

00570



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO FACULTAD DE QUIMICA

"ESTUDIOS DE UNION Y AFINIDAD DEL ALBENDAZOL SOBRE TRES MODELOS DIFERENTES DE TUBULINA"

T E S I S QUE PARA OBTENER EL GRADO DE: MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS QUIMICA FARMACEUTICA PRESENTA: Q.F.B. EDUARDO ALCANTARA PRIEGO

281717

MEXICO, D. F.

2000





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 DESIGNADO

Presidente: Dr. Rafael Castillo Bocanegra.	Facultad de Química, UNAM
Primer Vocal: Dr. Jaime Lagunes Otero.	Instituto de Química, UNAM
Secretario: Dra. Helgi Jung Cook.	Facultad de Química, UNAM
Primer Suplente: Dra. Ofelia Espejo González.	Facultad de Química, UNAM
Segundo Suplente: Dr. Francisco Hernández Luis.	Facultad de Química, UNAM

Este trabajo de tesis se realizó en los Laboratorios No. 122, Conjunto "E" del Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, y 25, 26 del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) Zacatenco, IPN.

TUTOR DE TESIS:



Dr. Roberto M. Cedillo Rivera.

COTUTOR DE LA PARTE QUIMICA:



Dr. Rafael Castillo Bocanegra.

COTUTOR DE LA PARTE BIOLÓGICA:



M. en C. Rafael Cortés Zarate.

SUSTENTANTE:



Q.F.B. Eduardo Alcántara Priego.

"Gracias Dios por haber estado a mi lado desde el principio hasta el final de esta meta, no fue fácil, las dudas siempre se me presentaron pero, gracias a usted Señor, por fin puedo decir ahora que: las vendas ya cayeron de mis ojos, las dudas se desvanecieron y una sensación de tranquila certidumbre ocupó su lugar"

"En el ir y venir de las cosas he comprendido que aunque Dios no juega a los dados el destino, sin embargo, mezcla las cartas y nosotros sólo jugamos"

"Recordemos siempre que la Ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo progreso"

"Nosotros podemos disfrutar de las bondades que ofrece la naturaleza porque el mundo fue construido ordenadamente y los átomos se mueven con armonía"

¡EL RECONOCIMIENTO!

Dedico con todo mi amor y cariño este arduo trabajo a mis Padres, ya que ellos siempre me apoyaron nunca me fallaron y estuvieron en todo momento a mi lado desde el principio hasta el final de este proyecto. Reconozco el empeño y el esfuerzo que ustedes invirtieron en mi para hacerme una persona útil a la sociedad, por lo que a ustedes les debo todo lo que soy y seré.

¡Celebren Papas porque este triunfo también es de ustedes!
Muchas Gracias.

Dedico también la culminación de esta obra a una persona que admiro y de la cual estoy muy orgulloso: mi esposa Marisa Elena. Le agradezco porque siempre estuvo a mi lado, brindándome siempre su gran apoyo que resultó fundamental para la culminación de este proyecto. Gracias muñeca con todo mi amor y cariño para ti.

A mis hermanos: René y Fernando para que al igual que yo también puedan alcanzar las metas que tanto anhelan.

“Soñemos, quizá entonces hallaremos la verdad...pero abstengámonos de publicar nuestros sueños antes de haberlos puesto a prueba con la mente despierta”

AGRADECIMIENTOS.

- Agradezco afectuosamente al Dr. Roberto Manuel Cedillo Rivera quien confió en mí, desde un principio, para la realización de este proyecto.
- Agradezco también en forma muy especial, al Dr. Rafael Castillo Bocanegra, por el apoyo académico, la orientación, la motivación y el tiempo que me brindó, ya que para mí fueron muy importantes en la culminación de este proyecto.
- Agradezco también al Dr. Francisco Hernández Luis y al Dr. Eugene Bratoeff por la asesoría académica, sus sabios consejos y por ser excelentes personas.
- Gracias a la M. en C. María Alicia Hernández Campos y a mis compañeros y amigos del laboratorio No. 122 por su ayuda y sus comentarios.
- Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al M. en C. Rafael Cortés Zárate por todo su apoyo, por haber sido mi "socio académico" en la realización de este gran proyecto y por su amistad y confianza. ¡Muchas Gracias Rafa!
- Quiero también agradecer al Dr. José Manuel Hernández Hernández, a Carlos García, Armando Pérez, Jorge Tonathiú y Fortunato por haberme brindado su confianza y apoyo para poder trabajar en las instalaciones del laboratorio 25 y 26 del Departamento de Biología Celular del Cinvestav, IPN.
- Gracias a la Dra. Helgi Jung Cook, y a los M. en C. Inés Fuentes y Manuel Morales por haberme apoyado con las instalaciones y equipos del laboratorio de Biofarmacia.
- Al personal que labora en el USAI por la realización de los espectros de IR, RMN y EM, les estoy muy agradecido.

- Muchas gracias al CONACYT por la beca que me otorgó para la realización de mis estudios de Posgrado.

FINALMENTE AGRADEZCO TAMBIEN EN FORMA ESPECIAL:

*A Pharmacia & Upjohn por haberme dado la oportunidad de aplicar por vez primera mis conocimientos en el campo profesional y por haberme permitido ingresar a este gran ambiente de trabajo, así como también, a todos mis compañeros de trabajo del área de producción.

*A nuestros amigos-compadres: Bastida, Santillana, Murakami y Ayala por su gran amistad.

*Por su gran apoyo y cariño a mis tios: Maruca, Alba, Nury, Mirena y Chato, así como también a mis primos: Horacio, Alejandro, Daniel y Manolo a los que les mando un afectuoso saludo.

*A mis grandes amigos: Felipe, Ricardo, Alejandro, Juanelo, Marlene, Lulú, los hermanos Rodríguez, Olea y Leon por nuestros grandes momentos en Colonial.

*Y a mis amigos de la Facultad: Lino y Saul a los cuales muy pronto volveré a ver.

¡A TODOS USTEDES SINCERAMENTE, MUCHAS GRACIAS!

SU AMIGO DE SIEMPRE:

EDUARDO ALCANTARA PRIEGO.

PARA TI MI QUERIDA FACULTAD DE QUIMICA
POR LA FORMACION PROFESIONAL Y LOS
GRANDES MOMENTOS.

INDICE

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES.....	6
2.1.- HELMINTOS.....	6
2.2.- <i>Giardia lamblia</i>	6
2.3.- MICROTUBULOS Y TUBULINA.....	8
2.4.- BENCIMIDAZOLES.....	11
2.5.- ALBENDAZOL.....	16
2.6.- LA LEY DE ACCION DE MASAS.....	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
HIPOTESIS.....	22
3. OBJETIVOS.....	23
3.1.- OBJETIVO GENERAL.....	23
3.2.- OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
METAS.....	24
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	25
4.1.- PARTE QUIMICA.....	25
4.1.1.- Ruta Sintética 1.....	25
4.1.2.- Ruta Sintética 2.....	33
4.1.3.- Ruta Sintética 3.....	36
4.1.4.- El [³ H]Albendazol (VII-T).....	37

4.1.5.- Análisis de la solución de [³ H]albendazol por espectrofotometría.....	40
4.1.6.- Determinación de la pureza absoluta de la solución de [³ H]albendazol por HPLC.....	43
4.1.7.- Determinación de la actividad específica de la solución de [³ H]albendazol.....	45
4.2.- PARTE BIOLÓGICA.....	47
4.2.1.- La Tubulina de cerebro de rata.....	47
4.2.2.- La Tubulina de <i>Giardia lamblia</i>	48
4.2.3.- La Tubulina de <i>Ascaris suum</i>	50
4.2.4.- Cuantificación proteica de las muestras de tubulina de cerebro de rata, <i>Giardia lamblia</i> y <i>Ascaris suum</i> a través del método de micro Bradford en placa de ELISA.....	51
4.2.5.- Electroforesis Realizadas en gel de poliacrilamida a las muestras de tubulina de cerebro de rata, <i>Giardia lamblia</i> y <i>Ascaris suum</i>	54
4.2.6.- Identificación de las muestras de tubulina de cerebro de rata, <i>Giardia lamblia</i> y <i>Ascaris suum</i> por el método de inmunoelectrotransferencia con luminol.....	57
4.2.7.- Determinación de la pureza de las muestras de tubulina de cerebro de rata, <i>Giardia lamblia</i> y <i>Ascaris suum</i> a través del programa de análisis densitométrico Sigma-Gel.....	59
4.3.- LOS EXPERIMENTOS DE UNIÓN Y AFINIDAD.....	60
4.3.1.- Preparación de las diluciones de la solución de [³ H]albendazol.....	60
4.3.2.- Preparación de las diluciones de las muestras de tubulina para ajustar la concentración final a 0.222 µg/µl.....	61
4.3.3.- El experimento de unión de las muestras de tubulina de cerebro de rata, <i>Giardia lamblia</i> y <i>Ascaris suum</i> con el albendazol.....	62
4.3.4.- Cálculos y Gráficas.....	66

5. RESULTADOS	69
5.1.- PARTE QUIMICA	70
5.1.1.- Tabla de caracterizacion de los compuestos intermediarios sintetizados, del albendazol y del 6-bromo albendazol.....	70
5.1.2.- Tabla de datos espectroscópicos de los compuestos intermediarios sintetizados, del albendazol y de la solución de [³ H]albendazol.....	71
5.1.3.- Resultados analíticos obtenidos con la solución de [³ H]albendazol..	73
5.2.- PARTE BIOLOGICA	78
5.2.1.- Resultados electroforéticos obtenidos con la muestra de tubulina de cerebro de rata.....	78
5.2.2.- Resultados electroforéticos obtenidos con la muestra de tubulina de <i>Giardia lamblia</i>	79
5.2.3.- Resultados electroforéticos obtenidos con la muestra de tubulina de <i>Ascaris suum</i>	80
5.2.4.- Resultados de la curva patrón de albúmina sérica de bovino con el reactivo de Bradford que se utilizó para la cuantificación de las muestras de tubulina de cerebro de rata, <i>Giardia lamblia</i> y <i>Ascaris suum</i>	81
5.2.5.- Resultados de la cuantificación de las muestras de tubulina de cerebro de rata, <i>Giardia lamblia</i> y <i>Ascaris suum</i> por el método del reactivo de Bradford.....	82
5.2.6.- Resultados obtenidos con la identificación de las muestras de tubulina de cerebro de rata, <i>Giardia lamblia</i> y <i>Ascaris suum</i> en película fotográfica por el método de inmunoelectrotransferencia con luminol.....	84
5.2.7.- Resultados obtenidos en la determinacion de la pureza en tubulina de las muestras de tubulina de cerebro de rata, <i>Giardia lamblia</i> y <i>Ascaris suum</i> a través del programa Sigma-Gel.....	85

5.3.- LOS EXPERIMENTOS DE UNION Y AFINIDAD.....	88
5.3.1.- Recálculo de la actividad específica de la solución de [³ H]albendazol al día del experimento de unión.....	88
5.3.2.- Resultados obtenidos en los experimentos de unión de la tubulina de cerebro de rata con el albendazol.....	90
5.3.3.- Resultados obtenidos en los experimentos de unión de la tubulina de <i>Giardia lamblia</i> con el albendazol.....	93
5.3.4.- Resultados obtenidos en los experimentos de unión de la tubulina de <i>Ascaris suum</i> con el albendazol.....	95
5.3.5.- Gráfica de unión en pmol/mg vs. concentración micromolar de albendazol para los tres modelos de tubulina: cerebro de rata, <i>Giardia lamblia</i> y <i>Ascaris suum</i>	99
5.3.6.- Cálculos de las constantes de los experimentos de unión albendazol-tubulina para los tres modelos de tubulina: cerebro de rata, <i>Giardia lamblia</i> y <i>Ascaris suum</i>	100
5.3.7.- Resultados comparativos en unión y afinidad para el complejo albendazol-tubulina de los tres modelos experimentales propuestos.....	112
6. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS.....	113
6.1.- PARTE QUIMICA.....	113
6.2.- PARTE BIOLOGICA.....	119
6.3.- EL EXPERIMENTO DE UNION.....	123
7. CONCLUSIONES.....	126
8. BIBLIOGRAFIA.....	128
APENDICES.....	134
APENDICE I. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	135

1.- INSTRUMENTACION.....	136
2.- CROMATOGRAFIA.....	136
3.- REACTIVOS Y DISOLVENTES.....	137
4.- SOLUCIONES, AMORTIGUADORES Y MEDIO DE CULTIVO.....	138
5.- EQUIPOS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS EN LA PARTE BIOLÓGICA.....	142
6.- PARTE RADIOLÓGICA.....	144
APENDICE II. GRÁFICAS Y CROMATOGRAMAS.....	146
APENDICE III. ESPECTROSCOPIA.....	152

RESUMEN

El albendazol se ha utilizado con éxito para el tratamiento de las helmintosis intestinales tanto en el campo clínico como en el veterinario. También se le ha reconocido su actividad letal contra los trofozoitos de *Giardia lamblia* en estudios realizados *in vitro*, así como su aplicación en el campo clínico como un agente anti $giardi$ ásico efectivo. Su principal mecanismo de acción se basa en la capacidad que tiene a unirse a la tubulina inhibiendo de esta forma su polimerización hacia microtúbulos.

El objetivo de este trabajo fue demostrar que tanto la tubulina del helminto *Ascaris suum*, como la del protozooario *Giardia lamblia*, muestran una unión y afinidad preferencial por el albendazol en comparación con la tubulina de cerebro de rata.

Para estos estudios se sintetizó [^3H]albendazol a través de la trititación directa del compuesto precursor, el 6-bromoalbendazol, con [^3H]borohidruro de sodio; así como también se aislaron, cuantificaron e identificaron las muestras de tubulina procedentes de cerebro de rata, *Giardia lamblia* y *Ascaris suum*.

De la cuantificación de la unión como función de la concentración de albendazol se obtuvieron los valores de B_{max} : 803, 1314 y 2301 pmol/mg para Rata, *Giardia* y *Ascaris* respectivamente. El cálculo de las constantes que determinan la afinidad ligando-receptor para la formación del complejo albendazol-tubulina proporcionó los siguientes valores de K_d , K_a y C_{mineq} (concentración mínima de albendazol para alcanzar el equilibrio en la formación del complejo albendazol-tubulina): 15.144 μM , 0.066 μM^{-1} y 0.3026 μM para Rata; 12.307 μM , 0.0812 μM^{-1} y 0.1186 μM para *Giardia*; y 8.38 μM , 0.1193 μM^{-1} y 0.0308 μM para *Ascaris*. Estos resultados claramente demuestran que la tubulina de estos parásitos unen más y con mayor afinidad albendazol, que la tubulina de origen mamífero. De esta manera se demuestra la existencia de una toxicidad selectiva que el albendazol exhibe por estos parásitos, y su valor quimioterapéutico en el tratamiento de las infecciones intestinales.

ABSTRACT

Albendazole has been used successfully in the treatment of intestinal helminthic infections in humans, as well as in animals. Its lethal activity against *Giardia lamblia* trophozoites *in vitro*, and *in vivo*, has also been recognized. The primary mode of action of albendazole involves its binding capacity for tubulin, thus inhibiting its polymerization into microtubules.

The objective of the present work was to demonstrate that helminthic tubulin from *Ascaris suum*, as well as protozoan tubulin from *Giardia lamblia* shows a preferential binding and affinity for albendazole, than that of mammalian tubulin from rat brain.

For this purpose we first synthesized [³H]albendazole by treatment of 6-bromoalbendazole with sodium [³H]borohydride; then we isolated, quantified, and identified tubulin from the three species above.

The binding quantification, as an albendazole concentration function, gave the following B_{max} data: 803, 1314, and 2301 pmol/mg for rat, *Giardia*, and *Ascaris* respectively. The calculation of the constants that determine the ligand-receptor affinity for the albendazole-tubulin complex gave the following K_d, K_a and C_{mineq} (minimum albendazole concentration to reach equilibrium in the albendazole-tubulin complex formation) data: 15.144 μM, 0.066 μM⁻¹ and 0.3026 μM for rat brain tubulin; 12.307 μM, 0.0812 μM⁻¹, and 0.1186 μM for *Giardia* tubulin; 8.38 μM, 0.1193 μM⁻¹ and 0.0308 μM for *Ascaris* tubulin. These results clearly demonstrate that tubulin from the parasites tested binds more and with a higher affinity to albendazole, than tubulin from a mammal organism. Therefore, these results explain the selective toxicity of albendazole for these intestinal parasites, and its chemotherapeutic value in the treatment of intestinal parasitic infections.

1. INTRODUCCION

Los helmintos son los agentes causales de una extensa lista de enfermedades debilitantes, deformantes y mortales que aquejan al hombre y a los animales domésticos.^{1,2} Se han reconocido a las infecciones helmínticas (helmintosis)³ por su impacto económico en el ganado doméstico y es probablemente por esta razón que los avances más importantes en la quimioterapia de las helmintosis han venido del área de salud animal, ya que el tratamiento oportuno de las infecciones helmínticas en el ganado da como resultado una mayor ganancia en peso de estos animales.²

Las infecciones helmínticas más comunes pueden ser tratadas con alguno de estos cinco fármacos: albendazol, mebendazol, dietilcarbamazina, ivermectina y prazicuantel⁴ (figura No.1). En la mayoría de las infecciones helmínticas de tipo gastrointestinal, el albendazol y el mebendazol han sido los más utilizados por su eficacia y pocos efectos adversos; entre éstos, el albendazol se ha caracterizado por ser el bencimidazol con el espectro antihelmíntico más amplio que se ha obtenido hasta la fecha.⁵

Así como las helmintosis afectan a millones de personas en el mundo entero, existe otra infección de particular importancia, la giardiosis,³ que es ocasionada por el protozoo flagelado *Giardia lamblia* en el intestino delgado y cuya parasitosis es reconocida entre las diez más importantes que afectan al ser humano;⁴⁰ ésta, junto con el nematodo *Ascaris lumbricoides*, son la causa más común de parasitosis en países del tercer mundo.^{6,7}

La giardiosis se manifiesta con una serie de síntomas característicos que van desde infecciones asintomáticas, a cuadros de diarrea crónica, pérdida de peso en niños, calambres e hinchazón abdominal, náusea, anorexia, flatulencia y síndrome de absorción intestinal deficiente.⁸⁻¹⁰

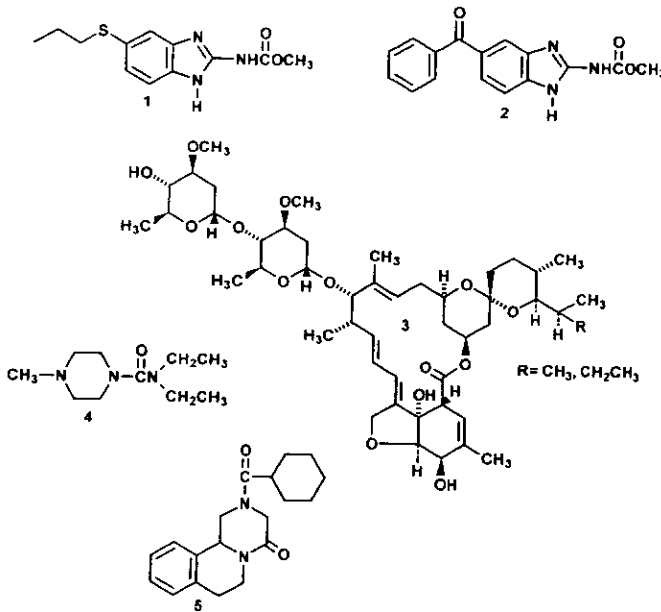


Figura No. 1

Antihelminticos de mayor uso en la actualidad.

- 1.- Albendazol. 2.- Mebendazol. 3.- Ivermectina. 4.- Dietilcarbamacina.
5.- Prazicuantel.

Giardia lamblia es la causa más común de brotes epidémicos asociados a la contaminación de las aguas de uso cotidiano. La giardiosis puede transmitirse a través de sus quistes, los cuales son altamente infecciosos para el ser humano ya que una infección puede provenir tan solo de la ingestión de unos diez quistes viables⁸.

En la actualidad, pocos son los agentes quimioterapéuticos que están disponibles para el tratamiento de giardiosis.¹¹ Este limitado arsenal terapéutico se compone de fármacos como el metronidazol y sus análogos nitroimidazólicos como el tinidazol; y otros como la quinacrina, la etofamida, la quinfamida y la furazolidona (figura No. 2). Sin embargo, ninguno de ellos es considerado ideal debido a los efectos adversos asociados a su uso.^{6,10,11} El tratamiento muchas veces no es efectivo debido a que los pacientes no siempre terminan su régimen

de dosis, además, estos fármacos son activos contra la flora intestinal, presentan una actividad limitada contra las infecciones intestinales, algunos son potencialmente carcinogénicos, y en otros, este microorganismo ya ha generado resistencia.¹⁰⁻¹³ Es por esta razón que encontrar otras alternativas eficaces y seguras para el tratamiento de giardiosis se ha vuelto una labor primordial.

Los bencimidazol carbamatos comprenden una familia de compuestos heterocíclicos que han mostrado un amplio espectro de actividad biológica. Son usados comercialmente o experimentalmente como agentes antifúngicos, antitumorosos y antihelmínticos.^{4,14-16} La actividad antihelmíntica se debe a su capacidad para unirse a la tubulina inhibiendo su polimerización hacia microtúbulos.

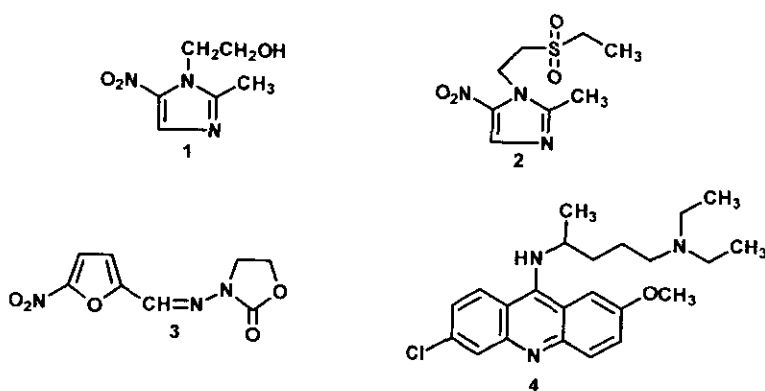


Figura No. 2

Fármacos comunmente epleados en el tratamiento de la giardiosis.

1.- Metronidazol. 2.- Tinidazol. 3.- Furazolidona. 4.- Quinacrina.

Ahora bien, si sabemos que el albendazol y el mebendazol deben su efecto antihelmíntico a la inhibición de la formación de los microtúbulos, y si también se sabe que *Giardia lamblia* posee un prominente citoesqueleto hecho principalmente de microtúbulos, entonces éstos bien podrían ser efectivos como agentes anti*giardiásicos*.^{9,10} Los experimentos *in vitro* que se han venido llevando a cabo con *Giardia lamblia* han confirmado esta hipótesis y además han demostrado que

este parásito es muy susceptible a estos bencimidazoles de uso antihelmíntico común, ya que se ha encontrado que el albendazol y el mebendazol han sido de 30 a 50 veces más activos que el metronidazol, y de 4 a 40 veces más activos que la quinacrina¹². Estudios *in vivo* soportan estos hallazgos en donde estos dos bencimidazoles resultaron ser excelentes agentes anti-giardíacos.⁶ Se encontró que tres a cuatro dosis de albendazol (79-100 mg/Kg) son efectivas para erradicar a los trofozoítos del intestino y para eliminar la excreción de sus quistes,⁶ aunque en la actualidad se sabe que lo ideal consiste en aplicar cinco dosis de 400 mg cada una.⁵

Sin embargo, para establecer de modo más exacto el rol de la tubulina en la interacción parásito-bencimidazol y a modo de lograr entender la supuesta toxicidad selectiva que exhiben estos bencimidazoles, se han desarrollado protocolos para aislar la tubulina de los diferentes parásitos en estudio;¹⁷ después, se realizan los experimentos de unión de los bencimidazoles con las muestras asiladas de tubulina procedente de uno o varios parásitos, para lo cual es necesario utilizar bencimidazoles marcados (preferentemente con tritio).^{16,18-21}

Es por ello que el desarrollar métodos de síntesis de bencimidazoles trititados es necesario para llevar a cabo los experimentos de unión (encaminados a encontrar alguna selectividad y/o resistencia) y para dar continuidad al estudio de los mecanismos de acción (farmacodinámica).¹⁸

A pesar de que ya se sabe que el albendazol es un excelente agente antihelmíntico de uso humano²² y veterinario,²³ y aunque también se le ha reconocido como un anti-giardíaco efectivo, en México todavía no se ha difundido y aprovechado al máximo estas ventajas que ofrece el albendazol para ayudar a erradicar a las parasitosis de tipo gastrointestinal que siguen afectando a nuestro país, sobre todo en aquellas poblaciones marginadas que se caracterizan por presentar malos hábitos de higiene.

Además, aunque por separado se han realizado estudios de unión de la tubulina de diferentes tipos de helmintos,¹⁷ como también se han hecho estudios de inhibición de la polimerización de tubulina de diferentes mamíferos^{24,25} con albendazol, y se han descrito los efectos morfológicos del albendazol en *Giardia*

lamblia,⁹ en ningún caso hasta ahora se ha comparado cuantitativamente la unión del albendazol con la tubulina proveniente de un organismo mamífero, de *Giardia lamblia* y de un helminto dentro de un mismo estudio, así como tampoco se ha comparado la afinidad del complejo albendazol-tubulina que forman estos diferentes organismos en cuestión.

Podría pensarse que, si el albendazol *in vitro* también se une a la tubulina de algunos mamíferos inhibiendo su polimerización, ¿cómo es que esta unión no resulta tóxica tanto para el hombre como para los animales domésticos?, o es que, ¿en realidad habrá algún tipo de selectividad?. Para resolver estas interrogativas y a medida de extender la sugerencia del uso del albendazol como un alternativa quimioterapéutica segura y valiosa para el tratamiento tanto de las helmintosis como de la giardiosis en nuestro país, en este trabajo de tesis se llevarán a cabo experimentos de unión del albendazol a la tubulina proveniente de un mamífero (cerebro de rata), un protozooario (*Giardia lamblia*) y un helminto (*Ascaris suum*), con la finalidad de comparar la unión y la afinidad entre estos tres tipos de tubulina y así determinar si es que existe algún tipo de unión y afinidad preferencial de la tubulina de origen parasitario por el albendazol, en comparación con la tubulina de origen mamífero.

2. ANTECEDENTES

2.1.- HELMINTOS.

La gran mayoría de los parásitos metazoarios que viven en huéspedes vertebrados pertenecen a tres "phyla": Plathelmintha, Nematoda y Acantocefala.¹ "Helminto" es un término impreciso pero muy útil, el cual incluye a todos los parásitos de este tipo.¹

Los helmintos son responsables de infectar a más de una cuarta parte de la población mundial. Para su estudio se dividen en tres grupos: los nematodos, los trematodos y los cestodos.^{4,7}

En México, se estima que el 33% de la población está parasitada por el nematodo *Ascaris lumbricoides*, y de éstos, el 6 % de los infectados presentan parasitosis severa.³

Se han reportado los hallazgos clínicos obtenidos durante el tratamiento de las infecciones helmínticas más comunes que son ocasionadas por nematodos, cestodos y trematodos en humanos, utilizando uno de los cinco compuestos antihelmínticos de mayor eficacia como son el albendazol, mebendazol, dietilcarbamazina, ivermectina y prazicuantel. Estos resultados, reportados tanto por de Silva N⁴ así como por Cook G.C²² entre otros, dejan ver de manera clara el papel tan relevante que han venido desempeñando el albendazol y el mebendazol en el tratamiento de las helmintosis.

2.2.- *Giardia lamblia*.

Giardia es un protozoo binucleado y flagelado que ocasiona infecciones intestinales en mamíferos, aves, reptiles y anfibios.⁸

Giardia lamblia fue descrita hace más de tres siglos, pero sólo recientemente ha sido reconocida como un patógeno más del ser humano, ya que las infecciones en las que se ve involucrada no son invasivas y frecuentemente son

asintomáticas.⁸ Los conocimientos de *Giardia spp* se han incrementado rápidamente desde 1976, año en que *Giardia lamblia* fue axenizada (cultivada *in vitro*) por primera vez y cuando el modelo murino de giardiosis fue descrito.⁸

Giardia lamblia ha sido nombrada como el organismo eucarionte más primitivo, siendo uno de los pocos eucariontes que presenta un metabolismo anaerobio y una dependencia completa por las fuentes exógenas de nucleótidos.⁸ Además, es el protozoo más comúnmente aislado de las muestras de evacuaciones humanas y es causa común de diarrea en humanos así como también en perros y gatos.^{7,8}

Giardia ha sido establecida en el *phylum* Sarcomastigophora y en la clase Zoomastigophorea junto con otros parásitos flagelados que infectan al ser humano como *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Tricomonas* y *Dientamoeba* y ha sido clasificada en el orden Diplomonadida.⁸

Se han usado criterios morfológicos para dividir al género *Giardia* en tres especies: *Giardia agilis*, que infecta a anfibios; *Giardia muris*, que infecta a roedores, aves y reptiles; y *Giardia lamblia* (también llamada *Giardia intestinalis* y *Giardia duodenalis*) que infecta a una gran variedad de mamíferos incluyendo al ser humano, así como también a reptiles y aves.⁸

Giardia presenta un ciclo vital simple que consta de un quiste infectivo y de un trofozoito vegetativo. El quiste es relativamente resistente al medio ambiente y a la desecación, así como también a los ácidos gástricos del estómago de sus huéspedes. Después de que el quiste ha sido ingerido, este se desenquista en el intestino delgado para formar dos trofozoitos. Los trofozoitos se dividen por fisión binaria en el intestino delgado y son responsables de los síntomas de la giardiosis. Algunos de los trofozoitos son inducidos a enquistarse y el ciclo se completa cuando los quistes pasan por las heces y son ingeridos por otro huésped.⁸

Giardia lamblia es el parásito que más frecuentemente ha sido aislado del intestino de la población de todo el mundo y que frecuentemente se presenta en niños que habitan en países en desarrollo.^{6,8} Es importante recalcar que sólo un limitado número de fármacos están disponibles para el tratamiento de la giardiosis. Sin embargo, en la actualidad se cuenta con el albendazol y el mebendazol, los

cuales tienen una excelente actividad anti-giardíasis. Esta actividad es el resultado de su unión a tubulina, que en los trofozoitos trae como consecuencia el desarrollo de alteraciones dañinas en el citoesqueleto, como son: la pérdida de la adherencia, alteración de la morfología celular, el desagrupamiento del disco ventral y la pérdida de viabilidad después de un tratamiento prolongado con estos bencimidazoles.²⁶

2.3.- MICROTUBULOS Y TUBULINA.

Los microtúbulos son estructuras fibrilares y poliméricas de tubulina (α y β) de forma tubular, que son comunes para la mayoría de las células eucariotas y que se encuentran compuestas por varias cadenas llamadas protofilamentos (generalmente en número de 13) unidos por interacciones laterales,²⁷⁻²⁹ se caracterizan por presentar un diámetro interno de 15 nm y uno externo de 25 nm.³⁰

La tubulina es una proteína globular que se compone de dos subunidades denominadas α y β . Estas presentan un peso molecular de 55000 y 53000 Da y una longitud secuencial de 450 y 445 aminoácidos respectivamente. Las subunidades se pueden separar y resolver parcialmente a través de métodos electroforéticos en sus diversos isotipos: $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \dots$ y $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \dots$.^{29,30}

La tubulina es una proteína de unión a GTP que contiene sitios de alta afinidad tanto para iones calcio Ca^{2+} como para iones magnesio Mg^{2+} . *In vitro*, estos iones muestran funciones opuestas, Mg^{2+} es requerido para el ensamblaje, mientras que Ca^{2+} , ya sea en forma libre o acomplejada con la proteína de unión llamada calmodulina, inhibe el proceso de ensamblaje e induce a la desagrupación.³⁰

La hidrólisis de GTP está directamente acoplada con la polimerización de los microtúbulos, ya que hay dos sitios de unión a GTP presentes en la molécula dimerica de tubulina. Los llamados sitios "E" (exchangeable), localizables en la subunidad β , son fácilmente intercambiables con el GTP exógeno, y los sitios "N" (non-exchangeable, localizables en la subunidad α), que al contrario, no son fácilmente intercambiables.²⁷

La participación de los microtúbulos en el ambiente intracelular es de gran importancia, ya que están involucrados en procesos fisiológicos tales como.²⁷⁻³⁰

- Formación del huso acromático en la división celular.
- Transporte intracelular.
- Secreción celular.
- Absorción de nutrientes.
- Mantenimiento de la forma celular.
- Motilidad celular mediada por flagelos.

