



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

“Exploración *in vitro* de la permeabilidad del
tejido de los cisticercos de *Taenia crassiceps*
cepa ORF frente a dos derivados
bencimidazólicos”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ARIADNA JULIETA GARIBAY RAMÍREZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS
2010**



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:	Dr. Guillermo Salgado Maldonado
Vocal:	Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández
Secretario:	Dr. Francisco Hernández Luis
Suplente:	Dra. Patricia Guevara Fefer
Suplente:	Dr. Luis Felipe Jiménez García

Director de tesis:	Dr. Francisco Hernández Luis
Con la asesoría:	Dr. Javier R. Ambrosio Hernández
Supervisión técnica:	Biol. Olivia A. Reynoso Ducoing

Este proyecto se llevó a cabo con la colaboración de dos laboratorios de la Universidad Nacional Autónoma de México, el primero del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina del Dr. Javier Ambrosio y el segundo del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química del Dr. Francisco Hernández.

”La vida es bella a pesar de tener espinas”

A mi abuelita, por su fortaleza,
quien me enseñó a nunca rendirme.

A mis hijos, mi principal fuente de inspiración.
A mi hermosa familia Guerrero Garibay porque
son mi razón de lucha y de salir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la mejor etapa escolar de mi vida; fue toda una maravillosa experiencia.

En segundo lugar quisiera agradecer al Dr. Francisco Hernández Luis, por su gran profesionalismo e incondicional guía a través de todo este proceso, sin sus conocimientos, paciencia y gran apoyo, el desarrollo de éste trabajo no se habría concretado.

Asimismo al Dr. Javier R. Ambrosio Hernández y a la Biol. Olivia A. Reynoso Ducoing, quienes están a cargo del taller “Biología del cisticerco en parásitos” de la Facultad de Ciencias, ejecutado en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM; por abrirme las puertas de su laboratorio y apoyarme durante la realización de este proyecto.

A el Dr. Pedro García Barrera y a la M. en C. Rosa Ma. Guevara Fefer, por su apoyo durante el proceso de titulación; así como al jurado de mi examen profesional, por sus valiosos comentarios.

Al apoyo financiero de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico en el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA):

Proyecto PAPIIT (IN203900) “Componente del citoesqueleto de *Taenia solium*; su caracterización molecular, su dinámica de distribución y su interacción en los parásitos”. En el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina, (agosto 2002 a julio 2003).

Proyecto PAPIIT (IN203101-3) “Evaluación de bencimidazoles contra *Tripanosoma cruzi* y preparación de sus derivados bioreversibles (profármacos) para optimizar su actividad contra *Giardia lamblia*”. En la Facultad de Química, (julio 2003 a abril 2004).

Merece también de toda mi gratitud a mis amigos que me apoyaron e impulsaron para continuar durante todo el camino de mi carrera: el Dr. José A. Barrios Pérez, la M. en C. Tania Garcíapiña Ríos, al Profesor Eduardo Roman Morales y a la Lic. Adriana Machuca Barbosa.

Finalmente lo más importante: Agradecer profundamente a mi esposo Luis I. Guerrero Ruiz por animarme a no desistir, por su eterno apoyo, comprensión, paciencia y gran amor. Quien ha sido el motivo de mi felicidad.

“Exploración *in vitro* de la permeabilidad del tejido de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF frente a dos derivados bencimidazólicos”

CONTENIDO	página
INDICE DE GRÁFICAS	iv
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Cisticercosis	3
2.1.2 Cuadro clínico	4
2.1.3 Tratamiento	4
2.1.3.1 Diferencias entre Prazicuantel y Albendazol	6
2.1.4 Distribución de cisticercosis	7
2.1.5 Complicaciones del uso de <i>T. solium</i> a nivel laboratorio	7
2.2 <i>Taenia crassiceps</i>	8
2.2.1 Ciclo de vida de <i>T. crassiceps</i>	8
2.2.2 Modelo murino	9
2.2.3 Tejido de los cisticercos de <i>T. crassiceps</i> cepa ORF	9
2.3 Fármacos antihelmínticos (Bencimidazol-2-carbamato de metilo)..	11
2.3.1 Albendazol	13
2.3.2 Nuevo derivado BZD 2-(trifluorometil) bencimidazol	15
2.3.3 Transporte de los fármacos	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	20
5.1 Objetivo general	20
5.2 Objetivos específicos	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1 Diagrama de flujo	22

CONTENIDO	página
6.2 Procedimientos experimentales	24
6.2.1 Inoculación de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF.....	24
6.2.2 Obtención de cisticercos cepa ORF	24
6.2.3 Cultivo de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> cepa ORF con los BZD	25
6.2.4 Recuperación del tejido y fluido vesicular	26
6.2.5 Análisis de las muestras por HPLC	27
6.2.5.1 Extracción de los BZD	27
6.2.5.2 Análisis HPLC	28
6.2.5.3 Tratamiento con urea	29
6.3 Análisis estadísticos	30
6.3.1 Prueba de hipótesis X^2	30
6.3.2 Análisis de varianza (ANOVA)	30
7. RESULTADOS	32
7.1 Obtención de cisticercos cepa ORF	32
7.2 Recuperación de las muestras	33
7.3 Estandarización de la técnica cuantitativa	33
7.3.1 Curva patrón de los BZD	34
7.3.2 Estandarización del método cuantitativo	35
7.4 Análisis y comparación de las muestras	37
7.4.1 Cinética de los compuestos	37
7.4.2 Comparación de los compuestos en las distintas condiciones de incubación	39
7.4.3 Comparación de los BZD en las muestras	44
7.4.4 Comparación de los BZD en el tejido obtenidos a partir de dos técnicas de extracción	48
7.5 Análisis estadísticos	53
7.5.1 Prueba de hipótesis X^2	53

CONTENIDO	página
7.5.2 Análisis de varianza (ANOVA)	54
7.6 Diferencia morfológica de los cisticercos	57
8. CONCLUSIONES	61
8.1 Perspectivas	63
Anexo I. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	65
A. Buffer de fosfatos 1% (PBS-1X)	65
B. Medio de cultivo (RPMI-1640)	66
C. Preparación de los BZD	66
D. Estándar interno (MBZ)	67
Anexo II. GRÁFICAS DEL HPLC	71
A. Albendazol	71
B. Sulfóxido de Albendazol	73
C. Mebendazol	75
D. GNV-1	77
BIBLIOGRAFÍA	81

INDICE DE GRÁFICAS	página
Gráfica 1. Curva patrón de los BZD	34
Gráfica 2. Cinética de ABZ en medio de cultivo	37
Gráfica 3. Cinética de GNV-1 en medio de cultivo	38
Gráfica 4. Compuestos a 25 μ M en RPMI	39
Gráfica 5. Compuestos a 25 μ M en tejido	40
Gráfica 6. Compuestos a 25 μ M en FV	41
Gráfica 7. Compuestos a 50 μ M en RPMI	41
Gráfica 8. Compuestos a 50 μ M en tejido	42
Gráfica 9. Compuestos a 50 μ M en FV	43
Gráfica 10. ABZ a 25 μ M presente en las tres muestras	44
Gráfica 11. GNV-1 a 25 μ M presente en las tres muestras	45
Gráfica 12. ABZ a 50 μ M presente en las tres muestras	46
Gráfica 13. GNV-1 a 50 μ M presente en las tres muestras	47
Gráfica 14. ABZ a 25 μ M en tejido con y sin urea y la suma de ambos	49
Gráfica 15. ABZ a 50 μ M en tejido con y sin urea y la suma de ambos	50
Gráfica 16. GNV-1 a 25 μ M en tejido con y sin urea y la suma de ambos	51
Gráfica 17. GNV-1 a 25 μ M en tejido con y sin urea y la suma de ambos	51
Gráfica 18. Espectro UV de ABZ	71
Gráfica 19. ABZ con tiempo de retención de 6.63 min	72
Gráfica 20. ABZ 50 μ M en 6.63 min y MBZ 10 μ M en 7.70 min	72
Gráfica 21. ABZ 25 μ M y MBZ 10 μ M en 7.70 min	73
Gráfica 22. Espectro UV de ABZSO	74
Gráfica 23. ABZSO con tiempo de retención 6.38 min	74
Gráfica 24. Espectro UV MBZ 10 μ M (columna C 18)	75

INDICE DE GRÁFICAS

	página
Gráfica 25. Espectro UV MBZ 10 μ M (columna C 8)	76
Gráfica 26. MBZ 10 μ M en un tiempo de retención 4.17 minutos (columna C 8)	76
Gráfica 27. Espectro UV del GNV-1	77
Gráfica 28. GNV1 con tiempo de retención de 5.80 min	78
Gráfica 29. GNV-1 50 μ M en 5.80 min y MBZ 10 μ M en 4.17 min	78
Gráfica 30. GNV-1 25 μ M & MBZ 10 μ M en 4.17 min	79

INDICE DE TABLAS

	página
Tabla 1. Principales fármacos antihelmínticos para el tratamiento de la cisticercosis	5
Tabla 2. Gradiente de la fase móvil	28
Tabla 3. Concentración de los BZD analizados en el HPLC	33
Tabla 4. Absorbencia y tiempo de retención de los BZD	35
Tabla 5. Prueba de X ² ABZ y GNV-1	53
Tabla 6. Prueba de X ² de las tres muestras	54
Tabla 7. ANOVA bilateral de las muestras en los tiempos de incubación	55
Tabla 8. ANOVA bilateral de 50 y 25 µM en cada tiempo de incubación	56
Tabla 9. Imágenes de cisticercos en distintas condiciones de incubación	58
Tabla 10. Compuestos del RPMI-1640	68

INDICE DE FIGURAS

página

Figura 1. Corte transversal del tegumento y pared del cuerpo de cestodos	10
Figura 2. Estructura general de un bencimidazol-2-carbamato de metilo	12
Figura 3. Estructura de Albendazol	13
Figura 4. Estructura de GNV-1	15
Figura 5. Ratón cepa BALB/c, con 5 meses de infección, con cisticercos de <i>T. crassiceps</i> ORF	32
Figura 6. Cisticercos control de <i>T. crassiceps</i> ORF con una longitud de 0.5 a 1 mm	57

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

○ Acetonitrilo	ACN
○ Albendazol	ABZ
○ Aminoácidos	a.a
○ Amortiguador de fosfatos	PBS
○ Bencimidazol	BZD
○ Cloruro de metilo	ClCH ₂
○ Coeficiente de partición octanol-agua	log P
○ Cromatografía líquida de alta resolución (High performance liquid chromatography)	HPLC
○ Dimetilsulfoxido	DMSO
○ Etanol	C ₂ H ₅ OH
○ Fluido vesicular	FV
○ Grupo trifluorometilo	CF ₃
○ Mebendazol	MBZ
○ Medio de cultivo	RPMI
○ Mililitros	mL
○ Neurocisticercosis	NC
○ Peso molecular	PM
○ Punto de fusión	pf
○ Sistema nervioso central	SNC
○ Sulfoxido de albendazol	ABZSO
○ <i>Taenia crassiceps</i>	<i>T. crassiceps</i>
○ <i>Taenia solium</i>	<i>T. solium</i>
○ Ultravioleta	UV

1. INTRODUCCIÓN

La neurocisticercosis (NC) es un padecimiento infeccioso que constituye un problema de salud pública en nuestro país. Esta enfermedad es ocasionada por los cisticercos de *Taenia solium*. Es una enfermedad grave para el humano porque los parásitos se hospedan en el sistema nervioso central (SNC) provocando daños irreversibles que pueden ocasionar la muerte.

Para el tratamiento de esta enfermedad actualmente se disponen de dos fármacos: Albendazol y Praziquantel. Ambas sustancias presentan problemas de eficacia terapéutica por su comportamiento farmacocinético.

Con el propósito de contar con nuevas moléculas antiparasitarias contra el cisticerco de *T. solium* sin la problemática antes mencionada, nuestro grupo de investigación sintetizó el compuesto GNV-1, el cual posee las mismas características estructurales que el Albendazol; excepto que, en la posición 2 del núcleo del bencimidazol presenta un trifluorometilo, en lugar del grupo carbamato de metilo.

Con la intención de estudiar el comportamiento de esta sustancia frente a los cisticercos, para incrementar y fortalecer nuestro conocimiento sobre las características estructurales que nos lleven al desarrollo de nuevos cestocidas, el objetivo de este proyecto fue la exploración del traslado de GNV-1 y de ABZ frente al cultivo *in vitro* con cisticercos de *T. crassiceps* (organismo modelo).

Este trabajo de tesis está dirigido a las personas que estén interesadas en el tema, a quienes pretendan reforzar sus conocimientos y a quienes deseen continuar con esta línea de investigación.

2. ANTECEDENTES

Durante la evolución de la vida, han existido interacciones entre todos los seres vivos y el medio que les rodea. Una de estas interacciones es la parasitosis, en donde los parásitos se benefician y los hospederos se afectan, puesto que los primeros se alimentan y sobreviven a costa de los segundos (Smith y Smith, 2007). El humano no es la excepción a esto, y frecuentemente es el hospedero de una inmensa variedad de parásitos; los cuales le producen diversas enfermedades, siendo una de éstas, la cisticercosis.

2.1 Cisticercosis

La cisticercosis es una enfermedad causada por *Taenia solium*. Parásito que pertenece al Phylum Plathelminthos, Clase Céstoda, Subclase Eucestoda, Orden Cylophyllidea, Familia Taenidae, Género *Taenia*, Especie *solium* (Jiménez, *et al.* 2001).

La cisticercosis, es una enfermedad causada por la ingestión de huevos viables del parásito adulto, los cuales se obtienen principalmente a partir de alimentos contaminados, o por contacto con personas parasitadas por teniasis. Los huevos eclosionan a la fase larvaria denominada cisticercos o metacéstodos; con una longitud de 8 a 10 mm (Ruppert y Barnes, 1996; Willms y Sotelo, 2001). Los parásitos se localizan frecuentemente en los ojos, tejido graso subcutáneo, corazón y sistema nervioso central¹; en este último lugar la enfermedad es llamada neurocisticercosis (NC). A diferencia del cerdo, es poco frecuente que en el hombre

¹ Los órganos que son parte del SNC son: el cerebro, cerebelo, tallo cerebral y medula espinal.

se presente cisticercosis en el músculo estriado. La cisticercosis extraneurológica se presenta más en África y Asia, mientras que las neurocisticercosis son abundantes en América Latina. (Willms y Sotelo 2001, Larralde, *et al*; 2006).

2.1.2 Cuadro clínico

La NC es una enfermedad de evolución crónica, en donde los parásitos pueden estar presentes por largo periodo de tiempo sin que aparezca una respuesta efectiva. Los síntomas dependen del número de quistes, la localización, el estado evolutivo del parásito y la respuesta inflamatoria que manifieste (Willms y Sotelo; 2001).

Los trastornos causados por la NC son: inflamación del cerebro, cefaleas, epilepsia, convulsiones, trastornos mentales, movimientos motores anormales como desequilibrio, ceguera, hidrocefalia y por último la muerte (Flisser y Malagón, 1989; Jiménez, *et al.* 2001; Willms, Sotelo, 2001).

2.1.3 Tratamiento

Se han utilizado diversos tratamientos para la NC; tales como fármacos antihelmínticos, anticonvulsivos, antiinflamatorios y medios quirúrgicos. En la actualidad la investigación para la elaboración de una vacuna contra la NC, puede ser la clave para evitar el daño severo que el cisticerco ocasiona al huésped (Flisser y Malagón, 1989; Larralde, *et al*; 2006). La Tabla 1 muestra los fármacos antihelmínticos que se emplean en el tratamiento de la NC, los efectos que producen a los cisticercos y su dosificación en el hombre adulto (Flisser, Malagón; 1989. Sharma, 1994 y Willms, Sotelo; 2001).

Tabla 1. Principales fármacos antihelmínticos para el tratamiento de la cisticercosis

FÁRMACO	FUNCIÓN	DOSIFICACIÓN*
Prazicuantel (Derivado pirazinoisoquinolinico)	El parénquima del cisticerco elimina un 70%. Causa daño en el tegumento (se desconoce su mecanismo molecular), lo que activa los mecanismos de defensa del huésped, por consiguiente culmina en la destrucción de los parásitos. Existe una disminución en la inflamación del cerebro. Está contraindicado en la cisticercosis ocular (Hardman, <i>et al.</i> 2001).	Se administran dosis de 75mg/kg/día, por 2 semanas.
Albendazol (Derivado bencimidazólico)	El parénquima y el sistema microtubular del cisticerco se destruyen en un 80% y se elimina la polimerización tubular. Es efectivo en la cisticercosis ocular, ventricular y cerebral.	Se administran dosis de 15mg/kg/día, cada 12 horas, por 7 a 8 días.

* (Sotelo y Jung, 1998).

Como se observa en la Tabla 1, el Prazicuantel se administra 75 mg/kg/día (dividido en 3 dosis); sin embargo, el Albendazol es de 15 mg/kg/día (dividido en 2 dosis); se considera que el consumo es mayor de Prazicuantel que de Albendazol para la eliminación de esta enfermedad. Sin embargo, la duración del tratamiento es variable dependiendo del cuadro clínico inicial y del número o sitios en que se encuentran los quistes (Sotelo y Jung, 1998).

2.1.3.1 Diferencias entre Prazicuantel y Albendazol

El Prazicuantel pertenece al grupo isoquinolina. Se absorbe fácilmente por el tracto gastrointestinal, de manera que en una o dos horas llega a su concentración máxima en el plasma del ser humano. Su farmacocinética tiene relación con la dosis, sin embargo sus metabolitos no son activos contra la infección, dando como resultado una eficacia menor para la NC. Por su parte el Albendazol (derivado del bencimidazol) su absorción es incompleta e irregular ya que es poco soluble, dando como resultado cifras bajas del fármaco en el plasma sin reflejar la dosis ingerida. Es metabolizado rápidamente por el hígado convirtiéndose en Sulfóxido de albendazol, el cual también tiene una actividad antihelmíntica; por lo tanto se considera más eficaz que el Prazicuantel. (Sotelo y Jung, 1998; Hardman, *et al.* 2001).

Las reacciones adversas de estos dos compuestos son: El Prazicuantel en la NC durante las reacciones inflamatorias puede producir meningismo, convulsiones, cambios psíquicos, adormecimiento, vértigo, náusea, anorexia, dolor gastrointestinal y diarrea. El Albendazol en los primeros días de administración, puede provocar vómito, dolor en vías gastrointestinales, fiebre, fatiga y aumentar los efectos ocasionados por la inflamación cerebral. (Sotelo y Jung, 1998; Hardman, *et al.* 2001). Sin embargo, pese a sus efectos adversos son fármacos de uso continuo para la lucha contra la NC.

2.1.4 Distribución de cisticercosis

La cisticercosis llegó a México hace aproximadamente 500 años (Larralde., *et al*, 2006). Se encuentra en poblaciones rurales de las cuales, logra esparcirse a las comunidades urbanas con deficientes condiciones sanitarias, debido a la emigración (Willms y Sotelo; 2001).

En México es considerada como una enfermedad endémica con 1.9 % para NC (Flisser y Malagón, 1989). Su distribución y prevalencia depende principalmente de las medidas tomadas por el hombre en el manejo y destino de las heces humanas, el tratamiento de las aguas residuales, el control de la carne de cerdo, las costumbres culturales y el procedimiento para identificar y tratar a los portadores del parásito adulto.

2.1.5 Complicaciones del uso de *T. solium* a nivel laboratorio

Lo complejo que resulta obtener cerdos infectados con cisticercos de *T. solium*, se debe esperar meses en algunos casos, para la obtención de cisticercos frescos y en buen estado. Otras desventajas son que, en cuanto se sacrifica al cerdo, los metacéstodos deben de extraerse inmediatamente, puesto que la carne se estropea y disminuye la viabilidad de los cisticercos; además la complejidad de mantenerlos en condiciones *in vitro*.

