

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

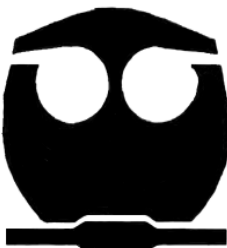
EVALUACION *in vitro* DEL EFECTO DEL PRAZIQUANTEL MEDIANTE
LA MEDICION DEL MARCADOR VITAL CMFDA EN CISTICERCOS DE
Taenia crassiceps CEPA ORF

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

HECTOR TREJO CHAVEZ



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Ofelia Espejo González
VOCAL: Dr. Francisco Hernández Luis
SECRETARIO: Dr. Javier R. Ambrosio Hernández
1er. SUPLENTE: Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha
2° SUPLENTE: Dra. Elena Guadalupe Ramírez López

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Biología del Citoesqueleto de Parásitos, Depto. De Microbiología y Parasitología. Edificio A, Facultad de Medicina, UNAM.

ASESOR:

Dr. Javier R. Ambrosio Hernández

SUPERVISOR TÉCNICO:

Bióloga Olivia Reynoso Ducoing

SUSTENTANTE:

Héctor Trejo Chávez

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández, por haberme facilitado las instalaciones del laboratorio para la elaboración de mi trabajo de tesis y su consejo.

Al M en C David García Vilchis, porque gracias a los resultados obtenidos en su trabajo de tesis de maestría, tuve la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis sobre bases firmes, producto de su esfuerzo y dedicación.

A la B. Olivia Reynoso Ducoing, por guiarme durante el aprendizaje y realización de la parte experimental, por la amistad y, principalmente por su apoyo.

A mis compañeros del laboratorio: Xochitl, Rafael, Yamile, Adrián, Sra. Gloria, Laura, Mayra, Liliana, David, Mónica y Carlos, por brindarme su amistad, su apoyo y corrección de mi trabajo en el laboratorio.

Al Dr. Marco Tulio González Martínez y al M en C Víctor Manuel Torres Flores, por prestarme el espectrofluorómetro en el que se realizaron las determinaciones y su instrucción para el buen uso del equipo.

A la Dra. Limei Zhang Hi, por facilitarme el microscopio estereoscópico acoplado a epifluorescencia, por su ayuda y paciencia conmigo con respecto al uso del equipo.

A la Facultad de Química, por haberme formado como Químico Farmacéutico Biólogo y enseñado tantas cosas en otros aspectos.

A la Facultad de Medicina y el Departamento de Microbiología y Parasitología, por permitirme utilizar sus instalaciones para la realización de mi proyecto de Tesis.

AGRADECIMIENTOS

Al jurado, por la atención prestada durante la revisión del proyecto.

Al proyecto que me apoyo durante la realización del trabajo.

PAPIIT-UNAM

“Evaluación de cambios inducidos por estrés químico en la expresión de proteínas del citoesqueleto de *Taenia solium* y *Taenia crassiceps*”. Por la beca otorgada por concepto de conclusión de estudios y elaboración de tesis.

No. de registro IN-216107-3

DEDICATORIA

A mi Padre, Héctor Trejo Urbina, por ser mi apoyo en todo sentido durante toda la carrera y cuando más lo necesité, por su amor y comprensión.

A mi Madre, Alejandra Chávez González, porque gracias a su atención y apoyo constante durante los grandes tropiezos en mi vida, he llegado hasta donde estoy.

A mi Hermano, Alejandro Trejo Chávez, porque siempre está ahí cuando lo necesito, su compañía hace que mi vida sea muy feliz.

A mis amigos de la facultad: Ricardo “Gato”, Jorge, Juan, David, Cynthia, Javier, Maribel, Samantha “Keke”, Ivan, Karina y Diego, por compartir conmigo muchos momentos inolvidables durante la carrera.

A mi mejor amigo Jonathan García Villalba, por soportarme en las buenas y en las malas. Y porque gracias a que él ha conseguido triunfar a pesar de tanta adversidad, es un ejemplo para mí de lucha y perseverancia.
iiiiCORAAA...RATAMAAA...iiii.

Al Maestro Samuel Figueroa Martínez “Teacher”, por tener confianza en mí, por darme fuerza y esperanza cuando más lo necesité, por la amistad y aprecio.

A mi Tío Jorge Urbina Anaya, porque gracias a él, descubrí desde mi niñez mi gusto y fascinación por el vasto mundo de la Química.

INDICE GENERAL

Página

1. ANTECEDENTES.....	1
1.1. Enfermedades parasitarias producidas por cestodos.....	1
1.2. Control y tratamiento de las parasitosis según la OMS.....	2
1.3. Fármacos de uso actual antiparasitarios.....	2
1.4. Praziquantel.....	4
1.4.1. Estructura química.....	4
1.4.2. Farmacocinética y farmacodinámica.....	4
1.4.3. Uso terapéutico.....	6
1.5. La importancia del desarrollo de fármacos antiparasitarios cestocidas y ADMET.....	6
1.6. Estudios <i>in vitro</i> para determinar el potencial antiparasitario de una molécula.....	8
1.7. Modelo de la cisticercosis murina por <i>T. crassiceps</i> cepa ORF en la evaluación <i>in vitro</i> del efecto de fármacos antiparasitarios.....	9
1.8. Marcadores fluorescentes biológicos y su uso en la evaluación del efecto de fármacos.....	10
1.8.1. Uso de marcadores vitales para determinar CE ₅₀	10
1.8.2. CMFDA y su biotransformación.....	11
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	14
3. MATERIALES Y METODOS.....	15
3.1. Diseño experimental.....	15
3.2. Obtención de los parásitos.....	16

3.3 Mantenimiento <i>in vitro</i> de cisticercos.....	16
3.4 Evaluación <i>in vitro</i> de PZQ en cisticercos.....	17
3.5 Marcaje fluorescente de cisticercos con CMFDA.....	18
3.6 Recuperación del fluido vesicular de los cisticercos y medición de la fluorescencia por CMFDA.....	18
3.7 Adquisición de imágenes.....	19
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	20
4.1 Morfología macroscópica de los cisticercos.....	20
4.1.1. En ausencia de PZQ.....	20
4.1.2. En presencia de PZQ.....	21
4.2 Estimación de la CE ₅₀ del PZQ en cisticercos marcados con CMFDA.....	24
4.3 Determinación de la capacidad de biotransformación del CMFDA en presencia del PZQ.....	25
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	27
PERSPECTIVAS.....	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la molécula del praziquantel.....	4
Figura 2. Modificación metabólica de la molécula CMFDA (diacetato de 5-clorometil fluoresceína)	10
Figura 3. Diagrama Experimental.....	13
Figura 4. Marcaje de cisticerco con CMFDA en ausencia de PZQ.....	18
Figura 5. Marcaje de cisticerco con CMFDA en presencia de PZQ.....	20
Figura 6. Curva concentración-respuesta de la fluorescencia emitida por el CMFDA versus la concentración de PZQ.....	21
Figura 7. Capacidad de biotransformación del CMFDA en presencia del PZQ.....	23

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADMET	Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación y Toxicidad.
BZM	Bencimidazol.
CE₅₀	Concentración efectiva en 50% de la población.
CE₉₀	Concentración efectiva en 90% de la población.
CMax	Concentración Máxima.
CMFDA	Diacetato de 5 – clorometil fluoresceína (Marcador vital)
FV	Fluido vesicular.
HEPES	Acido 4-(2-hidroxietil)-1-pirazin etano sulfónico (Agente auxiliar amortiguador de pH)
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PZQ	Praziquantel.
SSAF	Solución salina amortiguadora a pH fisiológico.
TMax	Tiempo máximo en que se consigue la concentración máxima en torrente sanguíneo.
UV	Luz ultravioleta.
SOABZ	Sulfóxido de Albendazol

1. ANTECEDENTES

1.1 Enfermedades parasitarias producidas por cestodos.

El ser humano desde su aparición en la tierra ha adquirido una cantidad sorprendente de parásitos. Aspectos de la vida humana como la migración, el nacimiento de las civilizaciones, los conflictos bélicos, han sido desde entonces factores de importancia en la diseminación de infestaciones de tipo parasitario que prevalecen en nuestros tiempos. Entre las numerosas infestaciones contraídas por el humano, las parasitosis por cestodos y principalmente las ocasionadas por la especie *Taenia solium* desde la antigüedad, han sido consideradas como un problema que aún atenta contra la integridad de la población en el mundo actual (Cox, 2002).

Los cestodos son gusanos planos, segmentados con un cuerpo que puede llegar a longitudes por arriba de 10 metros, normalmente residen en el intestino delgado de sus huéspedes definitivos los mamíferos. Su ciclo de vida incluye al menos un huésped intermediario, en el cual el parásito se desarrolla desde que se encuentra como huevo hasta su estadio larvario. Estos parásitos durante la etapa adulta presentan dentro de su constitución corporal, una simetría bilateral y tejido especializado, que soporta en cada proglótido o segmento, un complejo reproductivo que consta de un aparato reproductor femenino y uno masculino. Este aparato tiene una gran capacidad reproductiva de 20 a 30 millones de nuevos parásitos, los cuales están provistos de una cubierta de queratina que los protege del entorno y que, una vez dentro del huésped definitivo, se deshace y el huevo es activado por la bilis y enzimas pancreáticas y pasa a un estadio larvario o de metacéstodo; aspecto de

relevancia debido al cual este parásito es persistente en áreas endémicas (Willms *et al*, 2001).