Todos estos procesos biológicos, excepto el último, se basan en la capacidad que tienen los microtúbulos para polimerizarse y despolimerizarse; y por lo tanto, estas funciones pueden ser bloqueadas de una manera similar tanto por agentes que inhiban el ensamblaje como por aquellos que inhiban la desagrupación de los microtúbulos. La capacidad de reversibilidad en el mecanismo de ensamblaje que poseen los microtúbulos los hace organelos diferentes al resto de las otras estructuras biológicas.²⁷

La interrupción del equilibrio tubulina-microtúbulo puede ser ocasionado por sustancias conocidas como inhibidores de microtúbulos que en el ambiente intracelular traen como consecuencia una cascada de cambios bioquímicos y/o fisiológicos que repercuten en la pérdida de la homeostasis celular.³⁰ La mayoría de los inhibidores de microtúbulos (producidos por hongos, plantas, organismos marinos y más recientemente de origen sintético) son capaces de unirse a los microtúbulos por su extremo "extensible" inhibiendo su crecimiento mientras que el microtúbulo puede estar disociándose por su extremo opuesto "de acortamiento" ocasionando con esto, la pérdida neta de la longitud del microtúbulo.¹⁵ Es por eso que los efectos letales son más evidentes en las células en división o en crecimiento.³⁰

El ensamblaje de los microtúbulos (que requiere de una concentración mínima de tubulina dimérica llamada concentración crítica) consta de dos fases: nucleación y elongación.^{26,27} La nucleación es la formación de un oligómero de tubulina, el cual es lo suficientemente estable para permitir una subsecuente

elongación en donde la velocidad de polimerización (según el modelo de Oosawa) puede ser determinada por la ecuación siguiente:^{27,28}

$$-- \frac{dc}{dt} = mck+ - mk-$$

Donde c es la concentración de tubulina, t es tiempo, m se refiere al número de polimeros, k+ es la constante de polimerización y k- es la constante de despolimerización.²⁸

La adición gradual de moléculas de tubulina, después de un cierto tiempo, puede alcanzar un "estado estacionario", en donde no se presenta crecimiento ni acortamiento en ninguno de los extremos de los microtúbulos, por lo que $mck+ = mk-$.²⁸

Posteriormente, se encontró que los dos extremos de los microtúbulos difieren en sus velocidades de crecimiento. El extremo que presenta la mayor velocidad de crecimiento se le denominó "extremo positivo" y el que presenta la menor velocidad "extremo negativo".²⁸

Según Margolis & Wilson,²⁷ una vez que se ha alcanzado el estado estacionario en el proceso de polimerización de los microtúbulos, el extremo positivo de los microtúbulos incorpora tubulina a la misma velocidad que es liberada por el extremo negativo de los mismos.²⁷

Sin embargo, el modelo de "inestabilidad dinámica" sugiere que el estado estacionario para una población de microtúbulos se logra cuando el crecimiento de un grupo de microtúbulos es compensado por la despolimerización de otro grupo y que el equilibrio individual de cada microtúbulo nunca es alcanzado.²⁸ Este modelo se basa en la existencia de dos fases: una de polimerización o fase de crecimiento y otra de despolimerización o fase de acortamiento.²⁷ Según este modelo después de que la despolimerización empieza, varios microtúbulos nunca retornan a su fase de crecimiento y son disueltos completamente por lo que la tubulina soluble es reutilizada para la elongación de los microtúbulos que se encuentran en fase de crecimiento.²⁸ La transición de fase de crecimiento a fase de acortamiento (catástrofe) y de acortamiento a crecimiento (rescate) son parámetros que describen el comportamiento de los extremos microtubulares.²⁸ La reducción de la

concentración de tubulina incrementa la frecuencia de catástrofes y abate la frecuencia de rescates.²⁸

Por otro lado, se sabe de la existencia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) que pueden estimular el ensamblaje de los microtúbulos.^{27,28} Estas no son necesarias para el ensamblaje de los dímeros de tubulina, pero en su presencia, los microtúbulos se constituyen a concentraciones bajas de tubulina. Además, todo indica que las "MAPs" protegen a los microtúbulos de algunos agentes como la colchicina, y de bajas temperaturas que tienden a disociarlos.²⁹ Cabe hacer notar que el grado de estabilización de los microtúbulos por las "MAPs" depende de la afinidad de esas proteínas por los microtúbulos, y esa afinidad se encuentra bajo control celular.²⁸

Hasta ahora se han llevado a cabo estudios *in vitro* de polimerización y de inhibición de la polimerización de tubulina procedente del cerebro de algunos mamíferos como rata²⁴, bovino²⁵ y cerdos³¹ principalmente, mediante técnicas turbidimétricas. En estos estudios de inhibición se han utilizado algunos bencimidazoles entre los que figuran albendazol²⁴ y mebendazol;²⁵ y otros compuestos como colchicina,^{31,32} vinblastina y vincristina.³⁰ Se ha reportado que el grado de inhibición de la tubulina procedente de organismos mamíferos, a diferencia de la tubulina de los nematodos, es dependiente de la temperatura.²¹ También, que el sitio de unión de los bencimidazoles es el mismo que el de la colchicina,^{15,31,32} el cual parece estar localizado entre los aminoácidos 239 y 354 de la β tubulina. Se cree que en esta región se lleva a cabo el ensamblaje de las unidades de tubulina que dan lugar al crecimiento de los microtúbulos.³⁰

2.4.- BENCIMIDAZOLES.

El núcleo bencimidazol es un sistema bicíclico anular en el cual el anillo de benceno ha sido fusionado en las posiciones 4 y 5 del sistema heterocíclico imidazol.^{4,33} El núcleo de bencimidazol se caracteriza por presentar el fenómeno de tautomerismo, el cual puede proceder en forma intermolecular cuando se ven involucradas dos o más moléculas, o a través de interacciones con disolventes

prácticos como el agua (figura No. 3).³³ Los compuestos bencimidazólicos en general, y los bencimidazol carbamatos en particular, son materiales cristalinos con puntos de fusión elevados y relativamente insolubles en agua.³³ La escasa solubilidad acuosa de los bencimidazol 2-carbamatos trae como consecuencia una baja absorción después de una administración oral y es por esto que han sido efectivos, particularmente en el tratamiento de las infecciones helmínticas intestinales.⁴

Los compuestos bencimidazólicos que no están sustituidos en ambos átomos de nitrógeno del anillo de imidazol poseen características tanto ácidas como básicas³³ (figura No. 3).

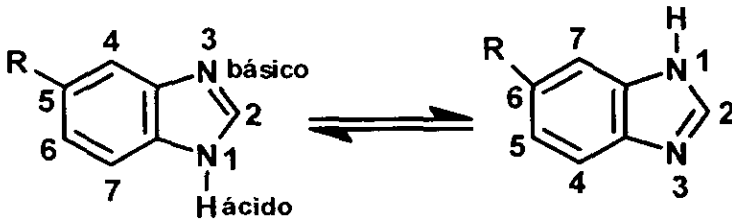


Figura No. 3

Equilibrio tautomérico del núcleo bencimidazol

Las rutas sintéticas de los bencimidazoles generalmente proceden a través de dos pasos: el primero consiste en la síntesis de una *orto*-fenilendiamina con los sustituyentes deseados, seguido de la ciclación para generar al anillo bencimidazólico.³³ En varios casos este cierre de anillo es el paso final en la síntesis del bencimidazol deseado.

El descubrimiento en 1964 de que el tiabendazol presentaba un amplio espectro de actividad contra parásitos gastrointestinales fue el suceso que dio inicio a una nueva era en el tratamiento de las enfermedades parasitarias.⁴ Desde entonces, varios miles de bencimidazoles han sido estudiados por su actividad antihelmíntica. De estos, menos de 20 alcanzaron un uso comercial, de los cuales,

sólo el mebendazol y el albendazol tienen uso en medicina humana y veterinaria en la actualidad.^{4,23}

Ahora se sabe que el principal mecanismo de acción de los bencimidazoles se basa en su capacidad de unión con la subunidad β de la tubulina inhibiendo su polimerización hacia microtúbulos. Se cree que los disturbios que ocasionan sobre otros procesos celulares, tales como el transporte y el metabolismo anaerobio, representan en conjunto el resultado de la inhibición de una o varias funciones que desempeñan los microtúbulos.³⁴

Cabe mencionar que los conocimientos adquiridos sobre el mecanismo de acción de los diferentes bencimidazoles que se han estado probando como agentes antiparasitarios, se han alcanzado mediante los estudios de unión que se llevaron a cabo con muestras de tubulina procedente de diversos organismos, para lo cual ha sido necesario optimizar técnicas de marcaje de los bencimidazoles. Para los primeros estudios metabólicos, farmacocinéticos y bioquímicos, se prefirió el marcaje con ^{14}C ^{18,25} incorporándolo en la posición 2 del núcleo bencimidazol. Para ello se utilizó urea marcada como fuente de ^{14}C . Sin embargo, la baja actividad específica que se obtiene mediante esta ruta ha limitado la investigación sobre el mecanismo de acción.¹⁸

Se ha encontrado que el marcaje con tritio es más fácil de llevar a cabo dando lugar a compuestos con mayor actividad específica. Razón por la cual, el hallar un método de síntesis de [^3H]bencimidazoles podría resultar muy útil para continuar con los estudios de unión y profundizar más sobre los mecanismos de acción.¹⁸

De la investigación de varias rutas para la preparación de bencimidazoles trititados, se encontró que el método de bromación-desbromación puede ser utilizado para producir buenos rendimientos de dichos compuestos trititados.¹⁸

Lacey E. y colaboradores utilizaron esta estrategia para la obtención de [^3H]albendazol, con la finalidad de llevar a cabo los estudios de unión con tubulina de *Haemonchus contortus*, y obtuvieron una actividad específica de 3,092 dpm/pmol.³⁵

Para los estudios de unión, Lacey E. y colaboradores, utilizaron la técnica de extracción con carbón activado (de la fracción de isótopo no que no se une a

tubulina) ya que ha sido la más conveniente. Sin embargo, este método se limita sólo a probar colchicina tritiada sobre eucariotes superiores y bencimidazoles tritiados sobre helmintos, hongos, y algunos otros eucariotes inferiores.^{30,35,36}

Ahora bien, gracias a los estudios de unión que se han realizado, ya se ha podido confirmar que los bencimidazol carbamatos se unen preferentemente a la subunidad de β tubulina que pudiese encontrarse libre en la célula. Se ha postulado que esta unión podría deberse a una reacción de sustitución nucleofílica entre el grupo carbamato de metilo y los grupos sulfhidrilos de las cisteínas localizadas en las posiciones 239 y 354 de la β tubulina.^{30,34}

Por otro lado, sabiendo que *Giardia lamblia* se compone de un citoesqueleto hecho predominantemente de microtúbulos, Cedillo R. y colaboradores han demostrado que tanto el albendazol como el mebendazol pueden ser considerados como anti-giardínicos efectivos y que además éstos también se pudiesen unir a las giardinas (proteínas particulares de este protozoario)^{37,38} que constituyen los microlistones del disco ventral.^{9,26}

Por lo que respecta a los estudios de relación estructura-actividad de los bencimidazoles, se han realizado modificaciones sobre el sistema bicíclico con la finalidad de mejorar la unión a tubulina (como actividad antihelmíntica). Los resultados de estos estudios, indicaron que las modificaciones estructurales sobre las posiciones 2 y 5 produjeron las moléculas más activas (figura 4).³⁰

También se ha encontrado que la presencia de un grupo carbamato en la posición 2 es esencial para potenciar la actividad, en cambio el reemplazo por una función amida reduce la actividad unas diez veces mientras que la hidrólisis a la función amino elimina la actividad³⁰. Incrementos en el tamaño del carbamato de metilo a etilo puede mejorar la actividad 1.2 a 2 veces; sin embargo, incrementos mayores, como carbamatos de propilo, butilo y pentilo progresivamente, reducen la actividad.³⁰

La alquilación en la posición 1 puede reducir la actividad de 10 a 20 veces. El reemplazo del NH del núcleo bencimidazol por S, o O para formar benzotiazoles y benzoxazoles respectivamente, eliminan la actividad.³⁰

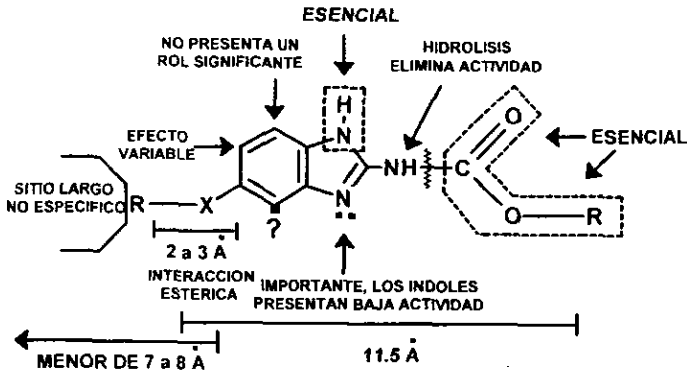


FIGURA No. 4

Requisitos estructurales de los benzimidazol carbamatos necesarios para presentar una actividad óptima de inhibición microtubular.

Los benzimidazoles con actividad anihelmíntica son extensivamente metabolizados por los mamíferos después de su administración oral. Los metabolitos primarios que se obtienen son el resultado de procesos hidrolíticos y oxidativos; por lo general, son más solubles que el compuesto dosificado.³⁹ La conjugación es un proceso frecuente y en algunos casos los conjugados llegan a ser los productos predominantemente excretados.³⁹

El metabolismo primario y la toxicidad de estos compuestos es generalmente controlada por los sustituyentes en "5" en donde una variedad de reacciones de tipo fase I se han observado; como son las hidroxilaciones (tiabendazol, parabendazol), S-oxidaciones (albendazol, fenbendazol) y las reducciones (mebendazol).³⁹ Aunque la descaborxilación hidrolítica del grupo carbamato para formar la amina libre es un suceso común, existen otras reacciones metabólicas que involucran transformaciones sobre el núcleo de benzimidazol (hidroxilaciones y N-metilaciones) las cuales sólo ocurren en forma limitada.³⁹

Los benzimidazoles han servido bien a la humanidad en su continua batalla para lograr el control de las helmintosis, pero en nuestros días, presentan un problema ocasionado por el fenómeno de resistencia que han venido desarrollando algunas especies de helmintos.⁴⁰ A través de estudios moleculares

se ha encontrado que dicha resistencia es causada por cambios estructurales del gen que codifica a la subunidad de β tubulina.^{34,40}

2.5.- ALBENDAZOL.

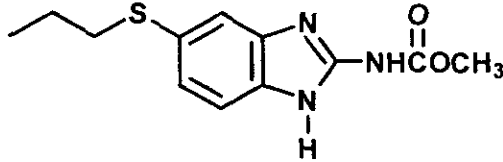


Figura No. 5
Albendazol

El albendazol, 5-(propiltio)-1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo, (figura No. 5) con fórmula mínima $C_{12}H_{15}N_3O_2S$, es un polvo blanco con un peso molecular de 265.34 g/mol y un punto de fusión de 208-210°C.⁴¹ Es insoluble en agua y es soluble en hexametilfosforamida y N,N-dimetilformamida (DMF). En dimetil sulfóxido (DMSO), metanol, etanol, cloroformo, acetona, ácido acético y HCl 0.1M presenta una solubilidad de 5.0, 0.25, 0.35, 2.0, 0.83, 5.0 y 0.04 mg/mL a 25°C respectivamente.⁴² El albendazol presenta dos valores de pKa (2.8 y 10.26) según se muestra en la figura No. 6.⁴²

Este bencimidazol fue aprobado en 1977 para el tratamiento de infecciones helmínticas en ovejas y fue hasta 1983 que se le dio la aprobación para su uso humano.⁴ Aunque el albendazol es escasamente absorbido en el intestino, alcanza concentraciones plasmáticas de 0.3-0.6 μ g/mL.⁴ Es rápidamente metabolizado en el hígado a través de la oxidación de su heteroátomo nucleofílico (S) que es catalizada por la flavinmonooxigenasa microsomal "FMO" dando lugar a la formación del metabolito primario: el sulfóxido de albendazol, que también mantiene la actividad antihelmíntica.^{4,39} La oxidación posterior del sulfóxido de albendazol da lugar a la sulfona, la cual carece de actividad antihelmíntica y es catalizada por el citocromo P-450.³⁹

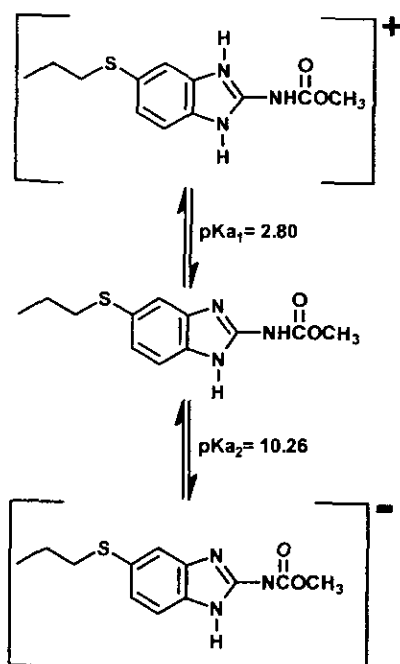


Figura No. 6.

Efecto del pH en la ionización del albendazol.

Tanto el sulfóxido como la sulfona del albendazol dominan el perfil plasmático e incluso se encuentran como los metabolitos mayoritarios en plasma y orina, aunque las proporciones que guardan estos metabolitos pueden variar según las especies.³⁹

El albendazol ha sido ampliamente usado como antihelmíntico en medicina veterinaria y en medicina humana, presentando gran actividad contra larvas y estadios adultos de varios helmintos.⁵ El albendazol ejerce su efecto antihelmíntico inhibiendo la polimerización de la tubulina, y por lo tanto, disminuye los niveles energéticos hasta que éstos llegan a ser insuficientes para la sobrevivencia de los parásitos.¹⁵ De este modo el albendazol inicialmente inmoviliza y después mata a los helmintos susceptibles.¹⁵

En la actualidad ya se ha reconocido al albendazol como el agente antihelmíntico de más amplio espectro.²² En casi todas las infecciones intestinales

ocasionadas por nematodos, el albendazol ha presentado una eficiencia mayor que el mebendazol.²² El albendazol en dosis únicas de 400 mg ha sido tan efectivo como la dosis única o múltiple de mebendazol contra *Ascaris lumbricoides*, con una eficiencia tanto en curación como en la reducción de la producción de huevecillos del 90 al 100%.⁴

Las dosis únicas de albendazol son efectivas contra varias especies de helmintos, ya que ha sido recomendado en casos de infecciones provocadas por *Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*; aunque una dosis más alta es necesaria para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por *Strongyloides*.⁵

También, las dosis únicas de albendazol han sido eficaces contra infecciones ocasionadas tanto por uncinarias como por nematodos, que la dosis única de mebendazol.⁴

En el caso de las infecciones más severas ocasionadas por nematodos, éstas responden bien a un tratamiento de tres días con albendazol.⁴ Se ha encontrado que las dosis múltiples de albendazol han sido benéficas en el tratamiento de las strongiloidosis, con eficiencias terapéuticas del 38 al 95%.⁴

Además, se ha reportado que el albendazol ha sido de gran valor terapéutico en las capiliariosis intestinales, teniosis, cisticercosis, gnatostomiosis, hidatidosis enquistada y alveolar, larvas migratorias cutáneas y viscerales, clonorchiosis y trichinelosis; también presenta efecto embriotóxico sobre *Onchocerca volvulus* y *Loa loa*.⁴

Otro candidato para ser atacado quimioterapéuticamente por albendazol es el protozooario *Giardia lamblia*,⁵ ya que el albendazol interacciona con la tubulina y las giardinas de su citoesqueleto.⁵ En base a estudios posteriores se ha visto que después de una exposición a albendazol *Giardia lamblia* no muestra cambios significativos en su actividad flagelar ya que su efecto selectivo se presenta exclusivamente sobre la tubulina de su disco ventral o sobre las giardinas.^{5,37,38}

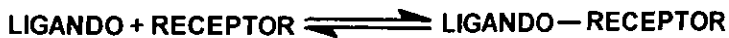
Diversos investigadores como Cedillo R y Chavez B, así como también Meloni B.P. y Reynoldson J.A entre otros, han contribuido a demostrar la efectividad del albendazol a través de los estudios *in vitro* que han realizado con trofozoitos de

Giardia lamblia,^{5,6,9-12,26} en donde el albendazol ha demostrado ser mucho más activo que el ornidazol, tinidazol, metronidazol y secnidazol;¹⁰ por lo que se le ha reconocido como el "agente anti giardiásico del futuro".⁵ En base a estos resultados obtenidos con el albendazol, se planteó la posibilidad de que este bencimidazol también pudiese ser utilizado contra otros protozoarios de importancia médica como la *Entamoeba histolytica*, pero los resultados hasta la fecha revelan que el albendazol no posee actividad anti amibiana, sino solamente anti giardiásica.²⁶

En ensayos clínicos con grupos numerosos en donde el albendazol se ha utilizado para el tratamiento de infecciones ocasionadas por nematodos ha demostrado una eficiencia terapéutica en 11 de 46 pacientes con giardiosis con solo una dosis de 400 mg. En estudios realizados con niños se ha encontrado que tan sólo por la administración de una dosis única de 800 mg de albendazol se puede alcanzar una eficiencia terapéutica del 75% en casos de giardiosis, observándose aún mejores resultados por la administración de 400 mg por tres (81%) y por cinco días (95%).⁵

2.6.- LA LEY DE ACCION DE MASAS.

El análisis de la mayor parte los experimentos de unión, en los que se emplean radioligandos, están basados en un simple modelo llamado la ley de acción de masas, que se rige de acuerdo al siguiente sistema:⁴³



Este modelo está basado en los siguientes postulados:⁴³

- La unión ocurre cuando entre el ligando y el receptor se presenta una colisión con la orientación correcta y la energía suficiente para formar el enlace.
- La velocidad de asociación (número de uniones por unidad de tiempo) es igual a: $[\text{Ligando}][\text{Receptor}]K_1$, en donde K_1 es la constante de velocidad de asociación expresada en $M^{-1} \text{ min}^{-1}$.

- Una vez que la unión ha ocurrido, el ligando y el receptor permanecen unidos por una cantidad de tiempo aleatorio el cual es influenciado por la afinidad del receptor por el ligando.
- La velocidad de disociación (número de disociaciones por unidad de tiempo) es igual a: $[\text{Ligando-Receptor}]K_{-1}$, en donde K_{-1} es la constante de velocidad de disociación expresada en min^{-1} .
- Después de la disociación, el ligando y el receptor recuperan las mismas características que tenían antes de que se efectuara la unión.
- El estado de equilibrio se alcanza cuando la velocidad de formación de un nuevo complejo ligando-receptor es igual a la velocidad en la que el complejo ligando-receptor se disocia.
- En el equilibrio, el complejo ligando-receptor se forma a la misma velocidad que se disocia:

$$[\text{Ligando}][\text{Receptor}]K_1 = [\text{Ligando-Receptor}]K_{-1}$$

Rearreglando términos tenemos:

$$\frac{[\text{Ligando}][\text{Receptor}]}{[\text{Ligando-Receptor}]} = K_{-1}/K_1 = K_d$$

La K_d expresada en unidades molares, es la concentración de ligando que ocupa la mitad del total de los receptores en el estado de equilibrio.⁴³ Un valor pequeño de K_d significa que el receptor tiene alta afinidad por el ligando; por lo que un valor grande significa que el receptor tiene baja afinidad por el ligando.⁴³

En los experimentos de unión de tipo específico por un solo sitio, de un receptor por un radio ligando, se generan gráficas Unión vs. Concentración, las cuales describen una hipérbola rectangular en su trayectoria y se rigen mediante la ecuación:⁴⁴

$$Y = \frac{B_{\text{max}} X}{K_d + X}$$

De donde **B_{max}** es la cantidad máxima de ligando unido por mg de receptor a una concentración infinita de ligando libre, **X** es la concentración de ligando libre, **K_d** es la constante de disociación y **Y** es la unión específica.

Una vez que se obtienen los datos del experimento de unión, se deberá llevar a cabo una regresión no lineal de la curva con la finalidad de corregir de la mejor manera el trazo de la hipérbola rectangular que se obtiene. Después, los datos se pueden analizar creando una gráfica de tipo "Scatchard" para obtener las constantes del estudio.⁴⁴

Para generar las gráficas de Scatchard, en el eje de las abscisas se ingresan los datos de unión específica y en el eje de las ordenadas se ingresan los datos de unión específica dividida entre la concentración de radio ligando⁴⁴. Mediante gráficas de tipo Scatchard es posible estimar el valor de la **B_{max}** y de la **K_d**, ya que **B_{max}** es la intercepción con el eje de las abscisas y **K_d** es el recíproco negativo de la pendiente de la recta, que se obtiene según como se muestra en la figura No. 7.⁴⁴

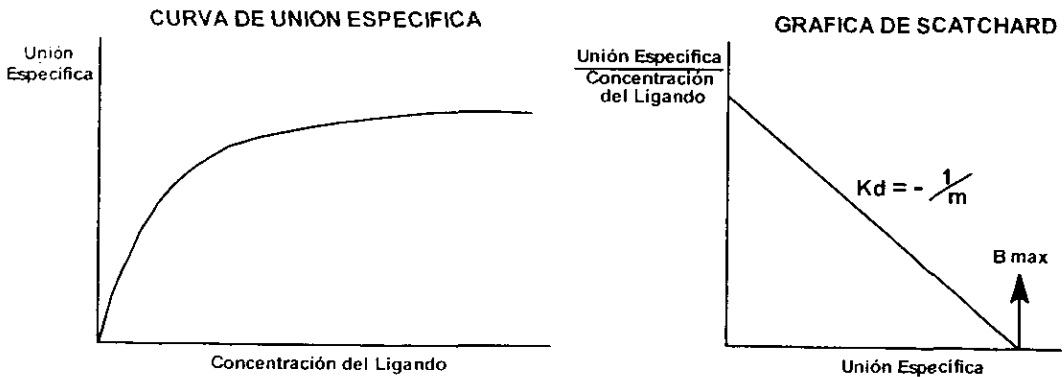


Figura No. 7

Gráficas de unión específica y de tipo Scatchard con la cual se pueden obtener las constantes de un experimento de unión.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Aunque se sabe que el albendazol ha servido con éxito tanto al hombre como a los animales domésticos en la lucha por erradicar las helmintosis de tipo intestinal, y recientemente se ha reconocido su potencial anti $giardiásico$, todavía no se ha establecido bien cuál es el fundamento de su actividad selectiva. ¿Será que tanto la unión como la afinidad que exhibe la tubulina de origen parasitario por el albendazol son en magnitud muy superiores con respecto a la que se puede presentar con la tubulina de origen mamífero?

HIPOTESIS.

“El valor quimioterapéutico del albendazol en el tratamiento de las parasitosis intestinales ocasionadas por helmintos y *Giardia lamblia*, se debe tanto a la unión como a la afinidad preferencial que la tubulina de estos parásitos presenta por el albendazol con respecto a la tubulina de los mamíferos”.

3. OBJETIVOS

3.1.- OBJETIVO GENERAL.

- Demostrar que la tubulina de origen parasitario (*Giardia lamblia* y *Ascaris suum*) presenta tanto una unión como una afinidad preferencial por el albendazol con respecto a la tubulina de origen mamífero (cerebro de rata).

3.2.- OBJETIVOS PARTICULARES.

- Llevar a cabo la síntesis del compuesto 6-bromoalbendazol, como precursor del [³H]albendazol.
- Obtener [³H]albendazol a partir del 6-bromoalbendazol en cantidad y actividad específica suficiente para realizar los experimentos de unión a tubulina.
- Aislar, identificar y cuantificar tubulina de cerebro de rata, *Giardia lamblia* y *Ascaris suum*.
- Realizar los experimentos de unión utilizando las tres tubulinas anteriores con [³H]albendazol.
- Comparar cuantitativamente las diferencias en unión de las tres muestras de tubulina por el albendazol a través de las gráficas de unión vs. concentración de albendazol.
- Analizar las diferencias en afinidad que describen la formación del complejo albendazol-tubulina mediante el cálculo de las constantes B_{max}, K_d y K_a a través de gráficas tipo Scatchard para cada muestra de tubulina en estudio.

METAS.

- Sintetizar [³H]albendazol en cantidad y actividad específica suficiente para realizar los experimentos de unión a tubulina.
- Aislar tubulina de un mamífero, de *Giardia lamblia* y de un helminto en cantidad suficiente para realizar los experimentos de unión.
- Llevar a cabo los experimentos de unión con [³H]albendazol y las tres tubulinas aisladas, y calcular las constantes que describen la formación de los complejos albendazol-tubulina para demostrar que la tubulina de origen parasitario une más y con una mayor afinidad albendazol, en comparación con la tubulina de origen mamífero.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental de esta tesis se llevó a cabo en tres partes. En la primera parte, la química, se realizó la síntesis y la caracterización del 6-bromo albendazol (VII), como compuesto precursor del [^3H]albendazol (VII-T) y sus precursores. Se realizó la síntesis del [^3H]albendazol (VII-T), y en solución de DMSO (solución de [^3H]albendazol), se analizó por espectrometría de masas, se cuantificó por espectrofotometría y HPLC y se determinó su actividad específica en dpm/pmol.

En la segunda parte, la biológica, se obtuvieron las muestras de tubulina de cerebro de rata, *Giardia lamblia* y *Ascaris suum*. Se les analizó su contenido protéico total, su corrimientos electroforéticos, su identificación inmonoquímica y se estimaron sus purezas por densitometría.

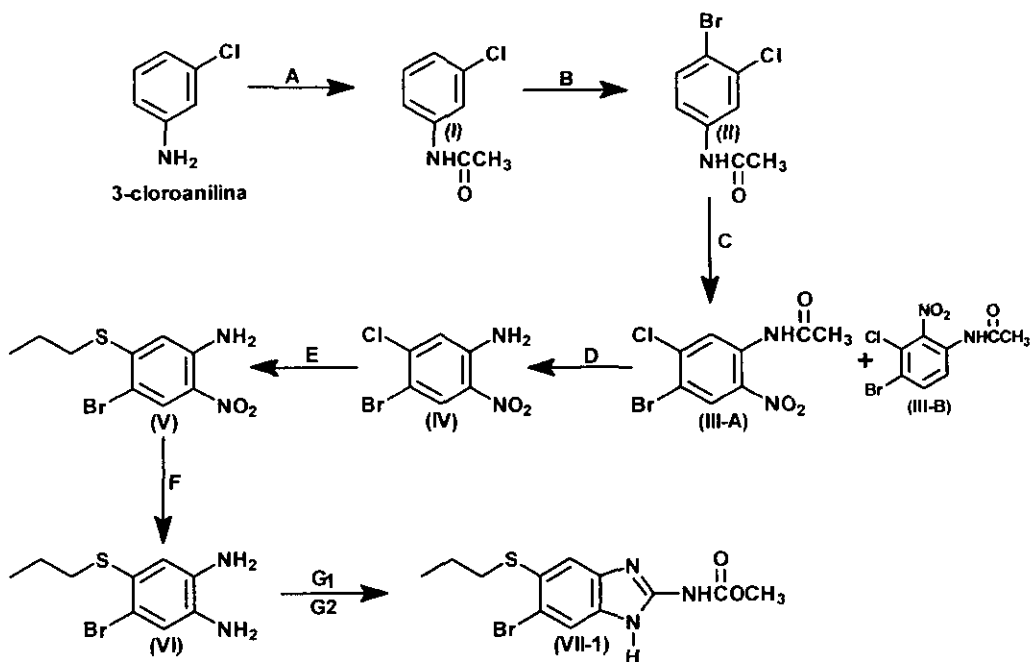
En la tercera parte se llevaron a cabo los estudios de unión y afinidad de las tres tubulinas en estudio con la solución de [^3H]albendazol.

4.1.- PARTE QUIMICA.

La obtención del 6-bromo albendazol se llevó a cabo por tres rutas diferentes, denominadas rutas sintéticas 1,2 y 3.

4.1.1.- RUTA SINTETICA 1.

Para esta ruta se utilizó la 3-cloroanilina como materia prima, la cual se transformó, a través de 5 precursores sintéticos, en la 4-bromo-5-propiltio-1, 2-fenilendiamina (VI).⁴⁵ Esta se ciclocondensó con sulfato de metiltiopseudourea y cloroformiato de metilo para obtener de esta manera el núcleo de bencimidazol.^{14,33,46,47} La figura No. 8 esquematiza la ruta sintética 1:



A= $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, 25°C .

B= $\text{Br}_2/\text{CH}_3\text{COOH}$, 25°C .

C= $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, -5°C a 0°C

D= $\text{NaOH}/\text{CH}_3\text{OH}$ a refluxo.

E= $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}/\text{NaOH}$, H_2O , $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, refluxo.

F= $\text{SnCl}_2/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, refluxo

G1= $(\text{CH}_3\text{SCNH}_2)_2\text{SO}_4$, $2\text{ClCOOCH}_3/\text{KOH}$, $\text{pH}=7-8$, $T < 10^\circ\text{C}$

G2= (VI) + $\text{CH}_3\text{SCNHCOOCH}_3/\text{H}_2\text{O}$ refluxo, $\text{pH}=6.5$

Nota: G1 da lugar a $\text{CH}_3\text{SCNHCOOCH}_3$

Figura No. 8

Diagrama sintético del 6-bromoalbazol por la ruta 1.

4.1.1.1.- 3-Cloroacetanilida (I).

En un matraz de bola de 1L, adaptado con septum de hule y termómetro, colocado en baño de agua a temperatura ambiente, se colocaron 210 mL (250 g, 1.96 moles) de 3-cloroanilina y se fueron adicionando, gota a gota y bajo agitación vigorosa, 204 mL (220 g, 2.15 moles) de anhídrido acético a través de un embudo de adición de 250 mL con trampa anhidra. La reacción procedió con un incremento en la temperatura durante la adición. Una vez que terminó la adición del anhídrido acético, la mezcla de reacción se continuó agitándose por 30 minutos más y luego se le realizó una cromatografía en capa fina para comprobar la ausencia de materia prima. Se obtuvo un líquido viscoso de color ámbar que al verterse con agitación manual sobre un vaso de precipitados de 2 L, con litro y medio de agua fría, dio lugar a la formación de un precipitado de color blanco que se filtró al vacío sobre buchner y el polvo retenido se lavó con agua fría y carbonato de sodio hasta que el polvo ya no presentó residuos de acidez. El producto se dejó secar al aire obteniéndose 317 g de un polvo blanco, lo cual representa un 95.5 % de rendimiento de reacción.

Para estudios de espectroscopía, la 3-cloroacetanilida (I) obtenida se recrystalizó en una mezcla de ácido acético-agua 1:1 obteniéndose unas agujas blancas y cristalinas con un punto de fusión de 75 a 77°C⁵¹ y un *r_f* de 0.46 en el sistema 7.

4.1.1.2.- 4-Bromo-3-cloroacetanilida (II).

En un matraz de bola de 1 L con tres bocas adaptado con termómetro y colocado en un baño de agua a temperatura ambiente, se disolvieron 100 g (0.59 moles) de 3-cloroacetanilida (I) con 400 mL de ácido acético glacial con agitación mecánica. Posteriormente, a la mezcla de reacción le fueron adicionados gota a gota bajo agitación moderada y a través de un embudo de adición de 50 mL, 30.5 mL (94.4 g, 0.59 moles) de bromo. La reacción procedió con un incremento en la temperatura de la mezcla de reacción a medida de que se fue adicionando el bromo. Se formó un precipitado amarillo poco antes de haberse terminado la adición del bromo. Al término de la adición del bromo, la mezcla de reacción

continuó agitándose por 30 minutos más y se le realizó una cromatografía en capa fina para comprobar la ausencia de materia prima. Se obtuvo un precipitado amarillo que se vertió en vaso de precipitados de 2 litros de capacidad con litro y medio de agua fría con agitación manual y se dejó en reposo. El precipitado obtenido se filtró al vacío en buchner y el polvo retenido se lavó varias veces con agua y carbonato de sodio hasta que el polvo ya no presentó residuos de acidez. El producto se dejó secar al aire obteniéndose 139.36 g de un polvo blanco, lo cual representa un 95 % de rendimiento de reacción.

Para estudios de espectroscopía, la 4-bromo, 3-cloroacetanilida (II) obtenida se recrystalizó en etanol obteniéndose un polvo cristalino de color blanco que presentó un punto de fusión de 123 a 124°C y un r_f de 0.4 en el sistema 1.

4.1.1.3.- 4-Bromo-5-cloro-2-nitroacetanilida (III-A).

