como "hits". En los cribados primarios, los compuestos son evaluados a una sola concentración o en múltiples concentraciones y los resultados son expresados como porcentaje de actividad en comparación con un control positivo (100% de actividad) y uno negativo (0% de actividad). En la práctica, se ha observado que la mayoría de los hits presentan actividad en concentraciones que varían entre 1 y 100  $\mu\text{M}$  (Eckstein, 2005).

Posterior a la identificación de los hits, estos deben confirmarse mediante repetición del ensayo. También en esta etapa de confirmación se realizan ensayos de tipo dosis-respuesta para calcular la potencia de las moléculas activas. Además, pueden llevarse a cabo otros estudios en paralelo para evaluar la especificidad de los compuestos e identificar sus mecanismos de acción.

La última etapa, antes de que una molécula pueda entrar a estudios preclínicos y clínicos, consiste en generar y optimizar estructuras químicas líderes (denominadas técnicamente como “leads”). Estas secuencias líderes son generadas a partir del refinamiento de las estructuras químicas de los hits confirmados para mejorar sus características farmacológicas y toxicológicas con el objetivo de generar un candidato molecular que pueda iniciar los estudios preclínicos. En esta etapa son importantes los estudios de relación estructura actividad, en donde se sintetizan y evalúan compuestos análogos a los hits, para generar información cuantitativa que correlaciona de los cambios estructurales con los datos biológicos y farmacológicos (Eckstein, 2005; Sittampalam et al., 2004).

### 3.3.3 Nuevos compuestos con actividad anti giardiásica

La mayoría de investigaciones llevadas a cabo con el objetivo de encontrar nuevas moléculas con actividad anti giardiásica han sido abordadas desde el enfoque basado en analogía. En estos estudios se han sintetizado y evaluado moléculas homólogas a los nitroimidazoles, benzimidazoles y nitrotiazoles con la generación de compuestos mucho más activos a los ya comercializados. Estos compuestos análogos también han mostrado ser eficaces contra cepas resistentes del parásito (Hernández-Luis et al., 2010; Muller et al., 2006; Navarretevazquez et al., 2006; Pérez-Villanueva et al., 2013; Valdez et al., 2009).

Dentro del enfoque basado en analogía, también se han diseñado nuevos agentes quimioterapéuticos mediante la creación de compuestos híbridos, en donde se combinan dos moléculas activas con diferente estructura y mecanismo de acción. Análogos a la nitazoxanida obtenidos por unión de esta molécula con benzimidazoles y antiinflamatorios no esteroideos, y compuestos generados por la combinación entre nitroimidazoles e isatina, han mostrado una mejor actividad anti giardiásica en comparación con el metronidazol o la nitazoxanida sin modificar, tanto en modelos *in vitro* como en modelos murinos, e incluso algunos han tenido una baja citotoxicidad en células de mamíferos (Colín-Lozano et al., 2017; Kumar et al., 2018; Soria-Arteche et al., 2013).

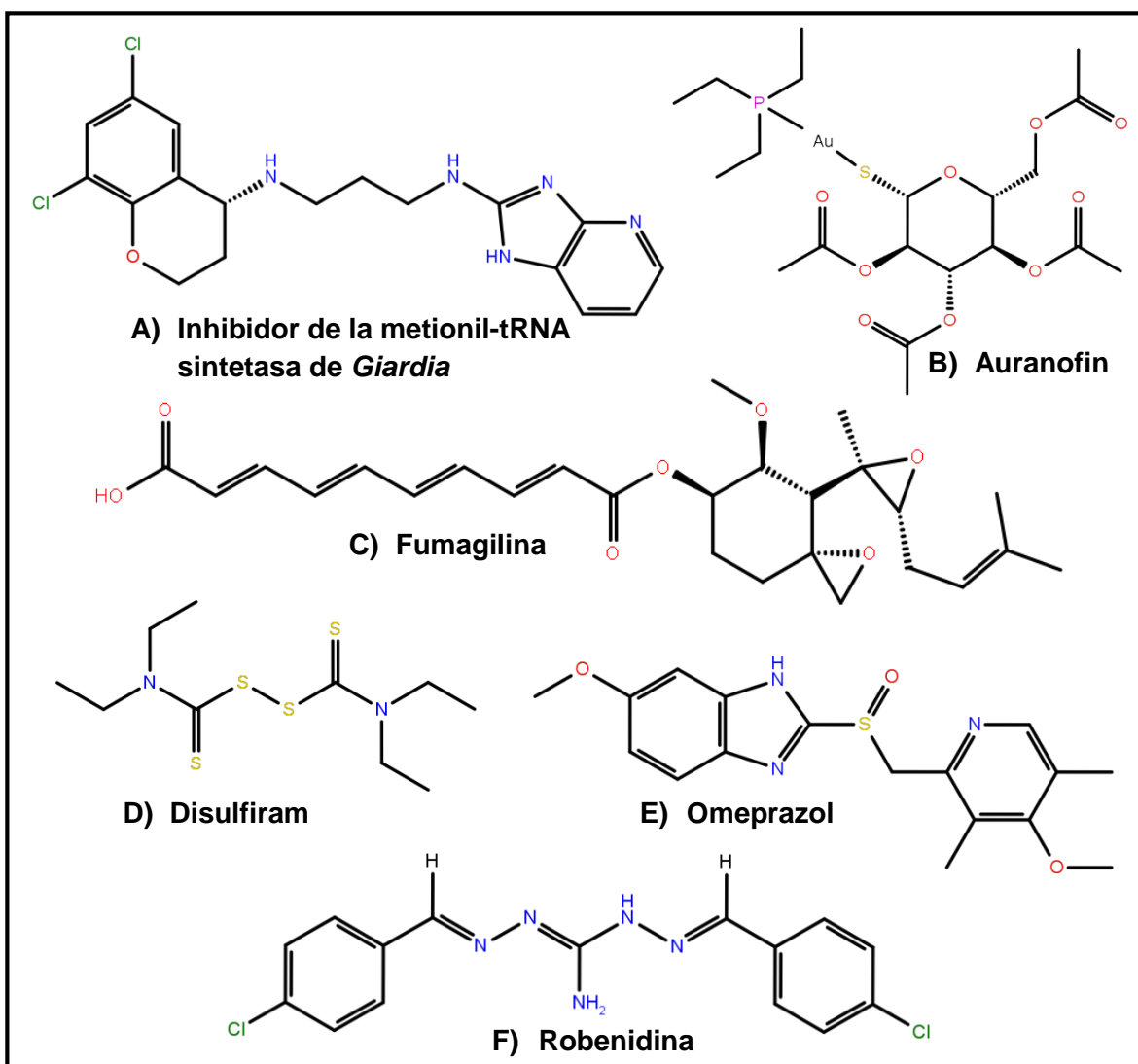


Bajo el enfoque del diseño “*de novo*” se ha investigado la utilización de inhibidores de la metionil-tRNA sintetasa de *Giardia* como agentes antiparasitarios (Figura 4A). Se ha encontrado que las mejores moléculas dentro de esta familia de compuestos inhiben el crecimiento de los trofozoítos de *Giardia* a concentraciones micromolares, y además presentan baja citotoxicidad en células de mamífero (Ranade et al., 2015).

A través del reposicionamiento farmacológico, se ha logrado identificar fármacos ya comercializados que, además de su actividad primaria, también presentan actividad anti*giardiásica*. Entre estos fármacos se encuentran el auranofín, la fumagilina, el disulfiram, los inhibidores de la bomba de protones (como el omeprazol) y la robenidina (Figura 4). Cabe mencionar, que el auranofín y la fumagilina fueron identificados como agentes *giardicidas* a través de cribado molecular de bibliotecas comerciales constituidas por compuestos con actividades biológicas ya conocidas (Chen et al., 2011; Tejman-Yarden et al., 2013).

El auranofin es un fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de la artritis reumatoide (Figura 4B). El compuesto tiene actividad *giardicida in vitro*, en el rango micromolar (4  $\mu$ M a 6  $\mu$ M), contra una amplia variedad de cepas patogénicas para el humano, tanto sensibles como resistentes a metronidazol. Uno de sus posibles mecanismos de acción sobre *Giardia* es a través de la inhibición de la tiorredoxina reductasa. Además también ha demostrado eficacia en modelos *in vivo* (ratón y jerbo) (Tejman-Yarden et al., 2013) y su seguridad en humanos ya ha sido confirmada en un ensayo clínico de fase I (Capparelli et al., 2017).

La fumagilina es un fármaco aprobado por la Unión Europea para tratar la microsporidiosis en personas inmunosuprimidas (Figura 4C). Este fármaco muestra actividad *giardicida in vitro* a concentraciones nanomolares, tanto hacia cepas susceptibles como resistentes a nitroimidazoles. También muestra efectividad en modelo murino; sin embargo, su mecanismo de acción no se conoce todavía (Kulakova et al., 2014).



**Figura 4. Fármacos anti-giardíacos potenciales.** Estructuras moleculares de los compuestos que se han identificado con actividad giardicida.

El disulfiram es un fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento del alcoholismo (Figura 4D). Su actividad ha sido demostrada tanto en ensayos *in vitro* (utilizando cepas sensibles y resistentes a metronidazol) como en ensayos *in vivo* (modelo murino). Dentro de sus blancos farmacológicos, se ha visto que tiene la capacidad de inactivar las enzimas triosafosfato isomerasa (enzima de la vía glucolítica) y carbamato cinasa (enzima de la vía de la arginina dihidrolasa) de *Giardia lamblia*, a través de la derivatización de residuos de cisteína esenciales para la actividad de estas dos enzimas (Castillo-Villanueva et al., 2017; Galkin et al., 2014; Nash & Rice, 1998).

Los inhibidores de la bomba de protones gástrica, como el omeprazol y sus homólogos, son fármacos aprobados para el tratamiento de la gastritis (Figura 4E). Su actividad giardicida ha sido demostrada sólo en ensayos *in vitro* y se ha visto que uno de los mecanismos antiparasitarios de estas moléculas podría ser a través de la inactivación de la triosafosfato isomerasa del parásito *Giardia lamblia*, por la formación de aductos covalentes con el residuo de cisteína-222 (Hernández-Ochoa et al., 2017).

La robenidina es un compuesto utilizado como agente anticoccidial y, aunque su uso en humanos no se encuentra aprobado, es utilizado en la industria avícola y de conejos (Figura 4F). Este compuesto se caracteriza por tener grupos aromáticos simétricos unidos por un centro de guanidina. En estudios *in vitro*, ha mostrado tener actividad giardicida a concentraciones micromolares muy similares al del metronidazol. Hasta el momento no se tienen reportes de su actividad *in vivo* y su mecanismo de acción también es desconocido (Abraham et al., 2019).

## 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La acción limitada y los efectos adversos de los fármacos utilizados comúnmente para el tratamiento de la infección intestinal causada por el protozooario *Giardia lamblia*, así como la resistencia emergente hacia la acción de estos medicamentos por parte del parásito, genera la necesidad de diseñar moléculas novedosas con potencial actividad anti giardiásica y de descubrir blancos terapéuticos nuevos.

Con este fin se han realizado numerosas investigaciones que han dado como resultado el diseño y el descubrimiento de una amplia variedad de moléculas con potencial actividad giardicida. Sin embargo, la gran mayoría de estas moléculas han sido análogas a los fármacos ya comercializados, por lo que, en lo referente a estructura y mecanismos de acción antiparasitaria no suponen alguna novedad.

A través del reposicionamiento farmacológico también ha sido posible descubrir un número pequeño de compuestos que además de sus propiedades farmacológicas convencionales, también presentan actividad giardicida. Tal es el caso del disulfiram y el omeprazol que fueron identificados por el laboratorio de Bioquímica-Genética del Instituto Nacional de Pediatría. A pesar de ello, no se tratan de moléculas nuevas hablando estructuralmente, puesto que ya se comercializan en el mercado. Por lo cual, para descubrir y diseñar moléculas anti giardiásicas totalmente novedosas que además guíen hacia la identificación de nuevos blancos farmacológicos, será necesario utilizar estrategias de búsqueda distintas al diseño por homología o al reposicionamiento farmacológico.

## 5. HIPÓTESIS

A través del uso del cribado farmacológico de bibliotecas de diversidad no comerciales, será posible identificar nuevas estructuras moleculares que presenten actividad giardicida.

## 6. OBJETIVO

### Objetivo general

Identificar y evaluar nuevas estructuras moleculares con potencial actividad giardicida, siguiendo el enfoque del cribado farmacológico.

### Objetivos específicos

- 1) Identificar nuevas estructuras moleculares con actividad giardicida a través del cribado farmacológico de bibliotecas químicas de diversidad no comerciales.
- 2) Evaluar la actividad giardicida de los andamios moleculares identificados.
- 3) Estudiar el efecto citotóxico de los compuestos sobre los trofozoítos del parásito *Giardia lamblia*.
- 4) Evaluar la citotoxicidad de los compuestos identificados con actividad giardicida en células de mamífero.

## 7. MÉTODOS

### 7.1 Cribado farmacológico

El cribado farmacológico se realizó mediante un ensayo de microcitotoxicidad *in vitro* sobre trofozoítos de *G. lamblia* (cepa WB), el cual está basado en un método de resiembra y medición de la proliferación y viabilidad celular. Todos los compuestos de la biblioteca química se evaluaron en el cribado primario a una concentración final de 100  $\mu$ M.

#### 7.1.1 Biblioteca química

Se evaluó la actividad antiparasitaria de una biblioteca de 54 compuestos, proporcionada por el Instituto de Química, UNAM. Como compuestos de referencia (controles positivos) se utilizaron al metronidazol (Fluka) y al tinidazol (Sigma Aldrich); debido a que ambos presentan alta efectividad como agentes anti giardiásicos (Escobedo & Cimerman, 2007).

El principal criterio tomado en cuenta para la selección de los compuestos que conformaron la biblioteca química evaluada, fue que los compuestos no tuvieran ninguna semejanza estructural con los fármacos anti giardiásicos ya comercializados (Figura 3) ni con otras moléculas que ya se conoce que presentan actividad giardicida (Figura 4). Además, se buscó que existiera una amplia diversidad estructural entre estos compuestos. Cabe mencionar que todos los compuestos que conformaron la biblioteca evaluada fueron moléculas diseñadas por el propio Instituto de Química de la UNAM. En la figura 5 se muestran los andamios moleculares de los compuestos que conformaron la biblioteca química evaluada en el cribado primario.

