

U
2ej



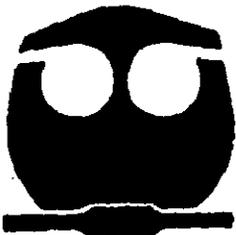
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**"EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE DERIVADOS
DEL 1-METILBENCIMIDAZOL SOBRE
Trichinella spiralis."**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA - FARMACEUTICA - BIOLOGA
P R E S E N T A :
NAYELI YADIRA LOPEZ RAMIREZ



MEXICO, D. F.

SECRETARÍA GENERAL
DE LA FACULTAD DE QUIMICA

1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

278662



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

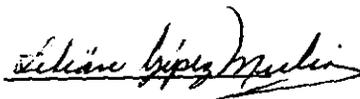
Presidente	Prof. GUTIÉRREZ RAMOS ABEL.
Vocal	M. en C. HERNÁNDEZ CAMPOS Ma. ALICIA.
Secretario	Dra. YÉPEZ MULIA LILIÁN.
1er. suplente	M. en C. HERNÁNDEZ LUIS FRANCISCO.
2do. suplente	Prof. GARCÍA ORTEGA HÉCTOR.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias
Laboratorio de Parasitología
Hospital de Pediatría
Centro Médico Nacional Siglo XXI
Instituto Mexicano del Seguro Social

Asesor del tema:

DRA. YEPEZ MULÍA LILIÁN



Sustentante:

NAYELI YADIRA LÓPEZ RAMÍREZ



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Parasitología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, en colaboración con el Laboratorio 122 del Departamento de Farmacia, Edificio "E" de la Facultad de Química UNAM.

Asimismo este trabajo recibió financiamiento económico por parte del CONACYT a través del proyecto Número:25920-M.

Agradecimientos y Dedicatorias.

***Doy gracias a Dios por todos los momentos de mi vida, porque me colma de bendiciones y por permitirme llegar hasta el final de este proyecto.**

***A mi MAMI por haberme dedicado gran parte de su vida, por su valentía, paciencia y amor; sabiendo que sin ella esto nunca hubiera sido posible. TE AMO, GRACIAS y QUE DIOS TE BENDIGA.**

***A mis abuelitos CHELO Y JOSE, que aunque ya no esten conmigo se que estarían muy contentos y satisfechos. GRACIAS por su amor y cuidados.**

***A mis tíos Rubén, Victor, Noe y a mi tía Toña; por su apoyo, cariño y comprensión.**

***A mi abuelita Cueto y a mi tía Chela, gracias por haberse preocupado por mi.**

***A TODOS mis familiares porque forman una parte importante de mi vida.**

***ALBERTO, gracias por darme tu amor, por aceptarme como soy y por compartir conmigo parte de tu vida. TE AMO Y SIEMPRE LO HARÉ.**

***A mis amigas Lís y Miris, por soportarme y compartir conmigo su estancia en la Facultad. Siempre las recordaré.**

***A mis amigas (os) de la Facultad Marce, Bety, Ari, Miguel (Churris), Victor y Luis. A Pedro, Laura, Laura Albarran, Ivonne y Marcos porque los momentos compartidos serán inolvidables.**

***A mi querido profesor Vicente Turrubiarte por su amistad y por enseñarme a disfrutar de la Química.**

***A David Espinoza por su amistad, confianza y ayuda.**

***A Irene y Juan que me han ayudado a conocer más del Señor; y a todos mis hermanos en Cristo.**

***A la Dra. Lilián Yépez por su apoyo, paciencia y asesoría que me permitieron realizar y terminar este trabajo. GRACIAS.**

***Al Dr. Roberto Cedillo por su cooperación y sencillez, y por haberme permitido trabajar en su laboratorio.**

***A Bety y Amparito por su ayuda, por brindarme su amistad y por hacer más agradable mi estancia en el laboratorio. Bety gracias por escucharme.**

***A TODOS mis compañeros del laboratorio de Parasitología ya que de una u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo.**

***A Pablo Basilio por su paciencia.**

***Al Dr. Castillo y sus colaboradores, en especial al Prof. Francisco y la Profa. Alicia.**

***Al laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la FQ, UNAM.**

***A la Facultad de Química y a mi Universidad, la UNAM.**

***A mi país: MÉXICO.**

CONTENIDO.

	pág.
Contenido	1
i. Índice de Tablas y Figuras	2
I. Introducción	3
II. Antecedentes	
2.1 Generalidades	7
2.2 Mecanismo acción de los Bencimidazoles antihelmínticos	11
2.3 Albendazol	12
2.4 Nitazoxanida	15
2.5 Derivados del 1- Metilbencimidazol con posible actividad antiparasitaria	17
2.6 Clasificación de <i>Trichinella spiralis</i>	23
III. Planteamiento del problema	29
IV. Objetivos	31
V. Hipótesis	32
VI. Materiales y Métodos	
Parte experimental	33
Metodología	36
VII. Resultados	41
VIII. Discusión	50
IX. Conclusiones	54
X. Perspectivas	55
XI. Apéndice	56
XII. Bibliografía	58

INDICÉ DE TABLAS Y FIGURAS.

- Tabla 1. Prevalencia mundial de helmintosis de 1947 a 1984.
- Tabla 2. Prevalencia de parasitosis en México durante 1995.
- Tabla 3. Espectro antihelmíntico de algunos antiparasitarios.
- Tabla 4. Enfermedades causadas por helmintos y fármaco de elección.
- Tabla 5. Efecto de la Nitazoxanida sobre diferentes estadios parasitarios.
- Tabla 6. Derivados del 1-metilbencimidazol.
- Tabla 7. Características físicas de los compuestos 4, 8, 12 y 16.
- Tabla 8. Características fisicoquímicas de los compuestos 4, 8, 12 y 16.
- Tabla 9. Porcentaje de reducción de la actividad metabólica de *T. spiralis*.
- Tabla 10. Efecto de los compuestos 8, 12 y 16 sobre *Meloidogyne incognita*.
- Tabla 11. Especies y genotipos del género *Trichinella*.
- Tabla 12. Actividad de los compuestos 4, 8, 12 y 16 sobre el adulto de *T. spiralis*.
- Tabla 13. Actividad de los compuestos 4, 8, 12 y 16 sobre la fertilidad de la hembra de *T. spiralis*.
- Tabla 14. Actividad de los compuestos 4, 8, 12 y 16 sobre la larva muscular de *T. spiralis*.
- Tabla 15. Actividad biológica in-vitro de los derivados del 1-metilbencimidazol sobre la larva muscular de *T. spiralis*.
-
- Figura 1. Algunos derivados del bencimidazol con actividad antiparasitaria.
- Figura 2. Equilibrio tautomérico del Albendazol.
- Figura 3. Sulfoxidación microsomal del Albendazol.
- Figura 4. Preparación general de los compuestos 4, 8, 12 y 16.
- Figura 5. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*.
- Figura 6. Porcentaje de reducción de los compuestos 4, 8, 12 y 16 sobre el adulto de *T. spiralis*.
- Figura 7. Porcentaje de reducción de los compuestos 4, 8, 12 y 16 sobre la fertilidad de la hembra de *T. spiralis*.
- Figura 8. Porcentaje de reducción de los compuestos 4, 8, 12 y 16 sobre la larva muscular de *T. spiralis*.

I INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades parasitarias causadas por protozoos y helmintos, constituyen uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, representando un enorme gasto económico en particular para los países en vías de desarrollo. El número de pacientes que padecen o mueren por enfermedades parasitarias se incrementa de manera proporcional con el crecimiento de la población mundial¹. Se estima que alrededor de un tercio de la población mundial se encuentra infectada con el nemátodo *Ascaris lumbricoides* y la prevalencia de enfermedades como: trichuriasis, enterobiasis y estrogiloidosis va en aumento; así como millones de casos de filariasis e infecciones por cestódos se reportan en diferentes partes del mundo² (Tabla 1).

Tabla 1. Prevalencia Mundial de Helmintosis de 1947 a 1984.

	1947*		1984**	
	No. en millones	Tasax100,000hab.	No. en millones	Tasax100,000 hab.
Ascaris	650	30,950	1,100-1,300	25,580-30,230
Uncinarias	450	21,430	1,000	23,255
Trichuris	350	16,670	500-1,000	11,630-23,255
Strongyloides	35	1,670	50-100	1,160-2,325
Enterobius	209	9,950	300-500	6,980-11,630

Fuente: Parasitology Today, 1990, 6 (4):106

*Población calculada para ese año de 2,100 millones de habitantes.

**Población calculada para ese año de 4,300 millones de habitantes.

En México, en el anuario estadístico de 1995, la Dirección General de Estadística, Informática y Evaluación, presenta el número de casos de infecciones parasitarias de notificación obligatoria, informados por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica, observándose que la amibiasis y la ascariasis ocupan el primer lugar de prevalencia dentro de las parasitosis causadas por protozoarios y helmintos respectivamente (Tabla 2). Estas 2 parasitosis además de otras helmintosis (parasitosis causadas por helmintos) representan un gran problema de salud en nuestro país.

Tabla 2. Prevalencia de parasitosis en México durante 1995.

PARASITOSIS	TOTAL CASOS	TASAx100,000 HAB.
amibiasis intestinal	1,106,364	1,274.98
absceso hepático amibiano	3,074	3.54
anquilostomiasis y necatoriasis	3,420	3.94
ascariasis	469,951	527.22
giardiasis	76,577	88.22
oxiuriasis	152,499	175.74
teniasis	9,495	10.94
cisticercosis	691	0.70
trichuriasis	10,468	11.83
otras parasitosis intestinales	123,308	142.10

Fuente: SS-EPI-1-7 Dirección General de Epidemiología.

A pesar de progresos notables en la obtención de vacunas, la quimioterapia sigue siendo el método más eficaz y económico para controlar las parasitosis. Los fármacos disponibles en el mercado son especialmente útiles para tratar las infecciones causadas por parásitos intestinales, sin embargo se necesitan nuevos y mejores productos para combatir las infecciones sistémicas y eliminar la aparición de resistencia a fármacos.

A este respecto, el tratamiento de las helmintosis es uno de los campos que han mostrado avances importantes en los años recientes. Los antihelmínticos mayormente empleados en la actualidad son los bencimidazoles los cuales bajo diferentes modificaciones estructurales han proporcionado mejores fármacos para el tratamiento de infecciones intra y extraintestinales. Aunque los carbamatobencimidazoles (Mebendazol, Albendazol, Oxfendazol, entre otros) son los compuestos más utilizados, ya que tienen un amplio espectro de acción (Tabla 3), presentan en la posición 2 un sustituyente carbamato de metilo que le confiere alta polaridad a la molécula y por lo tanto una pobre absorción a nivel intestinal y una baja efectividad sobre helmintosis sistémicas. Además, esta estructura sufre un efecto tautomérico debido al H que se encuentra en la posición 1 del núcleo bencimidazólico, lo que impide obtener moléculas con estructuras bien definidas; así como evaluar los requerimientos estereoelectrónicos necesarios para la actividad biológica.

Por lo antes mencionado es necesario contar con fármacos con mayor biodisponibilidad, que además sean efectivos sobre parasitosis intra y extraintestinales y contra los cuales no exista resistencia. Además se requiere realizar estudios de estructura-actividad que permitan mejorar las propiedades farmacológicas de los antihelmínticos actualmente empleados. Por otro lado existen métodos *in vitro* que permiten hacer de manera rápida la evaluación de la actividad antiparasitaria de diferentes compuestos, entre estos se encuentra el del MTT^{3,4}. Sin embargo, dado que una limitante en la actividad contra parásitos tisulares es la absorción de estos compuestos a nivel enteral es importante realizar estudios *in vivo* que permitan diferenciar

de mejor manera si un compuesto tiene actividad contra determinado parásito.

Tabla 3. Espectro antihelmíntico de algunos antiparasitarios.

Fármaco	Nemátodos	Cestódos	Tremátodos
Tiabendazol	+	-	(+)
Mebendazol	+	+	(+)
Albendazol	+	+	(+)
Pirantel	+	-	-
Prazicuantel	-	+	+
Nitazoxanida	+	+	(+)

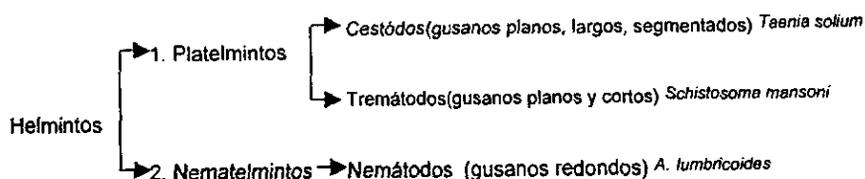
+ Clínicamente empleados.

(+) Se ha reportado alguna actividad.

II. ANTECEDENTES.

2.1 Generalidades y quimioterapia de las helmintosis.

Los helmintos de importancia médica y veterinaria se dividen en dos familias de metazoarios, las cuales incluyen diversas especies de vida libre o parásita⁵ y algunas de ellas son responsables de causar enfermedades tanto a nivel intestinal como sistémico.