Un vaso de precipitados de 2 litros de capacidad con 295 mL (521 g, 5.316 moles) de ácido sulfúrico concentrado y adaptado con termómetro de alcohol, fue colocado en un baño de etanol-hielo seco sobre una parrilla de agitación magnética. Una vez que el ácido sulfúrico alcanzó la temperatura de 5°C, se le fueron adicionando poco a poco y bajo agitación moderada 70 g (0.28 moles) de la 4-bromo-3-cloroacetanilida (II) manteniendo la temperatura de la mezcla abajo de los 10°C. Después de que se terminó la adición y se completó la disolución del polvo en el ácido sulfúrico la mezcla de reacción se enfrió hasta los -8°C; momento en el cual comenzó la adición gota a gota de 210 mL (210 g, 3.333 moles) de ácido nítrico frío y concentrado, a través de un embudo de adición de 250 mL bajo agitación moderada y manteniendo la mezcla de reacción abajo de los 0°C. Al término de la adición del ácido nítrico, la mezcla de reacción continuó agitándose por 10 minutos más a una temperatura entre -5 a 0°C. Se tomó muestra de la mezcla de reacción y se realizó una cromatografía en capa fina para asegurar la ausencia de materia prima, comprobándose de esta manera la obtención del producto nitrado deseado y un subproducto nitrado minoritario. Posteriormente, la mezcla de reacción fue vertida poco a poco y con agitación manual sobre un vaso de precipitados de 4 L con 2 L de hielo-agua, observándose

la formación de un precipitado amarillo que se hizo más abundante a medida de que se terminaba la adición. Los residuos del vaso reactor fueron lavados con agua helada y se añadieron al vaso de 4 litros de capacidad cuyo contenido total fue filtrado, bajo agitación manual, al vacío sobre buchner y el polvo retenido se lavó varias veces con agua y carbonato de sodio hasta que el polvo ya no presentó residuos de acidez.

El producto se dejó secar al aire obteniéndose 80.5 g de un polvo color amarillo claro, lo cual representa un 97.3 % de rendimiento de nitración.

Para estudios de espectroscopia, la 4-bromo,5-cloro,2-nitroacetanilida (III-A) obtenida se recristalizó en etanol obteniéndose el producto en forma de agujas cristalinas de color amarillo claro que presentan un punto de fusión de 121 a 123°C y un r_f de 0.46 en el sistema 4. Cabe resaltar que en el proceso de nitración se obtuvo un subproducto minoritario el cual se observó a través de la cromatografía en capa fina realizada al producto ya purificado presentando un r_f de 0.12 en el sistema 4, que probablemente corresponde a la 4-bromo, 3-cloro, 2-nitroacetanilida (III-B) y que se presenta en cantidad de trazas.

4.1.1.4.- 4-Bromo-5-cloro-2-nitroanilina (IV).

A un matraz de bola de 2 litros de capacidad con tres bocas adaptado con columna vigraux, conteniendo 70 g (0.238 moles) de la 4-bromo-5-cloro-2-nitroacetanilida (III-A) se le adicionaron 800 mL de metanol. El matraz de reacción se colocó sobre una canasta de calentamiento arriba de la parrilla de agitación, y la mezcla se calentó a reflujo bajo agitación magnética moderada. Una vez que se logró la disolución de la materia prima, se adicionaron gota a gota, a través de un embudo de adición de 50 mL de capacidad; 30 mL de una solución de hidróxido de sodio la cual se preparó disolviendo 10 g (0.25 moles) de hidróxido de sodio en 30 mL de agua destilada. La solución metanólica cambió de un color naranja claro a naranja oscuro a medida que se fue adicionando la solución de sosa. Después de que se terminó de añadir la solución de hidróxido de sodio, la mezcla de reacción continuó agitándose a reflujo por 10 minutos más y luego se dejó en reposo. Se tomó una muestra de la mezcla de reacción y se realizó una

cromatografía en capa fina para asegurar la ausencia de materia prima de donde se observó la presencia minoritaria de un compuesto diferente al compuesto deseado. La aparición de un precipitado naranja fue evidente a medida de que la mezcla de reacción se iba enfriando y se hizo más abundante al colocar el matraz en baño de hielo-agua. El precipitado obtenido se filtró al vacío sobre buchner y el polvo retenido se lavó varias veces con una mezcla de metanol-agua 1:1 que luego se dejó secar al aire, obteniéndose 45 g de un polvo amarillo mostaza, el cual representa un 75% de rendimiento en la reacción hidrólisis.

Para estudios de espectroscopía, la 4-bromo,5-cloro,2-nitroanilina (IV) obtenida, se recrystalizó en metanol obteniéndose así, un polvo cristalino de color amarillo mostaza que presenta un punto de fusión de 198 a 200°C y un rf de 0.21 en el sistema 2 eluido tres veces.

4.1.1.5.- 4-Bromo-2-nitro-5-propiltioanilina (V).

A un matraz de bola con tres bocas adaptado con termómetro y columna de reflujo vigraux con 70 g (0.278 moles) de 4-bromo-5-cloro-2-nitroanilina (IV), se le adicionaron 910 mL de agua destilada y 178.5 mL de propilenglicol. El matraz de reacción se colocó sobre una canasta de calentamiento en la cual la mezcla de reacción se calentó a 40°C, y bajo agitación mecánica vigorosa, le fueron añadidos 14 g (0.35 moles) de hidróxido de sodio disueltos en 20 mL de agua destilada y además, 29.2 mL (24.31 g, 0.32 moles) de 1-propanotiol. Posteriormente, la mezcla de reacción se calentó a reflujo de agua a 95°C bajo agitación mecánica vigorosa por 4 horas, manteniendo el sistema de reacción perfectamente cerrado. Tiempo después, el matraz de reacción se dejó enfriar en reposo y el sistema se empezó a desarmar lentamente, bajo condiciones de extracción de aire, y sumergiendo las piezas en solución de hipoclorito de sodio para así evitar el olor fétido de los residuos del 1-propanotiol. El polvo suspendido, que cambió de naranja oscuro a naranja claro, se filtró al vacío sobre buchner y el polvo retenido se lavó varias veces con agua hasta haberle quitado por completo los residuos de olor fétido el cual se dejó secar al aire obteniéndose 73.7 g de un polvo naranja claro. Se le realizó una cromatografía en capa fina y se

detectó una ligera contaminación con materia prima, por lo que el producto se recristalizó en etanol absoluto; obteniéndose 65 g de unas agujas cristalinas de color naranja claro lo cual representa un 80.2 % de rendimiento de reacción. Dicho producto presenta un punto de fusión de 135 a 137°C y un *r_f* de 0.13 en el sistema 3 con el cual, se realizaron sus estudios de espectroscopía.

4.1.1.6.- 4-Bromo-5-propiltio-1, 2-fenilendiamina (VI).

En un vaso de precipitados de 250 mL se disolvieron, mediante agitación y calentamiento, 19.66 g (0.0859 moles) de cloruro estanoso dihidratado en 160 mL de etanol absoluto.⁴⁵ La solución alcohólica-estamosa obtenida se vertió en un matraz reactor de 250 mL, adaptado con termómetro y columna de reflujo vigraux, que contenía 5 g (0.01718 moles) de la 4-bromo-2-nitro-5-propiltioanilina (V). El matraz reactor se colocó sobre una canasta de calentamiento y la mezcla de reacción se calentó a reflujo a 73°C con dispositivo de atmósfera de nitrógeno y agitación magnética vigorosa por 5 horas en las cuales la reacción fue monitoreada por cromatografía en capa fina para analizar el avance de la reacción y se notó que a medida que la reacción de reducción procedía, la solución inicial que era de color naranja se torna amarilla. Tiempo después, se dejó enfriar el matraz reactor en reposo y su contenido se vertió en un matraz de bola de 500 mL y la solución obtenida se concentró a sequedad en rotavapor. El líquido viscoso de color naranja-amarillo que se obtuvo se suspendió en un vaso de precipitados de 600 mL con 200 mL de agua destilada y bajo agitación magnética vigorosa, se le fue adicionando poco a poco una solución de hidróxido de potasio al 25% hasta que la suspensión alcanzó un pH aproximadamente de nueve. Posteriormente, se realizó la extracción de la suspensión acuosa con acetato de etilo cuatro veces de 100 mL c/u y el extracto de acetato de etilo obtenido se lavó tres veces de 100 mL c/u con agua saturada de sal, al que después se le añadió sulfato de sodio anhidro; se agitó y filtró a través de un embudo de filtración rápida a un matraz de bola de un litro de capacidad. Los residuos de sulfato de sodio se lavaron con más acetato de etilo y estos lavados se recibieron en el mismo matraz. La solución de acetato de etilo obtenida (450 mL aproximadamente) se concentró a sequedad en

rotavapor formándose un líquido viscoso de color naranja claro que después de ser sometido a presión reducida con calentamiento ligero liberó vapores y que finalmente, cuando el matraz contenedor se congeló, el líquido viscoso solidificó obteniéndose 4.3 g de un polvo ceroso de color amarillo-naranja que presenta un punto de fusión de 60 a 65°C, un *r_f* de 0.4 en el sistema 5 y un rendimiento de reacción de reducción del 95.88%; que como tal se envió para sus estudios de espectroscopía.

4.1.1.7.- 6-Bromoalobenzazol (VII-1).

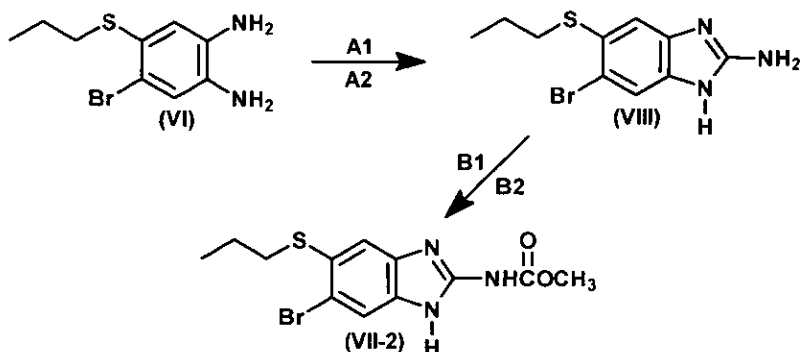
En un vaso de precipitados de 20 mL se disolvieron, con agitación y calentamiento, 2.72 g (0.00977 moles) de sulfato de metiltiopseudourea¹⁴ en 10 mL de agua destilada y esta solución se vertió en un matraz reactor de 50 mL, adaptado con termómetro de alcohol, colocado en un baño de etanol hielo seco. Una vez que la solución alcanzó los 5°C se adicionaron, bajo agitación magnética moderada, 1.5 mL (1.816 g, 0.00192 moles, 2Eq) de cloroformiato de metilo.¹⁴ Inmediatamente fue colocado el electrodo del potenciómetro en el matraz reactor y mediante la adición de una solución de hidróxido de potasio al 25% gota a gota, a través de un embudo de adición de 50 mL y bajo agitación moderada, se mantuvo la mezcla de reacción a un pH de 7 a 8 y a una temperatura abajo de los 10°C. La formación de un precipitado blanco esponjoso se logró cuando el pH de la mezcla de reacción se estabilizó entre 7 y 8, momento en el cual se detuvo la adición de la solución de hidróxido de potasio. Dicha mezcla de reacción como tal, se vertió a un matraz reactor de 125 mL adaptado con columna vigraux, termómetro y dispositivo para atmósfera de nitrógeno; el cual contenía 2.5 g (0.00957 moles) de la 4-bromo-5-propiltio-1, 2 fenilendiamina (VI).¹⁴ Posteriormente, el matraz reactor fue colocado sobre una canasta de calentamiento, se le añadieron 40 mL de agua destilada y el pH de la mezcla de reacción fue ajustado a 6.5 mediante la adición de una solución de ácido acético al 10%. La mezcla de reacción se calentó a reflujo a 95°C bajo agitación moderada durante 3 horas. Tiempo después, el matraz reactor se dejó enfriar a temperatura ambiente en reposo y luego el sistema de reacción fue desmontado lentamente bajo extracción en campana,

colocando todas sus piezas en una solución de hipoclorito de sodio (para eliminar residuos fétidos de metanotiol) y la suspensión obtenida en la mezcla de reacción fue filtrada al vacío sobre buchner, el polvo retenido se lavó varias veces con agua hasta haberle quitado el olor fétido del metanotiol, y se dejó secar al aire. El polvo morado oscuro de consistencia resinosa que se obtuvo, se depositó en un matraz de bola de 250 mL y se agitó a reflujo con 100 mL de metanol absoluto durante una hora. El polvo blanquecino que se liberó se filtró en embudo Hirsch, se lavó varias veces con metanol frío y se dejó secar al aire, obteniéndose 1.75 g de un polvo amorfo de color beige claro que corresponde a un rendimiento de reacción del 53%.

El producto se purificó con dimetilformamida y metanol 1:1, se lavó con metanol frío y se llevó a sequedad total (liberándolo de cualquier residuo de disolventes) mediante vacío y pentóxido de fósforo. Finalmente se obtuvo un polvo blanco fino y amorfo, que presenta un punto de fusión de 224 a 226°C y un n_D^{20} de 0.38 en el sistema 6 eluido dos veces; con el cual se realizaron sus estudios de espectroscopía.

4.1.2.- RUTA SINTETICA 2.

Para esta ruta se utilizó la 4-bromo-5-propiltio-1,2-fenilendiamina (VI) como materia prima inicial para dar lugar a la formación del 6-bromo albendazol (VII-2), y se diferencia de las otras rutas en que la 4-bromo-5-propiltio-1,2-fenilendiamina (VI) se transformó en el compuesto intermediario 2-amino-6-bromo-5-propiltio bencimidazol (VIII)⁴⁶ mediante una reacción de sustitución nucleofílica de la materia prima con bromuro de cianógeno,⁴⁷ dando lugar a una reacción de ciclización en la cual se forma el anillo de imidazol fusionado al anillo bencénico. Posteriormente la sustitución nucleofílica del compuesto anterior con el cloroformiato de metilo⁴⁸ da lugar a la obtención del compuesto final el 6-bromoalbendazol (VII-2). La figura No.9 esquematiza la ruta sintética 2:



(A1) 1.5 BrCN/CH₃CH₂OH a reflujo.

(A2) 1.5 KOH

(B1) 2ClCOOCH₃/Piridina, 0- 5°C

(B2) 50°C, 30min.

Figura No. 9

Diagrama sintético del 6-bromoalbenzazol por la ruta 2.

4.1.2.1.- 2-Amino-6-bromo-5-propiltiobencimidazol (VIII).

A un matraz reactor de 50 mL adaptado con columna vigraux, termómetro y dispositivo para atmósfera de nitrógeno, que contenía 1.3 g (0.005 moles) de la 4-bromo-5-propiltio-1,2-fenilendiamina (VI), se le adicionaron 15 mL de etanol absoluto. El matraz reactor fue colocado sobre una canasta de calentamiento y una vez que la mezcla de reacción alcanzó los 70°C, bajo agitación moderada le fueron adicionados poco a poco 0.792 g (0.00747 moles, 1.5 Eq) de bromuro de cianógeno y se mantuvo a reflujo a 73°C por una hora. Se realizó una cromatografía en capa fina y, después de comprobar la ausencia de materia prima, se bajó la temperatura a 60°C para adicionarle 0.419 g (0.00748 moles, 1.5 Eq) de hidróxido de potasio disueltos en 5 mL de agua destilada observándose un cambio de color en la mezcla de reacción de café rojizo a café oscuro, y se mantuvo así por 30 minutos a 75 °C bajo las mismas condiciones de agitación. Posteriormente, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente en reposo, se vertió en

un matraz de bola de 100 mL y se concentró a sequedad en rotavapor. Se obtuvo un líquido de aspecto resinoso de color café oscuro al que se le añadieron 40 mL de agua destilada y se extrajo con acetato de etilo cuatro veces de 30 mL c/u. La solución de acetato de etilo obtenida se lavó dos veces de 50 mL c/u con agua saturada de sal y luego se le agregó sulfato de sodio anhidro, se agitó y filtró a través de un embudo de filtración rápida para después calentarla a reflujo con carbón activado por 30 minutos. Finalmente, la solución de acetato de etilo de color naranja oscuro fue filtrada al vacío en buchner empacado con celita y la solución filtrada se recibió en un matraz de bola de 250 mL que se concentró a sequedad en rotavapor. Se obtuvo un líquido viscoso de color naranja oscuro que al ser sometido a presión reducida se expande, dando lugar a 1.32 g de un polvo resinoso de color naranja que corresponde a un 92.7% de rendimiento de reacción. El producto se recristalizó en cloroformo obteniéndose un polvo amorfo de color beige que presenta un punto de fusión de 125 a 127°C y un r_f de 0.15 en el sistema 7, con el cual se realizaron sus estudios de espectroscopía.

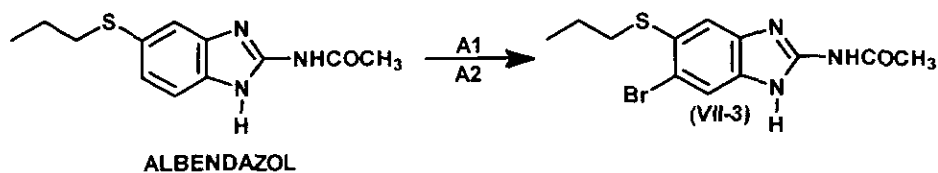
4.1.2.2.- 6-Bromoalbendazol (VII-2).

A un matraz reactor de 50 mL conteniendo 1.3 g (0.00454 moles) del 2-amino, 6-bromo-5-propiltiobencimidazol (VIII), se le añadieron 5 mL de piridina anhidra y la mezcla de reacción se enfrió colocando el matraz reactor en un baño de hielo seco-etanol bajo agitación moderada. Cuando la mezcla de reacción alcanzó los 0°C se le añadieron gota a gota, a través de un embudo de adición de 10 mL, 0.710 mL (0.86 g , 0.0091 moles, 2 Eq) de cloroformiato de metilo; manteniendo la temperatura abajo de los 5°C. Al término de la adición del cloroformiato de metilo, la mezcla de reacción se continuó agitando por 30 minutos más a las mismas condiciones de temperatura y luego se realizó una cromatografía en capa fina. Una vez que se comprobó la ausencia de materia prima en la mezcla de reacción de color café-rojiza, se retiró del enfriamiento; y al matraz reactor se le adaptó el termómetro, el dispositivo de atmósfera de nitrógeno y se colocó sobre una canasta de calentamiento para mantener a la mezcla de reacción a 50°C, bajo agitación, durante 30 minutos. Tiempo después, el matraz reactor se dejó enfriar a

temperatura ambiente y con agitación se le agregaron 20 mL de una mezcla fría de metanol-agua 1:1 y luego se mantuvo en reposo. En el fondo del matraz reactor apareció un precipitado amarillo-mostaza el cual se filtró al vacío en buchner, se lavó varias veces con agua hasta quitarle los residuos de piridina, y se dejó secar al aire obteniéndose un polvo de color café-crema que después se agitó a reflujo con metanol absoluto por una hora. El producto se filtró al vacío en embudo Hirsch, se lavó con metanol frío y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 1.04 g de un polvo color crema que corresponde a un 66.5% de rendimiento de reacción. El producto se purificó con dimetilformamida-metanol 1:1, se lavó con metanol frío y se llevó a sequedad mediante vacío y pentóxido de fósforo. Finalmente se obtuvo un polvo fino amorfo de color beige claro con un punto de fusión de 222 a 224°C y un n_D^{20} de 0.41 en el sistema 6 eluido dos veces; con el cual se realizaron sus estudios de espectroscopía.

4.1.3.- RUTA SINTETICA 3.

Para esta ruta se utilizó el albendazol como materia prima inicial para dar lugar a la formación del 6-bromoalbendazol (VII-3) y se diferencia de las otras rutas en que este producto final se obtuvo por la bromación directa del albendazol en ácido acético glacial. La figura No. 10 esquematiza la ruta sintética 3:



A1= 1.5Br₂/CH₃COOH, 25°C, 1h

A2= Na₂S₂O₄/H₂O

Figura No. 10

Diagrama sintético del 6-bromoalbendazol por la ruta 3.

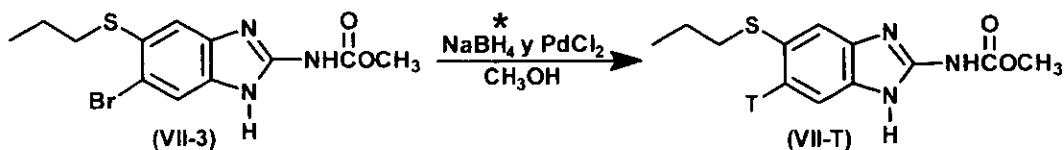
4.1.3.1.- 6-Bromoalbendazol (VII-3).

En un matraz reactor de 125 mL, adaptado con termómetro y bajo agitación magnética se disolvieron 3 g (0.0113 moles) de albendazol en 25 mL de ácido acético glacial. Posteriormente, a través de un embudo de adición de 10 mL, se le fue añadiendo gota a gota y con agitación moderada, una solución de 0.880 mL (2.724 g, 0.017 moles, 1.5 Eq) de bromo en 5 mL de ácido acético glacial. Se observó un incremento en la temperatura de la mezcla de reacción al momento de la adición de la solución de bromo junto con la formación de un precipitado naranja el cual se presentó a la mitad de la adición. Al término de la adición de la solución de bromo, la mezcla de reacción continuó agitándose durante una hora y luego se le agregaron 0.383 g (0.00187 moles, 1/6 Eq) de ditionito de sodio disueltos en 5 mL de agua destilada observándose con esto, un cambio de naranja a amarillo en el color del precipitado contenido en la mezcla de reacción la cual se mantuvo en agitación por 30 minutos más y luego se dejó en reposo. El precipitado obtenido se filtró en embudo Hirsch y el polvo retenido se lavó varias veces con agua y carbonato de sodio hasta que el polvo ya no presentó residuos de acidez, luego con agua destilada, y se dejó secar al aire obteniéndose 3.28 g de un polvo amarillo que corresponde a un 84.2% de rendimiento de reacción. El polvo obtenido se purificó con dimetilformamida-metanol 1:1, luego se lavó con metanol frío y finalmente se llevó a sequedad al vacío con peróxido de fósforo, obteniéndose un polvo amorfo de color blanco con un punto de fusión de 225 a 226°C y un r_f de 0.37 en el sistema 6 eluido dos veces; con el cual se realizaron sus estudios de espectroscopía.

4.1.4.- EL [³H]ALBENDAZOL (VII-T).

Para tritiar el albendazol se utilizó como materia prima el 6-bromo albendazol procedente de la ruta sintética No.3 (VII-3) el cual, a través de una sustitución nucleofílica aromática del [³H]borohidruro de sodio sobre la posición "6" del núcleo benzimidazol catalizada con cloruro de paladio,^{18,49} dio lugar a la incorporación de tritio en dicha posición; así como también en las posiciones intercambiables (1 y 2)

características de la molécula de albendazol. La figura No. 11 esquematiza únicamente el procedimiento del tritiado del albendazol sobre la posición "6":



* Soluciones de NaBH_4 y $[\text{}^3\text{H}] \text{NaBH}_4$ en NaOH 0.01N.

Figura No. 11
Diagrama sintético del $[\text{}^3\text{H}]$ albendazol (VII-T)

4.1.4.1.- La muestra de $[\text{}^3\text{H}]$ albendazol (VII-T).

A un matraz de bola de 100 mL conteniendo 10 mL de una solución de 6-bromoalbendazol (VII-3) en metanol-DMF al 3%, a una concentración de 0.344 mg/mL (son 3.44 mg ó 10 μmoles de 6-bromoalbendazol) bajo agitación vigorosa, se le adicionaron 10 mL de una solución de cloruro de paladio en metanol a una concentración de 0.532 mg/mL (son 5.32 mg ó 30 μmoles de Pd^{2+}) y después 0.1 mL de una solución reactiva de borohidruro de sodio en NaOH 0.01N a una concentración de 9.45 mg/mL (son 0.945 mg ó 25 μmoles de borohidruro de sodio). El matraz se colocó en campana con extracción de aire y se dejó agitándose por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, a través de una micropipeta de 1000 μL , se adicionó el mililitro de la solución de $[\text{}^3\text{H}]$ borohidruro de sodio en NaOH 0.01N (son 12.6 μg de $[\text{}^3\text{H}]$ borohidruro de sodio) que tenía una actividad específica de 75 Ci/mmol, conteniendo 25mCi/mL (925Bq/mL) y que venía en un recipiente de seguridad NEN de la marca Dupont, el cual después se enjuagó con 1.5 mL de NaOH 0.01N y éstos se adicionaron a la mezcla de reacción, y ésta se dejó en agitación por 10 minutos con el matraz cerrado herméticamente. Tiempo después se adicionaron otros 0.1mL de la solución reactiva de borohidruro de sodio (son otros 0.945 mg ó 25 μmoles de

borohidruro de sodio) y la agitación se continuó por otros 20 minutos manteniendo el matraz herméticamente cerrado.

Después del tiempo de agitación la suspensión de color negra se filtró al vacío en embudo de filtro poroso empacado con celita sobre una campana de filtración de vidrio y recibiendo la solución metanólica, junto con los tres lavados con metanol de 5 mL c/u que se realizaron después al empaque de celita, en un matraz de ErlenMeyer de 50 mL. La solución metanólica obtenida después de filtrar se evaporó a sequedad colocando el matraz en un baño de agua caliente y pasándole una corriente de nitrógeno, los residuos sólidos de la evaporación se suspendieron en 15 mL de solución salina saturada y se vertieron en un embudo de separación de 60 mL para ser extraídos con cloroformo 2 veces de 10 mL c/u. A la fase clorofórmica se le agregó sulfato de sodio anhidro, se agitó y la suspensión obtenida se filtró en embudo de filtración rápida recibiendo el filtrado en un vaso de precipitados de 30 mL. El polvo retenido se lavó con más cloroformo y estos lavados se juntaron con la solución previamente filtrada, la cual se concentró a un volumen final de 10 mL con corriente de nitrógeno para ser posteriormente aplicados a un cartucho de sílica Sep-pak clásica de Waters que previamente se había activado con cloroformo. Al cartucho se le pasaron 5 mL de cloroformo y el [^3H]albendazol se eluyó con 7 mL de cloroformo-metanol 99:1, recibiendo el eluido en un matraz ErlenMeyer de 50 mL que después se evaporó a sequedad con corriente de nitrógeno obteniéndose un aro de polvo blanco incrustado en el fondo del matraz, el cual se resuspendió con un mililitro de acetona pura y se le realizó una cromatografía en capa fina presentando un r_f de 0.33 en el sistema 6 eluido tres veces y que coincide con el r_f de albendazol estandar. Finalmente la solución de acetona se evaporó a sequedad con corriente de nitrógeno y el matraz contenedor con la muestra de [^3H]albendazol (VII-T) se congeló a -20°C bien sellado y envuelto con papel aluminio dentro de un bote con polvo de cloruro de calcio.

4.1.5.- ANALISIS DE LA SOLUCION DE [³H]ALBENDAZOL POR ESPECTROFOTOMETRIA.

4.1.5.1.- Barrido espectrofotométrico de 200 a 500 nm del albendazol en DMSO.

Se pesaron 5 mg de albendazol en un tarador de vidrio y se depositaron en un matraz volumétrico de 50 mL el cual se llevó al aforo con DMSO. Se tomó una alícuota de 5 mL y se vertió en un matraz volumétrico de 25 mL que se llevó al aforo con DMSO. La concentración final de albendazol fue de 20 µg/mL.

Se realizó el barrido UV/visible de 200 a 500 nm contra blanco de DMSO y se obtuvo el pico máximo de absorbancia para el albendazol a 300 nm (apéndice II).

4.1.5.2.- Elaboración de la curva patrón de albendazol en DMSO.

A) Preparación de la solución stock.

Se pesaron 5.05 mg de albendazol (son 5 mg ya que la pureza del estandar es del 99%) en un tarador de vidrio y se depositaron en un matraz volumétrico de 50 mL el cual se llevó al aforo con DMSO. Luego con esta solución se llevó a cabo la curva patrón de albendazol según se muestra en la tabla siguiente:

B) Curva patrón de albendazol en DMSO.

No. de muestra	Volumen de Solución stock en mL	Aforo a mL	Concentración en µg/mL
1	0.50	25	2
2	1.00	25	4
3	1.50	25	6
4	2.00	25	8
5	2.50	25	10
6	3.75	25	15
7	5.00	25	20

C) Lecturas de la curva patrón.

Finalmente se determinaron las absorbancias de los puntos de la curva patrón a una longitud de onda de 300 nm con los cuales se elaboró la curva patrón cuyo gráfico se muestra en el apéndice II.

Absorbancia a 300 nm VS. Concentración de Albendazol

No. de Muestra	Concentración de Albendazol en $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia a 300 nm
1	2	0.0763
2	4	0.1645
3	6	0.2459
4	8	0.3262
5	10	0.4105
6	15	0.6205
7	20	0.8121

Ver gráfico en el apéndice II.

Datos de la regresión lineal de la curva:

- $b = 0.00085$, $m = 0.04095$ y $r = 0.99985$.

4.1.5.3.- Análisis de la muestra obtenida de [^3H]albendazol (VII-T) por espectrofotometría.

Se descongeló la muestra obtenida de [^3H]albendazol (VII-T) y se disolvió en un mililitro de DMSO. Con la solución obtenida se prepararon las siguientes diluciones:

-Dilución No. 1: Se tomaron 20 μL de la solución preparada y se llevaron a un volumen final de 3 mL con DMSO en un vial de vidrio. La dilución obtenida se homogenizó con micropipeta. Factor de dilución=150.

-Dilución No. 2: Se tomaron 10 μL de la solución preparada y se llevaron a un volumen final de 1.5 mL con DMSO en un vial de vidrio. La dilución obtenida se homogenizó con micropipeta. Factor de dilución=150.

Finalmente se tomaron lecturas de las absorbancias a las dos diluciones anteriores a 300 nm contra blanco de DMSO para calcular, de esta manera, la concentración en analitos totales de la muestra de [^3H]albendazol (VII-T).

Dilución No.	Absorbancia a 300 nm	Factor de Dilución
1	0.3420	150
2	0.3484	150

La absorbancia promedio es **0.3452**.

Basándonos en la curva patrón, a una absorbancia de **0.3452** le corresponde una concentración de **8.45 µg/mL** de analitos totales por lo tanto la concentración de la solución de un mililitro de la muestra de [³H]albendazol (VII-T) en DMSO es:

$$8.45 \mu\text{g/mL} \times 150 = \mathbf{1,267.5 \mu\text{g/mL}}$$
 de analitos totales.

Debido a que en total se utilizaron 40 µL de la muestra de [³H]albendazol (VII-T) en DMSO en pruebas de cuantificación, el volumen total remanente es de 960µL, por lo que se cuenta con:

$$1,267.5 \mu\text{g/mL} \times 0.96 \text{ mL} = \mathbf{1,216.8 \mu\text{g}}$$
 de analitos totales y:

$$1.216.8 \mu\text{g}$$
 serían (si fuese puro albendazol) equivalentes a

$$\mathbf{4.586 \times 10^{-6} \text{ moles de albendazol.}}$$

$$\frac{4.586 \times 10^{-6} \text{ moles}}{0.002 \text{ M}} \times 1000 \text{ mL/L} = \mathbf{2.293 \text{ mL}}$$
 para el volumen final

$$0.002 \text{ M}$$

$$\text{y, } 2.293 \text{ mL} - 0.96 \text{ mL} = \mathbf{1.333 \text{ mL.}}$$

Por lo tanto se procedió a adicionar 1.333 mL más de DMSO a la muestra inicial de [³H]albendazol (VII-T) y se homogenizó con micropipeta. Como el volumen final de la muestra descongelada de [³H]albendazol (VII-T) fue de **2.293 mL**, ésta finalmente quedó a una concentración de hipotética de **2mM** de albendazol o de:

$$\frac{1,216.8 \mu\text{g}}{2.293 \text{ mL}} = \mathbf{530.6 \mu\text{g/mL}}$$
 de analitos totales.

$$2.293 \text{ mL}$$

“En adelante, la solución de [³H]albendazol se referirá a la muestra de [³H]albendazol (VII-T) obtenida, a partir del 6-bromo albendazol (VII-3), y disuelta en 2.293 mL de DMSO para dar lugar a una concentración final de **530.6 µg/mL** de analitos totales”.

4.1.6.- DETERMINACION DE LA PUREZA ABSOLUTA DE LA SOLUCION DE [³H]ALBENDAZOL POR HPLC.

4.1.6.1.- Preparación del amortiguador de fosfatos 0.05 M, pH=5.7.

En un vaso de precipitados de 1000 mL de capacidad se disolvieron 6.8045 g de fosfato de potasio monobásico en 800 mL de agua deionizada. A la solución obtenida se le ajustó el pH a 5.7 con una solución 0.8 M de hidróxido de sodio y se vertió en un matraz volumétrico de un litro realizándose posteriormente su aforo.

4.1.6.2.- Preparación del sistema fase móvil.

En una probeta de un litro de capacidad se midieron 700 mL de alcohol metílico grado HPLC y se vertieron en un matraz volumétrico de un litro. Posteriormente el matraz se aforó con la solución buffer de fosfatos 0.05 M, pH= 5.7 y la mezcla obtenida se vertió en un frasco de vidrio en donde se homogenizó por agitación. Posteriormente la mezcla se filtró a través de una membrana Millipore de 0.25 μm y degasificó por 20 minutos en un equipo de ultrasonido, obteniéndose así la solución fase móvil.

4.1.6.3.- Preparación del equipo de HPLC.

El equipo de HPLC Beckman System Gold con una columna Sherisorb ODS 1, utilizado se dejó acondicionando con la fase móvil durante una hora y media a un flujo de 1.2 mL/min, con su lámpara del detector fija a una longitud de onda de 292 nm, tiempo suficiente para que el equipo mostrara una línea basal estable.

4.1.6.4.- Elaboración de la curva patrón de albendazol.

A) Preración de la solución stock de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En un tarador de vidrio se pesaron 10 mg de albendazol estandar, y éstos se vertieron en un matraz volumétrico de 100 mL los cuales se disolvieron con 3 mL

de DMSO calentando suavemente en parrilla eléctrica y el matraz se llevó al aforo con metanol. Se tomó una alícuota de 5 mL y se vertió en un matraz volumétrico de 50 mL que se llevó al aforo con metanol. De esta última se tomó una alícuota de 5 mL y se vertió en un matraz volumétrico de 50 mL que también se llevó al aforo con metanol, obteniéndose así, la solución stock de albendazol de 1 µg/mL.

B) Metodología seguida para la curva patrón.

En 5 matraces volumétricos de 10 mL cada uno se realizó la curva patrón de albendazol a partir de diferentes alícuotas que fueron tomadas de la solución stock de albendazol aforando con metanol como se muestra en la siguiente tabla:

Punto No.	Volumen tomado de la solución stock de albendazol en mL.	Concentración final Obtenida en µg/mL.
1	2	0.2
2	4	0.4
3	6	0.6
4	7	0.7
5	8	0.8
6	-----	1.0

NOTA: El punto No. 6 es la misma solución stock de albendazol.

4.1.6.5.- Inyección de la curva patrón.