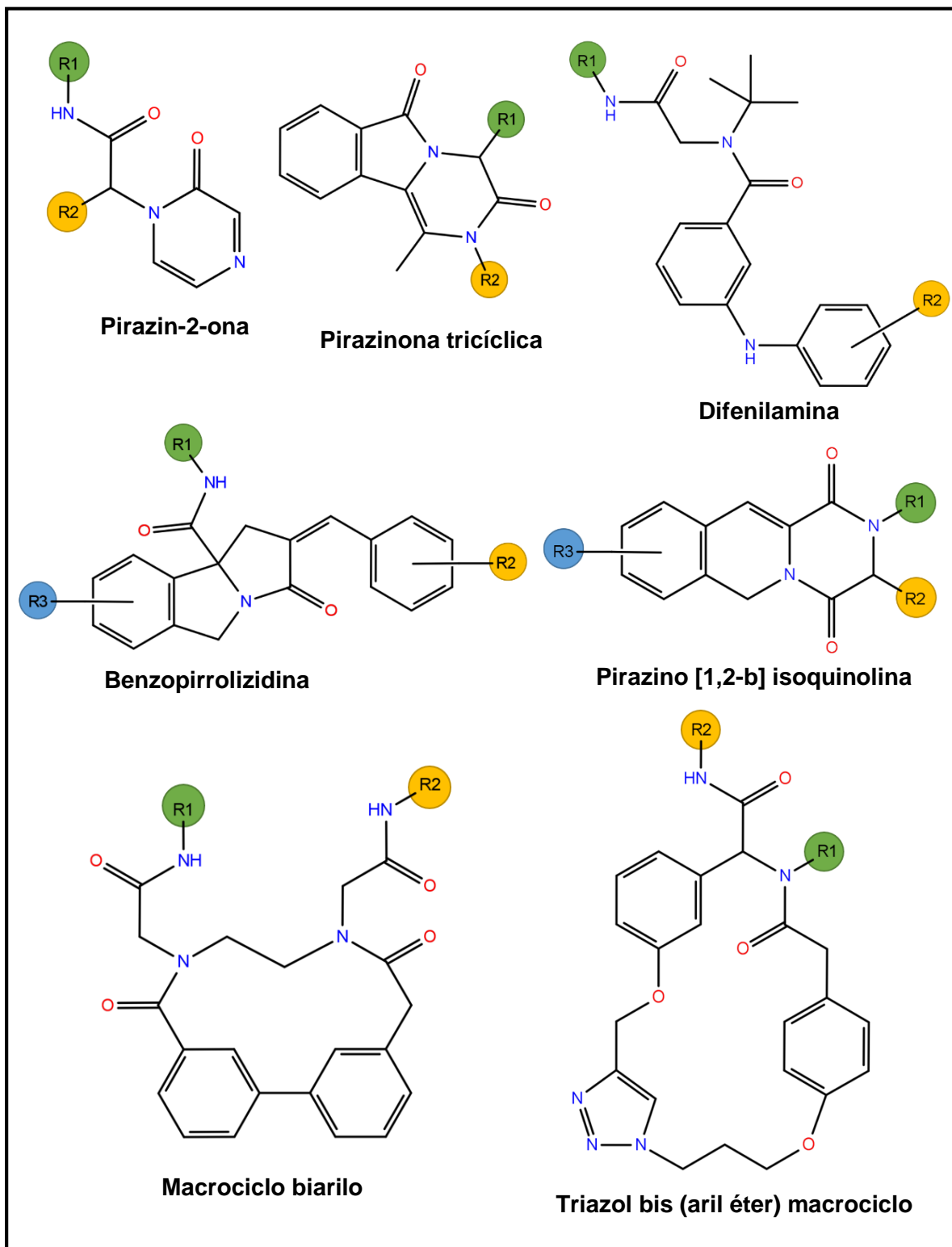


Figura 5. Biblioteca química evaluada en el cribado primario. Andamios moleculares de los compuestos evaluados en el cribado farmacológico.

Siguiendo protocolos reportados sobre el manejo de bibliotecas químicas (Willey et al., 2017); el metronidazol, el tinidazol y los 54 compuestos de la biblioteca que se evaluó, fueron preparados como soluciones stock a una concentración de 0.025M en 100% DMSO (Sigma Aldrich). El DMSO además de ser utilizado como disolvente también fue utilizado como control negativo. Los stocks de los compuestos se prepararon inmediatamente antes de ser evaluados y se conservaron a -20 °C después de ser utilizados.

### 7.1.2 Parásitos y cultivo

Los trofozoítos de *G. lamblia* (cepa WB) se cultivaron axénicamente a 37 °C en medio TYI-S-33 en tubos de borosilicato de 9 mL, siguiendo procedimientos ya descritos (Davids & Gillin, 2011). El medio base una vez preparado, se esterilizó por filtración empleando membranas de celulosa de 0.22 µm (Millipore), y se conservó hasta por siete días a 4 °C. Al momento de ser utilizado el medio base para el cultivo, se suplementó con suero fetal bovino al 10 % y con los antibióticos ampicilina, cefalotina y anfotericina b (a la concentración de 1mg por cada 100mL de medio para la ampicilina y la cefalotina, y 0.5 mg por cada 100 mL de medio para la anfotericina b). Los antibióticos se omitieron durante la realización de los ensayos de microcitotoxicidad *in vitro*.

Los trofozoítos de *G. lamblia* empleados en los ensayos provinieron de cultivos sanos; siendo estos los que presentaban una confluencia (revestimiento de la pared interna del tubo por adherencia de los trofozoítos) de entre 90 y 100 %, sin masas celulares apreciables en el fondo de los tubos, y con morfología celular normal (células periformes).



### 7.1.3 Ensayo de microcitotoxicidad *in vitro*

#### A. Preparación de las células

En este ensayo se utilizaron sólo los trofozoítos adheridos a la pared interna de los tubos de cultivo. Para desprender las células de la pared de los tubos, el medio líquido de los cultivos sanos se sustituyó por PBS pH 7.1 y los tubos se incubaron en hielo durante 15 minutos. Después del desprendimiento, los parásitos se concentraron mediante centrifugación (2000 g x 5 minutos); posteriormente, las células se contaron por método manual empleando cámara de Neubauer para finalmente, preparar una suspensión de trofozoítos en medio TYI-S-33 (suplementado con suero bovino y sin antibióticos) a una concentración de  $1.3 \times 10^6$  trofozoítos / mL.

#### B. Preparación de los compuestos

Cada uno de los controles positivos (metronidazol y tinidazol) así como los compuestos de la biblioteca que se evaluó, se llevaron a una concentración de 200  $\mu$ M en medio TYI-S-33. Para ello, se tomó 4  $\mu$ L de cada una de las soluciones stock y se diluyó con 500  $\mu$ L de medio de cultivo. De igual manera, el control negativo se preparó mezclando 4  $\mu$ L de 100% DMSO con 500  $\mu$ L de medio de cultivo.

#### C. Montaje del ensayo

Para la realización del ensayo se utilizaron placas de cultivo celular de 96 pocillos de fondo plano (Corning Costar 3596), a cada una de las cuales se les adicionó por triplicado 150  $\mu$ L de medio TYI-S-33 (100% viabilidad celular), 150  $\mu$ L de los controles y 150  $\mu$ L de los compuestos de la biblioteca; como blanco de ensayo se utilizó 300  $\mu$ L del medio de cultivo. A todos los pozos (exceptuando los blancos) se les adicionó 150  $\mu$ L de la suspensión celular de concentración  $1.3 \times 10^6$  trofozoítos / mL (equivalente a 200, 000 trofozoítos). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Para evitar la evaporación en las placas, a los pozos exteriores de éstas se les adicionó 300  $\mu$ L de PBS.

## D. Recultivo

Transcurrido el tiempo de incubación, las placas de cultivo se enfriaron en hielo durante 30 minutos para desprender los trofozoítos adheridos a las paredes de los pozos. De cada pozo se tomaron 50  $\mu$ L de cultivo y se transfirieron a una segunda placa que contenía 250  $\mu$ L de medio TYI-S-33 por pozo. Las placas recultivadas se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

## E. Medición de la proliferación y la viabilidad celular

La proliferación de los trofozoítos recultivados se midió empleando el ensayo XTT (sal de sodio del 3'-[1-(fenilaminocarbonil)-3,4-tetrazolium]-bis (4-metoxi-6-nitro) ácido bencensulfónico) (Cell proliferation kit II, Roche). Para ello, a cada pozo de las placas recultivadas se les removieron 250  $\mu$ L del medio de cultivo y se les sustituyó por 250  $\mu$ L de PBS pH 7.1, seguido de una incubación a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, a cada uno de los pozos se les removieron nuevamente 250  $\mu$ L de la solución, y se les adicionó 200  $\mu$ L de PBS pH 7.1 y 50  $\mu$ L del reactivo XTT activado con PMS (N-metil dibenzo pirazina metil sulfato) (Roche). Cada una de las placas se incubó durante 4 horas a 37 °C, para finalmente medir la absorbancia a 490 nm.

La actividad biológica de cada uno de los compuestos de la biblioteca evaluada se expresó como el porcentaje de muerte celular, con referencia al control sin tratamiento (100% de viabilidad); calculándose mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ muerte celular} = \left[ \frac{(\text{Abs. del 100\% viabilidad} - \text{Abs. del compuesto evaluado})}{(\text{Abs. del 100\% viabilidad} - \text{Abs. del blanco})} \right] \times 100$$

## 7.2 Confirmación de los hits

Los compuestos de la biblioteca química que mostraron porcentajes de muerte superiores al 50%, se confirmaron mediante repetición del ensayo de microcitotoxicidad *in vitro*, a concentraciones finales de 50, 25 y 12.5  $\mu\text{M}$ .

## 7.3 Evaluación de la actividad giardicida de los andamios identificados

Una segunda biblioteca química conformada por veinticinco compuestos análogos a los andamios identificados con actividad en el tamizado primario, se evaluó utilizando el ensayo de microcitotoxicidad descrito anteriormente. Todos los compuestos se analizaron a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , y aquellos que mostraron actividad giardicida se reevaluaron a concentraciones decrecientes.

## 7.4 Cálculo de los valores de IC50

Los valores de la concentración inhibitoria 50 (IC50) se calcularon a través del ensayo de microcitotoxicidad *in vitro*. Para cada compuesto se montaron por triplicado tres curvas de actividad dosis-respuesta y a partir de éstas se calcularon los valores de IC50. Para el cálculo se hizo empleo de la herramienta en línea Quest Graph™ IC50 Calculator (AAT Bioquest, Inc.) que utiliza el modelo de regresión logística de cuatro parámetros.

## 7.5 Evaluación de la actividad citotóxica en células de mamífero

Se realizó un estudio preliminar para evaluar la actividad citotóxica sobre células de mamífero de los andamios moleculares identificados en el tamizado primario. En este estudio se analizaron sólo los compuestos que presentaron mayor actividad giardicida y para ello se empleó un ensayo de citotoxicidad *in vitro* basado en el uso del colorante cristal violeta para medir la viabilidad celular.

### 7.5.1 Línea celular y cultivo

En este estudio se empleó la línea celular HaCaT (queratinocitos humanos inmortalizados provenientes de la piel). Las células se cultivaron en medio DMEM-F12 (Thermo Fisher) suplementado con 10% de suero fetal bovino a 37°C. Para su utilización en el ensayo de citotoxicidad, las células se colectaron por centrifugación a temperatura ambiente, el sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron a una concentración de  $5 \times 10^4$  células/mL en medio de cultivo fresco.

### 7.5.2 Montaje del ensayo

En cajas de cultivo de 24 pozos de fondo plano (Corning Costar) se sembraron  $3 \times 10^4$  células (en un volumen de 600  $\mu$ L) por pozo y se incubaron por 24 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, el medio de cultivo se retiró de cada uno de los pozos y se sustituyó por 800  $\mu$ L de medio fresco el cual contenía los compuestos a evaluar y los controles metronidazol y tinidazol a las concentraciones de 100, 90, 80, 70, 60 y 50  $\mu$ M. Como control negativo se utilizó DMSO. Las células con los compuestos se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. Trascurrido este tiempo, las células se lavaron dos veces con PBS 1X, se fijaron y tiñeron durante 15 minutos con el colorante cristal violeta (etanol 50%, formaldehído 1.75%, cristal violeta 0.75% y NaCl 0.25%). Posteriormente, las placas de cultivo se lavaron varias veces con agua corriente hasta eliminar el exceso de colorante y se dejaron secar durante un día a temperatura ambiente. Finalmente, el cristal violeta que fue incorporado por las células viables se solubilizó con 600  $\mu$ L de solución de SDS al 1% en PBS, y se leyó la absorbancia de cada pozo a una longitud de 570 nm en un lector de placas. A partir de los porcentajes de muerte obtenidos a las diferentes concentraciones ensayadas, se calculó el valor de IC<sub>50</sub> para cada uno de los compuestos y controles evaluados.

## 7.6 Estudios morfológicos sobre el trofozoíto de *Giardia lamblia*

Se realizaron estudios morfológicos mediante microscopía óptica convencional y microscopía electrónica de transmisión para evaluar el efecto citotóxico que tuvieron los compuestos que presentaron mayor actividad giardicida en el cribado primario y secundario, sobre los trofozoítos del parásito.

### 7.6.1 Microscopía óptica de campo claro

En microtubos de polipropileno se cultivaron  $2 \times 10^6$  trofozoítos de *Giardia lamblia* cepa WB en 1.5 mL de medio TYI-S33 (suplementado con suero bovino y sin antibióticos), en presencia de los compuesto metronidazol, tinidazol, albendazol y de los compuestos con mayor actividad identificados en el cribado molecular, a las concentraciones de sus respectivos valores de IC50. De igual manera se montó un control sin tratamiento. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se enfriaron en hielo durante 15 minutos y las células se concentraron mediante centrifugación (2000g x 5 minutos). Las células se lavaron tres veces con PBS pH 7.1 y posteriormente se montaron en portaobjetos. Las muestras se fijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa, para posteriormente ser analizadas por microscopía de campo claro.

### 7.6.2 Microscopía electrónica de transmisión

En tubos de borosilicato se cultivaron por duplicado  $6 \times 10^6$  de trofozoítos de *Giardia lamblia* cepa WB en 9 mL de medio TYI-S33 (suplementado con suero bovino y sin antibióticos), en presencia de los compuestos tinidazol, albendazol y el compuesto con mayor actividad identificado en el cribado molecular, a las concentraciones de sus respectivos valores de IC50. De igual manera se montó un control sin tratamiento. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se enfriaron en hielo durante 15 minutos y las células se concentraron mediante centrifugación (2000g x 5 minutos). Las células se lavaron tres veces con PBS pH 7.1, se concentraron nuevamente y su número se determinó por conteo manual empleando cámara de Neubauer.

El montaje de las muestras y la adquisición de las imágenes se llevaron a cabo por la unidad de imagenología del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. De forma breve, lo anterior se realizó de la siguiente manera. Aproximadamente  $11 \times 10^6$  de trofozoítos bajo cada uno de los tratamientos se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en buffer fosfatos y se trataron con tetraóxido de osmio al 1%. Después de ser lavadas con buffer fosfatos, las células se deshidrataron en etanol a concentraciones crecientes y se incluyeron en epón. Se obtuvieron cortes ultrafinos de las muestras utilizando el ultramicrotómo Reichert-Jung y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Finalmente, la adquisición de las imágenes se realizó utilizando el microscopio electrónico de transmisión JEOL-JEM-1200.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Cribado molecular primario

El presente trabajo se centró en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos anti giardiásicos empleando un enfoque basado en el cribado molecular. El ensayo que se empleó para este propósito permitió el tamizado de una biblioteca química conformada por 54 compuestos, a través de la evaluación del efecto citotóxico que estos compuestos presentan sobre la proliferación y la viabilidad del parásito.

El cribado primario, en donde se evaluaron todos los compuestos a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$ , permitió la identificación de cinco moléculas con actividad anti giardiásica (hits), cuatro de las cuales presentaron porcentajes de muerte sobre los trofozoítos del parásito iguales al 100% y una con un porcentaje de muerte cercano al 70%, como se puede apreciar en la tabla 1.

Para confirmar la actividad de estas moléculas y tener un punto de comparación temprano de la potencia que presentan estos compuestos, se reevaluaron los hits a tres concentraciones menores (50, 25 y 12.5  $\mu\text{M}$ ). Como puede apreciarse en la tabla 2, sólo los compuestos que presentaron porcentajes de muerte cercano al 100% en el cribado primario mantuvieron porcentajes de muerte superiores al 80% cuando fueron evaluados a la concentración de 50  $\mu\text{M}$ . Y de éstos, sólo el compuesto identificado como EHV-110-174 es el que mantuvo este porcentaje de muerte aun a la concentración de 12.5  $\mu\text{M}$ .