A lo largo del tiempo se han descrito y usado fármacos antihelmínticos con patrones de estructura-actividad no muy bien definida por ejemplo: los compuestos con antimonio (tártar hemético), hidrocarburos halogenados (tetracloruro de carbono), compuestos derivados de xantonas y tioxantonas (lucantona e hicantona), dihidroisoquinolinas (prazicuantel), compuestos arsenicales (arsenamida), compuestos organofosforados (metrifonate), y nitrocompuestos e imidazoles (metronidazol)⁶. Sin embargo, como resultado de una mejor comprensión de la bioquímica de los helmintos, las relaciones huésped-parásito y los procesos infecciosos, ha sido posible diseñar nuevos fármacos de uso en medicina humana y veterinaria (Tabla 4); ejemplo de esto son los derivados del bencimidazol (Fig. 1), que presentan un amplio espectro de acción, un buen margen de seguridad y la mayoría de ellos son efectivos en tratamientos cortos o mejor aun son efectivos a una sola dosis.

Tabla 4. Enfermedades causadas por helmintos y fármaco de elección para su tratamiento.

Helmintosis	Helminto	Fármaco efectivo	Fármaco alternativo
Ancilostomiosis	<i>Ancylostoma duodenale</i>	ABZ, MBZ, NTZ	Pamoato de Pirantel, TBZ
Ascariosis	<i>Ascaris lumbricoides</i>	MBZ Pamoato de Pirantel, NTZ	Piperazina ABZ
Enterobiosis	<i>Enterobius vermicularis</i>	MBZ, NTZ	Pamoato de Pirantel, ABZ
Necatoriosis	<i>Necator americanus</i>	MBZ, ABZ, NTZ	Pamoato de Pirantel, TBZ
Strongiloidosis	<i>Strongyloides stercoralis</i>	Ivermectina, NTZ	ABZ
Trichuriasis	<i>Trichuris trichiura</i>	MBZ, NTZ	ABZ, Pamoato de Pirantel
Trichinellosis	<i>Trichinella spiralis</i>	TBZ, ABZ	MBZ
Filariosis	<i>Dipetalonema perstans</i>	Citrato de dietilcarbama zina	Ivermectina
Onchocercosis	<i>Onchocerca vulvulus</i>	Ivermectina	Flubendazol, MBZ Dietilcarbamazina
Toxocariosis	<i>Toxocara canis y cati</i>	ABZ, MBZ	TBZ, Ivermectina
Cisticercosis	<i>Cysticercus cellulosae</i>	ABZ	Praziquantel
Taeniosis	<i>Taenia saginata Taenia solium</i>	Praziquantel, NTZ	Niclosamida
Hymenolepsiosis	<i>Hymenolepis nana</i>	Praziquantel, NTZ	Niclosamida
Equinococis	<i>Echinococcus granulosus</i>	ABZ	MBZ
Fasciolosis	<i>Fasciola hepática</i>	TRBZ	Bitionol
Schistosomiosis	<i>Schistosoma japonicum S. mansonia S. haematobium</i>	Praziquantel	Oxamniquina Metrifonato

Fuente: Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th edition. 1996:961-964. Monografía Nitazoxanida (Daxón) Columbia Laboratories.

*ABZ albendazol, MBZ mebendazol, TBZ tiabendazol, TRBZ triclabendazol, NTZ nitazoxanida.

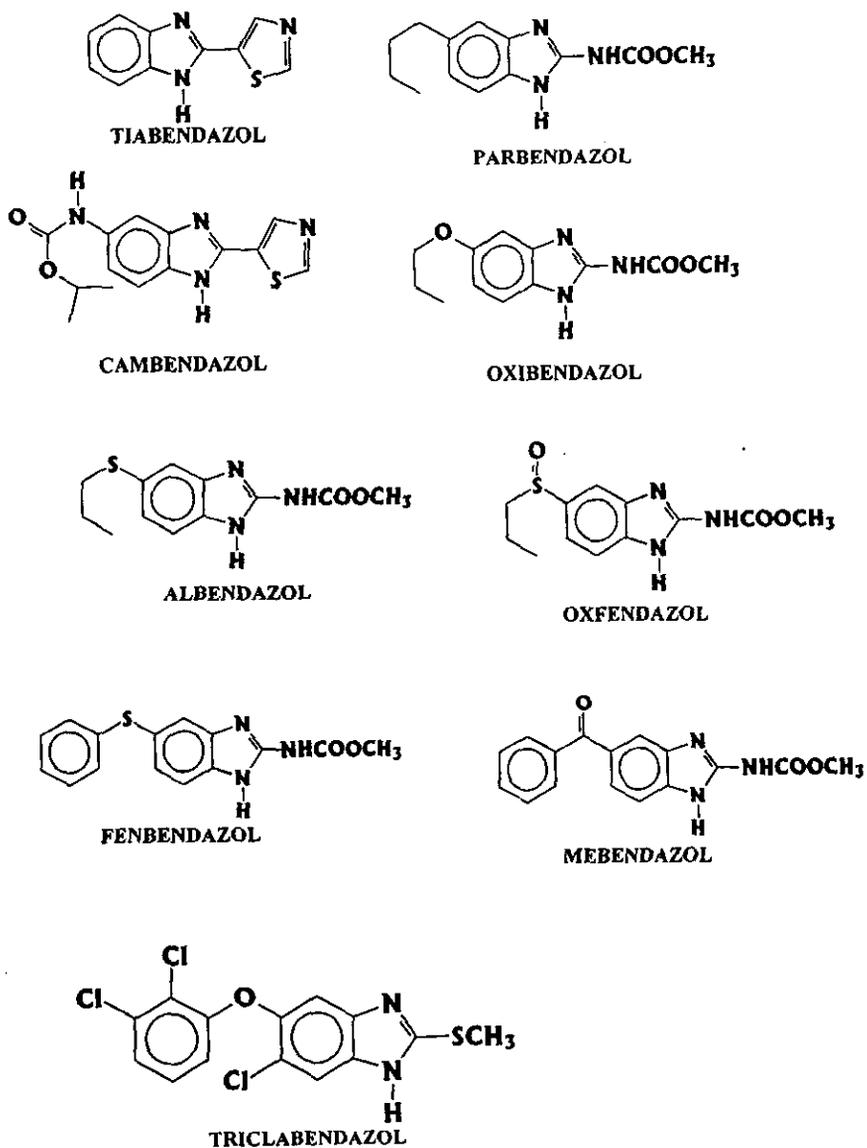


Figura 1. Algunos derivados del bencimidazol con actividad antiparasitaria.

El Tiabendazol (TBZ) fué el primero de la serie de los bencimidazoles antihelmínticos, con alto índice terapéutico, utilizado tanto en humanos como en animales, pero tiene la desventaja de sufrir una rápida inactivación por el metabolismo de la fase I, mediante hidroxilación en la posición 5. Posteriormente, se desarrolló un compuesto más activo, el Cambendazol (CBZ), el cual posee un espectro de acción similar al TBZ, pero es mucho más potente que este último.

A partir de los descubrimientos del TBZ y CBZ, y como parte de un programa de modificaciones estructurales sobre los sustituyentes del núcleo bencimidazólico, surgieron los carbamatobencimidazoles. La sustitución del grupo tiazolilo en posición 2 por un carbamato de metilo y diferentes sustituciones en la posición 5, permitieron aumentar la vida media de los compuestos, y dieron lugar a una nueva era de bencimidazoles antihelmínticos como el Parbendazol (PBZ) y el Mebendazol (MBZ).

Después del MBZ surgieron otros bencimidazoles de uso veterinario, como el Oxibendazol (OBZ), el Fenbendazol (FNBZ), el Oxfendazol OFZ, el Flubendazol FBZ y el Albendazol (ABZ), el cual en la actualidad es ampliamente utilizado tanto en helmintosis intestinales como sistémicas.

Entre los bencimidazoles más recientes se encuentra el Triclabendazol (TRBZ), el cual presenta un sustituyente metililo en posición 2 y tiene gran eficacia contra *Fasciola hepática*^{6,7,9}.

Estos bencimidazoles se caracterizan por su potente actividad antihelmíntica (Tabla 4) y su amplio espectro de acción; sin embargo su limitada absorción a nivel intestinal después de una administración oral, ha limitado su uso en infecciones intestinales y solo a algunas extraintestinales.

2.2 Mecanismo de acción de los bencimidazoles antihelmínticos.

Los estudios sobre los mecanismos de acción de los bencimidazoles antihelmínticos han mostrado que estos pueden afectar diferentes mecanismos celulares además de presentar una amplia variedad de efectos⁸. Ensayos *in vitro* utilizando *Haemonchus contortus* mostraron que el Tiabendazol inhibe la actividad de la enzima fumarato reductasa¹⁰, que juega un papel importante en el metabolismo anaeróbico de la glucosa y en la producción eventual de energía de muchos helmintos, ya que inhibe la oxidación del NADH en presencia de fumarato. En estudios posteriores con Mebendazol y otros bencimidazoles se demostró que estos actúan inhibiendo el complejo enzimático de la fumarato reductasa-succinato deshidrogenasa¹¹.^{12, 13} lo que afecta directamente en el metabolismo y utilización de glucosa en los helmintos. Los bencimidazoles también interfieren con las rutas energéticas de los parásitos por inhibición de la malato deshidrogenasa mitocondrial y citoplasmática¹⁴, interrumpiendo la conversión de malato a piruvato y bloqueando la principal vía glucolítica de los parásitos con la consecuente disminución de las reservas energéticas.

Algunos estudios *in vitro* e *in vivo* utilizando el Mebendazol, mostraron que éste interfiere con el transporte y utilización de glucosa en nemátodos y céstodos, lo que conduce a una disminución en la síntesis de ATP. De acuerdo con algunos autores⁸, estos compuestos también pueden actuar modificando el gradiente transmembranal de protones, comportándose como conductores liposolubles de los mismos, con la consecuente caída de los niveles de ATP intracelular.

La más reciente teoría se basa en la capacidad de los bencimidazoles para enlazarse con mayor afinidad a la tubulina de los helmintos, un componente importante del citoesqueleto^{15, 16}. Esta unión impide la polimerización de la tubulina y la consecuente formación de microtúbulos, lo que se cree afecta el transporte de glucosa, la actividad de la fumarato reductasa, la mitosis y otras funciones celulares¹⁷. Algunos estudios acerca de las relación

estructura-actividad de los carbamatobencimidazoles sobre la tubulina, mostraron que la sustitución del hidrógeno (H) que se encuentra en la posición uno del núcleo bencimidazólico por un grupo alquil, elimina o modifica la actividad antihelmíntica de los compuestos ^{2,18}. Las características como tamaño, hidrofobicidad, impedimento estérico y polaridad de los sustituyentes en la posición 5(6) también juegan un papel importante en la unión del fármaco con la tubulina^{2,18}. En algunos ensayos se ha visto que la introducción de grupos polares electroatrayentes (-NO₂) o electrodonadores (OH⁻, NH₂) en esta posición, resulta en una disminución de la actividad; sin embargo la introducción de halógenos como el Cl o el Br mejoran la potencia del compuesto¹⁸.

2.3 Albendazol.



De los carbamatobencimidazoles, el ABZ (2-metilcarbamato-5-propiltio-1-H-bencimidazol) es uno de los bencimidazoles de amplio espectro que presenta una alta actividad contra diferentes tipos de nemátodos, tremátodos y céstodos, en humanos y animales.

Este bencimidazol primero fué utilizado en el tratamiento de helmintiosis animales y en 1983 fué aprobado su uso en humanos¹⁹.

Estudios recientes han mostrado que el ABZ también es seguro y eficaz en el tratamiento de algunas enfermedades causadas por protozoarios como la giardiosis²⁰.

La presencia del grupo metilcarbamato en la posición 2 de la molécula, aumenta su polaridad, lo que limita su liposolubilidad y por lo tanto tiene pobre absorción intestinal, de tal forma que aproximadamente solo el 5% de la cantidad administrada por vía oral se recupera en plasma^{23,25}. El H en la posición 1 además de ser importante en la unión a la tubulina parasitaria, sufre un efecto tautomérico (Fig. 2) que impide determinar cual de las dos estructuras es la que presenta actividad.

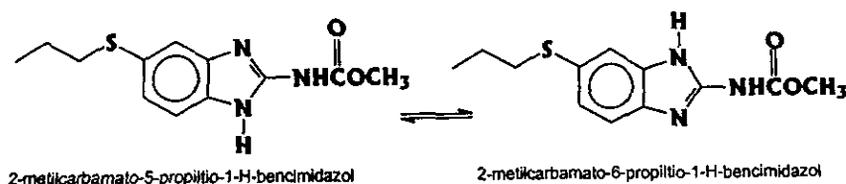


Figura 2. Equilibrio tautomérico del ABZ.

El ABZ es metabolizado a sulfóxido y sulfona por medio de oxidación microsomal^{21,22,23} durante el metabolismo de la fase I y aunque el ABZ contribuye significativamente al efecto terapéutico, la sulfoxidación es un paso importante en la expresión de la actividad antihelmíntica y la toxicidad del fármaco (Fig.3), considerándose por algunos autores que el sulfóxido de ABZ es la forma activa del ABZ²⁴.