Después de haberse obtenido una línea basal estable en el equipo HPLC con la fase móvil durante el acondicionamiento de la columna, se procedió a inyectar por duplicado y en forma manual un volumen de 20 µL de cada punto de la curva patrón de albendazol empleándose una jeringa microlítica de 50 µL de capacidad y manteniendo un flujo constante en el equipo de 1.2 mL/min con el detector a una longitud de onda de 292 nm.

4.1.6.6.- Preparación de las diluciones de la solución de [³H]albendazol.

En un tubo Eppendorf de 1.5 mL de capacidad se vertieron 990 µL de metanol grado HPLC luego se añadieron 10 µL de la solución de [³H]albendazol y se agitó

vigorosamente en vortex, obteniéndose así la dilución 1:100 de la solución de [^3H]albendazol.

En otro tubo Eppendorf igual se vertieron 400 μL de metanol grado HPLC y luego se añadieron 100 μL de la dilución anterior y se agitó vigorosamente en vortex, obteniéndose así la dilución final de la solución de [^3H]albendazol 1:500.

4.1.6.7.- Inyección de las diluciones de la solución de [^3H]albendazol.

Al término de la inyección de los puntos de la curva patrón, se inyectaron por duplicado 20 μL de la dilución 1:500 de la solución de [^3H]albendazol y finalmente la dilución 1:100, manteniendo el equipo a un flujo de 1.2 mL/min con el detector fijo a 292 nm.

4.1.7.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA SOLUCION DE [^3H]ALBENDAZOL.

4.1.7.1.- Cálculo del porcentaje de eficiencia del equipo contador de centelleo utilizado.

A) Cálculo de la actividad específica actual del Estándar de ^3H Beckman.

- Equipo empleado: Contador de Centelleo Beckman LS-6000SC.
- Actividad del estándar de ^3H Beckman= 104845 dpm al 11 de Enero de 1993.
- Al 11 de Febrero de 1998, tiempo transcurrido: 5.0833 años.
- El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) para ^3H es de 12.43 años.

$$\lambda = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \quad \text{por lo tanto: } \lambda \text{ } ^3\text{H} = \frac{\ln 2}{12.43 \text{ años}}$$

de donde λ , la constante característica de desintegración, es de 0.055764 para el núcleo de tritio. De lo anterior se obtiene que: $\lambda \text{ } ^3\text{H} = 0.055764 \text{ años}^{-1}$.

Sabiendo que $A = A_0 e^{-\lambda t}$, en donde A es la actividad específica actual y A_0 es la actividad específica inicial, sustituyendo tenemos que:

$$A = 104,845 e^{-\{ (0.055764 \text{ años}^{-1}) (5.0833 \text{ años}) \}}$$

- La actividad específica actual del estandar para el 11 de Febrero de 1998 fue de : **78965.87 dpm.**

B) Lecturas de los estandares blanco y de ^3H Beckman.

En el contador de centelleo se colocaron los dos estandares Beckman, el blanco y el de tritio, y se tomaron sus lecturas de actividad en cuentas por minuto (cpm); cuyos datos posteriormente fueron utilizados para el cálculo del porcentaje de eficiencia del equipo contador de centelleo utilizado.

C) Cálculo del porcentaje de eficiencia del equipo.

El porcentaje de eficiencia del equipo contador de centelleo se obtuvo dividiendo el valor promedio de la actividad real del estandar de tritio en cpm entre su valor teórico de actividad específica actual en dpm y multiplicando por cien.

$$\frac{\text{Valor promedio de la actividad real en cpm}}{78965.87 \text{ dpm}} \times 100 = \text{Porcentaje de eficiencia.}$$

4.1.7.2.- Cálculo de la actividad específica de la solución de [^3H]albendazol.

A cinco viales de vidrio para contador de centelleo se les agregaron a cada uno 5 mL de solución cocktail de Insta-Gel y a un primer vial se añadió 10 μL de DMSO, a un segundo y tercero 10 μL de la solución de [^3H]albendazol (por duplicado), a un cuarto 40 μL de una dilución 1:10 y al último 40 μL de la dilución 1:100 de la solución de [^3H]albendazol y después de agitarlos suavemente se les tomaron sus lecturas de actividad en cpm en el contador de centelleo para que, posteriormente a través de estos datos y del valor del porcentaje de la eficiencia del equipo, se realizara el cálculo de la actividad específica de la solución de [^3H]albendazol en dpm/pmol.

4.2.- PARTE BIOLÓGICA.

4.2.1.- LA TUBULINA DE CEREBRO DE RATA.

4.2.1.1.- Procedimiento de obtención de la tubulina de cerebro de rata.

Se sacrificaron 50 ratas blancas hembras de 30 días de edad de la raza Wistar y se les extrajeron los cerebros los cuales se lavaron con amortiguador RB frío. Luego los 64.16 g de material cerebral obtenidos fueron resuspendidos en 86 mL de amortiguador RB frío y a través de un homogenizador Tekmar, se homogenizaron completamente. El homogenizado de 101 mL fue centrifugado en ultracentrífuga a 100,000 g (29,300 rpm en rotor type 35) por 30 minutos a 4°C; y los 100 mL de sobrenadante que se obtuvieron se diluyeron 1:1 con amortiguador RB-glicerol 8M con GTP 0.5mM⁵⁰. La solución que se obtuvo de 200 mL se agitó e incubó a 30°C durante 45 minutos. Al término de la incubación se obtuvo una solución turbia que se centrifugó a 100,000 g (29,300 rpm en rotor type 35) por una hora a 30°C y la pastilla blanca gelatinosa que se obtuvo, se suspendió en 22 mL de amortiguador RB frío con GTP 0.5mM y se incubó en frío por 45 minutos a 4°C.

Posteriormente, la muestra se centrifugó en frío a 100,000 g (30,000 rpm en rotor type 42.1) por una hora a 4°C; y los 22.6 mL de sobrenadante que se obtuvieron se guardaron en refrigeración toda una noche y al día siguiente la muestra se diluyó 1:1 con amortiguador RB-glicerol 8M con GTP 0.5mM. La solución de 45.2 mL que se obtuvo se agitó e incubó a 30°C por 45 minutos. Al término de la incubación se obtuvo una solución turbia que se centrifugó a 100,000 g (29,300 rpm en rotor type 35) por una hora a 30°C y la pastilla gelatinosa que se obtuvo, se resuspendió en 5 mL de amortiguador RB frío con GTP 1mM y la muestra se incubó en frío por 45 minutos a 4°C (para la despolimerización final).

Finalmente, la muestra se centrifugó en frío a 100,000 g (30,000 rpm en rotor type 42.1) por una hora a 4°C. De los 5 mL del sobrenadante que se obtuvieron, conteniendo a la tubulina soluble, se tomaron las muestras para la cuantificación del contenido protéico para electroforesis en gel de poliacrilamida y para su

identificación inmunoquímica, el resto se distribuyó en tubos Eppendorf y se congeló a -80°C para su conservación y posterior uso en los estudios de unión.

4.2.2.- LA TUBULINA DE *Giardia lamblia*.

4.2.2.1.- Procedimiento de obtención de la tubulina de *Giardia lamblia*.

En una campana de flujo laminar con aire filtrado se inocularon 6 botellas especiales para cultivo conteniendo 30 varillas de vidrio y un litro de medio de cultivo enriquecido especial para *Giardia*⁵¹ cada una; con un número aproximado de 10 millones de trofozoitos viables de *Giardia lamblia* de la cepa P-1, provenientes de inóculos axénicos contenidos en tubos de cultivo de 25 mL que contenían una carga aproximada de 2 millones de trofozoitos por mililitro, y luego las botellas de cultivo se taparon, se giraron suavemente para homogenizar su contenido y se incubaron a 37°C por 4 días.

Al término de la incubación las botellas de cultivo se presentaron turbias y se observaron al microscopio para revisar la carga de trofozoitos que presentaban, y siendo esta satisfactoria, las botellas fueron colocadas en baño de hielo-agua por una hora para provocar con esto que los trofozoitos se despegaran del vidrio y se incorporaran al medio de cultivo. Luego de los seis litros de medio de cultivo ya fríos y con una turbidez bien notoria se tomó una muestra para realizar la cuenta total de trofozoitos en una cámara de Neubauer y observándose al microscopio las siguientes cuentas:

Cuadrante	No. de trofozoitos	Cantidad de trofozoitos Trofozoitos/mL
1	194	1,940,000
2	210	2,100,000
3	187	1,870,000
4	192	1,920,000

La cantidad promedio de trofozoitos por mililitro de medio de cultivo fue de 1,957,000 y por lo tanto en seis litros de medio de cultivo se tuvieron aproximadamente, 1.1745×10^{10} trofozoitos totales.

Posteriormente, los seis litros de medio de cultivo fueron centrifugados en tres tantos por 10 minutos a 4,000 rpm y las pastillas grises, con la carga de trofozoitos, fueron resuspendidas con amortiguador PBS frío y centrifugadas de nuevo por 5 minutos a 3,500 rpm en un tubo cónico para centrifuga. La pastilla gris con la carga total se resuspendió con amortiguador de PBS y se centrifugó de nuevo a 3,500 rpm completándose de esta manera un ciclo de lavado. Se realizaron en total 5 ciclos de lavado a la pastilla con la carga total obteniéndose, finalmente, una pastilla de color gris oscuro con olor característico y un volumen total de 4 mL contenida en un tubo cónico de la cual fue resuspendida y transvasada a un vaso de precipitados conteniendo 300 mL de amortiguador MM con tritón X-100 al 0.5% y PMSF al 0.005%.

La mezcla se dejó en agitación durante 30 minutos con una concentración aproximada de 10^7 trofozoitos por mililitro.

Tiempo después, los 300 mL de la solución con los trofozoitos lisados fueron centrifugados en dos tantos a 4,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se obtuvieron unas pastillas de halo blanquecino y centro gris oscuro, conteniendo a los citoesqueletos, los cuales se resuspendieron en amortiguador MM frío (con ayuda de vortex) y la suspensión se centrifugó a 3,500 rpm durante 10 minutos a 4°C, completándose de esta forma un ciclo de lavado. Se realizaron en total 3 ciclos de lavado a la pastilla de los citoesqueletos y ésta después se resuspendió con 10 mL de amortiguador MM con CaCl_2 1mM, GTP 1mM y ATP 1mM. Los citoesqueletos se agitaron vigorosamente en un vortex hasta que los últimos fragmentos se incorporaron a la suspensión y ésta se transvasó a un vial de vidrio en donde dicha suspensión de citoesqueletos se refrigeró a 4°C por un período de 18 horas para inducir la despolimerización.

Finalmente la suspensión se centrifugó en ultracentrifuga a 100,000 g (30,000 rpm en rotor type 42.1) por una hora a 4°C y la pastilla de color gris oscuro se guardó para que posteriormente se le realizara otro ciclo de despolimerización. El sobrenadante de 10 mL con la tubulina soluble se concentró a un volumen final de 5 mL en tubo de diálisis sobre lecho de polietilenglicol, y de este concentrado se tomaron las muestras para la cuantificación de contenido protéico, para la

electroforesis en gel de poliacrilamida y para su identificación inmunoquímica, el resto se vertió en un vial de vidrio y se congeló a -80°C para su conservación y posterior uso en los estudios de unión.

4.2.3.- LA TUBULINA DE *Ascaris suum*.

4.2.3.1.- Procedimiento de obtención de la tubulina de *Ascaris suum*.

En una licuadora Osterizer de cinco velocidades con vaso de vidrio se trituraron 60 g de nemátodos de *Ascaris suum* provenientes del intestino delgado de cerdos de traspatio recién sacrificados en el rastro de la Aurora en Cd. Nezahualcoyotl; con 100 mL de amortiguador PEM con GTP 1mM y Ribonucleasa tipo 1-A de Sigma a una concentración de $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ a velocidades crecientes durante 10 minutos. Una vez que se obtuvo una suspensión espesa y uniforme ésta se pasó por un homogenizador de tejidos con pistilo de teflón, con lo que se obtuvo un homogenizado uniforme. Dicho homogenizado se centrifugó a 100,000 g (29,300 rpm en rotor type 35) por una hora a 4°C . El sobrenadante rojizo que se obtuvo se filtró en buchner con papel Watman resultando unos 100 mL aproximadamente de la muestra cruda de *Ascaris suum*.

Para llevar a cabo el Batch (cromatografía de intercambio iónico en tubos de centrifuga) de la muestra cruda de *Ascaris suum*, se suspendieron 80 mL de resina DEAE a-50 Sephadex con 100 mL de la solución amortiguador PM con KCl 0.2M; la suspensión se agitó por 5 minutos en agitador orbital Nutator y luego se centrifugó en tubos cónicos a 1,500 rpm por 5 minutos para que de esta manera se compactara la resina. Este proceso se realizó 4 veces más para conseguir que la resina se equilibrara a esa molaridad. Luego la resina se vertió en el mismo contenedor que tenía el sobrenadante filtrado y éste se mantuvo agitándose en el agitador orbital Nutator toda una noche a 4°C . Al otro día la resina se centrifugó a 1,500 rpm por 5 minutos a 4°C desechándose el sobrenante y ésta se repartió en 4 tubos cónicos Falcon de 50 mL y se lavó con 320 mL de amortiguador PM con KCl 0.2M, en 4 secciones de 80 mL cada una (20 mL por tubo), agitando por 5 minutos y centrifugando a 1,500 rpm por 5 minutos entre sesión y sesión. Luego la

resina se transfirió a un tubo de jeringa de 20 mL de capacidad con papel filtro en el fondo y recortada por la parte superior (a modo de que sirviera de columna), con la cual se obtuvo un lecho de 15 mL. Posteriormente, a través de mangueras de hule de 1 mm de diámetro se conectó la salida inferior de la jeringa a un equipo detector Gibson y este a su vez a un equipo fraccionador Gibson. En la parte superior de la jeringa se colocó un tapón de hule con el cual se hizo la conexión a una bomba peristáltica Rabbit a través de la cual se suministró hacia el lecho la solución amortiguador PM, con KCl 0.2 M, a un flujo de 0.5 mL/minuto hasta que se terminó de eluir toda la proteína y se logró la línea basal en el detector. Luego de igual forma se suministraron 15 mL de la misma solución amortiguador pero con 0.3 M de KCl, con los que nuevamente se logró la línea basal en el detector una vez que se terminó de eluir proteína y por último se suministraron de igual forma 15 mL también de la misma solución amortiguador pero ahora con 0.35 M de KCl. Aproximadamente los 12 mL de la fracción que se recolectaron de esta última elución se vertieron a un tubo de diálisis y se concentraron a un volumen final de 2.5 mL con polietilenglicol. Finalmente, la muestra de tubulina así obtenida se transfirió a un vial de vidrio del que se tomaron las muestras para llevar a cabo la cuantificación del contenido protéico, la electroforesis en gel de poliácridamida y su identificación inmunoquímica, y el resto se congeló a -80°C para su conservación y posterior uso en los estudios de unión.

4.2.4.- CUANTIFICACIÓN PROTEICA DE LAS MUESTRAS DE TUBULINA DE CEREBRO DE RATA, *Giardia lamblia* Y *Ascaris suum* A TRAVES DEL METODO DE MICRO BRADFORD EN PLACA DE ELISA.

4.2.4.1.- Obtención de la Curva Patrón con BSA.

A) Preparación de la solución stock de 1mg/mL de BSA (Albúmina Sérica de Bovino).

En un vial de vidrio se pesaron 10.2 mg de BSA al 98% y se disolvieron en 10 mL de amortiguador PBS bajo agitación suave a temperatura ambiente. Dado que el coeficiente de extinción molar reportado para el BSA es $E_{1\%}^{280\text{nm}} = 5.8$, se le

tomó lectura del valor de absorbancia a 280 nm de la solución de BSA anterior resultando ser de 0.6424, lo cual correlaciona para una concentración de 1.10758 mg/mL.

Para obtener la solución stock de BSA de 1mg/mL , en un vial de vidrio se agregaron 2,708.4 μL de la solución anterior y se llevó a un volumen final de 3 mL con solución amortiguador de PBS.

B) Procedimiento de preparación de la curva patrón.

1.- Preparación de la solución de trabajo de BSA de 0.03125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

En un tubo Eppendorf de 1.5 mL de capacidad, se diluyeron 35 μL de la solución stock de BSA con 1,085 μL de solución amortiguador PBS, para obtener un total de 1,120 μL de la solución deseada; de tal forma que cada 160 μL de la solución de trabajo contiene una carga de 5 μg de BSA.

2.- La curva patrón de BSA.

En los pozos A₁, A₂, B₁, B₂, C₁ y C₂ de una placa de ELISA perfectamente limpia, se vertieron en cada uno 160 μL de la solución de trabajo de BSA. En las siguientes series de pozos: de A₃ a A₅, de B₃ a B₅ y de C₃ a C₅, se vertieron a cada uno 160 μL de amortiguador PBS. Luego a cada uno de los pozos A₂, B₂, y C₂ se les adicionaron a cada uno 160 μL de amortiguador PBS y las mezclas se agitaron para homogeneizarlas. Después se tomaron 160 μL de las mezclas de los pozos anteriores y se adicionaron a los pozos siguientes A₃, B₃, y C₃ respectivamente y se agitaron para homogeneizarlas. Luego se toman 160 μL de estos últimos y agregaron a la serie siguiente de tal forma que se siguieron realizando las diluciones seriadas hasta llegar a la serie de pozos A₅, B₅, y C₅. Después se toman 160 μL de estos últimos y se desechan fuera de la placa, dando lugar a que en cada uno de los 15 pozos quedara un volumen final de 160 μL con las cantidades de 5 μg , 2.5 μg , 1.25 μg , 0.625 μg y 0.312 μg de BSA en cada serie de tres pozos respectivamente.

En los pozos A₆, B₆ y C₆ sólo se les vertieron 160 μL de amortiguador PBS, los cuales sirvieron como blancos y posteriormente, a todos los 18 pozos se les

adicionaron 40 μL del reactivo de Bradford 5X homogenizando bien todas las mezclas con ayuda de una multimicropipeta.

C) Lecturas de los puntos de la curva patrón.

La placa de ELISA, conteniendo los puntos de la curva patrón por triplicado, se colocó en el equipo lector de ELISA Bio-Rad y se leyeron las absorbancias de los puntos a 595 nm.

4.2.4.2.- Cuantificación de la muestra de tubulina de cerebro de rata.

En un tubo Ependorf de 600 μL de capacidad se vertieron 90 μL de la solución de amortiguador PBS y se le agregaron 10 μL de la muestra obtenida de tubulina de cerebro de rata, la mezcla se agitó en vortex obteniéndose la dilución 1:10 de la muestra.

A los pozos A₁, B₁ y C₁ de una placa de ELISA perfectamente limpia, conteniendo 155 μL de amortiguador PBS, se les agregaron a cada uno 5 μL de la dilución 1:10 de la muestra obtenida de tubulina de cerebro de rata. Luego a los pozos A₂, B₂ y C₂ se les agregaron solo 160 μL de la solución de amortiguador PBS por ser los blancos y posteriormente, a estos 6 pozos se les adicionaron a cada uno 40 μL del reactivo de Bradford 5X homogenizando bien estas mezclas con ayuda de una multimicropipeta.

Finalmente a la placa de ELISA se le tomó la lectura de absorbancia a 595 nm en el equipo lector de ELISA Bio-Rad para obtener de esta forma la cuantificación protéica total de la muestra obtenida de tubulina de cerebro de rata.

4.2.4.3.- Cuantificación de la muestra de tubulina de *Giardia lamblia*.

A los pozos A₁, B₁ y C₁ de una placa de ELISA perfectamente limpia, conteniendo 150 μL de amortiguador PBS, se les agregaron a cada uno 10 μL de la muestra obtenida de tubulina de *Giardia lamblia*. Luego a los pozos A₂, B₂ y C₂ se les agregaron solo 160 μL de la solución de amortiguador PBS por ser los blancos y posteriormente, a estos 6 pozos se les adicionaron a cada uno 40 μL del

reactivo de Bradford 5X homogenizando bien estas mezclas con ayuda de una multimicropipeta.

Finalmente a la placa de ELISA se le tomó la lectura de absorbancia a 595 nm en el equipo lector de ELISA Bio-Rad para obtener de esta forma la cuantificación protéica total de la muestra obtenida de tubulina de *Giardia lamblia*.

4.2.4.4.- Cuantificación de la muestra de tubulina de *Ascaris suum*.

A los pozos A₁, B₁ y C₁ de una placa de ELISA perfectamente limpia, conteniendo 155 µL se les agregaron a cada uno 5 µL de la muestra obtenida de tubulina de *Ascaris suum*. Luego a los pozos A₂, B₂ y C₂ se les agregaron sólo 160 µL de la solución de amortiguador PBS por ser los blancos y posteriormente, a estos 6 pozos se les adicionaron a cada uno 40 µL del reactivo de Bradford 5X homogenizando bien estas mezclas con ayuda de una multimicropipeta.

Finalmente a la placa de ELISA se le tomó la lectura de absorbancia a 595 nm en el equipo lector de ELISA Bio-Rad para obtener de esta forma la cuantificación protéica total de la muestra obtenida de tubulina de *Ascaris suum*.

4.2.5.- ELECTROFORESIS REALIZADAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA A LAS MUESTRAS DE TUBULINA DE CEREBRO DE RATA, *Giardia lamblia* y *Ascaris suum*.

4.2.5.1.- Procedimiento de preparación de muestras.

A unos tubos Ependorf conteniendo una cantidad en µL de amortiguador RB, MM ó PM, (dependiendo si se trató de la electroforesis de las muestras de tubulina de rata, *Giardia* ó *Ascaris* respectivamente) se les adicionaron ciertos volúmenes en µL que correspondían a 15 µg de contenido protéico total para el caso de las muestras de los extractos crudos, de citoesqueletos de *Giardia* o semipurificadas que se obtuvieron en los pasos de obtención de las muestras de tubulina. ó 5 µg para el caso de las muestras obtenidas de las tres tubulinas, y para las muestras que se generaron en los pasos finales (a partir del segundo ciclo de polimerización para el caso de las muestras de cerebro de rata), de tal forma que el volumen final

y total contenido en todos los tubos Ependorf fuera de 10 μL . Luego, a otro tubo Ependorf conteniendo 7 μL del mismo amortiguador, se le vertieron 3 μL de la mezcla de marcadores de peso molecular y, posteriormente, a éste y a todos los tubos Ependorf con las muestras se les adicionaron 10 μL de amortiguador de muestra 2X y con ayuda de la micropipeta las muestras se homogenizaron y después fueron colocadas dentro de una plancha caliente por un minuto, la cual se encontraba a 100°C, para que finalmente quedaran listas para ser aplicadas al gel de poliacrilamida.

4.2.5.2.- Procedimiento de preparación del gel de poliacrilamida al 10 %.

A) Preparación del gel separador al 10%.

A un vaso de precipitados de 50 mL conteniendo 1.25 mL de solución de acrilamida al 30%-bisacrilamida al 0.08%, se le adicionaron en orden consecutivo: 0.93 mL de amortiguador Tris/SDS pH=8.8, 1.56 mL de agua deionizada, 12.5 μL de solución de APS al 10% y 5 μL del reactivo TEMED. La mezcla se agitó y con ayuda de una micropipeta se vertió entre las placas de vidrio del equipo de electroforesis y se dejó en reposo por 45 minutos para que el gel separador polimerizara.

B) Preparación del gel concentrador al 5%.

A un vaso de precipitados de 50 mL conteniendo 0.65 mL de solución de acrilamida al 30%-bisacrilamida al 0.08%, le fueron adicionados en orden consecutivo: 1.25 mL de amortiguador Tris Cl/SDS pH=6.8, 3.05 mL de agua desionizada, 25 μL de solución de APS al 10% y 5 μL de reactivo de TEMED. La mezcla se agitó, y con la ayuda de una micropipeta, se vertió entre las placas de vidrio del equipo de electroforesis por arriba del gel separador ya gelificado; luego se colocó el molde para 10 carriles en ésta y se dejó en reposo por 30 minutos para que el gel concentrador polimerizara.

Finalmente se extrajo el molde de los carriles, y el gel de poliacrilamida ya polimerizado entre las placas de vidrio, se colocó dentro de la cámara de electroforesis.

4.2.5.3.- Electroforesis de las muestras.

La cámara de electroforesis con el gel ya listo, se llenó tanto en la cavidad exterior como en la interior con un litro de amortiguador de corrida y con una jeringa microlítica se aplicó en el carril uno la muestra con la mezcla de los marcadores de pesos moleculares y en los carriles siguientes se fueron aplicando las demás muestras, empezando con el extracto crudo de cerebro de rata o *Ascaris suum* o la suspensión con citoesqueletos de *Giardia lamblia*, según sea el caso, y continuando con las demás muestras que se generan en los pasos consecutivos a la purificación, aplicando siempre en el último carril la muestra obtenida de tubulina de cerebro de rata, *Giardia lamblia* o *Ascaris suum*.

Posteriormente se colocó la tapa con los electrodos, se hizo la conexión con la fuente de poder y la cámara de electroforesis fue sometida a un voltaje de 100 volts dejando correr las muestras hasta que el frente de las muestras llegó al nivel del borde inferior de las placas de vidrio, en ese momento se apagó la fuente de poder, se quitó la tapa con los electrodos y se sacaron las placas de vidrio con el gel. Las placas de vidrio fueron separadas para extraer el gel el cual fue colocado en una charola de plástico con la solución teñidora de azul de Coomassie y ésta se colocó sobre el agitador por una hora. Luego se retiró el gel de la solución teñidora y se colocó en otra charola de plástico con solución desteñidora y ésta se colocó nuevamente sobre el agitador, realizando los cambios de la solución cada vez que ésta se saturaba de colorante hasta que el gel quedó desteñido.

Finalmente el gel se sacó de la solución desteñidora y se colocó sobre una pantalla de iluminación para observar los desplazamientos de las muestras en el gel que resultan de la electroforesis, así como también para la verificación del peso molecular por la comparación del desplazamiento de los marcadores. Los geles se conservaron para usos posteriores sumergidos en la solución desteñidora.

También se realizó otra electroforesis similar pero esta vez con las tres muestras de tubulina (cerebro de rata, *Giardia* y *Ascaris*) en el mismo gel, en el cual se aplicó un contenido proteico de 3 µg (aproximadamente) de cada muestra junto con 3 µL la mezcla de marcadores de peso molecular. Se obtuvo un gel con el cual se llevó a cabo el análisis densitométrico de las tres muestras y en el que

se compararon entre sí el aspecto de las tubulinas de los tres modelos experimentales.

4.2.6.- IDENTIFICACION DE LAS MUESTRAS DE TUBULINA DE CEREBRO DE RATA, *Giardia lamblia* y *Ascaris suum* POR EL METODO DE IMMUNOELECTROTRANSFERENCIA CON LUMINOL.

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de las tres muestras de tubulina de los tres modelos experimentales aplicando un contenido protéico de 5 μg (aproximadamente) de cada una junto con 3 μL de la mezcla de los marcadores de peso molecular. Al término de la electroforesis se extrajo el gel de las placas de vidrio, se cortó un pedazo de papel de nitrocelulosa con el tamaño exacto del gel y también se cortaron seis trozos de papel filtro Whatman de un tamaño mayor que el gel. Tanto el gel como el papel de nitrocelulosa y los trozos de papel filtro recortados se sumergieron en el amortiguador de transferencia por 5 min. Luego el gel se unió al papel de nitrocelulosa y después se unieron tres pedazos de papel filtro en ambos lados a manera de hacer un sandwich, el cual se colocó en la cámara de transferencia cuidando que el papel de nitrocelulosa quedara orientado hacia el polo positivo, se vertió un poco de amortiguador de transferencia sobre el sandwich y se tapó la cámara.

Se realizaron las conexiones con la fuente de poder para llevarse a cabo el Blot, con una corriente de 200 mA por 25 minutos. Tiempo después se extrajo el papel de nitrocelulosa, se sumergió en una charola de plástico con solución teñidora de rojo de Ponceau y se colocó en el agitador por 10 minutos. Tiempo después, al sacar el papel de nitrocelulosa se observó que las manchas de las muestras de tubulina se tiñieron de rojo las cuales se marcaron por su periferia suavemente con un lapicero y posteriormente la nitrocelulosa se sumergió en otra charola con solución de leche descremada en polvo al 5% en amortiguador PBS-tween al 0.05%, colocándose la charola en el agitador por una hora. Luego se lavó el papel de nitrocelulosa cinco veces con el mismo amortiguador de PBS-tween y se le realizaron tres cortes en tiritas de 5 mm de ancho a cada una, de tal forma

que cada tira recortada contenía la mancha de una de las tres muestras de tubulina. Una cuarta tira con muestra de tubulina de cerebro de rata, se obtuvo de un blot anterior la cual se utilizó como control negativo.

A una placa de acrílico con 10 carriles se le marcaron los primeros cuatro con los números 1,2,3 y 4; en el carril 1 se colocó la tira de la muestra de tubulina de cerebro de rata del blot anterior correspondiente al control negativo con un mL de una dilución 1:3000 de suero de ratón preinmune, en el carril 2 se colocó la tira con la muestra de tubulina de cerebro de rata con un mL de una dilución 1:3000 de suero antitubulina de rata de ratón, en el carril 3 la tira con la muestra de tubulina de *Giardia lamblia* con un mL de la dilución 1:3000 de suero antitubulina de *Giardia* de ratón y en el carril 4 la tira con la muestra de tubulina de *Ascaris suum* con un mL de la dilución 1:3000 de suero antitubulina de rata de ratón. La placa se colocó sobre el agitador para incubar las tiras con el anticuerpo primario en agitación por una hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, las tiras se lavaron 5 veces con el amortiguador PBS-tween al 0.05% y después a todos los carriles se les agregó un mL de la dilución 1:4000 de suero antiIgG de ratón de cabra acoplado a peroxidasa, que es el anticuerpo secundario, y la placa se incubó bajo agitación por una hora a temperatura ambiente.

Tiempo después, las tiras se lavaron 5 veces con el amortiguador PBS-tween y dentro de una bolsita de polietileno, las 4 tiras fueron rociadas con el reactivo de Luminol ECL (mecanismo de acción en figura No. 12)⁵² dejándolas interaccionar por dos minutos para que posteriormente, en un cuarto oscuro, se llevara a cabo la impresión de la película radiográfica por el contacto directo con las 4 tiras de nitrocelulosa. Una vez que se realizó la impresión el revelado se obtuvo con los reactivos, revelador y fijador, para que finalmente la película obtenida (después de dejarla secar) nos permitiera hacer la identificación de que las muestras aisladas correspondían a tubulina para el caso de los tres modelos experimentales.

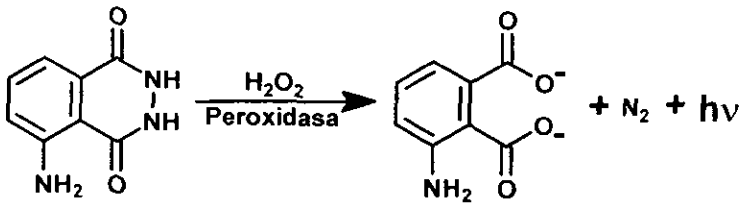


Figura No. 12

Fundamento inmunquímico de la técnica de identificación de tubulina por el método del reactivo de luminol.

4.2.7.- DETERMINACION DE LA PUREZA DE LAS MUESTRAS DE TUBULINA DE CEREBRO DE RATA, *Giardia lamblia* y *Ascaris suum* A TRAVES DEL PROGRAMA DE ANALISIS DENSITOMETRICO SIGMA-GEL.

Al gel obtenido anteriormente en donde se realizó la electroforesis de las tres muestras de tubulina de los tres modelos experimentales, se le realizó un copiado del tipo scan en el equipo Eagle-Eye. Posteriormente el scan del gel de poliacrilamida se analizó en computadora a través del programa Sigma-Gel con el que se realizó el análisis densitométrico y se estimó la pureza en tubulina de cada una de las muestras obtenidas. La cuantificación de la intensidad de cada una de las diferentes bandas que presentó cada muestra en el gel de poliacrilamida, se da en pixeles, y su sumatoria se considera como el 100%; por lo tanto la pureza en tubulina se obtiene de dividir la intensidad en pixeles de las dos bandas que corresponden a los dímeros de α y β tubulina entre la sumatoria total de la intensidad en pixeles que se obtuvo para todas las bandas presentes en el análisis electroforético de cada muestra multiplicado por cien. Fue de esta manera como se estimaron los porcentajes de pureza en tubulina de las muestras de cerebro de rata, *Giardia lamblia* y *Ascaris suum*.

4.3.- LOS EXPERIMENTOS DE UNIÓN Y AFINIDAD

4.3.1.- PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DE LA SOLUCIÓN DE [³H]ALBENDAZOL.

Para llevar a cabo los experimentos de unión se prepararon nueve diluciones para dar lugar a las concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 μM a partir de una solución stock de la muestra de [³H]albendazol de 100 μM .

4.3.1.1.- Solución stock 100 μM de la solución de [³H]albendazol.

Se tomó una alícuota de 76 μL (1.315 mM) de la solución de [³H]albendazol y se llevó a 1,000 μL con amortiguador MES 0.025M, DMSO al 20%, pH= 6.5 100 mL. y así se obtuvo la solución stock 100 μL de [³H]albendazol.

4.3.1.2.- Preparación de las concentraciones de 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 μM de la solución de [³H]albendazol a partir del stock 100 μM .

Para la preparación de estas diferentes concentraciones se llevaron a cabo las diluciones de la solución stock 100 μM según la siguiente tabla:

TABLA DE DILUCIONES.

Dilución No.	Alicuota de la solución stock de 100 μL en μL .	Aforo con Amortiguador MES 0.025M, DMSO al 20%, pH= 6.5 en μL .	Concentración μM final.
1	15	150	10
2	30	150	20
3	45	150	30
4	60	150	40
5	75	150	50
6	90	150	60
7	105	150	70
8	120	150	80
9	135	150	90

4.3.2.- PREPARACION DE LAS DILUCIONES DE LAS MUESTRAS DE TUBULINA PARA AJUSTAR LA CONCENTRACION FINAL A 0.222 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

4.3.2.1.- Dilución stock de la muestra de tubulina de cerebro de rata.

Se llevó a cabo la dilución de la muestra de tubulina de cerebro de rata con una concentración total de proteína de 5.396 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para llevarla a una concentración final de 0.222 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de la siguiente manera:

Si la pureza estimada para esta muestra fue del 82.05% entonces la concentración real en tubulina es de 4.427 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

En un vial de vidrio de 10 mL de capacidad se vertieron 2849.6 μL de solución amortiguadora RB frío y luego se le adicionaron 150.4 μL de la muestra de tubulina de cerebro de rata. Posteriormente esta mezcla se homogenizó con ayuda de la misma micropipeta, obteniéndose de esta forma la dilución que se utilizó para el experimento de unión, la cual presentó un volumen final de 3 mL y una concentración final de 0.222 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

4.3.2.2.- Dilución stock de la muestra de tubulina de *Giardia lamblia*.