**Tabla 1. Actividad citotóxica sobre trofozoítos de *G. lamblia* de los compuestos de la biblioteca química evaluada mediante el ensayo de microcitotoxicidad.**

Clave del compuesto	Porcentaje promedio de muerte celular	Clave del compuesto	Porcentaje promedio de muerte
EHV-110-5	16.7 (5.0)	ACR-162-19	12.5 (2.1)
EHV-110-6	12.4 (5.1)	ACR-162-73	8.5 (7.1)
EHV-110-108	8.0 (2.0)	ACR-162-76	12.0 (2.7)
EHV-110-139	24.9 (0.7)	ACR-162-86	9.9 (3.7)
<b>EHV-110-154</b>	<b>100.7</b> (0.3)	ACR-162-92	15.4 (4.6)
<b>EHV-110-160</b>	<b>100.7</b> (0.4)	ACR-162-94	8.2 (0.4)
<b>EHV-110-174</b>	<b>100.3</b> (0.3)	ACR-173-45	3.5 (3.2)
EHV-110-178	2.2 (0.7)	ACR-173-46	6.8 (5.2)
EHV-110-187	12.3 (3.2)	MCM-029	6.6 (4.0)
EHV-110-188	27.8 (4.0)	MCM-032	3.2 (3.0)
EHV-110-190	1.8 (0.2)	MCM-034	4.7 (3.0)
EHV-110-192	11.6 (3.7)	MCM-040	3.1 (1.3)
EHV-110-198	7.8 (0.9)	MCM-042	6.1 (7.1)
EHV-110-212	6.1 (2.2)	MCM-068	5.2 (2.3)
EHV-110-214	13.5 (1.8)	MCM-072	0.2 (0.2)
EHV-110MA-48	9.7 (1.2)	MCM-075	17.6 (4.1)
EHV-110MA-50	10.6 (2.9)	MCM-081	10.1 (7.0)
EHV-110MA-70	22.0 (7.0)	MCM-082	12.8 (3.1)
EHV-110MA-74	26.2 (6.7)	YAAS-129-70	8.7 (4.0)
<b>EHV-110MA-78</b>	<b>101.5</b> (0.3)	YAAS-129-63	4.3 (5.5)
EHV-110MA-84	2.9 (0.1)	YAAS-144-232	6.2 (4.9)
EHV-110MA-86	13.9 (2.3)	YAAS-144-239	7.3 (1.1)
EHV-110MA-92	16.2 (7.8)	YAAS-144-263	5.7 (2.7)
EHV-110AN-5	7.4 (4.2)	EHV-110-4	5.5 (2.5)
<b>EHV-110AN-16</b>	<b>70.9</b> (0.1)		
EHV-110AN-24	7.6 (2.4)	<b>Controles positivos</b>	
EHV-110AN-28	7.9 (1.8)	Tinidazol	<b>100.8</b> (0.6)
EHV-110AN-44	4.7 (3.2)	Metronidazol	<b>100.3</b> (0.5)
ACR-153-56	13.5 (5.9)		
ACR-153-60	4.5 (2.5)	<b>Control negativo</b>	
		DMSO	5.2 (4.1)

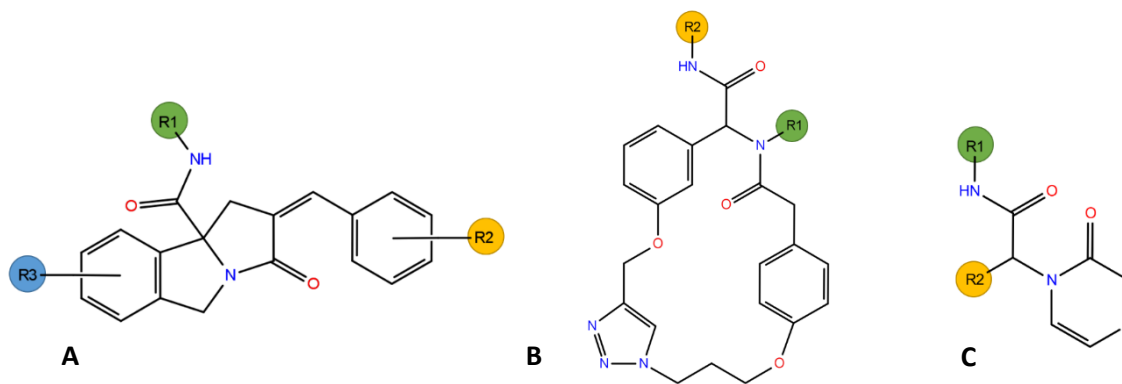
Todos los compuestos fueron evaluados por triplicado a una concentración final de 100 µM. Entre paréntesis se indica el valor de desviación estándar. En negritas se resaltan los compuestos que mostraron porcentajes de muerte celular mayores al 50%.



**Tabla 2. Actividad citotóxica sobre trofozoítos de *G. lamblia* de los hits en el ensayo confirmatorio.**

Hits	Cribado Primario	Confirmación de los Hits		
	Porcentaje promedio de muerte a 100 $\mu$ M	Porcentaje promedio de muerte a 50 $\mu$ M	Porcentaje promedio de muerte a 25 $\mu$ M	Porcentaje promedio de muerte 12.5 $\mu$ M
EHV-110-154 <sup>1</sup>	<b>100.7</b> (0.3)	<b>94.7</b> (1.0)	10.8 (0.6)	4.2 (0.3)
EHV-110-160 <sup>1</sup>	<b>100.7</b> (0.4)	<b>98.2</b> (0.1)	<b>66.9</b> (3.8)	2.9 (0.8)
EHV-110-174 <sup>1</sup>	<b>100.3</b> (0.3)	<b>98.3</b> (0.1)	<b>98.3</b> (0.2)	<b>83.7</b> (0.9)
EHV-110MA-78 <sup>2</sup>	<b>101.5</b> (0.3)	<b>84.9</b> (1.5)	12.1 (1.1)	12.1 (0.3)
EHV-110AN-16 <sup>3</sup>	<b>70.9</b> (0.1)	14.3 (4.6)	14.3 (1.4)	5.8 (4.3)
<b>Controles positivos</b>				
Tinidazol	<b>100.8</b> (0.6)	NE	NE	<b>98.5</b> (0.2)
Metronidazol	<b>100.3</b> (0.5)	NE	NE	<b>86.6</b> (1.7)
<b>Control negativo</b>				
DMSO	5.2 (4.1)	7.7 (2.9)	NE	NE
Todos los compuestos fueron evaluados por triplicado. En negritas se resaltan los porcentajes de muerte celular mayores al 50%. Entre paréntesis se indica el valor de desviación estándar. NE=No evaluado. <sup>1</sup> : Compuestos derivados de las benzopirrolizidinas; <sup>2</sup> : Compuesto derivado del triazol bis (aril éter) macrociclo; <sup>3</sup> : Compuesto derivado de la pirazin-2-ona.				

Los resultados obtenidos de la etapa del cribado primario y de la confirmación de los hits permitió la identificación de tres andamios moleculares que presentan actividad citotóxica contra los trofozoítos de *Giardia lamblia*. Estos andamios corresponden a los compuestos de benzopirrolizidina, macrociclo triazol bis (aril éter) y pirazin-2-ona, cuyas estructuras moleculares se ilustran en la figura 6. Estas nuevas estructuras identificadas con actividad giardicida son totalmente diferentes de los fármacos actualmente utilizados para tratar esta parasitosis (figura 3) y de los compuestos que han sido identificados con actividad giardicida a través del reposicionamiento farmacológico (figura 4).



**Figura 6. Estructura de los andamios moleculares que presentaron actividad giardicida.** A) Benzopirrolizidina B) triazol bis (aril éter) macrociclo C) pirazin-2-ona.

Hasta el momento no se encuentran publicados reportes previos que describan la actividad citotóxica de las benzopirrolizidinas o de los macrociclos sobre *G. lamblia* o sobre algún otro parásito que afecte al humano o algún otro mamífero. Las únicas evaluaciones de las que se tiene conocimiento para estos compuestos son, como agentes antioxidantes (para el caso de las benzopirrolizidinas) (Miranda & Hernández-Vázquez, 2015) y como agentes quimioterapéuticos para tratar el cáncer (para el caso de los macrociclos) (Hernández-Vázquez et al., 2018). Para el caso de la pirazin-2-ona, existe un reporte en donde el núcleo de pirazinona se fusionó con nitroimidazoles para generar compuestos 2-nitroimidazopirazin-ona, los cuales tienen actividad anti-tubercular y antiparasitaria contra los protozoarios *G. lamblia* y *Trypanosoma brucei* (Jarrad et al., 2018).

## 8.2 Validación de la actividad giardicida de los andamios identificados.

Con el objetivo de validar la actividad giardicida de los andamios identificados, se evaluó una segunda biblioteca química compuesta por homólogos a estos compuestos. Como puede apreciarse en la tabla 3, por lo menos un compuesto perteneciente a cada una de las tres series evaluadas presentó porcentajes de muerte sobre los trofozoítos del parásito mayores al 50% a la máxima concentración evaluada (100  $\mu$ M).

**Tabla 3. Actividad citotóxica sobre trofozoítos de *G. lamblia* de los compuestos análogos a los andamios identificados con actividad en el tamizado primario.**

Clase de compuesto	Clave del compuesto	Porcentaje promedio de muerte celular a diferentes concentraciones		
		100 $\mu$ M	50 $\mu$ M	25 $\mu$ M
Análogos a las Benzopirrolizidinas	<b>EHV-110-106</b>	<b>89.2 (8.2)</b>	13.4 (0.9)	2.7 (2.1)
	<b>EHV-110-135</b>	<b>98.8 (1.1)</b>	<b>97.5 (1.2)</b>	37.7 (1.1)
	EHV-110-146	24.5 (8.2)		
	EHV-110-173	7.1 (5.6)		
	EHV-110-178	17.9 (10.3)		
Análogos a la pirazin-2-ona.	EHV-110MC-35	23.1 (2.6)		
	EHV-110MC-40	2.1 (2.2)		
	EHV-110MC-44	31.0 (7.2)		
	EHV-110MC-48	2.7 (2.1)		
	EHV-110MC-50	15.7 (1.1)		
	EHV-110MC-54	21.9 (2.8)		
	EHV-110MC-56	26.0 (4.4)		
	EHV-110MC-58	20.5 (2.1)		
	<b>EHV-110MC-60</b>	<b>50.1 (5.6)</b>	34.9 (1.8)	
EHV-110MC-62	27.8 (5.9)			
Análogos a los triazol bis (aril éter) macrociclos.	EHV-110MC-66	39.7 (4.6)		
	EHV-110MC-68	14.1 (4.2)		
	<b>EHV-110MC-70</b>	<b>69.5 (8.6)</b>	16.4 (5.1)	
	<b>EHV-110MC-74</b>	<b>73.0 (8.5)</b>	<b>54.0 (3.1)</b>	
	<b>EHV-110MC-76</b>	<b>48.6 (8.3)</b>	13.1 (0.1)	
	EHV-110MC-78	2.4 (3.3)		
	EHV-110MC-80	25.4 (4.4)		
	EHV-110MC-82	5.0 (4.1)		
	EHV-110MC-84	15.3 (10.5)		
EHV-110MC-86	0.4 (2.3)			
Controles	<b>Tinidazol</b>	<b>100.7 (0.5)</b>		
	<b>Metronidazol</b>	<b>100.1 (0.6)</b>		
	DMSO	6.5 (5.5)		

Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. En negritas se resaltan los porcentajes de muerte celular mayores al 50%. Entre paréntesis se indica el valor de desviación estándar.

De igual manera a como se observó en el cribado primario (tabla 2), los análogos benzopirrolizidínicos fueron los compuestos que presentaron una mayor actividad antiparasitaria en comparación con los análogos de las otras dos series evaluadas. Dos de los cinco compuestos benzopirrolizidínicos tuvieron porcentajes de muerte celular cercanos al 90% a la concentración de 100  $\mu\text{M}$ , e inclusive uno de estos siguió presentado este nivel de muerte celular a 50  $\mu\text{M}$ . Por el contrario, los análogos de la pirazin-2-ona fueron los que presentaron la peor actividad, puesto que de los diez compuestos estudiados, solo uno presentó una actividad apenas superior al 50% a la máxima concentración evaluada. Por otra parte, los análogos macrocíclicos mostraron actividades intermedias con compuestos que tuvieron actividades cercanas al 70% de muerte celular a 100  $\mu\text{M}$ .

Con base en los resultados obtenidos del cribado primario y de la confirmación de los andamios, se puede deducir que de las tres clases de compuestos identificados con actividad giardicida, los compuestos benzopirrolizidínicos son los que exhiben la mejor actividad contra el parásito. Esto ha conllevado a enfocar el desarrollo del estudio en esta clase de compuestos y dejar de lado a los macrociclos y a los compuestos derivados de la pirazin-2-ona.

### **8.3 El andamio benzopirrolizidínico como punto de inicio para el desarrollo de nuevos fármacos anti-giardíacos**

En el proceso del desarrollo de nuevos fármacos, una vez identificado los compuestos que presentan la actividad deseada a través del cribado farmacológico, es necesario valorar si estos son adecuados para seguir investigándolos y servir como puntos de inicio para el desarrollo farmacológico. Dentro de los factores comúnmente evaluados para medir la calidad de los hits o de los andamios identificados y decidir si progresa hacia etapas más avanzadas del desarrollo de nuevos fármacos se encuentran: la novedad de la molécula, la accesibilidad sintética, su reactividad y toxicidad, y la medición de índices moleculares para juzgar su idoneidad como fármaco (Hevener et al., 2018).

Con el objetivo de valorar la calidad del andamio benzopirrolizidinico se investigó en primera instancia su novedad como molécula. Para ello se realizó la búsqueda de moléculas bioactivas que tuvieran similitud estructural con el núcleo de benzopirrolizidina utilizando el servidor SwissSimilarity del Instituto Suizo de Bioinformática (Zoete et al., 2016). La búsqueda realizada en las bases de datos de fármacos ya aprobados por la FDA y de fármacos que se encuentran en experimentación o en investigación, así como en las bases de datos químicas de moléculas bioactivas con propiedades tipo farmacéuticas (como ChEMBL y ChEBI), no arrojó ninguna similitud dentro de un total de 405,858 moléculas analizadas. Tampoco se encontraron compuestos con similitudes estructurales mayores al 80% cuando se realizó la búsqueda en base de datos de moléculas disponibles en el mercado (como Zinc, ChemBridge, ChemDiv, Enamine, Asinex y Sigma-Aldrich). Estos resultados indican que esta clase de moléculas identificadas con actividad giardicida, en donde el andamio benzopirrolizidinico es la estructura central, es novedosa estructuralmente y que hasta la fecha en que se está escribiendo este estudio no existen moléculas bioactivas que tengan similitud alguna.

Un segundo aspecto importante que se evaluó en el andamio de benzopirrolizidina fue la búsqueda de características que le pudieran impartir reactividad o toxicidad. Esto se realizó a través del análisis visual de la estructura del andamio en busca de grupos funcionales químicamente reactivos (grupos acilantes, alquilantes, aldehídos, cetonas, heterociclos reactivos) y de grupos toxicóforos (quinonas, anilinas, grupos nitro-aromáticos, entre otros) (Hevener et al., 2018); y se verificó a través del servidor SwissADME del Instituto Suizo de Bioinformática (Daina et al., 2017). Se encontró como única estructura de alerta la presencia de un aceptor de Michael, el cual es un carbonilo  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado considerado como grupo reactivos que pueden generar aductos covalentes con grupos tioles y por tanto generan actividad inespecífica (Schultz et al., 2007).

