

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

---

---

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Evaluación hepatotóxica y nefrotóxica de compuestos  
imidazo[1,2-*a*]piridinas 2-, 3- sustituidas con actividad  
antiparasitaria**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS  
QUIMICOBIOLÓGICAS  
P R E S E N T A  
QFI JOSÉ IVÁN SERRANO CONTRERAS



**DIRECTORES:  
DRA. MARÍA ESTELA MELÉNDEZ CAMARGO  
DRA. MARÍA ELENA CAMPOS ALDRETE**

**MÉXICO D. F. AGOSTO DE 2010**

La presente investigación se realizó bajo la dirección de la Dra. María Estela Meléndez Camargo y de la Dra. María Elena Campos Aldrete en el Laboratorio de Farmacología y Toxicología Renal y Hepática del Departamento de Farmacia y en el Laboratorio 7 del Departamento de Química Orgánica de las Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Dentro del proyecto titulado: "Evaluación farmacológica y toxicológica de principios activos de origen vegetal o por síntesis de interés farmacéutico III", con clave 20100495.

## ÍNDICE TEMÁTICO

	PÁGINA
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Diseño de nuevos fármacos	2
1.2. Estudios preclínicos de la eficacia y la seguridad	4
1.2.1. Toxicidad aguda	5
1.2.2. Toxicidad subaguda	7
1.2.3. Toxicidad crónica	8
1.3. Estudios clínicos	9
1.3.1. Fase 0	9
1.3.2. Fase I	10
1.3.3. Fase II	10
1.3.4. Fase III	11
1.3.5. Fase IV	11
1.4. Infecciones parasitarias	12
1.4.1. Amibiasis: <i>Entamoeba histolytica</i>	13
1.4.2. Tricomonirosis: <i>Tricomonas vaginalis</i>	13
1.5. Metronidazol	13
1.5.1. Efectos antiparasitarios y antimicrobianos	13
1.5.2. Mecanismo de acción	14
1.5.3. Farmacorresistencia	16
1.5.4. Toxicidad, contraindicaciones e interacciones farmacológicas	18
1.6. Imidazo[1,2-a]piridina 2-, 3- sustituidas	18
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS	22
5. METODOLOGÍA	23
5.1. Preparación de imidazo[1,2-a]piridinas 2-, 3- sustituidas	23



	PÁGINA
5.2.3.4. Cuantificación de la formación de especies reactivas de oxígeno y de la lipoperoxidación en el riñón y el hígado	30
5.2.3.5. Análisis estadístico	31
6. RESULTADOS	32
6.1. Preparación de imidazo[1,2-a]piridinas 2-, 3- sustituidas	32
6.2. Evaluación de la toxicidad aguda	34
6.3. Evaluación de la toxicidad subaguda	35
6.3.1. Valoración de la función renal	35
6.3.1.1. Determinación de la concentración de glucosa en la orina y el suero	35
6.3.1.2. Determinación de la concentración de proteínas en la orina	36
6.3.1.3. Determinación de la secreción tubular renal de aniones orgánicos	37
6.3.1.4. Determinación del flujo urinario	38
6.3.1.5. Determinación de la velocidad de filtración glomerular	39
6.3.1.6. Determinación del balance electrolítico	40
6.3.1.7. Determinación del balance hídrico	43
6.3.1.8. Cuantificación de la formación de especies reactivas de oxígeno y de la lipoperoxidación en el riñón	44
6.3.2. Valoración de la función hepática	46
6.3.2.1. Determinación de la actividad sérica de las enzimas fosfatasa alcalina y alanina aminotransferasa	46
6.3.2.2. Cuantificación de la formación de especies reactivas de oxígeno y de la lipoperoxidación en el hígado	48
7.0. DISCUSIÓN	50
8.0. CONCLUSIONES	60
9.0. BIBLIOGRAFÍA	61

	PÁGINA
ANEXO	72
Espectro No. 1. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1a)	73
Espectro No. 2. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1a)	74
Espectro No. 3. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1b)	75
Espectro No. 4. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1b)	76
Espectro No. 5. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1b)	77
Espectro No. 6. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de imidazo [1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2a)	78
Espectro No. 7. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de imidazo [1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2a)	79
Espectro No. 8. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2b)	80
Espectro No. 9. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2b)	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Fases del descubrimiento y desarrollo de un nuevo fármaco.	1
Figura 2. Modelo de la formación de aductos del metronidazol con el grupo sulfidrilo de la cisteína y GSH.	15
Figura 3. Metabolismo propuesto para los protozoarios <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Tricomonas vaginalis</i> .	16
Figura 4. Modelo de la activación y acción del metronidazol.	17
Figura 5. Analogía de los compuestos imidazo[1,2-a]piridinas 2-, 3- sustituidas y el metronidazol.	19
Figura 6. Efecto sobre la excreción urinaria de proteínas de los diferentes grupos experimentales.	37
Figura 7. Efecto sobre el transporte activo de aniones orgánicos de los diferentes grupos experimentales.	38
Figura 8. Efecto sobre la velocidad de filtración glomerular de los diferentes grupos experimentales.	40
Figura 9. Efecto sobre la concentración de creatinina sérica de los diferentes grupos experimentales.	40
Figura 10. Efecto sobre la formación de especies reactivas de oxígeno en el riñón de los diferentes grupos experimentales.	45
Figura 11. Efecto sobre la lipoperoxidación en el riñón de los diferentes grupos experimentales.	45
Figura 12. Efecto sobre la actividad sérica de la enzima fosfatasa alcalina de los diferentes grupos experimentales.	47
Figura 13. Efecto sobre la actividad sérica de la enzima alanina aminotransferasa de los diferentes grupos experimentales.	48
Figura 14. Efecto sobre la formación de especies reactivas de oxígeno en el hígado de los diferentes grupos experimentales.	49
Figura 15. Efecto sobre la lipoperoxidación en el hígado de los diferentes grupos experimentales.	49

## ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1. Categorías de peligro de toxicidad aguda con fines de clasificación	6
Tabla 2. Tipos de ensayos clínicos según la fase de desarrollo del fármaco y sus características habituales	12
Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria de las imidazo[1,2-a]piridinas 2-, 3- sustituidas y metronidazol obtenidas en estudios <i>in vitro</i>	20
Tabla 4. Resultados del escalamiento de la ruta sintética de los compuestos imidazo[1,2-a]piridinas 2-, 3- sustituidas	33
Tabla 5. DL <sub>50</sub> de las imidazo[1,2-a]piridinas 2-, 3- sustituidas	34
Tabla 6. Efecto sobre la carga filtrada y las excreciones urinaria y fraccional de glucosa de los diferentes grupos experimentales	35
Tabla 7. Efecto sobre la depuración y la concentración sérica de glucosa de los diferentes grupos experimentales	36
Tabla 8. Efecto sobre el flujo urinario de los diferentes grupos Experimentales	38
Tabla 9. Efecto sobre la excreción fraccional y la carga filtrada de sodio y potasio de los diferentes grupos experimentales	41
Tabla 10. Efecto sobre la excreción urinaria y depuración de sodio y potasio de los diferentes grupos experimentales	42
Tabla 11. Efecto sobre la concentración sérica de potasio y sodio de los diferentes grupos experimentales	43
Tabla 12. Efecto sobre el balance hídrico de los diferentes grupos experimentales	44
Tabla 13. Múltiplos sobre el límite superior normal de los compuestos imidazo[1,2-a]piridinas 2-, 3- sustituidas	46



## ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
1a	Imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo
1b	3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo
2a	Imidazo [1,2-a]piridina-2-carbonitrilo
2b	3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo
AB	Ácidos biliares
ALT	Enzima alanina aminotransferasa
ANOVA	Análisis de variancia unifactorial
APAP	Paracetamol
BSEP	Bomba exportadora de sales biliares
CF	Carga filtrada
DG	Diafragma glomerular
EF	Excreción fraccional
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EU	Excreción urinaria
FA	Fosfatasa alcalina
FDA	Food and Drug Administration
GOD-PAP	Glucosa oxidasa-peroxidasa
GSH	Glutación reducido
NAPQI	N-acetil-benzoquinoneimida
NEQ	Nueva entidad química
OAT	Transportadores de aniones orgánicos
PAH	Ácido p-aminohipúrico
PdC	Estudios de prueba de concepto
PFOR	Piruvato-ferredoxina óxido reductasa
SELECT	Acrónimo derivado del inglés que implica el criterio de seguridad, ambiental, legal, económico, control y productividad
SOD	Superóxido dismutasa

## RESUMEN

La investigación y el desarrollo de nuevos fármacos han hecho posible la introducción de tratamientos de enfermedades que antes eran mortales. En la investigación de un nuevo fármaco se sintetizan nuevas moléculas y se prueban farmacológicamente. En estudios previos, se sintetizaron 22 imidazo[1,2-a]piridinas 2-, 3- sustituidas con diferentes sustituyentes y fueron evaluados *in vitro* contra cepas de *Trichomonas vaginalis* GT<sub>3</sub> y *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS farmacorresistentes al metronidazol, de los cuales, cuatro compuestos mostraron el mejor efecto antiparasitario. La presente investigación corresponde a los estudios preclínicos de estos compuestos, imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1a), 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1b), imidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2a) y 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2b).

En primer instancia, se escalaron los cuatro compuestos imidazo[1,2-a]piridinas 2-, 3- sustituidas 1a, 1b, 2a and 2b con rendimientos de moderados a buenos (36.4%-77.9%).

Con base en la DL<sub>50</sub>, los cuatro compuestos imidazo[1,2-a]piridina 2- y 3- sustituidas, se clasificaron de prácticamente no tóxicos a ligeramente tóxicos. El grupo carbonitrilo en la posición 2- aumentó la toxicidad con respecto al grupo carboetoxi y el grupo nitro en la posición 3- disminuyó la toxicidad, en las dos parejas análogas estudiadas. Los compuestos 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1b) e imidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2a) disminuyeron el transporte activo de aniones orgánicos después del tratamiento subagudo de 14 días. Los compuestos imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1a) y 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1b) redujeron la velocidad de filtración glomerular por su efecto en la hemodinamia glomerular. Ninguno de los cuatro compuestos imidazo[1,2-a]piridinas 2- y 3- sustituidas presentaron toxicidad a nivel tubular ni hepatotoxicidad. La molécula líder (*lead*) de los cuatro compuestos es la 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2b).

## ABSTRACT

Advances in the research and development of new drugs have made it possible the treatment of long-term incurable diseases. The research on new drugs involves the preparation or isolation of new molecules and the screening of their potential biological response. In a previous study, imidazo[1,2-*a*]pyridines carrying different substituents at positions 2, 3 were synthesized and evaluated against *Trichomonas vaginalis* GT<sub>3</sub> and *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS, *in vitro*. From the group, four out of 22 compounds showed best anti-parasitic activity. The present investigation deals with the preclinical studies carried out on the four compounds, ethyl imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate (1a), ethyl 3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate (1b), imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carbonitrile (2a) and 3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carbonitrile (2b).

First, the four imidazo[1,2-*a*]pyridine derivatives 1a, 1b, 2a and 2b were scaled up in moderate to good yields (36.4%-77.9%).

The four compounds were classified from practically non toxic to slightly toxic in agreement with the LD<sub>50</sub> values obtained. The nitrile group at position 2, increased the toxicity as compared to the carboethoxy group at the same position. Interestingly, the nitro group at position 3 caused a diminished toxicity in the two analog compounds. Ethyl 3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate (1b) and imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carbonitrile (2a) diminished the active transport of organic anions as a result of the subacute toxicity treatment carried out during 14 days. Ethyl imidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate (1a) and ethyl 3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carboxylate (1b) reduced the glomerular filtration rate because of their effect on the glomerular hemodynamics.

The four imidazo[1,2-*a*]pyridine derivatives under investigation caused neither tubular toxicity nor hepatotoxicity. Best performance of the 4 tested compounds was shown by 3-nitroimidazo[1,2-*a*]pyridine-2-carbonitrile (2b).

## 1. INTRODUCCIÓN

El avance científico y tecnológico en los aspectos de la salud han aportado herramientas como la ingeniería genética, la biología molecular, los trasplantes, la cirugía de alta tecnología, los fármacos, los fitofármacos, etc., para hacer posible que muchas enfermedades que hasta hace muy poco tiempo eran letales o incurables, ahora puedan ser curadas o tratadas y mejorar la calidad de vida de los pacientes que las utilizan (Juaristi, 2007).

La investigación y el desarrollo de un nuevo fármaco es un proceso multidisciplinario, complicado, tardado, costoso y con el éxito no garantizado; que tiene el objetivo final de obtener nuevos medicamentos de calidad y seguros. El tiempo para cubrir todo el proceso de investigación de un nuevo fármaco es aproximadamente de ocho años y medio, período que incluye la síntesis, las pruebas en animales, los estudios clínicos, hasta el lanzamiento al mercado; los costos para realizar todos estos estudios van desde 100 hasta más de 500 millones de dólares. Una de cada 5,000 a 10,000 moléculas sobrevive a las pruebas posteriores a su descubrimiento, para que finalmente llegue a formar parte de un medicamento (From Test Tube To Patient, 2006; The Center for Drug Evaluation and Research Handbook, 1998). En la figura 1 se ilustran las etapas de investigación y desarrollo de un nuevo fármaco.

Antes de iniciar la búsqueda de nuevos fármacos se especifica el área terapéutica, para esto, se selecciona al área de investigación principalmente con base en: i) las necesidades de los médicos para mejorar algún tratamiento actual, ii) la existencia de datos científicos que fundamenten la necesidad de tratar alguna enfermedad y iii) al número de pacientes que presentan el padecimiento a tratar. Esta etapa es conocida como fase D0 (Herrling, 2005).

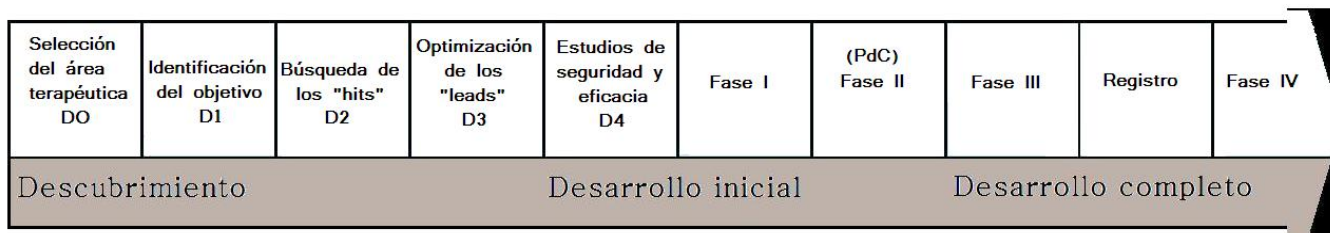


Figura 1. Fases del descubrimiento y desarrollo de un nuevo fármaco. En general, se divide en tres fases: la fase de descubrimiento que incluyen de la D0 a la D3, la fase de desarrollo inicial, dentro de la cual se encuentran la fase preclínica D4 y las pruebas clínicas I y II, y finalmente, se presenta la fase de desarrollo completo, que incluyen las fases clínicas III y IV. (Modificada de Herrling, 2005 y <http://www.novartis.com/research/drug-discovery.shtml>).

## 1.1. Diseño de nuevos fármacos

Una vez que se eligió el área terapéutica, se da inicio al proceso del diseño propiamente dicho, de tal forma que se elige el objetivo terapéutico o target (fase D1). Los objetivos terapéuticos son los sitios moleculares exactos a los que van dirigidos los nuevos fármacos para curar o incluso prevenir la enfermedad a tratar, la gran mayoría son proteínas que incluyen receptores de membrana y canales iónicos, enzimas intra- o extracelulares, proteínas involucradas en vías de señalización y receptores nucleares. Una vez que es elegido el objetivo terapéutico, se continúa con la dilucidación de su estructura tridimensional. Posteriormente, se obtiene en cantidades suficientes y en forma pura, para permitir el desarrollo adecuado del cribado o *screening* de las nuevas herramientas terapéuticas. Estas herramientas, principalmente incluyen compuestos de bajo peso molecular (PM 100-1000) provenientes de productos naturales, proteínas (anticuerpos y factores de crecimiento), terapia génica, trasplantes, terapia celular (células madre embrionarias o adultas), órganos artificiales y compuestos de bajo peso molecular sintéticos. El enfoque será en los compuestos de bajo peso molecular o sintéticos, que son compuestos con un peso molecular menor a 500 Da, que mimetizan la función de las moléculas pequeñas como por ejemplo, las hormonas o los neurotransmisores, para modular procesos biológicos. Estos compuestos tienen muchas ventajas, entre las cuales resaltan las siguientes: a) acceso potencial a todos los compartimentos del cuerpo humano, b) susceptibles a ser modificados sintéticamente para mejorar su perfil farmacológico y toxicológico, por ejemplo: solubilidad, especificidad por el objetivo, reducción de efectos colaterales, etc. Los ligandos o compuestos candidatos a interactuar con el objetivo son identificados mediante el cribado de colecciones de compuestos disponibles en cada compañía farmacéutica o centro de investigación. Los ligandos que tienen efecto en el objetivo se llaman moléculas primarias (*hits*) y son validados mediante el uso de experimentos repetidos y de registros de curvas dosis-respuesta. Estos *hits* son también seleccionados para mejorar su actividad antes de continuar su estudio. Los compuestos elegidos son ahora llamados moléculas líder (*leads*), esta etapa se llama fase D2 (Herrling, 2005; Juaristi, 2007; Preziosi, 2007).

En la actualidad, se han originado diversos procesos para la búsqueda de los ligandos, y pueden distinguirse cuatro estrategias fundamentales:

1. Modificación química de una molécula conocida. A partir de un núcleo conocido se modifican los sustituyentes para producir gran número de moléculas nuevas.
2. Estudios aleatorios sobre la actividad biológica. Obtención de diferentes fuentes como las plantas, los insectos, los organismos marinos se obtienen moléculas orgánicas o péptidos con posibilidades terapéuticas.
3. Diseño racional de fármacos. Con base en la analogía estructural con un ligando endógeno o a partir del conocimiento de la diana terapéutica determinada.
4. Cribado sistemático de las familias de compuestos. Mediante una selección de rendimiento elevado (HTS) se eligen los compuestos que poseen el mejor efecto farmacológico (Delgado y col., 2003).

Concomitante a esto, los compuestos obtenidos son modificados y sometidos a evaluaciones de estructura-actividad para optimizar su solubilidad, la potencia, selectividad, propiedades metabólicas, así como para disminuir sus efectos tóxicos evaluados en estudios *in vitro* e *in vivo*. Los compuestos más prometedores son evaluados en al menos dos especies de animales (una roedora y la otra no roedora) para obtener información acerca de la especificidad hacia el objetivo. Es común realizar estudios comparativos con el agente terapéutico de elección que se encuentra en el mercado, cuyo propósito es obtener resultados significativos con respecto al beneficio de los nuevos candidatos y los fármacos ya utilizados normalmente por los pacientes. La patente de un principio activo nuevo se lleva a cabo al final de esta fase D3 (Herrling, 2005; Juaristi, 2007; Preziosi, 2007).

Para definir la actividad y la selectividad del fármaco, se usa una diversidad de pruebas biológicas a los niveles molecular, celular, de órgano y en animales; dentro de las cuales, el tipo y el número a realizar dependen del objetivo farmacológico; por ejemplo: los fármacos antiinfecciosos en su mayoría serán probados primero contra una variedad de microorganismos patógenos, mientras que los fármacos hipoglucémicos serán empleados por su capacidad de reducir la concentración de glucosa sanguínea. Estos estudios también

aportan información para demostrar efectos tóxicos, y de manera ocasional, revelan una acción terapéutica que no se sospechaba con anterioridad. En los casos en que se dispone de buenos modelos, por lo general, es posible obtener fármacos adecuados ya que dicho modelo asemeja lo mejor posible al padecimiento a tratar. Por lo que, en padecimientos sobre los cuales aún no se disponen de modelos adecuados se carece de manera notable de buenos fármacos para el tratamiento de las afecciones objetivo. Por lo general, se requieren estudios en los animales normales o testigos para determinar el efecto del fármaco en los aparatos, sistemas y modelos de las enfermedades. En caso de que el agente tuviera una actividad útil, se realizan estudios para detectar efectos adversos sobre otros aparatos y sistemas principales, como el cardiovascular, el respiratorio, el digestivo, el endocrino y el nervioso central. En particular, los objetivos terapéuticos deben ser validados continuamente en todas las fases, para demostrar que el tratamiento con el nuevo fármaco produce un beneficio terapéutico (Berkowitz y Katzung, 1991; Cachón, 2008)

## **1.2. Estudios preclínicos de la eficacia y la seguridad**

La investigación preclínica proporciona la información sobre las propiedades de las nuevas entidades químicas (NEQ) *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Esta fase, también llamada D4, involucra estudios de toxicidad aguda, subaguda, crónica, genotoxicidad, carcinogénesis, mutagénesis y teratogénesis, estudios de farmacocinética y farmacodinamia (ADMET); además, se empieza a escalar la obtención de las nuevas moléculas e inician los estudios de formulación. Los objetivos de los estudios en animales es verificar si el efecto que se ha observado en los cultivos celulares o en los estudios en tejidos u órganos aislados tiene lugar en un organismo viviente y que la administración del nuevo fármaco en humanos sea segura (Cachón, 2008).

Los compuestos que pasan de manera satisfactoria por los procedimientos iniciales de selección y perfil, deben evaluarse con cuidado para detectar riesgos potenciales antes de iniciar las pruebas clínicas. Aunque ningún producto químico puede certificarse como totalmente seguro o libre de riesgo, ya que todas las sustancias químicas son tóxicas a determinada dosis,

con frecuencia es posible estimar el riesgo inherente a la exposición al producto químico en condiciones específicas si se realizan pruebas adecuadas.

En el estado preclínico generalmente se debe cumplir como mínimo los siguientes aspectos: i) desarrollo de un perfil farmacológico, ii) determinación de la toxicidad aguda al menos en dos especies de animales y iii) estudios de toxicidad crónica y subcrónica. Es importante reconocer que la extrapolación de datos de toxicidad obtenidos con animales a los seres humanos no es del todo confiable, ya que para cualquier compuesto dado, los datos de toxicidad tienen solamente un valor predictivo con respecto a su toxicidad en seres humanos. Por motivos estadísticos, es poco probable que se detecten efectos adversos infrecuentes, como ocurre en las pruebas clínicas, ya que en estas pruebas el número de individuos es mucho mayor. Cabe mencionar que aunque los niveles séricos eficaces pueden ser aceptablemente extrapolables de las especies animales al hombre, la dosis eficaz en especies animales muy frecuentemente es diferente de la dosis eficaz en la especie humana (Berkowitz y Katzung, 1991).

En esta fase también se lleva a cabo el escalamiento de la obtención del nuevo compuesto, que va de miligramos a kilogramos y también se desarrolla la formulación. Se define la estrategia de los estudios clínicos, con gran énfasis en el uso de biomarcadores y los estudios de prueba de concepto (PdC). Se puede percibir que durante la Fase D4, sólo una pequeña proporción de las moléculas podrán pasar a los estudios clínicos; de aproximadamente 10,000 moléculas que llegan a la fase preclínica, sólo de una a diez pasan a la fase clínica y de éstas, aproximadamente 20% llegarán al mercado. En suma, esta fase es la preparación final para dar inicio a las pruebas clínicas de los candidatos potenciales (Cachón, 2008; FDA, 2000; Herrling, 2005; Novartis, 2009).

### **1.2.1. Toxicidad aguda**

Dentro de la fase D4 se encuentran los estudios de toxicidad aguda, que proporcionan la información necesaria para saber la dosis a utilizar en estudios de dosis repetidas, las dosis iniciales para los estudios clínicos de la Fase I, la identificación de la toxicidad preliminar y los órganos blanco afectados, y ocasionalmente, la revelación de la toxicidad retardada. Con estos estudios se



obtienen la DL<sub>50</sub>, DE<sub>50</sub> y el índice terapéutico, este último, es un concepto general válido para predecir el grado de seguridad de un fármaco nuevo (Bello y López de Cerain, 2001). Con respecto a esto, las sustancias se clasifican en varias categorías, de acuerdo con su DL<sub>50</sub>, normalmente determinadas en roedores y por vía oral o dérmica (Repetto y Repetto, 2009) (tabla 1).

**Tabla 1. Categorías de peligro de toxicidad aguda con fines de clasificación**

Categoría	Etiquetas de toxicidad	Vía oral DL <sub>50</sub> (mg/kg de peso corporal)	Posible dosis letal en humanos
1	Extremadamente tóxico	≤ 5	1 gota, 1 grano
2	Altamente tóxico	5 a 50	1 cucharada (4mL)
3	Moderadamente tóxico	50 a 300	30 g
4	Ligeramente tóxico	300 a 2000	250 g
5	Prácticamente no tóxico	2000 a 5000	1 litro

Modificada de United Nations, 2007; Campos, 2008; Repetto y Repetto, 2009.

Estos estudios se realizan en al menos dos especies de mamíferos, una roedora y la otra no roedora, con un número equivalente de animales de cada sexo y la vía de administración a emplear será aquella que se pretende utilizar en humanos. Se utilizan dosis crecientes y se administra una sola vez. En cuanto a la selección de los niveles de las dosis se debe usar de tres a cuatro niveles, separados apropiadamente, para asegurar la presencia de los efectos tóxicos y a su vez la incidencia del número de animales muertos También, se deben tomar en cuenta el uso de grupos testigo, a los que se administra el vehículo utilizado para disolver los compuestos de prueba (Akhila y col, 2007; FDA, 1996; The Center for Drug Evaluation and Research Handbook, 1998)

En los estudios con roedores se debe considerar el uso de pequeños grupos de animales, que van de tres a cinco animales por sexo y por dosis. La duración de este estudio es de 7 a 14 días, período después de la administración del fármaco, durante el cual se observa el número de animales muertos. Además, de obtenerse el porcentaje de mortalidad, también, es recomendable observar si existen signos de intoxicación tales como: letargo, modificaciones en el comportamiento, convulsiones, consumo de comida, etc. (Berkowitz y Katzung, 1991; Cachón, 2008; Eaton y Klaassen, 2001; FDA, 1996).