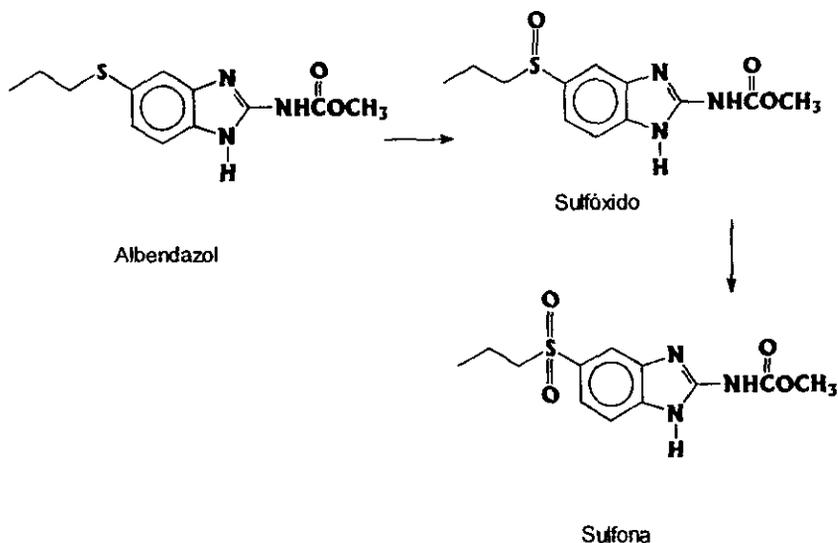


Figura 3. **Sulfoxidación microsomal del ABZ.**

El sulfóxido y la sulfona de ABZ se encuentran en plasma en mayor proporción que el mismo ABZ el cual sólo es detectado en cantidades traza. El sulfóxido de ABZ es el principal metabolito excretado en la orina de ratas y ratones (23-26%), mientras que la sulfona solo representa un 6%²².

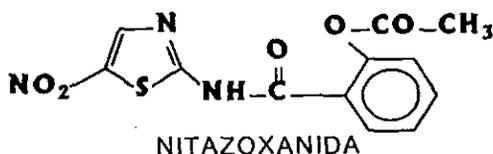
Actualmente, el ABZ se administra con gran éxito en la mayoría de las enfermedades causadas por nemátodos intestinales y con buenos resultados en infecciones extraintestinales como capilariasis intestinal²⁵, teniasis²⁶, cisticercosis²⁷, hydatidosis²⁸, larva migrans cutánea y visceral²⁹ y triquinelosis, aunque se requiere de la administración de grandes y repetidas dosis para que sea efectivo.

En relación a los estudios de toxicidad, aunque en seres humanos, el ABZ es bien tolerado durante 30 días en dosis de 10 mg/kg/día; cuando se administraron dosis de 15mg/kg/día por el mismo período, se reportaron algunos efectos colaterales, como cefaleas, náuseas y crisis convulsivas³⁰.

Estas reacciones no están condicionadas a la toxicidad del fármaco, sino a la reacción inflamatoria intensa desarrollada por el paciente ante la destrucción de los parásitos. Cuando las dosis se incrementaron, o los períodos de administración rebasaron los tres meses, se presentaron reacciones adversas tales como ictericia, alopecia y urticarias. Por otro lado, estudios con cultivos celulares mostraron que el ABZ presenta efectos teratogénicos, los cuales han sido atribuidos a su metabolito principal, el sulfóxido; por lo que no se recomienda su administración a mujeres embarazadas³¹.

2.4 Nitazoxanida.

Recientemente se ha sugerido para el tratamiento de helmintosis así como de infecciones causadas por protozoarios el empleo de otro compuesto conocido como Nitazoxanida, (2-(acetoxiloxi)-N-(5-nitro-2-tiazolil)benzamida) el cual es un derivado del 5-nitrotiazol, que ha demostrado tener un amplio espectro de actividad contra protozoarios, nemátodos, cestódos y tremátodos³³. Es también más eficaz que el metronidazol contra bacterias anaeróbicas y algunas aeróbicas como los *Streptococcus sp.*³².



El átomo de azufre que reemplaza al nitrógeno en el clásico anillo del imidazol, es el responsable de la detoxificación de la molécula, además de que potencializa su efectividad y mejora su espectro de acción.

En la literatura se menciona que este nuevo fármaco tiene una eficacia del 70-100% contra parasitosis intestinales causadas por *E. histolytica*, *Giardia*

Iamblia, *Cryptosporidium parvum*, *Hymenolepis nana* y *Ascaris lumbricoides*, a una dosis de 500mg, 2 veces al día, durante 3 días. La administración de una dosis única de 2-3g en parasitosis causadas por *Taenia saginata* e *Hymenolepis nana* representa un porcentaje de curación del 95% y 90% respectivamente. Su espectro de acción incluye además a *Trichuris trichiuria*, *Enterobius vermicularis*, *Uncinarias* y a los protozoarios *T. vaginalis* y *C. parvum*, entre otros. Una característica importante de la nitazoxanida es que rompe el ciclo biológico de los parásitos actuando sobre cualquiera de sus estadios y formas (trofozoitos, gusanos, huevos y quistes; Tabla 5) por lo que su espectro de acción es global³⁴.

La nitazoxanida interfiere con el metabolismo de la glucosa en los helmintos, creando una acidosis láctica que conduce a la muerte del parásito. Se sugiere que su actividad antiprotozoaria se debe a la reducción de su grupo nitro, lo que le permite intercalarse en el DNA e inhibir la síntesis de ácidos nucleicos del parásito, conduciendo así a la formación de productos citotóxicos³⁴.

No se ha demostrado que éste fármaco tenga efectos teratógenicos ni mutagénicos³⁶ y los estudios clínicos realizados en México³⁵ mostraron que además de su amplio espectro de acción, la nitazoxanida es muy bien tolerada, sin embargo a diferencia del ABZ tiene efectos secundarios como: náuseas, algunas veces acompañadas de cefalea, anorexia y dolor leve tipo cólico³⁶.

Tabla 5. Efecto de la Nitazoxanida sobre diferentes estadios parasitarios³⁴.

Parásitos	Nitazoxanida	
	Trofozoito	Quiste
Protozoario		
Entamoeba histolytica*	+	+
Giardia lamblia	+	+
Trichomonas vaginalis	+	+
Endolimax nana	+	+
Blastocystis hominis	+	+
Trichomonas intestinalis	+	+
Helminto	Gusano	Huevo
Ascaris lumbricoides*	+	+
Enterobius vermicularis	+	+
Hymenolepis nana	+	+
Taenia solium	+	+
Strongyloides stercoralis	+	+

* Efectivo a nivel intra y extraintestinal

+ Efectivo nivel intestinal

Fuente: Monografía Daxón (Nitazoxanida Columbia Laboratories)

El esquema de dosificación para la nitazoxanida es de 500 mg 2 veces al día durante 3 días consecutivos, lo que comparado con el ABZ representan una desventaja ya que este es efectivo en una sola dosis diaria³⁵. Dadas sus características terapéuticas y farmacológicas, la nitazoxanida es un nuevo antiparasitario de gran interés en el control de diversas parasitosis.

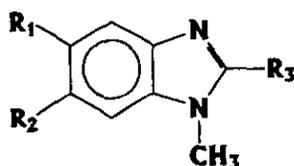
2.5 Derivados del 1-metilbencimidazol con posible actividad antiparasitaria.

Considerando la baja solubilidad en agua de los carbamatobencimidazoles, entre ellos el ABZ, y pretendiendo mejorar tanto su biodisponibilidad como su eficacia sobre parasitosis sistémicas, además de encontrar nuevos compuestos con actividad antiparasitaria contra los cuales no exista

resistencia, el grupo de investigación del Dr. Rafael Castillo Bocanegra del laboratorio 122 del edificio E de la Facultad de Química UNAM, diseñó una serie de derivados del 1- metilbencimidazol.

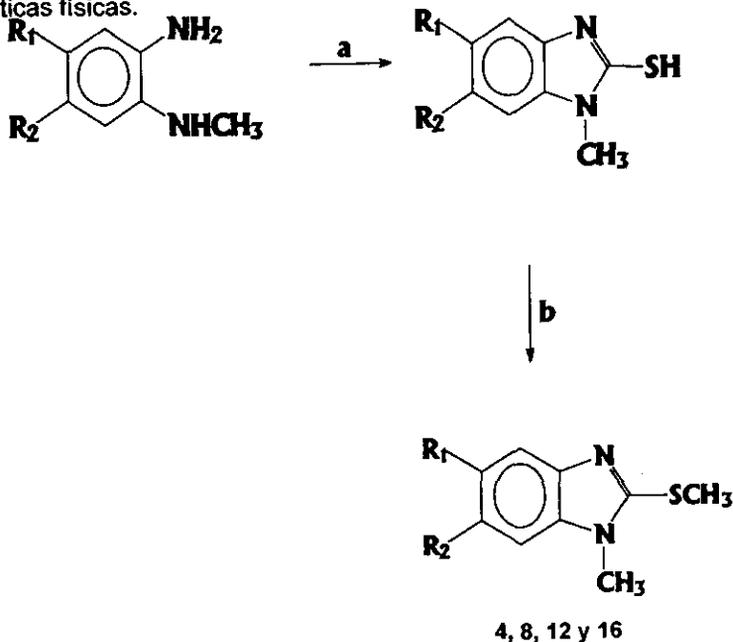
Estos compuestos conservan el núcleo del bencimidazol, sustituido en la posición 1 por un grupo metilo (CH_3). La posición 2 se sustituye con grupos como son el $-\text{NH}_2$, $-\text{CH}_3$, $-\text{SH}$ y $-\text{SCH}_3$; las posiciones 5 y 6 pueden no estar sustituidas (compuestos 1-4, serie A), monoclorada en 5 (compuestos 5-8, serie B), monoclorada en 6 (compuestos 9-12, serie C) o diclorada en 5 y 6 (compuestos 13-16, serie D) (Tabla 6).

Tabla 6. Derivados del 1-Metilbencimidazol.



COMPUESTO	R ₁	R ₂	R ₃
Serie A			
1	H	H	CH ₃
2	H	H	NH ₂
3	H	H	SH
4	H	H	SCH ₃
Serie B			
5	H	Cl	CH ₃
6	H	Cl	NH ₂
7	H	Cl	SH
8	H	Cl	SCH ₃
Serie C			
9	Cl	H	CH ₃
10	Cl	H	NH ₂
11	Cl	H	SH
12	Cl	H	SCH ₃
Serie D			
13	Cl	Cl	CH ₃
14	Cl	Cl	NH ₂
15	Cl	Cl	SH
16	Cl	Cl	SCH ₃

La introducción de un grupo metilo en la posición 1 evita el efecto tautomérico que sufre la molécula del bencimidazol, lo que permite tener compuestos con estructuras bien definidas; además permite evaluar la importancia que tiene el hidrógeno en esta posición dentro de la actividad biológica de estas moléculas. Por otro lado las sustituciones en la posición 2, permiten modificar las características de liposolubilidad de la molécula y cabe mencionar que el grupo $-SCH_3$ también puede sufrir oxidación metabólica para dar el sulfóxido $(-SO-)$. La sustitución en las posiciones 5 y 6, con H o Cl, definen los requerimientos estéreo-electrónicos necesarios para la actividad biológica. Estas sustituciones permiten estudiar la participación de los diferentes grupos en la actividad de la molécula. A continuación se muestra el procedimiento general de preparación de los compuestos 4, 8, 12 y 16 (Fig. 4) y en las Tablas 7, 8 se indican sus características físicas.



$R_1=R_2=H= 4$, $R_1=Cl$ $R_2=H= 8$, $R_1=H$ $R_2=Cl= 12$, $R_1=R_2=Cl= 16$

Reactivos: a) $CS_2/EtOH$, KOH b) $CH_3I/EtOH$, KOH

Fuente: Tesis Maestría Q.B. Ma. de los Remedios Sanchez Díaz 1999. Síntesis de derivados del 1-metilbencimidazol con actividad antihelmíntica potencial. F.Q. UNAM.

Figura 4. Preparación general de los compuestos 4, 8, 12 y 16.

Tabla 7. Características físicas de los compuestos 4, 8, 12 y 16 derivados del 1-metilbencimidazol.

Compuesto	F.M.	P.M.	Edo. físico	Rf (sist.)	pf (°C)
4	C ₉ H ₁₀ N ₂ S	178.26	cristales blancos	0.53(II)	53-54
8	C ₉ H ₇ ClN ₂ S	212.65	cristales crema	0.69(III)	92-93
12	C ₉ H ₇ ClN ₂ S	212.65	cristales blancos	0.69(II)	80.5-81.5
16	C ₉ H ₆ Cl ₂ N ₂ S	247.09	cristales blancos	0.66(II)	121-122

Fuente: Tesis Maestría Q.B. Ma. de los Remedios Sanchez Díaz 1999. Síntesis de derivados del 1-metilbencimidazol con actividad antihelmíntica potencial. F.Q. UNAM.

Tabla 8. Algunas características físicas de los compuestos 4, 8, 12 y 16.

COMPUESTO	Log P teórico	SOLUBILIDAD EN LA FORMULACIÓN*
4	2.73 ± 0.57	++++
8	3.32 ± 0.59	+++
12	3.32 ± 0.59	+++
16	3.79 ± 0.6	++
ABZ	3.01 ± 0.86	+

*Formulación empleada para disolver los compuestos (Ver apéndice)
 ++++ muy soluble, +++ soluble, ++ poco soluble, + muy poco soluble.