Se llevó a cabo la dilución de la muestra de tubulina de *Giardia lamblia* con una concentración total de proteína de 0.29144 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para llevarla a una concentración final de 0.222 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de la siguiente manera:

Si la pureza estimada para esta muestra fue del 100% entonces la concentración real en tubulina es de 0.29144 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

En un vial de vidrio de 10 mL de capacidad se vertieron 2285.2 μL de la muestra de tubulina de *Giardia lamblia* y luego se le adicionaron 714.8 μL de la solución amortiguadora MM frío. Posteriormente esta mezcla se homogenizó con ayuda de la misma micropipeta, obteniéndose de esta forma la dilución que se utilizó para el experimento de unión, la cual presentó un volumen final de 3 mL y una concentración final de 0.222 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

4.3.2.3.- Dilución stock de la muestra de tubulina de *Ascaris suum*.

Se llevó a cabo la dilución de la muestra de tubulina de *Ascaris suum* con una concentración total de proteína de 0.53747 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para llevarla a una concentración final de 0.222 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de la siguiente manera:

Si la pureza estimada para esta muestra fue del 81.54% entonces la concentración real en tubulina es de 0.43825 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

En un vial de vidrio de 10 mL de capacidad se vertieron 1519.7 μL de la muestra de tubulina de *Ascaris suum* y luego se le adicionaron 1480.3 μL de la solución amortiguadora PM frío. Posteriormente esta mezcla se homogenizó con ayuda de la misma micropipeta, obteniéndose de esta forma la dilución que se utilizó para el experimento de unión, la cual presentó un volumen final de 3 mL y una concentración final de 0.222 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

4.3.3.- EL EXPERIMENTO DE UNION DE LAS MUESTRAS DE TUBULINA DE CEREBRO DE RATA, *Giardia lamblia* Y *Ascaris suum* CON EL ALBENDAZOL.

A 30 tubos Eppendorf se les agregó a cada uno 90 μL de la dilución stock de la muestra de tubulina de cerebro de rata, a otros 30 tubos Eppendorf se les agregó 90 μL de la dilución stock de la muestra de tubulina de *Giardia lamblia* y a otros 30 tubos Eppendorf se les agregó 90 μL de la dilución stock de la muestra de tubulina de *Ascaris suum*.

Posteriormente a otros 10 tubos Eppendorf se les agregó 90 μL de de amortiguador RB, a otros 10 tubos 90 μL de amortiguador MM y a otros 10 tubos 90 μL de amortiguador PM.

Luego a cada uno de estos 120 tubos Eppendorf se les adicionan 10 μL de las diferentes concentraciones micromolares de la solución de [^3H]albendazol de la forma en que se indica a continuación en la siguiente tabla:

RELACION DE EPPENDORF VS AMORTIGUADOR O CONCENTRACION.

No. EPPENDORF	10 μ M A ADICIONAR DE
A-1	Amortiguador RB 10 μ M C.R.
A-2	Amortiguador MM 10 μ M G.L.
A-3	Amortiguador PM 10 μ M A.S.
B-1	Amortiguador RB 20 μ M C.R.
B-2	Amortiguador MM 20 μ M G.L.
B-3	Amortiguador PM 20 μ M A.S.
C-1	Amortiguador RB 30 μ M C.R.
C-2	Amortiguador MM 30 μ M G.L.
C-3	Amortiguador PM 30 μ M A.S.
D-1	Amortiguador RB 40 μ M C.R.
D-2	Amortiguador MM 40 μ M G.L.
D-3	Amortiguador PM 40 μ M A.S.
E-1	Amortiguador RB 50 μ M C.R.
E-2	Amortiguador MM 50 μ M G.L.
E-3	Amortiguador PM 50 μ M A.S.
F-1	Amortiguador RB 60 μ M C.R.
F-2	Amortiguador MM 60 μ M G.L.
F-3	Amortiguador PM 60 μ M A.S.
G-1	Amortiguador RB 70 μ M C.R.
G-2	Amortiguador MM 70 μ M G.L.
G-3	Amortiguador PM 70 μ M A.S.
H-1	Amortiguador RB 80 μ M C.R.
H-2	Amortiguador MM 80 μ M G.L.
H-3	Amortiguador PM 80 μ M A.S.
I-1	Amortiguador RB 90 μ M C.R.
I-2	Amortiguador MM 90 μ M G.L.
I-3	Amortiguador PM 90 μ M A.S.
J-1	Amortiguador RB 100 μ M C.R.
J-2	Amortiguador MM 100 μ M G.L.
J-3	Amortiguador PM 100 μ M A.S.
1-1	1-10 μ M C.R.
1-2	2-10 μ M C.R.
1-3	3-10 μ M C.R.
2-1	1-10 μ M G.L.
2-2	2-10 μ M G.L.
2-3	3-10 μ M G.L.
3-1	1-10 μ M A.S.
3-2	2-10 μ M A.S.
3-3	3-10 μ M A.S.
4-1	1-20 μ M C.R.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

4-2	2-20 μM C.R.
4-3	3-20 μM C.R.
5-1	1-20 μM G.L.
5-2	2-20 μM G.L.
5-3	3-20 μM G.L.
6-1	1-20 μM A.S.
6-2	2-20 μM A.S.
6-3	3-20 μM A.S.
7-1	1-30 μM C.R.
7-2	2-30 μM C.R.
7-3	3-30 μM C.R.
8-1	1-30 μM G.L.
8-2	2-30 μM G.L.
8-3	3-30 μM G.L.
9-1	1-30 μM A.S.
9-2	2-30 μM A.S.
9-3	3-30 μM A.S.
10-1	1-40 μM C.R.
10-2	2-40 μM C.R.
10-3	3-40 μM C.R.
11-1	1-40 μM G.L.
11-2	2-40 μM G.L.
11-3	3-40 μM G.L.
12-1	1-40 μM A.S.
12-2	2-40 μM A.S.
12-3	3-40 μM A.S.
13-1	1-50 μM C.R.
13-2	2-50 μM C.R.
13-3	3-50 μM C.R.
14-1	1-50 μM G.L.
14-2	2-50 μM G.L.
14-3	3-50 μM G.L.
15-1	1-40 μM A.S.
15-2	2-50 μM A.S.
15-3	3-50 μM A.S.
16-1	1-60 μM C.R.
16-2	2-60 μM C.R.
16-3	3-60 μM C.R.
17-1	1-60 μM G.L.
17-2	2-60 μM G.L.
17-3	3-60 μM G.L.
18-1	1-60 μM A.S.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

18-2	2-60 μM A.S.
18-3	3-60 μM A.S.
19-1	1-70 μM C.R.
19-2	2-70 μM C.R.
19-3	3-70 μM C.R.
20-1	1-70 μM G.L.
20-2	2-70 μM G.L.
20-3	3-70 μM G.L.
21-1	1-70 μM A.S.
21-2	2-70 μM A.S.
21-3	3-70 μM A.S.
22-1	1-80 μM C.R.
22-2	2-80 μM C.R.
22-3	3-80 μM C.R.
23-1	1-80 μM G.L.
23-2	2-80 μM G.L.
23-3	3-80 μM G.L.
24-1	1-80 μM A.S.
24-2	2-80 μM A.S.
24-3	3-80 μM A.S.
25-1	1-90 μM C.R.
25-2	2-90 μM C.R.
25-3	3-90 μM C.R.
26-1	1-90 μM G.L.
26-2	2-90 μM G.L.
26-3	3-90 μM G.L.
27-1	1-90 μM A.S.
27-2	2-90 μM A.S.
27-3	3-90 μM A.S.
28-1	1-100 μM C.R.
28-2	2-100 μM C.R.
28-3	3-100 μM C.R.
29-1	1-100 μM G.L.
29-2	2-100 μM G.L.
29-3	3-100 μM G.L.
30-1	1-100 μM A.S.
30-2	2-100 μM A.S.
30-3	3-100 μM A.S.

Los 120 tubos Eppendorf se prepararon en cuatro series de 30 tubos cada una, según la tabla anterior; se colocaron en el agitador orbital Nutator y se incubaron por 20 minutos a 37°C.

Tiempo después se adicionó a cada uno de los tubos 500 µL de una solución de BSA al 1% con carbón activado a una concentración de 2 mg/mL³⁵ y los tubos se incubaron de nuevo en el agitador orbital por 5 minutos a 37°C.

Finalmente los tubos se centrifugaron por 10 minutos a 14,000 rpm y posteriormente 400 µL del sobrenadante de cada tubo fueron adicionados en 120 viales para contador de centelleo que ya contenían previamente 5 mL de la solución Cocktail Insta-Gel de Packard. Después de ser agitados manualmente los 120 viales fueron colocados en 11 racks de 12 viales de capacidad, junto con otros 6 viales cuyo contenido se describe a continuación:

Dos de estos 6 viales son los estándares blanco y de [³H] Beckman. A los otros 4 viales se les agregó a cada uno, 5 mL de la solución Cocktail de Packard y posteriormente se les adicionaron 400 µL de la solución de BSA al 1%. Luego a un primer vial se le adicionaron 10 µL de DMSO, a un segundo 10 µL de la solución de [³H]albendazol, a un tercero 10 µL de la dilución 1:10 de solución de [³H]albendazol y al último 10 µL de la dilución 1:100 y se agitaron manualmente.

Finalmente los 126 viales se llevaron al contador de centelleo para la determinación de sus respectivas actividades en tritio.

4.3.4.- CALCULOS Y GRAFICAS.

Una vez obtenidos los datos del contador de centelleo, se procedió a calcular el valor de unión para cada una de las diez diferentes concentraciones de albendazol para los tres modelos de acuerdo a la formula:^{16,35}

$$\text{UNION} = \frac{\text{dpm}_u - \text{dpm}_b}{\text{AE}[\text{mg tubulina}]}$$

En donde:

dpm_u = Actividad real del promedio de la muestra.

dpm_b = Actividad real del blanco.

AE = Actividad específica de la solución de tritio-albendazol al día del experimento de unión en dpm/pmol.

[mg tubulina] = Cantidad de tubulina en mg.

Posteriormente se procedió a elaborar las gráficas de unión en pmol/mg vs. concentración micromolar para cada modelo en estudio y después a cada una de éstas, se le practicó su regresión no lineal de tipo hiperbólico empleando para este fin el programa Excel curve fitting⁵² en la versión de Excel 2000 y la herramienta "Solver" con el cual las curvas obtenidas se rearreglaron de la mejor forma posible en hipérbolas rectangulares para que posteriormente, a partir de los nuevos valores de unión que se obtuvieron mediante esta regresión, se interpolaron las gráficas hasta una concentración de 20 μ M (con la finalidad de poder observar K_d) mediante el empleo de la fórmula que describe el modelo de unión específica ligando-receptor para un solo sitio:⁴⁴

$$Y = \frac{B_{max} X}{K_d + X}$$

En donde:

Y = Unión en pmol/mg

X = La concentración de ligando

B_{max} = Unión máxima a una concentración infinita de ligando expresada en pmol/mg

K_d = La constante de disociación expresada en μ M.

A partir de los nuevos valores de unión que se obtuvieron mediante la regresión no lineal, se realizó la transformación de cada curva hiperbólica a gráficas de tipo Scatchard, para lo cual se gráfíco el cociente de Unión/Concentración vs. Unión, con la finalidad de linearizar los datos y así obtener los valores de las constantes B_{max} , K_d y luego K_a .

La Bmax se obtuvo de la intercepción con el eje de las abscisas y la Kd del inverso negativo de la pendiente; Ka se consideró como el inverso de Kd.

La concentración mínima para alcanzar el equilibrio en la formación del complejo albendazol-tubulina (Cmineq) se calculó probando en que valor de x se obtiene el valor de Ka utilizando la fórmula de E. Lacey:³⁶

$$y = \frac{B_{max} K_a (x-y)}{K_a (x-y) + 1}$$

En donde:

y= Es la unión en pmol/mg

x= La concentración μM de ligando

Ka= Constante de asociación expresada en μM^{-1}

Bmax=Unión máxima a una concentración infinita de ligando expresada en pmol/mg.

que también puede expresarse de la siguiente forma:

$$B_{max}(x-y)^2 K_a^2 + B_{max}(x-y) K_a - y = 0$$

y que se resuelve para Ka de la forma: $ax^2 + bx + c = 0$

Finalmente, una vez cuantificadas las uniones del albendazol por las tubulinas y después de haberse obtenido el valor de las constantes que nos propusimos, se llevó a cabo un análisis comparativo de la afinidad que mostró el albendazol por las tubulinas de los dos organismos parásitos con respecto a la tubulina de cerebro de rata.

5. RESULTADOS

Para la síntesis del 6-bromoalbandazol se desarrollaron tres rutas sintéticas diferentes en las cuales se generaron un total de siete compuestos intermediarios: I, II, III, IV, V, VI y VIII que, así como el 6-bromoalbandazol obtenido por las tres rutas, fueron caracterizados por sus propiedades fisicoquímicas particulares tales como punto de fusión, r_f en un determinado sistema de elución y por su descripción física. Todos estos datos se presentan en la tabla 5.1.

La elucidación estructural se llevó a cabo por métodos espectroscópicos de infrarrojo (KBr), resonancia magnética protónica (300 MHz) y espectrometría de masas (impacto electrónico). Los datos espectroscópicos se resumen en la tabla 5.2.

En este apartado se muestran los resultados analíticos obtenidos con la solución de [^3H]albandazol como son la cuantificación por espectrofotometría UV, la estimación de pureza por HPLC, y la determinación de su actividad específica.

También se muestran los gels de poliacrilamida que se obtuvieron de las electroforesis realizadas a las muestras de tubulina de cerebro de rata, *Giardia lamblia* y *Ascaris suum*, los resultados de la cuantificación y la estimación de la pureza se llevaron a cabo por el método de Bradford y el programa Sigma-Gel respectivamente, así como también, las películas fotográficas que se obtuvieron en la identificación de las muestras de tubulina por el método de inmunoelectrotransferencia con luminol.

Se presentan los datos y las gráficas de cada uno de los modelos que se obtienen de los experimentos de unión así como también, los cálculos que se realizaron para obtener las constantes que describen la afinidad y el comportamiento de los complejos albandazol-tubulina que resultan de los tres modelos experimentales de este estudio.

5.1. PARTE QUIMICA.

5.1.1.- TABLA DE CARACTERIZACION DE LOS COMPUESTOS INTERMEDIARIOS SINTETIZADOS, DEL ALBENDAZOL Y DEL 6-BROMO ALBENDAZOL.

Nombre del Compuesto	Punto de Fusión en °C	Rendimiento Sintético	rf	Descripción Física del Compuesto
3-cloroacetanilida (I)	75-77	95.5%	0.46 sistema 8	Agujas cristalinas de color blanco.
4-bromo-3-cloro acetanilida (II)	123-124	95%	0.40 sistema 1	Polvo cristalino de color blanco.
4-bromo-3-cloro-2-nitroacetanilida (III-a)	121-123	97.3%	0.46 sistema 4	Agujas cristalinas de color amarillo claro.
4-bromo-3-cloro-2-nitroanilina (IV)	198-200	75%	0.21 sistema 2 eluido tres veces.	Polvo cristalino de color amarillo mostaza.
4-bromo-5-propiltio-2-nitroanilina (V)	135-137	80.2%	0.13 sistema 3	Agujas cristalinas de color naranja.
4-bromo-5-propiltio-1, 2-fenilendiamina (VI)	60-65	95.88%	0.40 sistema 5	Polvo ceroso de color amarillo-naranja.
2-amino-6-bromo-5-propiltiobencimidazol (VIII)	125-127	92.7%	0.15 sistema 7	Polvo amorfo de color beige claro.
6-bromoalbendazol (VII-1) de Ruta Sintética No.1	224-226	53%	0.38 sistema 6 eluido dos veces	Polvo amorfo de color blanco.
6-bromoalbendazol (VII-2) de Ruta Sintética No.2	222-224	66.5%	0.41 sistema 6 eluido dos veces	Polvo amorfo de color beige claro
6-bromoalbendazol (VII-3) de Ruta Sintética No.3	225-226	84.2%	0.37 sistema 6 eluido dos veces	Polvo amorfo de color blanco.
Albendazol	208-210	-----	0.24 sistema 6 eluido dos veces	Polvo amorfo de color blanco.

5.1.2.- TABLA DE DATOS ESPECTOSCOPICOS DE LOS COMPUESTOS INTERMEDIARIOS SINTETIZADOS, DEL ALBENDAZOL Y DE LA SOLUCION DE [³H]ALBENDAZOL.

Nombre del Compuesto	Datos Espectroscópicos
3-cloroacetanilida (I)	<ul style="list-style-type: none"> • IR (KBr): 3318 y 3246 cm⁻¹ (N-H), 1664cm⁻¹ (C=O) y 1370 cm⁻¹ (CH₃). • RMN¹H (300 MHz): (3H) δ=2.176 ppm (CH₃), (1H) δ= 7.06, 7.22, 7.34 y 7.63 ppm protones aromáticos 4, 5, 6 y 2 respectivamente. (1H) intercambiable con D₂O δ=7.8ppm (NH). • EM (IE): Pico base 127 m/z y M⁺ 169 m/z.
4-bromo-3-cloroacetanilida (II)	<ul style="list-style-type: none"> IR (KBr): 3308 cm⁻¹ (N-H), 1670 cm⁻¹ (C=O), 1378 cm⁻¹ (CH₃). • RMN¹H (300 MHz): (3H) δ=2.21 ppm (CH₃), (1H) δ= 7.28, 7.53 y 7.78 ppm protones aromáticos 6, 5 y 2 respectivamente. (1H) intercambiable con D₂O δ= 7.87 ppm (NH). • EM (IE): Pico base 207 m/z y M⁺ 249 m/z.
4-bromo-3-cloro-2-nitroacetanilida (III-A)	<ul style="list-style-type: none"> • IR (KBr): 3218 cm⁻¹ (N-H), 1680 cm⁻¹ (C=O) y 1372 cm⁻¹ (CH₃) y 888 cm⁻¹ (C-NO₂). • RMN¹H (300 MHz): (3H) δ=2.337 ppm (CH₃), (1H) δ= 8.504 y 9.078 ppm protones aromáticos "para" 6 y 3 respectivamente. (1H) intercambiable con D₂O δ= 10.334 ppm (NH). • EM (IE): Pico 43 m/z, 206 m/z, pico base 252 m/z y M⁺ 294 m/z.
4-bromo-3-cloro-2-nitroanilina (IV)	<ul style="list-style-type: none"> IR (KBr): 3478 y 3354 cm⁻¹ (NH₂), 1242 cm⁻¹ (C-N) y 892 cm⁻¹ (C-NO₂). • RMN¹H (300 MHz): (1H) δ= 7.09 y 8.496 ppm protones aromáticos "para" 6 y 3 respectivamente. (2H) intercambiable con D₂O δ= 6.2 ppm (NH₂). • EM (IE): Pico 206 m/z y pico base a la vez M⁺ 252 m/z.
4-bromo-5-propiltio-2-nitroanilina (V)	<ul style="list-style-type: none"> • IR (KBr): 3468 y 3338 cm⁻¹ (NH₂), 1462 cm⁻¹ (CH₂), 1372 cm⁻¹ (CH₃) y 1234 cm⁻¹ (C-N). • RMN¹H (300 MHz): (3H) δ= 1.217 ppm (CH₃), (2H) δ= 1.9 y 2.995 ppm 2(CH₂). (1H) δ= 6.543 y 8.37 ppm protones aromáticos "para" 6 y 3 respectivamente. (2H) intercambiable con D₂O (débil) δ= 6.1 ppm (NH₂). • EM (IE): Pico 43 m/z, pico base 250 m/z y M+1⁺ 292 m/z.
4-bromo-5-propiltio-1, 2-fenilendiamina (VI)	<ul style="list-style-type: none"> • IR (KBr): 3440, 3356 y 3314 cm⁻¹ (NH₂) y 1270 cm⁻¹ (C-N). • RMN¹H (300 MHz): (3H) δ= 1.0 ppm (CH₃), (2H) δ= 1.617 y 2.792 ppm 2(CH₂). (1H) δ= 6.8 y 6.914 ppm protones aromáticos "para" 6 y 3 respectivamente. (4H) intercambiable con D₂O δ= 3.4 ppm 2(NH₂). • EM (IE): Picos 139 m/z y 219 m/z; pico base a la vez M+1⁺ 262 m/z.

Nombre del Compuesto	Datos Espectroscópicos
2-amino-6-bromo-5-propiltio bencimidazol (VIII)	<ul style="list-style-type: none"> • IR (KBr): 3366 a 3186 cm^{-1} (N-H) y 1688 cm^{-1} (C=N). • RMN¹H (300 MHz): (3H) δ= 0.967 ppm (CH₃), (2H) δ= 1.55 y 2.854 ppm 2(CH₂). (1H) δ= 7.216 y 7.378 ppm protones aromáticos "para" 4 y 7 respectivamente del núcleo bencimidazol. (2H) intercambiable con D₂O δ= 7.02 ppm (NH₂). • EM (IE): Picos 164 m/z, 177 m/z y 244 m/z; pico base a la vez M+1⁺ 287 m/z.
6-bromoalabendazol (VII-1) de Ruta Sintética No.1	<ul style="list-style-type: none"> • IR (KBr): 3340 cm^{-1} (N-H), 1620 cm^{-1} (C=N), 1708 cm^{-1} (C=O) y 1094 cm^{-1} (C-O). • RMN¹H (300 MHz): (3H) δ= 0.986 ppm (CH₃), (2H) δ= 1.58 y 2.9 ppm 2(CH₂), (3H) δ= 3.75 ppm (CH₃O), (1H) δ= 7.46 y 7.63 ppm protones aromáticos "para" 4 y 7 respectivamente del núcleo bencimidazol. (2H) intercambiable con D₂O (no visible) δ= 11.64 ppm 2(NH). • EM (IE): Picos 271 m/z, 313 m/z, pico base 190 m/z y M+1⁺ 345 m/z.
6-bromoalabendazol (VII-2) de Ruta Sintética No.2	<ul style="list-style-type: none"> • IR (KBr): 3338 cm^{-1} (N-H), 1620 cm^{-1} (C=N), 1708 cm^{-1} (C=O) y 1094 cm^{-1} (C-O). • RMN¹H (300 MHz): (3H) δ= 0.987 ppm (CH₃), (2H) δ= 1.58 y 2.89 ppm 2(CH₂), (3H) δ= 3.751 ppm (CH₃O), (1H) δ= 7.464 y 7.631 ppm protones aromáticos "para" 4 y 7 respectivamente del núcleo bencimidazol. (2H) intercambiable con D₂O (no visible) δ= 11.798 ppm 2(NH). • EM (IE): Picos 271 m/z, 313 m/z, pico base 190 m/z y M+1⁺ 345 m/z.
6-bromoalabendazol (VII-3) de Ruta Sintética No.3	<ul style="list-style-type: none"> • IR (KBr): 3350 cm^{-1} (N-H), 1632 cm^{-1} (C=N), 1710 cm^{-1} (C=O) y 1094 cm^{-1} (C-O). • RMN¹H (300 MHz): (3H) δ= 0.98 ppm (CH₃), (2H) δ= 1.58 y 2.887 ppm 2(CH₂), (3H) δ= 3.751 ppm (CH₃O), (1H) δ= 7.46 y 7.63 ppm protones aromáticos "para" 4 y 7 respectivamente del núcleo bencimidazol. (2H) intercambiable con D₂O (no visible) δ= 11.67 ppm 2(NH). • EM (IE): Picos 271 m/z, 313 m/z, pico base 190 m/z y M+1⁺ 345 m/z.
Alabendazol	<ul style="list-style-type: none"> • IR (KBr): 3328 cm^{-1} (N-H), 1634 cm^{-1} (C=N), 1714 cm^{-1} (C=O) y 1096 cm^{-1} (C-O). • RMN¹H (300 MHz): (3H) δ= 0.905 ppm (CH₃), (2H) δ= 1.5 y 2.82 ppm 2(CH₂), (3H) δ= 3.48 ppm (CH₃O), (1H) δ= 7.09, 7.325y 7.4 ppm protones aromáticos 6, 7 y 4 respectivamente del núcleo bencimidazol. (2H) intercambiable con D₂O (no visible) δ= 11.65 ppm 2(NH). • EM (IE): Pico 233 m/z, pico base 191 m/z y M⁺ 265 m/z.
Solución de [³ H]alabendazol	<ul style="list-style-type: none"> • EM (IE): Picos 159 m/z y 233 m/z, pico base 191 m/z y M⁺ 265 m/z. • EM (IE) de alta resolución: M⁺ 265.09 m/z, M+4: 268 m/z y M+6: 270.9771 m/z.

**5.1.3.- RESULTADOS ANALITICOS OBTENIDOS DE LA SOLUCION DE
[³H]ALBENDAZOL.**

5.1.3.1.- Resultados obtenidos con la solución de [³H]albendazol por espectrofotometría.

A través de la curva patrón de albendazol vs. absorbancia a 300 nm, se pudo hacer evidente que la cantidad de analitos totales, que absorben a 300 nm y que se encuentran presentes en la solución de [³H]albendazol, recién obtenida y disuelta con un mililitro de DMSO fue de **1,216.8** µg. Estos al ser llevados a un volumen final de **2.293** mL, dieron lugar a una concentración final de analitos totales (que absorben a 300 nm) en la solución de [³H]albendazol de **530.6** µg/mL. Ver detalle en el desarrollo experimental.

5.1.3.2.- Resultados obtenidos con la solución [³H]albendazol por HPLC.

A) Datos obtenidos con la curva patrón de albendazol por HPLC.

No. de Análisis	Concentración en µg/mL	Áreas Obtenidas	Promedio de las áreas	Alturas Obtenidas	Promedio de las alturas	Tiempo de retención en min.
1-A	0.2	0.31709	0.330965	0.00049	0.000505	11.134
1-B	0.2	0.34484		0.00052		11.170
2-A	0.4	0.64661	0.643715	0.00095	0.00095	11.508
2-B	0.4	0.64082		0.00095		11.433
3-A	0.6	1.03396	1.018875	0.00144	0.00144	11.441
3-B	0.6	1.00379		0.00144		11.532
4-A	0.7	1.14045	1.175005	0.00168	0.001685	11.649
4-B	0.7	1.20956		0.00169		11.613
5-A	0.8	1.43726	1.425525	0.00188	0.00188	11.794
5-B	0.8	1.41379		0.00188		11.983
6-A	1.0	1.74358	1.761705	0.00234	0.002355	11.888
6-B	1.0	1.77983		0.00237		11.917

Ver gráfica de la curva de áreas vs. concentración en el apéndice II.

Datos de la regresión lineal de la curva:

Promedio de áreas vs. Concentración de albendazol en $\mu\text{g/mL}$

$b = -0.058598$, $m = 1.8128$ y $r = 0.99858$

Promedio de alturas vs. Concentración de albendazol en $\mu\text{g/mL}$

$b = 3.8122 \times 10^{-5}$, $m = 2.3206 \times 10^{-3}$ y $r = 0.99975$

B) Datos obtenidos con las muestras de la solución de [^3H]albendazol por HPLC.

No. de Análisis	Dilución de la muestra de tritio-albendazol	Áreas Obtenidas	Promedio de las áreas	Alturas Obtenidas	Promedio de las alturas	Tiempo de retención en min.
1-A	1:500	1.19583	1.205415	0.00164	0.001655	11.810
1-B	1:500	1.21500		0.00167		11.837
2-A	1:100	5.93425	5.95375	0.0078	0.00780	11.964
2-B	1:100	5.97325		0.0078		

Nota: $5.95375/5 = 1.19075$ y $0.0078/5 = 0.00156$, lo que nos indica que las diluciones 1:500 y 1:100 correlacionan 1:5.

- A través de la curva patrón de áreas vs. concentración, tenemos que un área bajo la curva de 1.205415 correlaciona para una concentración de albendazol de $0.6972692 \mu\text{g/mL}$.
- A través de la curva patrón de alturas vs. concentración, tenemos que el dato de altura de la curva de 0.001655 correlaciona para una concentración de albendazol de $0.696746 \mu\text{g/mL}$.

Y si se considera el promedio de estos dos resultados obtendríamos una concentración de $0.697 \mu\text{g/mL}$.

Dado que la dilución de la muestra analizada fue 1:500; entonces la concentración final de albendazol en la muestra original de la solución de [^3H]albendazol será de: $0.697 \mu\text{g/mL} \times 500 = \underline{348.5 \mu\text{g/mL}} \text{ ó } \underline{1.315 \text{ mM}}$.

Siendo así, la pureza en albendazol de la solución de [^3H]albendazol será del:

$$\frac{348.5 \mu\text{g/mL}}{530.6 \mu\text{g/mL}} \times 100 = 65.68\%$$

C) Datos del cromatograma obtenidos con la dilución 1:100.

No. del pico	Tiempo de retención en minutos.	Nombre del analito	Nombre del probable analito
1	3.695	Frente de elución	Frente de elución
2	6.271	Subproducto	sulfona de albendazol*
3	9.100	Impureza	6-bromoalbendazol
4	11.964	Albendazol	Albendazol

Ver cromatograma en el apéndice II.

* Para ver fundamento consultar análisis de resultados pagina 118.

5.1.3.3.- Resultados radiológicos obtenidos con la solución de [³H]albendazol en contador de centelleo.

A) Datos obtenidos de las lecturas de los estandares blanco y de [³H]Beckman en contador de centelleo.

No. De Lectura	Lectura en cpm del blanco estandar Beckman	Lectura en cpm del estandar de ³ HBeckman	Cpm reales del estandar de [³ H]Beckman
1	37	50782	50745
2	24	50635	50611
3	25	50543	50518

La actividad real promedio del estandar de [³H]Beckman es de: **50,624.666 cpm.**

B) Cálculo del porcentaje de eficiencia del equipo.

$$\frac{50624.666 \text{ CPM}}{78965.87 \text{ DPM}} \times 100 = 64.1\%$$

78965.87 DPM \Rightarrow actividad específica actual del estandar para el 11 de Febrero de 1998. Ver desarrollo experimental.

- La Eficiencia del Contador de Centelleo Beckman LS-6000SC para tritio es del **64.1 %.**

C) Resultados obtenidos con las lecturas de actividad de la solución de [³H]albendazol.

1.- Resultados de los 10 µL directos de la solución de [³H]albendazol:

No. de Lectura	Lectura del blanco en cpm	Lectura de la muestra en cpm	Cpm reales de la muestra
1	31	150287.2	150256.2
2		152117.2	152086.2

La actividad real promedio de la solución de [³H]albendazol es de: 151,171.2 cpm.

2.- Resultados de los 40 µL de las diluciones de la solución de [³H]albendazol:

Dilución	Lectura del blanco en cpm	Lectura de las diluciones en cpm	Cpm reales de las diluciones
1:10	31	58846	58815
1:100		5939	5908

Nota: Obsérvese que si al valor obtenido de 151,171.2 cpm se multiplica por 4, este valor corresponde con la dilución 1:10 si ésta se multiplicara por 10, por lo que la proporcionalidad se mantiene durante las diluciones de la solución de [³H]albendazol lo que demuestra la confiabilidad del contador de centelleo.

D) Cálculo de la actividad específica de la solución de [³H]albendazol.

Basándonos en el dato de la actividad real promedio de la solución de [³H]albendazol y del dato del porcentaje de eficiencia del equipo, obtenemos que:

$$\frac{151171.2 \text{ cpm}}{0.641} = 235836.5 \text{ dpm.}$$

por lo tanto: $\frac{235836.5 \text{ dpm}}{0.01 \text{ mL}} = 23583650 \text{ dpm/mL.}$

y: $\frac{23583650 \text{ dpm/mL}}{530.6 \mu\text{g/mL}} = 4447 \text{ dpm}/\mu\text{g}$

Tabla de dpm obtenidas para las diluciones de la solución de [³H]albendazol.

Dilución	Cpm reales de las diluciones	Dpm de las diluciones
1:10	58815	91755
1:100	5908	9216.8

Nota: Si 235836.5 dpm se multiplican por 4 (factor de dilución de 10 a 40) da 943346 dpm y este valor corresponde con la dilución 1:10 si ésta se multiplicara por 10, por lo que la proporcionalidad se mantiene lo que demuestra la confiabilidad del contador de centelleo.

5.1.3.4.- Recopilación de los resultados analíticos obtenidos con la solución de [³H]albendazol el día del marcaje:

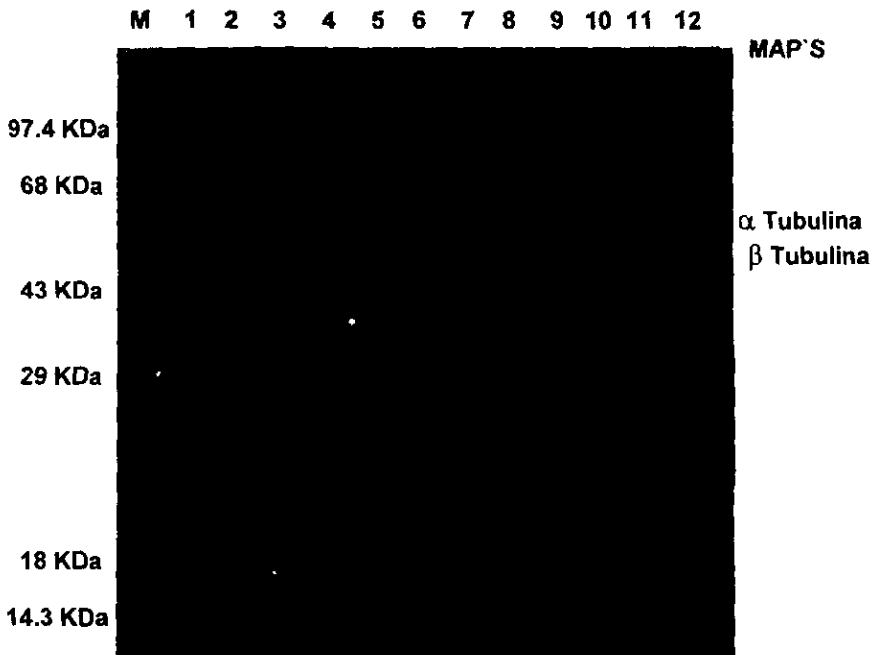
11 de Febrero de 1998.

1. Concentración de analitos totales presentes en la solución de [³H]albendazol por espectrofotometria de UV a 300 nm: 530.6 µg/ml.
2. Pureza en albendazol de la solución de [³H]albendazol determinada por HPLC: 65.68 %.
3. Concentración real como albendazol en la solución de [³H]albendazol: 348.5 µg/ml= 1.315 mM.
4. Actividad especifica de la solución de [³H]albendazol:
 - 44447 dpm/µg
 - 11.778 dpm/pmol
 - 1.963 x10¹¹ Bq/mol
 - 23583650 dpm/mL
 - 1.963 x10⁸ Bq/mmol
 - 5.305 mCi/mmol
 - 196.3 MBq/mmol

5.2.- PARTE BIOLOGICA

5.2.1.- RESULTADOS ELECTROFORETICOS OBTENIDOS CON LA MUESTRA DE TUBULINA DE CEREBRO DE RATA.