2.2 *Taenia crassiceps*

Taenia crassiceps es un plathelminto bilateral endoparásito. Pertenece a la Subclase Eucestoda que se caracteriza por la presencia de escolex, es acelomado, tiene ausente el sistema circulatorio y carece de aparato digestivo; su cuerpo está cubierto por un tegumento sincitial con modificaciones específicas asociadas con la absorción de nutrientes. Los sistemas musculares de la *Taenia* constan de capas longitudinales y circulares (Ruppert y Barnes, 1996).

De acuerdo a lo anterior, *T. crassiceps* es una especie muy similar morfofisiológicamente a *T. solium*. La diferencia de estas dos radica principalmente en su tamaño y en su ciclo de vida.

2.2.1 Ciclo de vida de *T. crassiceps*

En condiciones naturales, el parásito adulto de *T. crassiceps* es frecuente en el intestino del Zorro Rojo de Europa y el Norte de América. El zorro (hospedero definitivo) al defecar, desecha los proglótidos maduros del parásito adulto, con una inmensa cantidad de huevos viables, los cuales no maduran hasta ser ingeridos por pequeños roedores (Freeman, 1962 y Toledo, *et al*, 1997).

Los huevos al introducirse en el cuerpo del ratón (hospedero secundario), penetran el sitio parental (extraintestinal) y eclosionan en larvas con una longitud de 0.5 a 1 mm, tienen la capacidad de reproducirse asexualmente. El zorro al depredar a los roedores, logra ser parasitado por el metacéstodo, que llega al intestino y se transforma en adulto (Freeman, 1962; Larry y Jonaux, 1996; Toledo, 1997).

2.2.2 Modelo murino

Ante la complejidad de experimentar con los cisticercos de *T. solium*, Dorais y Esch, fueron quienes diseñaron el modelo murino a partir de cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF (Jiménez, 2006), se obtuvo por medio de mutaciones genéticas (Schiller, 1973); en el cuál se acortó el tiempo del desarrollo biológico del parásito con un solo hospedero en su ciclo de vida (el roedor). Para poder mantener esta cepa por selección artificial se debe realizar inoculación intraperitoneal al ratón (Kroeze y Freeman, 1982; Threadgold y Dunn, 1983).

Los cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF son el modelo ideal de estudio para laboratorio, debido a su parecido con los metacéstodo de *T. solium*. Además, los cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF tiene la particularidad de no ser infectivo al hospedero definitivo (Freeman, 1962; Schiller, 1973; Toledo, *et al.*, 1997). Por el diseño de sus características se convirtió en una cepa fácil y rápida de adquirir, en el manejo de laboratorio se pueden hacer grupos de estudio en diferentes condiciones en presencia de varios fármacos.

2.2.3 Tejido de los cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF

El tegumento sincitial continuo, es un epitelio de revestimiento que tiene como funciones: absorción de nutrientes, protección, excreción, regulación e interferencia entre el organismo y el medio externo; cubre las capas consecutivas de musculatura circular, longitudinal y diagonal. La membrana plasmática externa del tejido forma salientes llamados microtricos o microvellosidades (Hustead y

Williams, 1977). En el interior de los cisticercos está contenido el fluido vesicular (FV).

El tegumento es polimórfico y contiene organelos en el citoplasma como son: núcleos, mitocondrias, retículos endoplasmáticos, aparatos de Golgi y ribosomas. En el complejo de Golgi están presentes, vacuolas con cuerpos esféricos de distintos tamaños y materiales granulares que parecen ser cuerpos residuales (Hustead y Williams, 1977). (Figura 1)

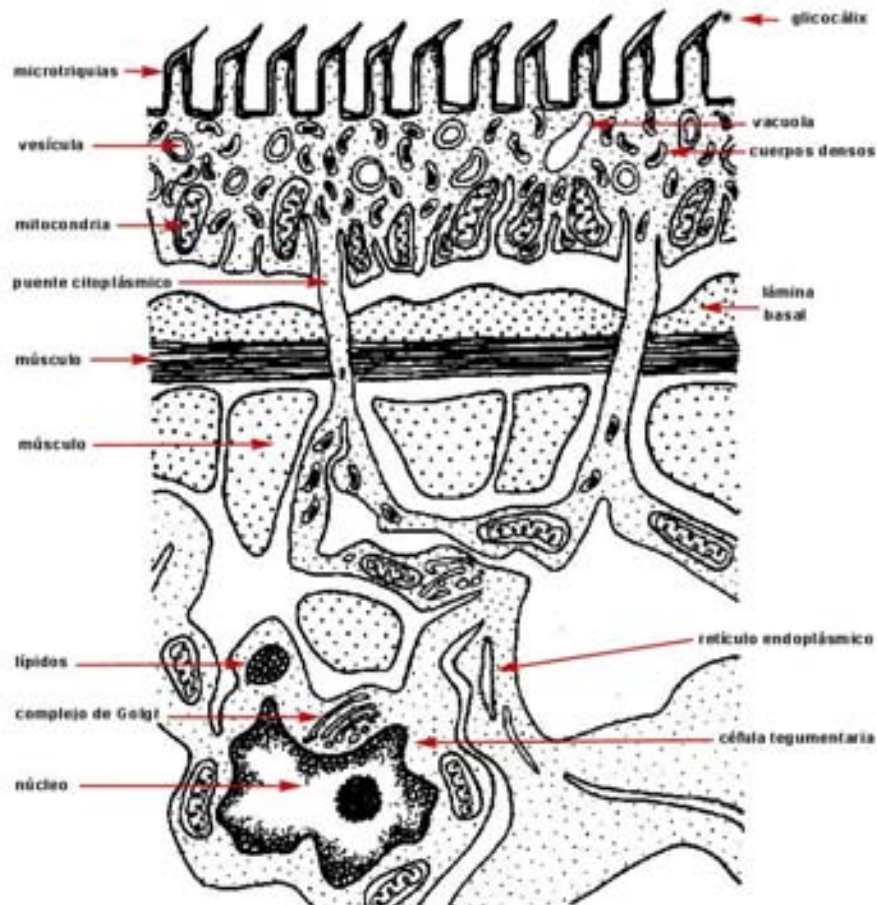


Figura 1. Corte transversal del tegumento y pared del cuerpo de cestodos. Tomado de Biodidac, Universidad de Ottawa (Ruppert y Barnes, 1996)

Dado que el tegumento presenta varias estructuras orgánicas que juegan un papel importante en la fisiología del parásito, es altamente selectivo en el transporte de sustancias, desempeñando también intercambio gaseoso. Sirve de barrera para las sustancias dañinas al cisticerco y lo protege de las enzimas digestivas del hospedero (Ruppert y Barnes, 1996).

El tejido es permeable a los nutrientes como aminoácidos y glucosa. Los mecanismos de transporte de moléculas pequeñas se dan por difusión pasiva, pinocitosis y transporte activo (Larry y Jonaux, 1996; Ruppert y Barnes, 1996; Husted y Williams, 1977).

2.3 Fármacos antihelmínticos (Bencimidazol-2-carbamato de metilo)

Los derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo (BZD) son compuestos que se usan con frecuencia en la eliminación de la parasitosis gastrointestinal por helmintos, son de amplio espectro y baja toxicidad al hospedero (Horton, 1990; Townsend y Wise, 1990 y Valdez, *et al.*, 2002).

El principal modo de acción de los BZD, se debe a su afinidad específica por las β -tubulinas y proteínas de transporte que permiten el paso de los componentes al receptor celular (sitio blanco) del parásito (Mottier, *et al.*, 2003). Si se mantiene al parásito en presencia de BZD un tiempo suficiente su acción inhibe la polimerización de la tubulina de los microtúbulos, así como el metabolismo y el transporte de la glucosa; dando como resultado la muerte del parásito (Mottier, *et al.*, 2000; Sharma, 1994). La unión específica a las β -tubulinas de los parásitos se presenta a concentraciones pequeñas en comparación a las cantidades que se necesitan para unirse a proteínas de mamíferos (Hardman, *et al.*, 2001).

La acción de los BZD hacia la tubulina se debe, a la presencia del hidrógeno en la posición 1 y al grupo carbamato de metilo localizado en la posición 2 (Navarrete 2004; Valdez, *et al.*, 2002). (Figura 2)

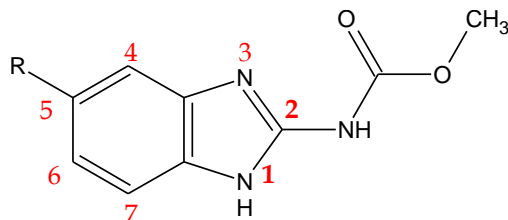


Figura 2. Estructura general de un bencimidazol-2-carbamato de metilo

“Los BZD poseen hidrosolubilidad limitada y por consecuencia, pequeñas diferencias en la solubilidad tienden a ocasionar un efecto mayor en la absorción” (Hardman, *et al.* 2001). Los BZD son transportados por difusión pasiva, atraviesan la barrera lipídica del tegumento, por lo cual su característica de liposolubilidad es importante. Se sabe que esta propiedad fisicoquímica tiene una directa relación con los efectos clínicos (Prieto, *et al.*, 1991).

Para el tratamiento de helmintos se utilizan tres compuestos bencimidazólicos principalmente: Albendazol (ABZ), Flubendazol (FBZ) y Mebendazol (MBZ). Estos BZD presentan una absorción limitada y son metabolizados rápidamente (Valdez, *et al.*, 2002). Este trabajo utiliza al Albendazol como fármaco de para combatir la NC.

2.3.1. Albendazol

El 5-(Propiltio)-1*H*-bencimidazol-2-il carbamato de metilo (Figura 3), llamado comúnmente Albendazol (ABZ), es un derivado de los BZD, antihelmíntico de amplio espectro, el cual se administra por vía oral (Tabla 1) y es tolerado por el hombre (Sharma, 1994).

Sus propiedades fisicoquímicas son: peso molecular (PM) 265.33 g/mol, punto de fusión (pf) 208-210 °C y coeficiente de partición octanol-agua (log P) 3.01 ± 0.86 . (Navarrete, 2004)

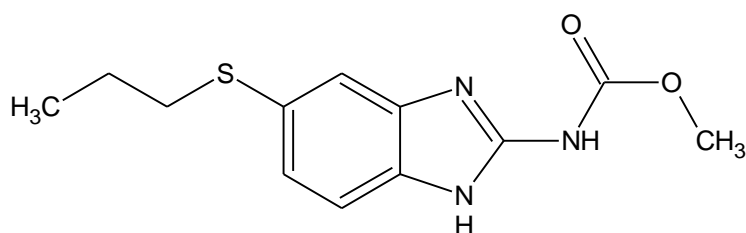


Figura 3. Estructura de Albendazol

La absorción de Albendazol en el tracto intestinal está limitada y es variable e irregular por su baja solubilidad acuosa; se administran dosis² de 15 mg/kg/día, cada 12 horas, por 7 a 8 días (Sotelo y Jung, 1998). La mayor concentración del compuesto se alcanza en el estómago por la acidez (pH 1-3) que allí se presenta. El compuesto gana protones al estar en contacto con un pH ácido.

² Si bien la duración del tratamiento ha variado con arreglo al cuadro clínico inicial y al número y sitio en que se encuentra el quiste (Hardman, *et al.*, 2001).

Sin embargo, al pasar al intestino delgado los protones obtenidos en el estómago se pierden; debido a que el intestino delgado tiene un pH casi neutro. Al sufrir este cambio se vuelve poco soluble en el medio acuoso presente en el intestino; por lo tanto, su paso por las membranas es mínimo. No se detecta el compuesto en el plasma porque es metabolizado con rapidez por el hígado, formando así el Sulfóxido de albendazol. Los rangos de concentración en el plasma del hombre son de 0.5-4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. La absorción de ABZ en el estómago y en el intestino es por medio de difusión pasiva (Jung, *et al.*, 1998; Prieto, *et al.*, 1991; Redondo, *et al.*, 1998).

La acción principal del ABZ está dada por la inhibición de la polimerización de la β -tubulina, provocando la alteración de los microtúbulos del citoplasma del tejido de las larvas y la fase adulta de los helmintos. Inhibe la captura del glucógeno y la enzima fumarato reductasa. Se ha demostrado que el ABZ tiene afinidad a la albúmina y a glucoproteínas con un porcentaje de 82% y 34%, respectivamente (Jung, *et al.*, 1998; Sotelo y Jung, 1998; Navarrete, 2004). Por otra parte el metabolito Sulfóxido de albendazol también posee actividad antihelmíntica, el cual alcanza concentraciones plasmáticas³ de 300 ng/mL ligándose aproximadamente a un 70% a las proteínas plasmáticas con una vida media es de 8 a 9 horas. Como consecuencia de lo anterior, el fármaco al inicio inmoviliza al parásito y posteriormente es eliminado. La eficacia del ABZ depende de la concentración y el tiempo de exposición del parásito al fármaco.

³ La concentración plasmática del Sulfóxido de albendazol presenta grandes variaciones de un individuo a otro.

2.3.2 Nuevo derivado BZD 2-(trifluorometil) bencimidazol

Generalmente los benzimidazol-2-carbamato de metilo tienen una solubilidad limitada en el agua; sin embargo, se han hecho investigaciones para mejorar esta propiedad y seguir usando los BZD en infecciones parasitarias.

Los BZD han logrado ser antihelmínticos gracias a las combinaciones y sustituciones de las posiciones 2 y 5 (Toledo, *et al.* 1997). De ésta forma, el grupo de investigación⁴ diseñó y sintetizó el compuesto denominado GNV-1. El diseño tomó como base la estructura de Albendazol, reemplazando el grupo carbamato de metilo por un grupo trifluorometilo (CF₃). Las propiedades fisicoquímicas de GNV-1 son: PM=260.280, pf = 102-105 °C y log P = 3.95 ± 0.7 (Navarrete 2004). (Figura 4)

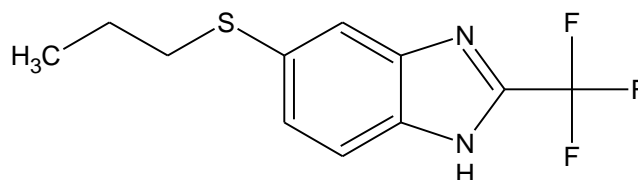


Figura 4. Estructura de GNV-1 (5-(Propiltio)-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol)

La razón por la cual se sustituyó la posición 2 del BZD, es debido a que el grupo carbamato del compuesto, le proporciona su poca solubilidad (Sharma, 1994). Sin embargo el grupo CF₃, induce cambios en las propiedades fisicoquímicas del bencimidazol, al incrementar la liposolubilidad y solubilidad.

2.3.3 Transporte de los fármacos

Como se mencionó anteriormente, los fármacos se mueven de un lado a otro en la membrana celular por difusión pasiva o por procesos de transportes especializados.

La conducta del transporte difusión pasiva es por barreras lipídicas localizadas en las membranas celulares. Las moléculas de los fármacos atraviesan las regiones lipídicas u otras alternativas como poros o canales, sin requerir energía; esto es si las moléculas son suficientemente pequeñas (Mottier, *et al.*, 2003).

Por esta razón, el transporte de los compuestos a través del tejido por difusión pasiva depende, del gradiente de concentración a ambos lados de la membrana, relación de pH/pK, solubilidad acuosa, peso molecular y reparto de lípido-agua de las moléculas; es decir, de la liposolubilidad del fármaco (Mottier, *et al.*, 2003).

⁴ El grupo de investigación del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La neurocisticercosis es una de las enfermedades humanas clínicamente importante por las graves consecuencias de salud que implica, se combate principalmente con Albendazol, que es un compuesto con gran eficacia antihelmíntica y es bien tolerado por el hombre; sin embargo, tiene poca solubilidad en agua, lo cual evita alcanzar niveles de concentración plasmática adecuados para mostrar actividad antiparasitaria sistémica. Por lo anterior, se diseñó un nuevo compuesto bencimidazólico llamado GNV-1, que posee las mismas características estructurales que el ABZ, excepto la posición dos del núcleo BZD, se reemplazó el grupo metilo por trifluorometilo. Ambos derivados BZD se utilizaron para este proyecto surgiendo la siguiente pregunta: ¿Los compuestos BZD logran atravesar el tejido de los cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF de forma similar o diferente?

4. HIPÓTESIS

Si el Albendazol y GNV-1 difieren en el sustituyente (posición 2) de su núcleo bencimidazólico, entonces la permeación de estos compuestos será distinta a través del tejido de las larvas de *Taenia crassiceps* cepa ORF, independientemente de la concentración en que se incuben los BZD con los cisticercos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Explorar el comportamiento del traslado de los derivados BZD (ABZ y GNV-1) durante el cultivo *in vitro* con los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