1.2 Control y tratamiento de las parasitosis según la OMS.

Debido a que las enfermedades parasitarias son un importante problema de salud pública tanto en países desarrollados como los que están en vías de desarrollo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha considerado que es necesario establecer medidas para el control de estas enfermedades como: la quimioterapia, el establecimiento de normas sanitarias y la cultura preventiva. Sin embargo, aunque tales medidas de control y de tratamiento tanto a corto como a mediano plazo, no son suficientes, y ello se requiere de mejorar los fármacos de uso actual o de producir otros nuevos, ya que los fármacos antiparasitarios de uso actual no son producto de un diseño racional de fármacos aún cuando en la actualidad se conoce el sitio blanco y el mecanismo de acción para ciertos fármacos antiparasitarios de amplio espectro, su uso solo está fundamentado en el conocimiento adquirido en reportes detallados donde se demuestra que existe una acción antiparasitaria (Fairlamb *et al*, 2003).

Además, hay una creciente problemática que preocupa a la medicina humana y que es la aparición de cepas multiresistentes, como producto del uso excesivo de fármacos antiparasitarios y que se ha manifestado más claramente en el campo veterinario (Wolstenholme, 2004).

1.3 Fármacos de uso actual con actividad antiparasitaria contra cestodos.

Las enfermedades parasitarias en seres humanos ocasionadas por cestodos son consideradas un problema importante para la salud, debido a su

gran distribución en países en vías de desarrollo en Latinoamérica, el Continente Africano y Asia, principalmente en China. Entre estas, las ocasionadas por cisticercos de *Taenia solium*, la etapa larvaria metacestodos afecta principalmente en músculo esquelético ó el sistema nervioso central, conocida como neurocisticercosis, la cual es la variante de la infección considerada como la de mayor gravedad (Flisser,1988).

Por estas causas los fármacos cestocidas actualmente disponibles para el tratamiento de la cisticercosis son los derivados del Bencimidazol como el Albendazol, el Mebendazol, el derivado de las pirazoisquinolinas conocido como Praziquantel y, recientemente, se ha comenzado la introducción de la Nitazoxanida, un derivado de las isoquinoleinas, debido a que este tipo de fármaco solo tiene efecto en los parásitos, es indispensable controlar las manifestaciones clínicas propias de la infección por medio de un tratamiento paralelo; analgésicos para aliviar el dolor, corticoesteroides para controlar, en el caso de la neurocisticercosis la inflamación en el sitio debido a la respuesta inmune y antiepilépticos, para aminorar las secuelas de epilepsia producto del daño en el tejido nervioso (Flisser, 1988).

Uno de estos fármacos antiparasitarios, el Praziquantel, se considera como uno de los más efectivos en la neurocisticercosis y por ello se ha puesto mucha atención en su utilidad para definir si su actividad farmacológica podría hacerse mejor al combinarlo con otros fármacos como el Albendazol, al menos con lo que se ha hecho experimentalmente, bajo condiciones *in vitro* (Palomares *et al*, 2004; 2006).

1.4 Praziquantel.

1.4.1 Estructura química. Su nombre químico es 2-ciclohexilcarbonil-1, 2, 3, 6, 7, 11b-hexahidro – 4 H - pirazino [2, 1-a] isoquinolin – 4 – ona. Cuando se sintetiza, se obtiene como una mezcla racémica en la que el enantiómero (-) es la forma que posee actividad terapéutica (Greenberg, 2005), y que se utiliza en el tratamiento de parasitosis ocasionadas por cestodos y trematodos. Su uso se ha dado tanto en seres humanos como animales y su introducción al mercado fue en el año de 1980 (Dayan, 2003).

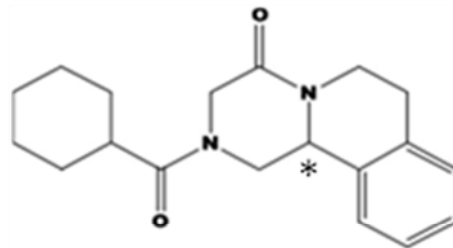


Figura 1 Estructura química de la molécula de Praziquantel. La molécula es un híbrido formado por un núcleo de isoquinolina y uno de pirazina, al cual está unido un radical ciclohexil carbonilo. Debido a que la molécula presenta un carbono quiral (*), el producto se genera como una mezcla racémica en donde la forma levógira es el principio activo del fármaco (Greenberg, 2005).

1.4.2 Farmacocinética y Farmacodinámica. En lo referente a su Farmacocinética, el PZQ, debido a su solubilidad acuosa limitada solo un 75% es absorbido. Su vida media ($T_{1/2}$) es de 1 – 2 h y los valores de C_{MAX} (Concentración Máxima) y T_{MAX} (Tiempo máximo) pueden variar entre individuos por razones desconocidas (Jung *et al*, 2008). Se sabe, de antemano que si el fármaco es administrado en compañía de alimentos ricos en carbohidratos, el porcentaje de absorción aumenta (Dayan, 2003).

Una vez administrado, el 80% del PZQ se une a proteínas plasmáticas. De la cantidad de fármaco libre, el 84% es biotransformado vía metabolismo de

primer paso en una serie de derivados mono- y di- hidroxilados (Dayan, 2003), donde el 4-hidroxiciclohexilcarbonil es el metabolito más abundante (Jung *et al*, 2008). Los metabolitos producidos poseen una actividad antiparasitaria casi nula; solo el PZQ tiene actividad antiparasitaria (Pawloski, 2006).

El mecanismo de acción que se ha propuesto en *Schistosoma mansoni*, esta referido en que altera la homeostasis de los iones calcio. Sin embargo, aún no se ha identificado a su proteína blanco principal. En cestodos y en trematodos, el PZQ produce alteraciones en el tegumento, así como una contracción parálitica de los parásitos. Esto genera como consecuencia una presentación de antígenos parasitarios al sistema inmune del huésped, y con lo cual se monta una respuesta inmune en contra de los parásitos lo cual lleva a alteraciones metabólicas, la muerte y la expulsión de los parásitos. (Day *et al*, 1992).

No se conoce el principal mecanismo de acción del PZQ, pero se ha argumentado la alteración de la homeostasis de iones Ca^{2+} es el principal mecanismo de acción. (Greenberg, 2005). Se considera que hay activación de canales de Ca^{2+} tanto por vía ligando, segundo mensajero y potencial eléctrico, así como por sistemas amortiguadores de Calcio, canales de Calcio intracelulares, así como bombas y transportadores. A pesar de estos argumentos, es sabido que el PZQ ocasiona modificación en los fosfolípidos e incremento en la fluidez de membrana plasmática lo cual produce un flujo interno de iones Ca^{2+} , producto de la permeabilidad alterada de la membrana (Harder *et al*, 1988). Por otro lado se han considerado a los canales de Ca^{2+} como sitios críticos de interacción de PZQ por su gran importancia en el establecimiento de la homeostasis de calcio. Esto se debe a que el calcio

permite que las células efectúen fenómenos de excitación-contracción, excitación-excreción y otros procesos de vital importancia para tejido muscular, nervioso y otras células excitables. Recientemente se encontró tanto en *Schistosoma mansoni* como en otras especies de invertebrados una variante de la subunidad β que forma parte de los canales calcio, la cual posee alta susceptibilidad a la acción del PZQ. Hasta la fecha, no se ha encontrado esta variante en el ser humano u otras especies de mamíferos (Greenberg, 2005).

1.4.3 Uso terapéutico. El PZQ es administrado por vía oral para el tratamiento de cisticercosis subcutánea (25 mg/kg/día durante 3 – 6 días), de neurocisticercosis (50 mg/kg/día durante 2 semanas) y como tenicida (5 mg/kg, una sola dosis) (Pawlowski, 2006). Debido a que el uso de PZQ para el tratamiento de la neurocisticercosis puede acelerar la inflamación y el dolor, síntomas relacionados con la respuesta inflamatoria generada por la infección, es recomendable el uso de corticoesteroides para tratar la inflamación y analgésicos para el dolor. Debido a ello el PZQ está contraindicado para el tratamiento de la cisticercosis ocular (Pawlowski, 2006).

1.5 La importancia del desarrollo de fármacos antiparasitarios cestocidas y la aplicación de ADMET.

La creciente distribución en el mundo de las enfermedades parasitarias, producto del turismo, la migración, la guerra, entre otros fenómenos socioeconómicos, hace imprescindible la disponibilidad de fármacos para el tratamiento de parasitosis específicas (Fairlamb *et al*, 2004). Además, desde hace más de 30 años, no se ha producido un fármaco antiparasitario exitoso debido a la falta de interés. Por ello, por lo consiguiente, y con la finalidad de evitar el empirismo en el desarrollo de nuevos fármacos, para su aplicación,

una vez que los fármacos han sido diseñados y sintetizados, requieren ser evaluados para cubrir ciertos requisitos de acuerdo a lo descrito como ADMET. Entre estos estudios, la evaluación del efecto *in vitro* en modelos celulares o biológicos es vital.