5.2.1.1.- Gel de poliacrilamida obtenido de la electroforesis realizada a la muestra de tubulina de cerebro de rata.

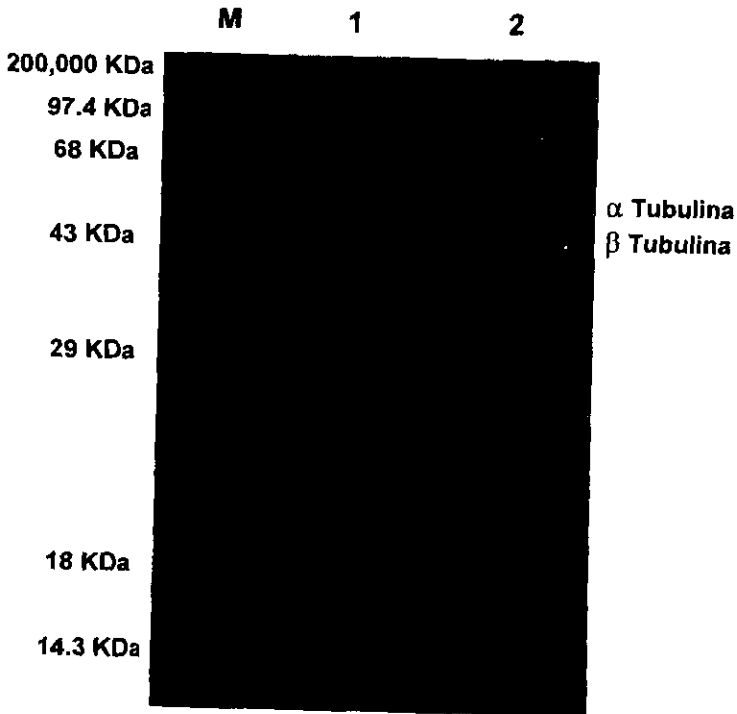


De donde:

- M.-Corrimiento electroforético de la mezcla de marcadores de peso molecular.
- 1.- Corrimiento electroforético del sobrenadante del extracto crudo de cerebro de rata.
- 2.- Corrimiento electroforético del sedimento después de 100,000 g a 4°C
- 3.- Corrimiento electroforético del sobrenadante después de 100,000 g a 4°C.
- 4.- Corrimiento electroforético del sedimento del primer ciclo de polimerización a 30°C.
- 5.- Corrimiento electroforético del sobrenadante del primer ciclo de polimerización a 30°C.
- 6.- Corrimiento electroforético del sobrenadante del primer ciclo de despolimerización a 4°C.
- 7.- Corrimiento electroforético del sedimento del primer ciclo de despolimerización a 4°C.
- 8.- Corrimiento electroforético del sedimento del segundo ciclo de polimerización a 30°C.
- 9.- Corrimiento electroforético del sobrenadante del segundo ciclo de polimerización a 30°C.
- 10.- Corrimiento electroforético del sedimento del segundo ciclo de despolimerización a 4°C.
- 11 y 12.- Corrimiento electroforético del sobrenadante del segundo ciclo de despolimerización a 4°C con 10mg y 5 mg respectivamente. Esta es la muestra de tubulina de cerebro de rata.

5.2.2.- RESULTADOS ELECTROFORETICOS OBTENIDOS CON LA MUESTRA
DE TUBULINA DE *Giardia lamblia*.

5.2.2.1.- Gel de poliacrilamida obtenido de la electroforesis realizada a la
muestra de tubulina de *Giardia lamblia*.



De donde:

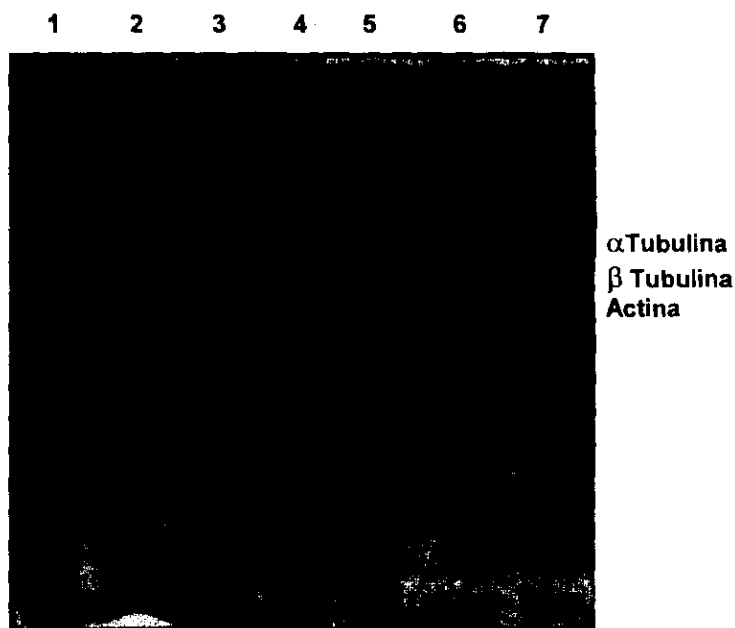
M.-Corrimiento electroforético de la mezcla de marcadores de peso molecular.

1.- Corrimiento electroforético del sedimento a 100,000 g con el extracto total de los citoesqueletos.

2.- Corrimiento electroforético del sobrenadante de la despolimerización a 4°C del extracto total de citoesqueletos. Esta es la muestra de tubulina de *Giardia lamblia*.

5.2.3. RESULTADOS ELECTROFORÉTICOS OBTENIDOS CON LA MUESTRA DE TUBULINA DE *Ascaris suum*.

5.2.3.1.- Gel de poliacrilamida obtenido de la electroforesis realizada a la muestra de tubulina de *Ascaris suum*.



De donde:

- 1.- Corrimiento electroforético del extracto total.
- 2.- Corrimiento electroforético del sedimento después de 100,000 g a 4°C.
- 3.- Corrimiento electroforético del sobrenadante después de 100,000 g a 4°C.
- 4.- Corrimiento electroforético de la elución en batch con 0.20 M de KCl.
- 5.- Corrimiento electroforético de la elución en columna con 0.20 M de KCl.
- 6.- Corrimiento electroforético de la elución en columna con 0.30M de KCl.
- 7.- Corrimiento electroforético de la elución en columna con 0.35 M de KCl. Esta es la muestra de tubulina de *Ascaris suum*.

5.2.4.- RESULTADOS DE LA CURVA PATRON DE ALBUMINA SERICA DE BOVINO CON EL REACTIVO DE BRADFORD QUE SE UTILIZO PARA LA CUANTIFICACION DE LAS MUESTRAS DE TUBULINA DE CEREBRO DE RATA *Giardia lamblia* y *Ascaris suum*.

ABSORBANCIA PROMEDIO VS. CANTIDAD DE BSA EN μg .

Punto de la curva No.	Contenido protéico de BSA en μg	Absorbancia a 595 nm	Absorbancia promedio a 595 nm
1	0.312	0.013	0.011
		0.010	
		0.010	
2	0.625	0.042	0.043
		0.046	
		0.041	
3	1.250	0.101	0.104
		0.104	
		0.107	
4	2.500	0.224	0.226
		0.230	
		0.224	
5	5.000	0.433	0.438
		0.440	
		0.441	

Ver gráfica de la curva en el apéndice I.

Datos de la regresión lineal de la curva:

- $b = -0.011939$
- $m = 0.091018$
- $r = 0.9992829$

5.2.5.- RESULTADOS DE LA CUANTIFICACION DE LAS MUESTRAS DE TUBULINA DE CEREBRO DE RATA *Giardia lamblia* y *Ascaris suum* POR EL METODO DEL REACTIVO DE BRADFORD.

5.2.5.1.- Cuantificación del contenido protéico de la muestra de tubulina de cerebro de rata por el método del reactivo de Bradford.

Resultados de la muestra:

No. de Ensayo	Volumen de la dilución 1:10 de la muestra adicionado en μL	Absorbancia promedio a 595 nm	Absorbancia a 595 nm	Concentración En $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
1	5	0.226	0.23366	5.396
2	5	0.231		
3	5	0.244		

La concentración final de la muestra de tubulina de cerebro de rata es de: 5.396 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

5.2.5.2.- Cuantificación del contenido protéico de la muestra de tubulina de *Giardia lamblia* por el método del reactivo de Bradford.

Resultados de la muestra:

No. de Ensayo	Volumen de la dilución 1:10 de la muestra adicionado en μL	Absorbancia promedio a 595 nm	Absorbancia a 595 nm	Concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
1	10	0.247	0.25333	0.29144
2	10	0.246		
3	10	0.267		

La concentración final de la muestra de tubulina de *Giardia lamblia* es de: 0.29144 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

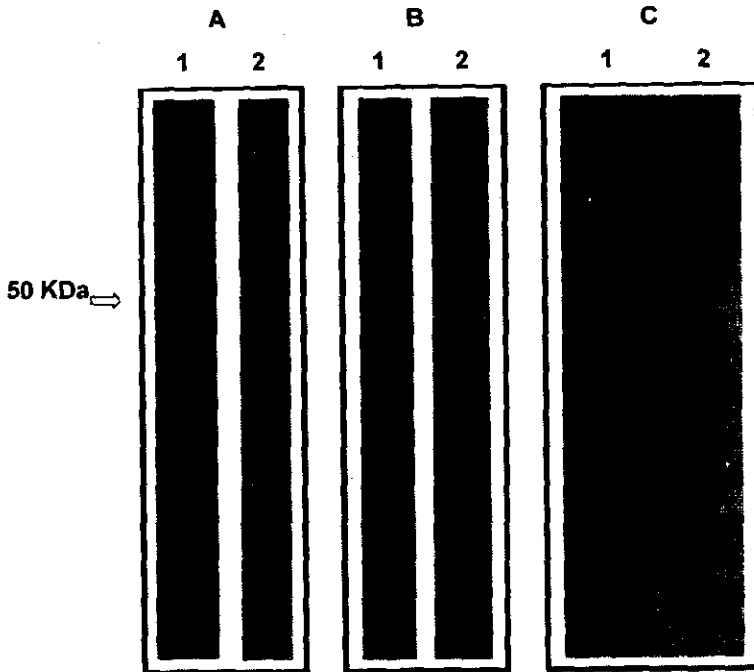
5.2.5.3.- Cuantificación del contenido protéico de la muestra de tubulina de *Ascaris suum* por el método del reactivo de Bradford.

Resultados de la muestra:

No. de Ensayo	Volumen de la dilución 1:10 de la muestra adicionado en μL	Absorbancia promedio a 595 nm	Absorbancia a 595 nm	Concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
1	5	0.223	0.23266	0.5374
2	5	0.235		
3	5	0.240		

La concentración final de la muestra de tubulina de *Ascaris suum* es de: 0.5374 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

5.2.6.- RESULTADOS OBTENIDOS CON LA IDENTIFICACION DE LAS MUESTRAS DE TUBULINA DE CEREBRO DE RATA, *Giardia lamblia* y *Ascaris suum* EN PELICULA FOTOGRAFICA POR EL METODO DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA CON LUMINOL.



A) Tubulina de rata:

- 1.- Ab anti-tubulina de rata de ratón.
- 2.- Control del Ab secundario.

B) Tubulina de *Giardia lamblia*:

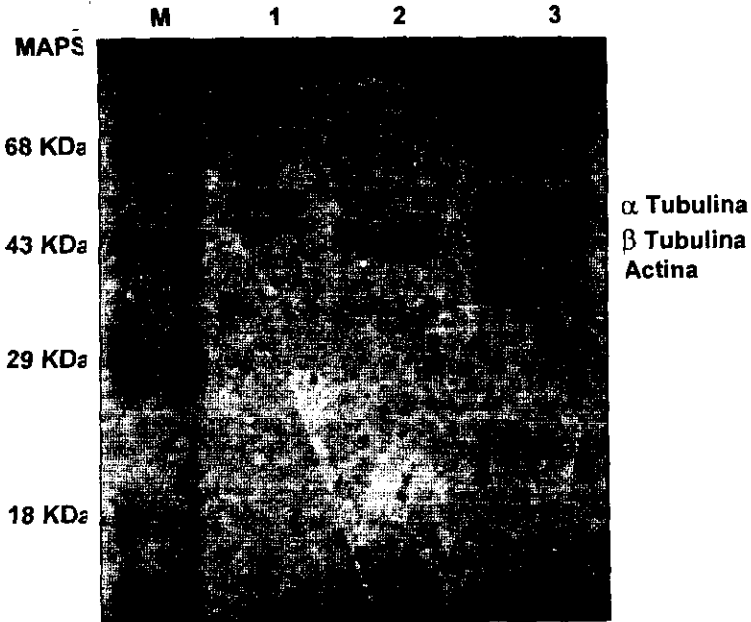
- 1.- Ab anti-tubulina de *Giardia* de ratón.
- 2.- Control del Ab secundario.

C) Tubulina de *Ascaris suum*:

- 1.- Ab anti-tubulina de rata de ratón.
- 2.- Ab anti-actina de ratón.

5.2.7.- RESULTADOS OBTENIDOS EN LA DETERMINACION DE LA PUREZA EN TUBULINA DE LAS MUESTRAS DE TUBULINA DE CEREBRO DE RATA, *Giardia lamblia* Y *Ascaris suum* A TRAVES DEL PROGRAMA SIGMA-GEL.

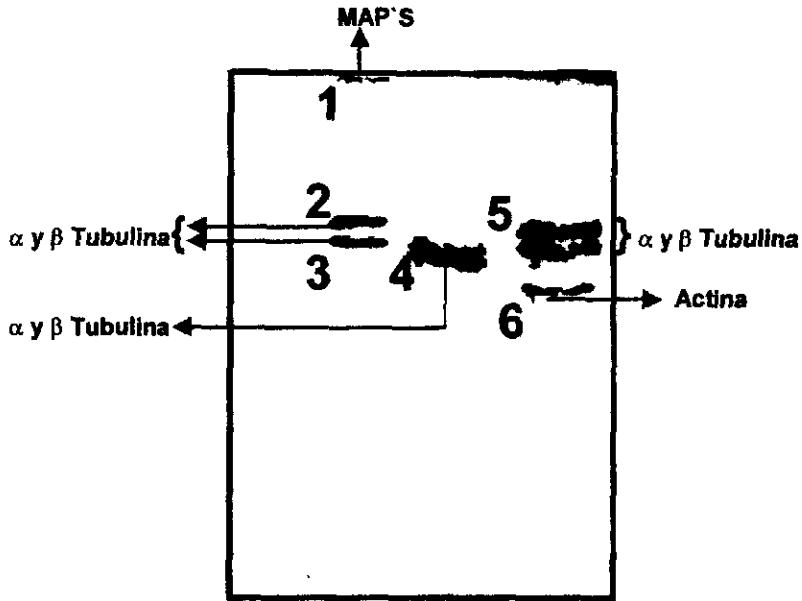
5.2.7.1.- Tubulinas aisladas.



De donde:

- M.- Corrimiento electrotoretico de la mezcla de marcadores de peso molecular.
- 1.- Corrimiento electroforético de la muestra de tubulina de cerebro de rata.
- 2.- Corrimiento electroforético de la muestra de *Giardia lamblia*.
- 3.- Corrimiento electroforético de la muestra de *Ascaris suum*.

5.2.7.2.- ANALISIS DEL GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENIENDO LAS TRES MUESTRAS ANALIZADAS A TRAVES DEL PROGRAMA SIGMA-GEL.



5.2.7.3.- TABLA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LAS MUESTRAS ANALIZADAS A TRAVES DEL PROGRAMA SIGMA-GEL

Muestra	No. Banda	Intensidad en Píxeles	Descripción	Sumatoria total de Píxeles
Tubulina de Rata	1	3369	MAPS	18768
	2	8149	α Tubulina	
	3	7250	β Tubulina	
Tubulina de <i>Giardia lamblia</i>	4	20737	α y β Tubulina	20737
Tubulina de <i>Ascaris suum</i>	5	34379	α y β Tubulina	42161
	6	7782	Actina	

5.2.7.4.- Cálculos de estimación de pureza.

A) Tubulina de cerebro de rata:

$$\frac{(8149+7250)}{18768} \times 100 = 84.05\%$$

B) Tubulina de *Giardia lamblia*:

$$\frac{20737}{20737} \times 100 = 100\% \text{ aproximadamente.}$$

C) Tubulina de *Ascaris suum*:

$$\frac{34379}{42161} \times 100 = 81.54\%$$

5.2.7.5.- Tabla de purezas finales

Muestra	Porcentaje de pureza en tubulina	Principal contaminante
Tubulina de cerebro de rata	84.05	Proteínas asociadas a microtúbulos (MAPS).
Tubulina de <i>Giardia lamblia</i>	100	No se presentó.
Tubulina de <i>Ascaris suum</i>	81.54	Actina.

5.3.- LOS EXPERIMENTOS DE UNION Y AFINIDAD

5.3.1.- RECALCULO DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA SOLUCION DE [³H]ALBENDAZOL AL DIA DEL EXPERIMENTO DE UNION.

25 de Marzo del 2000.

En base al procedimiento mostrado en el desarrollo experimental para el cálculo de la actividad específica inicial de la solución de [³H]albendazol, para este punto se realizó el cálculo de la actividad específica pero al día del experimento de unión obteniéndose los siguientes resultados:

Si : $\lambda \text{ } ^3\text{H} \approx 0.055764 \text{ años }^{-1}$, $T = 7.208 \text{ años}$, $A_0 = 104845 \text{ dpm}$ y sabiendo que:

$$A = A_0 e^{-\lambda t} \text{ entonces:}$$

$$A = 104,845 \text{ dpm } e^{-[0.055764 \text{ años}^{-1} (7.208 \text{ años})]}$$

$$A = 70,141.68 \text{ dpm.}$$

5.3.1.1.- Datos obtenidos de las lecturas de los estandares blanco y de [³H]Beckman en contador de centelleo.

Lectura en cpm del blanco	Lectura en cpm del estandar de tritio	Cpm reales del estandar de tritio
29	43817	43788

La actividad real del estandar de [³H]Beckman es de: **43788 cpm.**

5.3.1.2.- Cálculo del porcentaje de eficiencia del equipo.

$$\frac{43788 \text{ cpm}}{70141.68 \text{ dpm}} \times 100 = 62.42 \%$$

- La Eficiencia del Contador de Centelleo Beckman LS-6000SC para tritio es del **62.42 %.**

5.3.1.3.- Resultados obtenidos de las lecturas de actividad de la solución de [³H]albendazol.

A) Resultado de la lectura de los 10 μL directos de la solución de [³H]albendazol:

Lectura del Blanco de DMSO en cpm	Lectura de la muestra de tritio-albendazol en cpm	Cpm reales de la muestra de tritio-albendazol
25	133674	133649

La actividad real de la solución de [³H]albendazol es de: 133649 cpm.

B) Resultado de la lectura de los 10 μL de las diluciones de la solución de [³H]albendazol:

Dilución	Lectura del blanco en cpm	Lectura de las diluciones en cpm	Cpm reales de las diluciones
1:10	25	13028	13003
1:100		1325	1300

Nota: Obsérvase que se mantiene la proporcionalidad entre las lecturas de la muestra directa y las diluciones 1:10 y 1:100 de la solución de [³H]albendazol.

5.3.1.4.- Cálculo de la actividad específica de la solución de [³H]albendazol.

Basándonos en el dato de la actividad real de la muestra de [³H]albendazol y del dato del porcentaje de eficiencia del equipo, obtenemos que:

$$\frac{133649 \text{ cpm}}{0.6242} = 214,112.5 \text{ dpm.}$$

Por lo tanto: $\frac{214,112.5 \text{ dpm}}{0.01 \text{ mL}} = 21411250 \text{ dpm/mL.}$

Y: $\frac{21411250 \text{ dpm/mL}}{530.6 \text{ μg/mL}} = 40,352.9 \text{ dpm/μg.}$

Utilizando el peso molecular del albendazol tenemos finalmente:

$$40,352.9 \text{ dpm/μg} (10^{-6} \text{ μg/1pg}) (265 \text{ pg/1pmol}) = 10.6935 \text{ dpm/pmol}$$

La actividad específica (AE) de la solución de [³H]albendazol al día del experimento de unión es: 10.6935 dpm/pmol.

A) Tabla de dpm obtenidas para las diluciones de la solución de [³H]albendazol.

Dilución	Cpm reales de las diluciones	Dpm de las diluciones
1:10	13003	20,831.5
1:100	1300	2,082.66

Nota: Obsérvese que se mantiene la proporcionalidad entre las lecturas de la muestra directa y las diluciones 1:10 y 1:100 de la solución de [³H]albendazol.

5.3.2.- RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS EXPERIMENTOS DE UNIÓN DE LA TUBULINA DE CEREBRO DE RATA CON EL ALBENDAZOL.

5.3.2.1.- Datos obtenidos del contador de centelleo en el experimento de unión de la muestra de tubulina de cerebro de rata con el albendazol.

No. Eppendorf	Concentración μ M de albendazol	Descripción	CPM	CPM promedio	Dpm reales= (cpm/0.6242) x 1.5*
A-1	1	Blanco	40	40	96.1230
1-1	1	Muestra	43	43	103.3323
1-2	1	Muestra	43		
1-3	1	Muestra	34*		
B-1	2	Blanco	46	46	110.5415
4-1	2	Muestra	51	52	124.9600
4-2	2	Muestra	46		
4-3	2	Muestra	58		
C-1	3	Blanco	58	58	139.3784
7-1	3	Muestra	72	70	168.2153
7-2	3	Muestra	68		
7-3	3	Muestra	98*		
D-1	4	Blanco	71	71	170.6184
10-1	4	Muestra	89	86	206.6645
10-2	4	Muestra	83		
10-3	4	Muestra	67*		
E-1	5	Blanco	78	78	187.4399

RESULTADOS

13-1	5	Muestra	96	95.5	229.4937
13-2	5	Muestra	95		
13-3	5	Muestra	108*		
F-1	6	Blanco	105	105	252.3230
16-1	6	Muestra	124	125.333	301.1847
16-2	6	Muestra	145		
16-3	6	Muestra	107		
G-1	7	Blanco	108	108	259.5322
19-1	7	Muestra	121	132.5	318.4076
19-2	7	Muestra	144		
19-3	7	Muestra	156*		
H-1	8	Blanco	111	111	266.7414
22-1	8	Muestra	134	137	329.2214
22-2	8	Muestra	140		
22-3	8	Muestra	124*		
I-1	9	Blanco	125	125	300.3845
25-1	9	Muestra	152	151.5	364.0660
25-2	9	Muestra	151		
25-3	9	Muestra	147*		
J-1	10	Blanco	141	141	338.8337
28-1	10	Muestra	165	167.5	402.5152
28-2	10	Muestra	170		
28-3	10	Muestra	158*		

*Nota 1: Se multiplican todos los datos por 1.5 ya que el volumen total de la muestra es de 600 mL y sólo se toman 400 mL para la lectura en contador de centelleo.

Nota 2: Se considera que $dpm = cpm / \text{la fracción de eficiencia del equipo}$.

Nota 3: Se expresan en asterisco aquel valor de la tercia que se elimina con la finalidad de obtener una mejor linealidad en el experimento.

Datos para el cálculo de unión:

AE= Actividad de la solución de [³H]albendazol al día del experimento que resultó de 10.6935 dpm/pmol.

[mg tubulina]= Cantidad total de tubulina por ensayo:

$$0.222 \mu\text{g}/\mu\text{L} \times 90 \mu\text{L} = 19.98 \mu\text{g} = \underline{0.01998 \text{ mg.}}$$

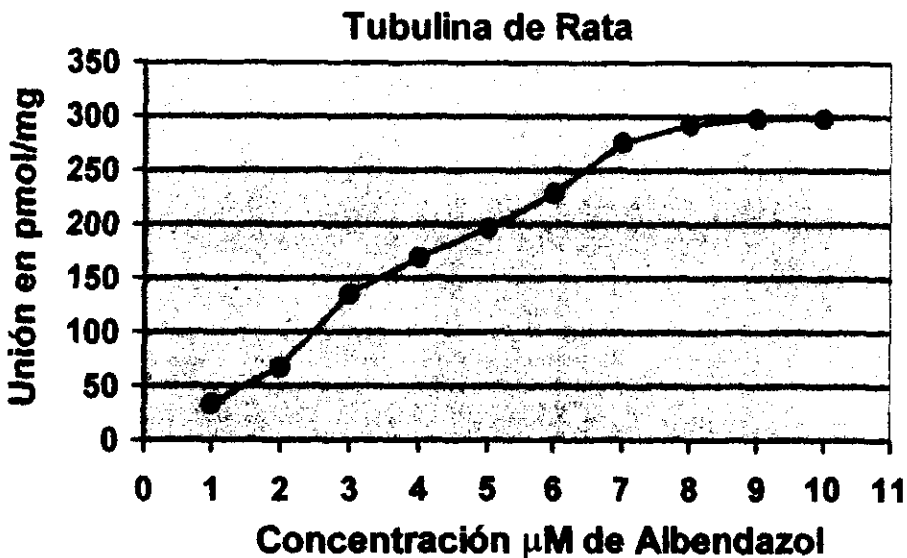
$dpm_m =$ dpm reales del promedio de las muestras

$dpm_b =$ dpm reales del blanco.

5.3.2.2.- DATOS DE UNION VS. CONCENTRACION MICROMOLAR DE ALBENDAZOL PARA TUBULINA DE CEREBRO DE RATA.

Concentración final μM de albendazol	dpm _m	dpm _b	Unión en pmol/mg obtenida de la Fórmula: $\text{Unión} = \frac{(\text{dpm}_m - \text{dpm}_b)}{\text{AE}[\text{mg tubulina}]}$
1	103.3323	96.1230	33.7422
2	124.9600	110.5415	67.4844
3	168.2153	139.3784	134.9688
4	208.6645	170.6184	168.7110
5	229.4937	187.4399	196.8295
6	301.1847	252.3230	228.6971
7	318.4076	259.5322	275.5613
8	329.2214	266.7414	292.4324
9	364.0660	300.3845	298.0561
10	402.5152	338.8337	298.0561

5.3.2.3.- GRAFICA DE UNION EN pmol/mg VS. CONCENTRACION MICRO MOLAR DE ALBENDAZOL OBTENIDA PARA EL MODELO EXPERIMENTAL DE TUBULINA DE CEREBRO DE RATA.



5.3.3.- RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS EXPERIMENTOS DE UNION DE LA TUBULINA DE *Giardia lamblia* CON EL ALBENDAZOL.

5.3.3.1.- Datos obtenidos del contador de centelleo en el experimento de unión de la muestra de tubulina de *Giardia lamblia* con el albendazol.

No. Eppendorf	Concentración μ M de albendazol	Descripción	CPM	CPM promedio	Dpm reales= (cpm/0.6242) x 1.5*
A-2	1	Blanco	41	41	98.5261
2-1	1	Muestra	49	47.5	114.1461
2-2	1	Muestra	35*		
2-3	1	Muestra	46		
B-2	2	Blanco	50	50	120.1538
5-1	2	Muestra	59	62.5	150.1922
5-2	2	Muestra	66		
5-3	2	Muestra	78*		
C-2	3	Blanco	62	62	148.9907
8-1	3	Muestra	86	82.666	198.6527
8-2	3	Muestra	60		
8-3	3	Muestra	102		
D-2	4	Blanco	76	76	182.6338
11-1	4	Muestra	103	103.5	248.7184
11-2	4	Muestra	88*		
11-3	4	Muestra	104		
E-2	5	Blanco	86	86	206.6645
14-1	5	Muestra	111	122	293.1753
14-2	5	Muestra	93*		
14-3	5	Muestra	133		
F-2	6	Blanco	111	111	266.7414
17-1	6	Muestra	147	150.666	362.0618
17-2	6	Muestra	157		
17-3	6	Muestra	148		
G-2	7	Blanco	133	133	319.6091
20-1	7	Muestra	189	179	430.1506
20-2	7	Muestra	169		
20-3	7	Muestra	145*		
H-2	8	Blanco	130	130	312.3999
23-1	8	Muestra	221	179.666	431.7510
23-2	8	Muestra	164		
23-3	8	Muestra	154		

RESULTADOS

I-2	9	Blanco	155	155	372.4768
26-1	9	Muestra	225	203.333	488.6246
26-2	9	Muestra	215		
26-3	9	Muestra	170		
J-2	10	Blanco	203	203	487.8244
29-1	10	Muestra	279	250.666	602.3694
29-2	10	Muestra	222		
29-3	10	Muestra	251		

*Nota 1: Se multiplican todos los datos por 1.5 ya que el volumen total de la muestra es de 600 mL y sólo se toman 400 mL para la lectura en contador de centelleo.

Nota 2: Se considera que dpm= cpm/la fracción de eficiencia del equipo.

Nota 3: Se expresan en asterisco aquel valor de la tercia que se elimina con la finalidad de obtener una mejor linealidad en el experimento.

Datos para el cálculo de unión:

AE= Actividad de la solución de [³H]albendazol al día del experimento que resultó de 10.6935 dpm/pmol.

[mg tubulina]= Cantidad total de tubulina por ensayo:

$$0.222 \mu\text{g}/\mu\text{L} \times 90 \mu\text{L} = 19.98 \mu\text{g} = \underline{0.01998 \text{ mg.}}$$

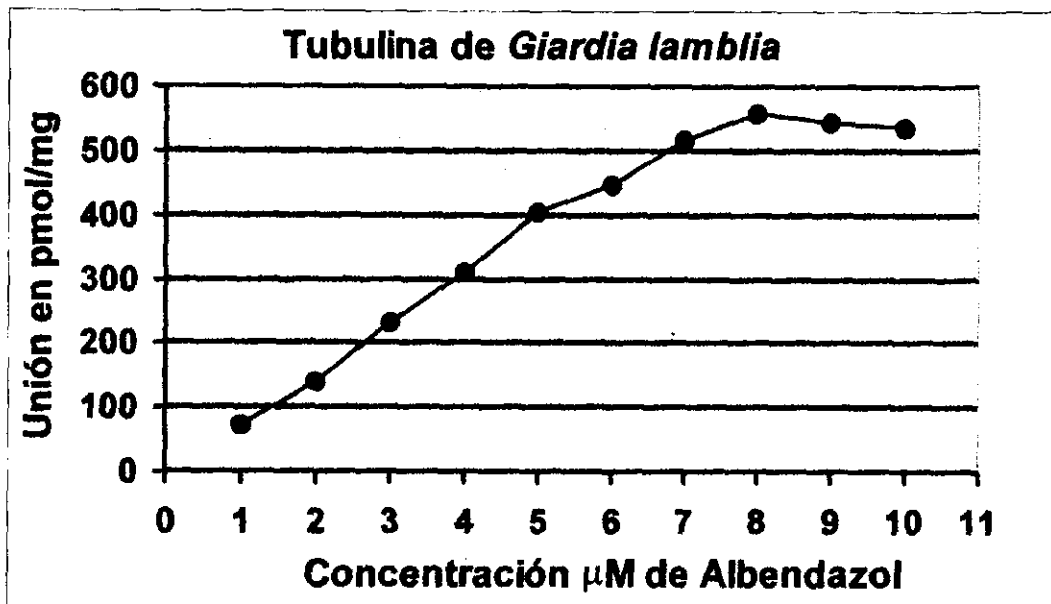
dpm_u= Resultado del conteo de la muestra.

dpm_b= Resultado del conteo del blanco.

5.3.3.2.- Datos de unión vs. concentración micromolar de albendazol para tubulina de *Giardia lamblia*.

Concentración final μM de albendazol	dpm _m	dpm _b	Unión en pmol/mg obtenida de la Formula: Unión= $\frac{(dpm_u - dpm_b)}{AE[mg \text{ tubulina}]}$
1	114.1461	98.5261	73.1081
2	150.1922	120.1538	140.5925
3	198.6527	148.9907	232.4463
4	248.7184	182.6338	309.3035
5	293.1753	206.6645	404.9064
6	362.0618	266.7414	446.1469
7	430.1506	319.6091	517.3804
8	431.7510	312.3999	558.6209
9	488.6246	372.4768	543.6243
10	602.3694	487.8244	536.1261

5.3.3.3.- GRAFICA DE UNION EN pmol/mg VS. CONCENTRACION MICRO MOLAR DE ALBENDAZOL OBTENIDA PARA EL MODELO EXPERIMENTAL DE TUBULINA DE *Giardia lamblia*.



5.3.4. RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS EXPERIMENTOS DE UNION DE LA TUBULINA DE *Ascaris suum* CON EL ALBENDAZOL.

5.3.4.1.- DATOS OBTENIDOS DEL CONTADOR DE CENTELLEO EN EL EXPERIMENTO DE UNION DE LA MUESTRA DE TUBULINA DE *Ascaris suum* CON EL ALBENDAZOL.

No. Eppendorf	Concentración μM de albendazol	Descripción	CPM	CPM promedio	Dpm reales= (cpm/0.6242) x 1.5*
A-3	1	Blanco	33	33	79.3015
3-1	1	Muestra	45		
3-2	1	Muestra	49		
3-3	1	Muestra	47		

RESULTADOS

B-3	2	Blanco	47	47	112.9446
6-1	2	Muestra	73	78	187.4399
6-2	2	Muestra	77		
6-3	2	Muestra	84		
C-3	3	Blanco	68	68	163.4092
9-1	3	Muestra	116	118	283.5630
9-2	3	Muestra	130		
9-3	3	Muestra	108		
D-3	4	Blanco	74	74	177.8276
12-1	4	Muestra	114*	138	331.6245
12-2	4	Muestra	134		
12-3	4	Muestra	142		
E-3	5	Blanco	99	99	237.9045
15-1	5	Muestra	180	177.666	426.9449
15-2	5	Muestra	173		
15-3	5	Muestra	180		
F-3	6	Blanco	97	97	233.0984
18-1	6	Muestra	184	186.5	448.1737
18-2	6	Muestra	213*		
18-3	6	Muestra	189		
G-3	7	Blanco	114	114	273.9506
21-1	7	Muestra	171*	217.5	522.6690
21-2	7	Muestra	199		
21-3	7	Muestra	236		
H-3	8	Blanco	121	121	290.7722
24-1	8	Muestra	209	231.666	556.7110
24-2	8	Muestra	249		
24-3	8	Muestra	237		
I-3	9	Blanco	144	144	346.0429
27-1	9	Muestra	250	246	591.1567
27-2	9	Muestra	242		
27-3	9	Muestra	275*		
J-3	10	Blanco	175	175	420.5383
30-1	10	Muestra	271	273.333	656.8399
30-2	10	Muestra	276		
30-3	10	Muestra	273		

*Nota 1: Se multiplican todos los datos por 1.5 ya que el volumen total de la muestra es de 600 mL y sólo se toman 400 mL para la lectura en contador de centelleo.

Nota 2: Se considera que $dpm = cpm / \text{la fracción de eficiencia del equipo}$.

Nota 3: Se expresan en asterisco aquel valor de la tercia que se elimina con la finalidad de obtener una mejor linealidad en el experimento.