Sin embargo, los resultados del cribado primario y secundario sugieren que a pesar de la presencia de un aceptor de Michael en la estructura del andamio de benzopirrolizidina, el mecanismo de acción de estos compuestos es específico, es decir, actuar sobre un blanco farmacológico en particular. Esto debido a que, como puede observarse, si bien el núcleo de benzopirrolizidina es importante para la actividad de la molécula, no todos los compuestos que lo tienen son activos; sólo aquellos que poseen los sustituyentes adecuados y en las posiciones correctas son los que tienen actividad antiparasitaria. Sin embargo, será necesario realizar estudios más profundos de relación estructura-actividad e identificar el blanco biológico sobre el cual actúen estos compuestos para confirmar esta idea.

Para tener una visión más real del efecto tóxico que estos compuestos pueden tener sobre células de mamífero, se realizó la evaluación de su actividad citotóxica sobre queratinocitos humanos inmortalizados y se comparó contra la actividad citotóxica sobre los trofozoítos de *Giardia lamblia*. Para este estudio se calcularon los valores de IC50, tanto sobre los trofozoítos del parásito (tabla 4) como sobre los queratinocitos humanos (tabla 5), de los tres compuestos benzopirrolizidínicos identificados con actividad en el cribado primario.

De los tres compuestos evaluados, la molécula identificada como EHV-110-174 fue la que mostró los resultado más sobresalientes, al tener una actividad citotóxica sobre el parásito con una IC50 de 10.9  $\mu\text{M}$ , muy cercana a los valores para el metronidazol y el tinidazol (IC50 de 2.6  $\mu\text{M}$  y 1.3  $\mu\text{M}$ , respectivamente). Además este compuesto, junto con la molécula EHV-110-160, presenta una citotoxicidad sobre los queratinocitos humanos menor en comparación con los fármacos tinidazol y metronidazol. Un aspecto que nos llamó la atención en este estudio fue que a mayor actividad citotóxica de los compuestos benzopirrolizidínicos sobre los trofozoítos del parásito, menor su citotoxicidad sobre la línea celular humana evaluada.

**Tabla 4. Actividad citotóxica sobre trofozoítos de *Giardia lamblia* de los Hits benzopirrolizidinicos identificados en el tamizado primario.**

Clave del compuesto	IC50 (µM)
EHV-110-154	33.7 (0.5)
EHV-110-160	22.3 (0.4)
EHV-110-174	10.9 (1.7)
<b>Controles</b>	
Tinidazol	1.3 (0.3)
Metronidazol	2.6 (0.3)
Albendazol	0.13 (0.002)
Cada compuesto fue evaluado por triplicado. Entre paréntesis valores de desviación estándar.	

**Tabla 5. Actividad citotóxica sobre células HaCaT (queratinocitos humanos) de los Hits benzopirrolizidinicos identificados en el tamizado primario.**

Clave del compuesto	IC50 (µM)
EHV-110-154	50.6 (4.1)
EHV-110-160	141.0 (1.8)
EHV-110-174	129.9 (4.8)
<b>Controles</b>	
Tinidazol	60.90 (5.0)
Metronidazol	71.86 (6.1)
Cada compuesto fue evaluado por triplicado. Entre paréntesis valores de desviación estándar.	

Finalmente el último aspecto que se evaluó al andamio benzopirrolizidinico fue su idoneidad para servir como estructura guía para el desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios. Esto se realizó a través del cálculo de índices moleculares que describen las propiedades fisicoquímicas que hacen favorables a los compuestos químicos para comportarse como fármacos, es decir, tener propiedades farmacocinéticas idóneas para poder absorberse, distribuirse y excretarse *in vivo*. El cálculo de los índices se realizó a través del servidor SwissADME del Instituto Suizo de Bioinformática (Daina et al., 2017). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas calculadas para el andamio de benzopirrolizidina.**

<b>Formula</b>	C19H16N2O2
<b>Peso molecular (P.M.)</b>	304.34 g/mol
<b>Número de átomos pesados</b>	23
<b>Número de enlaces rotables</b>	2
<b>Número de aceptores de hidrógeno</b>	2
<b>Numero de donadores de hidrógeno</b>	1
<b>Refractividad molar</b>	90.79
<b>Área de Superficie Polar Topológica (TPSA)</b>	63.40 Å <sup>2</sup>
<b>cLogP</b>	2.02

Con base en las propiedades fisicoquímicas calculadas para el andamio de benzopirrolizidina y siguiendo los criterios de Teague (Teague et al., 1999), se puede establecer que el núcleo de benzopirrolizidina posee las características idóneas (P.M. < 350; actividad < 0.1 µM; ClogP < 3) para servir como estructura líder que guie hacia el desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios. Estos valores son adecuados para optimizar el núcleo de benzopirrolizidina hacia una molécula con mayor afinidad, sin que se viole alguna de las reglas asociadas a la biodisponibilidad oral de los fármacos *in vivo*; como la regla de Lipinski (P.M. < 500 g/mol; clogP < 5.0; número de donadores de hidrógeno < 5; número de aceptores de hidrógeno < 10) o la regla de Veber (número de enlaces rotables < 10; TPSA < 140 Å<sup>2</sup>), entre otras (Lipinski et al., 2001; Veber et al., 2002).



## 8.4 Estudio del mecanismo de acción de los hits.

La realización de estudios morfológicos sobre células o tejidos, es una estrategia muy accesible que brinda un panorama general del mecanismo de acción por el cual un fármaco actúa. Debido a ello, fueron llevados a cabo estudios de microscopía para evaluar el efecto que tienen los compuestos benzopirrolizidínicos sobre los trofozoítos del parásito *Giardia lamblia*.

Los cambios morfológicos más notorios, observados por microscopía de campo claro, que presentaron los trofozoítos expuestos a los compuestos benzopirrolizidínicos fueron: alteraciones nucleares, acortamiento de flagelo y pérdida de la azurofilia del citoplasma, la cual se relaciona con el nivel de daño nuclear y celular. Sin embargo, aunque hay un cierto grado de cambio en la morfología celular, éstas mantienen su forma periforme (Figura 7, imágenes E-H).

Estos cambios morfológicos son bastante generales siendo también observados en mayor o menor grado en los trofozoítos tratados con los controles nitroimidazoles (Figura 7, imágenes B-C). Debido a que los trofozoítos tratados con las benzopirrolizidinas no presentan pérdida de su forma celular, en comparación a como puede observarse en los trofozoítos expuestos al albendazol (Figura 7, imágenes D), se podría plantear la posibilidad de que no estén actuando a nivel del citoesqueleto.

Una característica bastante llamativa observada en las células expuestas a las benzopirrolizidinas y que no se presenta con los controles, es el hecho de que un número considerable de trofozoítos pierden uno de sus dos núcleos total o parcialmente (como puede observarse en la figura 7, imágenes E-H; indicado por flechas). Esto plantea la posibilidad de que este tipo de compuestos actúen a nivel nuclear.

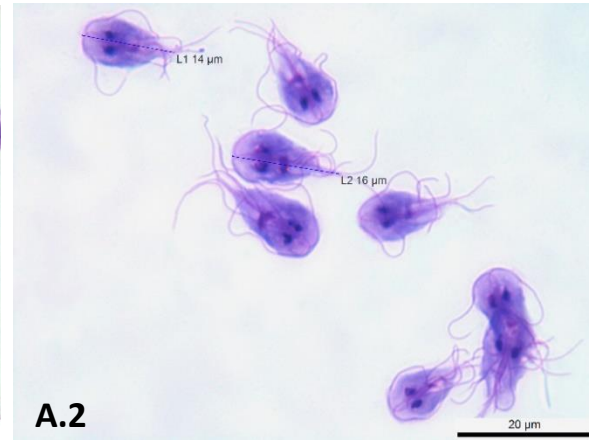
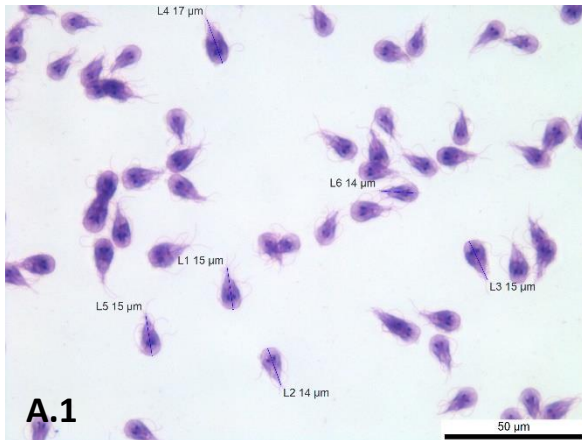
Al analizar los cambios morfológicos a nivel ultraestructural, mediante microscopia electrónica de transmisión, se fortalece el planteamiento de que los compuestos benzopirrolizidínicos posiblemente actúen a nivel nuclear. Como puede observarse en la figura 8 (imágenes D 1, 2, 3 y 6, indicado por asteriscos) en los núcleos de los trofozoítos es en donde se observan los cambios ultra estructurales más notorios de los trofozoítos expuestos al compuesto EHV-110-174; en éstos, puede notarse que hay condensación de la cromatina que le confieren al núcleo un patrón moteado. Esta alteración nuclear no se observó en los trofozoítos tratados con los controles (Figura 8, imágenes A-C).

Hasta el momento no se han encontrado reportes en donde se describan que estos dos cambios morfológicos (perdida de un núcleo y condensación de la cromatina) sobre los trofozoítos de *Giardia lamblia* hayan sido observados por otros compuestos que también tienen actividad giardicida. Estos resultados por tanto sugieren que los compuestos benzopirrolizidínicos ejercen actividad giardicida a través de mecanismos de acción distintos a los ya conocidos.

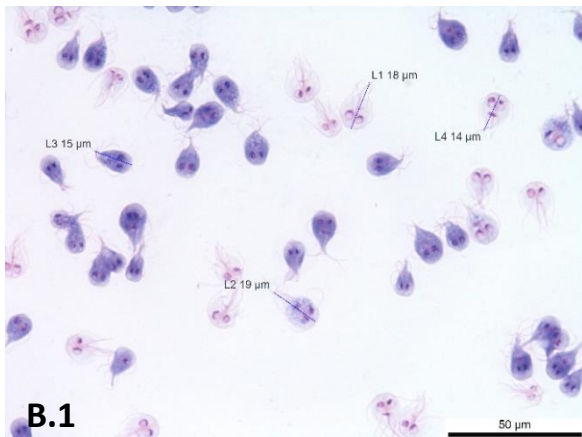
Otro cambio ultraestructural relevante observado en los trofozoítos cultivados en presencia del compuesto EHV-110-174 y que no se observa en los controles, es la aparición de estructuras membranosas prominentes dentro del citoplasma celular (Figura 8, imágenes D 1, 3, 4,5 y 6, indicado por asteriscos). La identidad y el origen de estas estructuras se desconocen actualmente pero se sigue investigando en ello. Se ha encontrado que la robenidina (Abraham et al., 2019) también causa la aparición de estas estructuras membranosas, aunque con un tamaño mucho menor. Así mismo, este tipo de estructuras en el parásito se ha observado con el uso de la nitazoxanida (Muller et al., 2006).

Finalmente, debido a que no se observan alteraciones a nivel del disco de adhesión en los trofozoítos tratados con el compuesto benzopirrolizidínico (en comparación a lo observado con el control de albendazol; Figura 8B), se consolida la idea de que no esté actuando a nivel del citoesqueleto.

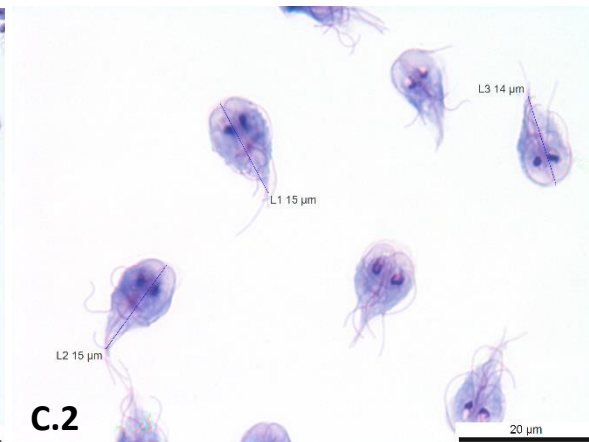
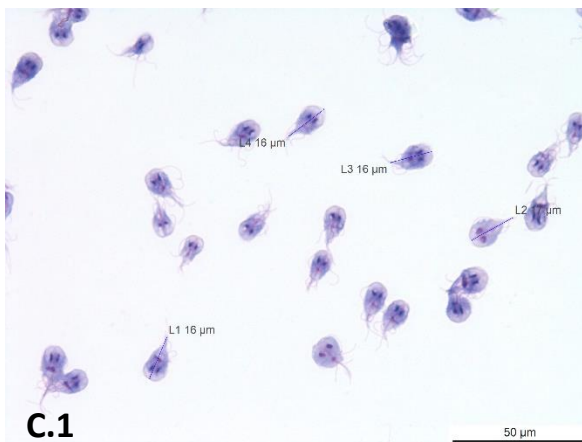
**A. Sin tratamiento**



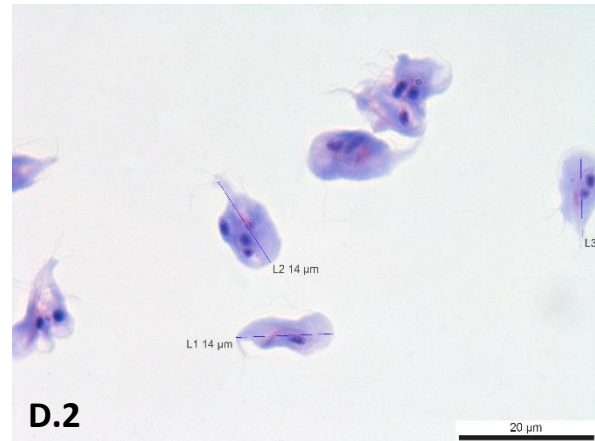
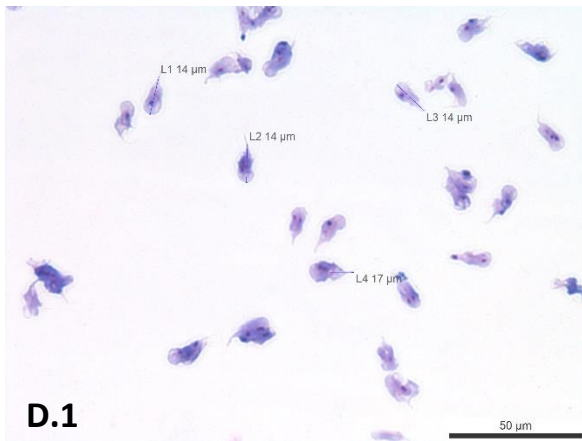
**B. Control metronidazol**