Es necesario aplicar estrategias de diseño racional de nuevos fármacos con actividad antiparasitaria o bien, de rediseñar los ya existentes. Para ello se requiere de un apoyo multidisciplinario, tecnológico y económico, que permita llevar a cabo cada uno de los procedimientos implicados. La empresa no es fácil, debido a que se tienen que considerar aspectos como la toxicidad, mutagenicidad, poca solubilidad, fácil metabolización, de entre millones de moléculas sintetizadas, al menos diez de ellas podrían satisfacer tales aspectos (Revah, 2002).

Aparte los aspectos mencionados, es necesario integrar nuevos conocimientos relacionados con la naturaleza celular, bioquímica y molecular de los patógenos, los resultados que provienen de modelos destinados al estudio de interacciones huésped-parásito (Kurtz *et al*, 2002). Y apoyarse en la bioinformática, todos estos elementos se considera proporcionan nuevos puntos de partida para el diseño de nuevas estructuras con propiedades antiparasitarias, el esclarecimiento del mecanismo de acción de los fármacos de uso actual y la búsqueda de nuevos blancos farmacológicos (Méndez *et al*, 2008).

1.6 Estudios *in vitro* para determinar el potencial antiparasitario de una molécula.

Cuando un fármaco es administrado se espera que el efecto terapéutico se presente, y así obtener el tratamiento deseado. Sin embargo, para cumplir este objetivo es necesario considerar diferentes aspectos de gran importancia. La farmacología preclínica es la primera etapa del desarrollo de fármacos, en ella se contemplan estudios realizados ya sea *in vitro* y/o en animales de experimentación con el propósito de obtener información farmacéutica, farmacocinética, farmacodinámica y toxicológica de sustancias con potencial farmacológico. Estos datos son vitales para garantizar la seguridad del fármaco y reducir dentro de lo posible los riesgos que implican su uso (Mendoza *et al*, 2008).

Dentro de la variedad de estudios *in vitro* que se realizan en la etapa preclínica, el bioensayo que es una aproximación experimental, tiene como función analizar la respuesta biológica resultante por el efecto del fármaco de manera cuantitativa para la elaboración de modelos que interpreten el probable efecto del fármaco. Esto resulta de gran importancia para la aceptación de la sustancia como un nuevo candidato.

El bioensayo que se elaboró en el presente proyecto de tesis fue del tipo de respuesta gradual de la cual consiste en asignar diferentes concentraciones del fármaco a los que estarán expuestas las muestras biológicas y un control, posteriormente, por medio de un método reproducible se mide la respuesta biológica a cada una de las muestras para la obtención de valores cuantificables, finalmente los datos resultantes se unifican para la elaboración de una curva concentración – respuesta, modelo gráfico que provee información de gran relevancia respecto a la actividad del fármaco.

1.7 Modelo de la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps* cepa ORF en la evaluación *in vitro* del efecto de fármacos antiparasitarios.

Aunque es posible evaluar *in vitro* en metacestodos de *Taenia solium*, ello sin embargo resulta complicado por que los parásitos requieren ser obtenidos de la carne de cerdo infectada. Luego, aunque se tenga la fortuna de tener carne infectada, es posible que el número de parásitos sea insuficiente para los experimentos, no hay homogeneidad segura de los parásitos en relación a su estadio ni tampoco del estado fisiológico que guardan los parásitos al momento de su disección.

Debido a estas causas se recurre al modelo experimental de cisticercosis murina, el cual ha venido a subsanar muchos de los problemas; Los cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF son parásitos obtenidos fácilmente de ratones infectados experimentalmente y el modelo es fácil de mantener en laboratorio. Otra característica es que estos cisticercos presentan una morfología microscópica semejante a los cisticercos de *T. solium*: son vesiculares, llenos de fluido vesicular y delimitados por un tegumento sincicial continuo, que les permite obtener los nutrientes necesarios para su desarrollo y, a su vez, eliminar aquello que no les sirve (Ambrosio, 2007). Gracias a este modelo experimental es posible obtener cantidades suficientes de cisticercos por medio de inoculaciones seriadas, ya que a diferencia de *T. solium*, esta especie es capaz de reproducirse asexualmente por gemación (Freeman, 1962), es posible conservar la homogeneidad morfológica, debido a las características fenotípicas de la cepa ORF, su incapacidad para desarrollar escólex y su alta capacidad de reproducción respecto a otras cepas (Smith *et al*, 1972).

Por lo anterior, se ha demostrado que este tipo de parásitos es útil para evaluar el efecto de fármacos en las formas larvarias en cultivo Palomares *et al*, 2006.

Sin embargo, dado que recientemente se estableció y estandarizó una estrategia, con base al marcador vital diacetato de 5- clorometil fluoresceína (CMFDA), para evaluar el efecto de derivados del BZM y se compararon con los parámetros farmacológicos con lo determinado por Palomares (2006).

1.8 Marcadores fluorescentes biológicos y su uso en la evaluación del efecto de fármacos.

1.8.1 Uso de marcadores vitales para determinar CE_{50} .

Actualmente se ha intensificado el uso de marcadores vitales debido a que permiten detectar componentes de complejos biomoleculares, incluyendo células vivas de una manera selectiva y sensitiva, mediante la medición de la fluorescencia, propiedad que se le atribuye a estas moléculas que son por lo general hidrocarburos poliaromáticos o heterocíclicos, también llamados fluoróforos o colorantes fluorescentes. Estas moléculas tienen la capacidad de localizarse dentro de una región específica de un espécimen biológico y/o responder a un estímulo específico, por lo que es posible obtener mediante el uso de diferentes sistemas de detección, información detallada a cerca de la localización del marcaje así como la intensidad de fluorescencia emitida. (Hauglan, 2005). Debido a las características de los marcadores vitales así como a la variedad de sistemas de detección de fluorescencia disponibles, es posible obtener mejores resultados mediante un método más sencillo y reproducible de aplicar en comparación a los métodos convencionales.

Relacionado al presente trabajo de tesis se empleó el marcador vital CMFDA para determinar el grado de susceptibilidad de la especie *Taenia crassiceps* cepa ORF a fármacos con actividad antiparasitaria, mediante un espectrofluorómetro, sistema de detección que permite medir de grado de fluorescencia en la muestra de FV.

1.8.2 CMFDA y su biotransformación. El CMFDA es una sustancia química con capacidad de difundir a través de las membranas plasmáticas de las células y una vez dentro de ellas, esta sustancia es biotransformada por la maquinaria enzimática de esterasas que rompen sus grupos acetato, y ello genera una molécula intermediaria que es capaz de emitir fluorescencia y es permeable.

Luego, debido a que ocurre una reacción de sustitución catalizada por la glutación-s-transferasa, entre el grupo clorometil del marcador vital y el grupo tiol contenido en el glutación, da como resultado un aducto tioéter el cual genera un compuesto no permeable fluorescente y que permite que la marca se mantenga en el interior de la célula (Hauglan, 2005).

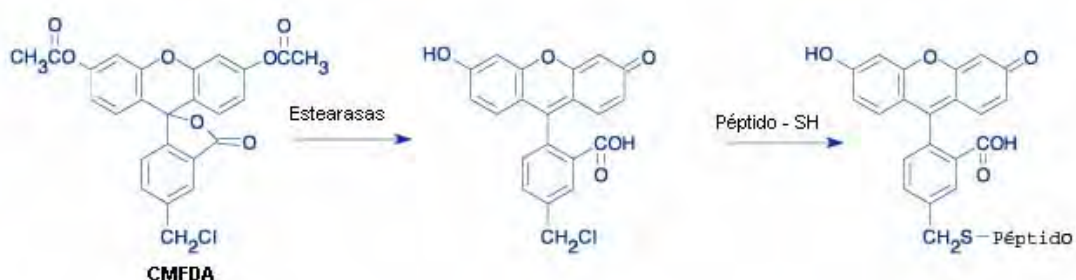


Figura 2 Modificación metabólica de la molécula CMFDA. La molécula, una vez dentro de la célula, es biotransformada por las esterasas intracelulares en una estructura intermediaria fluorescente, posteriormente mediante la interacción con el grupo clorometilo y el glutación se genera un aducto CMFDA-Glutación, el cual es fluorescente e impermeable.

El glutatión (glutamilcistienilglicina) es un tripéptido de gran importancia debido a que participa en procesos vitales que mantienen la estabilidad interna de la célula. Está ampliamente distribuido en tejidos de animales, plantas y distintos microorganismos (Meister, 1988). Participa en procesos de detoxificación debido a su capacidad para formar conjugados con sustancias de origen endógeno y exógeno, como lo son radicales libres derivados del oxígeno y metales pesados. Además, interviene como cofactor de enzimas que originan la catálisis de una gran variedad de reacciones (Meister, 1988).

Se encuentra en el citosol en concentraciones milimolares, por lo que convierte al glutatión en el principal almacén del azufre no proteico, y a su vez es distribuido como precursor en procesos de síntesis de cisteína y proteínas.

La concentración de glutatión se considera como el índice de vitalidad celular, ya que es uno de los principales sistemas de detoxificación celular (Meister, 1988). Por lo tanto, si este sistema de biotransformación se ve comprometido, la célula tendrá menor capacidad de biotransformar el marcador vital, por lo que en cisticercos, el grado de fluorescencia del marcador vital CMFDA transformado dentro de la célula es un parámetro medible que refleja directamente la capacidad metabólica y viabilidad del organismo en que se emplea (García-Vilchis, 2007).