Datos para el cálculo de unión:

AE= Actividad de la solución de [³H]albendazol al día del experimento que resultó de 10.6935 dpm/pmol.

[mg tubulina]= Cantidad total de tubulina por ensayo:

$$0.222 \mu\text{g}/\mu\text{L} \times 90 \mu\text{L} = 19.98 \mu\text{g} = \underline{0.01998 \text{ mg.}}$$

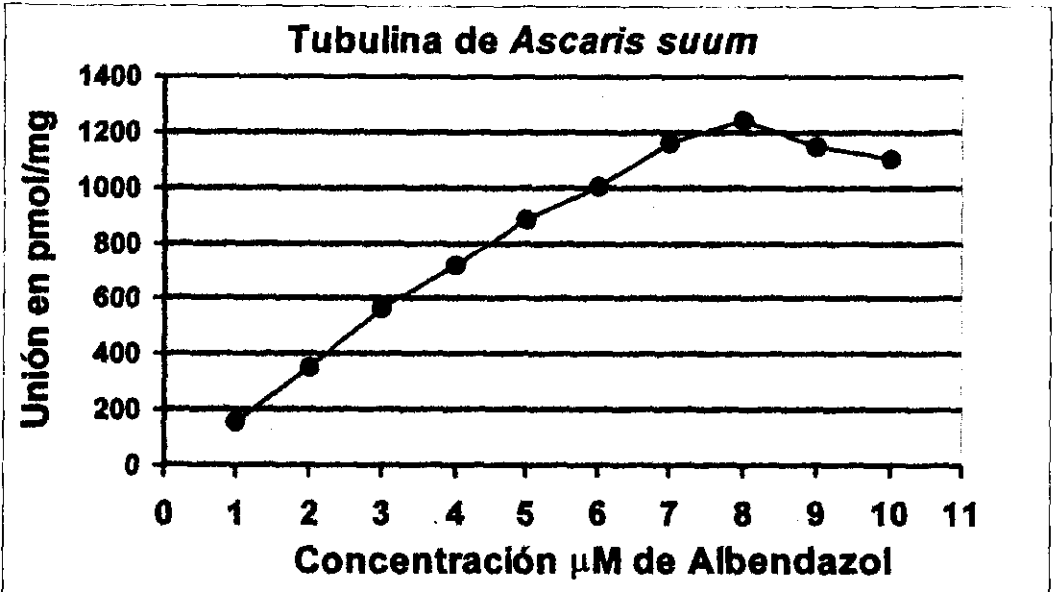
dpm_u= Resultado del conteo de la muestra.

dpm_b= Resultado del conteo del blanco.

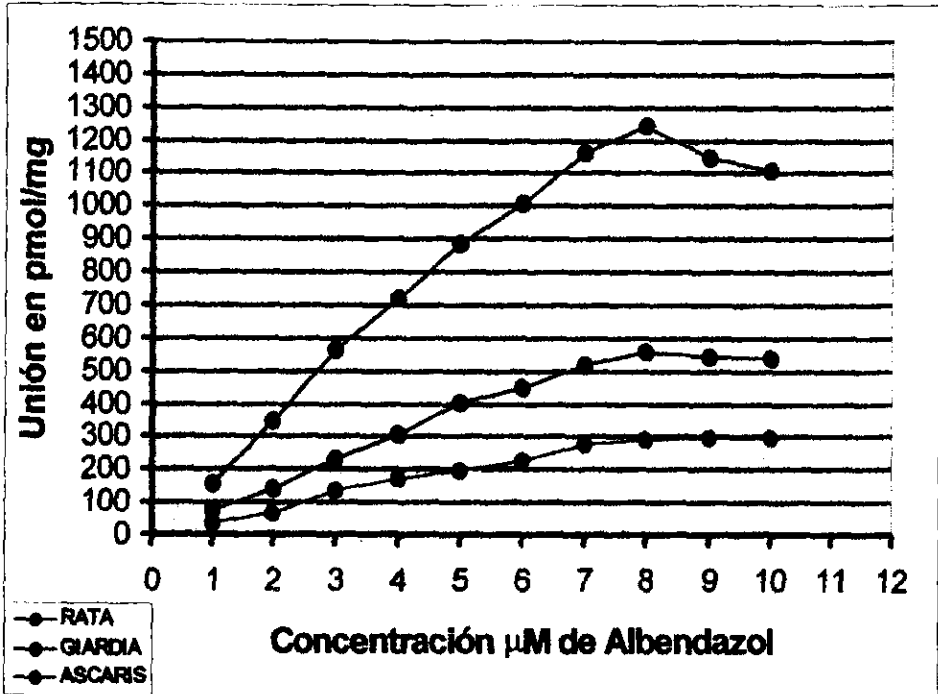
5.3.4.2.- DATOS DE UNION VS. CONCENTRACION MICROMOLAR DE ALBENDAZOL PARA TUBULINA DE *Ascaris suum*.

Concentración final μM de albendazol	dpm _m	dpm _b	Unión en pmol/mg obtenida de la Fórmula: Unión= $\frac{(dpm_u - dpm_b)}{AE[mg \text{ tubulina}]}$
1	112.9446	79.3015	157.4636
2	187.4399	112.9446	348.6694
3	283.5630	163.4092	562.3700
4	331.6245	177.8276	719.8336
5	426.9449	237.9045	884.7955
6	448.1737	233.0984	1006.6423
7	522.6690	273.9506	1164.1059
8	556.7110	290.7722	1244.7123
9	591.1567	346.0429	1147.2348
10	656.8399	420.5383	1105.9943

5.3.4.3.- GRAFICA DE UNION EN pmol/mg vs. CONCENTRACION MICRO MOLAR DE ALBENDAZOL OBTENIDA PARA EL MODELO EXPERIMENTAL DE TUBULINA DE *Ascaris suum*.



5.3.5. GRAFICA UNION EN pmol/mg vs. CONCENTRACION MICRO MULAR DE ALBENDAZOL PARA LOS TRES MODELOS DE TUBULINA.



5.3.6.- CALCULOS DE LAS CONSTANTES DE LOS EXPERIMENTOS DE UNION ALBENDAZOL-TUBULINA PARA LOS TRES MODELOS DE TUBULINA: CEREBRO DE RATA, *Giardia lamblia* Y *Ascaris suum*.

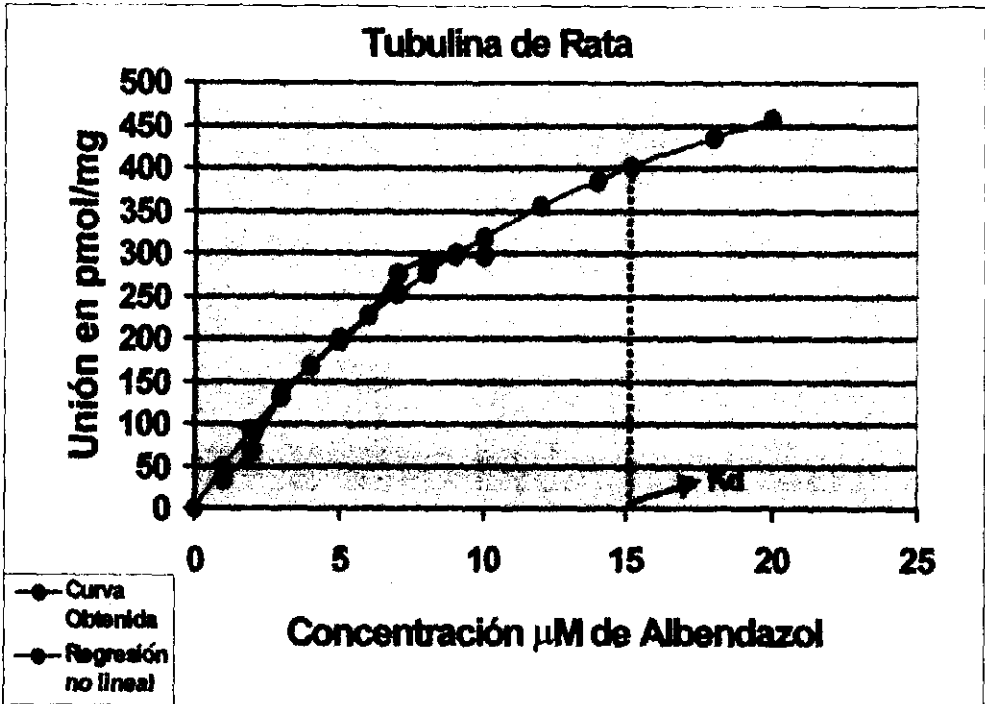
5.3.6.1.- Resultados de unión obtenidos después de aplicar la regresión no lineal de tipo hiperbólico a la curva original de tubulina de cerebro de rata.

Tubulina de cerebro de rata.

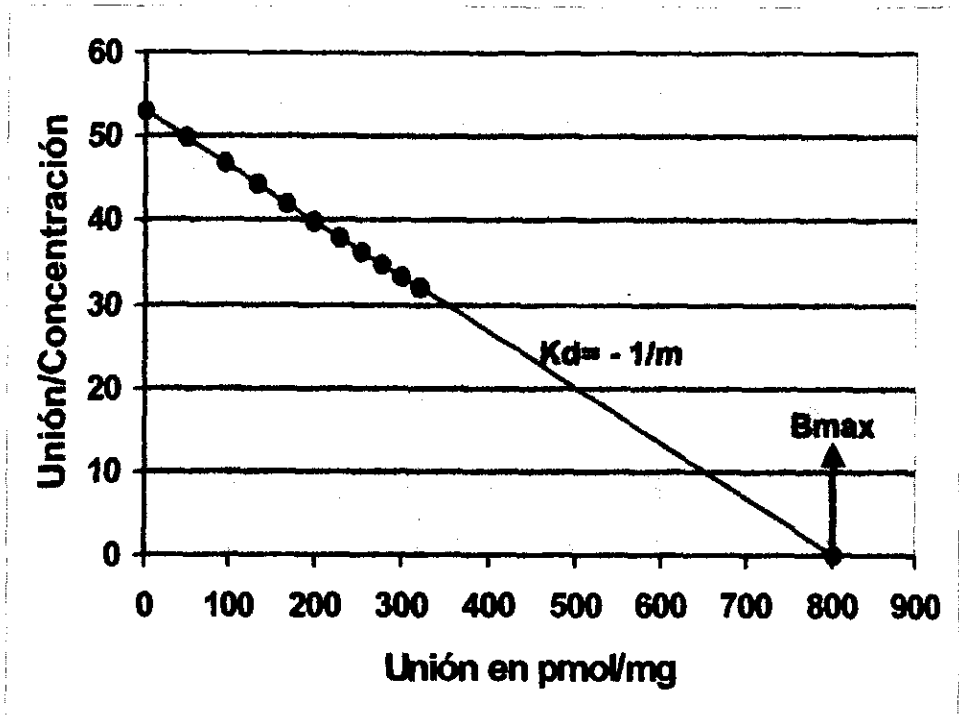
Concentración μM de albendazol	Datos originales de unión en pmol/mg	Datos de unión en pmol/mg después de la regresión no lineal	Unión en pmol/mg Concentración μM
0	-----	0.000	53.04
1	33.7422	49.7546	49.7546
2	67.4844	93.7050	46.8525
3	134.9688	132.8107	44.2702
4	168.7110	167.8311	41.9578
5	196.8295	199.3744	39.8749
6	228.6971	227.9342	37.9890
7	275.5613	253.9145	36.2735
8	292.4324	277.6497	34.7062
9	298.0561	299.4187	33.2687
10	298.0561	319.4563	31.9456
12	-----	355.1039*	-----
14	-----	385.8575*	-----
16	-----	412.6612*	-----
18	-----	436.2301*	-----
20	-----	457.1164*	-----
-----	-----	803.245	0.000

Nota: En asterisco valores calculados a partir de la fórmula: $Y = B_{\text{max}} X / K_d + X$ para la interpolación de la curva de los datos obtenidos de la regresión no lineal.

5.3.6.2.- Gráfica de unión vs. concentración obtenida después de aplicar la regresión no lineal de tipo hiperbólico a la curva original de tubulina de cerebro de rata.



5.3.6.3.- Gráfica de Scatchard de unión/concentración vs. unión para el modelo de tubulina de cerebro de rata.



Datos de la regresión lineal de la gráfica tipo Scatchard:

- $b = 53.04$
- $m = -0.066$
- $r = -0.999$
- $x(0) = 803.245$

5.3.6.4.- Cálculo de las constantes Bmax, Kd y Ka del experimento de unión del complejo albendazol-tubulina para el modelo de tubulina de cerebro de rata.

1.- Si $K_d = -1/m$ entonces la $K_d = -1/-0.066032 = 15.144$.

Por lo tanto el valor encontrado de la constante de disociación para la formación del complejo albendazol-tubulina de rata es: **$K_d = 15.144 \mu M$** .

2.- Si K_a es el inverso de K_d entonces $K_a = 1/15.144 = 0.066$.

Por lo tanto el valor encontrado de la constante de asociación para la formación del complejo albendazol-tubulina de rata es: **$K_a = 0.066 \mu M^{-1}$** .

3.- Bmax es la abscisa al origen de la gráfica de tipo Scatchard por lo tanto:

$B_{max} = x(0) = 803 \text{ pmol/mg}$.

4.- La concentración mínima para alcanzar el equilibrio (C_{mineq}) en la formación del complejo albendazol-tubulina de rata se calculó sustituyendo valores de "x" hasta que uno de éstos dio lugar al valor de K_a de acuerdo a la siguiente fórmula que se muestra:

$$B_{max}(x-y)^2 K_a^2 + B_{max}(x-y) K_a - y = 0$$

$$ax^2 + bx + c = 0$$

-----	c	A	B	-----
x	y	$B_{max}(x-y)^2$	$B_{max}(x-y)$	K_a
0.30265	-15.7382	191377.361	-12398.5	0.066031

De esta manera se encontró que para la formación del complejo albendazol-tubulina de rata, el valor de albendazol en $C_{mineq} = 0.3026 \mu M$.

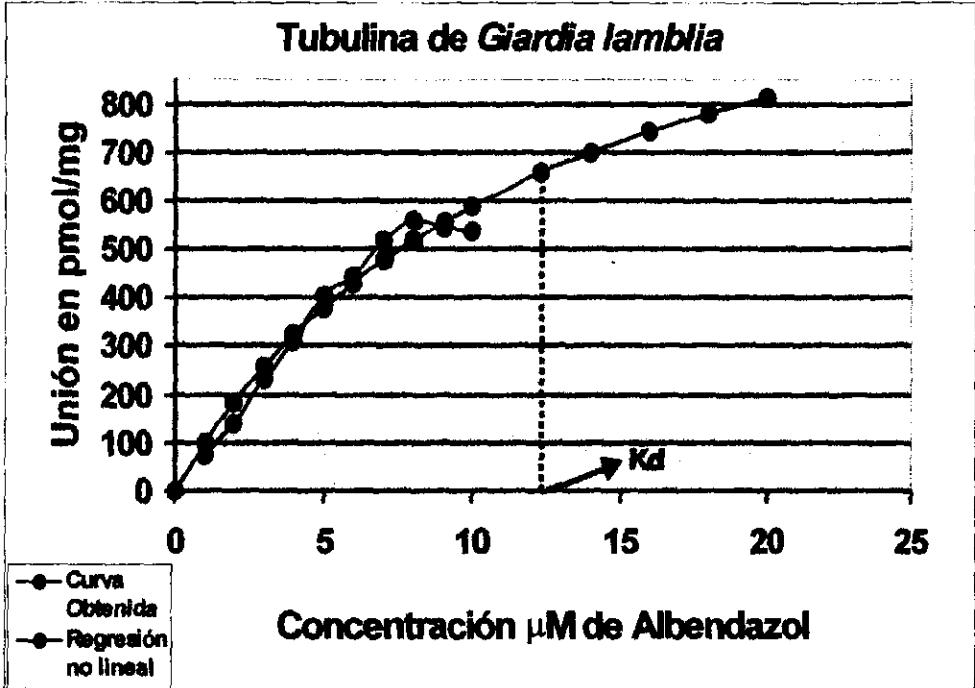
5.3.6.5.- Resultados de unión obtenidos después de aplicar la regresión no lineal de tipo hiperbólico de la curva original de tubulina de *Giardia lamblia*.

Tubulina de *Giardia lamblia*.

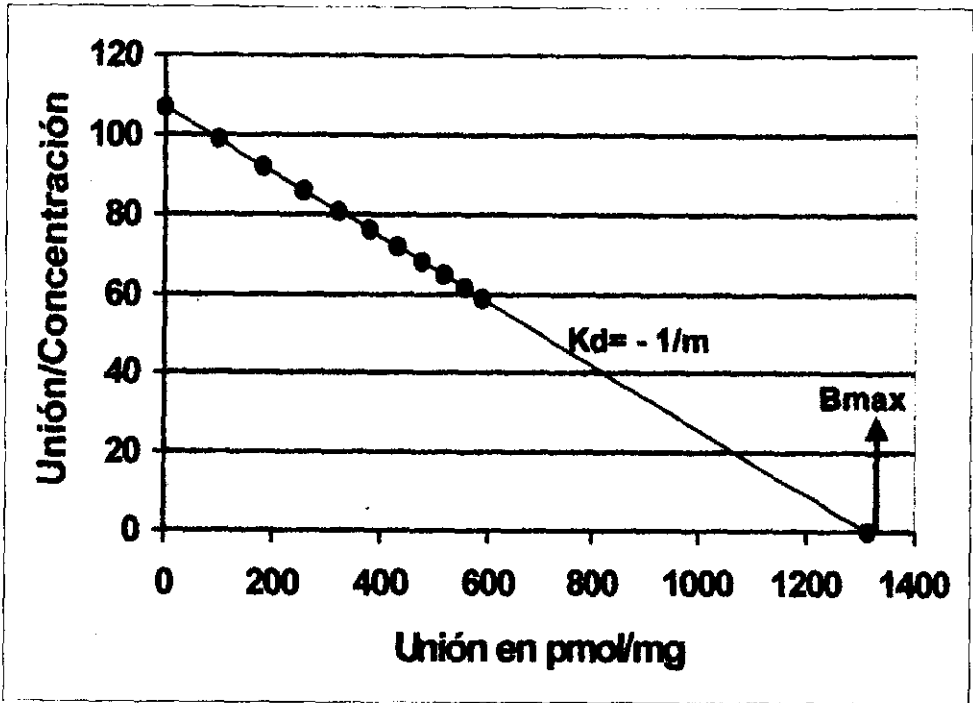
Concentración μM de albendazol	Datos originales de unión en pmol/mg	Datos de unión en pmol/mg después de la regresión no lineal	Unión en pmol/mg Concentración μM
0	-----	0.000	106.8259
1	73.1081	98.7983	98.7983
2	140.5925	183.7858	91.8929
3	232.4463	257.6691	85.8897
4	309.3035	322.4911	80.6228
5	404.9064	379.8223	75.9645
6	446.1469	430.8903	71.8150
7	517.3804	476.6683	68.0955
8	558.6209	517.9378	64.7422
9	543.6243	555.3336	61.7037
10	536.1261	589.3766	58.9377
12	-----	648.9269*	-----
14	-----	699.5246*	-----
16	-----	742.9726*	-----
18	-----	780.6862*	-----
20	-----	813.7304*	-----
-----	-----	1314.7417	0.000

Nota: En asterisco valores calculados a partir de la fórmula: $Y = \frac{B_{\max} X}{K_d + X}$ para la interpolación de la curva de los datos obtenidos de la regresión no lineal.

5.3.6.6.- Gráfica de unión vs. concentración obtenida después de aplicar la regresión no lineal de tipo hiperbólico a la curva original de tubulina de *Giardia lamblia*.



5.3.6.7.- Gráfica de Scatchard de unión/concentración vs. unión para el modelo de tubulina de *Giardia lamblia*.



Datos de la regresión lineal de la gráfica tipo Scatchard:

- $b = 106.825$
- $m = -0.0812$
- $r = -1$
- $x(0) = 1314.471$

5.3.6.8.- Cálculo de las constantes Bmax, Kd y Ka del experimento de unión del complejo albendazol-tubulina para el modelo de tubulina de *Giardia lamblia*.

1.- Si $K_d = -1/m$ entonces la $K_d = -1/0.08125 = 12.307$

Por lo tanto el valor encontrado de la constante de disociación para la formación del complejo albendazol-tubulina de *Giardia lamblia* es: **$K_d = 12.307 \mu M$** .

2.- Si K_a es el inverso de K_d entonces $K_a = 1/12.307 = 0.0812$.

Por lo tanto el valor encontrado de la constante de asociación para la formación del complejo albendazol-tubulina de *Giardia lamblia* es: **$K_a = 0.0812 \mu M^{-1}$** .

3.- B_{max} es la abscisa al origen de la gráfica de tipo Scatchard por lo tanto:

$B_{max} = x(0) = 1314 \text{ pmol/mg}$.

4.- La concentración mínima para alcanzar el equilibrio (C_{mineq}) en la formación del complejo albendazol-tubulina de *Giardia lamblia* se calculó sustituyendo valores de "x" hasta que uno de éstos dio lugar al valor de K_a de acuerdo a la siguiente fórmula que se muestra:

$$B_{max}(x-y)^2 K_a^2 + B_{max}(x-y)K_a - y = 0$$

$$ax^2 + bx + c = 0$$

-----	c	a	b	-----
x	y	$B_{max}(x-y)^2$	$B_{max}(x-y)$	K_a
0.11856	-12.54189	202874.42	-16330.12	0.08125

De esta manera se encontró que para la formación del complejo albendazol-tubulina de *Giardia lamblia*, el valor de albendazol en $C_{mineq} = 0.1186 \mu M$.

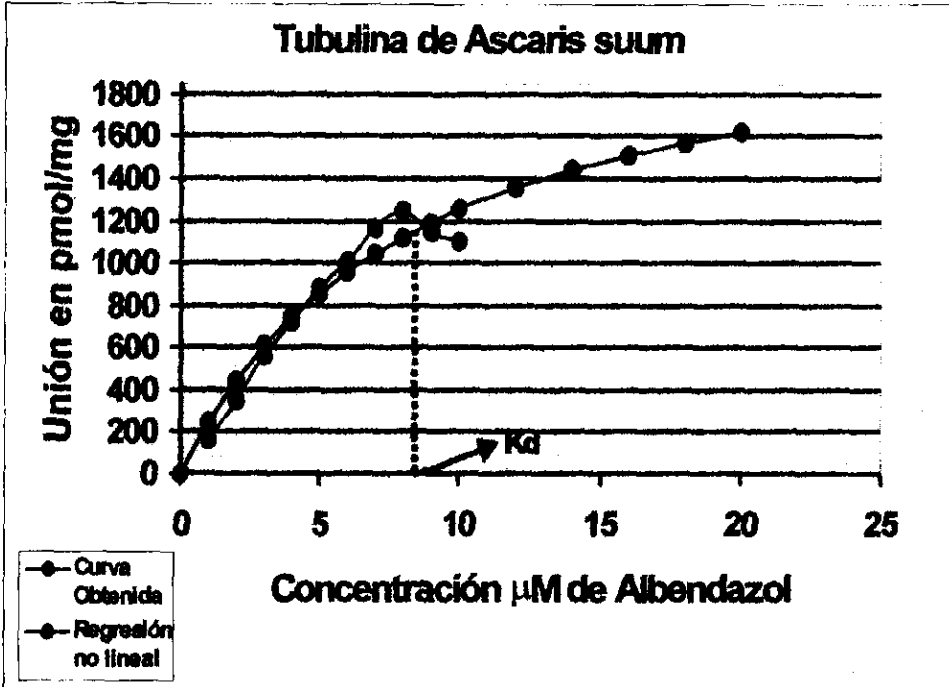
5.3.6.9.- Resultados de unión obtenidos después de aplicar la regresión no lineal de tipo hiperbólico de la curva original de tubulina de *Ascaris suum*.

Tubulina de Ascaris suum.

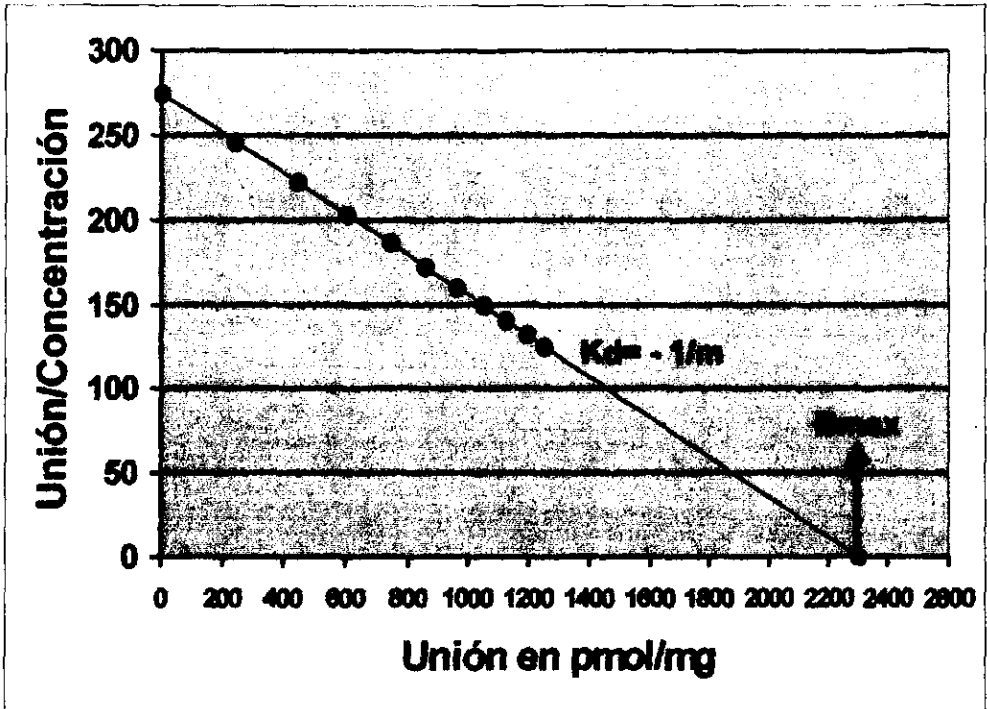
Concentración μM de albendazol	Datos originales de unión en pmol/mg	Datos de unión en pmol/mg después de la regresión no lineal	Unión en pmol/mg Concentración μM
0	-----	0.000	274.6663
1	157.4636	245.3846	245.3846
2	348.6694	443.4896	221.7448
3	562.3700	606.7787	202.2596
4	719.8336	743.6886	185.9221
5	884.7955	860.1338	172.0268
6	1006.6423	960.3838	160.0640
7	1164.1059	1047.5975	149.6568
8	1244.7123	1124.1625	140.5203
9	1147.2348	1191.9168	132.4352
10	1105.9943	1252.2986	125.2299
12	-----	1355.2858*	-----
14	-----	1439.8658*	-----
16	-----	1510.5690*	-----
18	-----	1570.5516*	-----
20	-----	1662.0799*	-----
-----	-----	2301.7428	0.000

Nota: En asterisco valores calculados a partir de la fórmula: $Y = B_{\text{max}} X / K_d + X$ para la interpolación de la curva de los datos obtenidos de la regresión no lineal.

5.3.6.10.- Gráfica de unión vs. concentración obtenida después de aplicar la regresión no lineal de tipo hiperbólico a la curva original de tubulina de *Ascaris suum*.



5.3.6.11.- Gráfica de Scatchard de unión/concentración vs. unión para el modelo de tubulina de *Ascaris suum*.



Datos de la regresión lineal de la gráfica tipo Scatchard:

- $b = 274.666$
- $m = -0.119$
- $r = -1$
- $x(0) = 2301.742$

5.3.6.12.- Cálculo de las constantes Bmax, Kd y Ka del experimento de unión del complejo albendazol-tubulina para el modelo de tubulina de *Ascaris suum*.

1.- Si $K_d = -1/m$ entonces la $K_d = -1/0.119 = 8.38$

Por lo tanto el valor encontrado de la constante de disociación para la formación del complejo albendazol-tubulina de *Ascaris suum* es: **$K_d = 8.38 \mu\text{M}$** .

2.- Si K_a es el inverso de K_d entonces $K_a = 1/8.38 = 0.119$

Por lo tanto el valor encontrado de la constante de asociación para la formación del complejo albendazol-tubulina de *Ascaris suum* es: **$K_a = 0.1193 \mu\text{M}^{-1}$** .

3.- Bmax es la abscisa al origen de la gráfica de tipo Scatchard por lo tanto:

$B_{\text{max}} = x(0) = 2301.742 \text{ pmol/mg}$.

4.- La concentración mínima para alcanzar el equilibrio (C_{mineq}) en la formación del complejo albendazol-tubulina de *Ascaris suum* se calculó sustituyendo valores de "x" hasta que uno de éstos dio lugar al valor de K_a de acuerdo a la siguiente fórmula que se muestra:

$$B_{\text{max}}(x-y)^2 K_a^2 + B_{\text{max}}(x-y) K_a - y = 0$$

$$ax^2 + bx + c = 0$$

-----	C	a	B	-----
X	Y	$B_{\text{max}}(x-y)^2$	$B_{\text{max}}(x-y)$	K_a
0.030848	-8.44183	162835.916	-19359.92	0.119326

De esta manera se encontró que para la formación del complejo albendazol-tubulina de *Ascaris suum*, el valor de albendazol en $C_{\text{mineq}} = 0.0308 \mu\text{M}$.

5.3.7. RESULTADOS COMPARATIVOS EN UNIÓN Y AFINIDAD PARA EL COMPLEJO ALBENDAZOL-TUBULINA DE LOS TRES MODELOS EXPERIMENTALES PROPUESTOS.

Modelo Experimental	Valor de las constantes de unión del complejo Albendazol-Tubulina	Unión y Afinidad comparada con la tubulina de rata
Tubulina de Cerebro de Rata.	Bmax=803 pmol/mg Kd=15.144 μM Ka=0.066 μM^{-1} Cmineq=0.3026 μM	1.00
Tubulina de <i>Giardia lamblia</i> .	Bmax=1314 pmol/mg Kd=12.307 μM Ka=0.0812 μM^{-1} Cmineq=0.1186 μM	La unión es 1.63 veces mayor. La afinidad es 1.23 veces mayor.
Tubulina de <i>Ascaris suum</i> .	Bmax=2301 pmol/mg Kd=8.38 μM Ka=0.1193 μM^{-1} Cmineq=0.0308 μM	La unión es 2.86 veces mayor. La afinidad es 1.8 veces mayor.

Nota 1.- Para comparar las uniones se dividió la Bmax obtenida en *Giardia lamblia* y *Ascaris suum* entre la Bmax obtenida en rata.

Nota 2.- Para comparar las afinidades se dividió la Ka obtenida en *Giardia lamblia* y *Ascaris suum* entre la Ka obtenida en rata.

6. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

6.1.- PARTE QUIMICA.

Dentro del trabajo de síntesis en la parte química se plantearon tres rutas sintéticas diferentes para la obtención del 6-bromo albendazol (VII) con la finalidad de verificar que las rutas propuestas en la literatura dan los resultados esperados.^{14,33,46-48} De esta manera se propuso explorar la ruta a partir de una o-fenilendiamina ya que se sabe que para obtener el bencimidazol 2-carbamato de metilo (con fines antihelmínticos) deseado, se sugiere primero obtener la o-fenilendiamina con los sustituyentes deseados³³ y finalmente generar el heterociclo a través de la reacción con sulfato de metiltiopseudourea y cloroformiato de metilo¹⁴. Pero también se sabe que se puede obtener la misma estructura deseada mediante la obtención de un 2-aminobencimidazol a partir de la o-fenilendiamina tratada con bromuro de cianógeno o cianamida⁴⁷ y ésta puede dar lugar al grupo carbamato de metilo en posición dos cuando se trata con cloroformiato de metilo.^{47,48} Finalmente, se realizó un análisis de los rendimientos y de las dificultades que se presentan durante el desarrollo de estas rutas propuestas, y así poder concluir sobre la ruta sintética ideal para obtener el 6-bromoalbendazol (VII).

Durante el desarrollo de la ruta sintética No. 1, que parte de la 3-cloroanilina como materia prima, se pudo evidenciar que los intermediarios sintéticos: 3-cloroacetanilida (I) y 4-bromo-3-cloroacetanilida (II) se obtuvieron fácilmente y con buenos rendimientos (95.5% y 95% respectivamente), siendo este último generado a través de una reacción de sustitución electrofílica aromática del bromo sobre la posición "para" con respecto al grupo acetamido. La nitración de la 4-bromo-3-cloroacetanilida (II), otra reacción de sustitución electrofílica aromática, para generar la 4-bromo-5-cloro-2-nitroacetanilida (III-A), presentó un 97.3 % de rendimiento, pero con la obtención de un subproducto minoritario que fue visible por cromatografía en capa fina: la 4-bromo-3-cloro-2-nitroacetanilida (III-B); ya que

esto es el resultado de la mononitración en la posición 2 de la 4-bromo-3-cloroacetanilida (II). Esto es consecuencia del grupo acetamido que orienta la nitración hacia las dos posiciones orto disponibles (2 y 6) siendo, afortunadamente para nuestros propósitos, mayoritaria la sustitución en la posición 6 que da lugar a (III-A).

En la reacción de hidrólisis del grupo acetamido de la 4-bromo-5-cloro-2-nitroacetanilida (III-A) con hidróxido de sodio en reflujo de metanol, con la que se obtuvo la 4-bromo-3-cloro-2-nitroanilina (IV) se presentó un rendimiento del 83%, esto se debió a que la mezcla de reacción solo se dejó 10 minutos más del tiempo contemplado a reflujo de metanol, después de haberse adicionado toda la solución de hidróxido de sodio. No es conveniente dejar la mezcla de reacción más tiempo porque también puede favorecerse la reacción de sustitución nucleofílica aromática del grupo hidroxilo sobre el cloro en posición "5"; ya que no todo el grupo acetamido alcanza a hidrolizarse. Esto puede deberse a que al principio la hidrólisis avanza muy rápido y después la velocidad de reacción va disminuyendo conforme se va consumiendo la materia prima, por lo que los últimos restos de ésta requieren de mayor tiempo en reflujo para transformarse, siendo este tiempo de más contraproducente porque un exceso de tiempo puede generar restos del 5-acetamido-2-bromo-4-nitrofenol. Cabe mencionar que al recrystalizar la 4-bromo-5-cloro-2-nitroanilina (IV) se eliminaron los residuos remanentes de la 4-bromo-3-cloro-2-nitroacetanilida (III-B) que es el subproducto de la reacción de nitración previa.