### **1.2.2. Toxicidad subaguda**

El objetivo de estos estudios es el de adquirir información adecuada para predecir los efectos adversos potenciales que pueden ocurrir en los estudios clínicos, orientar al investigador sobre la dosis a utilizar en los estudios crónicos y determinar qué órganos son afectados por las nuevas moléculas.

Este estudio, al igual que en la toxicidad aguda, se realiza en dos especies, una roedora y otra no roedora, mediante la administración diaria del fármaco a lo largo de un cierto período, que puede durar de 14 a 28 días. La vía de administración es la que se pretende utilizar en los estudios clínicos y el número de animales recomendado es de 5 ratas por sexo y por dosis. Para las pruebas de toxicidad subaguda se utilizan dosis que aseguren la aparición de algún efecto adverso. Se deben considerar a los grupos testigo, a los que se administra el vehículo utilizado para disolver los compuestos que se estudian (FDA, 2010).

Se debe predecir adecuadamente la toxicidad de las nuevas moléculas y evitar los falsos negativos, para disminuir la probabilidad de que se presenten efectos adversos en las fases clínicas, pérdidas de recursos humanos y materiales, y de un beneficio inseguro. En este contexto, es mejor encontrar falsos positivos, debido a que es preferente terminar durante las pruebas preclínicas y prescindir de gastos innecesarios (FDA, 2000).

Durante el período de observación se realizan exploraciones físicas para observar si se presentan síntomas de toxicidad tales como: cambios en el peso corporal, consumo de alimento, cambios en la pigmentación de la piel, efectos a nivel cardiorrespiratorio, anomalías a nivel motor y de comportamiento, formación de quistes, etc. Se realizan análisis de laboratorio hematológicos tales como la concentración de hemoglobina, hematocrito, cuenta de eritrocitos, leucocitos y plaquetas, tiempo de coagulación y tiempo de protrombina. También, se realizan evaluaciones de química sanguínea como por ejemplo: determinación de la glucosa, el calcio, el sodio, el potasio, la actividad de las enzimas alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa,  $\gamma$ -glutamil transferasa, sorbitol deshidrogenada, deshidrogenada láctica, fosfatasa alcalina, creatinina, bilirrubina, triglicéridos, colesterol, albúmina, globulina y proteínas totales. De igual forma se realizará el análisis urinario, éste incluye la determinación de la osmolalidad, el pH, las proteínas, la

glucosa, las cetonas, las bilirrubina, las proteínas, el balance electrolítico, la excreción de enzimas localizadas en el borde en cepillo como fosfatasa alcalina y gamma-glutamil transferasa. Al finalizar el estudio se sacrifican a los animales y realizan estudios histológicos (Beers y Berkow, 2002; Bello y López de Cerain, 2001; Berkowitz y Katzung, 1991; Cachón, 2008; Eaton y Klaassen, 2001).

Es importante mencionar, que la concordancia de los efectos tóxicos producidos por fármacos entre los animales de experimentación y el hombre, observados en los estudios de seguridad o preclínicos y en específico al efecto hepatotóxico y nefrotóxico son del 52% y 69%, respectivamente (Preziosi, 2007).

### **1.2.3. Toxicidad crónica**

En estas investigaciones se busca determinar cuáles son los órganos blancos de la toxicidad a largo plazo. Se realizan los mismos tipos de estudios que en la toxicidad subaguda; estos ensayos son necesarios en fármacos que tendrán una utilización prolongada. Los estudios de toxicidad crónica requieren uno o dos años de duración y pueden realizarse al mismo tiempo que los estudios de fase clínica, y estos incluyen los estudios de mutagénesis, teratogénesis y carcinogénesis.

Los estudios de carcinogénesis se pueden realizar durante las fases clínicas I y II, bajo las siguientes consideraciones: que el nuevo compuesto o sus metabolitos no se acumulen en el organismo, no forme parte de una familia química sospechosa de riesgo cancerígeno iatrogénico o de que las pruebas de mutagénesis no hayan mostrado anomalías.

Los estudios de toxicidad crónica permiten conocer la naturaleza del fenómeno tóxico a la vista de los órganos blanco y de sus funciones dañadas, el tiempo de aparición de estos efectos, saber si existe su reversibilidad, conocer la dosis mínima que produce un efecto adverso (LOAEL) y la dosis que no produce ningún efecto adverso detectable (NOAEL) (Bello y López de Cerain, 2001; Cachón, 2008; Repetto y Repetto, 2009; The Center for Drug Evaluation and Research Handbook, 1998).

### **1.3. Estudios clínicos**

Representan los últimos estudios antes de que un fármaco nuevo salga a la venta. En el caso de los Estados Unidos (USA), cuando un fármaco ha pasado con éxito las pruebas *in vitro* e *in vivo* en modelos animales, entonces los laboratorios solicitan que se abra un archivo para un nuevo fármaco en investigación (IND por sus siglas en inglés = Investigational New Drug). Este nuevo medicamento entra en revisión por la FDA y si ésta lo aprueba, se pueden comenzar los estudios clínicos (From Test Tube To Patient, 2006).

La obtención de los resultados con validez científica no se garantiza sólo por cumplir con la normatividad, de ahí que el diseño y la ejecución de una buena prueba química requieren esfuerzos del médico-científico o farmacólogo-clínico, un experto en estadística y con frecuencia, de otros profesionales. Una sustancia identificada como un fármaco potencial en la fase preclínica no se convierte en un fármaco hasta que se ha establecido su valor terapéutico. El desarrollo clínico de un fármaco consta de cinco fases consecutivas, que se resumen en la tabla 2 destinadas a obtener información en cada una de ellas para continuar avanzando en el desarrollo del fármaco. Las pruebas en seres humanos se inician al completarse los estudios suficientes de toxicidad aguda y subaguda en animales. Las pruebas de seguridad crónica en animales suelen efectuarse de manera simultánea a las pruebas clínicas. En cada una de las tres fases formales de las pruebas clínicas, los voluntarios o pacientes deben estar bien informados acerca del estado de la investigación del fármaco y los posibles riesgos, con el fin de que participen de manera voluntaria en las pruebas del fármaco o se nieguen a ello (The Center for Drug Evaluation and Research Handbook, 1998).

#### **1.3.1. Fase 0**

La duración de las fases clínicas depende de la enfermedad a tratar, por lo que, para enfermedades que aún no tienen un tratamiento eficaz como el cáncer, el Alzheimer y el SIDA, es necesario acortar la duración de estos estudios, debido que se requiere el suplemento acelerado de algún tratamiento que pueda ser eficaz (Steinmetz y Spack, 2009). Con respecto a esto y puesto que el 40% de retiro durante los estudios clínicos en la fase I se debe a los estudios inapropiados de farmacocinética (FC)/farmacodinamia (FD), se ha

introducido la Fase 0, que aunque no tenga un propósito terapéutico, pretende predecir tempranamente el perfil FC/FD, y por lo tanto, permite la selección temprana de los candidatos prometedores e incrementar la probabilidad de éxito en las fases I-III. En los estudios de la Fase 0 se administran microdosis de las nuevas moléculas, el tiempo de duración es un período corto de siete días, y se realizan en un número pequeño de individuos o pacientes no mayor de 30. Durante esta fase, también se puede determinar el mecanismo de acción (Jacobson-Kram y Mills, 2008; Marchetti y Schellens, 2007).

### **1.3.2. Fase I**

Durante esta fase se determinan los efectos del fármaco en función de la dosis, en un número de entre 20 y 80 voluntarios sanos. Las pruebas de fase I se efectúan para determinar si los seres humanos y los animales muestran respuestas significativamente distintas al fármaco y con el fin de establecer los límites probables de los valores de dosis clínicas seguras. También se realizan los estudios para determinar los perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos, de la tolerabilidad del fármaco, la dosis máxima tolerada, la relación estructura-actividad y el mecanismo de acción en humanos, además se pueden detectar efectos tóxicos. Si se espera que el fármaco presente toxicidad considerable (como en el caso de fármacos contra el cáncer y el SIDA), entonces, los individuos del ensayo serán aquellos que padezcan dichas enfermedades y estén de acuerdo en participar en el estudio clínico (Berkowitz y Katzung, 1991; Cachón, 2008; Preziosi, 2007; The Center for Drug Evaluation and Research Handbook, 1998).

### **1.3.3. Fase II**

En esta fase, el fármaco se estudia por primera vez en pacientes con la enfermedad por tratar, para determinar su seguridad y eficacia. En esta fase, se incluyen de 25 a 250 pacientes, se determina el mecanismo de acción de la NEQ y se realizan los estudios prueba de concepto (PdC) que comprueba si el candidato a fármaco tiene la actividad terapéutica requerida. También, se observa la seguridad a corto plazo, se determinan las dosis terapéuticas y la variabilidad individual, la seguridad de estas dosis y se analiza la relación eficacia-toxicidad. Si la sustancia estudiada muestra una eficacia real y pocos

efectos secundarios, puede pasar a la fase III (Berkowitz y Katzung, 1991; Cachón, 2008; Preziosi, 2007; The Center for Drug Evaluation and Research Handbook, 1998).

#### **1.3.4. Fase III**

Esta etapa estudia el nuevo medicamento en un grupo mayor de individuos, que puede variar de 100 a 1,000 o de 1,000 a 3,000 pacientes voluntarios. Durante estos estudios se evalúa la relación global costo-beneficio de la nueva molécula, se puede observar por primera vez algunos efectos tóxicos, en especial los provocados por procesos inmunológicos, y se obtiene la evidencia definitiva o confirmatoria de la eficacia del nuevo fármaco, en donde la comparación ideal del fármaco en estudio se debe realizar frente al mejor tratamiento existente para la situación clínica estudiada.

Una vez que la nueva molécula ha pasado con éxito los estudios de la fase III, se solicita a un organismo público la petición oficial del laboratorio que realizó los estudios para colocarla en el mercado. En el caso de los Estados Unidos, esta petición se denomina solicitud de un nuevo fármaco (NDA por sus siglas en inglés = New Drug Application) y el organismo encargado de la aprobación o rechazo del nuevo fármaco es la FDA (Food & Drug Administration), (Cachón, 2008; Preziosi, 2007; The Center for Drug Evaluation and Research Handbook, 1998).

#### **1.3.5. Fase IV**

Si se obtiene la aprobación para la venta del nuevo fármaco, se inicia la fase 4, que implica una vigilancia continua de la seguridad del nuevo fármaco en las condiciones reales de uso en un gran número de pacientes, donde se observa la eventual aparición de efectos secundarios adversos no detectados durante las fases precedentes, así como efectos a largo plazo. Debido al número tan pequeño de sujetos en las fases I-III, los efectos de baja incidencia no se detectan por lo general antes de la fase 4, sin importar el grado de cuidado con que se lleven a cabo los estudios clínicos. Dentro de estos efectos se encuentran las reacciones idiosincráticas, que son eventos impredecibles en el inicio de la investigación de un nuevo fármaco, no poseen una relación con la dosis, son caracterizadas por un alto grado de mortalidad y son muy raras de

observar (con una frecuencia de >1:10000 y en algunos casos de >1:100000), p.ej.: la anemia aplásica producida por cloranfenicol o el síndrome cardíaco Torsades de pointes causado por el antihistamínico terfenadina (Beers y Berkow, 2002; Berkowitz y Katzung, 1991, Cachón, 2008; Preziosi, 2007).

**Tabla 2. Tipos de ensayos clínicos según la fase de desarrollo del fármaco y sus características habituales**

	Individuos de investigación	Tamaño de la muestra	Objetivo
Fase 0	Voluntarios sanos o pacientes	< 30	Farmacocinética y farmacodinamia. Mecanismo de acción
Fase 1	Voluntarios sanos	< 20	Farmacocinética y farmacodinamia Dosis máxima tolerada Tolerabilidad
Fase 2	Pacientes	< 100	Pruebas prueba de concepto (PdC) Relación Dosis-Respuesta Dosis
Fase 3	Pacientes	< 1000	Eficacia Seguridad Práctica clínica
Fase 4	Pacientes	< 1000	Eficacia y seguridad

Modificada de García-Arenillas y col., 2005.

#### 1.4. Infecciones parasitarias

En la actualidad, existen enfermedades que son verdaderos retos para encontrar nuevos tratamientos más eficaces y seguros, dentro de estas se encuentran la amibiasis (causada por *Entamoeba histolytica*) y la tricomoniasis (causada por *Trichomonas vaginalis*). Ambas afectan notablemente a la población mundial, tanto en países desarrollados como en los de en vías de desarrollo (Upcroft y Upcroft, 2001). Por lo tanto, es muy importante garantizar la salud a las personas que las padezcan, debido que ésta es de suma importancia para construir una vida plena y permitir a los individuos realizar sus proyectos de vida y aspiraciones, así como también es un requisito primordial para el desarrollo económico y el bienestar social.

##### 1.4.1. Amibiasis: *Entamoeba histolytica*

*Entamoeba histolytica* es un protozooario entérico que causa amibiasis en el humano. A nivel mundial, la amibiasis está catalogada como la tercera parasitosis causante de muerte. De acuerdo a la Organización Mundial de la

Salud en el 2009, alrededor del 10 a 20 por ciento de la población mundial se considera infectada y el 10 por ciento de esta población sufre de enfermedad (en números: 500 millones de infectados, 50 millones de enfermos y 100 mil muertes por año). En México, se consideran que 16 millones de individuos son portadores, 1.3 millones se encuentran enfermos y ocurren de 10 mil a 30 mil casos mueren. Con base en estos datos, puede afirmarse que la amibiasis se encuentra entre las primeras causas de morbilidad en el país (Bansal y col., 2009; Conde-Bonfil y De la Mora-Zerpa, 1992).

Uno de los aspectos críticos de este padecimiento, es que el 90% de los casos clínicos son asintomáticos, pero eliminan quistes por las heces, principal forma de infección; mientras que el 10% restante desarrolla colitis, diarrea, disentería y (en pocos casos) lesiones extraintestinales, como abscesos en el hígado, el pulmón y el cerebro, de los cuales más del 20% de estos casos son fatales (Baxt y Singh, 2008).

#### **1.4.2. Tricomoniasis: *Tricomonas vaginalis***

*Tricomonas vaginalis* es un protozoo flagelado causante de la infección transmitida sexualmente conocida como tricomoniasis. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud en el 2004, la tricomoniasis se presenta en 180 millones de personas al año, alrededor del mundo. En los países en vías de desarrollo, los casos son más frecuentes en individuos con una conducta sexual riesgosa. Tanto en los países desarrollados, como en los de en vías de desarrollo, existe mayor incidencia en mujeres con etapa reproductiva, con vida sexual activa o con acceso limitado a la atención médica. Las tasas de prevalencia entre las mujeres que residen en los países en vías de desarrollo ascienden al 15% o más, cifra que indica que la tricomoniasis es una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes, además, es probable que cerca de 25 millones de mujeres embarazadas, en todo el mundo, padezcan esta enfermedad (Schmid, 2003; Walker, 2004).

### **1.5. Metronidazol**

#### **1.5.1. Efectos antiparasitarios y antimicrobianos**

El metronidazol es un compuesto heterocíclico 5-nitroimidazol ( $\alpha$ -hidroxietil-2-metil-5-nitroimidazol), un derivado del antibiótico azomicina, aislado



de diferentes especies de *Streptomyces spp.* Fue originalmente desarrollado para el tratamiento de la tricomoniasis en 1959, pero subsecuentemente se volvió útil para el tratamiento de otras infecciones causadas por protozoarios y bacterias anaerobias. Su potente actividad anaerobicida lo ha convertido en un referente y el comparador obligado (gold standard) para estimar la actividad relativa de cualquier fármaco con actividad frente a anaerobios. El metronidazol es útil en muchas infecciones parasitarias, aunque nuevos compuestos como el tinidazol, la nitazoxanida, el albendazol, el mebendazol y la furazolidona lo han desplazado parcialmente (Upcroft y Upcroft, 2001). El espectro de actividad incluye protozoos, bacterias anaerobias y algunas microaerófilas. El metronidazol es el fármaco de primera elección para las infecciones por *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* y *Giardia lamblia*. Es muy activo frente a prácticamente todo tipo de bacilos gramnegativos anaerobios, como *Gardnerella vaginalis*, *Helicobacter pylori*, *Bacteroides spp.* y *Clostridium spp.* Además de sus propiedades antimicrobianas, se le atribuye un efecto antiinflamatorio, antioxidante e inmunomodulador (Leitsch, y col., 2007; Pal y col., 2009; Tracy y Webster, 1996; Vicente y Pérez-Trallero, 2010).

### **1.5.2. Mecanismo de acción**

El mecanismo de acción del metronidazol, al igual que todos los nitroimidazoles, es el reflejo de la toxicidad inherente a su estructura molecular. Tras ingresar en la célula mediante difusión pasiva, las proteínas del metabolismo anaerobio activan al metronidazol al reducir el grupo nitro, evento responsable de la actividad antiprotozoaria; durante esta reacción se forma el radical aniónico nitro, que es citotóxico, debido a que produce la pérdida de la estructura helicoidal del ADN, inhibe la síntesis de ácidos nucleicos y finalmente, muerte celular. También, durante la nitrorreducción se forman el imidazo nitroso, el cual reacciona con el ADN, la hidroxilamina (4) y amina correspondiente (5). Además, durante la reducción del metronidazol se genera estrés oxidativo, debido a la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), principalmente el radical superóxido y a la disminución de los niveles de defensas que contrarrestan la toxicidad del metronidazol como la cisteína y el glutatión reducida (GSH), lo cual incrementa su efecto citotóxico (figura 2), (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000; Schwebke y Burgess, 2004).

Debido que el metronidazol es bioactivado principalmente en lugares donde existe anaerobiosis, hace segura su administración en el hombre (Vicente y Pérez-Trallero, 2010).

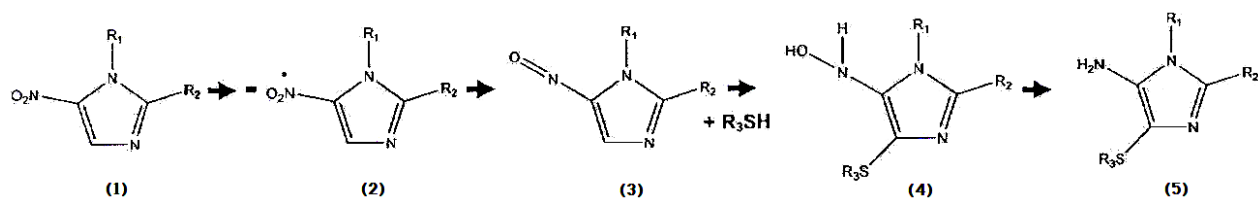


Figura 2. Modelo de la formación de aductos del metronidazol con el grupo sulfhidrilo de la cisteína y GSH. Durante la nitroreducción se forman el radical aniónico nitro (2), el 5-nitrosoimidazol (3), que al ser el más electrofílico se une covalentemente al grupo sulfhidrilo, posteriormente, se forman la hidroxilamina (4) y la amina respectiva (5), que es el aducto 5-aminoimidazol estable y no reactivo (Modificada de Leitsch y col., 2007).

Los protozoarios *Entamoeba* y *Trichomonas*, son sensibles al metronidazol, debido a que comparten la similitud con respecto a sus vías metabólicas anaerobias (figura 3) y por lo tanto, poseen enzimas análogas que activan al metronidazol, como las nitrorreductasas y los complejos ferredoxina-nitrorreductasa que se encuentran en el citosol. Debido al ambiente anaerobio presente en el lumen intestinal y en la vagina, explica la especificidad de infección en dichos tejidos por *E. histolytica* y *T. vaginalis*, respectivamente. (Cudmore y col., 2004; Leitsch y col., 2007; Pal y col., 2009; Schewbke y Burgess, 2004).

En el caso particular de la *E. histolytica*, la tiorredoxina reductasa, que funciona como nitrorreductasa, no disminuye por la unión con el metronidazol y el radical superóxido es continuamente generado después de la reducción del oxígeno por los nitroimidazoles activados, además, se produce peróxido de hidrógeno por la enzima superóxido dismutasa, el cual se acumula debido a que el metronidazol reduce la actividad de la peroxirredoxina (enzima que oxida al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular), lo que exagera su toxicidad sobre dicho parásito. El metronidazol es reducido en los hidrogenosomas de *T. vaginalis* por la acción de la enzima piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) (figura 4). El radical aniónico nitro daña principalmente al ADN que es rico en residuos de timina-adenina, como el que presenta el genoma de *T. vaginalis*, lo cual podría explicar la especificidad del metronidazol hacia este protozoario (Cudmore y col., 2004).

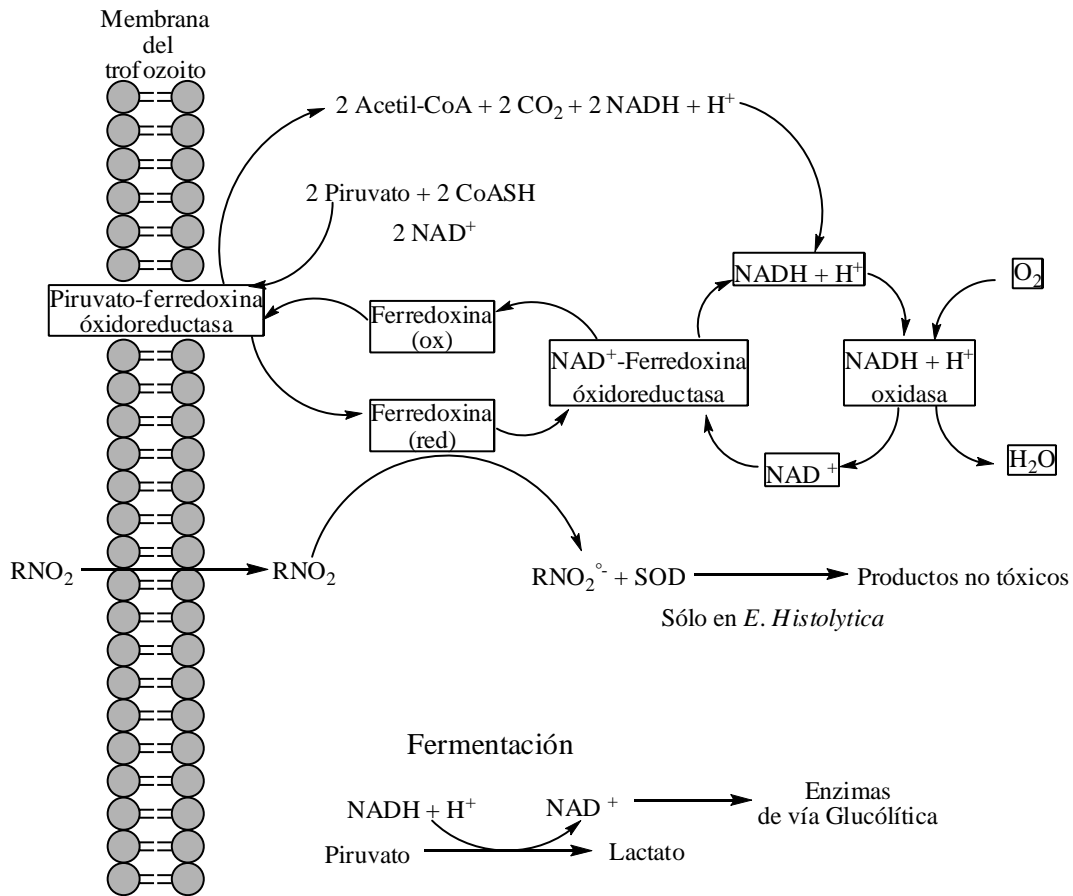


Figura 3. Metabolismo propuesto para los protozoarios *Entamoeba histolytica* y *Tricomonas vaginalis*. La piruvato-ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) sustituye a la piruvato deshidrogenasa de organismos aerobios. En la descarboxilación del piruvato se genera AcetilCoA y NADH + H<sup>+</sup>. Se puede llevar a cabo la fermentación del piruvato y recuperar NAD<sup>+</sup> útil como cofactor en la vía glucolítica (Modificada de Upcroft y Upcroft, 2001).

### 1.5.3. Farmacorresistencia

El principal mecanismo de resistencia es por la alteración de las enzimas implicadas en la activación intracelular del metronidazol necesaria para la producción de sus metabolitos activos (Vicente y Pérez-Trallero, 2010).

La resistencia en *Tricomonas vaginalis* se debe a (i) la resistencia microaerofílica, que está asociada a la inactivación del metronidazol por el oxígeno y (ii) la resistencia anaeróbica que disminuye la actividad o transcripción de la NAD<sup>+</sup>-ferredoxina oxidoreductasa y por lo tanto, se reduce la probabilidad de que sea activado el metronidazol, y para compensar el decremento de las vías de producción de la energía, incrementa la fermentación para producir NAD<sup>+</sup>, la glucólisis y también metaboliza el malato como vía alterna para producir ATP. En la *Entamoeba Histolytica*, existe un

aumento de la expresión de las enzimas antioxidantes peroxirredoxina y superóxido dismutasa, y también, disminuye la actividad o transcripción de la tiorredoxina reductasa. Todo esto, puede explicar el porqué las infecciones con cepas resistentes hace más difícil el tratamiento con el metronidazol (Cudmore y col., 2004; Leitsch y col., 2007; Pal y col., 2009; Schewbke y Burgess 2004; Tracy y Webster, 1996; Upcroft y Upcroft, 2001).