El CMFDA no sólo se ha aplicado en cestodos para determinar la viabilidad de los parásitos (García-Vilchis, 2007; Kurtz *et al*, 2002), también se ha empleado para evaluar el grado de susceptibilidad *in vitro* de hongos, de la especie *Aspergillus* frente a fármacos antifúngicos (Balajee *et al*, 2005). Por estas causas, se ha considerado que el CMFDA podría ser utilizado para determinar el potencial antihelmíntico de derivados del bencimidazol en

cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF (García-Vilchis, 2007). Por lo que, para el presente proyecto, se determinó evaluar el efecto del fármaco cestocida, el praziquantel, el cual no tiene relación estructural alguna con los compuestos derivados del bencimidazol y los cuales habían sido utilizados durante la estandarización la medición de CMFDA fluorescente en cisticercos.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Es posible determinar, mediante la medición de la fluorescencia emitida por el CMFDA, el efecto del praziquantel en cisticercos tratados *in vitro*.

OBJETIVO GENERAL

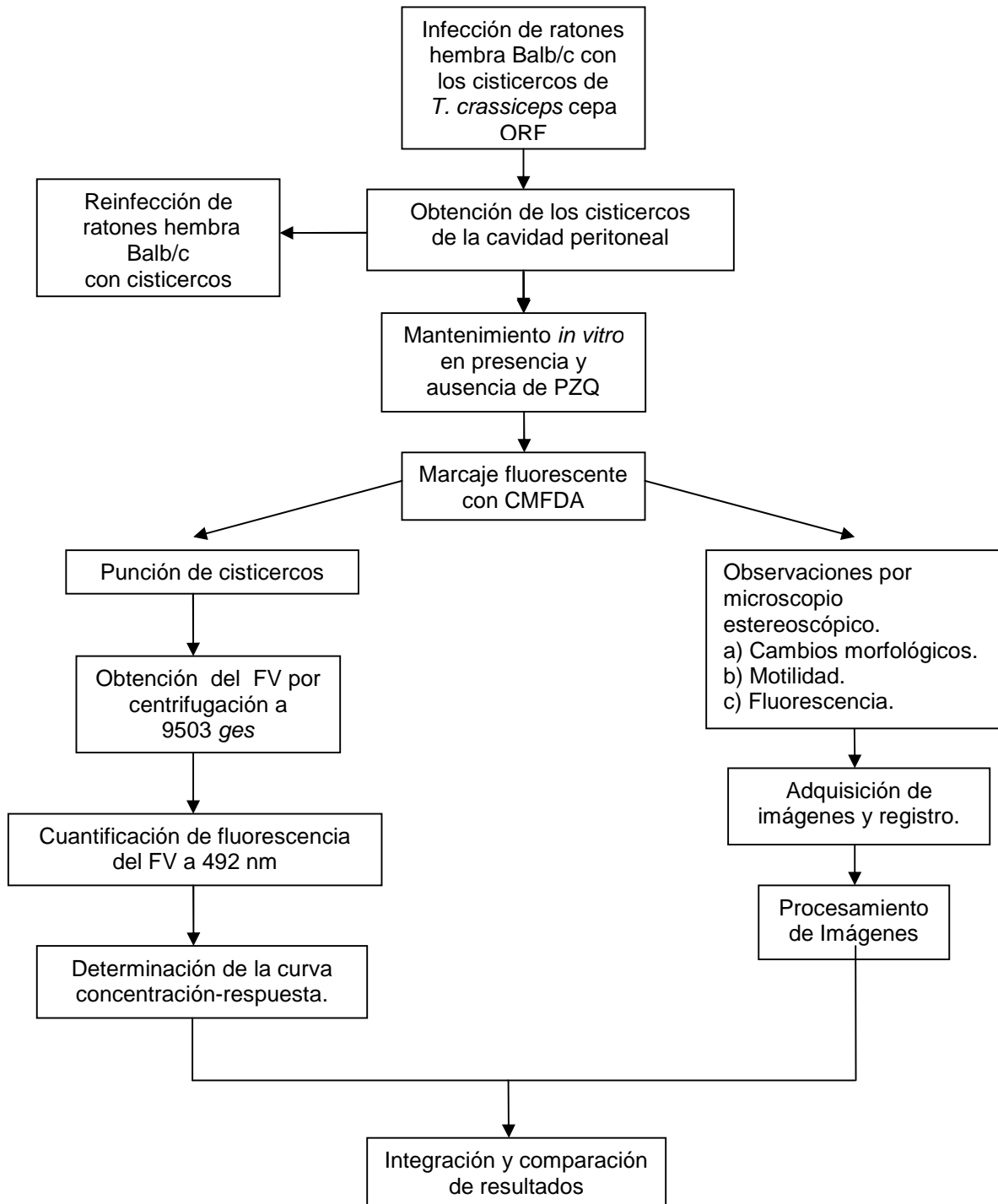
Evaluar el efecto del PZQ en cisticercos cultivados *in vitro* mediante la cuantificación del CMFDA y el aspecto morfológico de los parásitos.

Objetivos particulares

- 1.- Obtener parásitos de infecciones experimentales y mantenerlos en cultivo *in vitro*.
- 2.- Cuantificar la fluorescencia emitida por el CMFDA en cisticercos cultivados *in vitro*.
- 3.- Cuantificar la fluorescencia emitida por el CMFDA en cisticercos cultivados *in vitro* bajo tratamiento con PZQ
- 4.- Comparar la morfología de los parásitos, tratados o no con PZQ, bajo condiciones *in vitro*.

III. Materiales y Métodos

3.1 Diseño experimental.



3.2 Obtención de parásitos.

Se infectaron ratones hembra Balb/c de 5 semanas de edad con 0.4mL de cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF previamente.

Los parásitos se recuperaron de la cavidad peritoneal de un ratón de 4 meses de infección. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, y de ellos, de su cavidad peritoneal, se obtuvieron los parásitos los cuales. Cuando se requirió, los parásitos se almacenaron en SSAF complementado con antibiótico – antimicótico (Penicilina-G, Estreptomicina y Anfotericina B, GIBCO BRL), hasta ser utilizados para infectar otros ratones.

3.3 Mantenimiento *in vitro* de cisticercos.

Una vez recuperados y lavados los cisticercos, se colocaron en cultivo *in vitro*. En una incubadora NUAIRE Modelo UN - 4750 bajo condiciones definidas (37°C, 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa) durante 11 días.

El medio de cultivo empleado fue medio RPMI 1640 (GIBCO), suplementado con 2.2g de HEPES (GIBCO BRL) y 2.2g de NaHCO₃ y ajustado a pH 7.2. El medio de cultivo se esterilizó mediante filtración por 0.22µm, luego se complemento con 10mL de una mezcla de antibiótico – antimicótico (Penicilina-G, Estreptomicina y Anfotericina B, GIBCO BRL) y se almacenó a 4°C, hasta su uso.

3.4 Evaluación *in vitro* del efecto del PZQ en cisticercos.

Los ensayos, el PZQ se preparó de la manera siguiente: Se prepararon dos soluciones stock, una de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Solución 1) y otra de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Solución 2).

Mientras que la solución 1 consistió en una disolución de 10mg de PZQ, en un matraz volumétrico, en presencia de 1 mL de Etanol absoluto. Luego se llevó al aforo con agua Milli-Q a un volumen total de 10mL. Se tomó una alícuota de 10 μl de la solución 1 para disolverla en otro matraz aforado con agua Milli-Q hasta llegar a un volumen de 10 mL y para obtención de la solución 2. Luego, se prepararon en medio de cultivo, diferentes concentraciones de PZQ (0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1 y 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para los ensayos se utilizaron dos controles; uno, parásitos con medio de cultivo RPMI 1640 y el otro, parásitos en presencia del porcentaje de etanol absoluto en el que se diluyó la concentración más alta de PZQ.

Para evaluar el efecto del PZQ sobre los cisticercos, se depositaron grupos de 30 +/- 5 de cisticercos en cajas multipozos (NUNC) con pozos de 2.5 cm de diámetro. Los ensayos se hicieron por triplicado, en presencia de los grupos control y se formaron los grupos de parásitos necesarios para evaluar las diferentes concentraciones de PZQ. Durante el tiempo de cultivo se observó la morfología de los parásitos y el efecto que ejerció en ellos el PZQ. Para mantener siempre la concentración del PZQ, se hizo cambio de medio diario con la concentración correspondiente de PZQ, en estudio.

3.5 Marcaje fluorescente con CMFDA.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio con PZQ de todas las cajas multipozos, incluidos los controles y a cada uno se les adicionaron 2 mL del marcador vital CMFDA (Molecular Probes) diluido en medio de cultivo a una concentración de 8 μ M, se incubaron los parásitos por 45 minutos bajo las mismas condiciones indicadas. Al finalizar el tiempo, se retiró la solución con el CMFDA y se agregaron 3mL de formaldehído al 3.7%. Se volvieron a incubar los parásitos 15 minutos a temperatura ambiente, luego se retiró el formaldehído, se lavaron los cisticercos tres veces con SSAF a pH 7.2, se colocaron en tubos Eppendorf y se almacenaron a 4°C, protegidos de la luz.