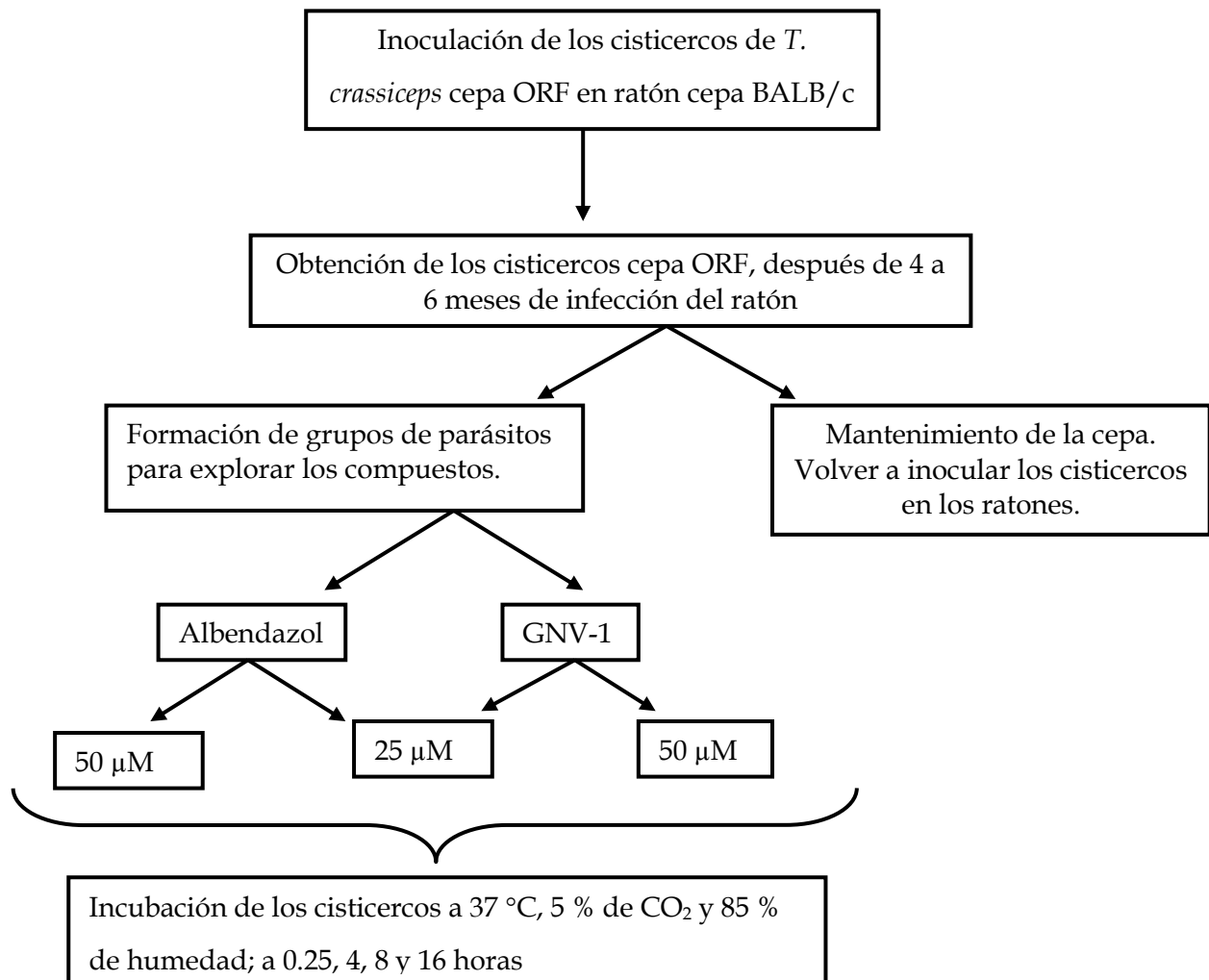
5.2 Objetivos específicos

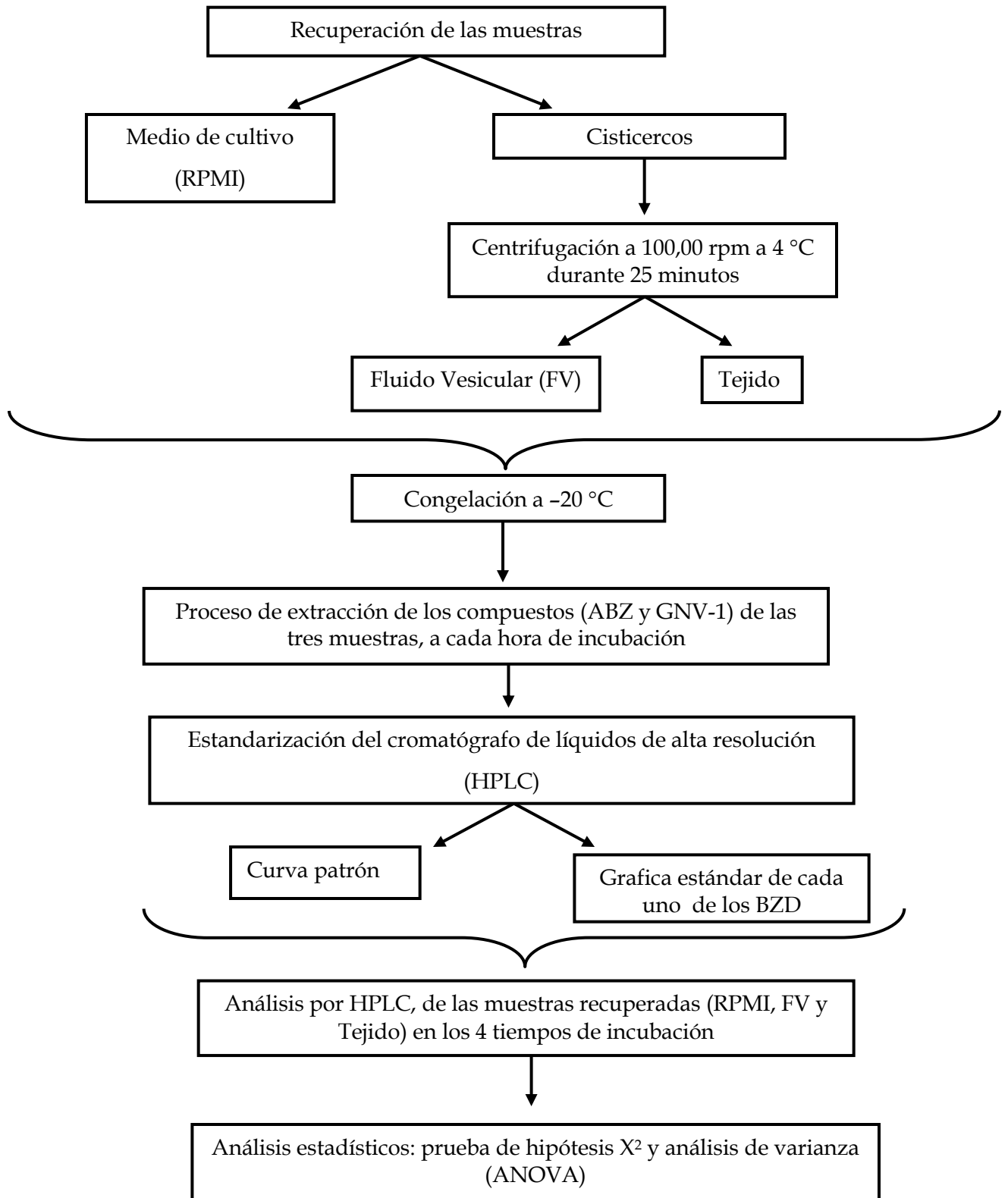
- a) Establecer las condiciones de cultivo de los cisticercos, los tiempos de incubación, así como las concentraciones de los compuestos.
- b) Definir el método de recuperación de las muestras.
- c) Estandarizar la técnica de extracción de los BZD para el análisis cuantitativo por cromatografía líquida de alta resolución.
- d) Determinar la concentración de cada compuesto después de los distintos tiempos de incubación en medio de cultivo (RPMI), fluido vesicular (FV) y tejido de los cisticercos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diagrama de flujo

En este capítulo se presentan en un diagrama de flujo, los pasos que se siguieron para comprobar la hipótesis propuesta y cumplir con los objetivos planteados; seguido de la descripción de los procedimientos experimentales. La explicación de las preparaciones de las soluciones está ubicada en el Anexo I.





6.2 Procedimientos experimentales

6.2.1 Inoculación de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF

Los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF se desarrollaron con facilidad en la cavidad peritoneal de los ratones cepa BALB/c AnN con un tiempo de 4 a 6 meses, ya que estos ratones son susceptibles a estos parásitos (Toledo, *et al.*, 1997).

La cepa ORF se mantuvo por series de inoculaciones intraperitoneales, a nivel de la ingle posterior de los ratones, se inyectaron de 10 a 15 cisticercos, con una jeringa para insulina y una aguja de 18G X 38 mm (Kroeze y Freeman, 1982; Threadgold y Dunn, 1983; Toledo, *et al.*, 1997). Se tuvo cuidado al introducir la aguja en la cavidad peritoneal del ratón; puesto que, si se inoculaba mal pudieran causar tumores intradérmicos. La infección duró de 4 a 6 meses y posteriormente se procedió a sacrificar al ratón.

6.2.2 Obtención de cisticercos cepa ORF

El método que se utilizó para la eutanasia del ratón fue rápido y sin dolor, al separar el cráneo de las vértebras cervicales (Illera, *et al.*, 1991).

Se colocó en cúbito dorsal, fijándolo a la tabla de disección, se impregnó todo el pelo con etanol (C₂H₅OH) al 100% (con la finalidad de impedir su desprendimiento y la contaminación de la zona de disección), se cortó la piel del ratón con cuidado, tratando de evitar romper el tejido peritoneal (Freeman, 1962).

Se separó el tronco del resto del cuerpo, se cortó el tejido peritoneal; los cisticercos obtenidos se depositaron en solución salina, amortiguador de fosfatos 1% (PBS estéril, pH 7.2, ver Anexo I). Se lavó varias veces con PBS hasta quitar por decantación la turbidez y se eliminaron los cisticercos de menor densidad y tamaño, para obtener una población homogénea.

Los cisticercos obtenidos se incubaron a 36.5 °C, temperatura corporal normal de un ratón (Illera, *et al.*, 1991). Se procedió a la incubación de los cisticercos, con los dos BZD (ABZ y GNV-1).

6.2.3 Cultivo de cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF con los BZD

Se procedió a cultivar los cisticercos con ABZ y GNV-1 a dos diferentes concentraciones 25 y 50 μ M, bajo las siguientes condiciones:

- Incubadora (forma Scientific, modelo 3193) a 37 °C, al 5% de CO₂, con 85 % de humedad. En los siguientes tiempos de incubación: 0.25, 4, 8, y 16 horas.
- En cajas de cultivo multipozos (cada una con 24 pozos) se colocaron por pozo 0.2 mL de ABZ y en otra caja multipozos se introdujo GNV-1(Ver Anexo I), mas 1 mL de medio de cultivo (RPMI) y 1 mL de cisticercos (cada mililitro de cisticercos es igual a 85 individuos).

El control negativo se hizo de la misma forma que el procedimiento anterior, con excepción de que no se depositó el mililitro de cisticercos, se sustituyó por 1 mL de RPMI-1640.

En síntesis, en cada pozo de las cajas de cultivo se colocaron 85 cisticercos con un compuesto a diferentes concentraciones y se incubaron a distintos tiempos (0.25, 4, 8 y 16 horas). Cada cultivo se hizo por triplicado.

En cuanto el tiempo de incubación concluyó se extrajo el medio de cultivo, cuidando de no sustraer ningún cisticerco colocándolos en tubos eppendorf bien rotulados y se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2.4 Recuperación del tejido y fluido vesicular

Después de retirar el medio de cultivo, los cisticercos se lavaron con PBS-1X varias veces, para evitar que quedara algo de RPMI; posteriormente, se eliminó todo el PBS, se colocaron los metacéstodos en los tubos de la Ultracentrífuga TL-100 (Beckman); perfectamente bien calibrados y rotulados. Enseguida se sometieron a centrifugación a 100,000 rpm, en un tiempo de 20 minutos y a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; para obtener el fluido vesicular y el tejido.

Se recuperó el fluido vesicular (FV) y el tejido, sin mezclar las dos fases. Se lavó varias veces el tejido con agua destilada, para evitar que permaneciera algo de FV en los tubos de centrifugación. Cada muestra se colocó en tubos eppendorf distintos, bien rotulados y se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta el análisis químico.

6.2.5 Análisis de las muestras por HPLC

Las muestras recuperadas se analizaron en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC, Water 1525) con bomba binaria, Waters 996 y detector de re-arreglos de diodos a 305 nm de absorción; columnas C 8 Nucleosil y C 18 Symmertry (Water), respectivamente. Las muestras (RPMI, FV y tejido) primero pasaron por un proceso de extracción en fase sólida con la finalidad de obtener sólo el ABZ o en su caso el GNV-1 y posteriormente se analizaron.

6.2.5.1 Extracción de los BZD

Para extraer los BZD de las 3 muestras, primero se preparó un estándar interno, Mebendazol (MBZ) a una concentración de 10 μ M (Redondo, *et al.* 1998) (Anexo I); con la finalidad de hacer los cálculos pertinentes para cuantificar los compuestos problema. Una vez elaborado el cromatograma con el estándar interno, se prepararon las muestras para ser analizadas en el HPLC:

Primero se tomaron 0.5 mL de la muestra deseada y se mezcló en 0.01 mL de la solución 2 de MBZ. En seguida se adicionaron 1.5 mL de cloruro de metileno (ClCH_2). Esta mezcla se agitó a 1000 rpm a temperatura ambiente por 10 minutos (Prieto, *et al.*, 1991).

Al término de la agitación, se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Los dos últimos movimientos se hicieron con la finalidad de mezclar el ClCH_2 con la muestra. Posteriormente se dejó que las fases inmiscibles se separaran.

Se tomó 1 mL de la fase orgánica, con cuidado de no extraer la fase acuosa; se agitó la fase orgánica a 1000 rpm a 50 °C; hasta lograr la evaporación de todo.

Posteriormente, se reconstituyó la muestra con 0.1 mL de etanol absoluto (C₂H₅OH) y se agitó a 1000 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos. Al término de la agitación se tomaron 0.05 mL de la muestra y se inyectaron al HPLC (Redondo, *et al.*, 1998).

6.2.5.2 Análisis HPLC

Una vez extraídos los BZD con el ClCH₂, se procedió a inyectarlos en el HPLC. Las condiciones en las que se trabajó en el HPLC fueron distintas con respecto al compuesto; sin embargo la fase móvil fue la misma, acetonitrilo-agua (ACN y H₂O) con 0.5% de ácido acético (v/v), bombeado a una velocidad de 1 mL min⁻¹ y leída una longitud de onda de 305 nm (Redondo, *et al.*, 1998).

En el caso del ABZ se utilizó una columna C 18 Symmetry 4.6 X 150 mm corriéndose por gradiente la fase móvil. (Tabla 2)

Tabla 2. Gradiente de la fase móvil

TIEMPO (min)	H₂O (%)	ACN (%)
0	70	30
4	65	35
8	60	40
12	65	35
14	70	30

En cambio con el GNV-1, la fase móvil se manejó de forma isocrática, con un porcentaje de 45% H₂O y 55% ACN (v/v), en un tiempo de 10 a 12 minutos y se usó una columna C 8 Nucleosil.

6.2.5.3 Tratamiento con urea

Para complementar el estudio y asegurar que se obtuvo todo el compuesto, se analizó de nuevo el tejido, sólo que en esta ocasión se agregó urea a una concentración de 8 M. Se utilizó esto con la finalidad de desnaturalizar a las proteínas del tejido y lograr así la liberación de los compuestos adheridos al tejido de los cisticercos.

La técnica de tratamiento del tejido con urea fue la siguiente:

- 1) Se tomaron 0.3 mL de urea 8 M y se añadieron al tejido (ya analizado con anterioridad). Se agitó a 1000 rpm, por 15 minutos a 40°C.
- 2) Una vez prácticamente desintegrado el tejido por la urea, se dejó enfriar agregándose 1.2 mL de ClCH₂. Se agitó a 1000 rpm durante 10 minutos y se centrifugó a 2500 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente.
- 3) El ClCH₂ extraído, se pasó por un filtro Millex-LCR Syringe Driven Filter Unit 0.45 micras (previamente humedecido con ClCH₂) y se evaporó la fase orgánica que quedó en el cloruro de metileno.
- 4) De igual manera se reconstituyó con 0.1 mL de etanol agitándolo durante 5 minutos a 1000 rpm y finalmente se inyectó 0.05 mL al HPLC.

6.3 Análisis estadísticos

6.3.1 Prueba de hipótesis X^2

Se elaboraron dos pruebas de X^2 distintas, la primera se basó en la hipótesis, en la cual se estableció si los BZD, en las dos concentraciones (50 μM y 25 μM), tuvieron la misma o diferente permeación en el tejido de los cisticercos. En la segunda, se pretende explicar estadísticamente si los datos obtenidos en cada una de las muestras (RPMI, FV, Tejido) en los cuatro tiempos de incubación (0.25, 4, 8 y 16 horas) fueron distintos.

6.3.2 Análisis de varianza (ANOVA)

Una vez comprobada la hipótesis planteada, se procedió hacer un análisis de varianza llamada ANOVA que muestra las fluctuaciones fortuitas existentes, que pudieron cometerse en el procedimiento experimental.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Obtención de cisticercos cepa ORF

Los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF se inocularon en el ratón cepa BALB/c. Después de 4 a 6 meses los ratones presentaron un abdomen abultado, debido a la cantidad de cisticercos (de 10 a 15 mL) que se reprodujeron en el peritoneo, como se muestra en la Figura 5.



Figura 5. Ratón cepa BALB/c, con 5 meses de infección, con cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF

7.2 Recuperación de las muestras

Una vez centrifugados los cisticercos se obtuvieron las siguientes cantidades de muestras: del medio de cultivo fue entre 1 a 1.5 mL, de los cisticercos fue el fluido vesicular entre 0.5 a 1 mL y el tejido pesó aproximadamente 0.069 g.

7.3 Estandarización de la técnica cuantitativa

Para verificar que los compuestos analizados en el cromatógrafo (HPLC) nos proporcionaran los datos correctos, se hizo un control para estandarizar la técnica cuantitativa. Los datos obtenidos tanto en ABZ como en GNV-1 nos indicaron que la recuperación de las concentraciones analizadas fueron menores a las concentraciones establecidas. (Tabla 3)

Tabla 3. Concentración de los BZD analizados en el HPLC

CONCENTRACIÓN ESTABLECIDA (μM)	BENCIMIDAZOLES			
	ABZ (μM)	ABZ (%)*	GNV-1 (μM)	GNV-1 (%)*
25	5.35	21	7.95	32
50	16.28	32	18.04	36

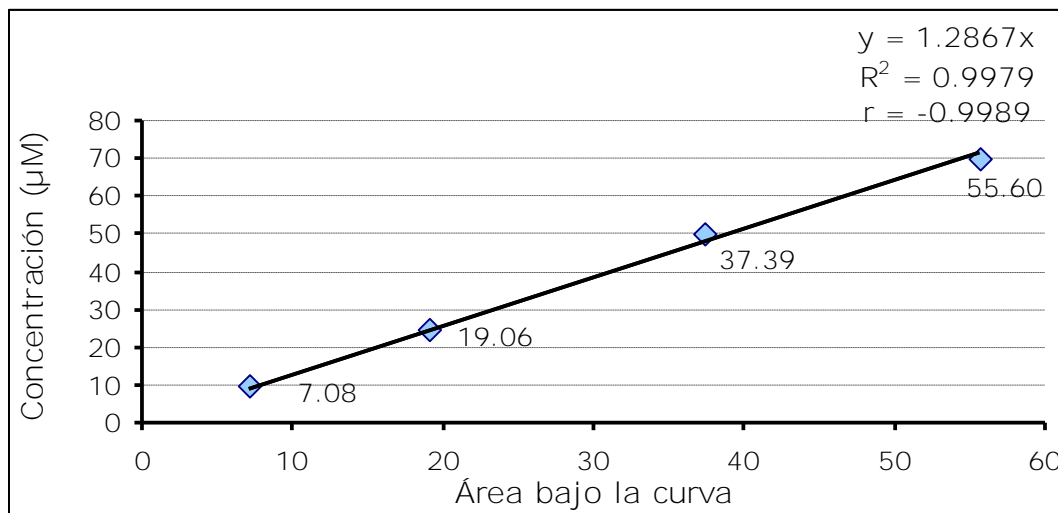
*El porcentaje del compuesto recuperado fue dado con respecto a la concentración establecida y adicionada al medio de cultivo.

Al observar la Tabla anterior vemos que en las muestras con ABZ a 25 μM sólo se analizó el 21 %, lo mismo pasó a 50 μM donde se analizó el 32 %. En el caso de GNV-1 a 25 μM se analizó el 32 % y a 50 μM el 36 %. El porcentaje restante que no logró obtenerse durante el proceso de análisis cuantitativo, pudo perderse durante el proceso de extracción o tal vez, algunas moléculas de los compuestos se precipitaron en el medio.

7.3.1 Curva patrón de los BZD

La curva patrón ayudó a estandarizar el análisis cuantitativo de los compuestos, la cual indicó el comportamiento de los BZD conforme aumentó la concentración. (Gráfica 1)

Gráfica 1. Curva patrón de los BZD



Esta curva patrón demuestra que la concentración del medio (variable independiente), es directamente proporcional con respecto al área bajo la curva (variable dependiente). Para verificar la exactitud de este análisis se determinó el coeficiente de correlación (r) de -0.9989 , el cual nos indica que tan cerca están los puntos obtenidos de los calculados. El coeficiente de determinación (R^2) de 0.9979 , señala que el 99 % de los datos obtenidos estuvieron estrechamente relacionados; se determinó que conforme aumentó la concentración establecida, mayor fue el área bajo la curva.

7.3.2 Estandarización del método cuantitativo

Se estableció la absorbencia y el tiempo de retención; los cuales son datos específicos que caracterizan a cada compuesto analizado en el cromatógrafo (Tabla 4). Esto indica que los compuestos poseen características fisicoquímicas distintas, tanto ABZ, MBZ y GNV-1, son derivados del grupo bencimidazol, que poseen diferencias en la solubilidad acuosa, liposolubilidad, peso molecular, etc. Las Gráficas obtenidas a partir del cromatógrafo se pueden observar en el Anexo II (Gráficas 18 a la 30).