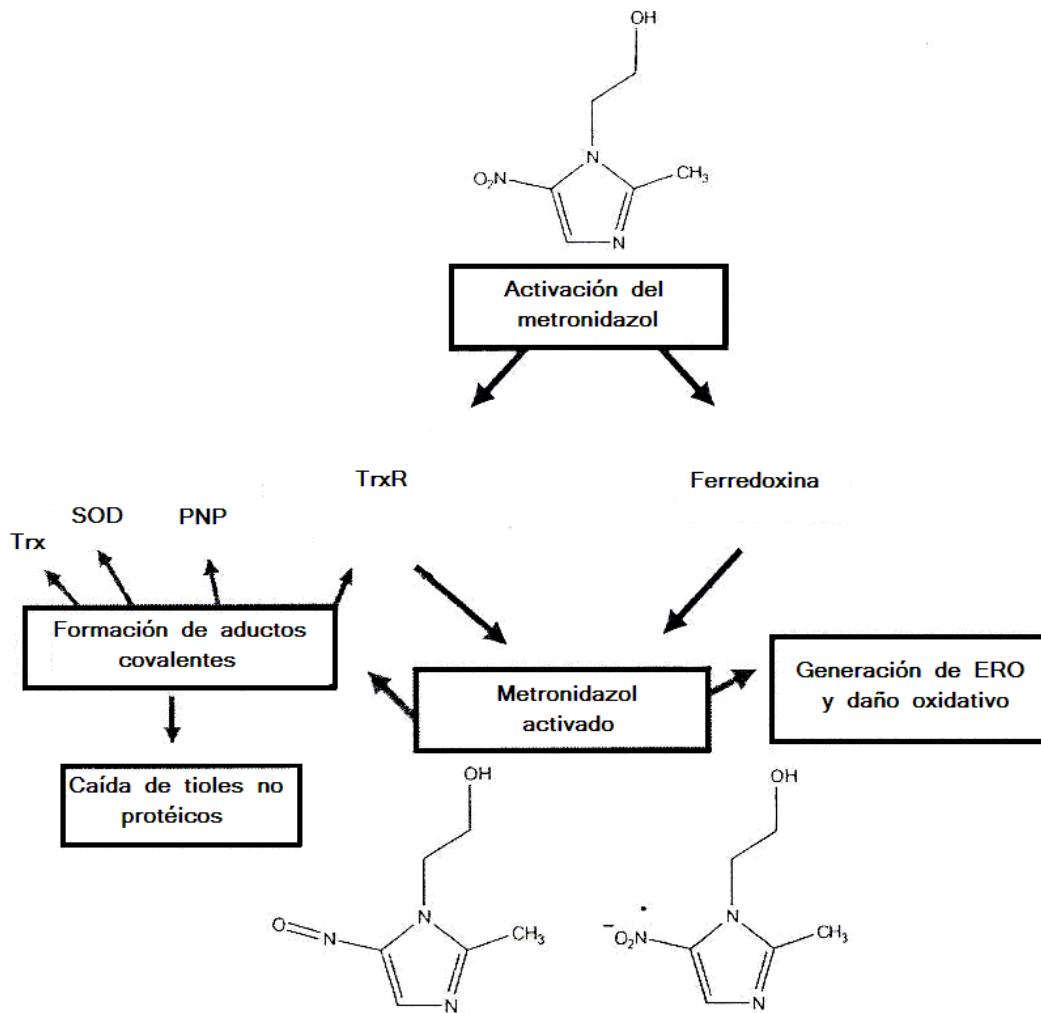


Figura 4. Modelo de la activación y acción del metronidazol. El metronidazol es reducido por la tiorredoxina reductasa (TrxR) (en *Entamoeba histolytica*) y por ferredoxina (en *Tricomonas vaginalis* y *Giardia intestinalis*). El nitrosoimidazol forma aductos con cisteína, GSH, tiorredoxina reductasa (TrxR), tiorredoxina (Trx), superóxido dismutasa (SOD) y purina nucleósido fosforilasa, lo cual disminuye las defensas antioxidantes en ambos parásitos y exacerba la toxicidad del metronidazol (Modificada de Leitsch y col., 2007).

#### **1.5.4. Toxicidad, contraindicaciones e interacciones farmacológicas**

Los efectos adversos que obligan a interrumpir el consumo del metronidazol son los neurotóxicos, dentro de los cuales se encuentran los mareos, la encefalopatía, las convulsiones, la incoordinación, la confusión, la irritabilidad, la depresión, el insomnio o la ataxia. Estos efectos, especialmente, se presentan en enfermos que reciben altas dosis o tratamientos prolongados. La reversión de las neuropatías puede ser lenta o incompleta. También, se han observado casos de urticaria, hiperemia facial, prurito y disuria. El metronidazol también posee efecto antabus, de modo que algunos enfermos muestran molestias abdominales, vómito, hiperemia facial o cefalea si consumen bebidas alcohólicas. Otro efecto relacionado al metronidazol es la supresión de la inmunidad celular (Swygard y col., 2004; Vicente y Pérez-Trallero, 2010).

El uso del metronidazol está contraindicado durante el primer trimestre del embarazo y considerado como segunda opción en la última etapa del embarazo, debido a que atraviesan la placenta el fármaco y sus metabolitos, y puede haber un riesgo potencial de presentar un efecto teratogénico, ya que se ha demostrado que son mutagénicos en bacterias y carcinogénicos en ratones (Report on Carcinogens, 2005), así como también, en estudios con ratones macho mostraron que el metronidazol produjo infertilidad, anemia y genotoxicidad. Además, se ha observado que el metronidazol se excreta en la leche materna, por lo que no se recomienda durante la lactancia (el-Nahas y el-Ashmawy, 2004; Schwebke y Burgess, 2004; Tracy y Webster, 1996; Walker, 2004).

#### **1.6. Imidazo[1,2-a]piridina 2-, 3- sustituidas**

Debido a la incidencia de tricomoniasis y amebiasis presentes en México y en el mundo, así como la incidencia de casos clínicos que presentan cepas, de ambos protozoarios, resistentes al metronidazol y además, debido a los efectos adversos que presenta dicho fármaco, se optó por investigar tratamientos alternativos.

Es por esto que Mexica-Ochoa en el 2007 sintetizó compuestos análogos al metronidazol, en su estructura molecular poseen un núcleo de imidazol y que han presentado actividad antiparasitaria contra *Trichomonas*

*vaginalis* y *Entamoeba histolytica*; tal es el caso de los compuestos imidazo[1,2-a]piridinas 2-, 3- sustituidas, mostrados en la figura 5 y la tabla 3. Cabe mencionar que estos compuestos fueron probados en cultivos axénicos de las cepas de *T. vaginalis* (GT<sub>3</sub>) y *E. histolytica* (HM1-IMSS), las cuales son resistentes al metronidazol. Se ha observado que la cepa patogénica HM1-IMSS posee un alto grado de virulencia, así como de actividad hemolítica y de resistencia al estrés oxidativo; así también, esta cepa es resistente al metronidazol con respecto a otras cepas de *Entamoeba* debido a que posee menos nitrorreductasas que activan al metronidazol (Bansal y col., 2009; Baxt y Singh, 2008; Pal y col., 2009).

De las 22 imidazo[1,2-a]piridinas investigadas por Mexica-Ochoa en el 2007, al ser evaluadas en estudios *in vitro*, se observó que 12 de ellas tenían actividad antiparasitaria contra cepas de *T. vaginalis* y *E. histolytica* resistentes al metronidazol (12 *hits*), de las cuales 1a-b y 2a-b dieron lugar a un efecto antiparasitario significativo comparado con el metronidazol, es decir, se obtuvieron 4 *leads*; dentro de los cuales los compuestos que poseen el grupo nitro en posición 3, poseen mejor actividad. En dicha investigación, también, se obtuvieron los valores de logP con el uso del programa Pharma Algorithms y de los mapas de potencial electrostático con el programa Argus Lab para cada uno de los 22 compuestos sintetizados (tabla 3).

Es importante mencionar que de acuerdo a las fases de investigación y desarrollo de un nuevo fármaco y a los estudios de Mexica-Ochoa realizados en el 2007, las imidazo[1,2-a]piridinas 2-, 3- sustituidas hasta se consideran como nuevas entidades químicas (NEQ), debido que en la etapa de farmacología primaria o D1 se observó, en estudios *in vitro*, sus efectos antiparasitarios. Por lo que resulta importante continuar con los estudios de la fase D4.

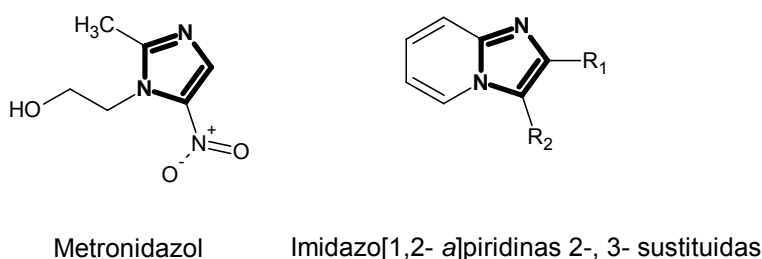


Figura 5. Analogía de los compuestos imidazo[1,2-a]piridinas 2-, 3- sustituidas y el metronidazol

**Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria de las Imidazo[1,2-*a*]piridinas 2-, 3- sustituidas y metronidazol obtenidas en estudios *in vitro***

Nombre	Clave	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	logP	PM [g/mol]	CMI [μmol/mL]	
						<i>Trichomonas vaginalis</i> (GT <sub>3</sub> )	<i>Entamoeba histolytica</i> (HM1-IMSS)
Imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridina-2-carboxilato de etilo	1a	CO <sub>2</sub> Et	H	1.28	190.20	1.240	1.250
3-nitroimidazo[1,2- <i>a</i> ]piridina-2-carboxilato de etilo	1b	CO <sub>2</sub> Et	NO <sub>2</sub>	1.07	235.20	0.421	0.312
Imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridina-2-carbonitrilo	2a	CN	H	0.63	143.14	1.250	1.250
3-nitroimidazo[1,2- <i>a</i> ]piridina-2-carbonitrilo	2b	CN	NO <sub>2</sub>	0.34	188.14	0.196	0.312
Metronidazol						5.000	0.625

## 2. JUSTIFICACIÓN

El medicamento de elección para el tratamiento de amibiasis (*Entamoeba histolytica*), tricomoniasis (*Trichomonas vaginalis*) y giardiasis (*Giardia intestinalis*) es el metronidazol, sin embargo, actualmente, han surgido cepas resistentes. Además, se ha encontrado que dicho compuesto produce diversos efectos tóxicos. Debido a lo anterior, en el laboratorio de Química Orgánica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, se sintetizaron una serie de imidazo[1,2-*a*]piridinas 2-, 3- sustituidas relacionadas estructuralmente con el metronidazol, de las cuales, cuatro han mostrado actividad contra *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis* farmacorresistentes. Resulta importante, continuar con los estudios relacionados a la investigación y desarrollo de un nuevo fármaco de estos compuestos, enfocados a escalar el proceso de obtención de los cuatro compuestos y a realizar los estudios de toxicidad aguda y subaguda.



### **3. HIPÓTESIS**

El cambio del grupo funcional en las posiciones 2- y 3- de los cuatro compuestos imidazo[1,2-*a*]piridinas modificarán su toxicidad.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar el efecto de las imidazo[1,2-*a*]piridinas 2-, 3- sustituidas sobre la función renal y hepática en la rata.

#### **4.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Escalar los procesos de obtención de las cuatro imidazo[1,2-*a*]piridinas:
  - Imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo
  - 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo
  - Imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo
  - 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo
- Determinar la dosis letal cincuenta (DL<sub>50</sub>) para cada uno de los compuestos obtenidos.
- Evaluar el efecto del tratamiento subagudo de los compuestos obtenidos en las ratas sobre la función renal mediante el uso de los siguientes biomarcadores:
  - Excreción urinaria de glucosa y proteínas
  - Secreción tubular renal activa de aniones orgánicos
  - Velocidad de filtración glomerular
  - Determinación del balance hídrico y electrolítico
  - Lipoperoxidación y la formación de especies reactivas de oxígeno
- Evaluar el efecto del tratamiento subagudo de los compuestos obtenidos en las ratas sobre la función hepática mediante la determinación de biomarcadores como:
  - Actividad sérica de las enzimas:
    - Fosfatasa alcalina
    - Alanina aminotransferasa
  - Lipoperoxidación y la formación de especies reactivas de oxígeno
- Evaluar el efecto nefrotóxico y hepatotóxico del CCl<sub>4</sub> y paracetamol mediante el uso de los parámetros antes mencionados.

## 5. METODOLOGÍA

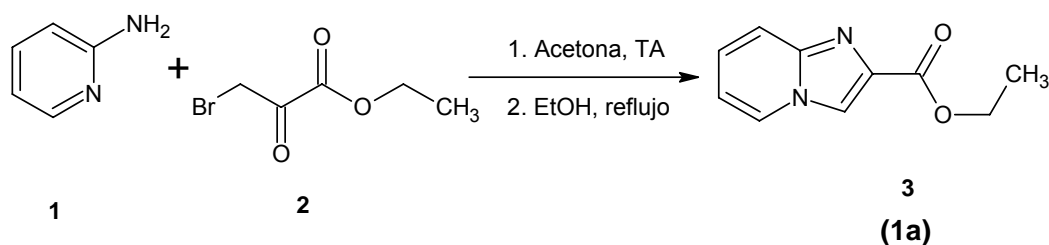
### 5.1. Preparación de imidazo[1,2-a]piridinas 2-, 3- sustituidas

#### 5.1.1. Generalidades

Los puntos de fusión de todos los compuestos sintetizados fueron determinados en un aparato Electrothermal 9100 y no están corregidos. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  obtenidos en un espectrómetro de RMN Varian Mercury de 300 MHz se realizaron a 300 y 75 MHz, respectivamente. Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  obtenidos en un espectrómetro Varian RMN System de 500 MHz se realizaron a 500 y 125 MHz, respectivamente. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se dan en partes por millón *ppm* usando como referencia interna al tetrametilsilano (TMS;  $\delta = 0$ ).

Los reactivos bromopiruvato de etilo, 2-aminopiridina, oxiclورو de fósforo, tetrametilsilano, dimetil sulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ), cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. La acetona y el hidróxido de amonio de J. T. Baker. El éter etílico y el ácido sulfúrico de Fermont. El ácido nítrico de Indeq.

#### 5.1.2. Imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1a)



Se prepararon dos soluciones:

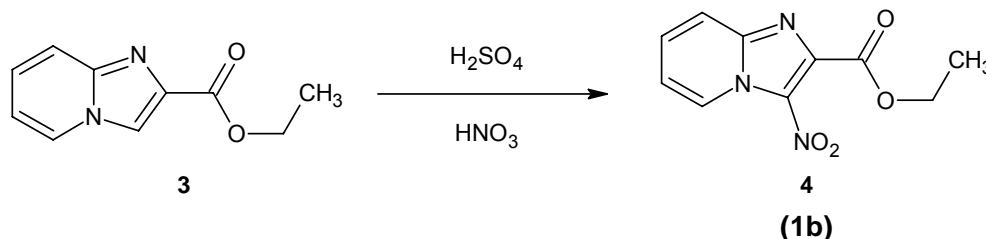
1.- La solución A, conformada por 8.0 g (85 mmol) de 2-aminopiridina (1) en 40 mL de acetona grado reactivo.

2.- La solución B, conteniendo 16.8 g (86.13 mmol) de bromopiruvato de etilo (2) en 40 mL de acetona grado reactivo.

La solución B se incorporó lentamente y con agitación constante a la solución A. La reacción se dejó agitando a temperatura ambiente durante 24 horas. El producto obtenido se filtró al vacío y se lavó con acetona grado reactivo; posteriormente, se colocó en reflujo con etanol durante 2 horas. Después se dejó enfriar y se evaporó a presión reducida, se agregó éter etílico

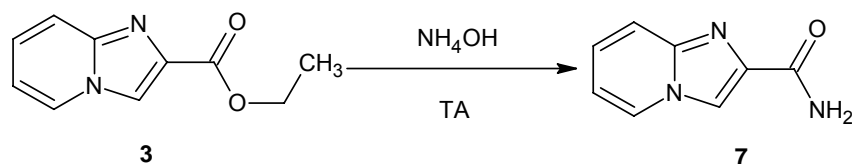
para precipitar la sal. Se separó por filtración al vacío, se dejó secar y se recristalizó en etanol (Lombardino, 1965). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  1.39 (3H, t),  $\delta$  4.46 (2H, c),  $\delta$  7.58 (1H, t),  $\delta$  7.93 (1H, d),  $\delta$  8.04 (1H, t),  $\delta$  9.01 (1H, d),  $\delta$  9.103 (1H, s); RMN  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$  14.08,  $\delta$  62.28,  $\delta$  113.22,  $\delta$  117.52,  $\delta$  119.21,  $\delta$  126.77,  $\delta$  129.63,  $\delta$  134.84,  $\delta$  141,  $\delta$  158.68. Ver espectros No. 1 y 2 (anexo).

### 5.1.3. 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1b)



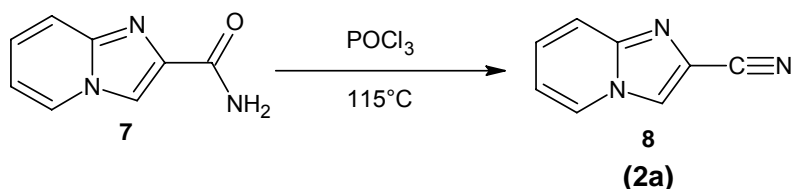
En un vaso de precipitado de 250 mL con agitación magnética eficiente, se colocaron 10 g (52.58 mmol) de imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo. El vaso se enfrió en un baño de hielo-sal (intervalo de  $-5$  a  $0$   $^\circ\text{C}$ ) y se adicionaron 70 mL de ácido sulfúrico concentrado y se agitó hasta completa disolución. Posteriormente, se adicionó lentamente 8.5 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado, manteniendo la temperatura constante en un intervalo de  $0$ - $5$   $^\circ\text{C}$ . La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos en un baño de hielo y una hora a temperatura ambiente; al finalizar este tiempo se vertió alrededor de 200 g de hielo al vaso de precipitado con la mezcla de reacción, y el precipitado formado se filtró y se lavó con agua (Teulade y col., 1981; Katritzky y col., 2005). Finalmente, el producto se dejó secar y se recristalizó en etanol. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  1.36 (3H, t),  $\delta$  4.44 (2H, c),  $\delta$  7.54 (1H, t),  $\delta$  7.86 (1H, t),  $\delta$  7.98 (1H, d),  $\delta$  9.27 (1H, d); RMN  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$  13.82,  $\delta$  62.38,  $\delta$  118.26,  $\delta$  118.42,  $\delta$  128.09,  $\delta$  132.34,  $\delta$  139.94,  $\delta$  144.60,  $\delta$  162.19. Ver espectros No. 3-5 (anexo).

#### 5.1.4. Imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxamida (7)



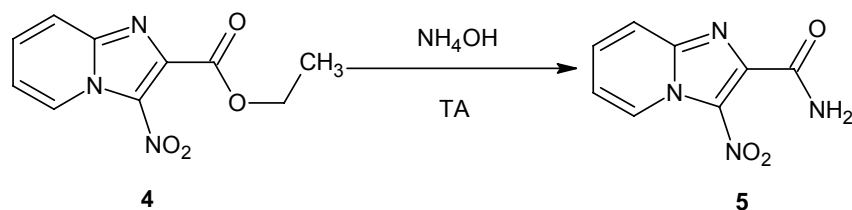
En un matraz de fondo redondo, con agitación magnética, se colocaron 10.78 g (56.68 mmol) de (3) y se adicionaron 161.7 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 28.2%. La suspensión obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas, al concluir se enfrió en un baño de hielo, se filtró lavando dos veces con agua fría. Finalmente, el producto se dejó secar.

#### 5.1.5. Imidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2a)



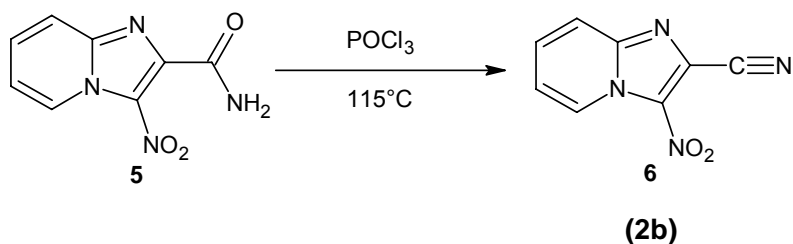
En un matraz de fondo redondo, con agitación magnética y en condiciones anhidras y bajo atmósfera de nitrógeno, se colocaron 8.58 g (53.24 mmol) de 3-imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxamida y se adicionaron 85 mL de oxiclورو de fósforo. La mezcla de reacción se calentó a  $115^\circ\text{C}$ , al disolverse el sólido se inició el conteo del tiempo de reacción hasta 1 hora; al finalizar este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se evaporó el oxiclورو de fósforo a presión reducida y al residuo obtenido se le adicionó aproximadamente 200 g de hielo; el precipitado obtenido se filtró y lavó con agua fría (Arias y col., 2006). Finalmente, el producto se dejó secar y se recristalizó en etanol. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.98 (1H, t),  $\delta$  7.35 (1H, t),  $\delta$  7.64 (1H, d),  $\delta$  8.1 (1H, s),  $\delta$  8.18 (1H, d); RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  114.58,  $\delta$  114.68,  $\delta$  118.41,  $\delta$  119.25,  $\delta$  125.98,  $\delta$  127.23,  $\delta$  145.34. Ver espectros No. 6 y 7 (anexo).

### 5.1.6. 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxamida (5)



En un matraz de fondo redondo, con agitación magnética, se colocaron 10.78 g (45.83 mmol) de 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (**4**) y se adicionaron 161.7 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 28.2%. La suspensión que se obtuvo se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas, al concluir se enfrió en un baño de hielo y se filtró lavando dos veces con agua fría. Finalmente, el producto se dejó secar.

### 5.1.7. 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2b)



En un matraz de fondo redondo, con agitación magnética y en condiciones anhidras bajo atmósfera de nitrógeno, se colocaron 8.58 g (41.62 mmol) de 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxamida y se adicionó 85 mL de oxiclورو de fósforo. El medio de reacción se calentó a  $115^\circ\text{C}$ , al disolverse el sólido se contó un tiempo de reacción de 1 hora; al finalizar este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se evaporó el oxiclورو de fósforo a presión reducida y al residuo obtenido se le adicionó aproximadamente 200 g de hielo; el precipitado obtenido se filtró y lavó con agua fría (Arias y col., 2006). Finalmente, el producto se dejó secar y se recrystalizó en etanol. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.47 (1H, t),  $\delta$  7.79 (1H, t),  $\delta$  7.94 (1H, d),  $\delta$  9.41 (1H, d); RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  11.65,  $\delta$  118.84,  $\delta$  119.55,  $\delta$  120.77,  $\delta$  127.21,  $\delta$  131.84,  $\delta$  145.31. Ver espectros No. 8 y 9 (anexo).

## **5.2. Estudios preclínicos de toxicidad**

### **5.2.1. Generalidades**

Se utilizaron ratas Wistar hembra adultas y ratones NIH hembra adultas, los cuales se mantuvieron en el bioterio, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno, con una temperatura de 22-24°C y humedad relativa de 50-55%, así mismo, se les ofreció agua y alimento *ad libitum* durante un período de 5 a 7 días para su ambientación. El manejo y cuidado de los animales se realizaron de acuerdo a los procedimientos establecidos en la NOM-062-ZOO-1999.

Los vehículos utilizados en este estudio fueron los siguientes: agua para los compuestos imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo (1a), 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo (1b) y paracetamol (APAP), tween 80 para los compuestos imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo (2a) y 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo (2b), aceite de cacahuate para tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>).

### **5.2.2. Estudio de la toxicidad aguda**

#### **5.2.2.1. Determinación de la dosis letal cincuenta**

Para calcular la DL<sub>50</sub> se utilizaron 20 ratones NIH hembra de 25 ± 3 g de peso corporal, los cuales se distribuyeron aleatoriamente en 5 grupos, el primer grupo fue el testigo, al cual se le administró el vehículo correspondiente *per os*, a los grupos restantes se les administró por la misma vía dosis de 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 g/Kg de p.c., para cada una de las imidazo[1,2-*a*]piridinas 2-, 3-sustituidas. Los animales se observaron durante 3 horas después de la administración, se mantuvieron monitoreados contando los animales vivos y muertos durante catorce días (FDA, 1996; Reed y Muench, 1938).

### **5.2.3. Estudios de la toxicidad subaguda**

#### **5.2.3.1. Modelos de toxicidad**

Se utilizaron ratas Wistar hembra adultas con un peso corporal de 200 ± 20 g, las cuales fueron distribuidas aleatoriamente en 2 grupos formados por seis ratas cada uno. El primer grupo fue el testigo, al cual se le administró el vehículo correspondiente. El segundo grupo fue el grupo con tratamiento subagudo, al cual se le administró diariamente el 10% de la DL<sub>50</sub> obtenida para

los cuatro compuestos imidazo[1,2-a]piridina 2-, 3- sustituidas, durante un tiempo de 14 días (este tratamiento fue independiente e individual para cada uno de los compuestos evaluados), la administración fue *per os*. Además, se incluyeron dos modelos de hepatotoxicidad y nefrotoxicidad, los cuales fueron: i) un grupo se intoxicó con 2.5 mL/kg de p.c. de CCl<sub>4</sub> disuelto en aceite de cacahuete (1:1, v/v) *per os* (Favari-Perozzi y col., 2007) y ii) el otro grupo se intoxicó con 1 g/kg de p.c. de una solución de paracetamol (APAP) con una concentración de 1mg/mL, que se administró durante tres días una vez.

### **5.2.3.2. Evaluación de la función renal**

La evaluación de la función renal se realizó mediante la determinación de los siguientes parámetros:

#### **5.2.3.2.1. Determinación de la concentración de glucosa**

La glucosa se determinó mediante el uso de un kit de GOD-PAP de la marca RANDOX. La glucosa se oxida por la actividad de la enzima glucosa oxidasa (GOD) y se forma peróxido de hidrógeno. Éste reacciona con fenol y 4-aminofenazona, usando como catalizador la enzima peroxidasa (POD), para formar un indicador de quinoneimina rojo-violeta, el cual tiene el máximo de absorción a 500 nm. La concentración sérica y urinaria de glucosa se determinó en un espectrofotómetro Varian mod. Cary 50, Australia. La concentración de glucosa se reporta en mg/dL (Trinder, 1969).

#### **5.2.3.2.2. Determinación de la concentración de proteínas en la orina**

Se empleó el método de Bradford, en el cual se forma un complejo entre los aminoácidos de las proteínas con el azul brillante de Coomassie. Este complejo tiene su máxima absorción a 595 nm. La concentración urinaria de proteínas se determinó en un espectrofotómetro Varian mod. Cary 50, Australia y se expresa en µg/mL (Bradford, 1976).