Inicialmente se evaluó la actividad biológica de todos los compuestos de la serie B, C, D; y de los compuestos 1 y 2 de la serie A, por medio de ensayos de actividad metabólica *in vitro* utilizando el método de MTT-PMS sobre la fase enteral y parenteral del parásito nemátodo *T. spiralis*³⁷ (Tabla 9). Los resultados mostraron que el compuesto 1 de la serie A (sin cloro, sustituido en

2 con un grupo metilo) presentó actividad similar al ABZ contra la larva muscular y en el caso del organismo adulto solo fué efectivo a la concentración de 10µg/mL, mostrando mayor efecto que el mismo ABZ. Dentro de los compuestos monoclorados en posición 5 (serie B), los compuestos 7 y 8, empleados a una concentración de 1µg/mL tuvieron un efecto similar al del ABZ contra el adulto; sin embargo el compuesto 8 fué el único que tuvo actividad contra la larva muscular del párasito a una concentración de 1 µg/mL. Con respecto a los compuestos monoclorados en posición 6 (Serie C), a la menor concentración usada, el compuesto 9 presentó actividad contra el organismo adulto de *T. spiralis* similar a la del ABZ, además a la concentración de 10 µg/mL el compuesto 12 también tuvo efecto. Ninguno de los compuestos de la serie C que fueron evaluados tuvo efecto sobre la larva muscular del parásito. En relación a los compuestos diclorados (Serie D), todos tuvieron actividad contra la larva muscular, semejante a la del ABZ; sin embargo solo los compuestos 13 y 16 (con sustituyentes metilo y metiltio respectivamente) redujeron la actividad metabólica del organismo adulto. De lo anterior se desprende que algunos compuestos como el 1, 8, 13 y 16 son efectivos contra ambas fases del parásito, y otros sólo son efectivos contra la fase enteral (7, 9, 12). Además, se observó que los grupos metiltio y metilo en posición 2 confirieron mayor actividad antihelmíntica a los derivados del 1-metilbencimidazol. Es importante mencionar que estos sustituyentes mejoran la liposolubilidad de los compuestos, lo cual puede explicar los resultados mencionados.

Tabla 9. Porcentaje de reducción de la actividad metabólica del organismo adulto y la larva muscular (LM) de *Trichinella spiralis* utilizando los derivados del 1-metilbencimidazol.

	Adulto 1µg/mL	Adulto 10µg/mL	LM 1µg/mL	LM 10µg/mL
Albendazol	28±7	31±10	22±12	23±14
1	6	51±2	25±6	25±17
2	NR	NR	9±8	NR
5	8	NR	14±2	13±5
6	NR	NR	12±1	16
7	23±12	28±21	7±4	18±6
8	34±12	24±4	24±10	16±10
9	25	16	14±4	19±1
10	NR	NR	14±4	15
12	14±7	26	9±5	12
13	23±5	23±13	24±6	27±8
14	NR	NR	26±2	34±3
15	15	15	30±6	37±3
16	29±5	27±4	22±11	46±5

NR= No Redujo.

El porcentaje de reducción de la actividad metabólica del parásito se calculó con respecto al control.

Por otro lado, al evaluar el efecto nematocida de los compuestos 8, 12 y 16 sobre la larva J2 de *Meloidogyne incognita in vitro*, se observó que el compuesto 8 resultó ser nematocida a 100 ppm y los compuestos 12 y 16 nematostáticos, pero éste último con menor potencia (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto de los compuestos 8, 12 y 16 sobre la sobrevivencia de la larva J-2 de *Meloidogyne incognita in vitro*.

Compuesto	Concentración (ppm)	% sobrevivencia (24 horas)
8	control	100
	50	15
	100	0
	200	0
12	control	100
	50	80
	100	60
	200	40
16	control	100
	50	80
	100	50
	200	50

Fuente: Tesis Maestría Q.B. Ma. de los Remedios Sanchez Díaz 1999. Síntesis de derivados del 1-metilbencimidazol con actividad antihelmíntica potencial. F.Q. UNAM.

Dado que *in vitro* los compuestos con sustituyente metiltio en posición 2 fueron efectivos contra parásitos helmintos, resulta de interés evaluar su actividad biológica *in vivo*.

2.6 Clasificación de *Trichinella spiralis*.

La especie *Trichinella spiralis* pertenece al género *Trichinella* que comprende organismos nemátodos que parasitan a una gran variedad de hospederos incluyendo al hombre, causando la enfermedad conocida como triquinelosis³⁸. La clasificación de este parásito se muestra a continuación:

Reino	Animal
Superphylum	Aschelminthes
Phylum	Nematoda
Clase	Adenoforea
Orden	Enoplida
Familia	Trichinellidae
Género	Trichinella

Tomado de Chester B.P. y cols.³⁸

A partir de la comparación de patrones isoenzimáticos de diferentes aislados de *Trichinella* con amplia distribución geográfica, así como de diferentes características biológicas, tales como: índice de capacidad reproductiva, forma de las células nodriza o ausencia de éstas, resistencia al congelamiento y huéspedes a los que parasitan, se puso de manifiesto que hay cuando menos ocho grupos genéticos diferentes, distribuidos en todo el mundo, los cuales infectan al hombre^{39,40,41}. Sin embargo, solo *T. spiralis* infecta al cerdo doméstico⁴². Basándose en estos estudios y otros de tipo molecular se determinó que el género *Trichinella* se encuentra formado por 5 especies y 3 genotipos⁴¹ (Tabla 11).

Tabla 11. Especies y genotipos del género *Trichinella* y su distribución geográfica

Especie	Distribución geográfica
<i>Trichinella spiralis</i> ó T1	Cosmopolita
<i>Trichinella nativa</i> ó T2	Zonas subárticas y holoárticas
<i>Trichinella britovi</i> ó T3	Zonas templadas de las regiones peleárticas
<i>Trichinella pseudoespiralis</i> ó T4	Cosmopolita
Genotipo T5	Pennsylvania (E.U.A)
Genotipo T6	Pennsylvania Montana (E.U.A)
<i>Trichinella nelsoni</i> ó T7	África tropical
Genotipo T8	Sur de África

Tomado de Pozio y cols.⁴¹

2.6.1 Triquinelosis.

La triquinelosis se define como una enfermedad parasitaria causada por nemátodos del género *Trichinella*, de gran importancia en salud pública y veterinaria. El hombre la adquiere principalmente, al comer carne de cerdo mal cocida o cruda, que contiene larvas musculares (LM) de *T. spiralis*. En

ocasiones, suele infectarse por la ingestión de carne infectada de otros animales como oso, caballo, foca, jabalí,⁴³ etc.

El curso de la enfermedad depende de la cantidad de LM ingeridas y de la intensidad de la infección. Esta parasitosis se caracteriza por fiebre, desórdenes gastrointestinales, miositis, mialgias, edema periorbital, eosinofilia y mastocitosis⁴². Un síntoma mucho más común y que ha constituido la clave para sospechar del padecimiento es el edema bilateral de los párpados, que a veces se extiende a toda la cara y que con menor frecuencia, se presenta acompañado de congestión conjuntiva⁴⁵.

En México no se le ha dado una gran importancia a la triquinelosis, ya que a pesar de ser conocida desde hace tiempo, los estudios clínicos que se han hecho son insuficientes y debido a que su sintomatología es similar a la de otros padecimientos, el diagnóstico puede ser equivocado.

2.6.2 Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*.

Actualmente *T. spiralis* es un parásito nemátodo que completa su ciclo de vida en un solo hospedero, y consta de tres fases de desarrollo: larva muscular (LM), larva adulta y larva recién nacida (LRN).

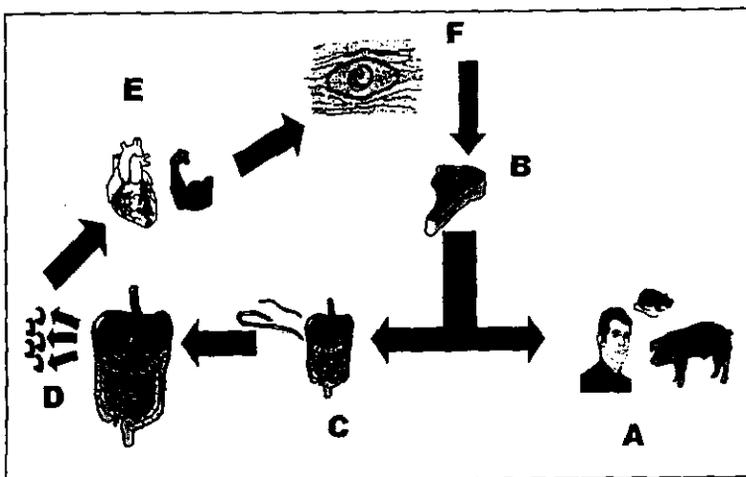


Fig. 5 Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*.

El ciclo de vida del parásito (Fig. 5) inicia cuando el hospedero (A) ingiere carne que contiene LM viables (B), en el estómago gracias a la acción de los jugos gástricos las LM son liberadas y migran hacia el epitelio del intestino delgado, lo invaden y aproximadamente durante las siguientes 30 h maduran a sus formas adultas (C). Al alcanzar este estadio, los adultos se localizan principalmente en las cavidades del duodeno y yeyuno.

En el intestino se lleva a cabo la cópula, las hembras comienzan a producir huevos que se desarrollan en el útero para dar lugar a larvas diminutas las cuales permanecen durante algún tiempo dentro de la madre. A partir del quinto o sexto día postinfección son liberadas larvas móviles (LRN) de aproximadamente 100µm de longitud y 6µm de grosor (D); aproximadamente hasta 500 LRN por hembra pueden ser producidas⁴⁴. La larviposición continúa durante un período aproximado de 4 semanas y a veces hasta 16 semanas. La fecundidad de la hembra varía de acuerdo a la especie del hospedero y es probablemente una función de la habilidad de este para montar una respuesta inmune rápida en contra del parásito a nivel intestinal. Las LRN liberadas atraviesan el epitelio intestinal hasta llegar a vasos linfáticos y corriente sanguínea, pasando por corazón, pulmones, cerebro, y líquido cefalorraquídeo, hasta llegar a invadir células del músculo esquelético⁴⁵(E). La invasión máxima se observa en músculos relativamente carentes de glucógeno como el diafragma, la laringe, la lengua, el abdomen, los intercostales, los bíceps, los pectorales, los gemelos, el deltoides, y otros músculos que mantienen una actividad constante.

Una vez que las LRN alcanzan las fibras musculares estriadas, penetran activamente en su interior, crecen, maduran a LM e inducen modificaciones dentro de la célula muscular llegando a producir lo que se conoce como "célula nodriza", que es una unidad morfofisiológicamente independiente y altamente especializada, que permite el intercambio metabólico entre el hospedero y la larva. Después de 21 a 28 días se origina la forma enquistada(F). Con la maduración de la LM se completa el ciclo de vida del parásito^{45,46}.

2.6.3 Tratamiento de la triquinellosis.

El tratamiento de la triquinellosis tiene como finalidad, en primer lugar eliminar los organismos adultos y detener la producción de LRN en el intestino, y en segundo lugar matar a las LM que se enquistan en los músculos; sin embargo no se ha establecido un tratamiento específico.

El tiabendazol es uno de los fármacos más antiguos utilizados en el tratamiento de la triquinellosis, se ha demostrado que este fármaco destruye al parásito cuando se administra a ratones o cerdos 24h después de la inoculación, y mitiga la enfermedad si se da al quinto o noveno día postinfección^{2,6}.

La desventaja principal del TBZ en el tratamiento de la triquinellosis es su rápida inactivación por el metabolismo de la fase I, por lo que han surgido otros bencimidazoles como el MBZ y el ABZ con amplio espectro de acción y con un sustituyente carbamato de metilo en posición 2 en lugar del grupo tiazolil y con diferentes radicales en la posición 5².

El MBZ también ha sido usado en el tratamiento de la triquinellosis pero debido a su pobre absorción a nivel intestinal su uso se ha limitado a la fase enteral de la enfermedad. Con el TBZ y el MBZ se observan efectos adversos a nivel digestivo, signos y síntomas atribuibles a la toxicidad propia de los fármacos^{2,23}.

Más recientemente el ABZ ha sido utilizado con éxito, resultando ser más eficaz que el TBZ y MBZ en el tratamiento de la enfermedad^{6,19,48}.

2.6.4 *Trichinella spiralis* como modelo experimental.

El interés por *T. spiralis* no es solo por su importancia epidemiológica, sino porque este parásito brinda un modelo experimental general de la helmintiosis causada por nemátodos, ya que es uno de los parásitos menos específicos que existen, por lo que puede infectar a cualquier mamífero incluyendo al hombre. Además, este parásito puede completar su ciclo de

vida en ratas y ratones de laboratorio en un periodo de tiempo relativamente corto, durante el cual presenta tanto una fase enteral como otra parenteral, por lo que brinda un modelo potencial completo para el estudio de la actividad antihelmíntica de nuevos compuestos ⁴⁷.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Considerando que las parasitosis ocasionan un grave problema de salud en México y a nivel mundial, es necesario contar con nuevos fármacos que permitan controlar esta situación y a la vez disminuir los gastos económicos que esto representa principalmente para los países en vías de desarrollo. En este sentido el Albendazol representa a uno de los bencimidazoles antihelmínticos de gran utilidad debido a su amplio espectro de acción sobre la mayoría de nemátodos, tremátodos y cestódos que parasitan al hombre y a los animales. Este carbamatobencimidazol, además de su gran efectividad sobre helmintosis intestinales, ha sido utilizado con buenos resultados en la giardiosis, obteniendo resultados similares a los del metronidazol y con menos efectos colaterales. Sin embargo debido a su baja solubilidad y a su limitada absorción intestinal, solo el 5% de la dosis administrada es recuperada en plasma; por lo que se requieren de altas dosis y largos periodos de tratamiento para que sea efectivo en infecciones sistémicas. Con estos antecedentes resulta de interés sintetizar y evaluar la actividad biológica de nuevos derivados del bencimidazol. Con tal finalidad se diseñaron 16 nuevas moléculas derivadas del 1-metilbencimidazol, con diferentes cambios estructurales que permitirán determinar si los radicales presentes en la posición 2 aumentan la solubilidad, la absorción en el ámbito intestinal y en consecuencia la biodisponibilidad de estos compuestos. La sustitución del H por un grupo metilo en la posición 1 contribuirá a comprender si éste cambio disminuye o modifica la actividad antihelmíntica, y en cual de las posiciones 5 ó 6 del núcleo bencimidazólico el sustituyente Cl confiere mayor actividad a la molécula.