Tabla 4. Absorbencia y tiempo de retención de los BZD

BZD	ABSORBENCIA	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)
COLUMNA C 18		
ABZSO	298.1	6.38
ABZ	296.9	6.63
MBZ	302.9	7.70
COLUMNA C 8		
GNV-1	301.7	5.80
MBZ	307.6	4.17

Como se menciona en capítulo 6, se utilizaron dos columnas para la determinación de los BZD; esto se debió a que el ABZ es insoluble al agua y para que pasara por el cromatógrafo con un mayor tiempo de retención se ocupó la columna C 18 (Anexo II, Gráficas 18-21). Sin embargo, para GNV-1 por ser hidrosoluble se usó la columna C 8 (Anexo II, Gráficas 27-30). En el caso del MBZ, se utilizaron las dos columnas con propiedades específicas para el uso de compuestos liposolubles o hidrosolubles., ya que fue el estándar interno de ambos BZD; y por esa razón el MBZ tuvo un tiempo de retención y absorbencia diferentes (Anexo II, Gráficas 24-26).

Durante el análisis de las muestras con ABZ, en la mayoría de los ensayos, se observó un pico extra entre ABZ y MBZ, ésto hace suponer que, tal vez, los cisticercos tienen la capacidad de oxidar a gran velocidad cierta concentración de ABZ, en Sulfóxido de albendazol (ABZSO) (Anexo II, Gráficas 22-23), (Redondo, *et al.*, 1998; Sotelo y Jun, 1998) y como consecuencia se obtuvo menor concentración de ABZ en comparación con GNV-1.

Sin embargo, el tiempo de retención del estándar de ABZSO fue de 6.38 minutos, como consecuencia, el valor fue menor al pico extra que se obtuvo en los ensayos, con un tiempo de retención de 7.20 minutos; por lo tanto, la señal que se observó entre los picos de ABZ y MBZ no es el metabolito de ABZ. No se determinó la estructura de este compuesto porque se hubiera tenido que hacer toda una serie de ensayos extras y eso hubiera desviado el objetivo de este trabajo. No obstante, no se desecha la cuestión y podría ser objeto para posteriores proyectos.

7.4 Análisis y comparación de las muestras

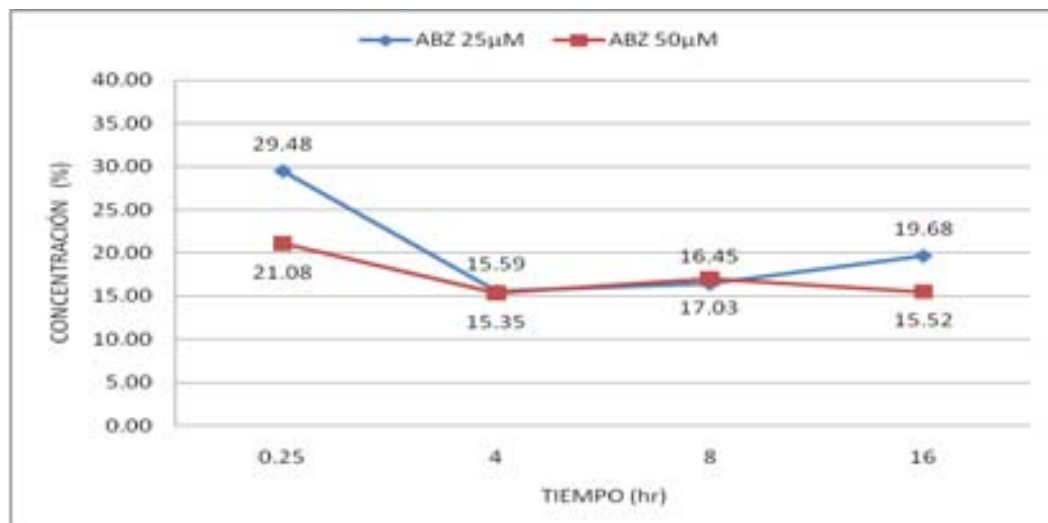
Una vez implementado el método analítico, se obtuvieron los resultados del cultivo de los cisticercos con los BZD a 25 y 50 μM en las distintas condiciones de incubación.

Las concentraciones se graficaron en porcentaje para hacer una comparación más eficaz entre las muestras, en cada tiempo de incubación. (Gráficas 2-17)

7.4.1 Cinética de los compuestos

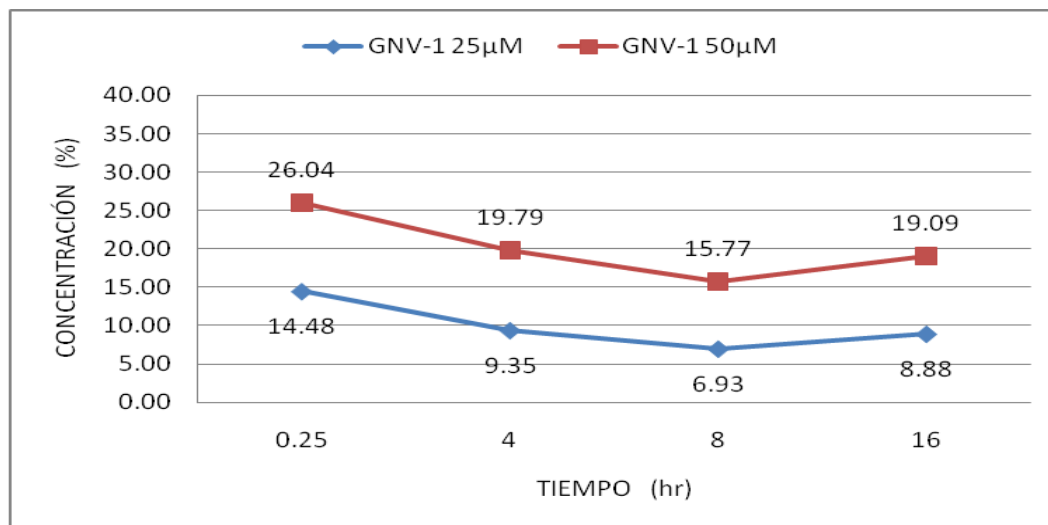
En las Gráficas 2 y 3 se observa la cinética de los compuestos en las dos concentraciones que se manejaron de los BZD, los cuales fueron incubados con los cisticercos en medio de cultivo en sus distintos tiempos de incubados.

Grafica 2. Cinética de ABZ en medio de cultivo



En la anterior Gráfica se observa que el ABZ tanto a 25 como a 50 μM tiene una baja de porcentaje en las primeras cuatro horas de incubación con los cisticercos, sin embargo, en 25 μM fue subiendo poco a poco el porcentaje conforme fue pasando el tiempo. Esto pudo deberse, a que, el ABZ entró tanto al tejido como al fluido vesicular del parásito a las 4 horas, regresando al medio de cultivo a las 16 hr. En cambio a 50 μM se mantuvo casi constante el porcentaje después de las primeras cuatro horas. Esto pudo deberse a que, la concentración fue el doble y logró tener mayor eficacia en la fijación del ABZ a la β -tubulina y proteínas de transporte del tejido.

Gráfica 3. Cinética de GNV-1 en medio de cultivo

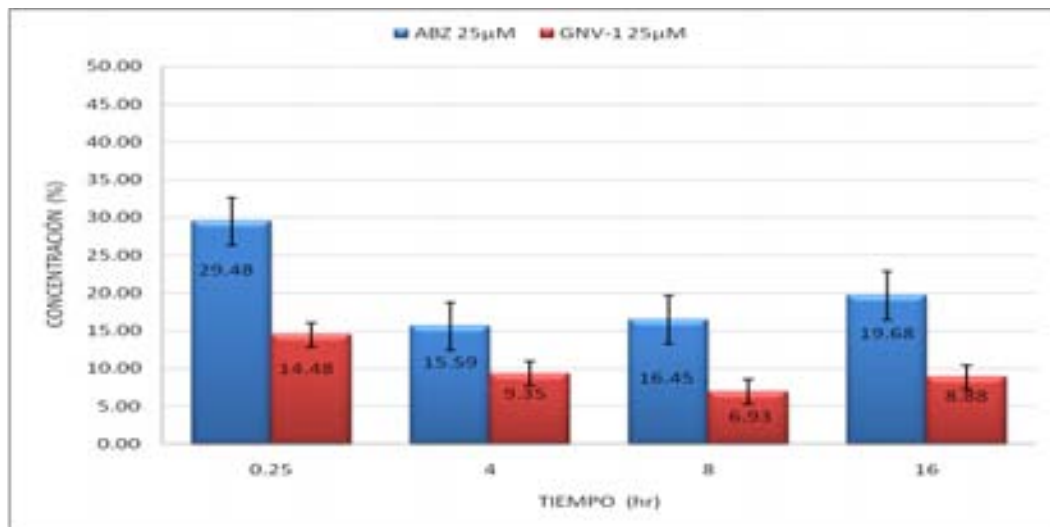


En la Gráfica 3 se observa como GNV-1 tiene prácticamente la misma cinética tanto en 25 como en 50 μM . Ambas concentraciones fueron descendiendo su porcentaje hasta las 8 hr de incubación con los cisticercos, posteriormente tendió a subir el porcentaje a las 16 hr. Esto pudo deberse a que el GNV-1 es soluble en agua y logró entrar y salir con facilidad del tejido y fluido vesicular.

7.4.2 Comparación de los compuestos en las distintas condiciones de incubación

Se comparó la concentración de los dos compuestos BZD en el medio de cultivo, fluido vesicular y tejido de los cisticercos, en sus distintos tiempos de incubación. Primero se comparó a los compuestos a 25 μM y posteriormente se hizo a 50 μM . Esto se hizo con la finalidad de determinar qué compuesto predominó en las distintas muestras y también saber cuál fue el BZD mejor permeado por el tejido de los cisticercos.

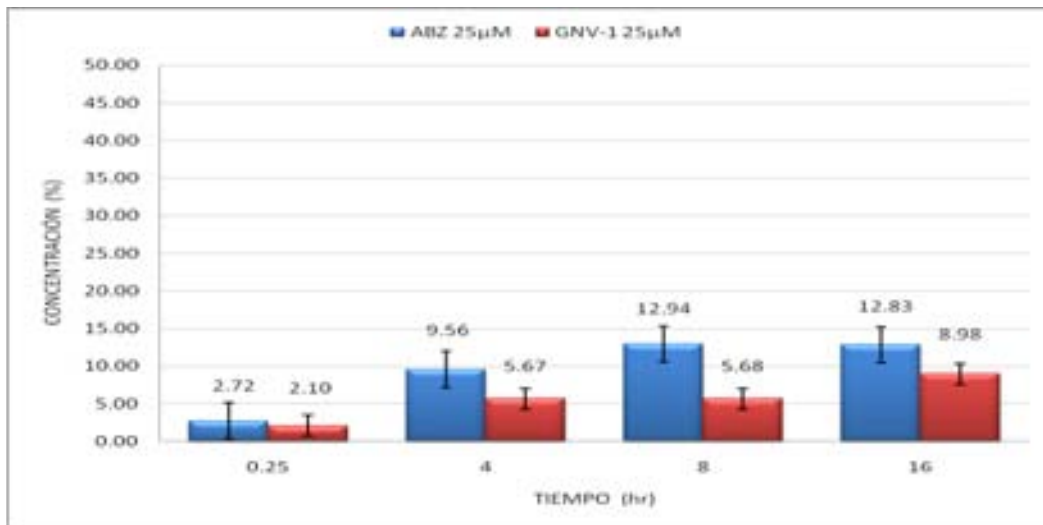
Gráfica 4. Compuestos a 25 μM en RPMI



En esta Gráfica se observa que ABZ a las primeras 4 hr bajó el porcentaje de concentración, sin embargo, posteriormente fue aumentando. Lo mismo sucedió con GNV-1 pero a las 16 hr empezó aumentar la concentración. Comparativamente el ABZ tuvo mayor porcentaje en el medio de cultivo que GNV-1; esto pudo deberse a que el ABZ es menos soluble que GNV-1 y como resultado tiene poca

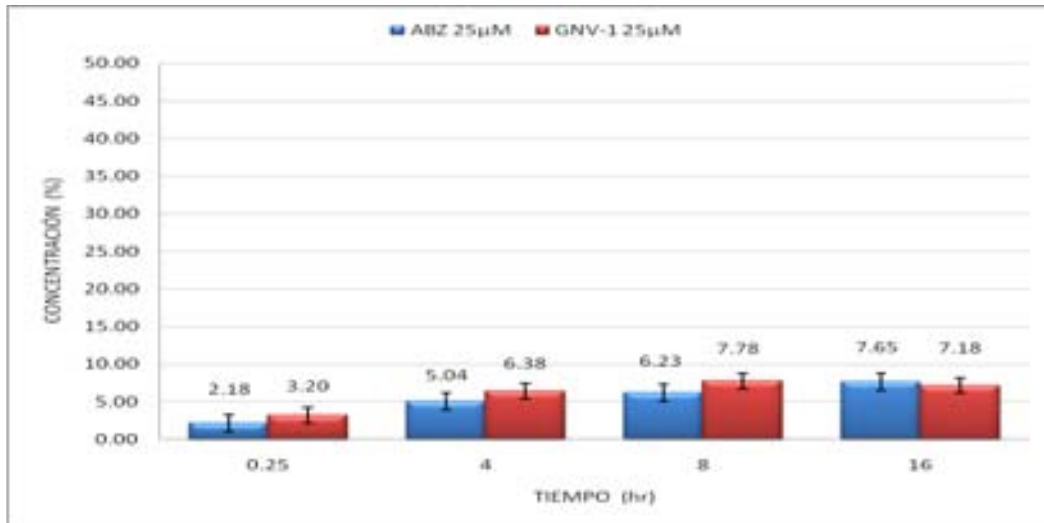
eficacia para atravesar el tejido de los cisticercos o logró precipitarse en el medio y por lo tanto no pasó por completo al interior de los cisticercos, a pesar de poseer peso molecular pequeño y liposolubilidad adecuada (Jung, *et al.*, 1998).

Gráfica 5. Compuestos a 25 μM en tejido

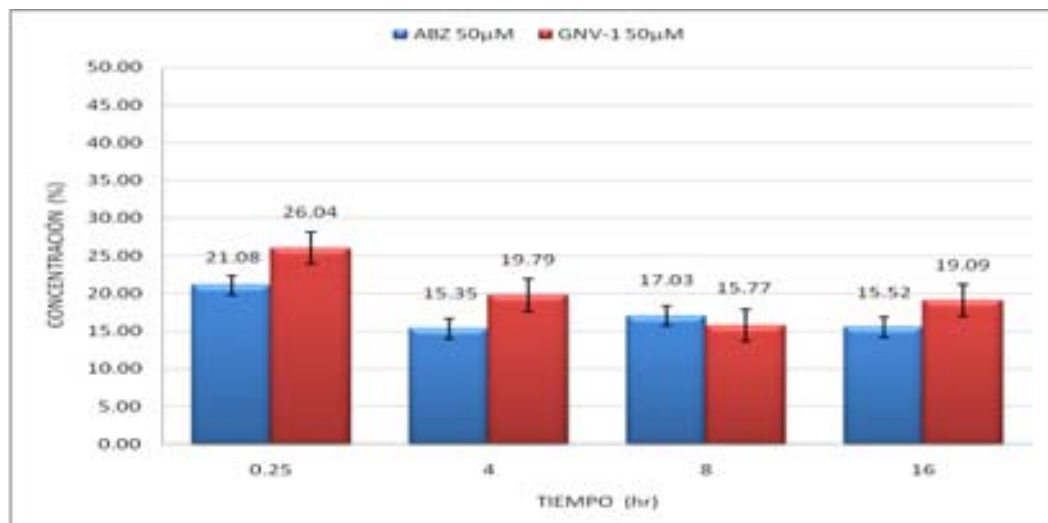


En esta Gráfica se puede ver que el ABZ sobresale del GNV-1 en el tejido de los parásitos; esto se consiguió gracias a que el ABZ tiene una mayor afinidad para adherirse principalmente a la β -tubulina de los microtúbulos del tejido.

Se observa que en general conforme fue pasando el tiempo de incubación fue aumentando el porcentaje de los compuestos en el tejido. Esto nos puede indicar que ambos compuestos tuvieron la capacidad de penetrar al tejido, independientemente de su propiedad de solubilidad en agua.

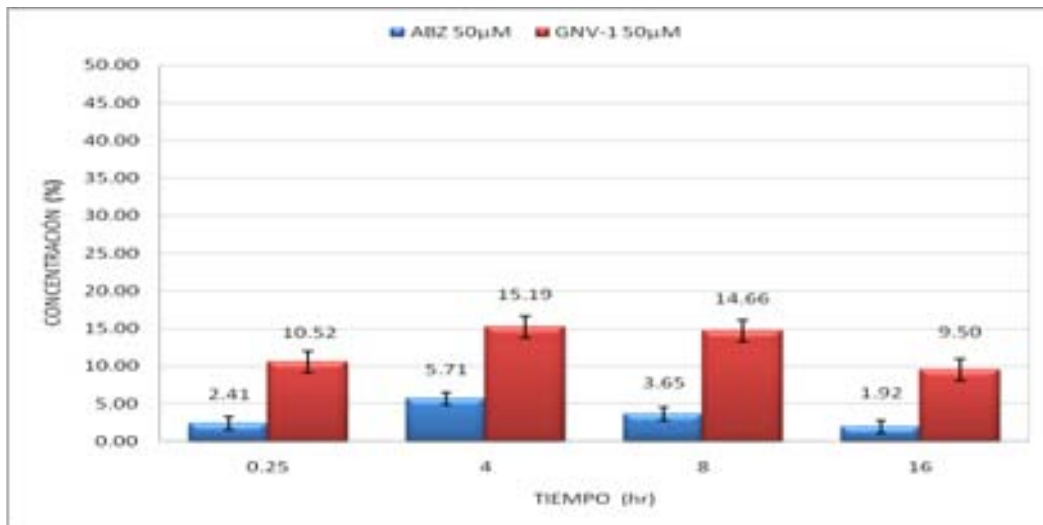
Gráfica 6. Compuestos a 25 μM en FV

Se observa que el porcentaje de GNV-1 sobresalió por muy poco del ABZ. Sin embargo, se considera que ambos compuestos en el fluido vesicular tienen casi el mismo porcentaje de concentración y conforme fue pasando el tiempo de incubación fue creciendo su porcentaje. Cabe señalar que el GNV-1 a las 16 hr. presentó una tendencia a bajar.

Gráfica 7. Compuestos a 50 μM en RPMI

En el caso de los compuestos en 50 μM , el GNV-1 fue quien predominó en mayor porcentaje de concentración. De la misma forma que a 25 μM el GNV-1 su concentración fue bajando conforme fue pasando el tiempo de cultivo, pero al llegar a las 16 hr de incubación comenzó a subir. En el caso de ABZ, se observa que el porcentaje bajó a partir de la cuarta hora con variaciones mínimas a las 8 y 16 hr del cultivo.

Gráfica 8. Compuestos a 50 μM en tejido

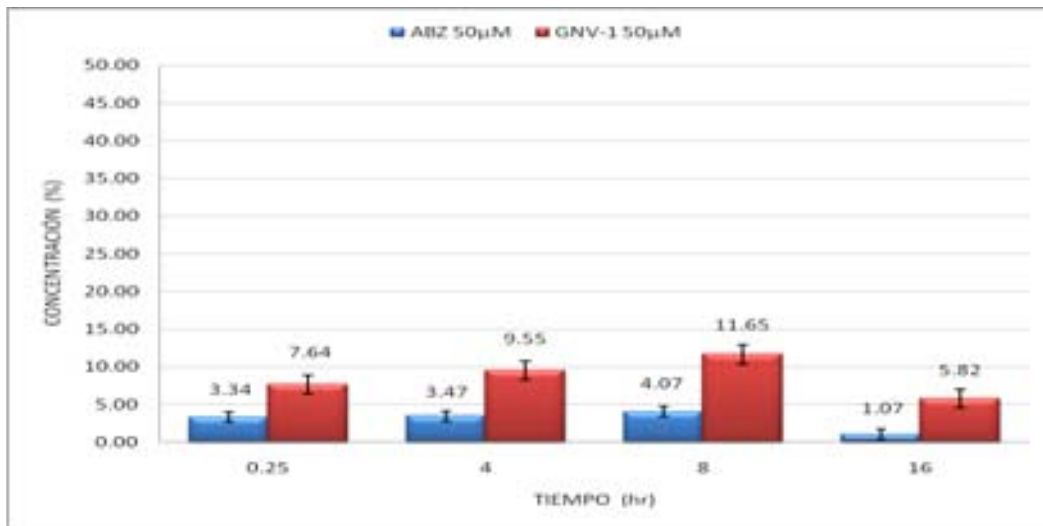


En esta Gráfica se observa que GNV-1 sobrepasa la concentración de ABZ, llegó a su mayor porcentaje a las 4 y 8 horas de incubación, con descendencia a las 16 hr. Esto explica porque en la Gráfica 7, el GNV-1 en el medio de cultivo comenzó a subir la concentración a las 16 horas.