#### **5.2.3.2.3. Determinación de la secreción tubular renal de aniones orgánicos**

Se extrajeron los riñones y se colocaron inmediatamente en solución Ringer (pH de 7.4 y osmolalidad de 290 ± 10 mOsm/kg de agua) con burbujeo constante de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95/5%). Posteriormente, los riñones se descapsularon y

se obtuvieron rebanadas de corteza, se incubaron en solución Ringer y ácido p-aminohipúrico (PAH;  $10^{-3}$  M) durante 60 minutos a 25°C con burbujeo constante de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95/5%). Para cuantificar el PAH se siguió el método de Bratton y Marshall (1939). La captación de PAH se expresa como la relación tejido/medio (t/m)

#### **5.2.3.2.4. Determinación de la velocidad de filtración glomerular**

Se utilizó el método modificado de Jaffé, en el cual la creatinina en medio alcalino reacciona con el ácido pícrico para formar un complejo colorido; y éste posee su máxima absorción a 515 nm. La concentración urinaria y sérica de la creatinina se determinó en un espectrofotómetro Varian mod. Cary 50, Australia. Con esta información se calculó la depuración de creatinina, la cual se expresa en mL/min, además, la excreción fraccional de sodio, potasio y glucosa (Meléndez y Lozano, 1998).

#### **5.2.3.2.5. Determinación del balance hídrico**

Se midió el volumen urinario y se determinó la osmolalidad sérica y urinaria con un osmómetro de presión de vapor (Wescor mod. 5500, USA) por triplicado. Se calculó la relación (U/P), las depuraciones osmolal y de agua libre.

#### **5.2.3.2.6. Determinación del balance electrolítico**

Se midieron las concentraciones de sodio y potasio tanto en la orina como en el plasma, mediante el uso de un flamómetro (Corning mod. 400, Reino Unido). Se calculó: la excreción urinaria y la depuración de sodio y potasio (Meléndez y col., 1991).

#### **5.2.3.3. Evaluación de la función hepática**

La evaluación de la función hepática se realizó mediante la determinación de los siguientes parámetros:

##### **5.2.3.3.1. Actividad sérica de la enzima fosfatasa alcalina**

La actividad sérica de la enzima fosfatasa alcalina se determinó mediante el uso de un kit, que contiene p-nitrofenilfosfato, del cual la enzima fosfatasa alcalina transfiere el fosfato al agua, formándose fosfato inorgánico y



p-nitrofenol; este último tiene su máxima absorbancia a 405 nm. La actividad enzimática se determinó en un espectrofotómetro Varian mod. Cary 50, Australia y se expresó en U/L (Kazmierczak y Lott 1990).

#### **5.2.3.3.2. Actividad sérica de la enzima alanina aminotransferasa**

La actividad de la enzima se determinó mediante el uso de un kit, que contiene L-alanina, de la cual se transfiere el grupo amino al  $\alpha$ -cetoglutarato, dicha reacción es catalizada por la enzima alanina aminotransferasa; para dar como productos al L-glutamato y piruvato. El piruvato reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidrazina, para formar la hidrazona correspondiente, cuya máxima absorbancia es a 505 nm, Se utilizó un espectrofotómetro Spectronic mod. 20D, USA y se expresó en U/L (Murray, 1990).

#### **5.2.3.4. Cuantificación de la formación de especies reactivas de oxígeno y de la lipoperoxidación en el riñón y el hígado**

Se obtuvieron los homogeneizados de hígado y de riñón en 5 mL de regulador de fosfatos con un pH 7.4. Para los homogeneizados de riñón e hígado se tomaron alícuotas de 1 mL y 0.8 mL, respectivamente, a las cuales se adicionaron 7 mL de una mezcla cloroformo-metanol (2:1, v/v). Después de agitar durante 15 segundos, la mezcla se dejó enfriar en hielo durante 30 min para permitir la separación de fases. Al concluir este tiempo, la fase clorofórmica que presenta fluorescencia, fue medida en un fluorómetro Shimadzu, Japón a 370 nm ( $\lambda$  excitación) y 430 ( $\lambda$  emisión). La sensibilidad del fluorómetro fue ajustada a 140 unidades de fluorescencia con una solución de sulfato de quinina en  $H_2SO_4$  0.05M, con una concentración de 1  $\mu$ g/mL. La concentración de proteínas en los homogeneizados fue medida por el método de Bradford (Bradford, 1976). Los resultados se expresaron como unidades relativas de fluorescencia (URF) por miligramo de proteína (Cano-Europa y col., 2008).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) fueron medidas con base en la formación de la 2'7'-diclorofluoresceína (DCF). Para los homogeneizados de riñón e hígado se tomaron alícuotas de 10  $\mu$ L y 5  $\mu$ L respectivamente, las cuales fueron adicionadas a 1,940  $\mu$ L para el riñón o 1945  $\mu$ L para el hígado de

una mezcla TRIS:HEPES (18:1) e incubadas con la presencia de 50  $\mu$ l de diacetato de 2'7'-dichlorofluoresceína (DA-DCF) durante 1 hora a 37°C. Las muestras se enfriaron con hielo para detener la reacción. La fluorescencia fue medida en un fluorómetro Shimadzu, Japón a 488 nm ( $\lambda$  excitación) y 525 ( $\lambda$  emisión). Los resultados se expresaron en nM de DCF formada por miligramo de proteína por hora (Cano-Europa y col., 2008).

#### **5.2.3.5. Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron mediante el análisis de variancia unifactorial (ANOVA) y para comparar medias se utilizó el método de Duncan; considerándose  $p < 0.05$  una diferencia estadística significativa.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Preparación de imidazo[1,2-a]piridinas 2-, 3- sustituidas

En cuanto al escalamiento de la imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1a), se llevaron a cabo 8 experimentos para obtener un lote de 65.57 g, con un rendimiento promedio de 77.9%. Los cristales obtenidos fueron blancos en forma de agujas.

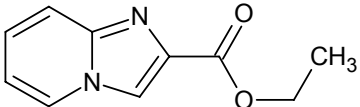
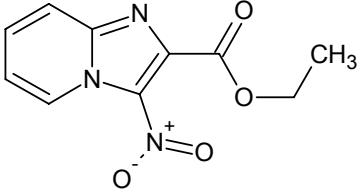
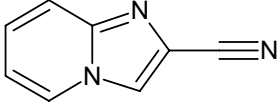
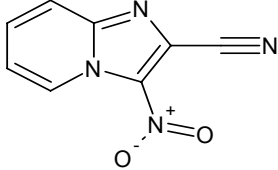
Para el compuesto 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1b), se llevaron a cabo 8 experimentos para obtener un lote de 27.48 g, con un rendimiento promedio de 59.0%. Los cristales que se obtuvieron fueron amarillos en forma de agujas.

Con respecto al escalamiento del compuesto imidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2a), se llevaron a cabo 3 experimentos para obtener 3.64 g del compuesto imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxamida (7), con un rendimiento promedio de 65.9%. Posterior a ello, se llevaron a cabo 3 experimentos para obtener 3.28 g del compuesto 2a, con un rendimiento promedio de 90.1%. Se obtuvieron cristales de color café pálido.

Para obtener el compuesto 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2b), se llevaron a cabo 8 experimentos para obtener 12.48 g de la 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxamida (5), con un rendimiento promedio de 85.8%. Del cual, se llevaron a cabo 3 experimentos para obtener 11.52 g del compuesto 2b, con un rendimiento promedio de 92.3%. Se obtuvieron cristales de color amarillo.

Las cuatro imidazo[1,2-a]piridinas 2- y 3- sustituidas preparadas fueron caracterizadas física y espectroscópicamente. Para la caracterización física se determinó el punto de fusión para cada uno de los cuatro compuestos y de éstos, se reporta el punto de fusión del lote respectivo al que se utilizó en los estudios de toxicidad aguda y subaguda (tabla 4).

**Tabla 4. Resultados del escalamiento de la ruta sintética de los compuestos imidazo[1,2-*a*]piridinas 2-, 3- sustituidas**

Compuesto	p.f. obt. °C	p.f. lit. °C	Rendimiento Global
 <b>(1a)</b>	177	174.5-175.5 <sup>a,d</sup>	77.9%
 <b>(1b)</b>	106	106-107 <sup>b,d</sup>	46.0%
 <b>(2a)</b>	176	169-170 <sup>c,d</sup>	46.2%
 <b>(2b)</b>	163	162-164 <sup>c,d</sup>	36.4%

Se presentan los puntos de fusión obtenidos y los rendimientos globales promedio.

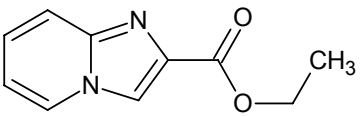
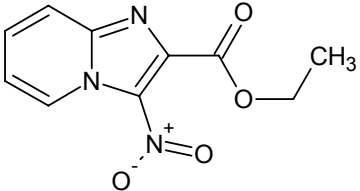
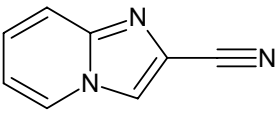
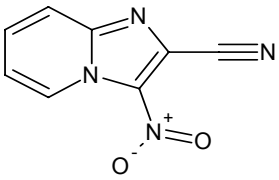
Los puntos de fusión no están corregidos en función a la presión atmosférica.

<sup>a</sup>Lombardino, 1965; <sup>b</sup>Teulade y col., 1981; <sup>c</sup>Arias y col., 2006; <sup>d</sup>Mexica-Ochoa, 2007.

## 6.2. Evaluación de la toxicidad aguda

De acuerdo a la dosis letal cincuenta ( $DL_{50}$ ) obtenida para cada uno de los compuestos imidazo[1,2-*a*]piridina 2-, 3- sustituidas, los compuesto 2a y 2b son más tóxicos que los compuestos 1a y 1b. Con respecto a los compuestos nitrados en la posición tres, 1b y 2b, estos presentaron menos toxicidad comparada con su pareja homóloga 1a y 2a, respectivamente. A pesar de ello, los cuatro compuestos probados se encuentran dentro la clasificación de ligeramente tóxicos a prácticamente no tóxicos (tabla 5), (United Nations, 2007).

**Tabla 5.  $DL_{50}$  de las imidazo[1,2-*a*]piridinas 2-, 3- sustituidas**

Compuesto	Vía oral $DL_{50}$ [g/kg] p.c.	Clasificación	Categoría
(1a) 	3.175	Prácticamente no tóxico	5
(1b) 	> 4.000	Prácticamente no tóxico	5
(2a) 	0.794	Ligeramente tóxico	4
(2b) 	1.606	Ligeramente tóxico	4

### 6.3. Evaluación de la toxicidad subaguda

#### 6.3.1. Valoración de la función renal

##### 6.3.1.1. Determinación de la concentración de glucosa en la orina y el suero

El grupo tratados con CCl<sub>4</sub> tuvo una disminución significativa de la carga filtrada de glucosa. Pero, tanto dicho disolvente como el APAP, no indujeron modificaciones de la concentración sérica, la depuración y las excreciones urinaria y fraccional de glucosa.

La imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo, la 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo, aceite de cacahuate, produjeron una disminución estadísticamente significativa de la carga filtrada de glucosa; por el contrario, la 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo provocó un aumento significativo en este parámetro comparado con el grupo testigo que recibió agua. La imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo y tween 80 no modificaron la carga filtrada (tabla 6).

**Tabla 6. Efecto sobre la carga filtrada y las excreciones urinaria y fraccional de glucosa de los diferentes grupos experimentales**

COMPUESTO	CF <sub>Glu</sub> [mg/min]	EU <sub>Glu</sub> [μg/min]	EF <sub>Glu</sub> [%]
Agua	1.22 ±0.24 (12)	0.19 ±0.05 (12)	0.019 ±0.005 (12)
Aceite de cacahuate	0.37 ±0.07 <sup>a</sup> (6)	0.12 ±0.04 (6)	0.035 ±0.009 (6)
Tween80	1.85 ±0.35 (6)	0.26 ±0.04 (6)	0.015 ±0.001 (6)
1a	0.39 ±0.16 <sup>a</sup> (6)	0.10 ±0.03 (6)	0.039 ±0.012 (6)
1b	0.31 ±0.04 <sup>a</sup> (6)	0.14 ±0.02 (6)	0.047 ±0.004 (6)
2a	0.90 ±0.29 <sup>b</sup> (6)	0.14 ±0.03 (6)	0.021 ±0.004 (6)
2b	1.97 ±0.33 <sup>a</sup> (8)	0.13 ±0.02 (8)	0.010 ±0.003 (8)
APAP	1.35 ±0.27 (6)	0.09 ±0.02 (6)	0.007 ±0.002 (6)
CCl <sub>4</sub>	0.36 ±0.13 <sup>a</sup> (5)	0.28 ±0.08 (5)	0.125 ±0.086 (5)

Los valores representa la media ± el error estándar para cada grupo. CF, carga filtrada; EU<sub>Glu</sub> excreción urinaria; EF, excreción fraccional.

<sup>a</sup>P<0.05 vs Testigo (H<sub>2</sub>O). <sup>b</sup>P<0.05 vs Testigo (Tween 80).

Los cuatro compuestos imidazo[1,2-a]piridina 2- y 3- sustituidas, el aceite de cacahuate y el tween 80 no indujeron cambios de la concentración sérica, la depuración y las excreciones urinaria y fraccional de glucosa (tablas 6 y 7).

**Tabla 7. Efecto sobre la depuración y la concentración sérica de glucosa de los diferentes grupos experimentales**

COMPUESTO	C <sub>glu</sub> (μL/min)	Glucosa sérica mg/dL
Agua	0.17 ±0.04 (12)	116.09 ±4.36 (12)
Aceite de cacahuate	0.10 ±0.03 (6)	135.72 ±9.15 (6)
Tween80	0.23 ±0.05 (6)	124.51 ±17.45 (6)
1a	0.08 ±0.02 (6)	112.39 ±4.92 (6)
1b	0.12 ±0.02 (6)	121.27 ±7.88 (6)
2a	0.13 ±0.03 (6)	103.46 ±3.16 (6)
2b	0.09 ±0.01 (8)	126.00 ±4.36 (8)
APAP	0.07 ±0.02 (6)	128.13 ±2.96 (6)
CCl <sub>4</sub>	0.24 ±0.11 (5)	110.68 ±9.79 (5)

Los valores representan la media ± el error estándar para cada grupo.

### 6.3.1.2. Determinación de la concentración de proteínas en la orina

Únicamente el grupo intoxicado con CCl<sub>4</sub> tuvo un incremento estadísticamente significativo de la excreción urinaria de proteínas, que fue de 88.2% y 90.2% con respecto a los grupos tratados con aceite de cacahuate y agua, respectivamente. La excreción urinaria de proteínas no se modificó en ninguno de los otros grupos (figura 6).

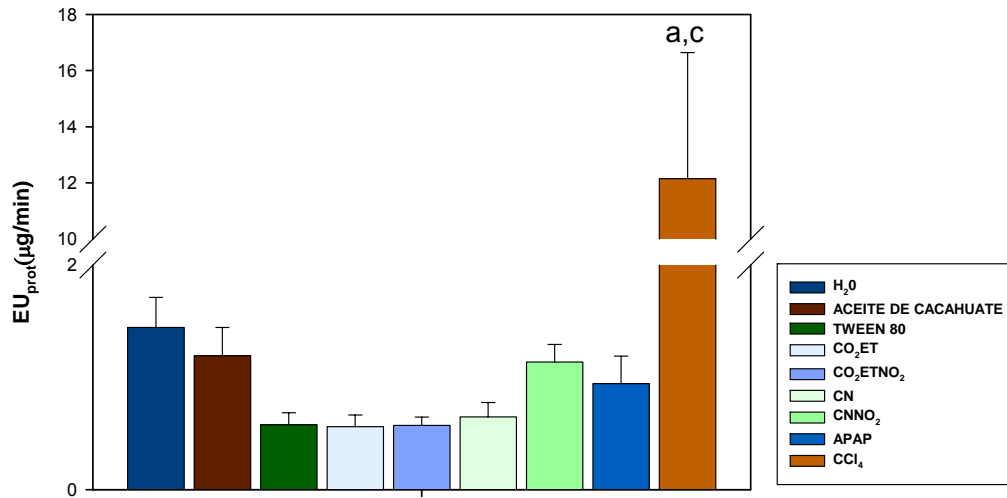


Figura 6. Efecto sobre la excreción urinaria de proteínas de los diferentes grupos experimentales. Las barras representan la media y las líneas el error estándar para cada grupo. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Testigo (H<sub>2</sub>O). <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs Testigo (aceite de cacahuete).

### 6.3.1.3. Determinación de la secreción tubular renal de aniones orgánicos

Los grupos intoxicados con CCl<sub>4</sub> y APAP provocaron una disminución significativa de este parámetro comparado con el grupo testigo agua. Además, el CCl<sub>4</sub> disminuyó significativamente la secreción activa con respecto al grupo tratado con aceite de cacahuete.

Los compuestos 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo, imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo y tween 80 produjeron una disminución en la secreción tubular renal de aniones orgánicos, con respecto al grupo testigo (H<sub>2</sub>O) (figura 7).

Los compuestos imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo, 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo y el aceite de cacahuete no indujeron cambios significativos en la secreción tubular renal de aniones orgánicos.



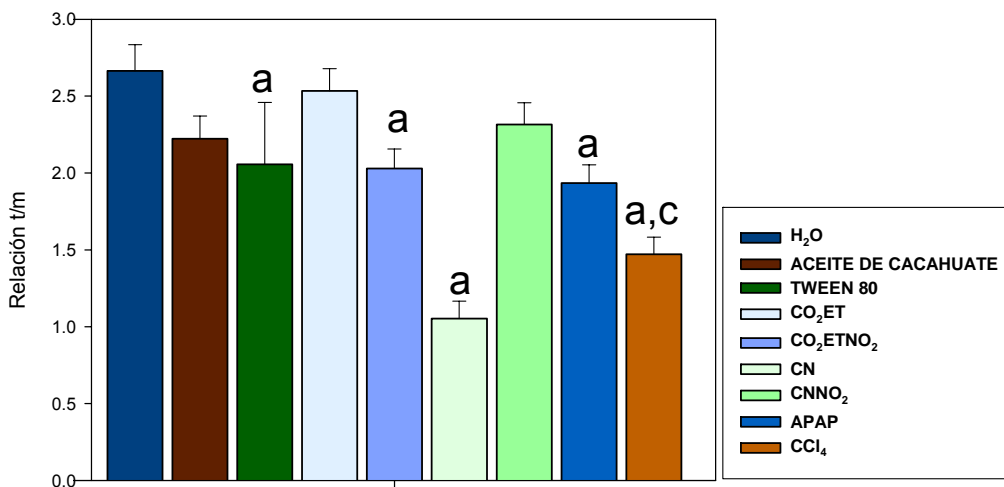


Figura 7. Efecto sobre el transporte activo de aniones orgánicos de los diferentes grupos experimentales. Las barras representan la media y las líneas el error estándar para cada grupo. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Testigo (H<sub>2</sub>O). <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs Testigo (aceite de cacahuate).

#### 6.3.1.4. Determinación del flujo urinario

El flujo urinario no se modificó en los grupos tratados con el CCl<sub>4</sub>, el APAP, el aceite de cacahuate, el tween 80 y los cuatro compuestos imidazo[1,2-a]piridina 2- y 3- sustituidas (tabla 8).

Tabla 8. Efecto sobre el flujo urinario de los diferentes grupos experimentales

COMPUESTO	Flujo urinario [ $\mu$ L/min]
Agua	4.73 $\pm$ 0.92 (12)
Aceite de cacahuate	4.39 $\pm$ 0.57 (6)
Tween80	6.29 $\pm$ 1.79 (6)
1a	4.17 $\pm$ 1.25 (6)
1b	4.54 $\pm$ 0.76 (6)
2a	6.44 $\pm$ 1.39 (6)
2b	7.08 $\pm$ 1.01 (8)
APAP	6.19 $\pm$ 1.15 (6)
CCl <sub>4</sub>	3.89 $\pm$ 1.18 (5)

Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar para cada grupo.

### **6.3.1.5. Determinación de la velocidad de filtración glomerular**

El  $\text{CCl}_4$  indujo una disminución del 62.5% en la VFG, que no fue significativa con respecto a los testigos que recibieron aceite de cacahuate y agua. También, tanto para este disolvente como para el APAP no se observaron cambios significativos en la concentración sérica de creatinina con respecto a los grupos testigo.

El aceite de cacahuate produjo una disminución estadísticamente significativa del 72.1% de la VFG, además, se observó un incremento en la concentración sérica de creatinina, con respecto al grupo testigo agua

El compuesto 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo indujo una disminución del 76.0% en la velocidad de filtración glomerular (VFG) y un incremento en la concentración sérica de creatinina, con respecto al grupo testigo agua. El compuesto imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo, produjo una disminución del 67.3% sobre la VFG, pero ésta no fue significativa con respecto al grupo testigo de agua; este compuesto tampoco modificó la concentración sérica de creatinina (figuras 8 y 9).

El compuesto imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo disminuyó 48.2% la VFG comparado con el tween 80, sin embargo, la respuesta mostrada fue similar a la del grupo testigo ( $\text{H}_2\text{O}$ ). De forma contraria, para el tween 80 se observó un incremento significativo sobre este parámetro al compararse con el grupo testigo de agua.

Para los compuestos imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo, imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo, 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo y el tween 80, no se observaron modificaciones en la concentración sérica de creatinina con respecto a los grupos testigo.

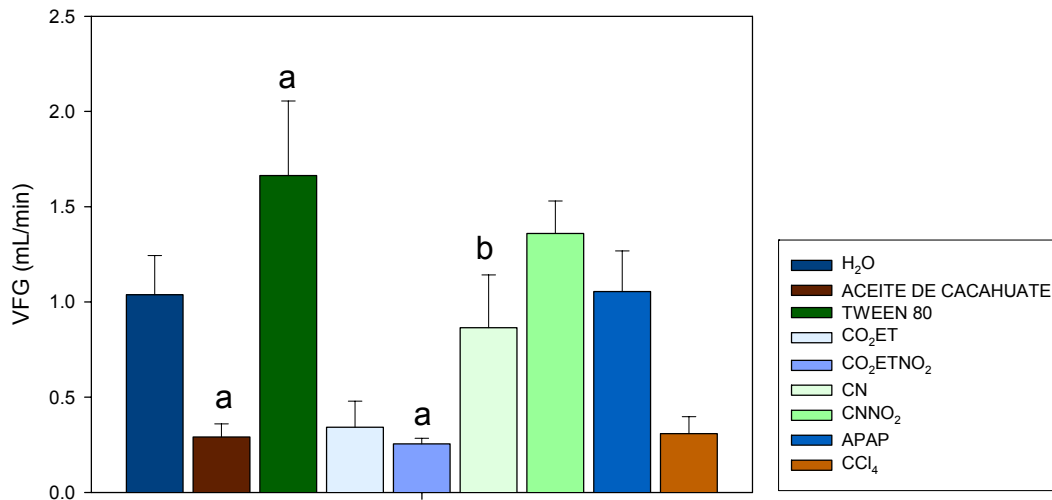


Figura 8. Efecto sobre la velocidad de filtración glomerular de los diferentes grupos experimentales. Las barras representan la media y las líneas el error estándar para cada grupo. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Testigo (H<sub>2</sub>O). <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs Testigo (Tween 80).

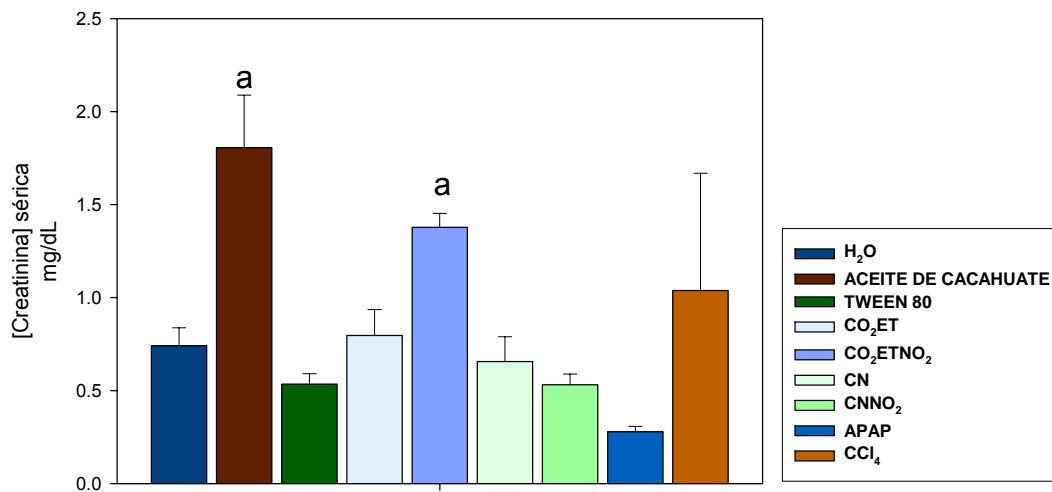


Figura 9. Efecto sobre la concentración de creatinina sérica de los diferentes grupos experimentales. Las barras representan la media y las líneas el error estándar para cada grupo. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Testigo H<sub>2</sub>O.

### 6.3.1.6. Determinación del balance electrolítico

El CCl<sub>4</sub> disminuyó significativamente la carga filtrada de sodio y potasio. Este disolvente y el APAP no modificaron la excreción urinaria, la excreción fraccional y la depuración de sodio y potasio, con respecto al grupo testigo agua (tablas 9 y 10).

El compuesto 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo, el aceite de cacahuate produjeron una disminución estadísticamente significativa en la carga filtrada de sodio y potasio. La imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo sólo disminuyó la carga filtrada de sodio. Los otros compuestos y el tween 80 no produjeron cambios significativos en estos parámetros.

La depuración de sodio se incrementó en el grupo tratado con el compuesto 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo con respecto a los grupos testigo agua y tween 80 (tablas 9 y 10).

Los compuestos imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo, 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo, imidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo, el aceite de cacahuate y el tween 80 no indujeron cambios significativos en la excreción urinaria, la excreción fraccional y en la depuración de sodio y potasio, con respecto al grupo testigo agua.