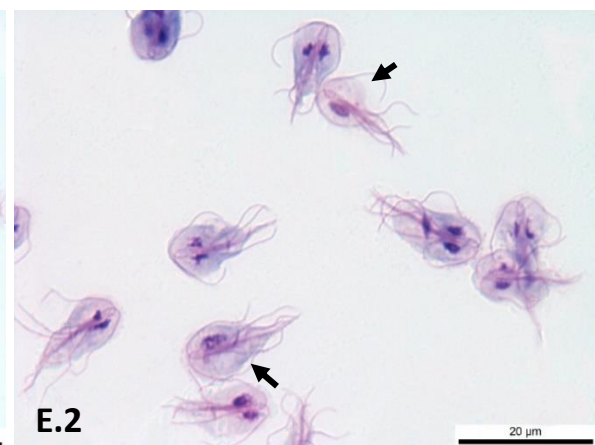
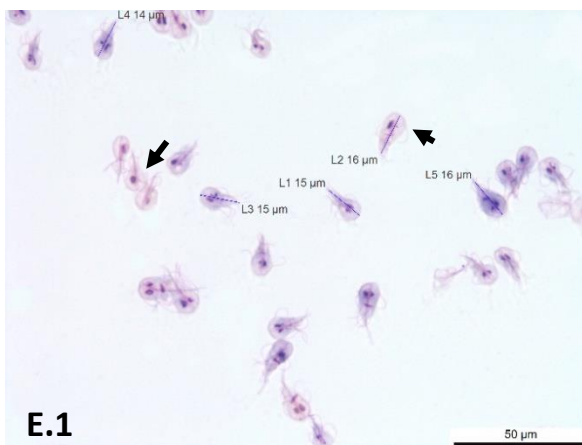
**C. Control tinidazol**



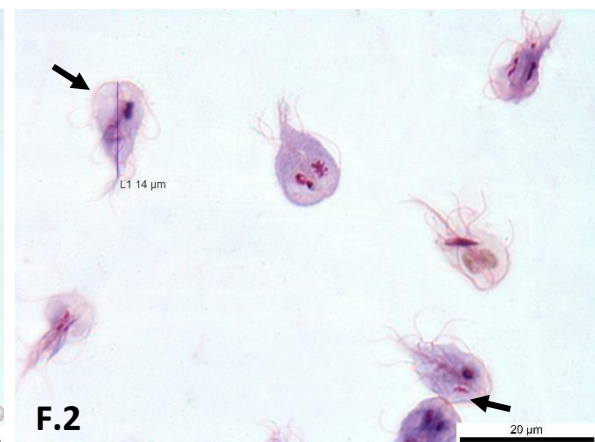
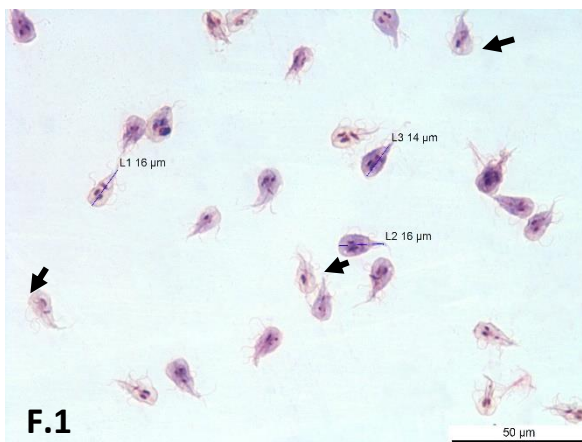
**D. Control albendazol**



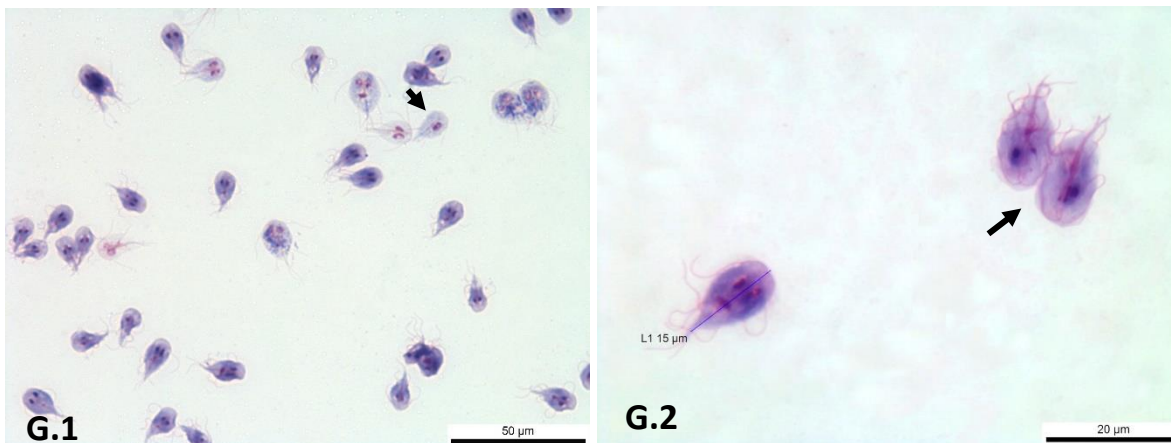
**E. Compuesto EHV-110-174**



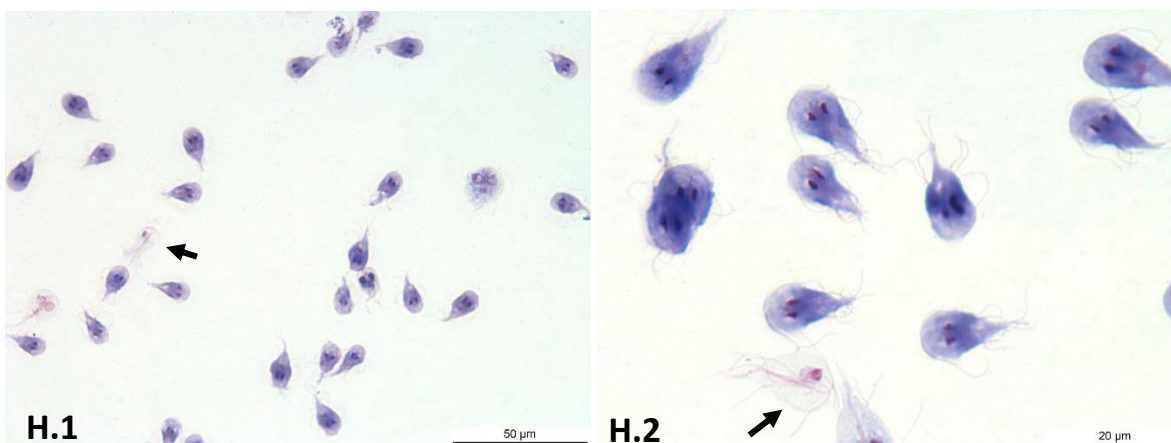
**F. Compuesto EHV-110-154**



### G. Compuesto EHV-110-160



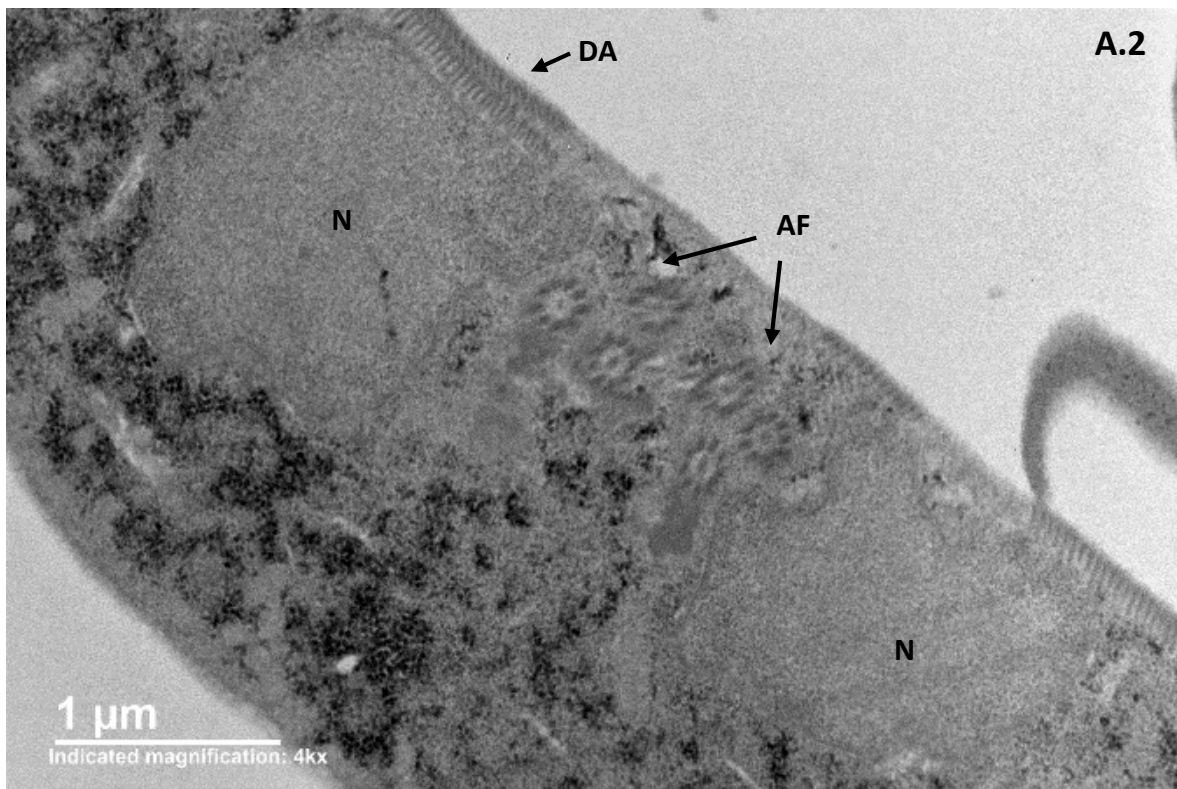
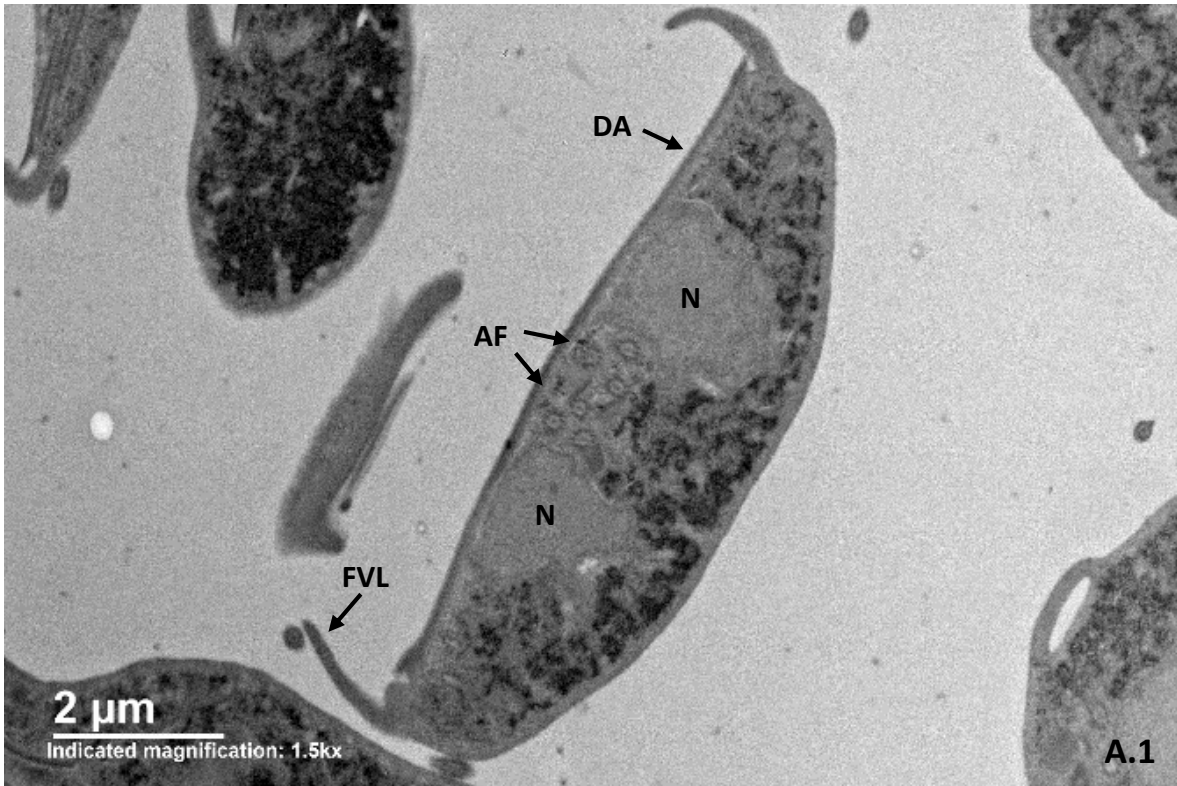
### H. Compuesto EHV-110-135



**Figura 7. Efectos morfológicos de las benzopirrolizidinas sobre los trofozoítos de *Giardia lamblia* cepa WB.** Los trofozoítos de *Giardia* se expusieron a las concentraciones de IC<sub>50</sub> de cada uno de los compuestos benzopirrolizidínicos que mostraron mayor actividad en el cribado farmacológico y de los controles, durante 24 horas. Posteriormente se montaron en portaobjetos, se fijaron y se tiñeron con giemsa. A; Control sin tratamiento. B; Control metronidazol (IC<sub>50</sub>: 2.6 µM). C; Control tinidazol (IC<sub>50</sub>: 1.3 µM); D; Control albendazol (IC<sub>50</sub>: 130 nM). E; Compuesto EHV-110-174 (IC<sub>50</sub>: 10.9 µM). F; Compuesto EHV-110-154 (IC<sub>50</sub>: 33.7 µM). G; Compuesto EHV-110-160 (IC<sub>50</sub>: 22.3 µM). H; Compuesto EHV-110-135 (28 µM). Con flechas se indican los cambios observados a nivel nuclear. Imágenes con subíndices 1: Objetivo 40X. Imágenes con subíndice 2: Objetivo 100X.