En el caso de ABZ sólo a las 4 hr subió el porcentaje pero posteriormente comenzó a bajar. Se podría pensar que, hubo poco porcentaje de ABZ en el tejido, debido a que la concentración de 50 μM pudo haber afectado en la solubilidad del compuesto. Por otro lado el GNV-1 por su mayor solubilidad se filtró mejor al

tejido y esto se dio porque el grupo CF_3 del GNV-1, le otorga la característica de ser más hidrosoluble, en comparación con el ABZ que no lo tiene.

Grafica 9. Compuestos a $50 \mu\text{M}$ en FV

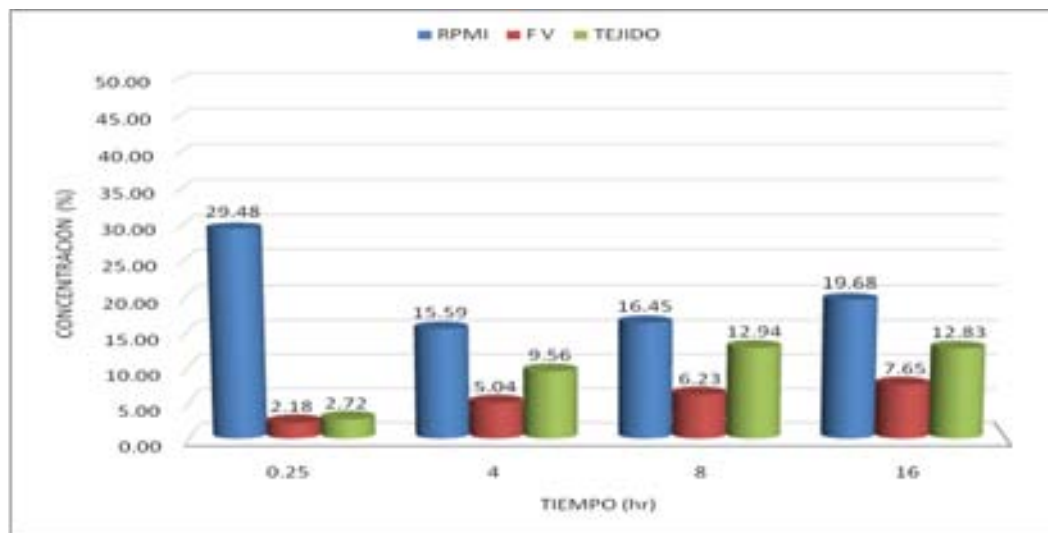


De acuerdo a las tres Gráficas anteriores (6 a la 8), el GNV-1 se presentó en mayor porcentaje de concentración que el ABZ. Como se mencionó anteriormente, pudo deberse a su adecuada solubilidad logrando un correcto paso al interior del tejido hasta llegar al FV. En esta Gráfica se observa cómo el GNV-1 fue subiendo poco a poco el porcentaje, sin embargo a las 16 hr bajó. Sucede de la misma forma con el ABZ, fue subiendo su porcentaje conforme fue pasando el tiempo de incubación pero a las 16 hr bajó drásticamente. Si se comparan los compuestos en la Grafica 7 se observa que en la última hora de incubación logran aumentar su concentración, corroborando que ambos BZD salen al medio de cultivo.

7.4.3 Comparación de los BZD en las muestras

Aquí se hace una comparación de cada uno de los compuestos en las muestras (medio de cultivo, tejido y FV); para identificar el comportamiento de los BZD durante el cultivo *in vitro* con los cisticercos, en las distintas condiciones de incubación y verificar si existe alguna modificación en la permeación de los compuestos a través del tejido, al cambiar la concentración de 25 a 50 μM .

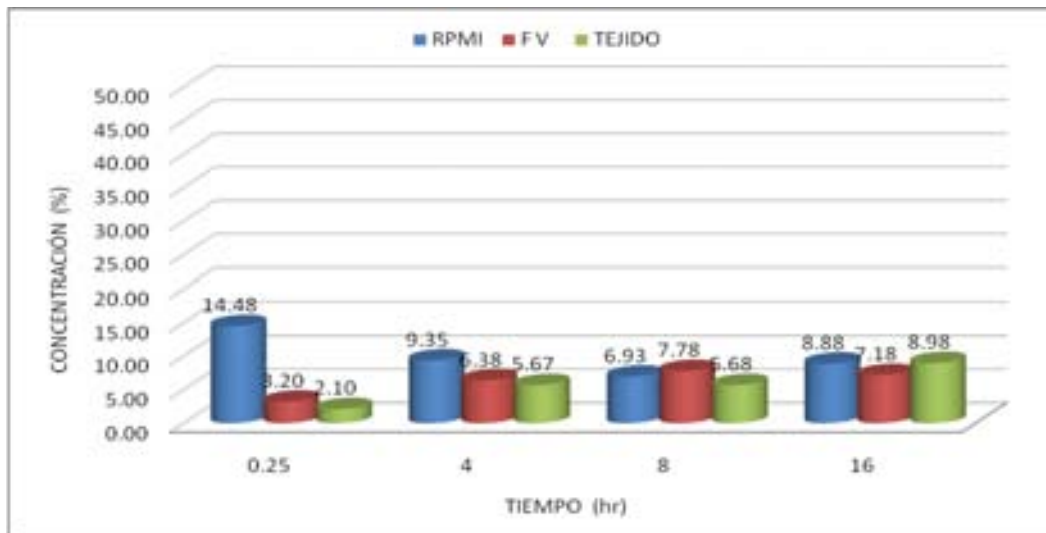
Gráfica 10. ABZ a 25 μM presente en las tres muestras



Se observa que el ABZ a 25 μM tuvo un mayor porcentaje en el medio de cultivo, en comparación con el tejido y el FV. El que sigue en porcentaje, fue el tejido, donde a partir de las 4 primeras horas de incubación con los cisticercos creció; sólo que a las 16 hr se ve como levemente tendió a bajar. Por último, el FV se observa que, conforme fue pasando el tiempo de cultivo, aumentó su porcentaje de concentración.

La alta concentración del ABZ obtenida en el RPMI fue gracias a su baja hidrosolubilidad y ésto no permitió una penetración adecuada del BZD al tejido; sin embargo, en cuanto logró entrar al tejido de los cisticercos se fijó fuertemente a la β -tubulina, además de otras proteínas, debido a sus características intrínsecas.

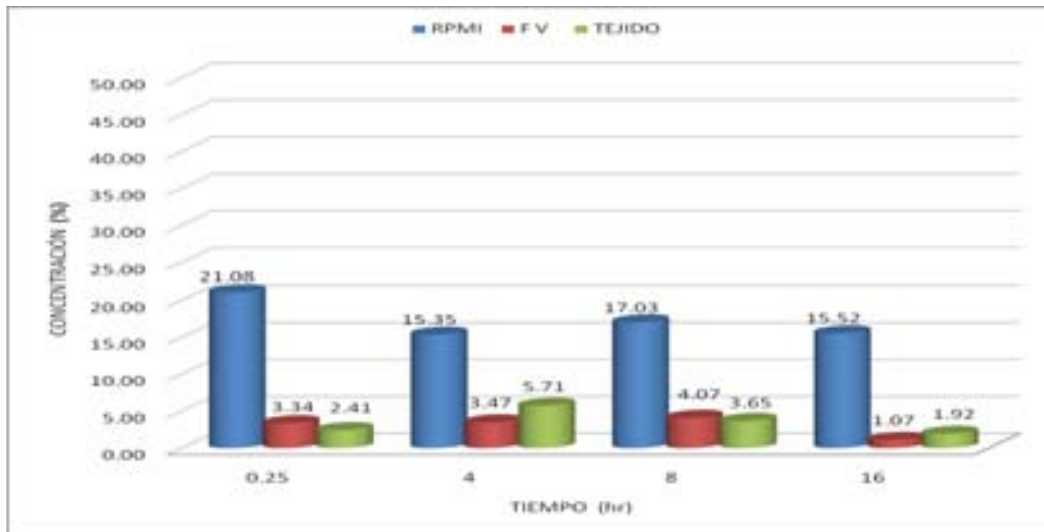
Gráfica 11. GNV-1 a 25 μ M presente en las tres muestras



El comportamiento de GNV-1 a 25 μ M durante los tiempos de incubación con los cisticercos fue distinto con respecto al ABZ a 25 μ M; ya que, si se observa la concentración en el medio de cultivo bajó hasta las 8 hr de incubación, pero a las 16 hr comenzó a subir. En cambio, en el tejido, fue casi constante el aumento del porcentaje durante todos los tiempos del cultivo. Finalmente, en el FV el comportamiento del compuesto fue inverso al que tuvo en el medio de cultivo, es decir, fue aumentando hasta las 8 hr pero a las 16 hr bajó.

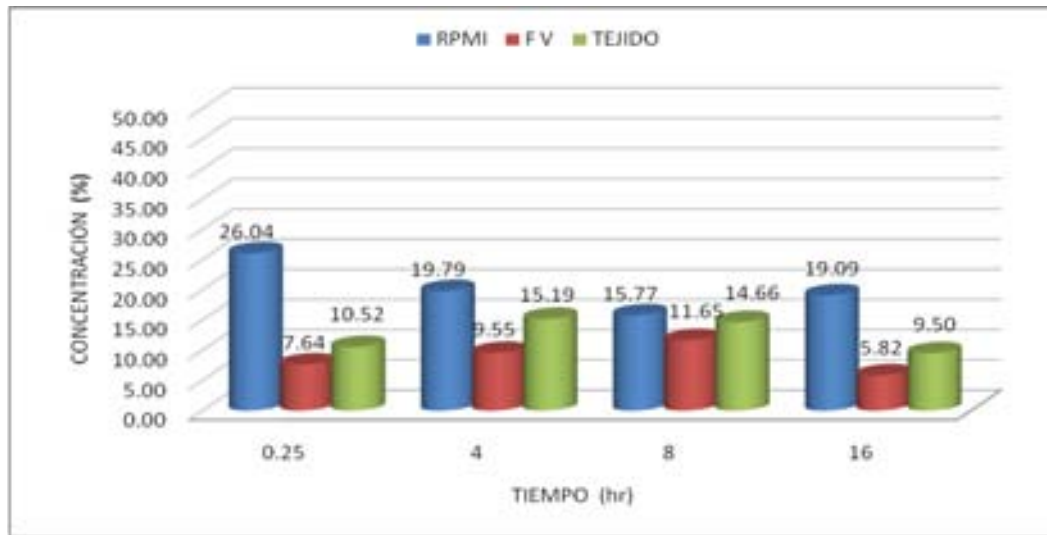
Es evidente que el GNV-1 por su alta hidrosolubilidad, entró con facilidad al tejido de los cisticercos y al fluido vesicular, pero de igual manera tendió a salir de nuevo al medio de cultivo a las 16 hr de incubación.

Gráfica 12. ABZ a 50 μM presentes en las tres muestras



En esta Gráfica se observa que, el ABZ a 50 μM de igual forma que a 25 μM , tuvo una mayor concentración en el RPMI que en el tejido y fluido vesicular de los cisticercos. En este caso, no es tan evidente determinar si el ABZ está más presente en el tejido que en FV. Si observamos el tejido a las 4 horas de incubación aumenta el porcentaje prácticamente el doble que a los 15 minutos, sin embargo a partir de las 8 hr tendió a bajar. En el FV a las primeras 8 hr de incubación subió el porcentaje, pero a las 16 hr bajó considerablemente.

Lo anterior comprueba que con ABZ al aumentar al doble su concentración (50 μM), su característica de poca solubilidad en agua afectó cuantiosamente en la permeación del compuesto ante el tejido de los cisticercos, ya que los porcentajes obtenidos en el tejido, como en el fluido vesicular son bajos comparativamente con los datos obtenidos con ABZ a 25 μM (Gráfica 10).

Gráfica 13. GNV-1 a 50 μM presente en las tres muestras

En esta Gráfica se observa que el GNV-1 a 50 μM obtuvo mayor porcentaje del compuesto en las tres muestras, principalmente en el medio de cultivo, en donde se ve como fue disminuyendo el porcentaje conforme fue pasando el tiempo de incubación, pero a las 16 hr aumentó de nuevo. En cambio en el tejido y el FV de los cisticercos fue inversamente proporcional que en el RPMI; es decir, conforme fue pasando el tiempo de incubación fueron incrementando los porcentajes excepto a las 16 hr que disminuyó radicalmente.

Como ya se mencionó en la Gráfica 11 por su gran solubilidad en el agua el GNV-1 independientemente de la concentración que se maneje, se permea con facilidad al tejido de los cisticercos en las primeras 8 hr de incubación, así como también, a las 16 hr, salió rápidamente al medio de cultivo.

En general, en el medio de cultivo es donde se presentó mayor porcentaje de los compuestos, puesto que fue el lugar donde se incubaron los cisticercos con los BZD. Cabe señalar que al igual que el medio de cultivo, también el tejido presentó un porcentaje significativo de dichos compuestos; debido a que los BZD tienen la

característica de fijarse a la β -tubulina, a las proteínas de transporte y a otras proteínas, del tejido de los cisticercos (Mottier, *et al.*, 2003; Sharma, 1994; Jung, *et al.*, 1998). En resumen, se logró determinar que GNV-1 presentó la capacidad de atravesar y de asociarse con mayor facilidad al tejido de los cisticercos, en comparación con ABZ, independientemente de la concentración en la que se utilizaron ambos compuestos.

7.4.4 Comparación de los BZD en el tejido obtenidos a partir de dos técnicas de extracción

El tejido de los cisticercos obtenido a partir de la centrifugación, se analizó de dos formas: con y sin urea; ya que en el primer proceso de extracción no se recuperó la suficiente cantidad de los compuestos, se procedió a agregar urea al mismo para desnaturalizarlo y lograr extraer más porcentaje de los BZD.

De esta forma se obtuvo los siguientes datos (Gráficas 14-17), en los cuales se grafica al tejido con urea, sin ella y la suma de estos dos, resultando el porcentaje total de los compuestos en el tejido, presentes en los distintos tiempos de incubación.

Gráfica 14. ABZ a 25 μ M en tejido con y sin urea y la suma de ambos

En esta Gráfica podemos observar que el ABZ se presentó en el tejido en todos los tiempos establecidos, independientemente del tipo de extracción que se utilizó. Se observa que a las 4 hr, el tejido que fue tratado con urea su porcentaje fue el más sobresaliente con 78.22 % y en la suma de ambos tratamientos de extracción se obtuvo un total de 88% de ABZ. Ésto pudo deberse a que en este tiempo de incubación los cisticercos fueron más susceptibles al compuesto y al desnaturalizar al tejido con urea, se extrajo gran parte del compuesto adherido a los microtubulos. El carbamato de metilo, responsable de la baja solubilidad acuosa, también le otorga mayor adherencia a β -tubulina, albúmina, glucoprotéas y proteínas de transporte, con inhibición tanto de la polimerización de la β -tubulina, como de la captura de glucógeno y enzima fumarato reductasa (Jung, *et al.*, 1998; Sotelo y Jung, 1998).

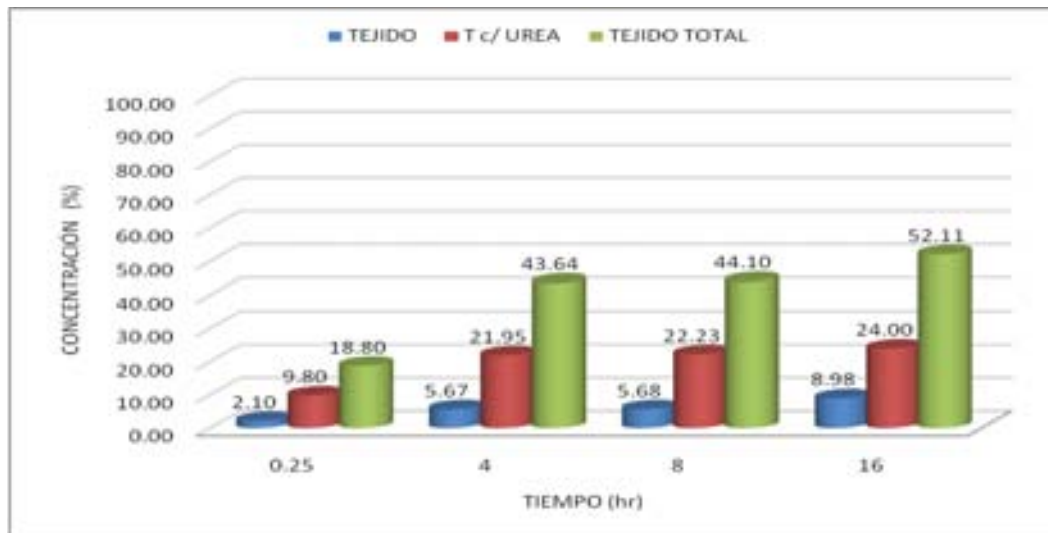
Posteriormente vemos que en tejido con urea, el ABZ presentó a las 8 hr un 18 % y a las 16 hr un 22 %; debido a que el compuesto regresó al medio de cultivo (Gráfica 10).

Gráfica 15. ABZ 50 μM en tejido con y sin urea y la suma de ambos

Se confirma que a las 4 hr de incubación se logró obtener el mayor porcentaje de ABZ a 50 μM en el tejido con una concentración de 39.5 % del compuesto. Se repite el mismo comportamiento observado en la Gráfica 14, en donde después de este tiempo muestra una reducción en su concentración.

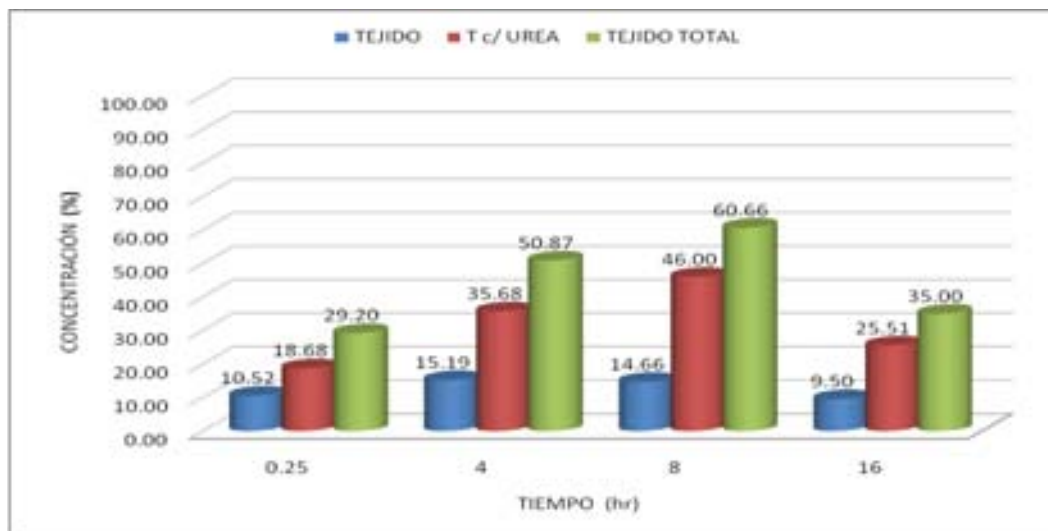
Es evidente que la extracción con urea, se logró adquirir una concentración imponente del ABZ.