**Tabla 9. Efecto sobre la excreción urinaria y depuración de sodio y potasio de los diferentes grupos experimentales**

COMPUESTO	EU <sub>K</sub> <sup>+</sup> [μEq/min]	EU <sub>Na</sub> <sup>+</sup> [μEq/min]	C <sub>K</sub> <sup>+</sup> [μL/min]	C <sub>Na</sub> <sup>+</sup> [μL/min]
Agua	0.76 ±0.19 (12)	0.68 ±0.25 (12)	143.27 ±32.61 (12)	4.59 ±1.70 (12)
Aceite de cacahuate	0.68 ±0.11 (6)	0.24 ±0.09 (6)	119.77 ±18.80 (6)	1.77 ±0.69 (6)
Tween80	1.09 ±0.21 (6)	0.47 ±0.10 (6)	206.04 ±38.13 (6)	3.21 ±0.61 (6)
1a	0.34 ±0.06 (6)	0.29 ±0.08 (6)	51.13 ±8.86 (6)	1.82 ±0.53 (6)
1b	0.24 ±0.03 (6)	0.34 ±0.05 (6)	37.00 ±6.18 (6)	2.19 ±0.37 (6)
2a	0.64 ±0.16 (6)	0.51 ±0.09 (6)	108.98 ±29.92 (6)	3.61 ±0.67 (6)
2b	1.01 ±0.21 (8)	1.18 ±0.31 (8)	171.29 ±35.85 (8)	8.78 ±2.47 <sup>a, b</sup> (8)
APAP	0.47 ±0.14 (6)	0.46 ±0.21 (6)	128.42 ±41.18 (6)	3.23 ±1.43 (6)
CCl <sub>4</sub>	0.78 ±0.21 (5)	0.39 ±0.14 (5)	143.29 ±32.33 (5)	2.88 ±1.08 (5)

Los valores representan la media ± el error estándar para cada grupo.

<sup>a</sup>P<0.05 vs Testigo (H<sub>2</sub>O). <sup>b</sup>P<0.05 vs Testigo (Tween 80).

**Tabla 10. Efecto sobre la excreción fraccional y la carga filtrada de sodio y potasio de los diferentes grupos experimentales**

COMPUESTO	EF <sub>K</sub> <sup>+</sup> [%]	EF <sub>Na</sub> <sup>+</sup> [%]	CF <sub>K</sub> <sup>+</sup> [μEq/min]	CF <sub>Na</sub> <sup>+</sup> [μEq/min]
Agua	16.31 ±3.07 (12)	0.46 ±0.11 (12)	5.57 ±1.23 (12)	154.06 ±29.89 (12)
Aceite de cacahuete	52.49 ±11.99 (6)	0.44 ±0.17 (6)	1.70 ±0.43 <sup>a</sup> (6)	40.27 ±9.01 <sup>a</sup> (6)
Tween80	15.18 ±4.52 (6)	0.22 ±0.04 (6)	8.80 ±2.07 (6)	242.92 ±61.59 (6)
1a	24.56 ±6.69 (6)	0.81 ±0.23 (6)	2.28 ±0.98 (6)	54.44 ±21.69 <sup>a</sup> (6)
1b	15.58 ±3.09 (6)	0.85 ±0.09 (6)	1.69 ±0.21 <sup>a</sup> (6)	39.31 ±4.28 <sup>a</sup> (6)
2a	13.55 ±1.23 (6)	0.55 ±0.13 (6)	5.07 ±1.44 (6)	124.49 ±40.89 <sup>b</sup> (6)
2b	11.94 ±1.64 (8)	0.57 ±0.12 (5)	8.03 ±0.96 (8)	196.22 ±35.32 (8)
APAP	12.49 ±3.12 (6)	0.27 ±0.09 (6)	3.99 ±0.79 (6)	147.38 ±31.27 (6)
CCl <sub>4</sub>	55.72 ±13.46 (5)	0.88 ±0.09 (5)	1.70 ±0.54 <sup>a</sup> (5)	43.09 ±11.50 <sup>a</sup> (5)

Los valores representan la media ± el error estándar para cada grupo.

<sup>a</sup>P<0.05 vs Testigo (H<sub>2</sub>O). <sup>b</sup>P<0.05 vs Testigo (Tween 80).

El CCl<sub>4</sub> no modificó la concentración sérica de sodio y potasio. El APAP indujo un decremento significativo en la concentración sérica de potasio

La imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo y la 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo produjeron un incremento significativo del 21.4% y 24.4%, respectivamente, sobre la concentración sérica de potasio.

Los compuestos imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo, 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo, el aceite de cacahuete y el tween 80 no provocaron cambios en la concentración sérica potasio (tabla 11).

La concentración sérica de sodio no se modificó en ningún grupo experimental.

**Tabla 11. Efecto sobre la concentración sérica de potasio y sodio de los diferentes grupos experimentales**

COMPUESTO	[K <sup>+</sup> ] Sérica meq/L	[Na <sup>+</sup> ] Sérica [meq/L]
Agua	5.41 ±0.34 (12)	149.98 ±4.19 (12)
Aceite de cacahuate	5.71 ±0.14 (6)	139.78 ±2.49 (6)
Tween80	5.29 ±0.20 (6)	144.63 ±27.68 (6)
1a	6.57 ±0.32 <sup>a</sup> (6)	162.38 ±5.03 (6)
1b	6.73 ±0.39 <sup>a</sup> (6)	155.42 ±3.63 (6)
2a	6.03 ±0.30 (6)	142.94 ±3.88 (6)
2b	5.79 ±0.14 (8)	140.82 ±3.03 (8)
APAP	3.78±0.22 <sup>a</sup> (6)	138.58 ±2.37 (6)
CCl <sub>4</sub>	5.35 ±0.24 (5)	142.23 ±3.36 (5)

Los valores representan la media ± el error estándar para cada grupo.

<sup>a</sup>P<0.05 vs Testigo (H<sub>2</sub>O).

### 6.3.1.7. Determinación del balance hídrico

El CCl<sub>4</sub> no modificó la osmolalidad sérica, la depuración osmolal (C<sub>osm</sub>), la depuración de agua libre (C<sub>H<sub>2</sub>O</sub>), ni la relación U/P con respecto al grupo testigo (H<sub>2</sub>O). El APAP produjo un incremento en la depuración osmolal y la depuración de agua libre, sin modificar la relación U/P no fue significativo.

La osmolalidad sérica disminuyó en los grupos tratados con los compuestos imidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo y 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo con respecto al tween 80 (p<0.05). Los cuatro compuestos imidazo[1,2-a]piridina 2- y 3- sustituidas, el aceite de cacahuate y el tween 80 no la modificaron, con respecto al grupo testigo (H<sub>2</sub>O) (tabla 12).

La imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo, la 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo, la imidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo, la 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo, el aceite de cacahuate y el tween 80 no produjeron cambios significativos en la depuración osmolal (C<sub>osm</sub>), la depuración de agua libre (C<sub>H<sub>2</sub>O</sub>), ni en la relación U/P (tabla 12).

**Tabla 12. Efecto sobre el balance hídrico de los diferentes grupos experimentales**

COMPUESTO	Osmolalidad Sérica [mmol/kg]	C <sub>osm</sub> [μL/min]	C <sub>H<sub>2</sub>O</sub> [μL/min]	Relación U/P
Agua	302.68 ±6.31 (12)	16.34 ±2.75 (12)	-11.62 ±2.01 (12)	3.99 ±0.72 (12)
Aceite de cacahuete	291.20 ±3.66 (6)	14.75 ±1.69 (6)	-10.36 ±1.13 (6)	3.41 ±0.09 (6)
Tween80	315.09 ±11.86 (6)	20.99 ±4.89 (6)	-14.69 ±3.19 (6)	3.81 ±0.61 (6)
1a	293.75 ±1.88 (6)	11.15 ±2.57 (6)	-6.99 ±1.38 (6)	3.02 ±0.25 (6)
1b	294.04 ±0.88 (6)	10.82 ±1.29 (6)	-6.28 ±0.69 (6)	2.54 ±0.20 (6)
2a	291.74 ±1.34 <sup>b</sup> (6)	20.21 ±3.83 (6)	-13.77 ±2.46 (6)	3.29 ±0.22 (6)
2b	289.65 ±0.44 <sup>b</sup> (8)	23.94 ±3.19 (8)	-16.86 ±2.19 (8)	3.43 ±0.05 (8)
APAP	295.68 ±1.57 (6)	33.72 ±6.87 <sup>a</sup> (6)	-27.53 ±5.86 <sup>a</sup> (6)	5.44 ±0.59 (6)
CCl <sub>4</sub>	291.11 ±1.06 (5)	14.66 ±3.79 (5)	-10.77 ±3.04 (5)	4.05 ±0.49 (5)

Los valores representan la media ± el error estándar para cada grupo.

<sup>a</sup>P<0.05 vs Testigo (H<sub>2</sub>O). <sup>b</sup>P<0.05 vs Testigo (Tween 80).

### 6.3.1.8. Cuantificación de la formación de especies reactivas de oxígeno y de la lipoperoxidación en el riñón

Los animales de los grupos intoxicados con CCl<sub>4</sub> y APAP mostraron un incremento significativo en la formación de especies reactivas de oxígeno y en la lipoperoxidación renal con respecto al grupo testigo agua. Además, el CCl<sub>4</sub> incrementó estos parámetros con respecto al aceite de cacahuete.

La imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo, la 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo, la imidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo, la 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo, el aceite de cacahuete y el tween 80 no indujeron cambios significativos en la formación de especies reactivas de oxígeno, ni en la lipoperoxidación renal comparados con el grupo testigo agua (figuras 10 y 11).

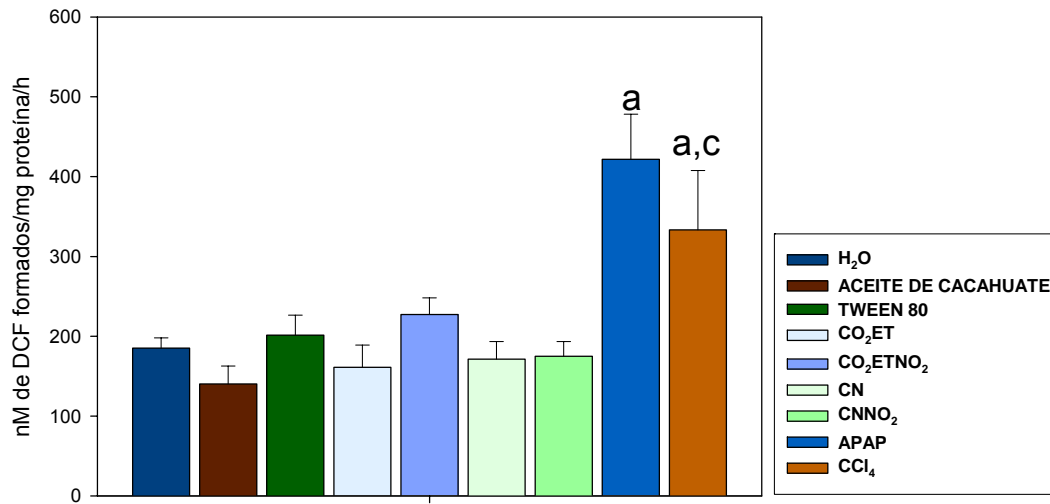


Figura 10. Efecto sobre la formación de especies reactivas de oxígeno en el riñón de los diferentes grupos experimentales. Las barras representan la media y las líneas el error estándar para cada grupo. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Testigo (H<sub>2</sub>O). <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs Testigo (aceite de cacahuete).

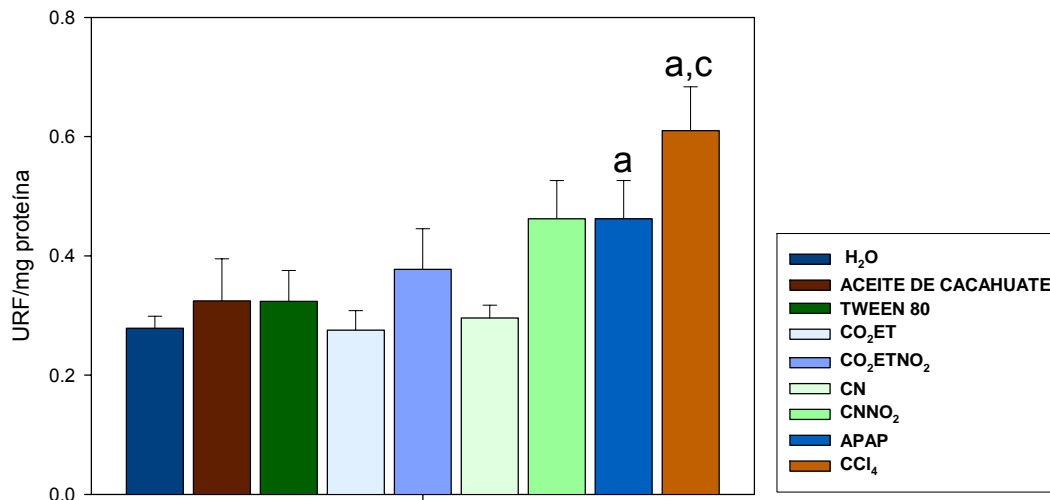


Figura 11. Efecto sobre la lipoperoxidación en el riñón de los diferentes grupos experimentales. Las barras representan la media y las líneas el error estándar para cada grupo. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Testigo (H<sub>2</sub>O). <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs Testigo (aceite de cacahuete).



## 6.3.2. Valoración de la función hepática

### 6.3.2.1. Determinación de la actividad sérica de las enzimas fosfatasa alcalina y alanina aminotransferasa

Para poder corroborar el efecto sobre la actividad sérica de ambas enzimas, además de recurrir al análisis estadístico, se calculó el límite superior normal (LSN), que fue obtenido de los valores del grupo testigo de agua, que representan valores normales sobre la actividad sérica de ambas enzimas y que fueron comparados con los efectos producidos por cada uno de los compuestos utilizados en el presente trabajo, en donde, un incremento más del doble sobre el LSN indica daño hepático (CIOMS, 1999). El LSN para la enzima fosfatasa alcalina (FA) fue de 112.79 U/L y para la enzima alanina aminotransferasa (ALT) fue de 34.05 U/L.

El CCl<sub>4</sub> además de producir un incremento estadísticamente significativo en la actividad sérica de la enzima fosfatasa alcalina, aumentó la FA 2.93 veces sobre el LSN de FA. También, el CCl<sub>4</sub> indujo un incremento significativo en esta variable con respecto al aceite de cacahuete.

El APAP no modificó la actividad sérica de FA, así como tampoco incrementó más del doble del LSN de FA

La 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2b), aunque indujo un incremento significativo con respecto al grupo testigo de agua, el incremento observado sobre el LSN de FA sólo fue de 1.45.

La imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo, la 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo, la imidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo, el aceite de cacahuete y el tween 80 no modificaron la actividad sérica de FA (figura 12 y tabla 13).

**Tabla 13. Múltiplos sobre el límite superior normal de los compuestos imidazo[1,2-a]piridinas 2-, 3- sustituidas**

COMPUESTO	Múltiplo de LSN (FA)	Múltiplo de LSN (ALT)
Aceite de cacahuete	0.83	1.13
Tween80	1.13	1.32
1a	0.82	0.59
1b	0.90	0.79
2a	0.95	1.13
2b	1.45	1.16
APAP	1.37	1.10
CCl <sub>4</sub>	2.93	3.75

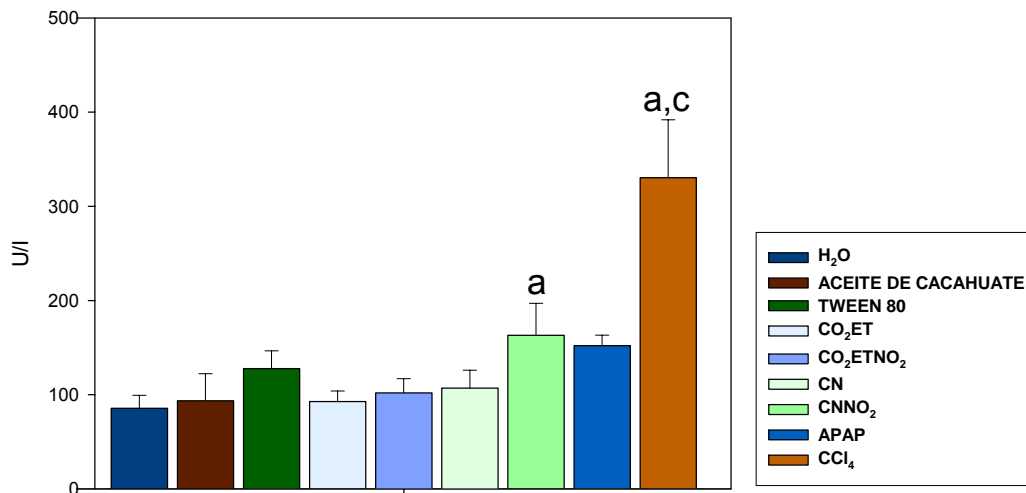


Figura 12. Efecto sobre la actividad sérica de la enzima fosfatasa alcalina de los diferentes grupos experimentales. Las barras representan la media y las líneas el error estándar para cada grupo. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Testigo (H<sub>2</sub>O). <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs Testigo (aceite de cacahuete).

El CCl<sub>4</sub> produjo un incremento estadísticamente significativo en la actividad sérica de ALT y el aumento sobre el LSN de ALT fue 3.75 veces mayor. El APAP no modificó la actividad sérica de ALT (figura 13 y tabla 13).

La imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo, la 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo, el aceite de cacahuete y el tween 80, aunque indujeron un incremento estadísticamente significativo en los niveles séricos de ALT, no aumentaron más del doble el LSN de ALT.

La imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo y la 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo no indujeron un incremento significativo en esta variable, así como tampoco aumentaron más del doble el LSN de ALT.

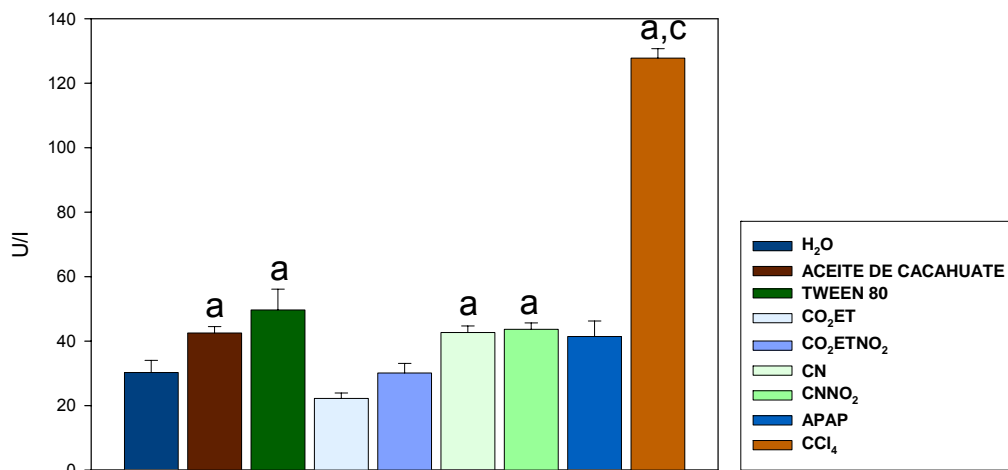


Figura 13. Efecto sobre la actividad sérica de la enzima alanina aminotransferasa de los diferentes grupos experimentales. Las barras representan la media y las líneas el error estándar para cada grupo. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Testigo (H<sub>2</sub>O). <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs Testigo (aceite de cacahuate).

### 6.3.2.2. Cuantificación de la formación de especies reactivas de oxígeno y de la lipoperoxidación en el hígado

El CCl<sub>4</sub> y el APAP causaron un incremento estadísticamente significativo de la formación de especies reactivas de oxígeno y de la lipoperoxidación hepática, con respecto al grupo testigo de agua. Además, el CCl<sub>4</sub> incrementó significativamente la formación de especies reactivas de oxígeno y la lipoperoxidación hepática con respecto al aceite de cacahuate (figuras 14 y 15).

El aceite de cacahuate produjo una disminución significativa en la lipoperoxidación hepática, pero no modificó la formación de especies reactivas de oxígeno.

Los cuatro compuestos imidazo[1,2-*a*]piridinas 2- y 3- sustituidas y el tween 80 no provocaron cambios significativos sobre la formación de especies reactivas de oxígeno y la lipoperoxidación hepática.

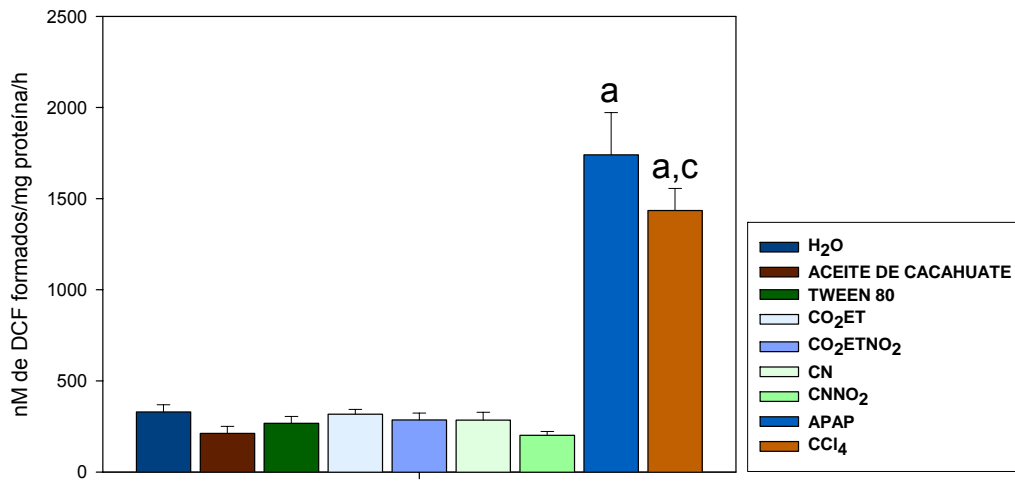


Figura 14. Efecto sobre la formación de especies reactivas de oxígeno en el hígado de los diferentes grupos experimentales. Las barras representan la media y las líneas el error estándar para cada grupo. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Testigo (H<sub>2</sub>O). <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs Testigo (aceite de cacahuete).

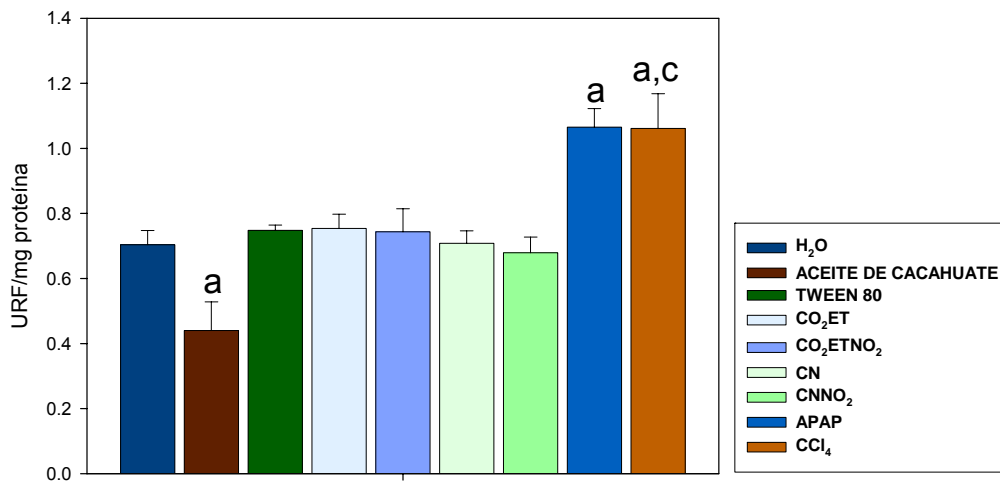


Figura 15. Efecto sobre la lipoperoxidación en el hígado de los diferentes grupos experimentales. Las barras representan la media y las líneas el error estándar para cada grupo. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Testigo (H<sub>2</sub>O). <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs Testigo (aceite de cacahuete).

## 7. DISCUSIÓN

De acuerdo a la clasificación propuesta por Herrling, en el 2005, sobre las etapas de investigación, el presente trabajo es la continuación a la fase D4 de la investigación realizada por Mexica-Ochoa en el 2007, que incluyó el escalamiento de las rutas sintéticas para obtener las cuatro imidazo[1,2-a]piridinas 2-, 3- sustituidas que presentaron mejor actividad antiparasitaria y que pueden ser alternativas para tratar la amibiasis y la tricomoniasis, las cuales son enfermedades de atención prioritaria (Bansal y col., 2009; Conde-Bonfil y De la Mora-Zerpa, 1992; Schmid, 2003; SSA, 2005; Walker, 2004).

El término escalamiento se cumplió debido a que i) se obtuvieron cantidades mayores o iguales a 10 g para las cuatro imidazo[1,2-a]piridinas 2-, 3- sustituidas, que fueron mayores a las conseguidas en la fase de descubrimiento, a excepción del compuesto 2a que se obtuvo un lote de 3.28 g y ii) se obtuvieron cantidades suficientes para realizar los estudios preclínicos de toxicidad aguda y subaguda (Rubin y col., 2006; Steinmetz y Spack, 2009).

Los procesos de obtención escalados fueron reproducibles, debido a que los rendimientos globales, la caracterización física y la espectroscópica (que demuestran pureza) obtenidos para cada uno de los compuestos corresponden a lo reportado en la literatura (Arias y col., 2006; Lombardino, 1965; Mexica-Ochoa, 2007; Teulade y col., 1981).

Adicionalmente y como parte de la fase D4, se señalan los posibles obstáculos de forma temprana que se pueden presentar en la producción a nivel industrial de dichos compuestos, con el objetivo de evitar pérdidas de tiempo y dinero. Estos obstáculos fueron valorados de acuerdo al criterio SELECT, que es utilizado por algunas empresas farmacéuticas (Butters y col., 2006). Debido a que dicho criterio hace hincapié en la seguridad, este trabajo incluyó la búsqueda de riesgos potenciales y se encontró que las materias primas utilizadas como el ácido sulfúrico, el ácido nítrico, el hidróxido de amonio y el oxiclورو de fósforo son muy tóxicas y peligrosas *per se*, tanto para el hombre como para el medio ambiente (Hoja Técnica de Seguridad del Material, [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com); EC, 2006), además se encontró que en las reacciones donde se requieren estas materias primas (deshidratación de carboxamida y nitración sulfonítrica) al incrementar la temperatura y al generar gases pueden tener un efecto negativo adicional sobre la producción a nivel

industrial (Butters y col., 2006; OSHA, 2005; Zhang, 2006), por lo que se sugiere utilizar equipo de protección y maquinaria adecuada para su manejo. Con respecto a los disolventes utilizados en la síntesis de los compuestos imidazo[1,2-a]piridinas 2-, 3- sustituidas, estos son de menor toxicidad y riesgo (FDA, 2003).