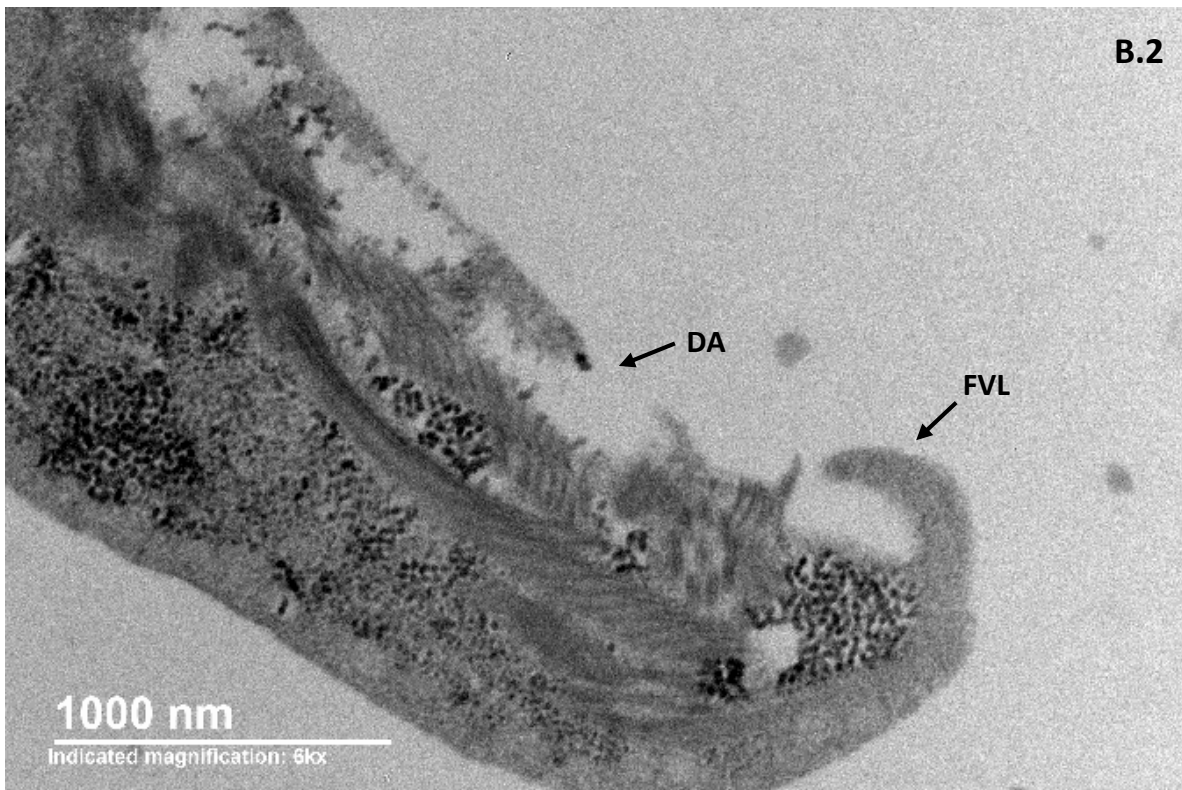
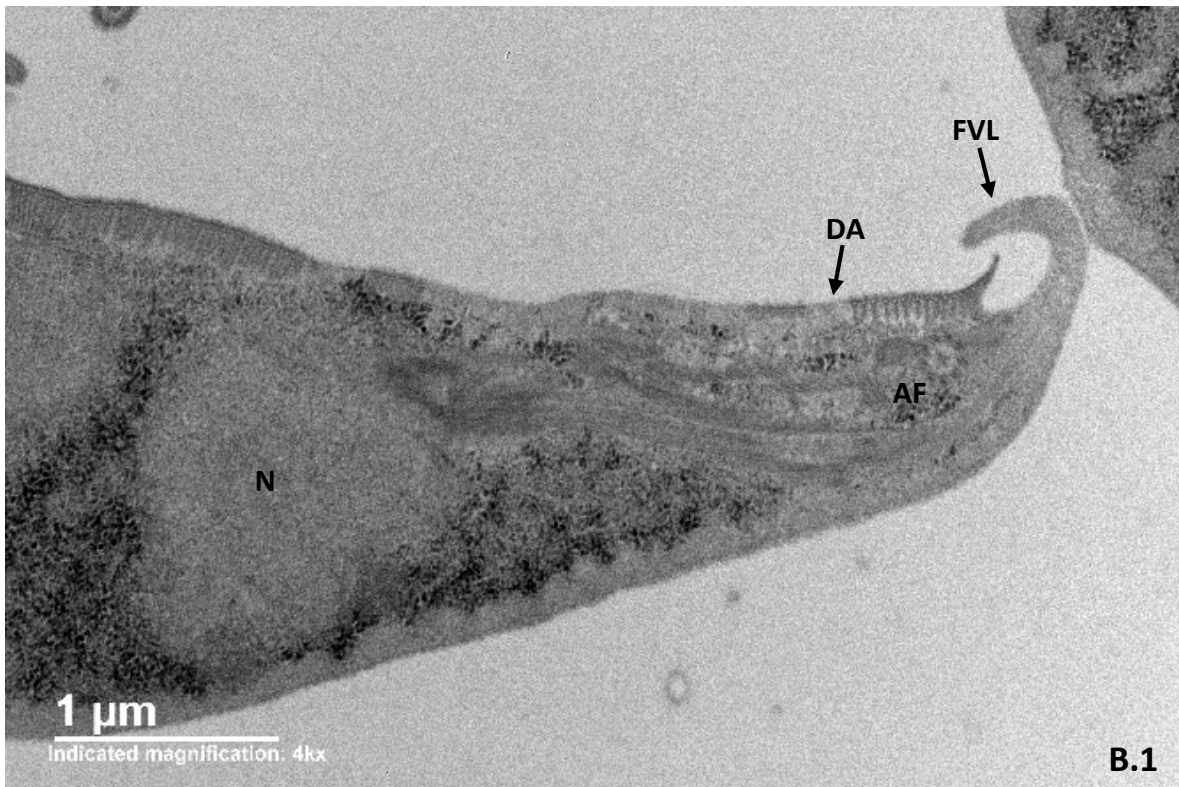


**A. Sin tratamiento**



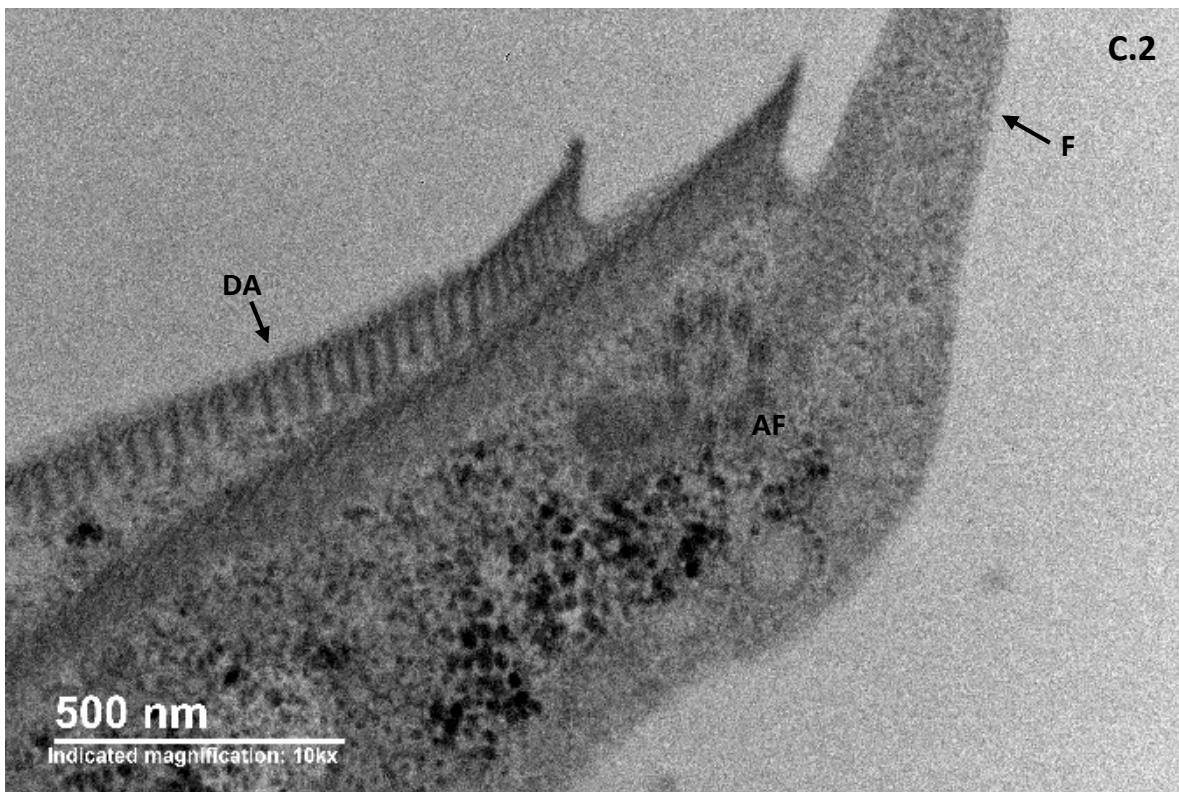
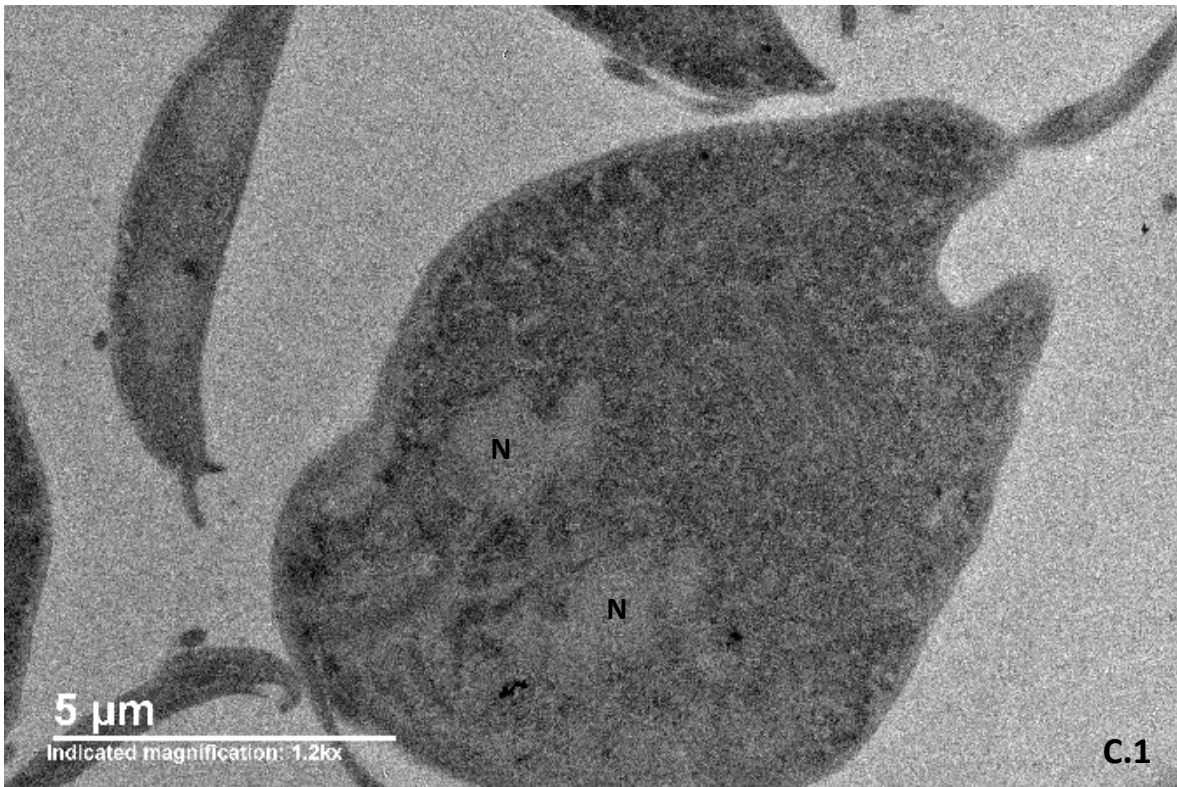


## B. Control Albendazol



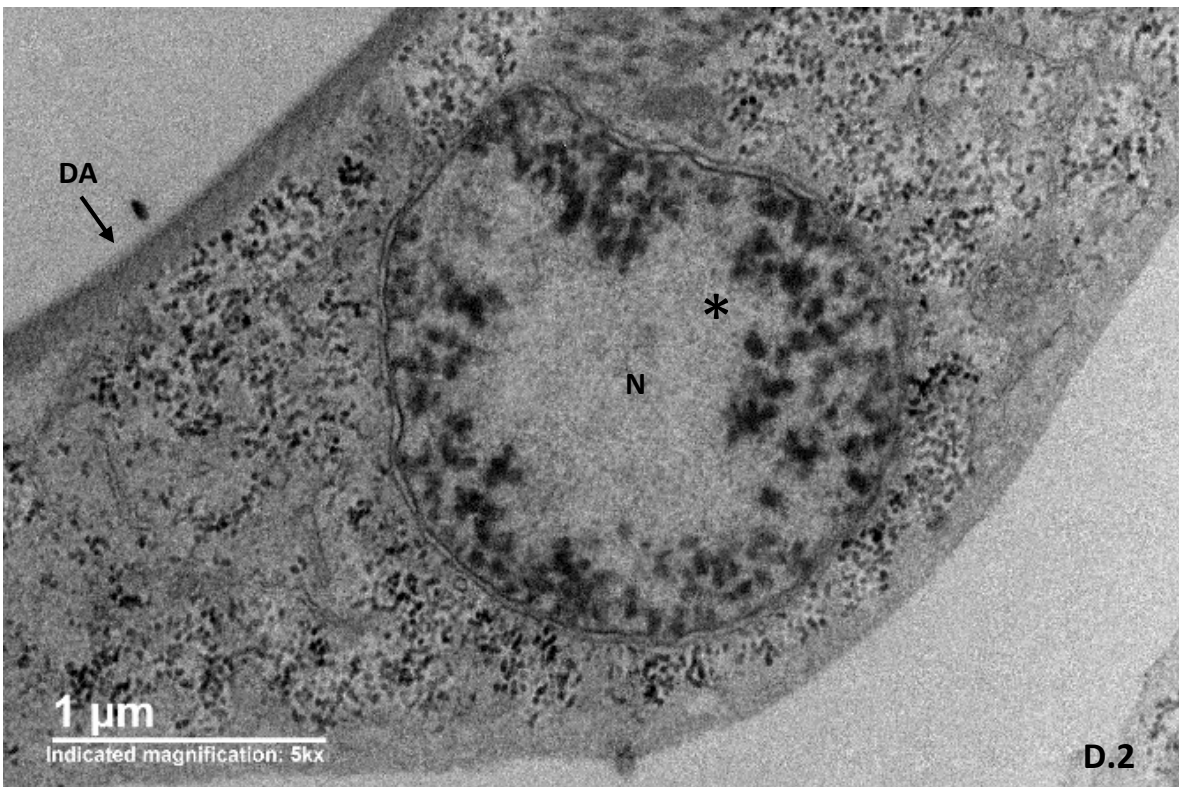
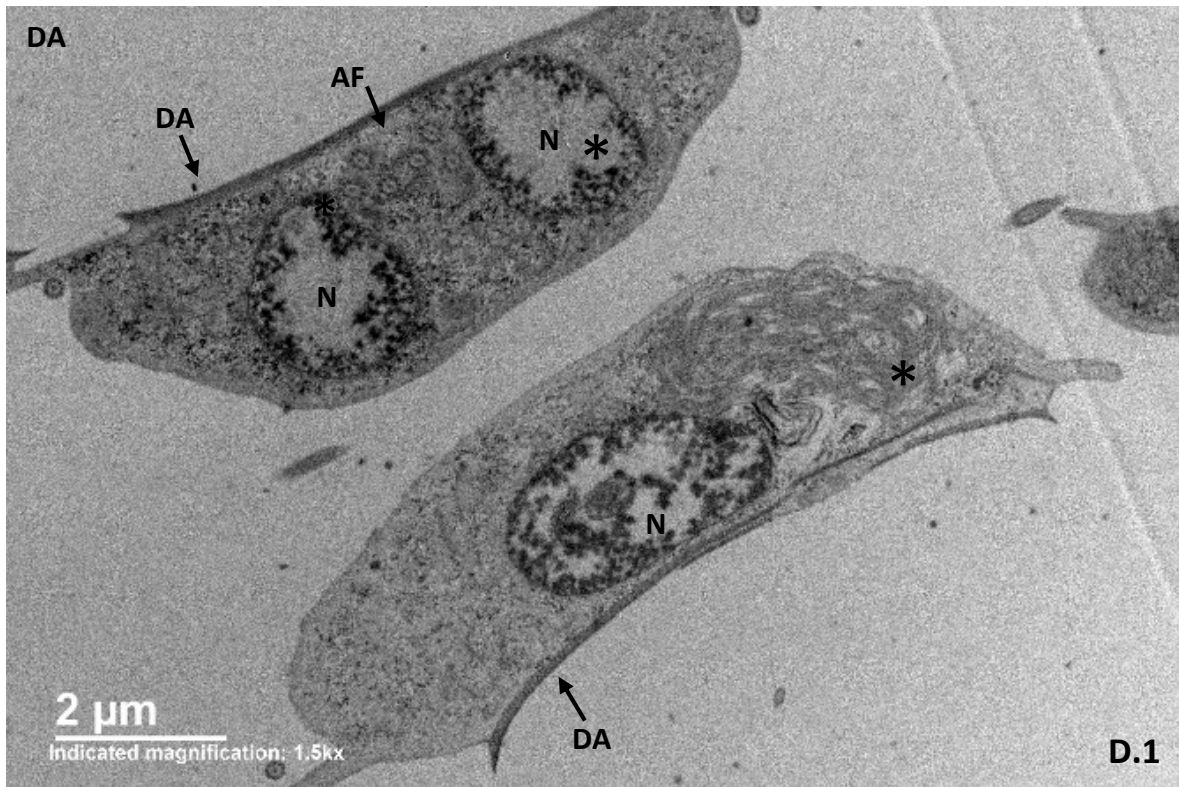