Gráfica 16. GNV-1 a 25 μ M en tejido con y sin urea y la suma de ambos



Por su parte en el caso del GNV-1 la concentración fue aumentando conforme fue pasando el tiempo de incubación, obteniendo el mayor porcentaje a las 16 hr del cultivo (52.11%). Ésto pudo deberse a que en este tiempo logró fijarse mejor al tejido de los cisticercos y al desnaturalizarlo con urea se extrajo gran parte del compuesto.

Gráfica 17. GNV-1 a 50 μ M en tejido con y sin urea y la suma de ambos



En esta Gráfica, podemos determinar que no se presentan las mismas características porcentuales que en la Gráfica anterior. Se observa que el porcentaje fue aumentando conforme aumento el tiempo de incubación hasta las 8 hr, que fue el tiempo donde se recuperó la mayor concentración (60.66%), no obstante a las 16 horas disminuyó drásticamente. Esto pudo deberse porque a las 8 hr el GNV-1 a 50 μM se adhirió en mayor cantidad al tejido de los cisticercos, pero a las 16 hr el compuesto comenzó a regresar al medio de cultivo.

Se establece que la variación de la concentración de los compuestos no influyó en su paso al tejido de los cisticercos, pero sí afectó el comportamiento de los BZD frente a los cisticercos. Es decir, la permeación de los BZD fue diferente independientemente de la concentración en que se incubaron con los cisticercos; sin embargo el porcentaje en cada una de las muestras varió, dependiendo de la concentración que se utilizó en el cultivo.

7.5 Análisis estadísticos

Se hicieron dos pruebas estadísticas, la prueba de hipótesis X^2 y el análisis de varianza (ANOVA). Estos análisis estadísticos ayudaron a comprobar los resultados experimentales, se aseguró que la hipótesis postulada fuera la adecuada y se verificó que los datos obtenidos fueran estadísticamente confiables.

7.5.1 Prueba de hipótesis X^2

La primera prueba de X^2 determinó si la hipótesis fue correcta o no, a partir de los datos obtenidos en el medio de cultivo, tejido y fluido vesicular en las distintas condiciones de incubación, con los derivados bencimidazólicos a 50 y 25 μM . (Tabla 5)

Tabla 5. Prueba de X^2 de ABZ y GNV-1

CONCENTRACIÓN (μM)	VALORES DE VARIANZA		
	RPMI	FV	TEJIDO
50	1.0	0.83	1.09
25	3.75	0.29	0.50

Basándose en los datos presentados en la Tabla anterior, se observa en todos los datos, un valor de $p > 0.25$ con una X^2 de Tablas de 4.11 (Wonnacott, y Wonnacott, 1997); es decir, se obtuvo más del 75 % de confiabilidad el cual, sugiere que sí hubo diferencia en el paso de los dos compuestos a través del tejido de los cisticercos y por lo tanto, se tomó una decisión adecuada.

La segunda prueba de X^2 se hizo para confirmar estadísticamente si las concentraciones obtenidas en las tres muestras (RPMI, FV y Tejido) eran diferentes en los cuatro tiempos de incubación. (Tabla 6)

Tabla 6. Prueba de X^2 de las tres muestras

DATOS ESTADÍSTICOS	ABZ		GNV-1	
	50 μ M	25 μ M	50 μ M	25 μ M
X^2 calculada	25.53	15.01	11.23	11.19
X^2 tablas*	27.90	19.90	11.40	11.40
p*	> 0.001	> 0.05	> 0.25	> 0.25

* (Wonnacott y Wonnacott, 1997)

De acuerdo a la Tabla anterior, se puede observar que todos los datos ratifican lo propuesto; es decir, todas las muestras (RPMI, FV, Tejido) analizadas, tuvieron concentraciones diferentes en cada uno de los tiempos, tomando en consideración las concentraciones de los compuestos que se manejaron durante el cultivo.

Las pruebas de X^2 determinaron que la hipótesis es aceptable, porque hubo diferencia en la permeación de los compuestos frente al tejido de los cisticercos, independientemente de la concentración de los BZD y del tiempo de incubación.

7.5.2 Análisis de varianza (ANOVA)

Al realizarse los ensayos experimentales se pudieron suscitar errores y provocar variaciones en los resultados, por esta razón se elaboró el análisis de varianza ANOVA bilateral. Este análisis ayudó a determinar las fluctuaciones que pudieron producirse, en el momento que se recuperaron las muestras con los compuestos y en los distintos tiempos de incubación (Tabla 7).

La recuperación de las muestras fue adecuada, en todos los tiempos de incubación, al obtener una $p > 0.1$ y < 0.001 . Los cuales son valores significativos y los datos de F calculada no llegaron a ser altos, con excepción del ABZ a $50 \mu\text{M}$, que fue de 34.52, este valor indica que las fluctuaciones en la recuperación y extracción fueron muchas.

Tabla 7. ANOVA bilateral de las muestras en los tiempos de incubación

ABZ (50 μM)	F CALCULADA	F DE TABLAS*	p*
Muestras	2.00	2.81	>0.1
Tiempo	34.52	13.9	<0.001
GNV-1 (50 μM)			
Muestras	0.76	1.63	>0.1
Tiempo	15.11	13.9	<0.001
ABZ (25 μM)			
Muestras	0.55	1.63	>0.1
Tiempo	10.07	13.9	<0.001
GNV-1 (25 μM)			
Muestras	3.75	3.86	>0.1
Tiempo	16.99	13.9	<0.001

* (Wonnacott y Wonnacott, 1997)

Se elaboró otro análisis de varianza ANOVA bilateral, en el cual se examinaron los dos derivados BZD en sus dos concentraciones (50 y $25 \mu\text{M}$), en cada uno de los tiempos de incubación. (Tabla 8)

Tabla 8. ANOVA bilateral de 50 y 25 μM en cada tiempo de incubación

MUESTRAS	50 μM	25 μM	VALORES *	
	F calculada	F calculada	F tablas	p
RPMI				
Fármacos	0.14	0.31	2.02	>0.25
Tiempo	0.01	0.25	2.36	>0.25
FV				
Fármacos	0.52	0.67	2.02	>0.25
Tiempo	0.27	0.28	2.36	>0.25
TEJIDO				
Fármacos	0.31	0.86	2.02	>0.25
Tiempo	0.46	0.06	2.36	>0.25

* (Wonnacott y Wonnacott, 1997)

Tomando como referencia la Tabla anterior se puede establecer que los cultivos de los BZD con los cisticercos fueron elaborados y analizados de manera adecuada en las condiciones de incubación, ya que se obtuvo una $p > 0.25$ y los valores de varianza no fueron altos. Ésto indica que las fluctuaciones no fueron significativas, al preparar los compuestos y al ser recuperados en los cuatro tiempos de incubación; por lo tanto, se obtuvo un 75 % de confiabilidad.

Al realizar los análisis de varianza ANOVA bilaterales, se determina que el procedimiento experimental fue elaborado adecuadamente, ya que se obtuvieron valores de $p < 0.001$, > 0.1 y > 0.25 , y lo que señala, que se logró un 99, 90 y 75 % de confianza respectivamente; confirmando que las fluctuaciones fueron mínimas en el procedimiento de preparación, recuperación y extracción de los BZD en todos los tiempos de incubación.

7.6 Diferencia morfológica de los cisticercos

Para complementar el trabajo, se tomaron fotografías a los cisticercos en sus distintas condiciones de incubación. Ésto se hizo para tratar de observar con el microscopio estereoscópico algunas diferencias morfológicas, derivadas de las concentraciones que se utilizaron de cada compuesto.

No hay mucho material para comparar, ya que ese no era nuestro objetivo; sin embargo, se logró observar algunas imágenes representativas en donde, se demostró que existieron diferencias morfológicas entre los cisticercos control (Figura 6) y los incubados con los BZD (Tabla 9).

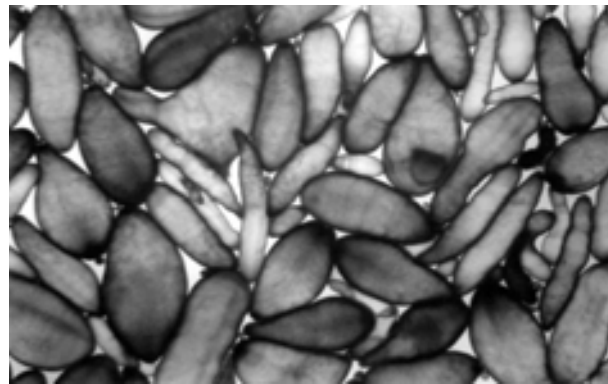


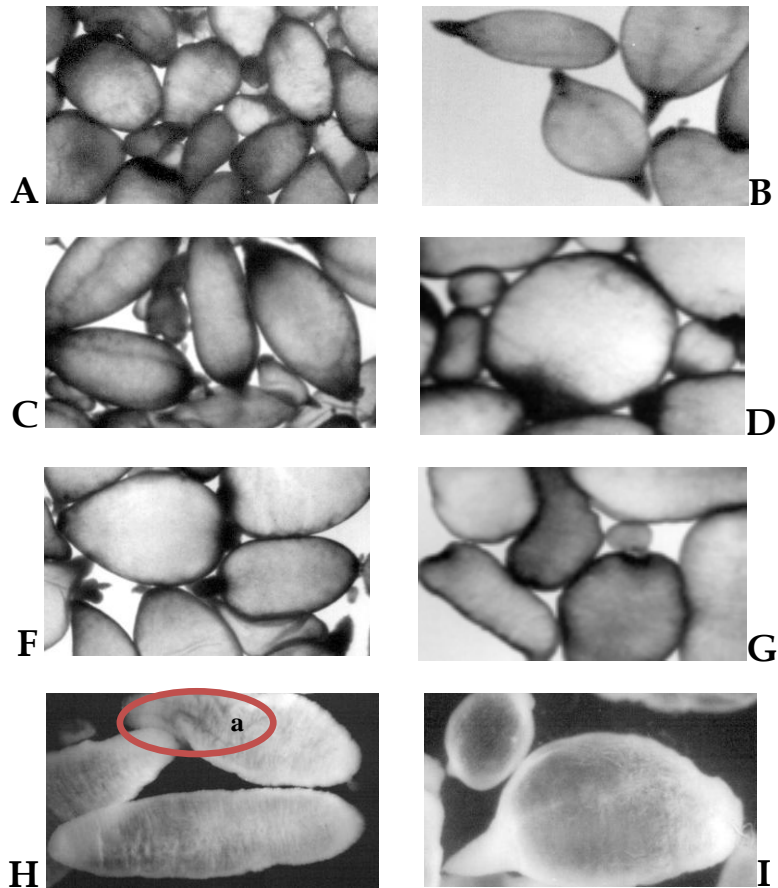
Figura 6. Cisticercos control de *T. crassiceps* cepa ORF
con una longitud de 0.5 a 1 mm

Los cisticercos que fueron incubados con el RPMI únicamente presentaron una forma alargada y al parecer con un tejido rugoso y grueso. Si observamos las imágenes de los cisticercos incubados con ABZ a un tiempo de 4 y 16 hr en las concentraciones estimadas (Tabla 9, A - D), podemos comparar que los incubados a 50 μ M (Tabla 9, B y D), se encontraban más hinchados, con el tejido delgado y con

una disposición polar; en cambio, los incubados a 25 μM (Tabla 9, A y C), no es tan evidente la figura globosa y lucen un tejido grueso y rugoso. La causa probable es que el ABZ a 50 μM logró inhibir más a la β -tubulina del tejido de los cisticercos, y esto provocó que el tejido pierda la regulación del flujo al medio de cultivo.

Tabla 9. Imágenes de cisticercos en distintas condiciones de incubación

(aumento A - G 0.8 X 2.5 X, H 3.5 X 2.5 X e I 2.5 X 2.5 X)



- A.** ABZ (25 μM) a 4 hr; **B.** ABZ (50 μM) a 4 hr; **C.** ABZ (25 μM) a 16 hr;
D. ABZ (50 μM) a 16 hr; **F.** GNV-1 (50 μM) a 8 hr; **G.** ABZ (50 μM) a 8 hr;
H. GNV-1 (25 μM) a 4 hr; **I.** GNV-1 (50 μM) a 4 hr.

Al comparar los cisticercos con la misma concentración de ABZ pero a diferente tiempo de incubación, las imágenes muestran que los cisticercos a las 4 horas (Tabla 9, A y C) estaban menos hinchados que a las 16 hr (Tabla 9, B y D). Como se sabe, la eficacia de este compuesto depende de la concentración y el tiempo de exposición del parásito al BZD.

Se comparó GNV-1 con ABZ, ambos a 50 μM a 8 hr de incubación (Tabla 9, F y G), y se detectó que los metacéstodos con GNV-1 estaban más hipotónicos que con ABZ. Esto pudo haber sucedido porque el GNV-1 es más soluble que el ABZ y por lo tanto, tuvo mayor capacidad para penetrar al interior de los cisticercos y provocar un crecimiento del tejido haciéndolo liso, delgado y con una disposición hacia los polos. Pero si comparamos GNV-1 con ABZ a 50 μM , con 8 y 16 horas de incubación respectivamente (Tabla 9, F y D), podemos observar que los cisticercos tienen una similar apariencia con ambos BZD. Sin embargo al parecer los parásitos son morfológicamente más afectados y en menor tiempo con GNV-1, que con ABZ; porque con el primer compuesto a las 8 hr se obtuvo el mismo resultado que con el segundo a las 16 hr de incubación.

Para verificar que el tejido de los cisticercos realmente cambiaba la característica de la superficie y la complejidad de éstos; se hizo un aumento de 3.5X2.5X y 2.5X2.5X. Se compararon los cisticercos a 4 hr de incubación con GNV-1 a 25 μM (Tabla 9, H) y a 50 μM (Tabla 9, I); en el primer caso eran más alargados con tejido grueso y rugoso, y en el segundo el tejido era transparente, liso y los parásitos estaban globosos.

Una cosa peculiar que se observó durante la sesión de fotos, fue que los cisticercos que fueron incubados a 0.25 y 4 horas con los BZD a 25 μM , levemente se movían (Tabla 9, H(a)); y los metacéstodos con BZD a 50 μM se vieron paralizados en todos los tiempos de incubación.

8. CONCLUSIONES

El paso de los derivados BZD frente al tejido de los cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF fue diferente; debido a que los dos derivados bencimidazólicos poseen características fisicoquímicas específicas; independientemente del tiempo de incubación y de la concentración en la que se manejaron en el cultivo *in vitro*.

Cabe señalar, que el tejido de los cisticercos permitió el transporte del GNV-1 más que el del ABZ. Esto probablemente fue porque GNV-1 presenta un balance mejor entre solubilidad acuosa y liposolubilidad, propiedades centrales para el transporte de difusión pasiva.

Lo anterior dio como consecuencia que, GNV-1 logró penetrar a los parásitos en un alto porcentaje; en cambio, el ABZ por ser escasamente soluble en agua, presentó problemas para transportarse con facilidad al interior de los parásitos. Sin embargo, el ABZ posee una liposolubilidad que le otorga la aptitud de ser permeado por el tejido y fijarse con gran fuerza a los microtúbulos y otras proteínas de transporte. (Jung, *et al.*, 1998; Sotelo y Jung, 1998; Navarrete, 2004). Por lo tanto, ambos compuestos tuvieron la capacidad de ser permeados por el tejido de los cisticercos independientemente de su solubilidad.

También se demostró que al variar las concentraciones de ABZ y GNV-1, se presentaron diferencias en la permeación durante el cultivo *in vitro*. El ABZ tuvo más presencia en el tejido que GNV-1 (ambos a 25 μM); en cambio, GNV-1 a 50 μM sobrepasó por completo en todas las muestras al ABZ.

Se demostró que, a menor concentración de los BZD mayor fue el tiempo de interacción con los cisticercos (a 25 μM los compuestos fueron aumentando su porcentaje conforme fue pasando el tiempo de incubación). Y viceversa, a mayor concentración de los compuestos, menor fue la interacción con los cisticercos de *T. crassiceps* (a 50 μM los BZD después de 8 hr de incubación mostraron una disminución del porcentaje de los compuestos). Por lo tanto, se logró el objetivo general, el cual fue la exploración del comportamiento de la permeación de los derivados BZD; ilustrado en las Gráficas (10-13) que comparan las concentraciones utilizadas en los BZD, extraídas a partir del medio de cultivo, tejido y fluido vesicular de los cisticercos en los distintos tiempos de incubación.

A pesar de no ser el objetivo del proyecto, los resultados obtenidos con las imágenes de los cisticercos, se concluye que el GNV-1 afectó de sobremanera la morfología de los parásitos, puesto que en menor tiempo de incubación se obtuvo similares o mejores resultados que con ABZ en las condiciones máximas de incubación.

Los resultados obtenidos en este trabajo, ayudan a dar un paso más en la investigación de cestodos y poder extrapolar a los parásitos que producen enfermedades de importancia para la salud pública como la NC; ya que nos dimos cuenta que el uso de otros compuestos basados en los tratamientos que se utilizan actualmente podrían mejorar el efecto antihelmíntico y disminuir las limitantes de éstos.

8.1 Perspectivas

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis, surgieron interrogantes que se pueden aplicar a siguientes proyectos, que tengan como objetivo el resolverlas y complementar esta investigación.

La pregunta que sobresalió fue saber cuáles son los efectos biológicos que poseen los derivados bencimidazólicos directamente a los cisticercos; la influencia que tiene la concentración y tiempo de incubación de los compuestos en los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

Verificar que los cisticercos tienen la capacidad de metabolizar a los BZD y determinar cuál es el compuesto que daña a los cisticercos de *T. crassiceps*, si la sustancia original o su metabolito; puesto que todavía no se tiene la información que indica cuál es el responsable de su eficacia.

Así como estas preguntas y muchas otras más que pueden surgir conforme avanza esta investigación, tal vez, se logre un acercamiento más preciso a los cisticercos de *T. solium* y de esta forma, tener una mejor comprensión y conocimiento sobre estos parásitos, que afectan directamente al hombre.

De tal manera que la finalidad de este y otros trabajos es tener las herramientas suficientes para diseñar un tratamiento eficaz contra la NC o por lo menos conseguir otras alternativas para el manejo y control de esta enfermedad de importancia para la salud pública.

Anexo I. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

A. Buffer de fosfatos 1% (PBS-1X)

Para poder preparar el amortiguador de fosfatos al 1 %, primero se tuvo que hacer el buffer al 10 % (PBS-10X).

- a) Se pesaron 2.6 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$) y también 11.5 g de fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4).
- b) Se mezclaron y agitaron en 500 mL con agua destilada, se subió la temperatura a 30 °C, con la finalidad de disolver por completo todos los fosfatos. Se agregaron 87 g de cloruro de sodio (NaCl).
- c) Se aforó a 1000 mL con agua destilada, previamente calibrado a un pH de 7.2.

El amortiguador de fosfatos a 1%, también llamado PBS-1X se preparó de la siguiente manera:

- a) Se tomó 100 mL de PBS-10X y se aforó a 1000 mL con agua destilada.
- b) Se ajustó el pH a 7.2

B. Medio de Cultivo (RPMI-1640)

El medio de cultivo (RPMI-1640) fue diseñado por Moore. Es un medio sintético de cultivo en suspensión, el cual se utiliza principalmente para el crecimiento de células, en proceso de transición permanente (linfocitos humanos). Este medio, de acuerdo a sus características no interfiere con las investigaciones. El RPMI-1640 está conformado por aminoácidos (a.a.) esenciales, a.a. no esenciales, derivados de aminoácidos, L-glutamina, vitaminas, coenzimsa, carbohidratos, lípidos, iones inorgánicos (sales), elementos inorgánicos (cobalto) y buffers indicadores de pH (Jackoby, *et al.*, 1979). (Tabla 10) El medio RPMI-1640 que se utilizó, no contenía en su fórmula bicarbonato de sodio.