Con respecto al criterio económico, la obtención de los cuatro compuestos imidazo[1,2-a]piridinas 2- y 3- sustituidas requirió pocos pasos, de duración mínima, con rendimientos globales de moderados a buenos (bueno es igual o mayor al 40%, a excepción para el compuesto 2b que es moderado), por lo que puede considerarse que estas rutas representan un bajo costo y pueden manejarse a nivel industrial (Enna y Williams, 2009; Zhang, 2006).

Los compuestos imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1a) y 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1b) con base en el valor obtenido de su  $DL_{50}$ , se clasifican en la categoría 5 (de prácticamente no tóxicos) y los compuestos imidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2a) y 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2b), pertenecen a la categoría 4 (de ligeramente tóxicos) (United Nations, 2007).

Este comportamiento se pudo deber al tipo de sustituyentes presentes en su estructura molecular. Se observó que la pareja análoga con el grupo carbonitrilo en la posición 2 aumentó la toxicidad con respecto a la pareja análoga con el grupo carboetoxi en la misma posición del anillo. Lo que sugiere que los compuestos con el grupo carboetoxi (1a-b), a pesar de ser más liposolubles con respecto a los compuestos con el grupo carbonitrilo (2a-b) (en función a los logP reportados por Mexica-Ochoa en el 2007), pueden ser hidrolizados por carboxiesterasas inespecíficas a los ácidos correspondientes, los cuales pueden ser más hidrosolubles y eliminados más rápido del organismo, lo que disminuye la probabilidad de producir efectos tóxicos (Testa, 2007).

Con respecto a los compuestos que tienen el grupo nitro en la posición 3, 1b y 2b se encontró que mostraron menor toxicidad en las dos parejas análogas estudiadas. Se sugiere que debido a que el grupo nitro les confiere más polaridad con respecto a los que no lo tienen, por lo que son susceptibles de ser eliminados más rápido del organismo y presentar menos toxicidad (Trager, 2007).

Los estudios de la toxicidad aguda fueron realizados en el ratón, debido que la cantidad requerida de los cuatro compuestos imidazo[1,2-*a*]piridinas 2- y 3- sustituidas es mínima en comparación a la requerida en la evaluación de la DL<sub>50</sub> en la rata.

De acuerdo a los estudios de toxicidad subaguda sobre la función renal, el CCl<sub>4</sub> y el APAP no indujeron glucosuria en los animales de experimentación, lo cual reflejó, la ausencia de daño a nivel del túbulo proximal, que es la parte de la nefrona que reabsorbe casi toda la glucosa que es filtrada por el glomérulo. Los animales de los grupos tratados con los compuestos imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo (1a), 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo (1b), imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo (2a) y 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo (2b) al no haber producido glucosuria, se sugiere que ninguno de dichos compuestos afectan los sistemas encargados de la reabsorción de glucosa a nivel del túbulo proximal (Kaplan, 2008; Schmidt y col. 2007; Tortora y Grabowsky, 2002; Vallon y col., 2005; Xu y col., 2008).

La proteinuria inducida por el CCl<sub>4</sub> sugiere que al formar radicales libres produce daño al glomérulo (que evita el paso de proteínas hacia el filtrado glomerular) y al túbulo proximal (que por pinocitosis reabsorbe las proteínas que pasan al filtrado glomerular) (Benzing, 2004; Tortora y Grabowsky, 2002).

Con respecto a los cuatro compuestos imidazo[1,2-*a*]piridina 2- y 3-sustituidas, el aceite de cacahuate, el tween 80 y el APAP no presentaron proteinuria, lo cual indicó ausencia de daño a nivel glomerular y del túbulo proximal.

El CCl<sub>4</sub>, al haber disminuido el transporte activo de aniones orgánicos e incrementado la formación de especies reactivas de oxígeno y la lipoperoxidación renal, sugiere que produce una disminución de ATP e incluso necrosis y/o apoptosis de los túbulos proximales. Además, se ha observado que la presencia de colestasis en las ratas, regulan a la baja los OAT y los ácidos biliares hidrofóbicos que se liberan y llegan al riñón, compiten con el PAH, lo cual también explicaría la disminución del transporte activo de aniones orgánicos producida por este disolvente (Perez y Briz, 2009; Torres, 2008).

El paracetamol disminuyó el transporte de PAH, debido a que es un anión y que al igual que muchos AINE's, compite por los receptores OAT1/3 (Lee y Kim, 2004).

El compuesto 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1b) disminuyó la secreción activa de PAH, pero no incrementó la formación de especies reactivas de oxígeno, ni la lipoperoxidación renal, lo que sugiere la competencia por los transportadores de aniones orgánicos (OAT) y no de regularlos a la baja, de activar directa o indirectamente la PKC (que disminuye la actividad de los OAT) o incluso de disminuir los niveles de ATP. Además, en investigaciones realizadas en nuestro laboratorio, se ha demostrado que el compuesto 1b tiene actividad antiinflamatoria y como la mayoría de los AINE's, compiten con el PAH por los transportadores OAT1/3 (Lee y Kim, 2004; Schneider y col., 2007; VanWert y col., 2010).

A pesar de que la imidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo es una molécula neutra, disminuyó el transporte activo de aniones orgánicos, lo cual sugiere tres mecanismos: regulación a la baja de los OAT, activación directa o indirecta de PKC e incluso disminución de los niveles de ATP (Schneider y col., 2007; VanWert y col., 2010). La última opción sería la más factible, debido a que el grupo carbonitrilo en la posición 2 del anillo imidazo[1,2-a]piridina al ser un buen grupo saliente, por su estabilidad, lo cual no ocurre para el compuesto 2b por la presencia del grupo nitro en la posición 3 (es más electroattractor que el grupo carbonitrilo), puede liberarse como ión cianuro y producir inhibición de la cadena de transporte de electrones y por tanto, disminuir el transporte activo de aniones orgánicos (Scherrmann, 2007).

El comportamiento de los compuestos imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo y 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo sugiere la ausencia de un efecto directo e indirecto sobre el transporte activo de aniones orgánicos.

El  $\text{CCl}_4$  no disminuyó la VFG, ni incrementó la concentración sérica de creatinina, pero indujo proteinuria que demostró el daño sobre los glomérulos, sugiere la presencia de algunas alteraciones sobre las uniones intercelulares que forman al diafragma glomerular (DG) y que pierda su función como barrera selectiva de filtración, por tanto, permitir el paso de proteínas al filtrado



glomerular (Benzing, 2004; Lee y col., 2006; Li y col., 2003; Tortora y Grabowsky, 2002; Vaidya y col., 2008).

El aceite de cacahuete al disminuir la VFG e incrementar la concentración sérica de creatinina, sugiere que los lípidos presentes en este vehículo, al no ser difusibles del glomérulo hacia el espacio capsular, aumentan la presión que se opone a la presión hidrostática glomerular y por tanto, disminuyen la velocidad de filtración glomerular. (Kimura, 2005; Tortora y Grabowsky, 2002),

El tween 80, al incrementar la VFG y al disminuir la concentración sérica de creatinina, pudo tener efecto sobre las células mesangiales, las arteriolas aferentes o eferentes, que causó un aumento sobre la superficie glomerular o incrementó el flujo sanguíneo que se manifieste con un aumento en la VFG.

La imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1a) y la 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1b) al disminuir la VFG más del 67% con respecto a los valores normales, indica la presencia de alteraciones sobre la hemodinamia glomerular (CIOMS, 1999; Lee y Forni, 2009). Además, el incremento de la creatinina sérica que indujo el compuesto 1b, al ser más del 50%, denota una alteración mucho mayor sobre el glomérulo con respecto a su pareja análoga (CIOMS, 1999; Lee y Forni, 2009; Naughton, 2008). A pesar de que ambos compuestos disminuyeron la VFG, al no producir proteinuria, anuria u oliguria se sugiere que la alteración sobre el glomérulo no es grave. Aunado a ello, en investigaciones realizadas en nuestro laboratorio, dichos compuestos junto con sus metabolitos correspondientes han demostrado tener actividad antiinflamatoria y al ser considerados como AINE's se sugiere que inhiben la formación de prostaglandinas en el riñón y producir vasoconstricción en las arteriolas aferentes corticales y medulares, lo que disminuye la VFG (Naughton, 2008; Vaidya y col., 2008). Para confirmar la ausencia de toxicidad a nivel glomerular de dichos compuestos se necesitan estudios histológicos.

Los compuestos imidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2a) y 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2b) no indujeron alteraciones a nivel glomerular.

Se observó que los compuestos imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1a) y el 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1b) disminuyeron la CF de potasio y sodio, lo cual es el reflejo del efecto producido

en la VFG, debido a que llega menos cantidad de ambos electrolitos al riñón. Con respecto a la hipercalemia producida por ambos compuestos, se sugiere que es de etiología diferente a la tubular, debido a que no está acompañada por natriuresis (McCormick y col., 2005; Schmidt y col., 2007; Tanemoto, 2007; Verrey, 2007). Aunado a ello, se ha observado que los AINE's, al igual que 1a-b, pueden producir hipercalemia, aunque no se conozca bien el mecanismo por el cual la produzcan (Karet, 2009; Kokot y Hyla-Klekot, 2008).

La imidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2a) y 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2b), el aceite de cacahuete, el tween 80, el APAP y el CCl<sub>4</sub> no presentaron alteraciones en la homeostasis del sodio y potasio, lo cual indica que todos los sistemas implicados en la reabsorción de sodio a lo largo de la nefrona no se encuentran afectados (Kaplan, 2008; Lee y col., 2006; McCormick y col., 2005; Orlov y Mongin, 2007; Schmidt y col., 2007; Tanemoto, 2007; Vallon y col., 2005; Verrey, 2007; Yu y col., 2005). En virtud de que la excreción fraccional de sodio es un indicador de la función tubular, al relacionarse el efecto natriurético con el daño sobre la reabsorción de sodio, ninguno de los cuatro compuestos probados muestra un incremento significativo sobre este parámetro, lo cual infiere ausencia de daño a nivel tubular (Schmidt y col., 2007).

Los resultados obtenidos para el grupo tratado con CCl<sub>4</sub> no coinciden con los estudios realizados en ratas por Fernández-Llama y colaboradores en el 2000, que indujeron cirrosis mediante inhalación crónica de CCl<sub>4</sub> con un flujo de 1L/min durante una exposición inicial de 30 segundos dos veces a la semana y una final de 5 minutos tres veces a la semana y que observaron retención anormal de agua e hiponatremia (Bekheirnia y Schrier, 2006; Orlov y Mongin, 2007; Rieg y Vallon, 2009).

Los cuatro compuestos imidazo[1,2-a]piridina 2- y 3- sustituidas, el aceite de cacahuete y el tween 80, no están involucrados en la alteración de la reabsorción de agua, por lo que la capacidad renal de concentración/dilución urinaria no se encuentra afectada (Fernández-Llama y col., 2000; Rieg y Vallon, 2009).

Con respecto a los datos obtenidos para los cuatro compuestos imidazo[1,2-a]piridina 2- y 3- sustituidas sobre el balance hídrico y electrolítico, se observó que estos no presentaron daño a nivel tubular, esto fue lo contrario

comparado con el inmunosupresor ciclosporina A (CsA), que ha demostrado ser nefrotóxico a nivel tubular en modelos con ratas al haber incrementado la excreción de sodio, reducido la capacidad de concentración urinaria acompañada con poliuria, disminuido la osmolalidad urinaria y la relación U/P e inducido hipercalemia (Kaplan, 2008; Lim y col., 2007).

Los resultados obtenidos para el grupo intoxicado con CCl<sub>4</sub> sobre la formación de ERO y la lipoperoxidación renal, además del daño causado por su bioactivación en el riñón, su efecto tóxico se potencializa por la colestasis producida, donde los ácidos biliares hidrofóbicos que se liberan en la sangre y llegan al riñón causan lipoperoxidación en células tubulares directamente por la generación de ERO a nivel mitocondrial o por la activación de neutrófilos y macrófagos e incluso el estrés oxidativo permite la producción de mediadores vasoactivos como la endotelina, que disminuyen la VFG (Miyata y col, 1999; Perez y Briz, 2009; Torres, 2008).

El APAP también aumentó la formación de las especies reactivas de oxígeno y la lipoperoxidación, pero por un mecanismo diferente al CCl<sub>4</sub>, ya que al biotransformarse se forma un metabolito activo electrofílico, la N-acetilbenzoquinoneimida (NAPQI), implicada en la disminución de los niveles de GSH y en el incremento del estrés oxidativo (Guengerich y MacDonald, 2007).

Los compuestos imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1a), 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1b), imidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2a) y 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2b) no están implicados en la producción del estrés oxidativo a nivel renal ni en la disminución de los niveles de las defensas antioxidantes como el GSH (Preziosi, 2007; Miyata y col., 1999).

En lo que respecta a los compuestos 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1b) y 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2b), se demostró que la nitrorreducción es poco probable en el riñón al no presentarse elevaciones significativas de las especies reactivas de oxígeno y de la lipoperoxidación, con respecto a los grupos control. Esto es debido a que la nitrorreducción se encuentra en mayor grado en organismos o ambientes anaerobios o hipóxicos, por lo que en el riñón al ser un sistema aerobio, es poco probable que se produzcan intermediarios de la nitrorreducción que disminuye los niveles del glutatión (Clarke y col., 1980; Clarke y col., 1982;

Ehlhardt y col., 1987; Leitsch y col., 2009; Olekhovich y col., 2009; Parkinson, 2001; Trager, 2007). A pesar de que la reoxidación del radical aniónico nitro en un sistema aerobio como el riñón se formen el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, éstos son menos tóxicos que los intermediarios de la nitrorreducción (Brown y Wilson, 2004; Leitsch y col., 2009; Wardman, 1985).

El CCl<sub>4</sub> produjo colestasis demostrada por el incremento significativo de la actividad sérica de la FA así como el incremento sobre el LSN que fue mucho mayor de 2 (CIOMS, 1999; Kaslow, 2010), lo cual afirma el hecho de que produce daño en las células canaliculares debida a su bioactivación, lo que aumenta la posibilidad de alterar los sistemas de transporte hepático, el metabolismo de los ácidos biliares (Pauli-Magnus y Meier, 2006) y producir obstrucción de los conductos biliares (Chiang, 2003; Grattagliano y col., 2009; Yang y col., 2008).

Los cuatro compuestos imidazo[1,2-a]piridinas 2- y 3- sustituidas. APAP, aceite de cacahuete y tween 80 no mostraron resultados que indicaran la presencia de colestasis.

El CCl<sub>4</sub> al haber inducido un incremento estadísticamente significativo de la actividad sérica de ALT y un aumento de 3.75 veces sobre el LSN de ALT, demuestra el daño hepatocelular producido al biotransformarse por el CYP2E1 y formarse el radical libre triclorometilo, que produce daño sobre la mitocondria y necrosis en los hepatocitos (Kaslow, 2010). Además, el daño puede aumentar debido a que el proceso de necrosis involucra la activación de las células Kupffer y la inflamación, lo cual disminuye la probabilidad de que los hepatocitos se regeneren (Grattagliano y col., 2009; Perez y Briz, 2009; Ramadori y col., 2008; Yang y col., 2008). El CCl<sub>4</sub> al producir colestasis y daño hepatocelular, produce un daño hepático mixto (CIOMS, 1999; Pauli-Magnus y Meier, 2006).

Los grupos tratados con los compuestos imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1a), el 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1b), el imidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2a) y el 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2b), aceite de cacahuete, tween 80 y APAP no presentaron elevaciones sobre la actividad sérica de ALT, lo que podría indicar ausencia de daño hepatocelular.

Se evidenció el mecanismo de toxicidad del  $\text{CCl}_4$ , ya que al biotransformarse se producen radicales libres, lo cual fue demostrado por el incremento de la formación de especies reactivas de oxígeno y la lipoperoxidación (Perez y Briz, 2009). Además, se ha observado que los ácidos biliares (AB) que se almacenan durante la colestasis, interrumpen la fosforilación oxidativa, estimulan la generación de ERO y de lipoperoxidación, depletan las defensas antioxidantes, alteran el potencial de la membrana mitocondrial, rompen la membrana externa, liberan citocromo c, dañan las membranas celulares, disminuyen los niveles de ATP, alteran la regulación iónica, incrementan el volumen mitocondrial y celular, lo que finalmente produce necrosis hepatocelular. Además, los AB pueden activar a las células Kupffer y exacerbar el daño hepático (Chiang, 2003; Cullen, 2005).

El APAP también produjo un aumento en la producción de ERO y la lipoperoxidación, lo cual comprobó su mecanismo de toxicidad inherente a su bioactivación por el citocromo P450, que forma la N-acetil-benzoquinoneimina (NAPQI), un metabolito electrofílico que se une covalentemente al glutatión (GSH) y al producir estrés oxidativo, lleva a los hepatocitos a la apoptosis y/o la necrosis, en función al tiempo de exposición y a la dosis administrada (Grattagliano y cols., 2009). El modelo de toxicidad con APAP de 1.0 g/kg no fue el adecuado para producir un efecto hepatotóxico ni nefrotóxico, lo que comprueba la teoría de que el destino celular está en función de la dosis y el período de exposición de un compuesto, lo que a cantidades bajas o moderadas puede haber la posibilidad de reparación celular (Guengerich y MacDonald, 2007)

Los compuestos imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1a), el 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1b), el imidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2a), el 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2b), aceite de cacahuate y tween 80 no produjeron incrementos significativos de la formación de ERO y la lipoperoxidación, lo cual indicó que dichos compuestos no afectan las defensas antioxidantes, y por tanto, no producen estrés oxidativo en los hepatocitos.

Al igual que en el riñón, se demostró que la nitrorreducción de los compuestos 1b y 2b fue poco probable en el hígado, al no presentarse un aumento de las especies reactivas de oxígeno, ni de la lipoperoxidación. Esto

es debido que la reducción de compuestos aromáticos nitrados está disminuida en ambientes aerobios como el hígado (Brown y Wilson, 2004; Clarke y col., 1980; Clarke y col., 1982; Ehlhardt y col., 1987; Leitsch y col., 2009; Olekhovich y col., 2009; Parkinson, 2001; Trager, 2007; Wardman, 1985). Además, uno de los ambientes propicios para la nitrorreducción, es el intestino donde la flavoenzima xantina oxidasa (una nitrorreductasa) se encuentra expresada 100 veces más que en el hígado, además, la microflora intestinal presente a este nivel crea un ambiente anaerobio y por tanto, es menos probable la formación de los intermediarios producidos durante la nitrorreducción (EHC 229, 2003; EHC 230, 2003; Parkinson, 2001; Sackler, 1966; Smyth y Orsit, 1989).

Hasta el momento, se ha avanzado en los estudios de investigación y desarrollo de las nuevas entidades químicas 1a, 1b, 2a y 2b con potencial de ser fármacos antiparasitarios, de los cuales se sintetizaron y escalaron, se evaluó *in vitro* su actividad antiparasitaria contra cepas de *Tricomonas vaginalis* GT<sub>3</sub> y *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS farmacorresistentes al metronidazol, se realizaron los estudios de la toxicidad aguda y parte de los de la toxicidad subaguda. Por lo cual, aún deben realizarse muchos estudios para que dichas moléculas continúen a la fase clínica y quizá, logren formar parte de un medicamento. No obstante, los resultados obtenidos han sido un logro proveniente de un gran esfuerzo de todos los miembros que integran el cuerpo de investigación y la iniciativa de implementar este tipo de investigación que es casi ausente en el país. Y además, existe la necesidad latente de encontrar nuevas alternativas para tratar la amibiasis y la tricomoniasis y más aún, en países en vías de desarrollo, como el nuestro.

## 8.0. CONCLUSIONES

- Se escalaron los procesos de obtención de los cuatro compuestos imidazo[1,2-*a*]piridinas 2- y 3- sustituidas con rendimientos de moderados a buenos (36.4% -77.9%).
- Los compuestos imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo (1a) y 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo (1b) son prácticamente no tóxicos.
- Los compuestos imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo (2a) y 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo (2b) son ligeramente tóxicos.
- Los compuestos nitrados 1b y 2b son menos tóxicos que sus respectivos análogos 1a y 2a.
- La sustitución en el carbono 2 del anillo imidazo[1,2-*a*]piridina del carboetoxi por el sustituyente carbonitrilo aumentó la toxicidad.
- El modelo de paracetamol a la dosis utilizada no produjo nefrotoxicidad, ni hepatotoxicidad, en las condiciones experimentales de este estudio.
- De los marcadores de daño a nivel de túbulo proximal, sólo los compuestos 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo e imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo disminuyeron el transporte activo de aniones orgánicos.
- Los compuestos imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo y 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo tienen efecto sobre la velocidad de filtración glomerular.
- Ninguno de los compuestos imidazo[1,2-*a*]piridina 2- y 3- sustituidas presentaron daño sobre la función hepática.
- Ninguno de los compuestos imidazo[1,2-*a*]piridina 2- y 3- sustituidas presentaron alteraciones sobre el balance hídrico y electrolítico.
- El compuesto 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo es la molécula líder de las cuatro nuevas especies químicas estudiadas.

## 9.0. BIBLIOGRAFÍA

- δ Akhila J. S., Shyamjith, Deepa, Alwar M. C. (2007). Acute toxicity studies and determination of median lethal dose. *Curr Sci*, 93(7): 917-920.
- δ Arias L., Salgado-Zamora H., Cervantes H., Campos E., Reyes A., Taylor E. C. (2006). Some nucleophilic substitutions in 2-cyano-3-nitroimidazo [1,2-a] pyridine. *J Heterocyclic Chem*, 43: 565-569.
- δ Bansal D., Ave P., Kerneis S., Frileux P., Boché O., Baglin A. C., Dubost G., Leguern A. S., Prevost M. C., Bracha R., Mirelman D., Guillén N., Labruyère E. (2009). An *ex-vivo* human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Plos Negl Trop Dis*, 3(11): 1-11.
- δ Baxt L. A., Singh U. (2008). New insights into *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Curr Opin Infect Dis*, 21(5): 489–494.
- δ Beers M. H., Berkow R. (2002). El manual Merck de diagnóstico y tratamiento. 10ª ed. Ed. Elsevier Science. España. pp. 2595-2600.
- δ Bekheirnia M. R., Schrier R. W. (2006). Pathophysiology of water and sodium retention: edematous states with normal kidney function. *Curr Opin Pharma*, 6: 202–207.
- δ Bello J., López de Cerain A. (2001). Fundamentos de ciencia toxicológica. 1ª ed. Ed. Díaz de Santos, España. pp. 318-325.
- δ Benzing T. (2004). Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol*, 15: 1382–1391.
- δ Berkowitz B. A., Katzung B. G. (1991). Evaluación básica y clínica de nuevos fármacos. En: Katzung B. G. (ed). *Farmacología Básica y Clínica*. 4ª ed. Ed. El Manual Moderno, México. pp. 73-84.
- δ Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.
- δ Bratton A. C., Marshall E. K. (1939). A new coupling component for sulfanilamide determination. *J Biol Chem*, 128:537-550.
- δ Brown J. M., Wilson W. R. (2004). Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Can*, 4: 437-447.
- δ Butters M., Catterick D., Craig A., Curzons A., Dale D., Gillmore A., Green S. P., Marziano I., Sherlock J. P., White W. (2006). Critical assessment of



- pharmaceutical processes-A rationale for changing the synthetic route. *Chem Rev*, 106: 3002-3027.
- δ Cachón A. (2008). Desarrollo de nuevos medicamentos y farmacoeconomía. En: Jaramillo F., Cardona E. G., Rincón A. R. (eds). *Farmacología General*. 2ª ed. Ed. Textos Universitarios. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. pp. 193-197.
- δ Campos A. E. (2008). Generalidades de la toxicología. En: Mendoza N. (ed). *Farmacología médica*. 1ª ed. Ed. Médica Panamericana, México. pp. 760-761.
- δ Cano-Europa E., López-Galindo G. E., Hernández-García A., Blas-Valdivia V., Gallardo-Casas C. A., Vargas-Lascari M., Ortiz-Butrón R. (2008). Lidocaine affects the redox environment and the antioxidant enzymatic system causing oxidative stress in the hippocampus and amygdala of adult rats. *Life Sci*, 83:681-685.
- δ Chiang J. Y. L. (2003). Bile acid regulation of hepatic physiology III. Bile acids and nuclear receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 284:G349-G356.
- δ CIOMS. (1999). Council for International Organization of Medical Sciences. Reporting adverse drug reactions. Definitions of terms and criteria for their use. Geneva. pp. 58-60, 108-118.
- δ Clarke E. D., Wardman P., Goulding K. H. (1980). Anaerobic reduction of nitroimidazoles by reduced flavin mononucleotide and by xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol*, 29(19): 2684-2687.
- δ Clarke E. D., Goulding K. H., Wardman P. (1982). Nitroimidazoles as anaerobic electron acceptors for xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol*, 31(20): 3237-3242.
- δ Conde-Bonfil M. C., De la Mora-Zerpa C. (1992). *Entamoeba histolytica*: un desafío vigente. *Sal Púb Méx*, 34(3):335-341.
- δ Cudmore S. L., Delgaty K. L., Hayward-McClelland S. F., Petrin D. P., Garber G. E. (2004). Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev*, 17(4): 783–793.
- δ Cullen J. M. (2005). Mechanistic classification of liver injury. *Toxicol Pathol*, 33:6–8.