Inicialmente estudios de actividad biológica *in-vitro* utilizando al parásito *Trichinella spiralis* como modelo experimental, mostraron que los compuestos derivados del 1-metilbencimidazol con sustituyente metilo en posición 2 (compuesto 1), diclorado en posición 5 y 6 (compuesto 13), así como compuestos con sustituyentes metilto monoclorados en posición 5

(compuesto 8), y/o diclorados (compuesto 16) tuvieron mayor actividad contra ambas fases de desarrollo del parásito. Asimismo los compuestos 8 (con cloro en posición 5), 12 (con cloro en posición 6) y 16 (diclorado en posición 5 y 6) con sustituyente metiltilio en posición 2 tuvieron actividad antihelmíntica *in-vitro* contra la larva J2 del nemátodo *M. incognita*, observándose que el compuesto 8 presentó actividad nematicida.

Considerando lo anterior resulta de gran interés evaluar la actividad biológica *in-vivo* de los compuestos con sustituyente metiltilio en posición 2 (1-metil-2-metiltiobencimidazol, compuesto 4; 5-cloro-1-metil-2-metiltiobencimidazol, compuesto 8; 6-cloro-1-metil-2-metiltiobencimidazol, compuesto 12; y el 5,6-dicloro-1-metil-2-metiltiobencimidazol, compuesto 16) sobre la fase enteral y parenteral de *T. spiralis*, ya que este sustituyente les confiere una mayor liposolubilidad. Los resultados que se obtengan en este estudio permitirán demostrar si las modificaciones químicas realizadas contribuyen para mejorar la biodisponibilidad de estos derivados y también permitirá conocer el efecto de los diferentes sustituyentes dentro del núcleo bencimidazólico sobre la actividad antihelmíntica.

IV. OBJETIVOS.

4.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la actividad antihelmíntica de 4 derivados del 1-metilbencimidazol con sustituyente metilto en posición 2, sobre las diferentes etapas de desarrollo de *Trichinella spiralis* en ratones infectados experimentalmente con el parásito.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

*Evaluar la actividad antihelmíntica de los compuestos 4, 8, 12 y 16 sobre el organismo adulto y la fertilidad de las hembras de *T. spiralis*, en ratones de la cepa BALB/c infectados con el parásito, en comparación con el efecto producido con el Albendazol y la Nitazoxanida.

*Evaluar el efecto biológico de los compuestos 4, 8, 12 y 16 sobre las larvas musculares de *T. spiralis* en ratones de la cepa BALB/c infectados con el parásito, en comparación con el efecto producido con el Albendazol y la Nitazoxanida.

*Determinar si las modificaciones estructurales de estos compuestos afectan la actividad antihelmíntica y establecer una relación estructura-actividad de los diferentes compuestos sobre las distintas fases de desarrollo de *Trichinella spiralis*.

V. HIPÓTESIS.

Considerando que el radical metiltio presente en la posición 2 del núcleo bencimidazólico de los compuestos 4, 8, 12 y 16 les confiere una mayor lipofilidad, la actividad antihelmíntica de estas moléculas sobre *Trichinella spiralis* será mayor en comparación con la del Albendazol y la Nitazoxanida.

VI MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 PARTE EXPERIMENTAL.

6.1.1 TIPO DE ESTUDIO.

El presente estudio es experimental, prospectivo, transversal, comparativo y controlado.

6.1.2 VARIABLES.

VARIABLES INDEPENDIENTES.

.Ratones de la cepa BALB/c

.Peso del ratón 15-30g de peso

.Dosis administrada de los compuestos equivalente molar a 50mg/kg y 75mg/kg de peso.

.Administración de los compuestos:

*Para el estudio de larva adulta y fertilidad aplicación de una dosis única al tercer día post-infección.

*Para el estudio de larva muscular aplicación de un dosis diaria durante 7 días consecutivos.

VARIABLE DEPENDIENTE.

Reducción de la carga parasitaria.

6.1.3 POBLACIÓN EN ESTUDIO.

Ratones de la cepa BALB/c de 8 a 12 semanas de nacidos, de sexo indistinto, sanos, de 15 a 30 g de peso, debidamente desparasitados.

Criterios de exclusión: pérdidas de los animales durante el estudio (muerte o cualquier otra causa).

6.1.4 POBLACIÓN OBJETIVO.

- .Derivados del 1-metilbencimidazol: compuestos 4, 8, 12 y16.
- .Albendazol (Smith Klane Beechman)
- .Nitazoxamida (Daxón)

6.1.5 MATERIAL Y EQUIPO.

- .Agitador Gerhardt RO5
- .Parrillas de agitación CORNING Stirrer/hotplate
- .Agitador para tubos (Vortex Genie 2 Fisher)
- .Aparato modificado de Bearman
- .Cajas petri de plástico Difco
- .Microplacas de cultivo de 24 pozos
- .Equipo de disección
- .Cánulas y jeringas
- .Centrífuga Clínica Sorvall RT 6000D
- .Centrífuga de tubos eppendorf 5415C Brinkmann Instruments
- .Incubadora con CO₂ (Water Jacketed, NU 2500E)
- .Malla metálica No. 40
- .Micropipetas Gilson de 20, 200 y 1000 μ L
- .Microscopio binocular Nikon 119
- .Picadora de carne Moulinex
- .Tubos falcon de 15 y 50mL (Costar)
- .Ultraturrax Type 18/10 S1 Ikawerk Janke Kunkel

6.1.6 REACTIVOS

- .Bactoagar (0140-01 Difco Laboratories)
- .Cloroformo y éter (Sigma de México)
- .HCl fumante (Merck-México)
- .Medio RPMI 1640 (Gibco BRL Life Technologies)
- .Pepsina 1:2500 60U/mg (Sigma Chemical)
- .PBS 10%
- .Albendazol (EMELAC), y prazicuantel (Sector Salud)
- .Formulación No. 1 (Ver APÉNDICE)

6.1.7 MATERIAL BIOLÓGICO

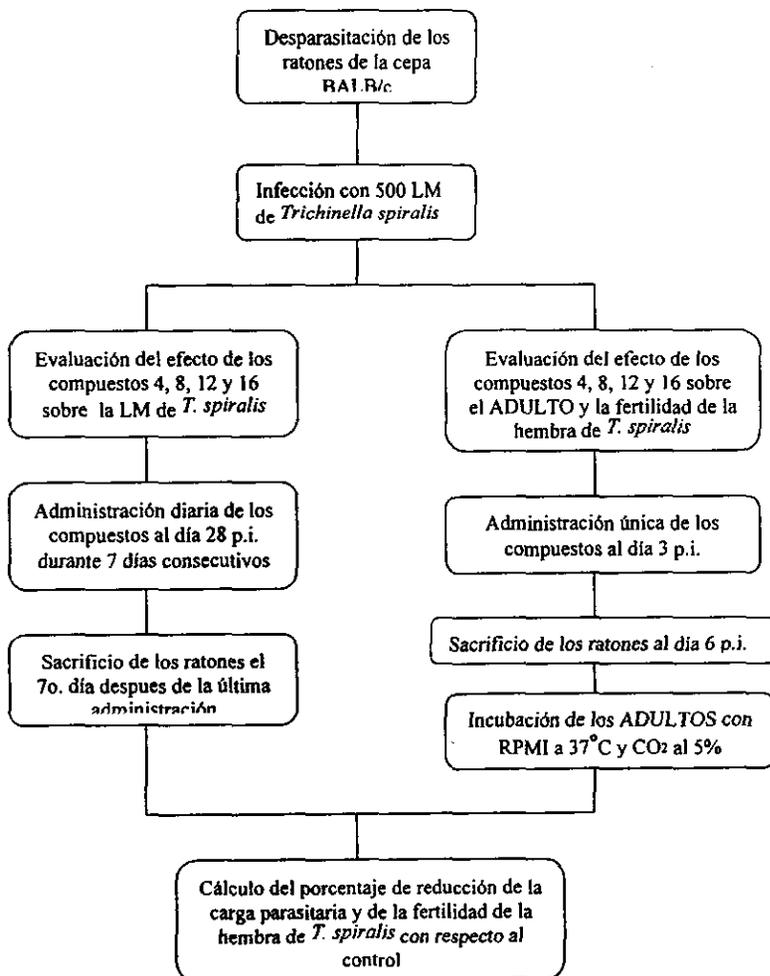
Organismos: La cepa de *T.spiralis* (T1) fué aislada de cerdo y mantenida en el laboratorio por pases regulares en ratas Sprague Dawley. Las larvas musculares fueron obtenidas por digestión artificial del músculo esquelético de ratas infectadas.

Criterios de inclusión: Larvas musculares obtenidas de ratas previamente infectadas, mantenidas a temperatura ambiente hasta no más de 2 días antes de su inoculación.

Criterios de exclusión: Organismos no viables.

6.2 METODOLOGÍA.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6.2.1 Desparasitación de los animales de experimentación.

Los ratones de la cepa BALB/c se desparasitaron utilizando 200 μ L de una mezcla de albendazol-prazicuantel (20mg-20mg/mL) administrada por vía oral por medio de una sonda gástrica de plástico del No. 5, durante 5 días consecutivos con 5 días de descanso y otros 5 días de administración. Los ratones se mantuvieron en cajas de plástico con cambio continuo de aserrín estéril durante todo el tratamiento. Cinco días después de la última administración se tomaron muestras fecales para verificar la ausencia de parásitos intestinales⁴⁵.

6.2.2 Obtención de las larvas musculares de *Trichinella spiralis* y mantenimiento del ciclo de vida del parásito.

A partir del músculo esquelético de ratas de la cepa Sprague Dawley infectadas con *T. spiralis* se obtuvieron las LM. Los animales se sacrificaron y se les quitó la piel, extremidades, cabeza y vísceras, cuidando de no romper el diafragma, que es uno de los sitios de predilección del parásito. El músculo y el esqueleto se maceraron en una picadora Moulinex y se colocaron en una solución de pepsina-HCl al 1% a una proporción de 100mL de solución por 10 g de muestra macerada.

Esta suspensión se incubó durante 3 h a 37°C y 150 rpm para su digestión. Posteriormente, el material digerido se tamizó a través de una malla No. 40 y se vertió sobre el aparato modificado de Bearman, dejando que las LM se sedimentaran por 20 min.

Finalmente, las larvas obtenidas se centrifugaron en tubos falcon a 2500rpm durante 3 min utilizando una centrífuga clínica. Se realizaron varios lavados con amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7. Para la determinación del número de parásitos, las LM obtenidas se resuspendieron en bactoagar al 0.2%, se tomaron alícuotas de 50 μ L y se diluyeron 1:10 en bactoagar. A partir de esta dilución se contaron 12 gotas de 5 μ L cada una y se calculó el número total de LM.

Las larvas así obtenidas se utilizaron para infectar a la población en estudio (ratones BALB/c) y para mantener el ciclo de vida⁴⁵.

6.2.3 Evaluación de la actividad de los compuestos derivados del 1-metilbencimidazol sobre el organismo adulto y la fertilidad de la hembra de *Trichinella spiralis*.

Para determinar el efecto de los compuestos 4, 8, 12 y 16 sobre el organismo adulto de *T. spiralis*, a grupos de 6 ratones de la cepa BALB/c previamente infectados con el parásito, se les administró por vía intragástrica, al tercer día p.i. una dosis única de los compuestos equivalente molar a 50mg/Kg de peso. A un grupo más se le administró la suspensión utilizada para disolver los compuestos y se le consideró como control negativo. Como controles positivos se incluyeron a 2 grupos de animales tratados con ALB y con Nitazoxanida a la misma dosis que los 1-metilbencimidazoles.

Los ratones se sacrificaron al día 6 p.i., se les extrajo el intestino delgado y los adultos se obtuvieron de acuerdo a la metodología descrita previamente. Así, el intestino se cortó en fragmentos de 3-4cm de largo y se incubó en PBS pH 7 durante 2 h en caja petri a 37°C. Posteriormente se retiraron los intestinos y se lavaron con PBS. En tubos cónicos de 50mL se recuperó tanto el medio de incubación, como el agua del lavado y se centrifugó a 2500 rpm durante 3 min. Los organismos adultos así obtenidos se lavaron varias veces y se resuspendieron en bactoagar al 0.2%. Finalmente se determinó el número de organismos adultos por ratón para cada uno de los grupos en estudio y se calculó el porcentaje de reducción de la carga parasitaria con respecto al control negativo.