3.6 Recuperación del fluido vesicular y medición de la fluorescencia.

Para ello, todas las actividades se realizaron en cuarto oscuro. Los parásitos se obtuvieron de los tubos Eppendorf y se puncionaron con ayuda de una aguja, los parásitos así puncionados, se centrifugaron a 9503 g durante 30 minutos a 4°C. Luego, una vez recuperado el FV de los sobrenadantes, se obtuvieron 25 μ L de cada una de las muestras y se disolvieron en 2.5 mL de agua destilada. La mezcla resultante se protegió de la luz y, cuando se hizo la medición de la fluorescencia, a las muestras se le colocó en una celda de cuarzo y se les midió la fluorescencia en un espectrofluorómetro (PPI). Las condiciones de medición de la fluorescencia se ajustaron a 490nm de excitación y a 515nm para emisión (Hauglan, 2005). Como blanco se utilizó agua destilada.

Para la determinación de la CE_{50} del PZQ sobre los cisticercos se hizo un triplicado de cada concentración establecida así como los controles.

Una vez que se obtuvieron las lecturas correspondientes al grado de fluorescencia de la muestra, los resultados fueron analizados con el programa GraphPad Prism versión 4.0, donde se estableció la curva concentración-respuesta mediante un análisis de correlación no lineal de pendiente variable.

3.7 Adquisición de imágenes.

Con la finalidad de adquirir las imágenes, de acuerdo a lo descrito en los apartados 3.3 y 3.4, los parásitos seleccionados se observaron en un microscopio estereoscópico invertido. Este equipo estaba acoplado a un sistema de epifluorescencia equipado con una lámpara de mercurio de 100W y un filtro de 510 nm (Olympus, modelo SZX7). Luego, las imágenes se tomaron con una cámara COOLPIX 4300. En presencia de luz blanca o de luz UV. Las imágenes obtenidas se editaron bajo el programa de ADOBE Photoshop 7.0, bajo condiciones de luz blanca y con luz producida con una lámpara de mercurio (luz UV).

IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

4.1 Morfología macroscópica de los cisticercos.

4.1.1. En ausencia de PZQ. Una vez que los parásitos se recuperaron de las infestaciones, se colocaron en cultivo *in vitro* en ausencia de fármaco y bajo estas condiciones se encontró que los parásitos no sufrieron modificación macroscópica alguna. Posteriormente, como se muestra en la Figura 4, los parásitos se dividieron en grupos para evaluar el marcaje fluorescente de ellos en ausencia (Fig 4 A y B) o en presencia del CMFDA (Fig. 4 C y D), así como en ausencia (Fig 4 A y C) o en presencia de luz UV (Fig 4 B y D) como fuente de excitación/emisión del marcador fluorescente. Como se observa en dicha figura, el grupo evaluado en ausencia de CMFDA y bajo condiciones de luz UV (Fig. 4 B) no tuvo una autofluorescencia intensa. Sin embargo, cuando se adicionó el marcador fluorescente y se le estimuló con la luz UV (Fig. 4 D) hubo un aumento intenso de la fluorescencia emitida por los parásitos. Se observó que los parásitos marcados con CMFDA, en ausencia de luz UV (Fig 4 C), presentaron una fuerte tinción no fluorescente de color verde en comparación de lo parásitos que no se marcaron (Fig 4 A). Según observaciones obtenidas, los parásitos no tuvieron alteraciones morfológicas macroscópicas por el mantenimiento *in vitro*, por la adición del CMFDA o la estimulación con la luz UV.

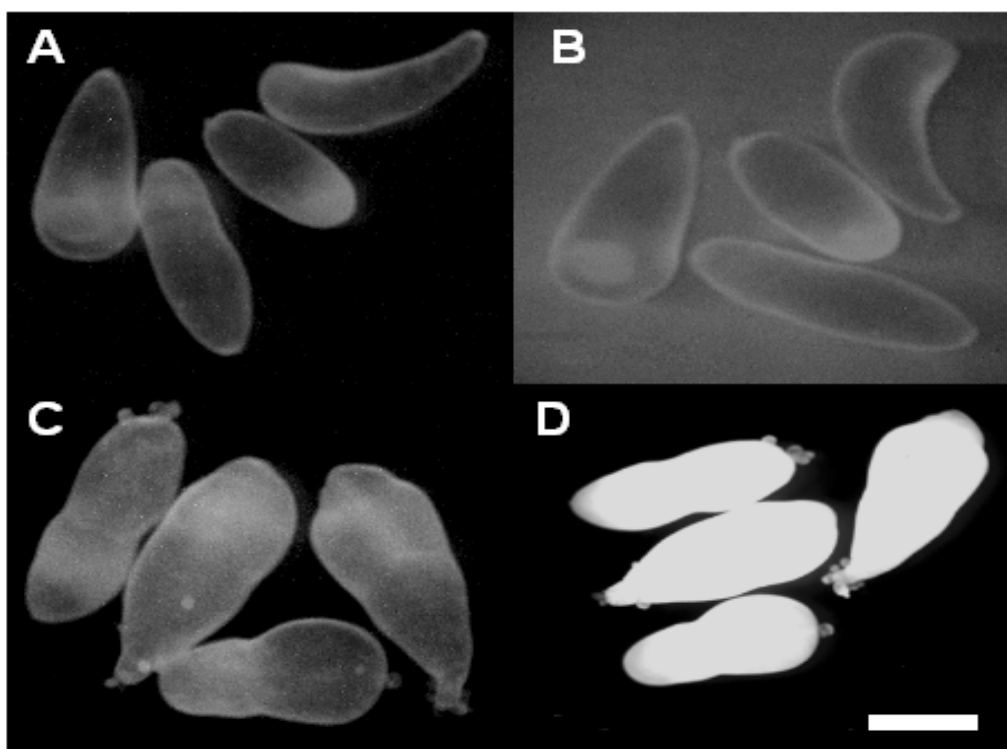


Figura 4. Marcaje con CMFDA de cisticercos en ausencia de PZQ. Luego de la obtención y el lavado de los parásitos se colocaron en ausencia (A y B) y en presencia de CMFDA (C y D), así como en ausencia (A y C) y en presencia de luz UV (B Y D). Sólo los parásitos bajo estas últimas condiciones emiten una fluorescencia intensa. La escala corresponde a 1 mm de longitud.

4.1.2. En presencia de PZQ. El efecto producido en función del tiempo de la incubación de los cisticercos, en presencia de diferentes concentraciones de PZQ, se muestra en la Figura 5. En la Figura 5 se observa que la morfología macroscópica de los parásitos, así como su tamaño (posiblemente debida a la pérdida de fluido vesicular) resultaron alteradas debido a la concentración del PZQ. Según la imagen, la concentración mas alta (0.3 $\mu\text{g/mL}$) fue la que produjo mayor alteración de los parásitos y la cual se mostró evidente conforme transcurrieron los días de tratamiento. No hubo modificación alguna en los

parásitos del grupo control durante el tiempo de estudio. En lo relacionado al marcaje fluorescente de CMFDA, no se observó variación alguna en la intensidad de la fluorescencia de los parásitos, ni aún cuando hubo disminución de su tamaño por el efecto de la máxima concentración de PZQ empleada.

El efecto del PZQ en la morfología de los parásitos se observó desde el primer día de incubación bajo una concentración de 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la que se observó que los parásitos tuvieron disminución de tamaño. Al segundo día de incubación, bajo una concentración de 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se encontró que los parásitos presentaban cambios en su morfología ya que se observaron con menores tamaños y menos ovalados. Estos cambios se mantuvieron, bajo esta misma concentración, a lo largo de los días de cultivo. Según la imagen, a una concentración de 0.022 $\mu\text{g}/\text{mL}$, hubo variaciones en la morfología de los parásitos a partir del día 7 de cultivo, sin embargo, cabe la posibilidad de que los efectos se manifestaran desde el segundo día de cultivo. En el último día de cultivo *in vitro*, bajo las concentraciones de 0.022 y 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$, los cisticercos tuvieron cambios en su morfología y sólo en la concentración de 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ los parásitos perdieron su tamaño considerablemente.

En lo referente a la motilidad franca de los parásitos, bajo el tratamiento con el PZQ, se encontró que los parásitos tuvieron movimiento hasta el segundo día de tratamiento hasta la concentración de 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que bajo la concentración de 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó que los parásitos estaban inmóviles.