- δ Delgado A., Minguillón C., Joglar J. (2003). Introducción a la química terapéutica. 2ª ed. Ed. Díaz de Santos, España. pp. 97-111.
- δ Eaton D. L., Klaassen C. D. (2001). Principles of toxicology. En: Klaassen C. D. Pesce A. J., Gendler A. J. (eds). Casarett and Doull's Toxicology, The Basic science of poisons. 6<sup>th</sup> Ed. McGraw-Hill, USA. pp. 26-30 y 501.
- δ EC. (2006). The regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council. European Community (EC).
- δ EHC 229. (2003). Environmental Health Criteria 229. Nitro- and nitro-oxy-polycyclic aromatic hydrocarbons. International Programme on Chemical Safety (IPCS). En:  
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc229.htm#7.5.1.6>
- δ EHC 230. (2003). Environmental Health Criteria 230. Nitrobenzene. International Programme on Chemical Safety (IPCS). En:  
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc230.htm#4.4>
- δ Ehlhardt W. J., Beaulieu B. B. Jr., Goldman P. (1987). Chemical and biological properties of acetyl derivatives of the hydroxylamino reduction products of metronidazole and dimetridazole. *Biochem Pharmacol*, 36(6):931-935.
- δ el-Nahas A. F., el-Ashmawy I. M. (2004). Reproductive and cytogenetic toxicity of metronidazole in male mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 94: 226–231.
- δ Enna S. J., Williams M. (2009). Defining the role of pharmacology in the emerging world of translational research. *Adv Pharmacol*, 57: 1-30.
- δ Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. (2000). Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev*, 13(2):318-331.
- δ Favari-Perozzi L., Nava-Álvarez R., Meléndez-Camargo M. E. (2007). Probable efecto hepatoprotector de la verbena en la hepatitis inducida con tetracloruro de carbono en la rata. *Rev Mex Cien Farm*, 38(3): 19-25.
- δ FDA. (1996). US Food and Drug Administration. Guidance for Industry. Single dose acute toxicity testing for pharmaceuticals. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), US Department of Health and Human Services.

- δ FDA. (2000). US Food and Drug Administration. Nonclinical Assessment of Potential Hepatotoxicity in Man. UCM091453.
- δ FDA. (2003). US Food and Drug Administration. Guidance for Industry. Q3C Impurities: tables and List. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER).
- δ FDA. (2010). US Food and Drug Administration. Guidance for Industry M3(R2) Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER).
- δ Fernández-Llama P., Jimenez W., Bosch-Marcé M., Arroyo V., Nielsen S., Knepper M. A. (2000). Dysregulation of renal aquaporins and Na-Cl cotransporter in CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis. *Kidney Int*, (58): 216–228.
- δ From Test Tube To Patient. Protecting America's Health Through Human Drugs. Fourth Edition (2006). FDA Consumer Magazine. En : <http://www.fda.gov/fdac/special/testtubetopatient/default.htm>
- δ García-Arenillas M. M., Terleira A., Portolés A. (2005). Metodología de estudio de fármacos. Ensayo Clínico. En: Lorenzo A., Moreno A., Leza J.C., Lizasoain I., Moro M.A. (eds). *Velázquez Farmacología básica y clínica*. 17<sup>a</sup> ed. Ed. Médica Panamericana. pp. 1035-1041.
- δ Grattagliano I., Bonfrate L., Diogo C. V., Wang H. H., Wang D. Q. H, Portincasa P. (2009). Biochemical mechanisms in drug-induced liver injury: certainties and doubts. *World J Gastroenterol*, 15(39): 4865-4876.
- δ Guengerich F. P., MacDonald J. S. (2007). Applying mechanisms of chemical toxicity to predict drug safety. *Chem Res Toxicol*, 20: 344-369
- δ Herrling P. L. (2005). The drug discovery process. En: Rudin M. (ed). *Progress in drug research*. Birkhäuser Verlag, Basel Switzerland. Vol 62, pp. 2-14.
- δ Jacobson-Kram D., Mills G. (2008). Leveraging exploratory investigational new drug studies to accelerate drug development. *Clin Cancer Res*, 14(12): 3670-3674.

- δ Juaristi E. Retos para el desarrollo de fármacos en México. (2007). En: Juaristi E. (ed). Diseño y producción de fármacos. 1ª Ed. El Colegio Nacional, México. pp. 1-18.
- δ Kaplan J. H. (2008). A natriuretic hormone-binding site on the sodium pump. *J Am Soc Nephrol*, 19: 1839–1840.
- δ Karet F. E. (2009). Mechanisms in hyperkalemic renal tubular acidosis. *J Am Soc Nephrol*, 20: 251–254.
- δ Kaslow J. E. (2010). Alkaline phosphatase and liver related test. En: [http://www.drkaslow.com/html/lab\\_findings.html](http://www.drkaslow.com/html/lab_findings.html)
- δ Katritzky A. R., Scriven E. F. V., Majumder S., Akhmedova R. G., Vakulenko A. V., Akhmedov N. G., Murugan R., Abboud K. A. (2005). Preparation of nitropyridines by nitration of pyridines with nitric acid. *Org Biomol Chem*, 3:538–541.
- δ Kazmierczak S. T., Lott J. A. (1990). Fosfatasa alcalina. En: Pesce A. J., Kaplan L. A. (eds). *Química Clínica Métodos*. Ed. Médica Panamericana. pp. 1083-1089.
- δ Kimura G. (2005). Glomerular function reserve and sodium sensitivity. *Clin Exp Nephrol*, 9:102-113.
- δ Kokot F., Hyla-Klekot L. (2008). Drug-induced abnormalities of potassium metabolism. *Pol Arch Med Wewn*, 118 (7-8): 431-434.
- δ Lee D. B. N., Huang E., Ward H. J. (2006). Tight junction biology and kidney dysfunction. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290: F20–F34.
- δ Lee J. B. L., Forni L. G. (2009). Recently published papers: Acute kidney injury – diagnosis and treatment. *Crit Care*, 13(2):140-141.
- δ Lee W., Kim R. B. (2004). Transporters and renal drug elimination. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44:137–66.
- δ Leitsch D., Kolarich D., Binder M., Stadlmann J., Altmann F., Duchêne M. (2009). *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. *Mol Microbiol*, 72(2), 518–536

- δ Leitsch D., Kolarich D., Wilson I. B., Altmann F., Duchêne M. (2007). Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: a central role for thioredoxin reductase. Plos Biol, 5(8): 1820-1834.
- δ Li X., Yuan H., Zhang X. (2003). Adriamycin increases podocyte permeability: evidence and molecular mechanism. Chin Med J, 116(12): 1831-1835.
- δ Lim S. W., Ahn K. O., Sheen M. R., Jeon U. S., Kim J., Yang C. W., Kwon H. M. (2007). Downregulation of renal sodium transporters and tonicity-responsive enhancer binding protein by long-term treatment with Cyclosporin A. J Am Soc Nephrol, 18: 421–429.
- δ Lombardino J. G. (1965). Preparation and new reactions of imidazo[1,2-a]pyridines. J Org Chem, 30:2403-2407.
- δ Marchetti S., Schellens J. H. M. (2007). The impact of FDA and EMEA guidelines on drug development in relation to Phase 0 trials. Br J Cancer, 97: 577-581.
- δ McCormick J. A., Bhalla V., Pao A. C., Pearce D. (2005). SGK1: A rapid aldosterone-induced regulator of renal sodium reabsorption. Physiol, 20: 134–139.
- δ Meléndez Camargo M. E., Lozano Cortés M. (1998). Renal and hepatic interaction of acetaminophen and amikacin in the infant rat. Proc West Pharmacol Soc, 41:61-63.
- δ Meléndez E., Reyes J. L., Meléndez M. A. (1991). Effects of furosemide on the renal functions of the unanesthetized newborn rat. Dev Pharmacol Ther, 17:210-219.
- δ Mexica-Ochoa C. A. (2007). Estudio del efecto modulador de diferentes grupos funcionales en imidazo[1,2-a]piridina sobre la respuesta antiparasitaria (*Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba histolytica*), Maestría en Ciencias Químico-biológicas, ENCB-IPN.
- δ Miyata T., van Ypersele de Strihou C., Kurokawa K., Baynes J. W. (1999). Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: Origin and significance of “carbonyl stress” in long-term uremic complications. Kidney Int, 55: 389-399.

- δ Murray R. L. (1990). Alanina aminotransferasa. En: Pesce A. J., Kaplan L. A. (eds). Química Clínica Métodos. Ed. Médica Panamericana. pp. 1071-1083.
- δ Naughton C. A. (2008). Drug-induced nephrotoxicity. Am Fam Physician; 78(6):743-750.
- δ NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)
- δ Novartis AG. (2009). Investigación y desarrollo. En: [http://www.novartis.com/downloads/newsroom/corporate-press-kit/6a\\_Research\\_Overview\\_ES.pdf](http://www.novartis.com/downloads/newsroom/corporate-press-kit/6a_Research_Overview_ES.pdf)
- δ Olekhnovich I. N., Goodwin A., Hoffman P. S. (2009). Characterization of the NAD(P)H Oxidase and Metronidazole Reductase Activities of the RdxA Nitroreductase of *Helicobacter pylori*. FEBS J, 276(12): 3354–3364.
- δ Orlov S. N., Mongin A. A. (2007). Salt-sensing mechanisms in blood pressure regulation and hypertension. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 293: H2039–H2053.
- δ OSHA. (2005). Occupational safety and health administration handbook for small businesses. Safety health management series. En. <http://www.osha.gov/Publications/smallbusiness/small-business.html>
- δ Pal D., Banerjee S., Cui J., Schwartz A., Ghosh S. K., Samuelson J. (2009). *Giardia*, *Entamoeba*, and *Trichomonas* enzymes activate metronidazole (nitroreductases) and inactivate metronidazole (nitroimidazole reductases). Antimicrob Agents Chemother, 53(2):458-464.
- δ Parkinson A. (2001). Biotransformation of xenobiotics. En: Klaassen C. D. Pesce A. J., Gendler A. J. (eds). Casarett and Doull's Toxicology, The basic science of poisons. 6<sup>th</sup> Edition. McGraw-Hill. USA. pp. 144-147.
- δ Pauli-Magnus C., Meier P. J. (2006). Hepatobiliary transporters and drug-induced cholestasis. Hepat, 44(4): 778-784.
- δ Perez M. J., Briz O. (2009). Bile-acid-induced cell injury and protection. World J Gastroenterol, 15(14): 1677-1689.
- δ Preziosi P. (2007). Drug development. Compr Med Chem II, 2: 173–202.

- δ Ramadori G., Moriconi F., Malik I., Dudas J. (2008). Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *J Physiol Pharmacol*, 59(suppl 1): 107-117.
- δ Reed L. J., Muench H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg*, 27: 493-497.
- δ Repetto M, Repetto G. (2009). *Toxicología Fundamental*. 4ª ed. Ed. Díaz de Santos. pp. 34-35, 403-432.
- δ Report on Carcinogens 11th Edition (11thRoC). Metronidazole. (2005). U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service. National Toxicology Program. En:  
<http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/eleventh/profiles/s112metr.pdf>
- δ Rieg T., Vallon V. (2009). ATP and adenosine in the local regulation of water transport and homeostasis by the kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 296: R419–R427.
- δ Rubin A. E., Tummala S., Both D. A., Wang C., Delaney E. J. (2006). Emerging technologies supporting chemical process R&D and their increasing impact on productivity in the pharmaceutical industry. *Chem Rev*, 106: 2794-2810.
- δ Sackler M. L. (1966). Xanthine oxidase from liver and duodenum of the rat: histochemical localization and electrophoretic heterogeneity. *J Histochem Cytochem*, 14(4): 326-333.
- δ Scherrmann J. M. (2007). The biology and function of transporters. *Compr Med Chem II*, 5: 51–85.
- δ Schmid G. (2003). Trichomoniasis treatment in women: RHL commentary The WHO Reproductive Health Library; Geneva: World Health Organization. En: [http://apps.who.int/rhl/rti\\_sti/gscorm/en/index.html](http://apps.who.int/rhl/rti_sti/gscorm/en/index.html)
- δ Schmidt C., Höcherl K., Bucher M. (2007). Regulation of renal glucose transporters during severe inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292: F804–F811.
- δ Schmidt C., Höcherl K., Schweda F., Kurtz A., Bucher M. (2007). Regulation of renal sodium transporters during severe inflammation. *J Am Soc Nephrol*, 18: 1072–1083.

- δ Schneider R., Sauvant C., Betz B., Otremba M., Fischer D., Holzinger H., Wanner C., Galle J., Gekle M. (2007). Downregulation of organic anion transporters OAT1 and OAT3 correlates with impaired secretion of para-aminohippurate after ischemic acute renal failure in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292: F1599–F1605.
- δ Schwebke J. R., Burgess D. (2004). Trichomoniasis. *Clin Microbiol Rev*, 17(4):794-803.
- δ Smyth G. E., Orsit B. A. (1989). Nitroreductase activity of NADH dehydrogenase of the respiratory redox chain. *Biochem J*, 257: 859-863.
- δ SSA. (2005). Secretaría de Salud. Hacia una política farmacéutica integral para México. Sección IV. Innovación y competitividad de la industria farmacéutica. Capítulos 13 y 15.
- δ Steinmetz K. L., Spack E. G. (2009). The basics of preclinical drug development for neurodegenerative disease indications. *BMC Neurol*, 9(Suppl1): S2.
- δ Swygard H., Seña A. C., Hobbs M. M., Cohen M. S. (2004). Trichomoniasis: clinical manifestations, diagnosis and management. *Sex Transm Infect*, 80:91–95.
- δ Tanemoto M. (2007). Regulatory mechanism of “K<sup>+</sup>-recycling” for Na<sup>+</sup>-reabsorption in renal tubules. *Clin Exp Nephrol*, 11:1–6.
- δ Testa B. (2007). Principles of drug metabolism 2: hydrolysis and conjugation reactions. *Compr Med Chem II*, 5: 133–166.
- δ Teulade J. C., Grassy G., Escale R., Chapat J. C. (1981). Nucleophilic aromatic substitution reaction of some 3-nitroimidazo[1,2-a]pyridines with thioglycolate anion in DMF. *J Org Chem*, 46(5): 1026-1030.
- δ Tortora G. J., Grabowsky S. R. (2002). Principios de anatomía y fisiología. 9ª edición. Ed. Oxford university press, México. pp. 923-938.
- δ Trager W. F. (2007). Principles of drug metabolism 1: redox reactions. *Compr Med Chem II*, 5: 87-132.
- δ The Center for Drug Evaluation and Research Handbook. (1998). Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Food and Drug Administration, US Department of Health and Human Services.

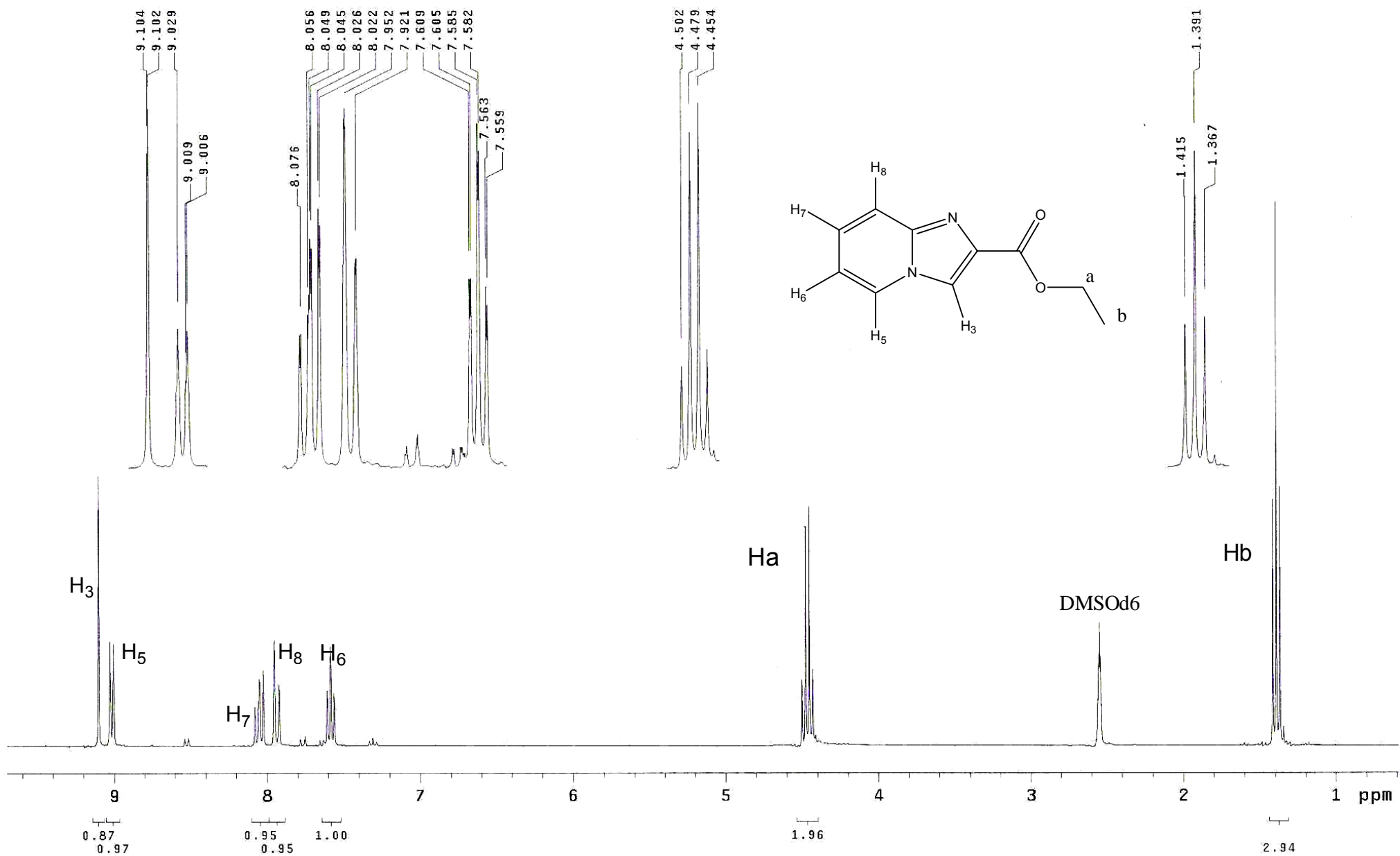


<http://www.fda.gov/downloads/AboutFDA/CentersOffices/CDER/UCM198415.pdf>)

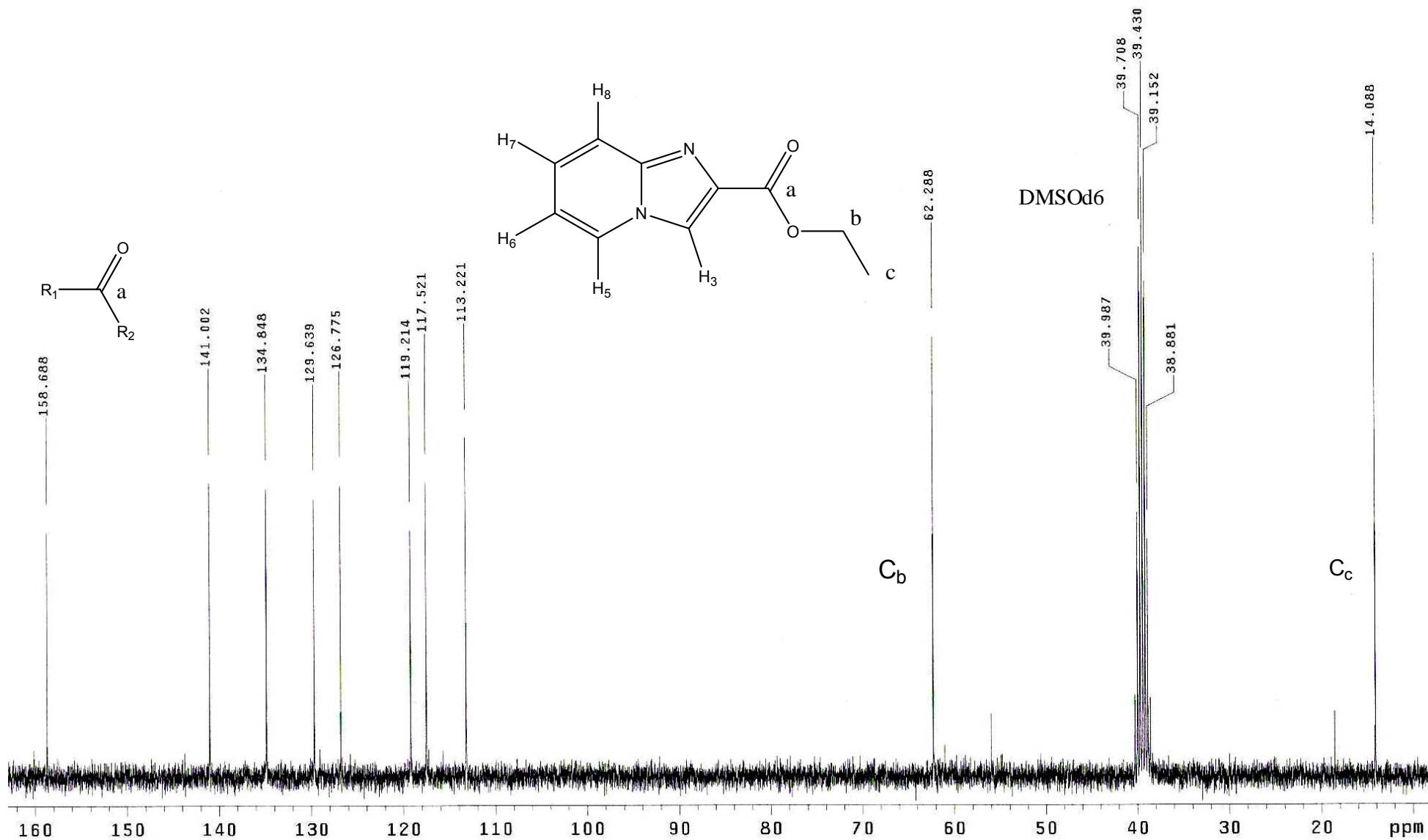
- δ Torres A. M. (2008). Renal elimination of organic anions in cholestasis. *World J Gastroenterol*, 14(43): 6616-6621.
- δ Tracy J. W., Webster L. T. Fármacos usados en la quimioterapia de infecciones causadas por protozoos. (1996). En: Hardman J. G., Limbird L. E., Molinoff P. B., Ruddon R. W., Goodman Gilman A (eds). *Las bases farmacológicas de la terapéutica de Goodman y Gilman*. 9ª edición. McGraw-Hill Interamericana, México. pp. 1058-1060.
- δ Trinder P. (1969). Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Path*, 22(2): 158-161.
- δ United Nations. (2007). *Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS)*. Second edition. United Nations, New York and Geneva. pp. 109-120.
- δ Upcroft P., Upcroft J. A. (2001). Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin Microbiol Rev*, 14(1):150-164.
- δ Vaidya V. S., Ferguson M. A., Bonventre J. V. (2008). Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 48: 463–493.
- δ Vallon V., Wulff P., Huang D. Y., Loffing J., Völkl H., Kuhl D., Lang F. (2005). Role of Sgk1 in salt and potassium homeostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288: R4–R10.
- δ VanWert A. L., Gionfriddo M. R., Sweet D. H. (2010). Organic anion transporters: discovery, pharmacology, regulation and roles in pathophysiology. *Biopharm Drug Dispos*, 31: 1–71.
- δ Verrey F. (2007). WNK4, as thiazides, shuts off NaCl reabsorption to stimulate Na/K exchange. *Nephrol Dial Transplant*, 22: 1305–1308.
- δ Vicente D., Pérez-Trallero E. (2010). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28(2):122–130.
- δ Walker G. (2004). Interventions for trichomoniasis in pregnancy: RHL commentary. *The WHO Reproductive Health Library*; Geneva: World Health Organization. En: [http://apps.who.int/rhl/rti\\_sti/gwacom/en/](http://apps.who.int/rhl/rti_sti/gwacom/en/)

- δ Wardman P. (1985). Some reactions and properties of nitro radical-anions important in biology and medicine. *Environ Health Perspect*, 64: 309-320.
- δ Xu E. Y., Perlina A., Vu H., Troth S. P., Brennan R. J., Aslamkhan A. G., Xu Q. (2008). Integrated pathway analysis of rat urine metabolic profiles and kidney transcriptomic profiles to elucidate the systems toxicology of model nephrotoxicants. *Chem Res Toxicol*, 21: 1548–1561.
- δ Yang L., Xiong A., He Y., Wang Z., Wang C., Wang Z., Li W., Yang L., Hu Z. (2008). Bile acids metabonomic study on the CCl<sub>4</sub>- and r-naphthylisothiocyanate-induced animal models: quantitative analysis of 22 bile acids by ultraperformance liquid chromatography-mass spectrometry. *Chem Res Toxicol*, 21: 2280–2288.
- δ Yu Z., Serra A., Sauter D., Loffing J., Ackermann D., Frey F. J., Frey B. M., Vogt B. (2005). Sodium retention in rats with liver cirrhosis is associated with increased renal abundance of NaCl cotransporter (NCC). *Nephrol Dial Transplant*, 20: 1833–1841.
- δ Zhang T. Y. (2006). Process chemistry: the science, business, logic, and logistics. *Chem Rev*, 106: 2583-2595.