Con la finalidad de evaluar la actividad de los compuestos sobre la fertilidad de la hembra de *T. spiralis*⁴⁴, a partir de los adultos previamente obtenidos se tomó una alícuota de cada uno de los grupos, con aproximadamente 20 larvas (hembras y machos), las cuales se incubaron en microplacas de cultivo de 24 pozos con 2mL de RPMI-completo, durante 24 h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Después de la incubación, los adultos y las LRN se centrifugaron a 5000

rpm durante 5min y posteriormente el paquete de parásitos se lavó 2 veces con PBS para eliminar el exceso de RPMI. Finalmente se resuspendieron en bactoagar al 0.2% y se determinó el número de LRN por hembra para cada uno de los grupos. También se calculó el porcentaje de reducción de la fertilidad de la hembra con respecto al control negativo.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron estadísticamente empleando la prueba de Duncan con una $p < 0.05$ y un α de 95%.

6.2.4 Evaluación de la actividad de los compuestos derivados del 1-metilbencimidazol sobre la larva muscular de *Trichinella spiralis*.

Para determinar la actividad de los compuestos 4,8,12 y 16 sobre las LM del parásito, a grupos de 10 ratones de la cepa BALB/c previamente infectados con 500 LM de *T. spiralis*, se les administraron a partir del día 28 p.i. los diferentes compuestos por vía intragástrica a una dosis diaria equivalente molar a 75mg/kg de peso durante 7 días consecutivos.

Se incluyeron como controles positivos a 2 grupos de ratones a los que se les administró Nitazoxanida y ALB a la misma dosis que los 1-metilbencimidazoles. Como control negativo se incluyó a un grupo de ratones a los que se les administró únicamente la suspensión utilizada para resuspender los diferentes compuestos.

Los animales se sacrificaron una semana después de la última administración y las LM se obtuvieron por digestión artificial según lo descrito anteriormente. Finalmente se determinó el número de LM por ratón para cada uno de los grupos y se calculó el porcentaje de reducción de la carga parasitaria con respecto al control negativo. El experimento se realizó por triplicado y los resultados se analizaron estadísticamente utilizando la prueba de Duncan con una $p < 0.05$ y un α de 95%.

6.2.5 Ensayo *in vitro* (MTT/PMS) para evaluar el efecto de derivados del 1-metilbencimidazol sobre la actividad metabólica de la larva muscular de *Trichinella spiralis*.

Con objeto de determinar la estabilidad de los compuestos derivados del 1-metilbencimidazol, se realizaron ensayos *in vitro* para determinar su actividad ante *T. spiralis*. Para esto las LM del parásito se obtuvieron según lo descrito anteriormente y se colocaron 1000 LM por pozo en cajas de cultivo de 24 pozos (Nunloc) en medio RPMI 1640 conteniendo el fármaco a evaluar disuelto en una solución Tween-Etanol-Agua (25-50-25%), a una concentración de 1µg/mL. Los parásitos se incubaron por 3 días consecutivos a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, con cambio diario de medio más fármaco. Como control positivo se incluyeron parásitos en presencia de ABZ y como control negativo se incluyeron LM sin tratamiento. Después de la incubación se determinó la actividad metabólica de las LM mediante un método colorimétrico basado en la reducción de la sal de tetrazolio MTT a formazán^{3,4}. Los parásitos cultivados con los diferentes compuestos se transfirieron a tubos de microcentrifuga de 2 mL y se centrifugaron a 2500 rpm durante 2min. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS y se añadió 1mL de una solución de MTT al 0.75% (Sigma), 50µL de una solución de metosulfato de fenazina al 5% (PMS, Sigma) como catalizador y 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). Los tubos se incubaron a 37°C durante 50 min, con agitación constante. Después de la incubación se realizó otro lavado con PBS y se agregaron 500µL de DMSO, los parásitos se resuspendieron y se dejaron a temperatura ambiente por 1 h. Al finalizar este tiempo los tubos se centrifugaron y se transfirió el sobrenadante a placas de ELISA, las cuales se leyeron a 492nm. Se calculó el porcentaje de reducción de la densidad óptica en relación con el control negativo y de acuerdo a esto se calculó el porcentaje de reducción de la actividad metabólica.

VII. RESULTADOS.

Los resultados obtenidos con respecto a la actividad de los compuestos 4, 8, 12 y 16 sobre el organismo adulto de *T. spiralis* a una dosis equivalente molar de 50 mg/kg de peso (Tabla 12, Fig. 6), mostraron que tanto los derivados del 1-metilbencimidazol, como el ABZ y la Nitazoxanida presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$). El compuesto 4 redujo 54% la carga parasitaria, siendo estadísticamente diferente con respecto al ABZ, Nitazoxanida, compuesto 8, 12 y 16 ($p < 0.05$). El porcentaje de reducción de la carga parasitaria de los compuestos 8 (72%), 12 (71%), 16 (76%) y Nitazoxanida (71%) no tuvo significancia estadística con respecto al obtenido con el ABZ (83%, $p \geq 0.05$) y entre ellos tampoco existen diferencias significativas.

Tabla 12. Actividad de los compuestos 4, 8, 12 y 16 derivados del 1-metilbencimidazol sobre el organismo adulto de *Trichinella spiralis*.

COMPUESTO	No. de adultos/ ratón \pm DS (% de reducción)*
CONTROL	129 \pm 15
4	73 \pm 7 (54 ^{ab})
8	34 \pm 1 (72 ^{bc})
12	37 \pm 6 (71 ^{bc})
16	37 \pm 3 (76 ^{bc})
ALBENDAZOL	21 \pm 8 (83 ^{bc})
NITAZOXANIDA	31 \pm 1 (71 ^{bc})

Ratones de la cepa BALB/c se infectaron con 500 larvas musculares (LM) de *T. spiralis* y al día 3 p.i. se les administró una dosis única equivalente molar a 50 mg/kg de peso de cada uno de los compuestos. Los ratones se sacrificaron al sexto día post-infección (p.i.) y se obtuvieron los organismos adultos según la metodología previamente descrita.

*Promedio obtenido de tres experimentos.

DS = desviación estándar.

^a Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, $p < 0.05$.

^b Diferencias estadísticamente significativas con respecto al ALB, Nitazoxanida, compuesto 8, 12 y 16 $p < 0.05$.

^c Sin diferencias estadísticamente significativas entre sí, $p \geq 0.05$.

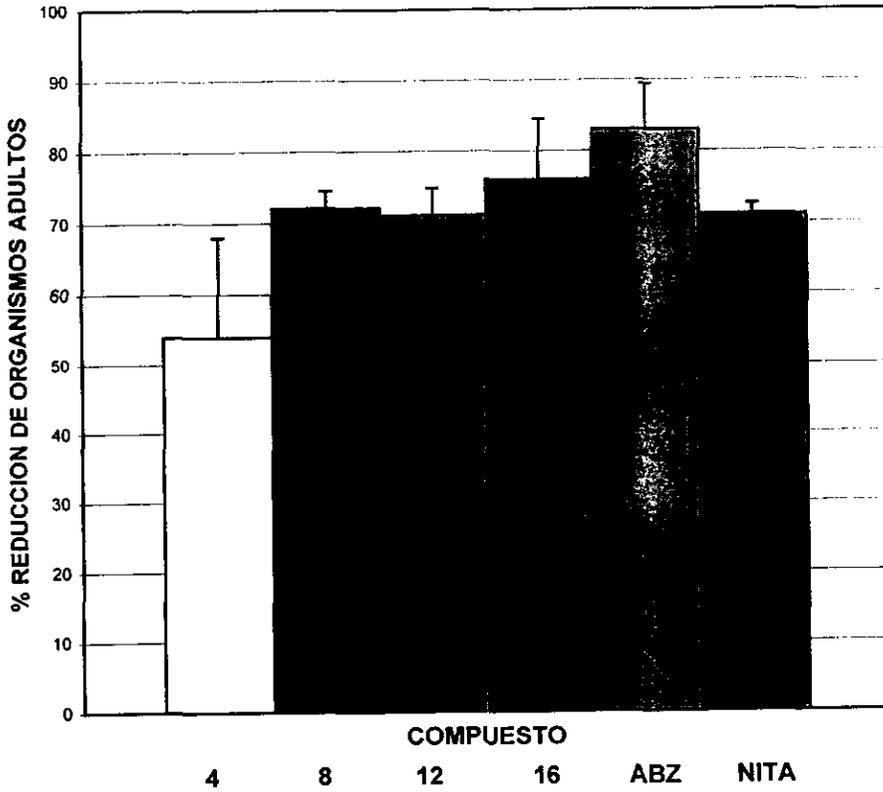


Figura 6. Porcentaje de reducción de los organismos adultos de *Trichinella spiralis* obtenidos de ratones infectados con el parásito y tratados con los compuestos 4, 8, 12 y 16 derivados del 1-metilbencimidazol, Albendazol (ABZ) y Nitazoxanida (NITA) a una dosis equimolar de 50 mg/kg de peso (Ver leyenda Tabla 12).

Cuando los derivados del 1-metilbencimidazol se evaluaron sobre la fertilidad de la hembra de *T. spiralis* (Tabla 13), se observó que todos presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$). Además los compuestos 8, 12 y la Nitazoxanida no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al ABZ, ya que los porcentajes de reducción obtenidos con estos compuestos fueron de 88, 86 y 90% respectivamente (Fig. 7) y con el ABZ del 90%. Los compuestos 4 y 16 redujeron un 63% y 74% la fertilidad de la hembra y fueron significativamente diferentes con respecto a todos los compuestos anteriores.

Tabla 13. Actividad de los compuestos 4, 8, 12 y 16 derivados del 1-metilbencimidazol sobre la fertilidad de la hembra de *Trichinella spiralis*.

COMPUESTO	No. de LRN/hembra \pm DS (% de reducción)*
CONTROL	6 \pm 1
4	2 \pm 0.4 (63 ^{ab})
8	0.7 \pm 0.1 (88 ^{ac})
12	0.8 \pm 0.01 (86 ^{ac})
16	1.2 \pm 0.1 (74 ^{ab})
ALBENDAZOL	0.5 \pm 0.15 (90 ^{ac})
NITAZOXANIDA	0.5 \pm 0.1 (90 ^{ac})

Ratones de la cepa BALB/c se infectaron con 500 larvas musculares (LM) de *T. spiralis*, al tercer día post-infección (p.i.) se administraron los fármacos a una dosis equivalente molar de 50 mg/Kg de peso. Los adultos se obtuvieron según la metodología previamente descrita con algunas modificaciones. Posteriormente se incubaron aproximadamente 20 adultos (hembras y machos) en placas de cultivo de 24 pozos en atmósfera de CO₂ a 37°C durante 24h. Las larvas recién nacidas se obtuvieron según lo descrito anteriormente.

*Promedio obtenido de tres experimentos.

D.S. = desviación estándar.

^a Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, $p < 0.05$.

^b Diferencias estadísticamente significativas con respecto al ABZ, Nitazoxanida, compuestos 8 y 12, $p < 0.05$.

^c Sin diferencias estadísticamente significativas entre sí, $p \geq 0.05$.

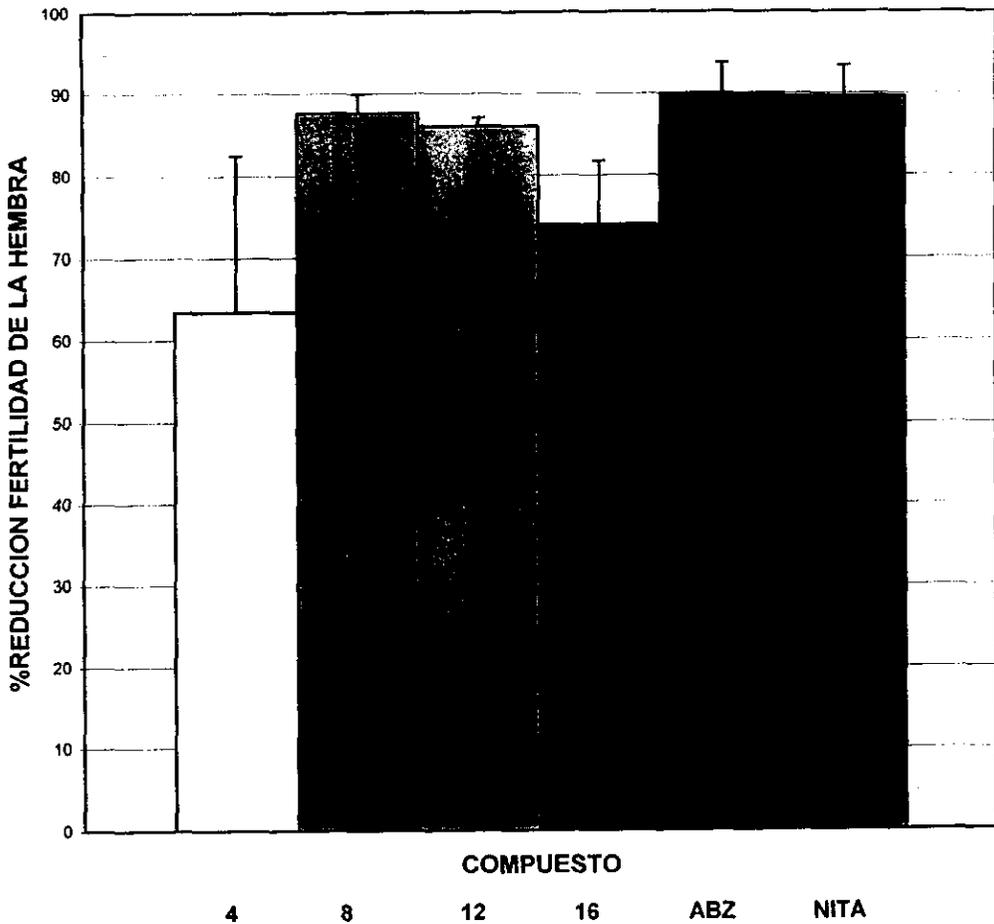


Figura 7. Porcentaje de reducción de la fertilidad de las hembras de *Trichinella spiralis* obtenidas de ratones infectados con el parásito y tratados con los compuestos 4, 8, 12 y 16 derivados del 1-metilbencimidazol, Albendazol (ABZ) y Nitazoxanida (NITA); a una dosis equimolar de 50 mg/Kg de peso (Ver leyenda de Tabla 13).