### C. Control Tinidazol

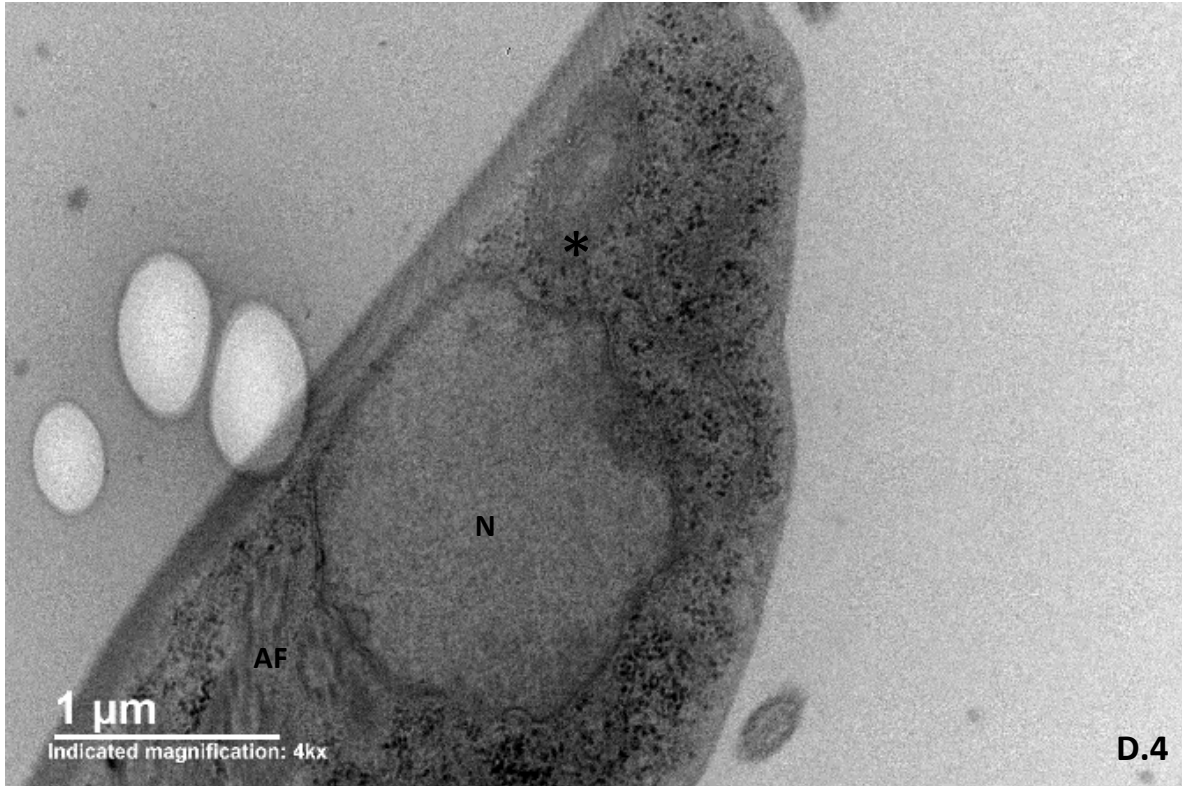
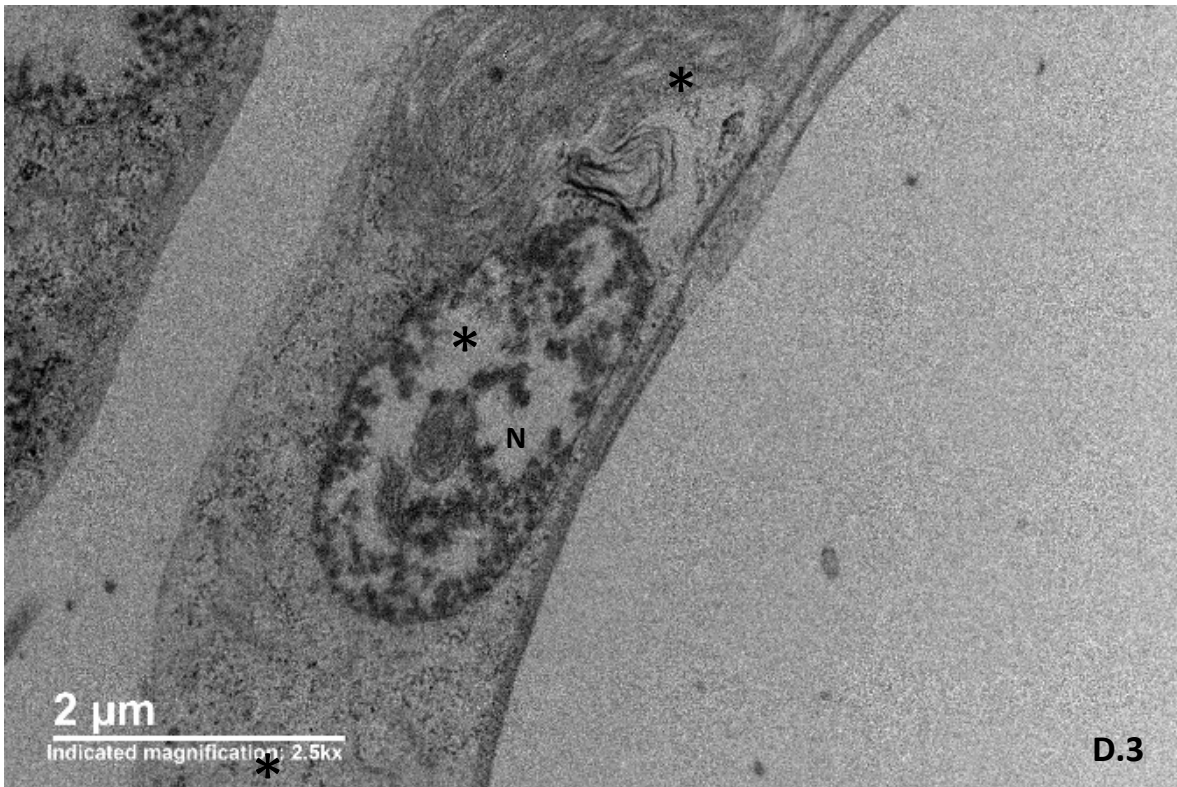




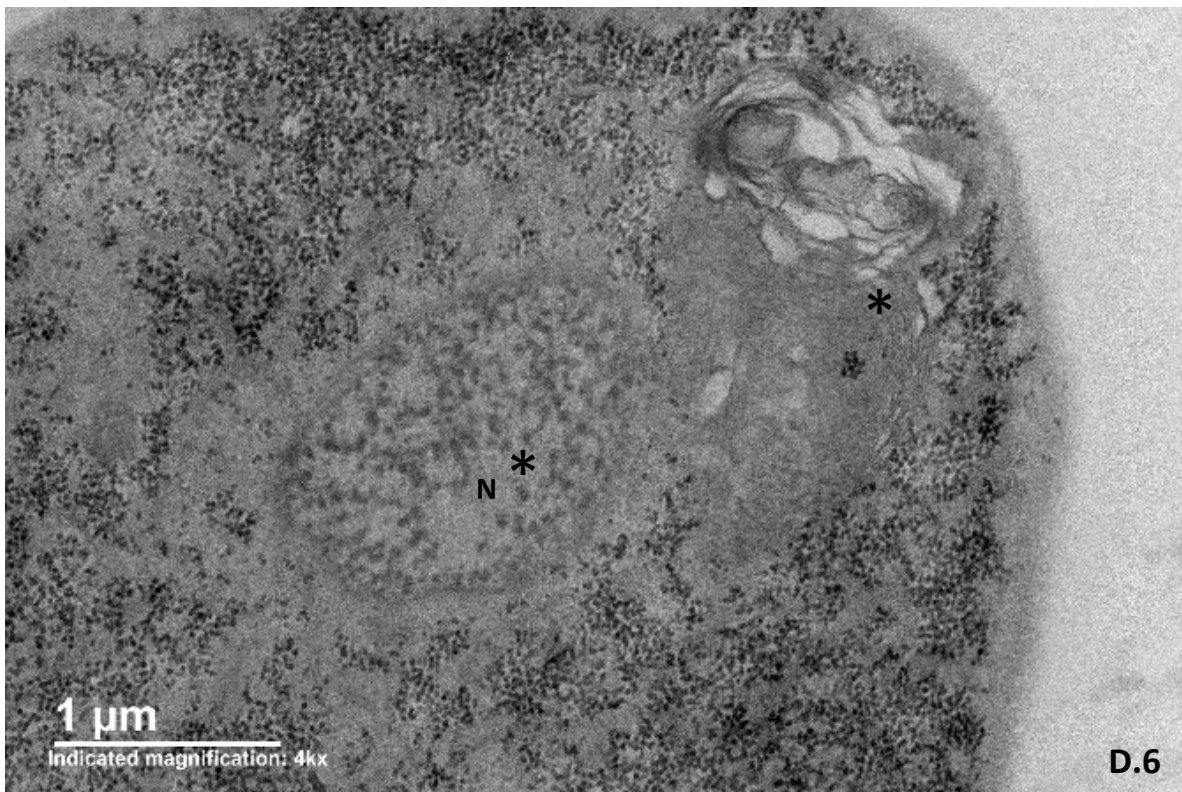
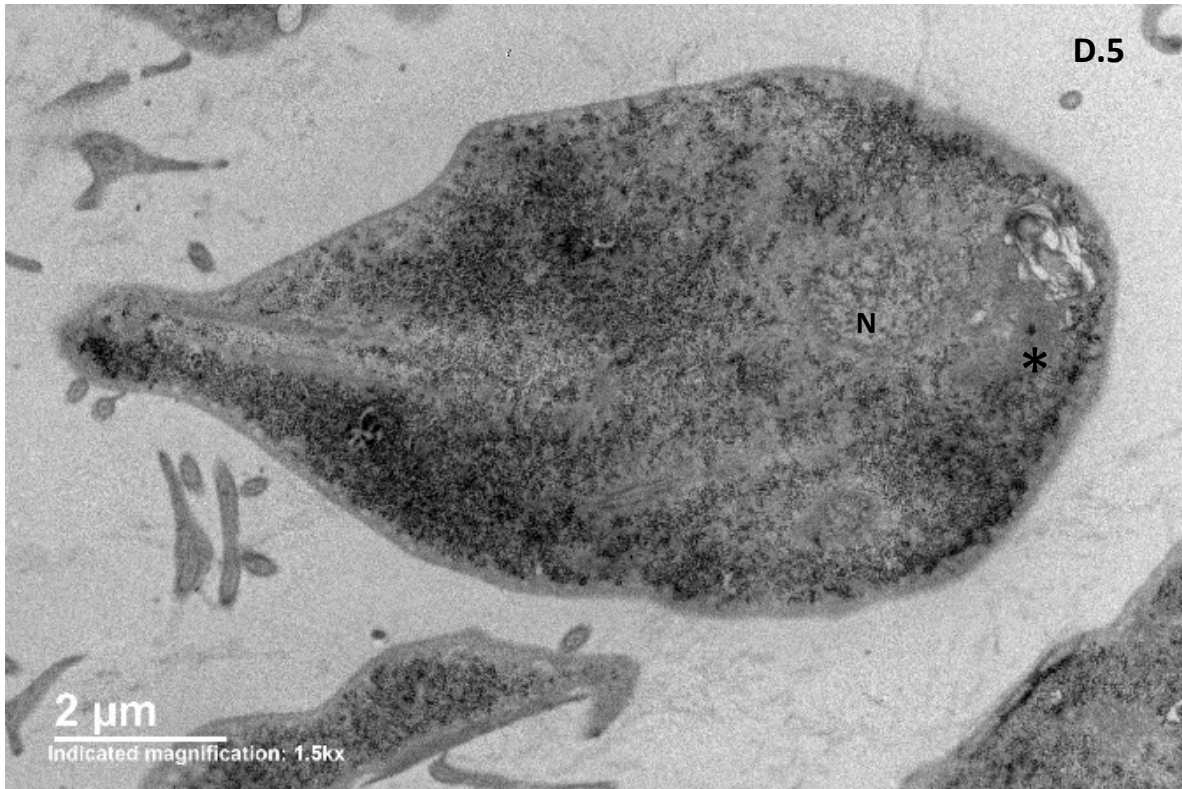
D. Compuesto EHV-110-174











**Figura 8. Microscopia electrónica de transmisión de los trofozoítos de *Giardia lamblia* cepa WB tratados con benzopirrolizidinas.** Los trofozoítos de *Giardia* se expusieron a las concentraciones de los IC50 del compuesto benzopirrolizidínico EHV-110-174 y de los controles, durante 24 horas. A; Control sin tratamiento. B; Control albendazol (IC50: 130 nM). C; Control tinidazol (IC50: 1.3  $\mu$ M). D; Compuesto EHV-110-174 (IC50: 10.9  $\mu$ M). Los principales elementos estructurales que se observan son: núcleos (N); disco de adhesión (DA); los axonemas flagelares (AF) que se originan en dos pares de cuerpos basales entre los núcleos; y flagelos ventro-laterales (FVL). Con asteriscos se indican los cambios nucleares y las estructuras membranosas observadas. Imágenes adquiridas utilizando el microscopio electrónico de transmisión JEOL-JEM-1200.

## 9. CONCLUSIÓN

A través del cribado farmacológico se ha identificado un andamio benzopirrolizidinico como una nueva estructura molecular que presenta actividad contra el parásito *Giardia lamblia*.

Este andamio de benzopirrolizidina posee las características necesarias para poder utilizarse como punto de inicio en el desarrollo de nuevos fármacos anti giardiásicos.

Finalmente, los resultados obtenidos sugieren que esta estructura molecular ejerce actividad giardicida a través de mecanismos de acción distintos a los ya conocidos, lo que abre la puerta hacia el descubrimiento de nuevos blancos farmacológicos.

## 10. PERSPECTIVAS

Mediante estudios en modelos animales se podrá evaluar el efecto farmacológico y tóxico que estos compuestos presentan en organismos más complejos a fin de tener un primer panorama con respecto a estos dos aspectos.

A través de la evaluación de compuestos análogos a las benzopirrolizidinas se podrá llevar a cabo estudios de relación estructura-actividad los cuales serán de gran utilidad para guiar el proceso de optimización de la actividad de esta clase de compuestos.