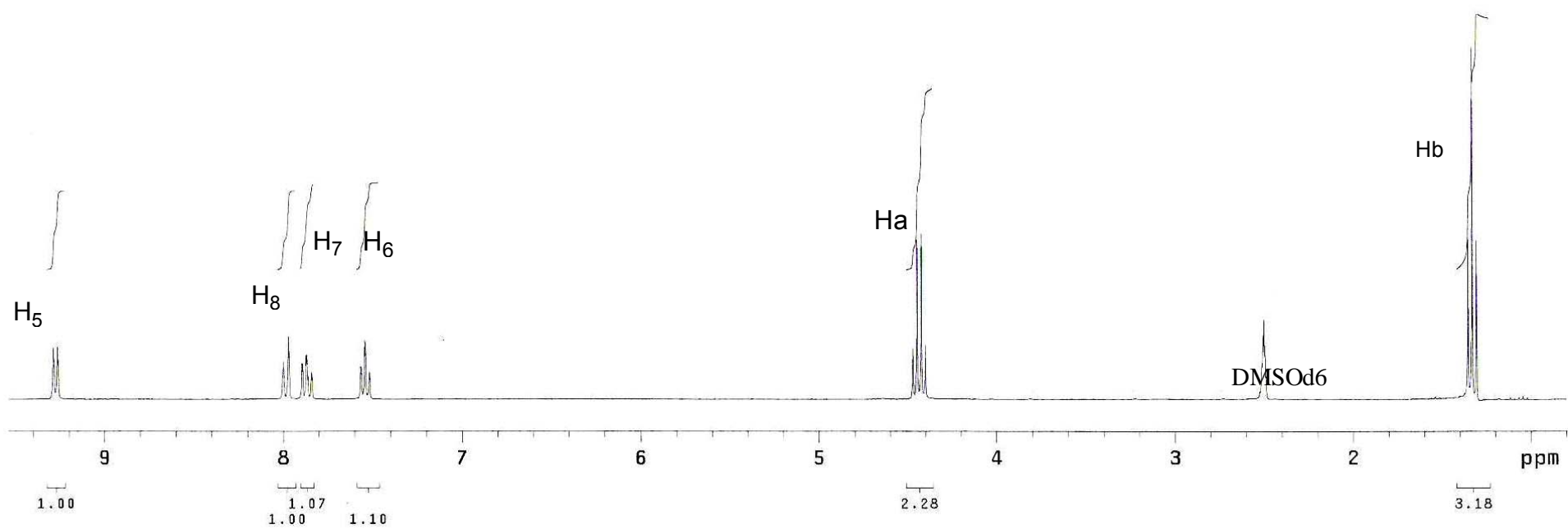
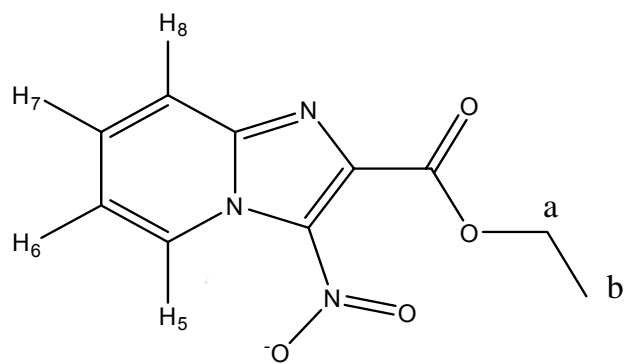
# ANEXO



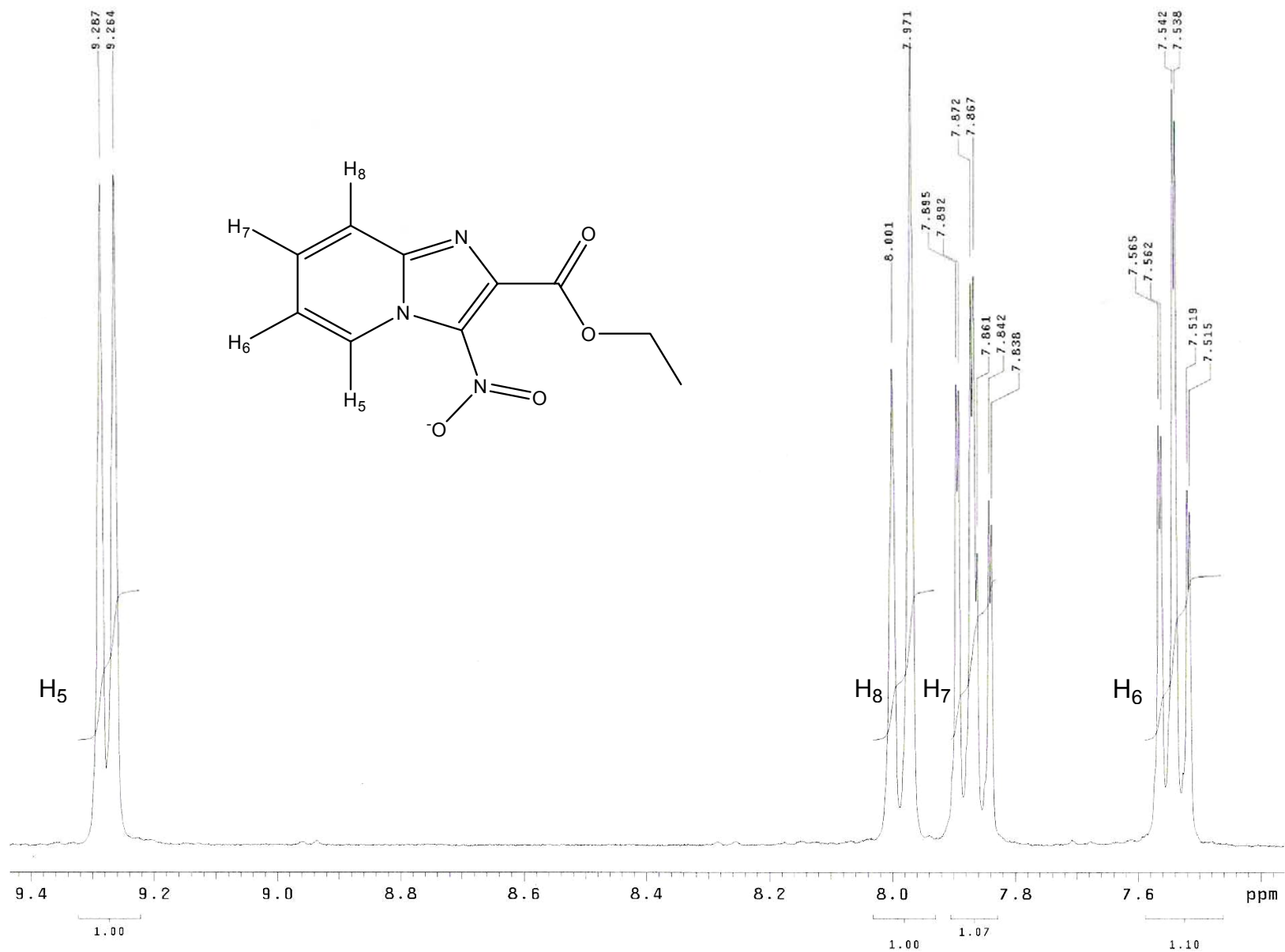
Espectro No.1. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo (1a) en DMSOd6, obtenido con una aparato de RMN de 300 MHz.



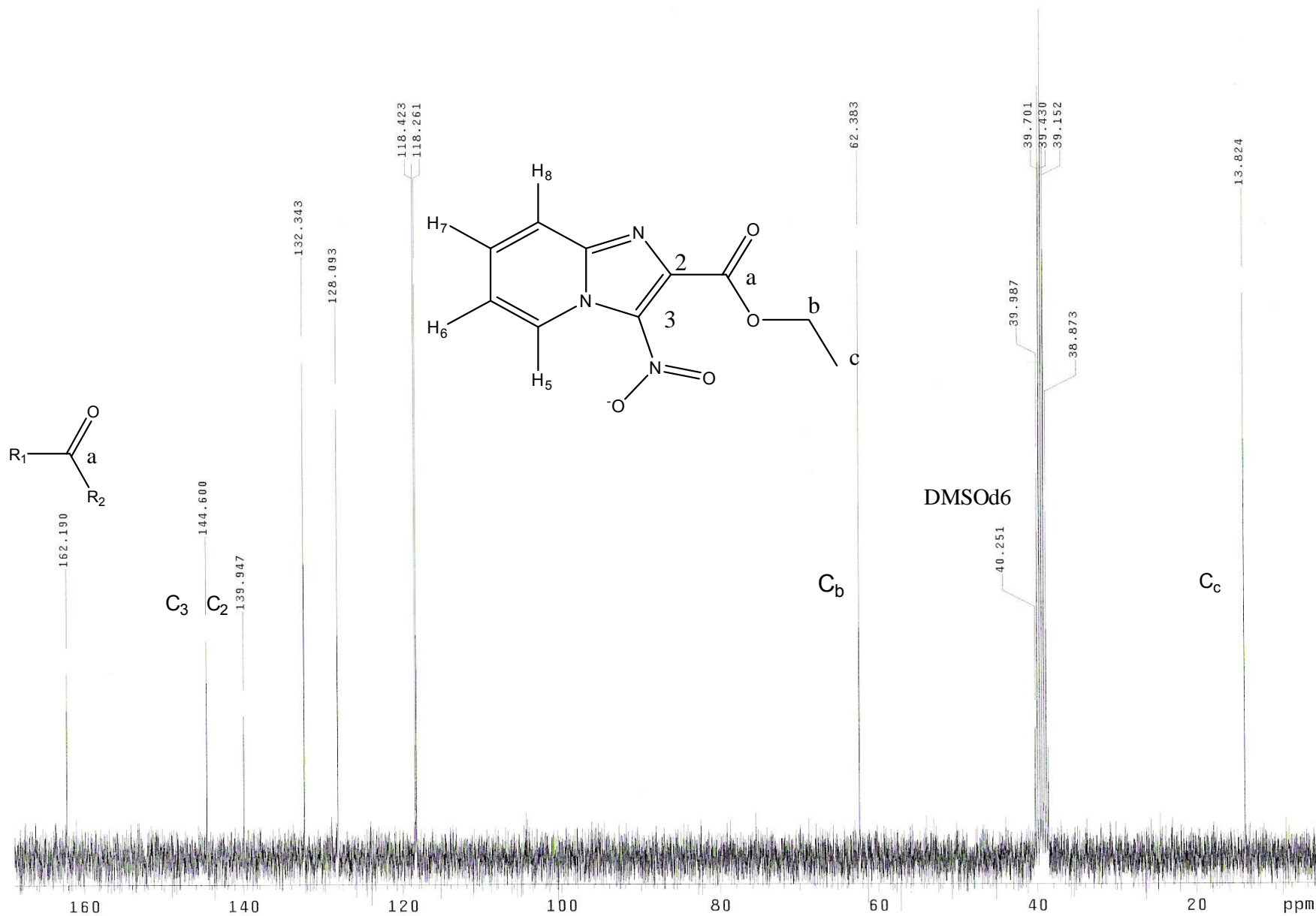
Espectro No.2. Espectro de RMN <sup>13</sup>C de imidazo[1,2-a]piridina-2-carboxilato de etilo (1a) en DMSOd6, obtenido con una aparato de RMN de 300 MHz.



Espectro No. 3. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo (1b) en DMSO $d_6$ , obtenido con un aparato de RMN de 300 MHz.

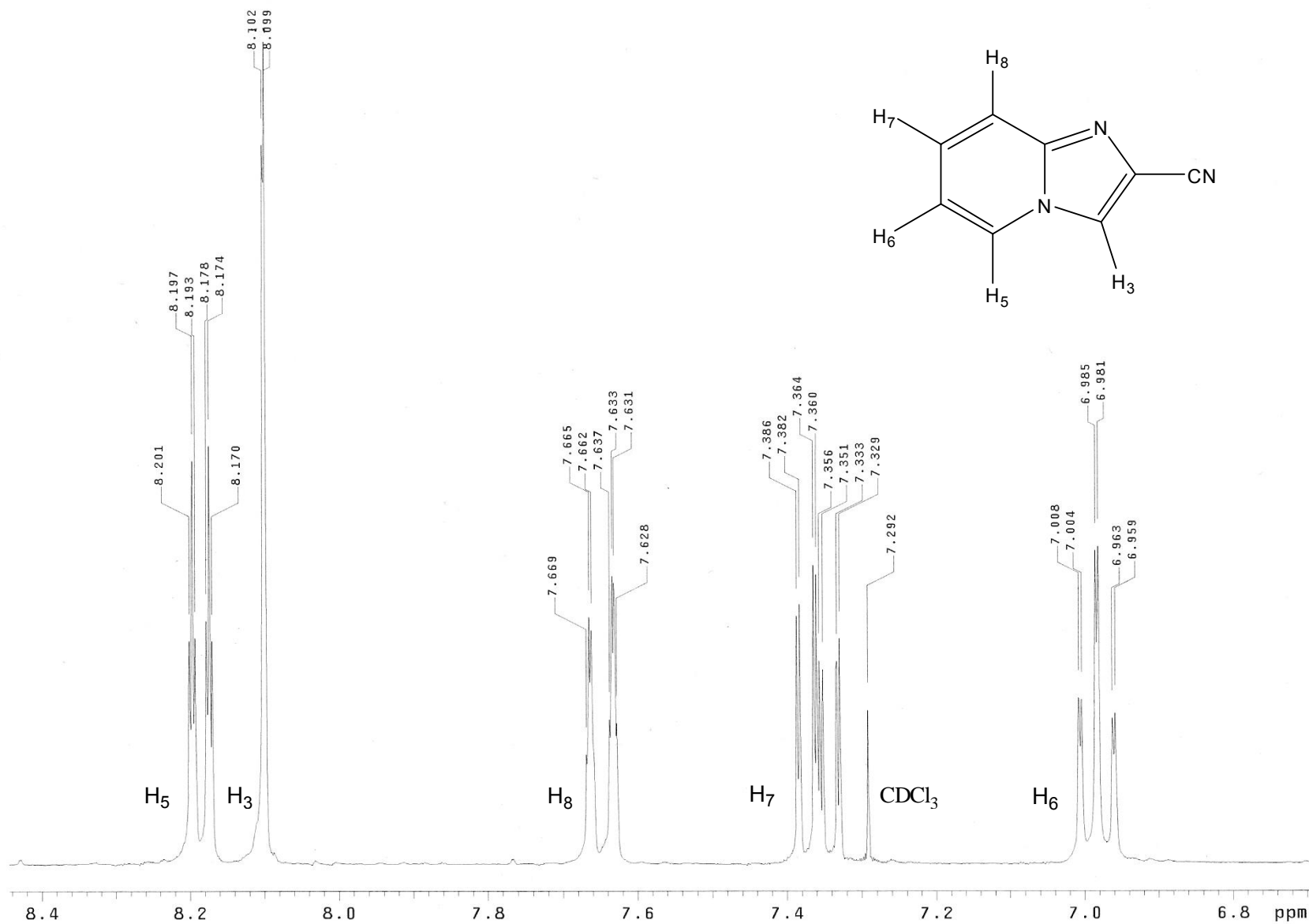


Espectro No. 4. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo (1b) en DMSOd6 (expansión), obtenido con un aparato de RMN de 300 MHz.

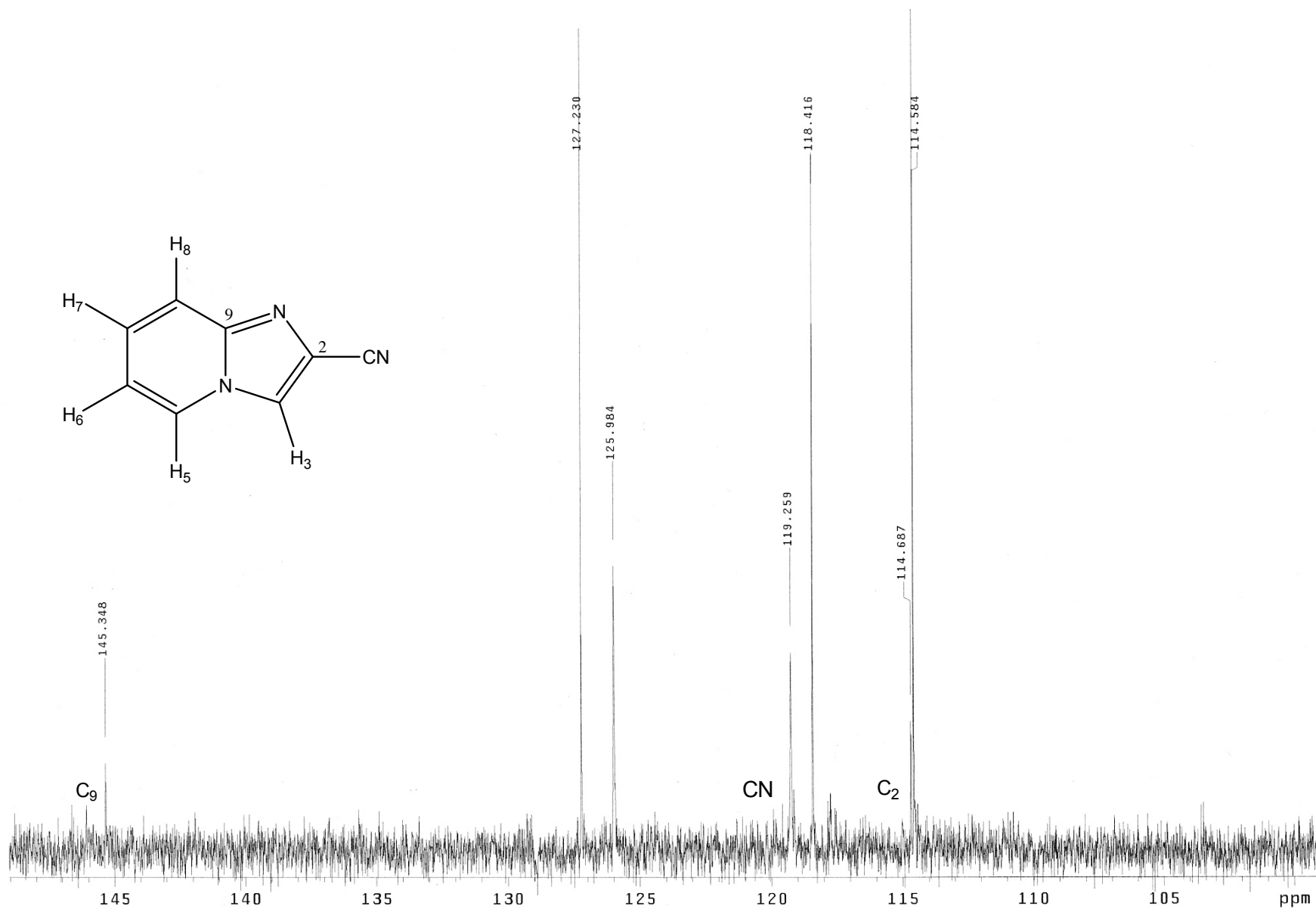


Espectro No. 5. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carboxilato de etilo (1b) en DMSO $d_6$ , obtenido con un aparato de RMN de 300 MHz.

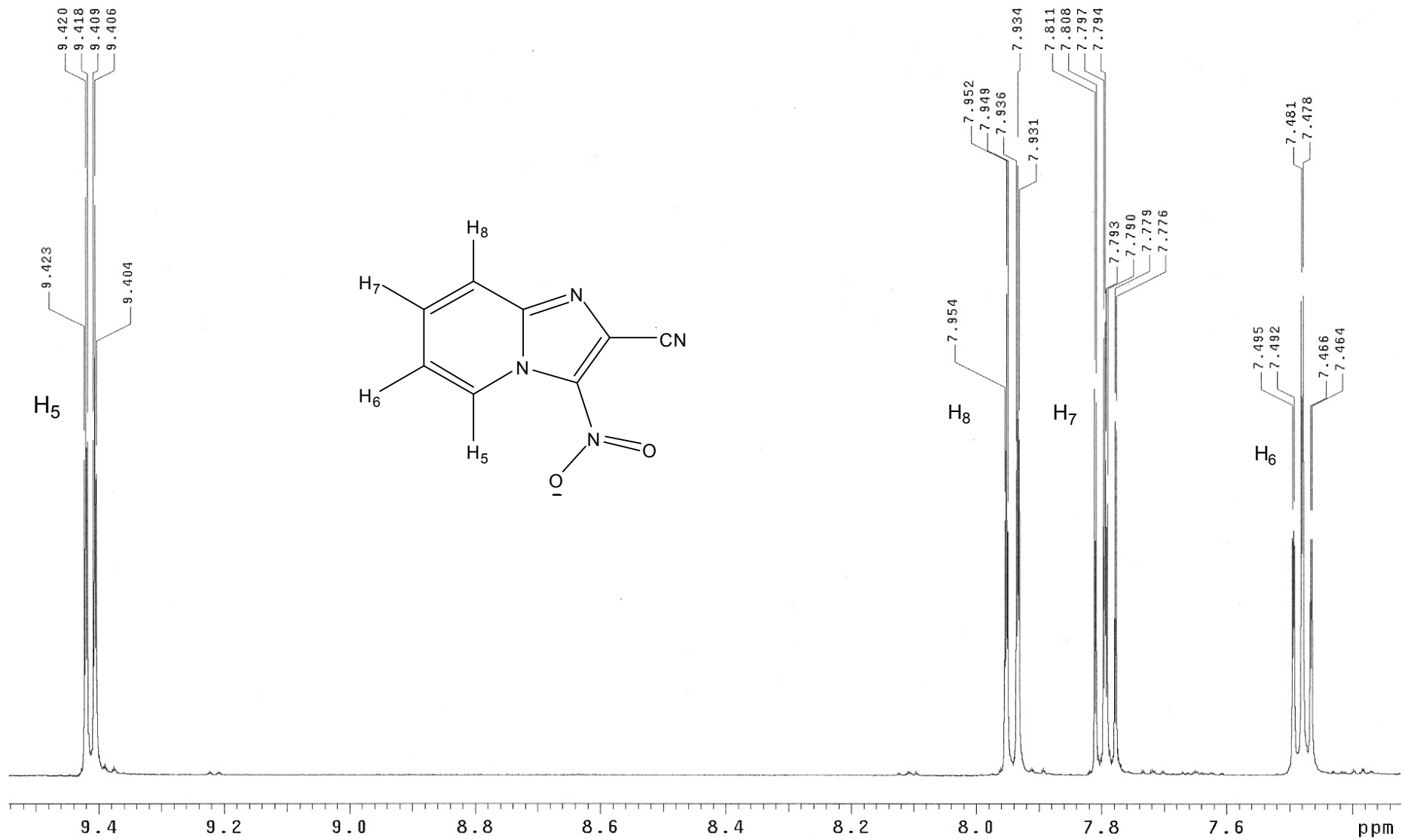




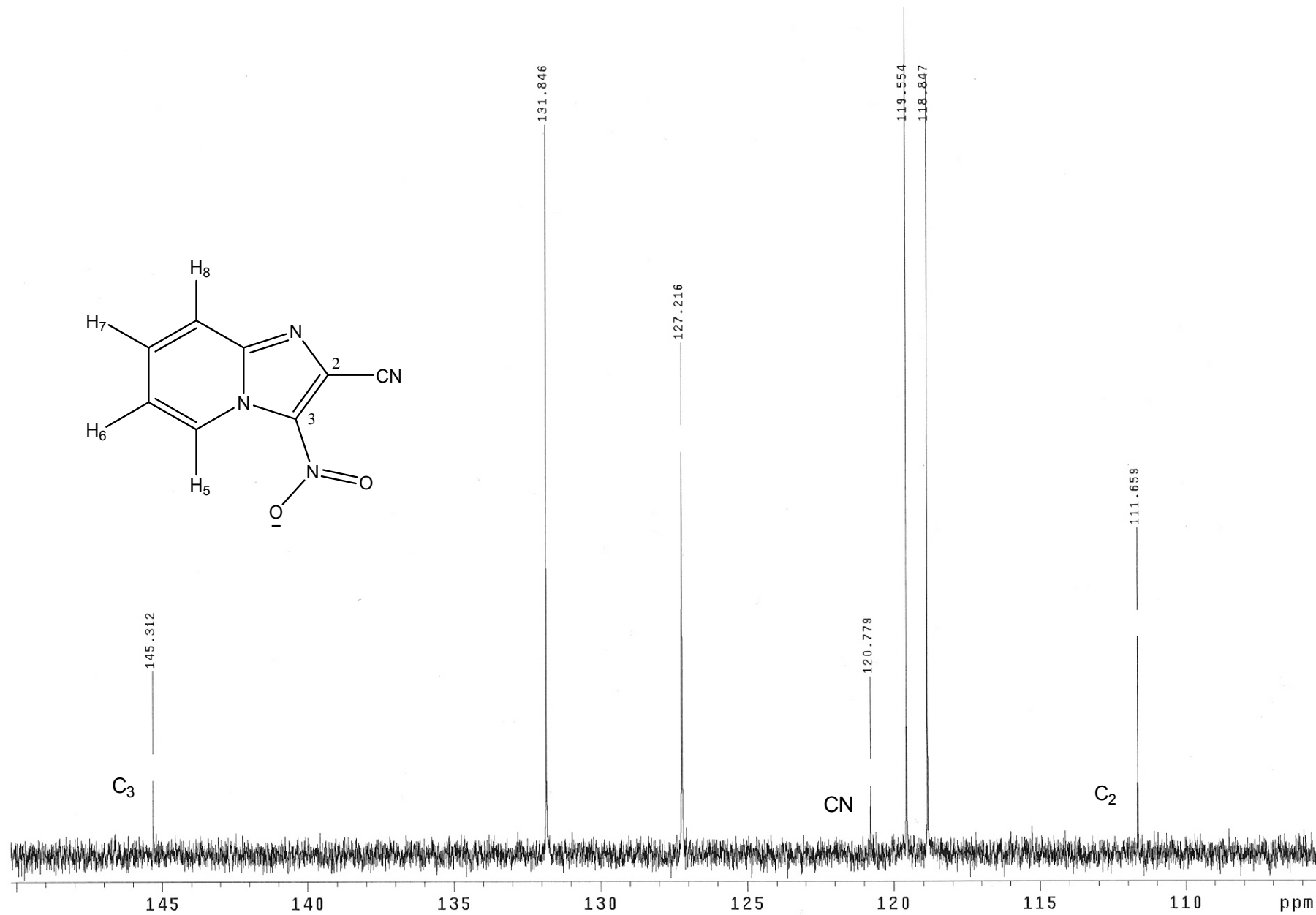
Espectro No. 6. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo (2a) en CDCl<sub>3</sub>, obtenido con un aparato de RMN de 300 MHz.



Espectro No. 7. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de imidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo (2a) en  $\text{CDCl}_3$ , obtenido con un aparato de RMN de 300 MHz.



Espectro No. 8. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 3-nitroimidazo[1,2-a]piridina-2-carbonitrilo (2b) en CDCl<sub>3</sub>, obtenido con un aparato de RMN de 500 MHz.



Espectro No. 9. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 3-nitroimidazo[1,2-*a*]piridina-2-carbonitrilo (2b) en  $\text{CDCl}_3$ , obtenido con un aparato de RMN de 500 MHz