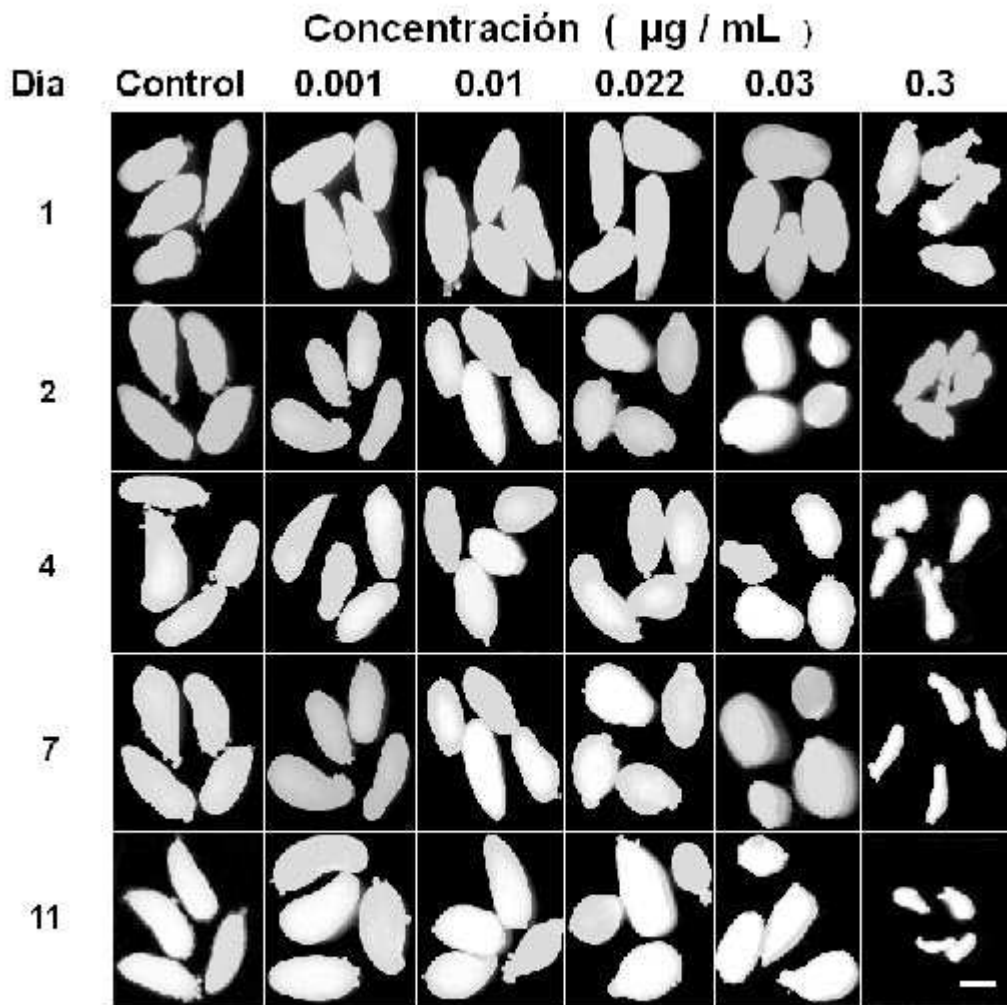


Figura 5. Marcaje con CMFDA de cisticercos en presencia de PZQ. Se muestran varios grupos de cisticercos cultivados *in vitro* en diferentes días y tratados con diferentes concentraciones de PZQ. Se comparan con un grupo de parásitos que no recibieron tratamiento (Control). Luego de los tratamientos con PZQ, los parásitos se marcaron con CMFDA, se fijaron con formaldehído, se observaron y las imágenes se obtuvieron bajo un microscopio estereoscópico acoplado a un equipo de epifluorescencia. La escala corresponde a 1 mm.

4.2 Estimación de la CE_{50} del PZQ en cisticercos marcados con CMFDA.

Una vez que se hicieron las observaciones del efecto de las diferentes concentraciones del PZQ, durante el tiempo de incubación y con el FV recuperado de los parásitos, se hizo la determinación de la fluorescencia emitida por el CMFDA. Los valores de fluorescencia emitidos bajo las diferentes concentraciones de PZQ se graficaron en una curva concentración-respuesta y se determinó la CE_{50} del fármaco como se muestra en la figura 6:

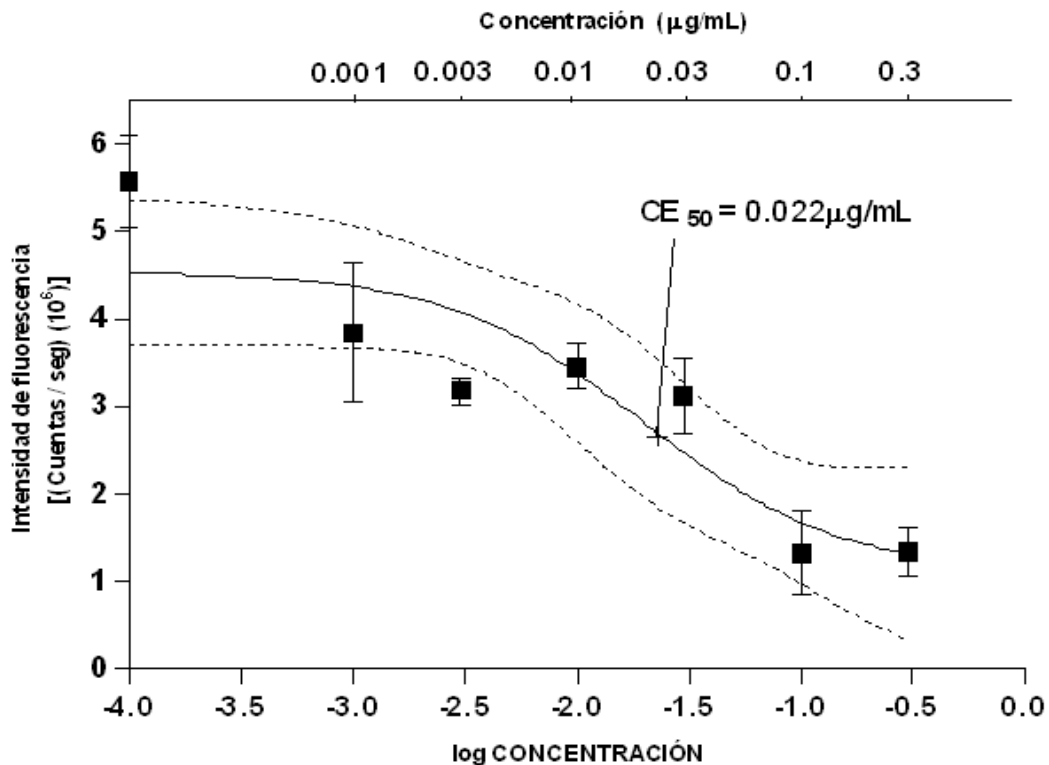


Figura 6. Curva concentración-respuesta de la fluorescencia emitida por CMFDA versus la concentración de PZQ. Luego de haber concluido con los 11 días de cultivo *in vitro* de los parásitos, en presencia de diferentes concentraciones de PZQ (eje de las abscisas inferior y superior), se recuperó el FV de los parásitos y se midió la intensidad de la fluorescencia del marcador vital CMFDA (eje de las ordenadas; no. de [(cuentas/seg) (10^6)]). Tanto los valores de intensidad de la fluorescencia (determinados en análisis por triplicado), como la tendencia de la curva sigmoidea, están presentadas con su intervalo de desviación estándar según las condiciones del análisis (95%, $R^2=0.78$) con el programa computacional GRAPH PAD Prism 4.0, en donde la Intensidad de fluorescencia esta en función de la concentración (Log Concentración).

En la Figura 6 la intensidad de la fluorescencia (mostrada en el eje de las ordenadas como unidades de [(Cuentas/segundo) (10^6)] presenta dependencia de las diferentes concentraciones utilizadas del PZQ (representado como el logaritmo de la concentración en el eje de las abscisas), las cuales se muestran en $\mu\text{g/mL}$ en el eje horizontal superior. Según la gráfica, la máxima fluorescencia emitida por el CMFDA corresponde a los parásitos que no recibieron tratamiento alguno, el valor de la fluorescencia (para fines de comparación) se colocó sobre el eje de las ordenadas (valor log -4.0 en el eje de las abscisas). Según la Figura 6, la curva concentración – respuesta muestra que hay una tendencia sigmoidea decreciente de la intensidad de la fluorescencia (línea continua sigmoidea que va de la menor a la mayor concentración del fármaco utilizado) debido al incremento de la concentración del fármaco. Los valores de la fluorescencia, para cada uno de los análisis realizados, se muestran con los intervalos correspondientes a la desviación estándar de dichos valores, así como se muestra en líneas punteadas la desviación estándar de la tendencia sigmoidea. Una vez que se determinó la tendencia de la curva concentración-respuesta, se determinó el valor de la CE_{50} el cual resultó de $0.0221 \mu\text{g/mL}$ (log concentración= -1.653) a un intervalo de confianza del 95% del intervalo de 0.0067 a $0.276 \mu\text{g/mL}$ (log concentración - 2.172 a -1.135) con una R^2 de 0.78.

4.3 Determinación de la capacidad de biotransformación del CMFDA en ausencia y en presencia del PZQ.

La capacidad de biotransformación del CMFDA (eje de las ordenadas), bajo las diferentes concentraciones de PZQ (eje de las abscisas), se presentan en la Figura 6. Para ello se hicieron estimaciones del porcentaje del CMFDA

que biotransformaron los parásitos en comparación con los que no recibieron tratamiento. Se consideró que los parásitos del grupo control poseen la capacidad de biotransformar al 100% del CMFDA (Ctrl, barra sombreada) y de acuerdo a estas consideraciones, con base a la concentración del PZQ, se encontró una tendencia decreciente en la capacidad de biotransformación. Según estos resultados, la incapacidad de biotransformar al marcador vital fluorescente, en el FV de los parásitos, es directamente proporcional al aumento en la concentración del PZQ. Aunque se utilizó la concentración máxima del fármaco (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no se eliminó por completo la capacidad de biotransformación del CMFDA.