La forma en cómo se preparó fue la siguiente:

Se pesaron 10.37 g del medio RPMI-1640 más 2 g de bicarbonato de sodio, se aforó a 1000 mL con agua destilada y se ajustó el pH a 7.2 con ácido clorhídrico.

- a) Una vez preparado el medio, se procedió a filtrar a través de 0.22 micras, en condiciones estériles, guardándose a 4 °C hasta su uso.

C. Preparación de los BZD

Los compuestos se trabajaron de la siguiente forma:

- a) Se pesaron 0.0133 g de ABZ y 0.013 g de GNV-1. Ambos se disolvieron por separado en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Prieto, *et al.* 1991).

NOTA: Los pasos siguientes se hicieron por separado tanto ABZ como GNV-1.

- b) Una vez disuelto el compuesto se aforó con DMSO, a 10 mL. (**solución 1**)

- c) Posteriormente se introdujo 1 mL de la solución **1**, más 1 mL de DMSO, en un nuevo matraz y se aforó a 10 mL con C₂H₅OH. **(solución 2)**
- d) De la solución **2** se tomaron 0.2 mL y se colocaron en un pozo de la caja de cultivo, más 1 mL de RPMI y 1 mL de cisticercos. **(solución 3)**

De esta manera se obtuvo una concentración de 50 µM de los derivados benzimidazólicos.

Para obtener una concentración de 25 µM de los BZD se hizo lo siguiente: en placas de cultivo (VWR Falcon) de 24 celdas, con un área de 2 cm; se agregó a cada pozo 0.1 mL de la solución **2**, más 1 mL de medio de cultivo y 1 mL de cisticercos.

D. Estándar Interno (MBZ)

El MBZ se preparó a una concentración de 10 µM de la siguiente manera:

- a) Se pesaron 0.01476 g y se aforaron en 10 mL con DMSO. **(solución 1)**
- b) Se tomó 1 mL de la solución **1** y se aforó a 10 mL con C₂H₅OH. **(solución 2)**
- c) De la solución **2** se tomaron 0.01 mL y se agregaron 0.5 mL de la muestra. Obteniendo como resultado una concentración de 10 µM. **(solución 3)**

Tabla 10. Compuestos del RPMI-1640

COMPUESTOS	AMINOÁCIDOS	DERIVADOS DE a.a.	VITAMINAS Y COENZIMAS	CARBOHIDRATOS	LÍPIDOS	IONES INORGÁ- NICOS	ELEMENTOS INORGÁNICOS	BUFFER
Arginina	1.1E-3	-	-	-	-	-	-	-
Cistina	4.2E-4	-	-	-	-	-	-	-
Glutamina	2.1E-3	-	-	-	-	-	-	-
Histidina	9.7E-5	-	-	-	-	-	-	-
Isoleucina	3.8E-4	-	-	-	-	-	-	-
Leucina	3.8E-4	-	-	-	-	-	-	-
Lisina	2.2E-4	-	-	-	-	-	-	-
Metionina	1.0E-4	-	-	-	-	-	-	-
Fenilalanina	9.1E-5	-	-	-	-	-	-	-
Treonina	1.7E-4	-	-	-	-	-	-	-
Triptófano	2.4E-5	-	-	-	-	-	-	-
Tirosina	1.1E-4	-	-	-	-	-	-	-
Valina	1.7E-4	-	-	-	-	-	-	-
Asparagina	3.3E-4	-	-	-	-	-	-	-
Aspartato	1.5E-4	-	-	-	-	-	-	-
Glutamato	1.4E-4	-	-	-	-	-	-	-
Glicina	1.3E-4	-	-	-	-	-	-	-
Prolina	1.7E-4	-	-	-	-	-	-	-
Serina	2.9E-4	-	-	-	-	-	-	-

COMPUESTOS	AMINOÁCIDOS	DERIVADOS DE a.a.	VITAMINAS Y COENZIMAS	CARBOHIDRATOS	LÍPIDOS	IONES INORGÁ- NICOS	ELEMENTOS INORGÁNICOS	BUFFER
Glutation	-	3.3E-6	-	-	-	-	-	-
Hidroxiprolina	-	1.5E-4	-	-	-	-	-	-
Biotina	-	-	8.2E-7	-	-	-	-	-
Ácido fólico	-	-	2.3E-6	-	-	-	-	-
Ácido p- amino- benzoico	-	-	7.3E-6	-	-	-	-	-
Nicotinamida	-	-	8.2E-6	-	-	-	-	-
Ácido pantoteni- co	-	-	1.0E-6	-	-	-	-	-
Piridoxina	-	-	4.9E-6	-	-	-	-	-
Riboflavina	-	-	5.3E-7	-	-	-	-	-
Tiamina	-	-	3.0E-6	-	-	-	-	-
B ₁₂	-	-	3.7E-9	-	-	-	-	-
Glucosa	-	-	-	1.1E-2	-	-	-	-
Colina	-	-	-	-	2.1E-5	-	-	-
i-Inositol	-	-	-	-	1.9E-4	-	-	-
Calcio	-	-	-	-	-	4.2E-4	-	-
Magnesio	-	-	-	-	-	4.1E-4	-	-
Potasio	-	-	-	-	-	5.4E-3	-	-
Sodio (I)	-	-	-	-	-	1.4E-1	-	-

COMPUESTOS	AMINOÁCIDOS	DERIVADOS DE a.a.	VITAMINAS Y COENZIMAS	CARBOHIDRATOS	LÍPIDOS	IONES INORGÁ- NICOS	ELEMENTOS INORGÁNICOS	BUFFER
Cloruro (I)	-	-	-	-	-	1.1E-1	-	-
Nitrato (II)	-	-	-	-	-	8.4E-4	-	-
Fosfato (III)	-	-	-	-	-	5.6E-3	-	-
Sulfato (II)	-	-	-	-	-	4.2E-4	-	-
Cobalto (II)	-	-	-	-	-	-	3.7E-9	-
Bicarbonato (I)	-	-	-	-	-	-	-	2.4E-2
CO ₂	-	-	-	-	-	-	-	5 %
Rojo fenol	-	-	-	-	-	-	-	1.4E-5

Los compuestos están expresados en moles por litro, la notación exponencial esta abreviada con la letra "E", las valencias de los compuestos están representadas con números romanos (Jackoby, *et al.*, 1979).

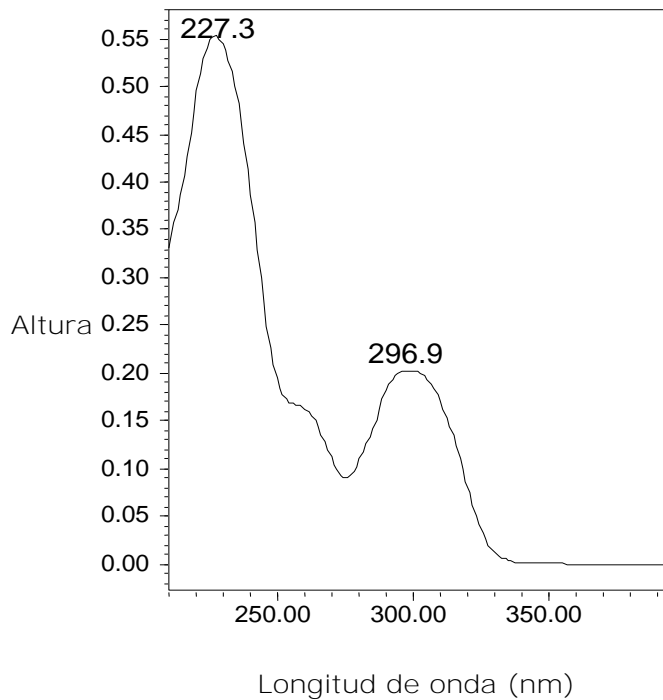
Anexo II. GRÁFICAS DEL HPLC

En este anexo se muestran las gráficas obtenidas en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución de los BZD, junto con el espectro ultravioleta (UV). Lo cual indica a que longitud de onda detectó el cromatógrafo a los derivados BZD.

A. Albendazol

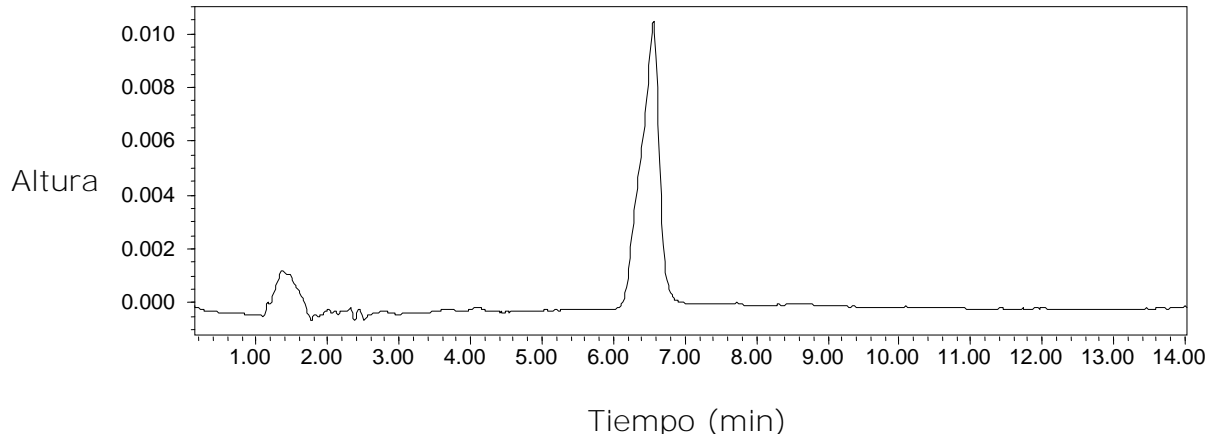
El ABZ se analizó por el HPLC con una columna C 18 en gradiente de fase móvil (ACN y H₂O). Se obtuvieron las siguientes Gráficas (18 a la 21).

Gráfica 18. Espectro UV del ABZ

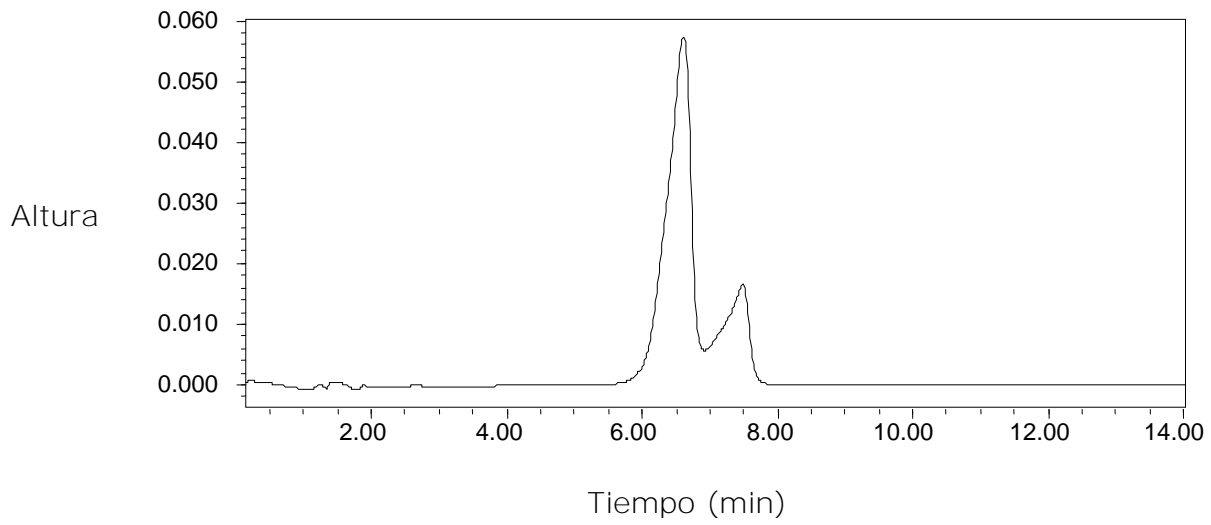


En esta gráfica se observa un pico inicial que es la fase móvil que se utiliza en el cromatógrafo, la siguiente curva es la absorbencia del ABZ (296.9 nm).

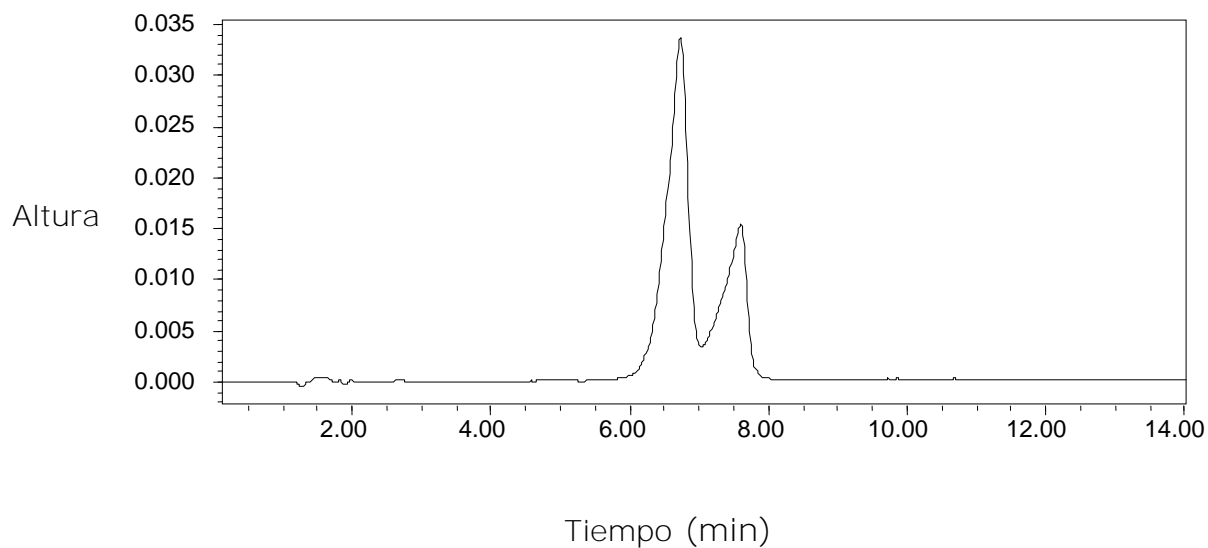
Gráfica 19. ABZ con tiempo de retención de 6.63 min



Gráfica 20. ABZ 50 μM en 6.63 min y MBZ 10 μM en 7.70 min



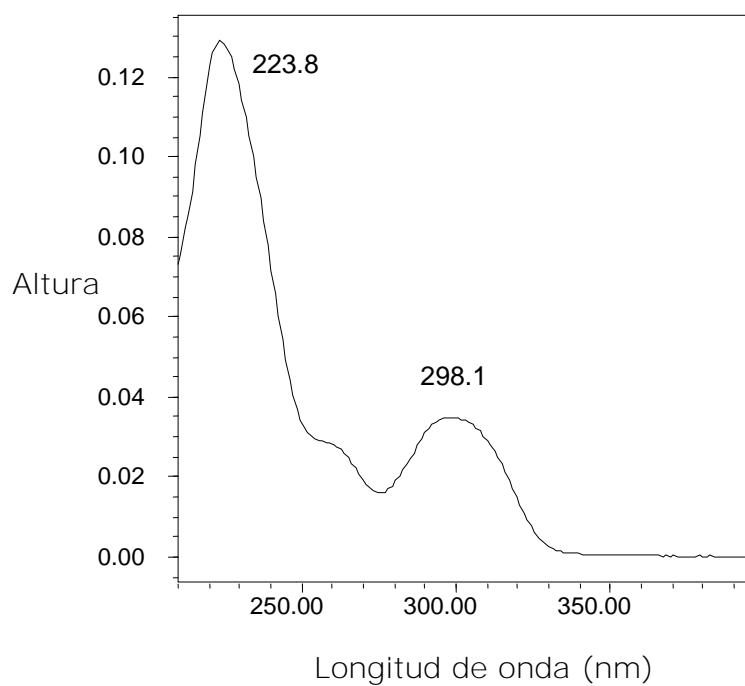
Gráfica 21. ABZ 25 μ M y MBZ 10 μ M en 7.70 min



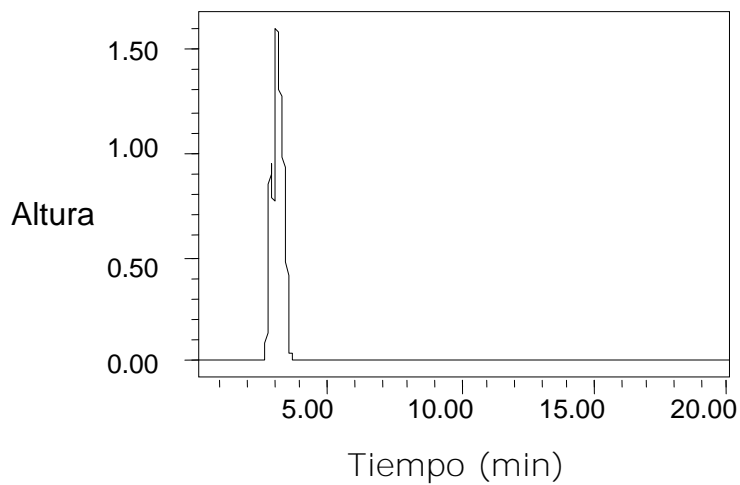
B. Sulfóxido de Albendazol

Se determinó el ABZSO con la finalidad de saber en qué tiempo de retención salía y asegurarse que no era el metabolito del ABZ el que se recuperó, sino el ben-
cimidazol. (Gráfica 22 y 23)

Gráfica 22. Espectro UV de ABZSO



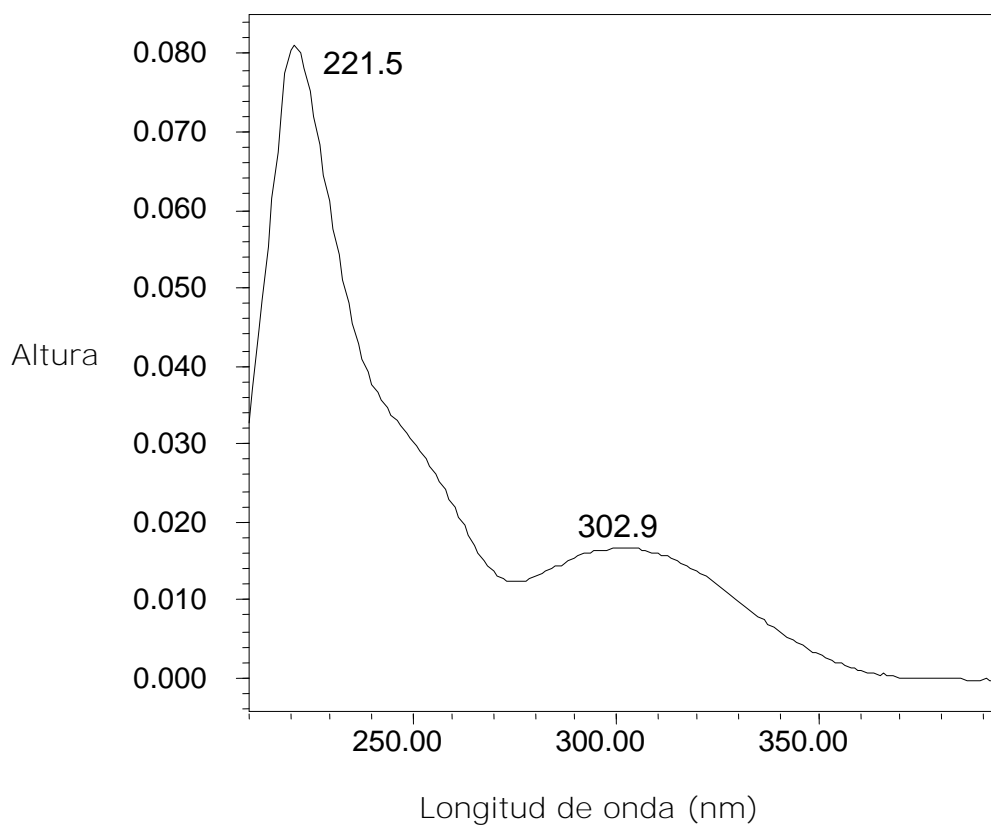
Gráfica 23. ABZSO con tiempo de retención 6.38 min