La identificación del o de los blancos farmacológicos sobre los cuales actúen las benzopirrolizidinas permitirá dilucidar su mecanismo de acción giardicida, y también permitirá estudiar la existencia de “off-targets”. Así mismo, facilitará la optimización de este tipo de compuestos para generar estructuras líderes que sirvan como puntos de inicio para el desarrollo de nuevos fármacos. Y en general, la identificación de la diana biológica y el estudio de su función, permitirá tener una mayor comprensión sobre la biología de este parásito.

## 11. REFERENCIAS

AAT Bioquest, Inc. (2019, October 09). Quest Graph™ IC50 Calculator. Obtenido de <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>.

Abraham, R. J., Abraham, S., Stevens, A. J., Page, S. W., McCluskey, A., Trott, D. J., & O'Handley, R. M. (2019). Aminoguanidines: New leads for treatment of *Giardia duodenalis* infection. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 10, 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.04.003>

Adam, R. D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 447-475. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.447-475.2001>

Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., & Svärd, S. G. (2010). Behind the smile: Cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 413-422. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2317>

Ashburn, T. T., & Thor, K. B. (2004). Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(8), 673-683. <https://doi.org/10.1038/nrd1468>

Bartelt, L. A., & Sartor, R. B. (2015). Advances in understanding *Giardia*: Determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000Prime Reports*, 7. <https://doi.org/10.12703/P7-62>

Capparelli, E. V., Bricker-Ford, R., Rogers, M. J., McKerrow, J. H., & Reed, S. L. (2017). Phase I Clinical Trial Results of Auranofin, a Novel Antiparasitic Agent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(1), e01947-16, [/aac/61/1/e01947-16.atom](https://doi.org/10.1128/AAC.01947-16). <https://doi.org/10.1128/AAC.01947-16>

Carranza, P. G., & Lujan, H. D. (2010). New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microbes and Infection*, 12(1), 71-80. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.09.008>

Carter, E. R., Nabarro, L. E., Hedley, L., & Chiodini, P. L. (2018). Nitroimidazole-refractory giardiasis: A growing problem requiring rational solutions. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(1), 37-42. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.05.028>

Castillo-Villanueva, A., Rufino-González, Y., Méndez, S.-T., Torres-Arroyo, A., Ponce-Macotela, M., Martínez-Gordillo, M. N., Reyes-Vivas, H., & Oria-Hernández, J. (2017). Disulfiram as a novel inactivator of *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase with anti-giardial potential. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 7(3), 425-432. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2017.11.003>

Chen, C. Z., Kulakova, L., Southall, N., Marugan, J. J., Galkin, A., Austin, C. P., Herzberg, O., & Zheng, W. (2011). High-Throughput *Giardia lamblia* Viability Assay Using Bioluminescent ATP Content Measurements. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(2), 667-675. <https://doi.org/10.1128/AAC.00618-10>

Colín-Lozano, B., León-Rivera, I., Chan-Bacab, M. J., Ortega-Morales, B. O., Moo-Puc, R., López-Guerrero, V., Hernández-Núñez, E., Argüello-García, R., Scior, T., Barbosa-Cabrera, E., & Navarrete-Vázquez, G. (2017). Synthesis, in vitro and in vivo giardicidal activity of nitrothiazole-NSAID chimeras displaying broad antiprotozoal spectrum. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(15), 3490-3494. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.05.071>

Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(1), 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>

Davids, B. J., & Gillin, F. D. (2011). Methods for *Giardia* Culture, Cryopreservation, Encystation, and Excystation In Vitro. En H. D. Luján & S. Svärd (Eds.), *Giardia* (pp. 381-394). Springer Vienna. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0198-8\\_23](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0198-8_23)

Dawson, S. C., & House, S. A. (2010). Life with eight flagella: Flagellar assembly and division in *Giardia*. *Current Opinion in Microbiology*, 13(4), 480-490. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.05.014>



Eckstein J. ISOA/ARF Drug Development Tutorial. Institute for the Study of Aging and Alzheimer Research Forum. 2005. (Disponible a través de la página [www.alzforum.org](http://www.alzforum.org)).

Elmendorf, H. G., Dawson, S. C., & McCaffery, J. M. (2003). The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology*, 33(1), 3-28. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00228-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00228-X)

Esch, K. J., & Petersen, C. A. (2013). Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 58-85. <https://doi.org/10.1128/CMR.00067-12>

Escobedo, A. A., & Cimerman, S. (2007). Giardiasis: A pharmacotherapy review. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 8(12), 1885-1902. <https://doi.org/10.1517/14656566.8.12.1885>

Ettmayer, P., Schnitzer, R., Bergner, A., & Nar, H. (2017). Hit and Lead Generation Strategies. En *Comprehensive Medicinal Chemistry III* (pp. 33-63). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12313-3>

Galkin, A., Kulakova, L., Lim, K., Chen, C. Z., Zheng, W., Turko, I. V., & Herzberg, O. (2014). Structural Basis for Inactivation of *Giardia lamblia* Carbamate Kinase by Disulfiram. *Journal of Biological Chemistry*, 289(15), 10502-10509. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.553123>

Gardner, T., & Hill, D. (2001). Treatment of Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(1), 114-128. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.1.114-128.2001>

Hernández-Luis, F., Hernández-Campos, A., Castillo, R., Navarrete-Vázquez, G., Soria-Arteche, O., Hernández-Hernández, M., & Yépez-Mulia, L. (2010). Synthesis and biological activity of 2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole derivatives against some protozoa and *Trichinella spiralis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(7), 3135-3141. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.03.050>

Hernández-Ochoa, B., Navarrete-Vázquez, G., Nava-Zuazo, C., Castillo-Villanueva, A., Méndez, S. T., Torres-Arroyo, A., Gómez-Manzo, S., Marcial-Quino, J., Ponce-Macotela, M., Rufino-González, Y., Martínez-Gordillo, M., Palencia-Hernández, G.,

Esturau-Escofet, N., Calderon-Jaimes, E., Oria-Hernández, J., & Reyes-Vivas, H. (2017). Novel giardicidal compounds bearing proton pump inhibitor scaffold proceeding through triosephosphate isomerase inactivation. *Scientific Reports*, 7(1), 7810. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07612-y>

Hernández-Vázquez, E., Chávez-Riveros, A., Romo-Pérez, A., Ramírez-Apán, M. T., Chávez-Blanco, A. D., Morales-Bárceñas, R., Dueñas-González, A., & Miranda, L. D. (2018). Cytotoxic Activity and Structure-Activity Relationship of Triazole-Containing Bis(Aryl Ether) Macrocycles. *ChemMedChem*, 13(12), 1193-1209. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800075>

Hevener, K. E., Pesavento, R., Ren, J., Lee, H., Ratia, K., & Johnson, M. E. (2018). Hit-to-Lead: Hit Validation and Assessment. En *Methods in Enzymology* (Vol. 610, pp. 265-309). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.09.022>

Hoffman, P. S., Sisson, G., Croxen, M. A., Welch, K., Harman, W. D., Cremades, N., & Morash, M. G. (2007). Antiparasitic Drug Nitazoxanide Inhibits the Pyruvate Oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, Selected Anaerobic Bacteria and Parasites, and *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(3), 868-876. <https://doi.org/10.1128/AAC.01159-06>

Ibáñez-Cervantes, G., León-Ávila, G., Bello-López, J. M., Pérez-Rangel, A., León-García, G., Noguera-Torres, B., & Hernández, J. M. (2018). Changes in the incidence of intestinal giardiasis in Mexican population during five years (2011-2015). *Acta Parasitologica*, 63(1), 40-47. <https://doi.org/10.1515/ap-2018-0005>

Jarrad, A. M., Ang, C. W., Debnath, A., Hahn, H. J., Woods, K., Tan, L., Sykes, M. L., Jones, A. J., Pelingon, R., Butler, M. S., Avery, V. M., West, N. P., Karoli, T., Blaskovich, M. A. T., & Cooper, M. A. (2018). Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 2-Nitroimidazopyrazin-one/-es with Antitubercular and Antiparasitic Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(24), 11349-11371. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01578>

Kulakova, L., Galkin, A., Chen, C. Z., Southall, N., Marugan, J. J., Zheng, W., & Herzberg, O. (2014). Discovery of Novel Antigiardiasis Drug Candidates.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 58(12), 7303-7311.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.03834-14>

Kumar, S., Bains, T., Won Kim, A. S., Tam, C., Kim, J., Cheng, L. W., Land, K. M., Debnath, A., & Kumar, V. (2018). Highly Potent 1H-1,2,3-Triazole-Tethered Isatin-Metronidazole Conjugates Against Anaerobic Foodborne, Waterborne, and Sexually-Transmitted Protozoal Parasites. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 380. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00380>

Lalle, M., & Hanevik, K. (2018). Treatment-refractory giardiasis: Challenges and solutions. *Infection and Drug Resistance*, Volume 11, 1921-1933. <https://doi.org/10.2147/IDR.S141468>

Lane, S., & Lloyd, D. (2002). Current Trends in Research into the Waterborne Parasite Giardia. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(2), 123-147. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046713>

Leitsch, D. (2015). Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite Giardia lamblia. *Current Tropical Medicine Reports*, 2(3), 128-135. <https://doi.org/10.1007/s40475-015-0051-1>

Leitsch, D., Burgess, A. G., Dunn, L. A., Krauer, K. G., Tan, K., Duchene, M., Upcroft, P., Eckmann, L., & Upcroft, J. A. (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), 1756-1765. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr192>

Leitsch, D., Müller, J., & Müller, N. (2016). Evaluation of Giardia lamblia thioredoxin reductase as drug activating enzyme and as drug target. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 6(3), 148-153. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2016.07.003>

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 24.

Macalino, S. J. Y., Gosu, V., Hong, S., & Choi, S. (2015). Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Archives of Pharmacal Research*, 38(9), 1686-1701. <https://doi.org/10.1007/s12272-015-0640-5>

Martínez-Espinosa, R., Argüello-García, R., Saavedra, E., & Ortega-Pierres, G. (2015). Albendazole induces oxidative stress and DNA damage in the parasitic protozoan *Giardia duodenalis*. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00800>

Miranda, L. D., & Hernández-Vázquez, E. (2015). Multicomponent/Palladium-Catalyzed Cascade Entry to Benzopyrrolizidine Derivatives: Synthesis and Antioxidant Evaluation. *The Journal of Organic Chemistry*, 80(21), 10611-10623. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b01742>

Muller, J., Ruhle, G., Muller, N., Rossignol, J.-F., & Hemphill, A. (2006). In Vitro Effects of Thiazolides on *Giardia lamblia* WB Clone C6 Cultured Axenically and in Coculture with Caco2 Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(1), 162-170. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.162-170.2006>

Muller, J., Wastling, J., Sanderson, S., Muller, N., & Hemphill, A. (2007). A Novel *Giardia lamblia* Nitroreductase, GINR1, Interacts with Nitazoxanide and Other Thiazolides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(6), 1979-1986. <https://doi.org/10.1128/AAC.01548-06>

Nash, T., & Rice, W. G. (1998). Efficacies of Zinc-Finger-Active Drugs against *Giardia lamblia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(6), 1488-1492. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.6.1488>

Navarretevazquez, G., Rojanovilchis, M., Yepezmulia, L., Melendez, V., Gerena, L., Hernandezcampos, A., Castillo, R., & Hernandezluis, F. (2006). Synthesis and antiprotozoal activity of some 2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole bioisosteres. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41(1), 135-141. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.09.001>

Pérez-Villanueva, J., Hernández-Campos, A., Yépez-Mulia, L., Méndez-Cuesta, C., Méndez-Lucio, O., Hernández-Luis, F., & Castillo, R. (2013). Synthesis and

antiprotozoal activity of novel 2-[[2-(1H-imidazol-1-yl)ethyl]sulfanyl]-1H-benzimidazole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(14), 4221-4224. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.05.012>

Ranade, R. M., Zhang, Z., Gillespie, J. R., Shibata, S., Verlinde, C. L. M. J., Hol, W. G. J., Fan, E., & Buckner, F. S. (2015). Inhibitors of Methionyl-tRNA Synthetase Have Potent Activity against *Giardia intestinalis* Trophozoites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(11), 7128-7131. <https://doi.org/10.1128/AAC.01573-15>

Savioli, L., Smith, H., & Thompson, A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends in Parasitology*, 22(5), 203-208. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.015>

Schultz, T. W., Yarbrough, J. W., Hunter, R. S., & Aptula, A. O. (2007). Verification of the Structural Alerts for Michael Acceptors. *Chemical Research in Toxicology*, 20(9), 1359-1363. <https://doi.org/10.1021/tx700212u>

Schwartz, C. L., Heumann, J. M., Dawson, S. C., & Hoenger, A. (2012). A Detailed, Hierarchical Study of *Giardia lamblia*'s Ventral Disc Reveals Novel Microtubule-Associated Protein Complexes. *PLoS ONE*, 7(9), e43783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043783>

Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.

Soria-Arteche, O., Hernández-Campos, A., Yépez-Mulia, L., Trejo-Soto, P. J., Hernández-Luis, F., Gres-Molina, J., Maldonado, L. A., & Castillo, R. (2013). Synthesis and antiprotozoal activity of nitazoxanide-N-methylbenzimidazole hybrids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(24), 6838-6841. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.10.011>

Teague, S. J., Davis, A. M., Leeson, P. D., & Oprea, T. (1999). The Design of Leadlike Combinatorial Libraries. 38(24), 3743-3748. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-3773\(19991216\)38:24<3743::aid-anie3743>3.0.co;2-u](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-3773(19991216)38:24<3743::aid-anie3743>3.0.co;2-u)

Tejman-Yarden, N., Miyamoto, Y., Leitsch, D., Santini, J., Debnath, A., Gut, J., McKerrow, J. H., Reed, S. L., & Eckmann, L. (2013). A Reprofiled Drug, Auranofin, Is Effective against Metronidazole-Resistant *Giardia lamblia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5), 2029-2035. <https://doi.org/10.1128/AAC.01675-12>

Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L. B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernández, M., Müller, M., & Lucocq, J. M. (2003). Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*, 426(6963), 172-176. <https://doi.org/10.1038/nature01945>

Valdez, C. A., Tripp, J. C., Miyamoto, Y., Kalisiak, J., Hruz, P., Andersen, Y. S., Brown, S. E., Kangas, K., Arzu, L. V., Davids, B. J., Gillin, F. D., Upcroft, J. A., Upcroft, P., Fokin, V. V., Smith, D. K., Sharpless, K. B., & Eckmann, L. (2009). Synthesis and Electrochemistry of 2-Ethenyl and 2-Ethanyl Derivatives of 5-Nitroimidazole and Antimicrobial Activity against *Giardia lamblia*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(13), 4038-4053. <https://doi.org/10.1021/jm900356n>

Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H.-Y., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D. (2002). Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 2615-2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>

Wildey, M. J., Haunso, A., Tudor, M., Webb, M., & Connick, J. H. (2017). High-Throughput Screening. En *Annual Reports in Medicinal Chemistry* (Vol. 50, pp. 149-195). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.armc.2017.08.004>

Wolfe, M. S. (1992). Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(1), 93-100.

World Health Organization Model List of Essential Medicines, 21st List, 2019. Geneva: World Health Organization; 2019.

Zoete, V., Daina, A., Bovigny, C., & Michielin, O. (2016). SwissSimilarity: A Web Tool for Low to Ultra High Throughput Ligand-Based Virtual Screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56(8), 1399-1404. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00174>