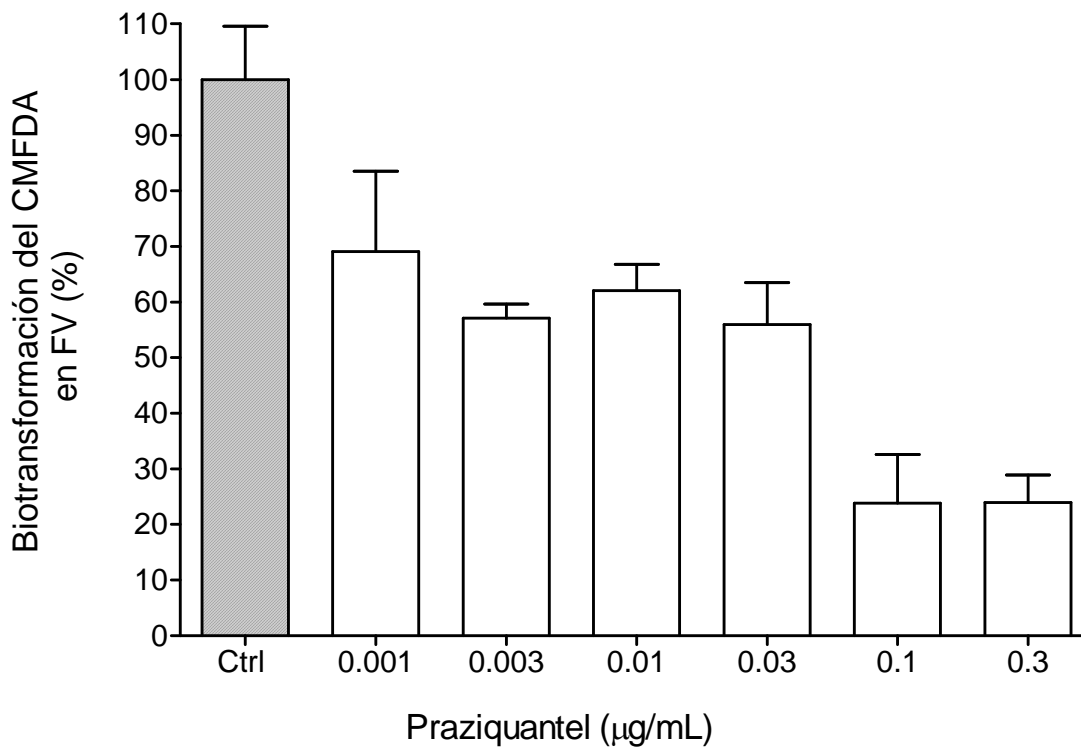


Figura 7. Capacidad de biotransformación del CMFDA en presencia de PZQ. Los cisticercos se cultivaron durante 11 días en ausencia (Ctrl, barra sombreada) y en presencia de diferentes concentraciones de PZQ (0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1 y 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), al término se les incubó en presencia del CMFDA. Luego de la fijación, se obtuvo el FV de los parásitos y se le determinó la fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 498$; $\lambda_{\text{emisión}} = 515$ nm) en un espectrofluorómetro. En el eje de las ordenadas se presenta el porcentaje de la capacidad de biotransformación del CMFDA, mientras que en el eje de las abscisas, se muestran las distintas concentraciones empleadas del PZQ. Los ensayos se realizaron por triplicado y la mitad de los valores de los intervalos de desviación estándar se muestran en cada caso.

V. Discusión y conclusiones.

El presente proyecto de tesis permitió ampliar lo efectuado en la investigación del efecto de derivados del bencimidazol sobre la biotransformación del CMFDA por cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF (García-Vilchis, 2007). Se corroboró que la medición de la fluorescencia del CMFDA es un parámetro cuantitativo eficiente para evaluar el efecto de sustancias antiparasitarias en fases larvarias de ténidos; en este proyecto se evaluó al praziquantel un compuesto estructuralmente diferente a los bencimidazoles y de distinto mecanismo de acción (Dayan, 2003 ; Palomares *et al*, 2006). También, se pudo establecer que la determinación de la fluorescencia por el marcador vital y la evaluación del efecto de las sustancias químicas en los parásitos, es sencilla de llevar a cabo, a diferencia de lo reportado. En donde hay necesidad de observar continuamente el movimiento de los parásitos, su apariencia y su tamaño (Palomares *et al*, 2006) y los cuales son parámetros cualitativos sujetos a la capacidad de percepción de la persona que realiza las observaciones.

Los resultados presentados no sólo mostraron el efecto del PZQ en los parásitos, sino también el cambio en la fluorescencia que sufrieron de acuerdo al tratamiento que recibieron. Mientras que los cisticercos sin tratamiento alguno mostraron una autofluorescencia, ésta no fue lo suficientemente intensa para generar duda que cuando el CMFDA era adicionado a los parásitos, estos la biotransformaban y ella se presentó con una alta intensidad de fluorescencia (Fig. 4). Se encontró, como se había mencionado durante la evaluación del efecto de los BZM (García-Vilchis, 2007), que el plástico de la caja de cultivo presentó autofluorescencia, el cual tampoco fue determinante en la

visualización de la franca fluorescencia emitida por los parásitos incubados en presencia del CMFDA. Por lo consiguiente, se considera que la fluorescencia emitida por la biotransformación del CMFDA no se altera por factores distintos a lo que el metabolismo de los parásitos efectúa sobre el marcador vital. Esto correlaciona con lo establecido al evaluar al CMFDA como marcador vital en la evaluación de fármacos antifúngicos (Balajee *et al*, 2005).

En lo referente al efecto sobre los parásitos por parte del PZQ, es claro que los cambios macroscópicos morfológicos secuenciales se debieron al contacto con las diferentes concentraciones del fármaco durante el mantenimiento en cultivo de los parásitos. Estos cambios se observaron como ya se había publicado al respecto (Palomares *et al*, 2006). Sin embargo, a diferencia de lo que se encontró por efecto con los derivados del BZM (García-Vilchis, 2007), la fluorescencia se mantuvo intensa aún en los parásitos alterados en su morfología por el tratamiento a las más alta concentración usada para el PZQ (Fig. 5). Esta observación resulta interesante porque podría ser una muestra del distinto efecto en el metabolismo del CMFDA que tiene el PZQ en los parásitos, a diferencia de los derivados del BZM, en donde los cisticercos junto con la disminución de su tamaño por el efecto de los derivados, se les observó con menor intensidad de fluorescencia (García-Vilchis, 2007).

Respecto marca fluorescente fuera de los parásitos, esto teóricamente, no debería haber sucedido porque el marcador fluorescente formado debía haberse convertido a un compuesto impermeable que sólo tendría que ser detectado dentro de los parásitos (Haugland, 2005); ante esto dos posibilidades, o una de ellas, podrían estar presentes: 1. Que el CMFDA

haya sido biotransformado hasta el compuesto intermediario pero fluorescente y así haya sido eliminado desde los parásitos. 2. Que el compuesto, fluorescente y conjugado al glutatión, haya salido de los parásitos tratados con el PZQ debido al daño que este fármaco produjo al estar en contacto con los tejidos parasitarios. Sin embargo, estos argumentos tendrán que ser elucidados para definir porque la marca fluorescente se encontró fuera de los parásitos. Este último punto podría ser la explicación mas aproximada de lo que sucedió; en las observaciones (no mostradas) de los parásitos lavados, tanto de controles como de tratados con el PZQ, se encontró que los cisticercos que se incubaron con la mayor concentración del fármaco (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no sólo redujeron su tamaño de manera notoria, sino que aparentemente la marca fluorescente se salió de ellos. Posiblemente, el efecto del PZQ sobre los tejidos parasitarios se dio como una causal de que estos no logran contener al marcador vital biotransformado dentro de los parásitos y se saliera junto con su FV.

En lo referente a la estimación del CE_{50} del PZQ en los cisticercos, en comparación con lo reportado (Palomares *et al*, 2006), bajo las determinaciones de la fluorescencia emitida por el CMFDA biotransformado, se encontró que este sistema de estimación es reproducible y sencillo de llevar a cabo; no hay necesidad de mantener la atención hacia la motilidad de los parásitos e incluso, de atender si se presentaron cambios morfológicos producidos por el tratamiento farmacológico. La estimación de la CE_{50} del PZQ (0.022 $\mu\text{g}/\text{mL}$), con un intervalo de 0.001 a 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mostró que está dentro del intervalo (0.005 a 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$) reportado (Palomares *et al*, 2006) y lo cual resultó semejante a lo estimado para el efecto del ABZ en cisticercos tratados

con el CMFDA (García-Vilchis, 2007). Por estas causas, la determinación del CMFDA biotransformado parece ser una estrategia precisa y sencilla de estimación de la CE_{50} para cualquier fármaco o sustancia con la que se desafíe a los parásitos. Además de lo observado para la CE_{50} y los intervalos indicados, el empleo del CMFDA permitió hacer estimaciones del efecto del PZQ a menores concentraciones de lo reportado por Palomares (2006) y con ello, se muestra que esta estrategia permite la obtención de resultados con un mayor grado de sensibilidad. También, aparentemente, por lo obtenido en este trabajo de tesis y en lo obtenido previamente (García-Vilchis, 2007), el CMFDA biotransformado tiene diferente comportamiento en función del mecanismo de acción de las sustancias químicas.