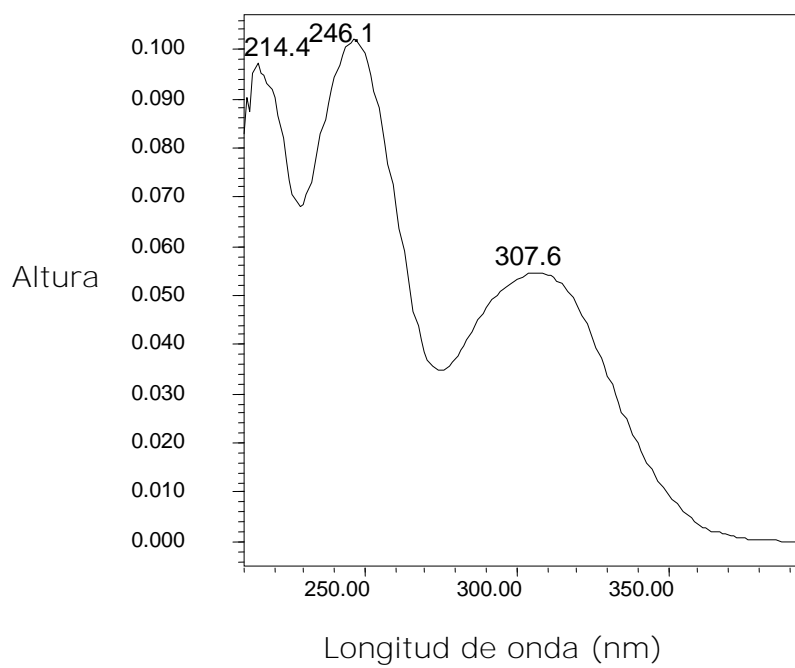
C. Mebendazol

El MBZ como ya se mencionó, es el BZD que se utilizó como estándar interno a una concentración de 10 μM ; no obstante, tuvo tiempos de retención de 4.17 y 7.70 min y longitudes de ondas distintas, porque se utilizaron dos columnas distintas (C 8 y C 18). (Gráfica 24 a la 26)

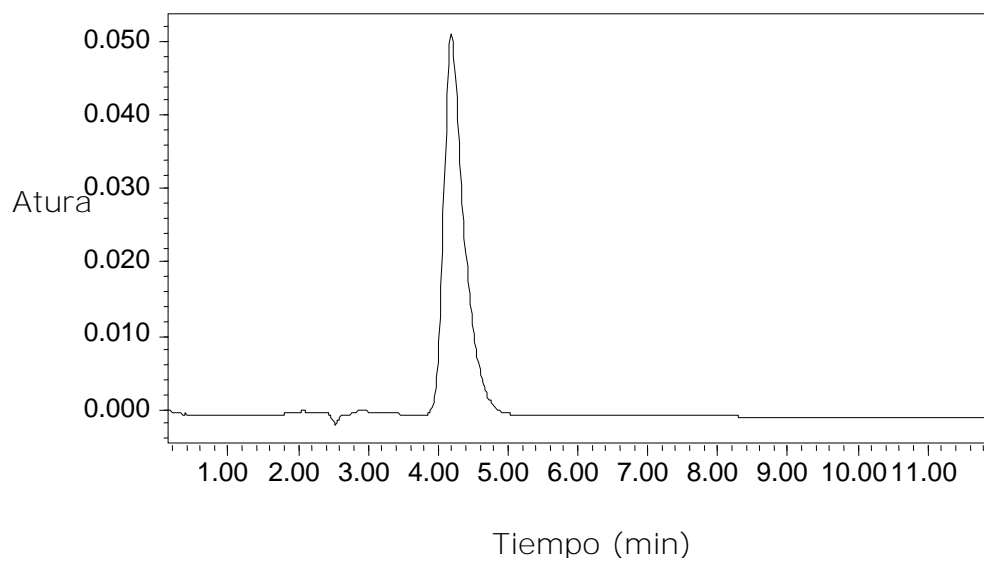
Gráfica 24. Espectro UV MBZ 10 μM (columna C 18)



Gráfica 25. Espectro UV MBZ 10 μ M (columna C 8)



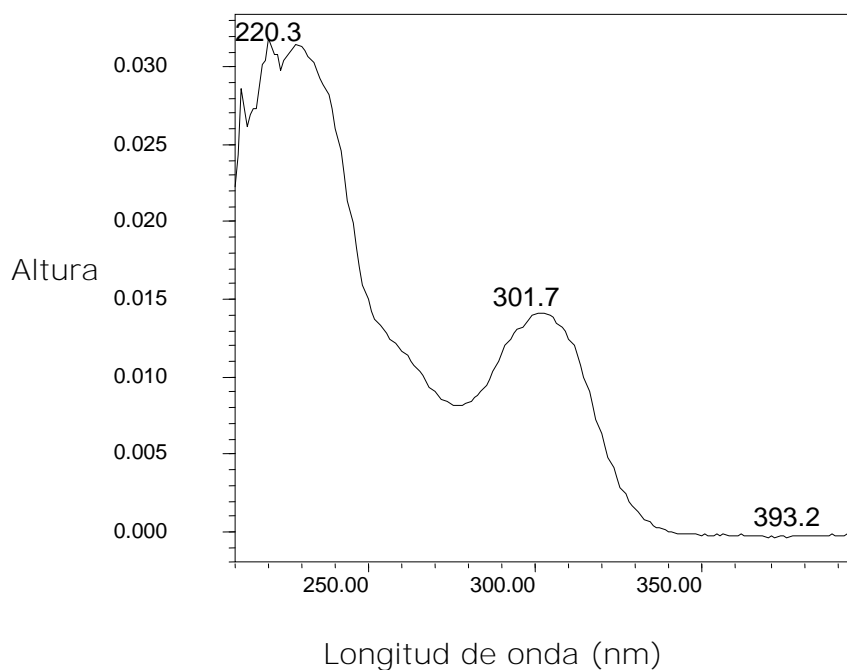
Gráfica 26. MBZ 10 μ M en un tiempo de retención 4.17 min (columna C 8)



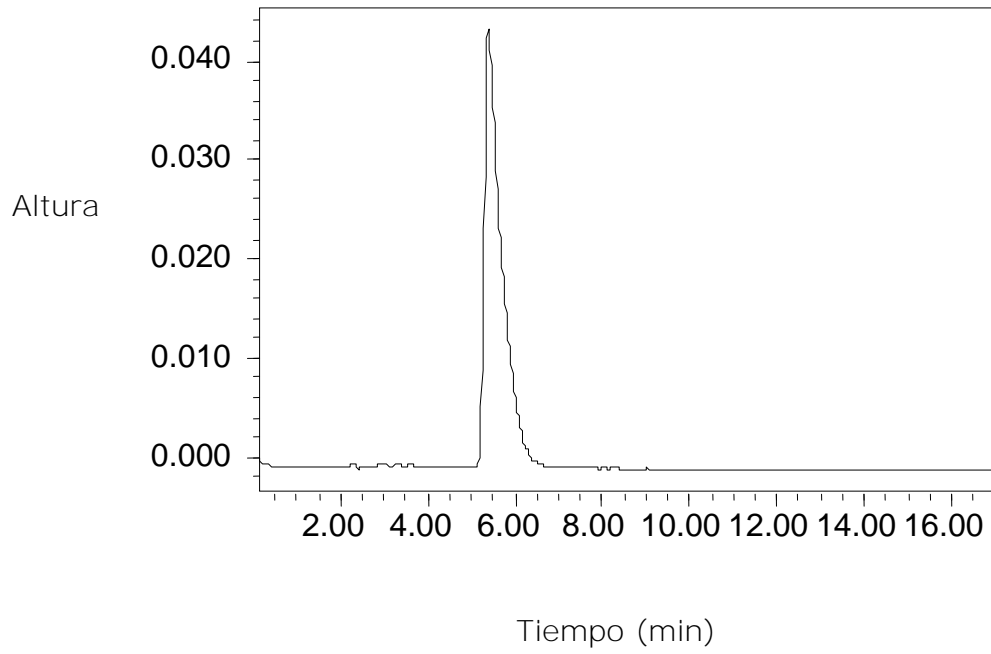
D. GNV-1

El GNV-1 se analizó en el HPLC con una fase móvil (ACN & H₂O) isocrática, con una columna C 8 obteniendo una longitud de onda de 301.7 nm, en un tiempo de retención de 5.80 min. (Gráficas 27 a la 30)

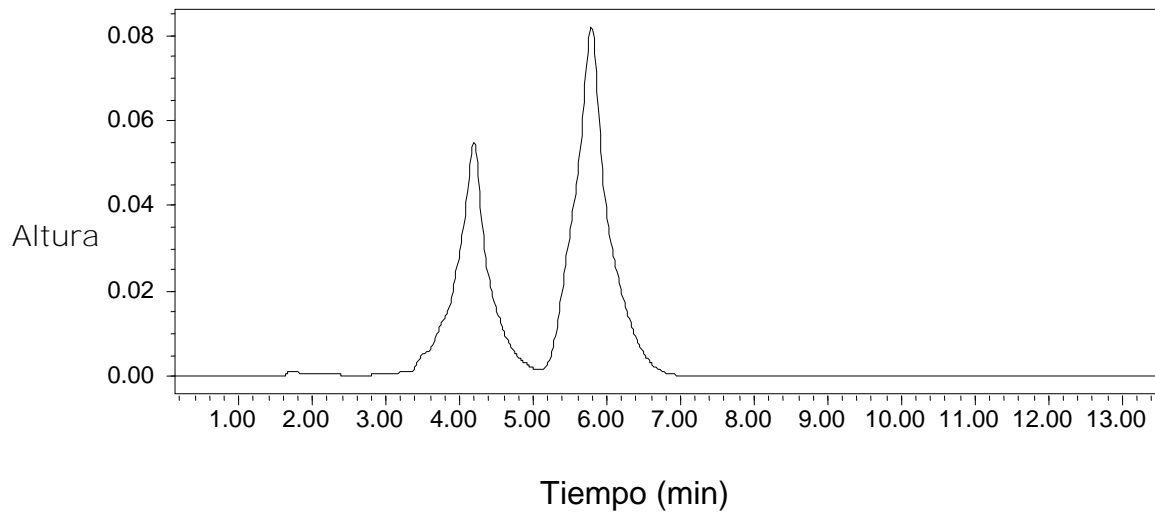
Gráfica 27. Espectro UV del GNV-1



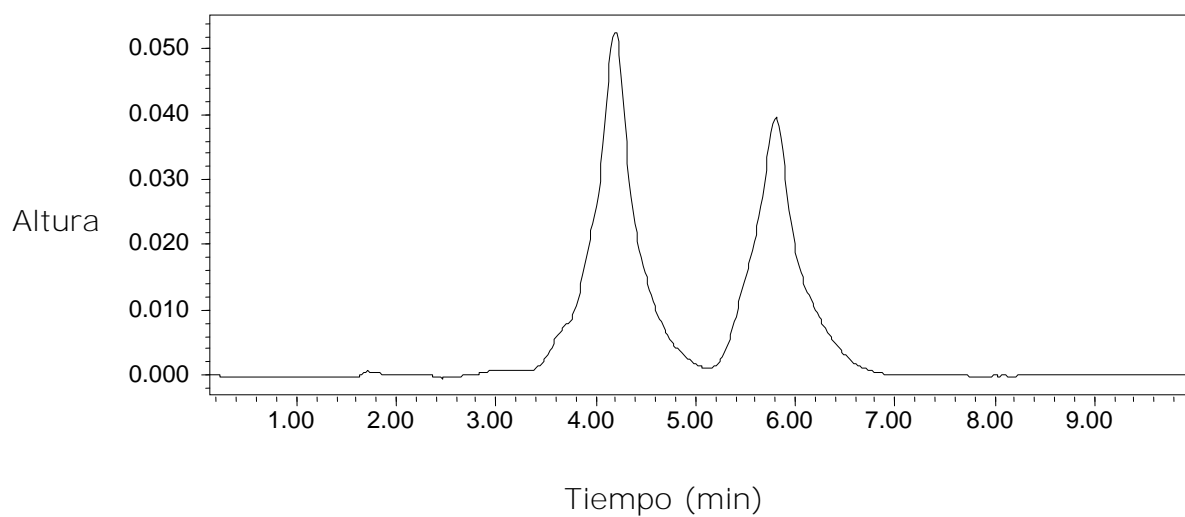
Gráfica 28. GNV1 con tiempo de retención 5.80 min



Gráfica 29. GNV-1 50 μ M en 5.80 min y MBZ 10 μ M en 4.17 min



Gráfica 30. GNV-1 25 μM y MBZ 10 μM en 4.17 min



No es representativa la altura del pico, porque la técnica que se utilizó para calcular la concentración de los compuestos no necesitó de ella; sino del área bajo la curva de los compuestos.

BIBLIOGRAFÍA

- Flisser Ana y Malagón Filiberto., *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México*, Limusa, México. (1989) pp 3-5 y 199-203.
- Freeman Reinos S. "Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (zedler, 1800) rudolphi, 1810 (cestoda)." *Canadian Journal of Zoology*, Vol. 40, (1962) pp 969-990.
- Hardman Joel G., Limbird Lee E., Gilman Alfred G., *Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica.*, ed. 9, Ed. McGraw-Hill/Interamericana de España, 2001 pp. 1077-1087.
- Horton R. J., "Benzimidazoles in a wormy world", *Parasitology Today*, Vol. 6, No. 4, (1990) pp 1.
- Hustead S. T., y Williams J. F., "Permeability studies on Taeniid metacestodes: I. Uptake of proteins by larval stages of *Taenia taeniaformis*, *Taenia crassiceps*, and *Echinococcus granulosus*", *The Journal of Parasitology*, Vol. 63, No. 2, (1977) pp 314-321.
- Illera M. M., Illera del Portal J. C., Illera Ma. J., *El ratón y la rata.*, Ed. Universidad Complutense, Madrid. (1991) pp 35-123.
- Jackoby W. B., y Pastan I. H. *Methods in enzymology*, Vol. LVIII *Cell Culture*, Ed. Academic Press, INC. California. (1979) pp 44-93
- Jiménez C. Blanca E., Chavez M. Alma., Barrios P. José A., Maya R. Catalina., Salgado V. Germán., *Curso: Determinación y cuantificación de Huevos de Helminto, Técnica Norma Oficial NMX-AA-113-SCFI-1999*, Ed. Instituto de Ingeniería, UNAM. México. (2001) pp 13-22.
- Jiménez E. Pedro I., "Producción y papel de las hormonas esteroides sexuales en los cisticercos *T. solium* y *T. crassiceps*". Trabajo de grado (Doctorado en Ciencias), Medicina Facultad de Veterinaria Zootecnia UNAM. México. (2006) pp 98.

- Jung H., Medina L., García L., Fuentes I. y Moreno-Esparza R. "Absorption studies of albendazole and some physicochemical properties of the drug and its metabolite albendazole sulphoxide", *Journal Pharmacodynamic. Pharmacology*. Vol. 50, (1998) pp 43-48.
- Kroeze W. K. y Freeman R. S. *Taenia crassiceps*: fate of Cysticerci following ingestion by the mouse", *Experimental Parasitology*, Vol. 54, (1982) pp 425-431.
- Larralde Carlos., De Aluja Aline S., et al., [Libro en línea], "Cisticercosis, guía para profesionales de la salud, Ed., Fondo de Cultura Económica, (2006) pp. 19-33 y 41-127. Disponible en: <http://www.lab.biomedicas.unam.mx/cistimex/s1/CistiBook.pdf>
- Larry Roberts S. y Jonauy John., *Foundations of Parasitology*, ed. 5°, Ed. Wm. C. Brown. USA. (1996) pp 297-323.
- Mottier M. L., Alvarez L. I., Pis M. A. y Lanusse C. E., "Transtegumental diffusion of benzimidazole anthelmintics into *Moniezia benedeni*: correlation with their octanol-water partition coefficients" *Experimental Parasitology*, Vol. 04, (2003) pp 1-7.
- Navarrete V. Juan G., "Síntesis de derivados del 1-metilbencimidazol con actividad antihelmintica potencial". Trabajo de grado (Doctorado en Ciencias), Posgrado Ciencias Químicas UNAM. México. (2004) pp 222.
- Prieto J. G., Justel A., Del Estal J. L., Barrio J. P. y Alvarez A. I., "Comparative study on gastric absorption of albendazole and mebendazole in rats" *Component Biochemistry Physiology* Vol. 100C, No. 3, (1991) pp 397-400.
- Redondo P. A., Álvarez A. I., García J. L., Villaverde C. y Prieto J. G., "Influence of surfactants on oral bioavailability of albendazole base on the formation of the sulphoxide metabolites in rats", *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, Vol. 19, (1998) pp 65-70.
- Ruppert Edward E. y Barnes Robert D., *Zoología de los invertebrados*, ed. 6°, Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. México. (1996) pp 213-255.

- Schiller Everett L., "Morphologic anomalies in scoleces of larval *Taenia crassiceps*." *The Journal of Parasitology*, Vol. 59, No. 1, (1973) pp 122-129.
- Sharma S., "Design of new drugs for helminth diseases: lead optimization in benzimidazoles", *Advances in Drug Research*, Vol. 25, (1994) pp 103-172.
- Smith Thomas M. y Smith Robert L., *Ecología*, ed. 6º, Ed. Pearson Addison Wesley, España. (2007) pp 327-333
- Sotelo J. y Jung H., "Pharmacokinetic of the treatment of neurocysticercosis", *Clinical Pharmacokinetics*, Vol. 36, No. 6, (1998) pp 503-515.
- Threadgold L. T., and Dunn J., "*Taenia crassiceps*: Regional variations in ultrastructure and evidence of endocytosis in the cysticercus' Tegument," *Experimental Parasitology*, Vol. 55, (1983) pp 121-131.
- Toledo A., Cruz C., Fragoso G., Laclette J. P., Merchant M. T., Hernández M., and Sciutto E., "In vitro culture of *Taenia crassiceps* larva cells and cyst regeneration after injection mice." *Journal Parasitology*, Vol 83, No. 2, (1997) pp 189-193.
- Townsend L. B. y Wise D. S., "The synthesis and chemistry of certain antihelmintic benzimidazoles", *Parasitology Today*, Vol. 6, No. 4, (1990) pp 107-124.
- Valdez J., Cedillo R., Hernández-Campos A., Yépez L., Hernández-Luis F., Navarrete-Vázquez G., Tapia A., Cortés R., Hernández M., and Castillo Rafael., "Synthesis and antiparasitic activity of 1H-Benzimidazole derivatives", *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, Vol.12, (2002) pp 2221-2224.
- Willms Kaethe y Sotelo Julio., *Principles and Practice of Clinical Parasitology*, Ed. Jhon Wiley and Sons Lid. USA. (2001) pp 613-633.
- Wonnacott T. H. y Wonnacott R. J., *Introducción a la estadística*, ed. 5ª, Ed. Limusa. México. (1997) pp 375-402, 619-632