En relación con la actividad de los compuestos evaluados sobre la fase parenteral de *T. spiralis* (Tabla 14), todos los compuestos incluyendo a la Nitazoxanida tuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control y al ABZ ($p < 0.05$). El compuesto 16 y la Nitazoxanida tuvieron un porcentaje de reducción de la carga parasitaria muy similar (56 y 60% respectivamente) no habiendo diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0.05$) entre ellos.

Tabla 14. Actividad de los compuestos 4, 8, 12 y 16 derivados del 1-metilbencimidazol sobre las larvas musculares (LM) de *Trichinella spiralis*.

COMPUESTO	No. de LM/ratón \pm DS (% de reducción)*
CONTROL	19091 \pm 3314
4	14474 \pm 3058 (26 ^{ab})
8	10933 \pm 2976 (42 ^{ab})
12	13563 \pm 3019 (28 ^{ab})
16	8753 \pm 942 (56 ^{abc})
ALBENDAZOL	1881 \pm 533 (87 ^a)
NITAZOXANIDA	9164 \pm 252 (60 ^{abc})

Ratones de la cepa BALB/c se infectaron con 500LM de *T. spiralis*, al día 28 p.i. se les administró una dosis equivalente molar a 75 mg/kg de peso de cada uno de los compuestos durante 7 días consecutivos. Los ratones se sacrificaron 7 días después de la última administración y se obtuvieron las LM según la metodología previamente descrita.

*Promedio de tres experimentos.

D.S. = desviación estándar.

^a Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, $p < 0.05$.

^b Diferencias estadísticamente significativas con respecto al ALB, $p < 0.05$.

^c Sin diferencias estadísticamente significativas entre sí, $p \geq 0.05$.

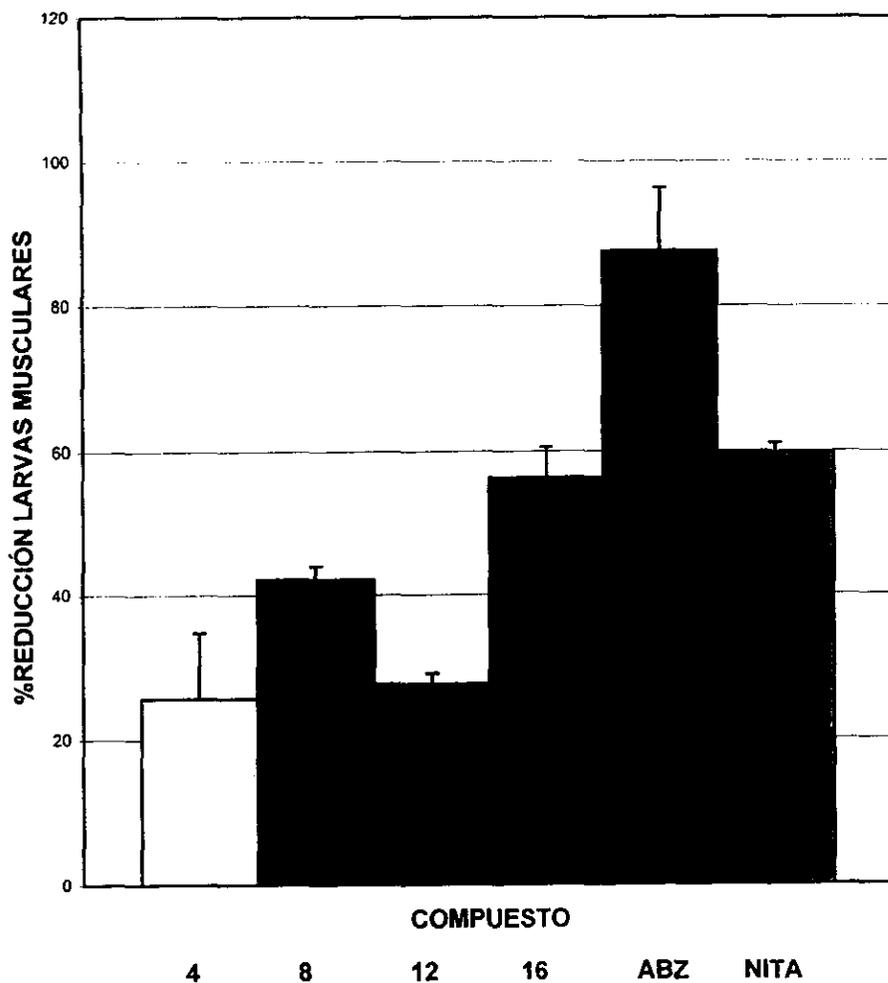


Figura 8. Porcentaje de reducción de larvas musculares de *Trichinella spiralis* obtenidas de ratones infectados con el parásito y tratados con los compuestos 4, 8, 12 y 16 derivados del 1-metilbencimidazol, Albendazol (ABZ) y Nitazoxanida (NITA); a una dosis equimolar de 75 mg/kg de peso (Ver leyenda Tabla 14).

Para determinar la estabilidad de los compuestos 4, 8, 12 y 16, se realizó un ensayo de la actividad biológica *in vitro* sobre la capacidad metabólica de las larvas musculares de *T. spiralis* (Tabla 15). Se observó que el compuesto 16 es el que presenta el más alto índice de reducción, y comparado con la Nitazoxanida y el Albendazol su efecto sobre la actividad metabólica es muy similar (36% 28% y 33% respectivamente). Los compuestos 4 y 8 presentan una actividad muy parecida a la de la Nitazoxanida e incluso al mismo Albendazol. El compuesto 12 no presentó ninguna actividad sobre la capacidad metabólica de la LM de *T. spiralis*. Los resultados obtenidos en este ensayo fueron similares a los obtenidos con anterioridad cuando los compuestos fueron recién sintetizados (resultados no mostrados).

Tabla 15. Actividad biológica *in vitro* de los compuestos derivados del 1-metilbencimidazol, Albendazol y Nitazoxanida sobre las larvas musculares de *T. spiralis*.

COMPUESTO	Reducción de la actividad metabólica (%)
4	26
8	29
12	NR*
16	36
ALBENDAZOL	33
NITAZOXANIDA	28

Larvas musculares (1000/pozo) de *T. spiralis* se incubaron en placas de cultivo (Nuloc) de 24 pozos con medio RPMI 1640 en presencia de 1 µg/mL de los diferentes compuestos por 3 días a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Se hicieron cambios diarios de medio más compuesto. Se determinó el porcentaje de reducción de la actividad metabólica con respecto al control, utilizando un método colorimétrico (MTT/PMS).

*NR= no redujo

VIII. DISCUSIÓN.

La sustitución del hidrógeno en posición 1 por un radical metilo resulta de gran interés ya que además de evitar el efecto tautomérico en la molécula del bencimidazol, permite evaluar la importancia de las sustituciones en las posiciones 5 y 6. También se considera que el H en posición 1 le confiere a la molécula su actividad antihelmíntica, ya que es importante para la unión de los bencimidazoles a la tubulina parasitaria (Lacey 1985, Abuzar 1992, Sharma 1994) el cual es uno de los mecanismos de acción de estos compuestos.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que con esta sustitución no se perdió completamente la actividad antihelmíntica de los 1-metilbencimidazoles. Asimismo ensayos previos con derivados 1-metilados del Triclabendazol evaluando su actividad sobre *T. spiralis* (Basilio 1998, Tesis Licenciatura) mostraron que estos también mantienen su efecto antihelmíntico, por lo que es posible que los derivados del 1-metilbencimidazol actúen mediante un mecanismo que no involucra su unión a tubulina, y en este sentido podrían realizarse ensayos de inhibición, para determinar si la ausencia del H en posición 1 del anillo bencimidazólico es indispensable para su acción sobre la tubulina, además estudios de microscopía electrónica ayudarían a identificar posibles blancos de acción de estos nuevos compuestos.

Los resultados obtenidos en relación a la actividad antihelmíntica de los compuestos 4, 8, 12 y 16 derivados del 1-metilbencimidazol sobre el parásito nemátodo *Trichinella spiralis*, mostraron que para la fase enteral todas las moléculas presentaron actividad, obteniéndose para los compuestos 8, 12 y 16 un porcentaje de reducción similar al obtenido con el Albendazol y la Nitazoxanida.

En el caso del efecto de estos derivados sobre la fertilidad de la hembra de *T. spiralis*, al igual que sobre la fase adulta, todos los compuestos tuvieron actividad, sin embargo los compuestos 8 y 12 se comportaron de manera muy similar al Albendazol y la Nitazoxanida, e incluso no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí. El efecto de los compuestos 8 y 12 sobre la fase enteral y sobre la fertilidad de la hembra fue similar, lo que sugiere

que para su acción a nivel intestinal es indistinta la posición (5 ó 6) que ocupe el Cl dentro del núcleo bencimidazólico, sin embargo si es muy importante que exista la presencia de este sustituyente en estas posiciones ya que el compuesto 4 que únicamente cuenta con un grupo metilto en posición 2, fue el que presentó el menor porcentaje de reducción.

Dado que el compuesto 16, que se encuentra diclorado, no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto a los demás compuestos sobre estas fases del parásito, el sustituir ambas posiciones no potencia o mejora la actividad y si pudiera influir en la toxicidad de la molécula.

El efecto de los compuestos 8, 12, Nitazoxanida y Albendazol sobre la fertilidad de la hembra sugiere que estos compuestos actúan sobre alguna función bioquímica afectando directamente su reproducción. Estos resultados son muy importantes para el tratamiento de la triquinellosis ya que al disminuir la cantidad de las larvas recién nacidas se reduce la intensidad de la infección a nivel muscular.

La Nitazoxanida que es un fármaco con una estructura química totalmente diferente y con una actividad comprobada en otras parasitosis causadas por protozoarios y helmintos, tuvo una buena actividad contra el organismo adulto de *T. spiralis* (71%) y muy similar a la de los compuestos evaluados, por lo que sería importante evaluar la actividad de los derivados del 1-metilbencimidazol sobre otras parasitosis intestinales, sobre las cuales tiene actividad la Nitazoxanida.

En el caso del efecto sobre la larva muscular de *T. spiralis*, los porcentajes de reducción de la carga parasitaria obtenidos con los compuestos 4, 8, 12 y 16, fueron significativamente diferentes del control, sin embargo ninguno de ellos presentó un porcentaje de reducción similar al del Albendazol y lo mismo ocurrió con la Nitazoxanida, la cual redujo la carga parasitaria un 60% no observándose significancia estadística con respecto al compuesto 16 (56%).

A este respecto, cabe mencionar que aunque con el radical metilto se mejoró la liposolubilidad de los compuestos (en comparación con la del Albendazol), este factor no es el único que determina la actividad antihelmíntica de una molécula a

nivel sistémico. En relación a este aspecto, el compuesto 4 resultó el más soluble en la formulación, sin embargo fue el menos activo, por lo que posiblemente esta molécula haya sido rápidamente metabolizada ya que no tiene sustituyentes en posición 5 y/o 6, y como ocurre con el Tiabendazol puede sufrir una inactivación, mediante hidroxilación en la posición 5, durante el metabolismo de la fase I.

Con respecto a la actividad del compuesto 16, que se encuentra diclorado, aunque no llega a ser tan efectivo como el Albendazol, si es mejor que los otros derivados del 1-metilbencimidazol, por lo que la sustitución en la posición 6, al combinarse con la sustitución en la posición 5 logra potenciar el efecto antihelmíntico.

De esta manera los resultados obtenidos a nivel intestinal sugieren que tanto la sustitución de la molécula en posición 5 ó 6 confiere actividad antihelmíntica, sin embargo a nivel sistémico es importante la sustitución en la posición 5 y no en la posición 6, ya que el compuesto 12 (con Cl en posición 6) tuvo un efecto menor que el compuesto 8 (con Cl en posición 5) e incluso se comportó de la misma forma que el compuesto 4 que no está sustituido y que no tuvo actividad antihelmíntica.

A nivel sistémico el tipo de sustituyentes cobra una mayor importancia, ya sea por los factores que afectan la absorción del compuesto (permeabilidad, tamaño, grado de ionización), o por los que siguen a este paso limitante (distribución, metabolismo, etc.), además para que el compuesto actúe sobre el parásito a este nivel, se necesita que éste atraviese la célula nodriza, por lo cual se ve afectada la actividad del mismo.