En el trabajo presentado aquí hubo la necesidad de efectuar mas lavados de los parásitos marcados con la finalidad de evitar que la marca fluorescente aparentemente liberada de los parásitos entorpeciera las mediciones de lo obtenido en el FV de los cisticercos. La diferencia que se encontró en el efecto producido por el PZQ en los cisticercos, en comparación con lo evaluado con el ABZ (García-Vilchis, 2007), parece estar relacionado con la forma en que este fármaco actúa en los parásitos; se sabe que este fármaco produce parálisis espástica en los cisticercos porque reduce su capacidad de movimientos musculares (Dayan, 2003; Day *et al*, 1992), pero ello no necesariamente tendría que estar asociado con alteraciones en las funciones que realiza el sistema protonefridial de los cisticercos. Tal sistema protonefridial, el cual es un sistema encargado de eliminar aquellas sustancias que no le sirven a los cisticercos, aún bajo el tratamiento con el PZQ, podría

seguir funcionando y ello estar relacionado con una biotransformación disminuída del CMFDA.

CONCLUSIONES.

Es posible emplear el método cuantitativo de determinación de la susceptibilidad al estrés químico, aún cuando se utilizan moléculas estructuralmente diferentes a los compuestos derivados del BZM empleados en la estandarización del método.

Según los resultados obtenidos, los valores de CE_{50} que se obtienen experimentalmente con el presente método de cuantificación de fluorescencia ($CE_{50} = 0.022\mu\text{g/mL}$) se encuentran dentro del intervalo en el que se obtienen valores semejantes mediante apreciaciones cualitativas como las obtenidas por Palomares et al (2006).

Debido a que en los presentes estudios fue posible evaluar concentraciones del PZQ tan bajas como $0.001\mu\text{g/mL}$, a diferencia del intervalo evaluado por Palomares et al (2006) que va de 0.005 a $0.04\mu\text{g/mL}$, se puede apreciar que con el presente método de cuantificación es posible detectar daños ocasionados por el PZQ aún a concentraciones mas bajas y lo cual correlaciona con la disminución de la fluorescencia.

A pesar de lo eficiente del método cuantitativo y de lo práctico que resulta para evaluar el efecto de sustancias en los parásitos; hay aspectos de carácter metodológico que necesitan ser mejorados y entre los cuales destacan: Ampliar el número de lavados de los cisticercos recién marcados con el CMFDA previo al proceso de obtención del FV. Esto debido a que la

fluorescencia no específica, que no se elimine mediante los lavados de los parásitos, pudiera tener efecto en las lecturas de medición de la fluorescencia. Por otra parte, en lo relativo al cálculo de la CE_{90} , este valor no fue posible de determinar debido a que los parásitos perdieron una cantidad importante de FV a la concentración más alta utilizada en los ensayos ($0.3\mu\text{g/mL}$). En relación a esta concentración, es de llamar la atención que se mantuvo un 25% de viabilidad de los parásitos y que está asociado al mayor grado de daño producido por el PZQ en los presentes ensayos.

Con los hallazgos presentados en el trabajo de tesis, es necesario reconsiderar las posibles aplicaciones que el CMFDA ofrece para la realización de otros estudios que pudiesen explicar diferentes aspectos importantes, como la liberación de sustancias nocivas para el parásito así como el modo de protección que lleva a cabo el parásito para contrarrestar el daño, producto del estrés químico inducido.

Perspectivas.

Con el presente trabajo de tesis se abren otros aspectos interesantes en el estudio del efecto de sustancias en los parásitos. Ello se debe a que la forma de evaluación del efecto de los fármacos en los cisticercos es simple, cuantitativa y de fácil aplicación.

Hasta el momento se sabe uno de los principales cambios morfológicos que ejerce la mayoría de compuestos antiparasitarios en los cisticercos cuando estos son tratados de manera *in vitro* es la pérdida de FV. Por lo tanto es posible que el parásito lleve a cabo procesos que minimicen el daño producido

por el fármaco durante el tratamiento *in vitro*, mediante el reajuste de su maquinaria enzimática y expulsión de sustancias que el parásito no necesita.

En conjunto con los resultados obtenidos mediante la cuantificación de la fluorescencia, es posible evaluar cambios en la expresión de proteínas de los parásitos en estudio. Por lo consiguiente, es posible evaluar también si los parásitos tratados con los compuestos en estudio liberan sustancias durante los ensayos y lo cual podría ser analizado por estrategias de tipo electroforético y de inmunoelectrotransferencia.

Por otra parte, debido a que el CMFDA es un marcador vital y atraviesa las membranas plasmáticas antes de ser biotransformado, podría ser empleado como un sistema de evaluación de integridad de membranas y que pudiera estar asociado a la forma en que las sustancias ingresen a los parásitos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Ambrosio JR. 2007. Cytoskeletal proteins of parasites as therapeutic agents. In: *Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases*. Research Signpost. Mexico, pp.73-90.

Balajee S, Imhof A, Gribskob JL, Marr KA. 2005. Determination of antifungal drug susceptibilities of *Aspergillus* species by fluorescence-based microplate assay, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 55 (1); pp. 102-105.

Cox F. 2002. History of Human Parasitology, *Clinical Microbiology Reviews*, 5 (4); pp. 595-611.

Day T, Bennett JL, Pax RA. 1992 Praziquantel: The Enigmatic Antiparasitic, *Parasitology Today*. 8 (10); pp. 342-344.

Dayan AD. 2003. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of nonclinical toxicity and pharmacokinetics, *Acta Tropica*. 86 (2-3); pp. 141-159.

Fairlamb AH, Ridley RG, Vial HJ. 2003. Discovery and drug development for tropical diseases: new oportunities, new trends. Drugs againts parasitic diseases: R&D methodologies and issues. *En WHO. Special programme for research and training in Tropical Diseases (TDR)*. pp. 5-7.

Flisser A. 1988. Neurocysticercosis in Mexico, *Parasitology Today*, 4 (5); pp. 131-137.

Freeman RS. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder,1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda) *Canadian Journal of Zoology*. 40. pp. 969-990.

García-Vilchis D. 2007. Determinación del Potencial antihelmíntico de derivados del BZM en cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF, Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM.

Greenberg RM. 2005. Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action?, *International Journal for Parasitology*. 35 (1); pp. 1-9.

Harder A, Goossens J, Andrews P. 1988. Influence of Praziquantel and Ca^{2+} on the bilayer – isotropic – hexagonal transition of model membranes. *Molecular Biochemistry Parasitology*. 29 (1); pp. 55-59.

Haugland RP. 2005. "Handbook of fluorescent probes and research products" *Molecular Probes*.

Jung H, Cárdenas G, Sciutto E, Fleury A. 2008. Medical treatment for neurocysticercosis: Drugs, indications and perspectives, *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 8 (5); pp. 424-433.

Kurtz J, Ineke TV, Christen M. 2002. Fluorescent vital labeling to track cestodes in a copepod intermediated host. *Experimental Parasitology*. 100. pp. 36-43.

Lesney MS. 2004. Assaying ADMET, *Modern Drug Discovery*. 7 (1); pp. 30-34.

Meister A. 1988. Glutathione metabolism and its selective modification, *The Journal of Biological Chemistry*. 263 (33); pp. 17205-17208.

Méndez C, Hernández JA. 2008. Desarrollo de nuevos fármacos en parasitología. En *Parasitología Médica*, 2ª Edición, Mc Graw-Hill. México. pp 267-277.

Mendoza N, Velasco MA, De la Fuente M. 2008. Farmacometría. En: *Farmacología Médica*. Editorial Médica Panamericana: UNAM, Facultad de Medicina. México, pp 102-110.

Palomares F, Palencia G, Perez R, González-Esquivel D, Castro N, Jung Cook H. 2004. *In vitro* Effects of Albendazole Sulfoxide and Praziquantel against *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* Cysts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48 (6); pp 2302-2304.

Palomares F, Palencia G, Ambrosio JR, Ortiz A, Jung-Cook H. 2006. Evaluation of the efficacy of the albendazole sulphoxide and praziquantel combination on *Taenia crassiceps* cysts: *in vitro* studies, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 57 (3); pp. 482-488.

Pawlowski ZS. 2006. Role of chemotherapy of taeniasis in prevention of neurocysticercosis, *Parasitology International*. 55; S105-S109.

Revah, PF. 2002. De 10^{40} à 10 molécules. *Science & Vie* 218; pp. 18-26.

Smith JK, Esch GW, Kuhn RE. 1972. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda)-1, *International Journal for Parasitology*. 2, pp 261-263.

Willms K, Sotelo J. 2001. Cestodes. In: Principles and Practice of Clinical Parasitology. John Wiley & Sons Ltd. pp. 613 – 633.

Wolstenholme JA, Fairweather I, Prichard R, Samson-Himmelstjerna G, Sangster NC. 2004. Drug resistance in veterinary helminths, *TRENDS in Parasitology*. 20 (10); pp. 469-476.