Cabe mencionar que los resultados obtenidos *in vivo* sobre la fase enteral del parásito, concuerdan con los obtenidos anteriormente en ensayos *in vitro* empleando el método de MTT, esta concordancia puede explicarse debido a que la acción de estos compuestos es a nivel intestinal, por lo que no necesitan ser absorbidos y su acción directa sobre el parásito puede observarse en los ensayos *in vitro*. Además estos ensayos demostraron que los compuestos 4,8,12 y 16 son estables a través del tiempo. En los ensayos *in vitro* sobre la

LM del parásito, se observó que todos los compuestos a excepción del 12 tuvieron un porcentaje de reducción muy parecido al del Albendazol y la Nitazoxanida, sin embargo bajo condiciones *in vivo* no se vió el mismo efecto. En relación a la Nitazoxanida y el compuesto 16, estos conservan el mismo patrón de comportamiento tanto en los ensayos *in vitro* como *in vivo*, y aunque su actividad no llega a ser como la del Albendazol, sería importante evaluar el compuesto 16 a diferentes dosis de manera comparativa con la Nitazoxanida, así como realizar estudios de biodisponibilidad.

IX. CONCLUSIONES

- 1) La sustitución del hidrógeno por un metilo en la posición 1 del núcleo bencimidazólico no eliminó la actividad antihelmíntica de los compuestos evaluados.
- 2) La presencia del sustituyente Cl en las posiciones 5 y/o 6 de los 1-metilbencimidazoles les confiere mayor actividad antihelmíntica a los compuestos evaluados, de esencial importancia sobre la fase enteral de *T. spiralis* en relación con el compuesto 4, el cual no se encuentra sustituido en estas posiciones.
- 3) La introducción de un grupo metililo en la posición 2 del núcleo bencimidazólico no mejoró la actividad antihelmíntica de los compuestos evaluados, en comparación con el Albendazol.
- 4) Los compuestos 8 y 16 que se encuentran sustituidos en la posición 5 y en las posiciones 5 y 6 respectivamente del núcleo bencimidazólico tuvieron mejor actividad contra la fase sistémica de *T. spiralis*.
- 5) El compuesto 16 tuvo una actividad antihelmíntica contra el organismo adulto de *T. spiralis* similar al Albendazol, sin embargo contra la larva muscular su actividad fue menor que la del Albendazol.
- 6) El compuesto 16 tuvo una actividad antihelmíntica contra el adulto y larva muscular de *Trichinella spiralis* similar a la Nitazoxanida.

X PERSPECTIVAS

- 1) Determinar el mecanismo de acción de los compuestos derivados del 1-metilbencimidazol.
- 2) Evaluar la actividad a nivel extraintestinal del compuesto 16 y la Nitazoxanida a diferentes dosis y sobre otras parasitosis.
- 3) Realizar estudios de biodisponibilidad que nos permitan determinar la cantidad de compuesto absorbido y los metabolitos formados.
- 4) Comparar la actividad antihelmíntica de compuestos sustituidos con un radical metilo en posición 1 y con un radical carbamato en posición 2, con la finalidad de evaluar la contribución del grupo carbamato a la actividad antihelmíntica de los compuestos.

XI APÉNDICE.

Preparación de reactivos.

PBS 10x (concentrado).

NaCl	87.7g
Na ₂ HPO ₄	42.9g
NaH ₂ PO ₄	5.2g
KCl	2.0g

Disolver las sales en 700mL de agua destilada y desionizada, llevar a un litro y esterilizar. Ajustar el pH (7.2-7.3).

PBS 1x (10%).

Tomar 10mL de la solución anterior y llevar a 100mL con agua destilada.

Bactoagar al 0.2% (p/v).

Pesar 0.2g de bactoagar y llevar a 100mL con agua destilada, disolver y calentar durante 3 minutos en horno de microondas.

Formulación I, Departamento de Tecnología Farmacéutica de la FQ.

Pectina USP	1.5g
Carboximetilcelulosa BV	0.5g
Carboximetilcelulosa MB	0.5g
Sacarina USP	0.2g
Metilparabeno	0.5g
Propilparabeno	0.3g
Agua c.b.p.	1L

Resultados de la prueba de Duncan con α 95%, $p < 0.05$.

Fase enteral de *T. spiralis*.

Compuesto	Control	4	8	12	16	ABZ	NITA
Control	-	0.00152	0.000037	0.000080	0.000031	0.000026	0.000059
4	0.000152	-	0.005301	0.006589	0.001485	0.000145	0.006548
8	0.000037	0.005301	-	0.772999	0.503803	0.080042	0.85450
12	0.000080	0.006589	0.772999	-	0.374201	0.055241	0.902708
16	0.000031	0.001485	0.503803	0.374201	-	0.220155	0.422201
ABZ	0.000026	0.000145	0.080042	0.055241	0.220155	-	0.063868
NITA	0.000059	0.006548	0.854505	0.902708	0.422201	0.063868	-

Fertilidad de la hembra de *T. spiralis*.

Compuesto	Control	4	8	12	16	ABZ	NITA
Control	-	0.000159	0.000035	0.000062	0.000084	0.000027	0.000033
4	0.000159	-	0.000357	0.000516	0.051682	0.000189	0.000195
8	0.000035	0.000357	-	0.742899	0.018613	0.664431	0.694059
12	0.000062	0.000551	0.742899	-	0.028800	0.472021	0.497014
16	0.000084	0.051682	0.018613	0.028800	-	0.009677	0.009826
ABZ	0.000027	0.000189	0.664431	0.472021	0.009677	-	0.947671
NITA	0.000033	0.000195	0.694059	0.497014	0.009826	0.947671	-

Larva muscular de *T. spiralis*.

Compuesto	Control	4	8	12	16	ABZ	NITA
Control	-	0.000186	0.000059	0.000099	0.000037	0.000026	0.000031
4	0.000186	-	0.003913	0.675804	0.000066	0.000039	0.000038
8	0.000059	0.003913	-	0.007378	0.007378	0.000059	0.000190
12	0.000099	0.675804	0.007387	-	0.000092	0.000037	0.000065
16	0.000037	0.000066	0.007387	0.000092	-	0.000087	0.319257
ABZ	0.000026	0.000039	0.000059	0.000037	0.000087	-	0.000177
NITA	0.000031	0.000038	0.000190	0.000065	0.319257	0.000177	-

XII BIBLIOGRAFÍA.

1. Horton R.J. Benzimidazoles in a Wormy World. *Parasitology Today*, 1990; 6(4):106.
2. Sharma S. Design of New Drugs for Helminth Diseases: Lead optimization in Benzimidazoles. *Advances in Drug Research*, 1994; 25:103-172.
3. Townson DH. *Echinococcus granulosus*: *in vitro* maintenance of Whole cysts and the assessment of effectes of Albendazole sulphoxide and Prazicuantel on the germinal layer. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1989; 83:664-669.
4. Cedillo-Rivera R. A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt (MTT) and phenazine methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res*, 1992; 23:59-61.
5. Korolkovas A. *Essentials of Medicinal Chemistry*. Jhon Wiley and Sons, 1976:583-600.
6. Goodman and Gilman´s. *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 9th edition. 1996; 961-964.
7. Campbell William et al. *Review Chemoterapy of Parasitic Diseases*. Plenumm Press, N.Y. 1986.
8. McCracken RO. A possible biochemical mode of action for benzimidazoles anthelmintics., *Int. J. Parasitol*, 1991; 21(1): 99-104.
9. McCracken RO. Uncoupling of rat liver mitochondrial oxidative by the fasciolicide Triclabendazole and its sulfoxide and sulfone metabolites. *J. Parasitol*, 1993; 79(2):198-204.
10. Pichard RK. Mode of action of anthelmintic thiabendazole in *Haemonchus contortus*. *Nature*, 1970; 228:684-685.
11. Pichard RK. The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics. *Int. J. Parasitolo*, 1973; 3: 409-417.

12. Pichard R.K. Prolonged administration: a new concept for increasing the spectrum and effectiveness of anthelmintics. *Veterinary Parasitology*, 1978; 4:309-315.
13. Criado Fornelio A. The mode of action of some benzimidazole drugs on *Trichinella spiralis*. *Parasitol*, 1987; 95:61-70.
14. Tejada P, M. Inhibition of malate dehydrogenase enzymes by benzimidazole anthelmintic. *Vet Parasitol*, 1987; 24:269-274.
15. Lacey E. Mode of Action of benzimidazoles. *Parasitology Today*, 1990; 6(4):112-115.
16. Lacey E. The role of Cytoskeletal Protein Tubulin in the mode of action and mechanism of drugs resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol*, 1988; 18:885-936.
17. Lacey E, Waston TR. Structure-Activity relationships of Benzimidazoles Carbamates as inhibitors of mammalian tubulin, *in vitro*. *Biochem Pharmacol*, 1985; 34:1073-1077.
18. Friedman PA. Interaction of anthelmintic Benzimidazoles with *Ascaris suum* embryonic tubulin. *Biochem Biofys Acta*. 1980; 630:271-278.
19. Campbell WC. Benzimidazoles: Veterinary Uses. *Parasitology Today*, 1990; 6(4):130-135.
20. Romero-Cabello R. Estudio aleatorio para comparar seguridad y eficacia del Albendazol y Metronidazol en el tratamiento de giardiasis en niños. *Rev. Lat. Microbiol*, 1995; 37:315-323.
21. Gottschall D.W. The metabolism of benzimidazole anthelmintics. *Parasitology Today*, 1990; 6(4):115-124.
22. Villavera C. Small intestinal sulphoxidation of Albendazole. *Xenobiotica*, 1995; 25(5):433-441.
23. Cook G.C. Use of benzimidazole chemotherapy in human helminthiases: indications and efficacy. *Parasitology Today*. 1990; 6(4):133-136.
24. Lanusse C.E. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant-anthelmintics. *Vet Parasitol*, 1993; 49(2):123-158.

ESTA TESIS NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

25. Lee SH. A case of intestinal capillariasis in the Republic of Korea. *Am J Trop Med Hyg*, 1993; 48(4):542-546.
26. Kaminsky RG. Albendazole treatment in human teniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1991; 85(5):648-650.
27. Cruz M. Albendazole versus praziquantel in treatment of cerebral cysticercosis: Clinical Evaluation. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1991; 35(2):244-247.
28. Gil Grande LA. Randomized controlled trial of efficacy of Albendazole in intrabdominal hydatid disease. *Lancet*, 1993; 342(8882):1269-1272.
29. Caumes E. A randomized trial of ivermectin versus Albendazole for the treatment of cutaneous larva migrans. *Am J Trop Med Hyg*, 1993; 49(5):641-644.
30. Escobedo F. Albendazole therapy for neurocysticercosis. *Arch Int Med*, 1987; 147:748-731.
31. Whittaker S.G. Effects of Albendazole and Albendazole sulfoxide on cultures of differentiating rodent embryonic cells. *Toxicol App Pharmacol*, 1992; 113(1):144-151.
32. Dubreuil et al. *In vitro* evaluation of the activities of nitazoxanide and thiazoxanide against anaerobes and aerobic organisms. *Ant Agents and Chemother*, 1996; 40:2266-2270.
33. Rossignol JF. New derivatives of 2-benzamido-5-nitrothiazoles. *Chemical Abstracts*, 1976; 83(28):2-16.
34. Monografía Nitazoxanida LANAC. Columbia Laboratories Division Antibioticos pp. 33-37.
35. Romero-Cabello R. Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1997; 91:701-703.
36. Murphy JR. Preclinical toxicology of Nitazoxanide: A new antiparasitic compound. *J App Toxicol*, 1985; 5(2):281-284.

37. Q.B. Sánchez Remedios Ma.. Tesis Maestría: Síntesis de derivados del 1-metilbencimidazol con actividad antihelmintica potencial 1999. Facultad de Química, UNAM.
38. Chester B.P. Parasitología Clínica 2a. edición, Salvat editores. Barcelona España, 1986:251-260.
39. Pozio E. Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. J Parasitol, 1992; 78(4):654-659.
40. Pozio E. Biological Characterization of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. J Parasitol, 1992; 78(4):647-653.
41. Pozio E. New taxonomic contribution to the genus *Trichinella*: Biochemical identification of seven clusters by gene-enzyme systems. In: Campbell, Pozio and Bruschi Editors. Proc of the 7th Int Conf on Trichinellosis. Alicante Spain, 1988:76-81.
42. Alcántara PP. Triquinelosis una parasitosis fuera de serie. Publicación Técnica del INDRE, 1992, No. 16 México.
43. Murrell KD. *Trichinella spiralis* in agricultural ecosystem II: Evidence for natural transmission of *Trichinella spiralis* from domestic swine to wildlife. J Parasitol, 1987; 73(1):103-109.
44. Dennis TD. Infectivity of the newborn larvae of *Trichinella spiralis* in the rat. J Parasitol 1970; 56(5):974-977.
45. Basilio Espeites Pablo. Tesis Licenciatura Evaluación de la actividad biológica de compuestos derivados del Triclabendazol empleando a *Trichinella spiralis* como modelo experimental. 1998 FES-Zaragoza, UNAM. México.
46. Andon A. Fármacos Antihelmínticos y Ectoparasiticidas, Cap 63. En Farmacología de Velazquez, 16a. edición. Edit. Interamericana, Madrid 1993:1046-1062.
47. López GM. *Trichinella spiralis* as model for evaluation of generic benzimidazole carbamates. In Campbell WC, Pozio E. (editors); Dí Sanita Press. Rome Italy. 1993:423-425.

48. De Silva Nilanthi, Guyatt Helen and Bundy Donald. Anthelmintics: A comparative review of their clinical pharmacology. *Drugs*, May 1997; 53(5):768-788.