La reacción de sustitución nucleofílica aromática de la 4-bromo-5-cloro-2-nitroanilina (IV) con 1-propanotiol, en presencia de hidróxido de sodio para dar lugar a la formación de la 4-bromo-5-propiltio-2-nitroanilina (V), culminó con un bajo rendimiento siendo éste del 69%, esto se debió a que la reacción se tuvo que desarrollar en fase acuosa para dar lugar a la formación y al mantenimiento de la nucleofilicidad del anión 1-propanotiol, en donde la 4-bromo-5-cloro-2-nitroanilina (IV) presenta baja solubilidad por lo que la reacción se llevó a cabo en fase de suspensión, limitándose de esta manera la interacción molecular. Además de que

bajo estas condiciones el 1-propanotiol es muy volátil por lo que se pierde parte de este reactivo en el transcurso de la reacción.

La obtención de la 4-bromo-5-propiltio-1,2-fenilendiamina (VI) a partir de la 4-bromo-5-cloro-2-nitroanilina (V) y cloruro estanoso en etanol culminó con un rendimiento de reacción del 95%. Las condiciones reductoras con que se trabajó esta reacción al parecer también favorecen ligeramente la desbromación del sustrato ya que a través de cromatografía en capa fina se pudo observar la presencia de trazas de otro componente con un r_f menor. Además cabe mencionar que la ortofenilendiamina obtenida no se recrystalizó sino que se dejó como producto crudo ya que primeramente ésta se obtuvo en forma de un líquido viscoso con aspecto resinoso que es muy difícil de manejar y sólo llega a solidificarse en forma de un polvo de aspecto ceroso, cuando ésta se somete a calentamiento suave y a presiones reducidas. Por tal motivo se trabajó este producto en estas condiciones para las siguientes reacciones avalando su pureza y estructura química por cromatografía en capa fina y por sus datos espectroscópicos.

La ruta No. 1 se completó con la obtención del 6-bromoalbendazol (VII-1) a partir de la 4-bromo-5-propiltio-1,2-fenilendiamina (VI) cuando ésta se trató en agua a reflujo y pH de 6.5 con el subproducto blanco esponjoso que se obtuvo de una mezcla previa de reacción entre el sulfato de metiltiopseudourea con cloroformiato de metilo a pH entre 7 y 8 y a menos de 10°C. El subproducto obtenido es la N-(metoxicarbonil) metiltiopseudourea. El rendimiento de reacción fue bajo (50%) y esto se debió a que la ortofenilendiamina, que da pie a la formación del anillo imidazol por sustitución nucleofílica de los dos grupos amino sobre el átomo de carbono del subproducto; a pH de 6.5 es escasamente soluble en agua por lo que casi la mitad de este sustrato se degradó a la temperatura de reflujo (94°C) y sólo lo poco que se iba integrando fue reaccionando con el subproducto para dar lugar a la formación del 6-bromo albendazol (VII-1). Cabe mencionar que en este producto final ya recrystalizado se presentaron trazas de albendazol que fueron evidentes por cromatografía en capa fina. Esto se debió a que la 4-bromo-5-propiltio-1,2-fenilendiamina (VI) se trabajó casi cruda y con las

condiciones reductoras de la reacción anterior se pudo parcialmente desbromado. Sin embargo los datos espectroscópicos obtenidos de este producto, después de haberse purificado, corresponden para 6-bromoalbendazol (VII-1).

Para la ruta No. 2 se hizo reaccionar la misma 4-bromo-5-propiltio-1,2-fenilendiamina (VI) cruda obtenida de la ruta No. 1, con 1.5 equivalentes de bromuro de cianógeno en etanol a reflujo para que, a través de una reacción de sustitución nucleofílica de uno de los aminos sobre el átomo de carbono con hibridación sp y posteriores reacciones de adición de los aminos sobre el triple enlace del grupo ciano, diera lugar a la formación del anillo imidazol; y así se obtuvo el 2-amino-6-bromo-5-propiltiobencimidazol (VIII) con un rendimiento de reacción del 92.7%. La ruta No. 2 se completó con la reacción de obtención del 6-bromo albendazol (VII-2) a partir del 2-amino-6-bromo-5-propiltiobencimidazol (VIII) cuando éste se trató con dos equivalentes de cloroformiato de metilo⁴⁸ en piridina a 5°C, para adicionar el grupo formiato de metilo en las posiciones 1 ó 3 del núcleo bencimidazol y posteriormente al calentar la mezcla de reacción a 50°C se favoreció la transposición del grupo formiato de metilo a la posición 2 con lo cual se generó el 6-bromoalbendazol (VII-2) con un rendimiento del 66%. Cabe mencionar que en esta ruta se presentó como inconveniente la generación de trazas de sustrato que no logró transponerse a la posición 2 ya que la cromatografía en capa fina realizada al 6-bromoalbendazol (VII-2) obtenido, presentó 2 manchas: una que corresponde al producto deseado y otra, apenas visible, que (no es albendazol) probablemente corresponda a trazas de sustrato en donde el grupo cloroformiato de metilo no alcanzó a transponerse en la posición 2. Sin embargo los datos espectroscópicos obtenidos con este producto, después de haberse purificado, corresponden para 6-bromoalbendazol(VII-2).

La ruta No. 3 se completó con la reacción de obtención del 6-bromoalbendazol (VII-3) a partir del albendazol por bromación directa con bromo en ácido acético glacial a través de una reacción de sustitución electrofílica aromática en donde el bromo se adicionó a la posición 6 del núcleo bencimidazol según muestran los datos espectroscópicos obtenidos. La reacción de bromación presentó un rendimiento regular del 84%, y hasta este momento parecía no presentar ningún

inconveniente ya que el producto desarrolló una sola mancha por cromatografía en *capa fina*.

Debido a que la ruta sintética No. 3 dio lugar al compuesto precursor con mejor rendimiento y sin problemas tanto de desbromación como de transposición parcial (como en el caso de la ruta No. 1 y ruta No. 2 respectivamente); fue que el 6-bromoalabendazol (VII-3) obtenido mediante esta ruta se eligió para la trititación del alabendazol a usarse en los experimentos de unión; aunque cabe mencionar que presenta como único inconveniente la generación de subproductos del alabendazol los cuales son productos de oxidación del grupo propiltio por efecto del uso de bromo elemental, y que pudo dar lugar a la generación de sulfóxido y sulfona de alabendazol.

Al tratar el 6-bromoalabendazol (VII-3) con [^3H]borohidruro de sodio tritiado en presencia de cloruro de paladio,^{18,49} se dio lugar a la trititación del alabendazol a través de una reacción de sustitución nucleofílica aromática en donde el anión tritio desplaza al bromo de la posición 6 obteniéndose de esta forma el 6- ^3H alabendazol (VII-T). Mediante el espectro de masas de alta resolución se pudo evidenciar que la solución de ^3H alabendazol obtenida es en realidad una mezcla del resultado de la monotrititación, la ditrititación y de la tritrititación del alabendazol ya que así lo confirman los picos obtenidos de 267 m/z, 269 m/z y 271 m/z. Esto sucedió porque a que a pesar de estar favorecida la posición 6 de (VII-3) para poder intercambiar un átomo de bromo por uno de tritio, y como la reacción se llevó a cabo en un medio *prótico*, entonces el exceso de los aniones tritio presentes en el medio de reacción también pudieron intercambiarse por los hidrógenos presentes tanto en las posiciones 1H como en el grupo carbamato de metilo (que está como sustituyente de la posición 2 del núcleo bencimidazol) ya que estas posiciones son las únicas que presentan hidrógenos intercambiables en medios *próticos*. Al realizar la cromatografía en *capa fina* de la muestra de ^3H alabendazol (VII-T), esta correspondió con la muestra de alabendazol referencia (SmithKline Beecham) ya que ambas presentaron una sola mancha y el mismo *rf*.

De la cuantificación de la muestra de ^3H alabendazol (VII-T) que se realizó por espectrofotometría a 300 nm, se obtuvieron 1.2675 mg de alabendazol de los 3.44

mg de 6-bromoalbendazol que se procesaron lo cual representa un rendimiento de recobro del 47.8% ya que el resto de la muestra se pudo haber perdido tanto en el proceso de extracción con cloroformo como en el cartucho de sílica sep-pak. La muestra de [³H]albendazol (VII-T) se diluyó con DMSO hasta una concentración 2mM (solución de [³H]albendazol) con la finalidad de manejar mejor la muestra y de tener así una concentración no fraccionaria. A esta dilución se le conoce por solución de [³H]albendazol. Cabe mencionar que para el cálculo de esta dilución se consideró como albendazol al total de los analitos cuantificados ya que no considerabamos todavía la presencia de impurezas en la muestra. Al determinar la pureza de la solución de [³H]albendazol por HPLC se encontró que del total de los analitos cuantificados por espectrofotometría sólo el 65.68 % corresponde a albendazol según nos indica la señal de mayor área bajo la curva y que presentó un tiempo de retención de 11.5 minutos del cromatograma obtenido. (ver apéndice II). Pero además puede observarse la presencia de otras dos señales diferentes, la primera con un tiempo de retención de 6.3 minutos y la segunda con 9.1 minutos. La primera es probable que se deba a la presencia de sulfona de albendazol, debido a que el tiempo de retención es muy similar al que se ha venido obteniendo en el Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Centro Médico IMSS. Esto resulta lógico ya que para la trititación del albendazol se utilizó el 6-bromoalbendazol procedente de la ruta sintética No. 3 en la que se trató el albendazol con bromo y este último además de adicionarse a la posición 6 del núcleo benzimidazol, también pudo haber ocasionado la oxidación del átomo de azufre del grupo propiltio para transformarlo en sulfona lo cual representó un inconveniente de la ruta No. 3 que se hizo evidente hasta este punto. Sin embargo la señal de 9.1 minutos probablemente se deba a trazas remanentes del 6-bromo albendazol que no alcanzó a desbromarse durante el proceso de trititación.

Una vez que se realizó la determinación de la actividad específica de la solución de [³H]albendazol por contador de centelleo, se encontró que ésta presentaba una actividad específica total, al día del marcaje, de 44447 dpm/ μ g y de 40,352.9 dpm/ μ g al día del experimento, lo cual representa una pérdida de la

marca del 9.21 % en dos años. Aunque del total de la muestra sólo el 65.68% corresponde a albendazol (es decir 348.5 µg/mL de los 530.6 µg/mL de analitos totales cuantificables por espectrofotometría) el 34.32 % remanente se consideró como subproductos e impurezas del albendazol, que probablemente son sulfona de albendazol (subproducto inactivo del albendazol)³⁹ y trazas (impureza) de 6-bromoalbendazol que a penas alcanza el 16 % de los 34.32 %. Considerando que éstos no afectan los experimentos de unión, ya que el mayoritario es inactivo y el otro se encuentra en baja cantidad, entonces se calculó la actividad específica de la solución de [³H]albendazol en dpm/pmol empleándose el peso molecular de 265 pg/pmol ya que se consideró a los 530.6 mg/mL de analitos totales como si fuera todo albendazol.

De esta manera se obtuvo el valor de 10.6935 dpm/pmol como valor de la actividad específica de la solución de [³H]albendazol.

6.2.- PARTE BIOLÓGICA.

Para realizar los experimentos de unión con [³H]albendazol, se propusieron los modelos de tubulina de cerebro de rata, *Giardia lamblia* y *Ascaris suum* ya que la ideal principal fue comparar la unión y afinidad de la tubulina de diferente origen, una obtenida de mamífero, otra del protozoario *Giardia lamblia* y la otra de un helminto con el albendazol. Como modelo de tubulina de mamífero se eligió la de cerebro de rata ya que su aislamiento es relativamente fácil y se obtienen buenas cantidades de esta proteína,¹⁷ además de que es empleada frecuentemente en ensayos de unión. El segundo se eligió en base a que necesitábamos ratificar otra importante aplicación quimioterapéutica del albendazol como agente antigiardiasico.⁵³ El tercero se eligió en base a que se requería un modelo de helminto y se prefirió a *Ascaris suum* entre otros, ya que éste es un parásito muy sensible al efecto del albendazol y además se puede obtener en buena cantidad en los rastros donde se siguen sacrificando cerdos criados en traspatios.

La tubulina de cerebro de rata se obtuvo a partir del método descrito por Shelansky⁵⁰, el cual consiste en someter el homogenizado cerebral a ciclos de

polimerización en tibia con glicerol 4M y despolimerización en frío, y así la tubulina se fue purificando hasta que finalmente se obtuvo una muestra de 5 mL con una concentración de 5.3966 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y una pureza del 82.05 % cuantificada por densitometría de una cantidad inicial de 64.16 gramos de cerebro. Cabe mencionar que la muestra de tubulina no se obtiene absolutamente pura ya que se copurifica junto con las MAP's (proteínas asociadas a microtúbulos), sin embargo el rendimiento en tubulina soluble lo consideramos satisfactorio ya que la cantidad de proteína obtenida fue suficiente para realizar nuestros ensayos. En la electroforesis de la muestra de tubulina de cerebro de rata se observan claramente tres bandas diferentes: la primera, en la parte superior, que corresponde a las PAM's y las otras dos que corresponden a las cadenas α y β tubulina respectivamente en orden descendente.

La tubulina de *Giardia lamblia* se obtuvo a partir de la cepa P-1 de referencia cultivada en el medio de cultivo desarrollado por Keister David B,⁵¹ a partir de la despolimerización en frío de los citoesqueletos provenientes de los trofozoitos lisados con tritón X-100. La cantidad de tubulina soluble que se obtuvo de estos citoesqueletos fue satisfactoria ya que se obtuvieron 5 mL de muestra con una concentración de 0.29144 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y con una pureza aproximada del 100% cuantificada por densitometría; de una cantidad inicial aproximada de 1.1745×10^{10} trofozoitos. El rendimiento de esta tubulina lo consideramos satisfactorio ya que la cantidad de proteína obtenida fue suficiente para realizar nuestros ensayos. En la electroforesis de la muestra de tubulina de *Giardia lamblia* sólo se observan claramente dos bandas muy juntas que corresponden a las cadenas α y β tubulina respectivamente en orden descendente.

La tubulina de *Ascaris suum* se obtuvo a partir de un homogenizado de 70 gramos de nemátodos el cual se centrifugó a 100,000 g y el sobrenadante fue aplicado en resina de DEA-Sephadex y, mediante la técnica de batch, se eluyó la mayor cantidad de impurezas con 0.2 M de KCl ya que no contamos con una columna de las dimensiones necesarias para realizar este paso por cromatografía en columna. Fue solamente en el paso de la elución de la tubulina con KCl 0.35 M que se utilizó una jeringa de 20 mL la cual recortamos a la medida para empaclarla

con 15 mL de DEA-Sephadex y de esta forma con esta jeringa al servirnos de columna, realizamos hasta este paso la cromatografía por intercambio iónico de la muestra debido a que la mayor parte del total de la carga de impurezas protéicas ya habían sido removidas. Una vez que se concentró con polietilenglicol el eluido de tubulina con 0.35 M de KCl, la técnica presentó como inconveniente que la muestra de tubulina de *Ascaris suum* presentó restos de actina, ya que ambas proteínas presentan características bioquímicas similares (se polimerizan y despolimerizan de forma similar).²⁸ Sin embargo el rendimiento fue favorable ya que se lograron obtener 2.5 mL de muestra con una concentración de 0.5374 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y una pureza del 81.54 % cuantificada por densitometría, lo cual nos fue suficiente para realizar nuestros ensayos.

Para la cuantificación de la concentración protéica total de las tres muestras de tubulina se eligió el método micro Bradford ya que éste demostró ser un método rápido de análisis que sólo requiere de una placa de 96 pozos para ELISA, un equipo lector de absorbancias para placas de ELISA automatizado, un solo reactivo (Bradford) y poca cantidad de las muestras; además de que es un método confiable ya que la curva patrón que se obtuvo con albúmina sérica de bovino, y que sirvió para cuantificar a las tres muestras, presentó muy buena linealidad según la gráfica y los datos de la curva que se muestran en el apéndice II.

Los análisis electroforéticos que se iban realizando a las muestras crudas en sus diferentes etapas de purificación sirvieron de ayuda para verificar que a medida que éstas se iban purificando, la tubulina todavía se encontraba presente y que aún no se había perdido. Por otra parte los análisis electroforéticos realizados a las muestras purificadas ayudaron a identificar previamente a las tubulinas ya que a partir de éstos claramente se pudieron observar, de los geles teñidos, las dos cadenas α y β que caracterizan al dímero de tubulina y que en forma previa anticiparon nuestro éxito. Además, también se pudo comprobar la pureza de las muestras de tubulina dependiendo de la presencia o no de otros contaminantes de naturaleza proteica que también se encuentran en la misma muestra y que se presentan como bandas teñidas en el mismo gel.

Para la identificación de las muestras de tubulina se eligió el método con luminol ya que éste es un método sencillo que sólo requiere de realizar una electrotransferencia en papel de nitrocelulosa a partir del gel obtenido previamente en la electroforesis de las muestras, así como también de dos sueros: un anti-tubulina de rata de ratón y un anti-tubulina de *Giardia* de ratón, un suero secundario, el anti-IgG de ratón de cabra acoplado a peroxidasa, película fotográfica, reactivos revelador y fijador y el reactivo luminol. Mediante este método de identificación se obtienen películas fotográficas en donde se hace evidente el reconocimiento de la tubulina mediante la unión entre la tubulina y el suero anti-tubulina, que se manifiesta a través de una emisión de luz la cual revela la película fotográfica y, de este modo, se pudo comprobar que en las tres muestras obtenidas había tubulina. Esta emisión de luz proviene de la reacción de oxidación de las diacilhidrazidas cíclicas, como el luminol, con el peróxido de hidrógeno presentes en el reactivo luminol, para dar lugar a la formación del anión ftalato, nitrógeno y la emisión de energía radiante; y todo esto originado a partir de la descomposición del peróxido de hidrógeno por la acción catalítica de la enzima peroxidasa que se encuentra acoplada al anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón de cabra).⁵² Cabe mencionar que para el caso de la muestra de tubulina de *Ascaris suum* se utilizó un suero anti-tubulina de rata de ratón y no así un anti-*Ascaris* ya que pudimos constatar que el suero anti-tubulina de rata de ratón también reconoce a los isotipos de la tubulina de *Ascaris*, por lo que no fue necesario producir un suero anti-*Ascaris* de ratón.

La razón por la cual se llevó a cabo el análisis densitométrico de las tres muestras obtenidas se debió a que se observaron otras bandas en los geles de los análisis electroforéticos efectuados las cuales no correspondían a tubulina, tal es el caso de la muestra de cerebro de rata y de *Ascaris suum* principalmente; y así de esta forma, se podría determinar la pureza en tubulina de la carga protéica total en cada una de las muestras. Se eligió el método de análisis densitométrico Sigma-Gel porque este es un programa del cual rápidamente se obtienen resultados y es confiable, además que se contaba con un excelente scanner: el equipo Eagle Eye (ya que un buen scanner es requisito necesario para capturar

adecuadamente la imagen del gel de poliacrilamida y así correr en forma óptima este programa). El programa Sigma-Gel contabiliza densitométricamente a todas las bandas las cuales corresponden a una proteína en particular y que son evidentes en el gel electroforético de cada muestra en unidades denominadas píxeles. La sumatoria total en píxeles de todas las bandas observadas en el gel de cada muestra corresponde al 100%, por lo que al dividir la contribución en píxeles de las bandas que corresponden a tubulina entre la contribución total de todas las bandas se puede obtener el porcentaje de la pureza en tubulina con respecto a la carga proteica total de la muestra después de multiplicar el resultado obtenido por cien.

6.3.- EL EXPERIMENTO DE UNIÓN.

Antes de comenzar el experimento de unión se determinó nuevamente tanto la eficiencia del equipo contador de centelleo como la actividad específica actual de la solución de [³H]albendazol ya que del día del marcaje al día el experimento de unión ya habían transcurrido poco más de dos años, pero sin embargo comparando los dos resultados encontramos que la variación fue poca ya que sólo se logró perder un 9.21% de la marca original y la eficiencia del equipo se mantuvo casi igual.

Para el experimento de unión se escogieron diez concentraciones diferentes de la muestra de [³H]albendazol para realizar los experimentos de unión con las tres muestras de tubulina. Estas concentraciones van de 1 a 10 μM y se eligieron en base a un experimento previo de unión (sólo con tubulina de rata y *Giardia lamblia*) en donde se encontró que la concentración de albendazol en la que las gráficas de unión desarrollaron una meseta a una cantidad constante de tubulina de 19.8 μg , se encontraba entre 8 y 9 μM .

Cabe mencionar que para la preparación de la solución stock de 100 μM de [³H]albendazol, a partir de la cual se prepararon las demás diluciones, se consideró la concentración de albendazol real de la muestra que es de 348.5 $\mu\text{g/mL}$ y no así los 530.6 $\mu\text{g/mL}$ del total de los analitos cuantificados ya que las

concentraciones se manejaron en función del albendazol existente y no así de los artefactos que por ser uno inactivo y el otro minoritario, no se consideraron.

Este experimento de unión se llevó a cabo en forma muy similar al que realizó Ernest Lacey en 1985³⁵ en el cual se utilizaron volúmenes y concentraciones constantes de una muestra cruda de tubulina de *Haemonchus contortus*, con diferentes concentraciones de varios bencimidazoles tritizados. En nuestro caso primeramente se incubaron a 37°C por 20 minutos las muestras de tubulina con diferentes concentraciones de [³H]albendazol para que se estableciera el equilibrio de la formación del complejo albendazol-tubulina. El carbón activado se incorpora después para que éste adsorba tanto a las impurezas presentes en la solución de [³H]albendazol como a aquellas moléculas de albendazol que en su momento no se encuentran unidas a la tubulina. Al centrifugarse las muestras, se deja libre en solución únicamente al complejo albendazol-tubulina; y la cuantificación del albendazol incorporado por unidad de masa de proteína se realizó a través del contador de centelleo. En las gráficas obtenidas de unión vs. concentración se puede observar que, cuantitativamente, la unión es diferente para cada una de las tres tubulinas. Se aplicó la regresión no lineal de tipo hiperbólico a las gráficas de Unión vs Concentración obtenidas ya que la formación del complejo albendazol-tubulina se ajusta al modelo de unión específico para un solo sitio y cuyas curvas se caracterizan por describir una hipérbola rectangular (isoterma de unión o curva de unión saturable) en su trayectoria que parte del origen y se vuelve asintótica con un trazo imaginario que parte del eje de las ordenadas en donde $y=B_{max}$. Para efectuar la regresión no lineal de las curvas originales se eligió el programa Microsoft Excel curve fitting⁵⁴ por la facilidad con la que se ajustan las curvas ya que sólo se requiere ingresar los resultados obtenidos del experimento de unión y a través de su herramienta "Solver", se consigue obtener la curva corregida que se ajusta a la ecuación: $Y=(B_{max})(X)/Kd+X^{44}$ con la cual se puede interpolar la curva corregida y que aplica para un modelo de unión específica para un solo sitio. Las constantes que describen el comportamiento de unión de cada tubulina por el albendazol se obtuvieron mediante la transformación lineal de tipo Scatchard de las curvas ya corregidas graficando unión/concentración vs. unión y a partir de las

cuales se obtuvo B_{max} como intercepto en el eje de las abscisas de la línea que se obtiene y K_d como el inverso negativo de la pendiente. Para obtener K_a se consideró el inverso de K_d ya que en el estado de equilibrio se sabe que entre estas constantes existe una relación inversa. Además, mediante el empleo de la ecuación de E. Lacey:³⁶ $y = B_{max}K_a(x-y)/(K_a(x-y)+1)$; que se resuelve para K_a al expresarla como trinomio cuadrado de la forma:

$B_{max}(x-y)^2K_a^2 + B_{max}(x-y)K_a - y = 0$; se pudo obtener el valor de la concentración mínima de albendazol que se requiere para alcanzar el estado de equilibrio (C_{mineq}) al hallar el valor de "x" con el cual se obtiene K_a . Cabe mencionar que entre mayor sea el valor de C_{mineq} la afinidad será mayor ya que se requerirá mayor concentración de ligando para alcanzar el estado de equilibrio, y por lo tanto un menor valor de C_{mineq} se traducirá en una mayor afinidad.

Para el análisis de las diferencias de unión entre las tubulinas parasitarias en relación a la tubulina de rata, se realizó la comparación de las magnitudes obtenidas para B_{max} de *Giardia lamblia* y *Ascaris suum* con respecto a la B_{max} obtenida en rata y de igual forma, para analizar las diferencias en afinidad, se relacionaron los valores de K_a obtenidas para ambas tubulinas parasitarias con respecto a la K_a de tubulina de rata.

El hecho de que tanto la unión como la afinidad de la tubulina de los parásitos estudiados haya sido mayor que la tubulina de mamífero se traduce en una toxicidad selectiva del albendazol hacia los helmintos y *Giardia lamblia*.

En base a estos resultados obtenidos, se sugiere aprovechar las ventajas terapéuticas que nos brinda el albendazol en el tratamiento de las parasitosis intestinales ocasionadas por helmintos y *Giardia lamblia* en el sentido de que si se sospecha de una de estas parasitosis se puede administrar albendazol con la ventaja de que si el diagnóstico hubiese sido falso, no resultará tóxico ya que el albendazol escasamente llega a producir efectos secundarios considerables y que sólo por precaución se limita su uso en pacientes con sospecha de embarazo.⁵⁵

7. CONCLUSIONES

1.- Del experimento de unión con las tres tubulinas se encontró que el tipo de unión que sigue la formación del complejo albendazol-tubulina corresponde para un modelo de unión específico para un solo sitio, y que ésta unión fue mayor en la tubulina de origen parasitario, según se muestra en los siguientes valores de B_{max} :

$$B_{max} \text{ Ascaris} > B_{max} \text{ Giardia} > B_{max} \text{ rata.}$$

2301 pmol/mg 1314 pmol/mg 803 pmol/mg

Esto nos quiere decir que en sus sitios de unión, la tubulina de origen parasitario es capaz de incorporar estequiométricamente más moléculas de albendazol en comparación con la tubulina de origen mamífero.

2.- Del análisis de las constantes obtenidas K_d , K_a y C_{mineq} para cada modelo en estudio podemos ordenar la afinidad de las tubulinas por el albendazol en forma creciente de la siguiente manera:

- Tubulina de cerebro de rata: $K_d = 15.144$, $K_a = 0.066$ y $C_{mineq} = 0.302$.
- Tubulina de *Giardia lamblia*: $K_d = 12.307$, $K_a = 0.0812$ y $C_{mineq} = 0.118$.
- Tubulina de *Ascaris suum*: $K_d = 8.38$, $K_a = 0.119$ y $C_{mineq} = 0.0308$.

La tubulina de ambos parásitos presentan mayor afinidad por el albendazol ya que sus valores de K_d son menores⁴³ en relación a la tubulina de rata. Los valores obtenidos de C_{mineq} respaldan este punto ya que al haber una mayor afinidad, se requiere una menor concentración de ligando para alcanzar el equilibrio.

3.- El hecho de que las tubulinas de origen parasitario en este estudio, unen mayoritariamente al albendazol en relación a la tubulina de origen mamífero es consecuencia de que las primeras pueden incorporar estequiométricamente más moléculas de albendazol en sus sitios de unión, y que además presentan una mayor afinidad por este ligando.

4.- En este trabajo de tesis se encontró que entre los dos parásitos estudiados, la tubulina de *Ascaris suum* presenta una mayor unión y afinidad por el albendazol en comparación con la tubulina de *Giardia lamblia*.

5.- A pesar de que también se observó que el albendazol llega a unirse a la tubulina de los organismos mamíferos, aunque en menor cantidad, hay que considerar que estos experimentos se hacen *in vitro*. En la vida real tanto el hombre como los animales domésticos contamos con enzimas de tipo oxidativas como la FMO y las P-450 las cuales pueden inactivar rápidamente a aquellas moléculas de albendazol que pudiesen entrar a las células,³⁹ y en contraste con parásitos como *Giardia lamblia* la existencia de estas enzimas aun no se ha comprobado. En lo que respecta a los helmintos aunque pudiesen estar presentes estas enzimas, la acción del albendazol sería más rápida ya que estos organismos presentan un volumen corporal menor.

6.- En base a los resultados de unión de las tubulinas estudiadas con el albendazol, y de las constantes que se obtuvieron, se puede concluir que estos hechos soportan la hipótesis planteada; ya que se puede afirmar que: el valor quimioterapéutico del albendazol se debe a su toxicidad selectiva, la cual se traduce en una selectividad preferencial que la tubulina de los organismos parásitos (como helmintos y *Giardia lamblia*) exhiben por el albendazol, en comparación con el hombre y los animales domésticos en donde la toxicidad prácticamente es nula y su uso quimioterapéutico solamente se restringe cuando se sospecha de embarazo.^{53,55}

8. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Cox F.E.G. *Modern Parasitology. A Textbook of Parasitology. Blackwell Scientific Publications LTD. 1982; pp. 34-82.*
- 2.- Horton R.J. Benzimidazoles in a Wormy World. *Parasitology Today. 1990; Vol 6(4); pp. 106.*
- 3.- Tay Z. J, Lara A. R, Velasco C. O. & Gutiérrez Q. M.. *Parasitología Médica. Méndez Editores S.A de C.V. 1998; pp. 27, 73, 294.*
- 4.- Silva N, Guyatt H. & Bundy D. Anthelmintics. A Comparative Review of Their Clinical Pharmacology. *Drugs. 1997; 53(5): pp. 769-788.*
- 5.- Reynoldson J.A. Thompson R.C.A. & Horton R.J. Albendazole as a Future Antigiardial Agent. *Parasitology Today. 1992; Vol 8(12): pp. 412-414.*
- 6.- Reynoldson J.A. Thompson R.C.A. & Meloni B.P. The Mode of Action of Benzimidazoles Against *Giardia lamblia* and Their Chemotherapeutic Potential Against *Giardia* and Other Parasitic Protozoa. *Biochemical Protozoology. 1991; pp. 587-593.*
- 7.- Kenneth S. W, Bowers Z.J. *Parasitology. A Global Perspective. Springer-Verlag. 1983; pp. 45-57.*
- 8.- Rodney D.A. The Biology of *Giardia spp.* *Microbiological Reviews, American Society for Microbiology. 1991; Vol 55(4): pp. 706-732.*
- 9.- Chávez B, Cedillo R.R. & Martínez P.A. *Giardia lamblia*: Ultrastructural Study of the In Vitro Effect of Benzimidazoles. *Journal Protozoology 1992; Vol 39(4): pp. 510-515.*
- 10.- Cedillo R. R. & Muñoz O. In-Vitro Susceptibility of *Giardia lamblia* to Albendazole, Mebendazole and Other Chemotherapeutic Agents. *Journal Medicinal Microbiology. The Pathological Society of Great Britain and Ireland. 1992; Vol 37: pp. 221-224.*

- 11.- Meloni B.P, Thompson R.C.A. Reynoldson J.A. & Seville P. Albendazole: A More Effective Antigiardial Agent In Vitro Than Mebendazole or Tinidazole. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **1990**; **84**: pp. 375-379.
- 12.- Edlind T. D, Hang T. L. & Chakraborty P. R. Activity of the Anthelmintic Benzimidazoles Against *Giardia lamblia* In Vitro. *The Journal of Infectious Diseases*. **1990**; **162**: pp. 1408-1411.
- 13.- Upcroft J.A. & Upcroft P. Drug Resistance and *Giardia*. *Parasitology Today*. **1993**; Vol 9(5): pp. 187-190.
- 14.- Ram R, Wise D.S, Wotring L.L, McCall J.W. & Townsend L.B. Synthesis and Biological Activity of Certain Alkyl 5-(Alkoxy-carbonyl)-1H-benzimidazole-2-carbamates and Related Derivatives: A New Class of Potential Antineoplastic and Antifilarial Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1992**; **35**(3): pp. 539-547.
- 15.- Lacey E. Mode of Action of Benzimidazoles. *Parasitology Today*. **1990**; Vol 6(4): pp. 112-115.
- 16.- Lacey E, Snowdon K.L. Eagleson G.K. and Smith E.F. Further Investigations of the Primary Mechanism of Benzimidazole Resistance in *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*. **1987**; Vol 17(8): pp. 1421-1429.
- 17.- Gull K, Dawson P. J, Davis C. & Byard E. H. Protein/Ligand Interactions in Anthelmintic Chemotherapy. Microtubules as Target Organelles for Benzimidazole Anthelmintic Chemotherapy. *Biochemical Society Transactions*. **619th Meeting, Cambridge**. **1986**; **15**: pp. 59-60.
- 18.- Lacey E. Synthesis of Specifically-Labelled Tritiated Benzimidazole Carbamates. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. **1985**; Vol12(9): pp. 893-901.
- 19.- Lubega G. W. & Prichard R. K. Specific Interaction of Benzimidazole Anthelmintics With Tubulin form Developing Stages of Thiabendazole-Susceptible and Resistant *Haemonchus contortus*. *Biochemical Parasitology*. **1991**; Vol 41(1): pp. 93-101.

- 20.- Russell G. J. & Lacey E. Differential Stability of the Benzimidazole (BZ)-Tubulin Complex in BZ- Resistant and BZ- Susceptible Isolates of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal for Parasitology*. **1992**; Vol 22(3): pp. 399-402.
- 21.- Russell G. J, Gill J. H. and Lacey E. Binding of [³H] Benzimidazole Carbamates to Mammalian Brain Tubulin and the Mechanism of Selective Toxicity of the Benzimidazole Anthelmintics. *Biochemical Pharmacology*. **1992**; Vol 43(5): pp. 1095-1100.
- 22.- Cook G.C. Use of Benzimidazole Chemotherapy in Human Helminthiasis: Indications and Efficacy. *Parasitology Today*. **1990**; Vol 6(4): pp. 133- 136.
- 23.- Campbell W.C. Benzimidazoles: Veterinary Uses. *Parasitology Today*. **1990**; Vol 6(4): pp. 130- 133.
- 24.- Cortés Z. R. Análisis Viscosométrico del Efecto del Albendazol Sobre la Polimerización de Tubulina de Rata. *Tesis de Maestría*. **1995**
- 25.- Lacleste J.P. Guerra G. and Zetina C. Inhibition of Tubulin Polymerization by Mebendazole. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **1980**; Vol 92(2): pp. 417-423.
- 26.- Chávez B, Espinosa-Cantellano M, Cedillo R.R, Ramírez A. & Martínez P.A. Effects of Albendazole on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* Trophozoites. *Archives of Medical Research*. **1992**; Vol 23(2): pp. 63-67.
- 27.- Avila J. Microtubule Dynamics. *The FASEB Journal*. **1990**; Vol 4: pp. 3284-3290.
- 28.- Gelfand V. I. & Bershadsky A. D. Microtubule Dynamics: Mechanism, Regulation and Function. *Annual Review of Cell Biology*. **1991**; 7:93:116. pp. 93-111.
- 29.- Dustin P. Microtúbulos. *Investigación y Ciencia*. **Junio 1991**; pp. 37-48.
- 30.- Lacey E. The Role of the Cytoskeletal Protein, Tubulin, in the Mode of Action and Mechanism of Drug Resistance to Benzimidazoles. *International Journal for Parasitology*. **1988**; Vol 18(7): pp. 885-936.

- 31.- Bergen L. G. & Borisy G. G. Tubulin-Colchicine Complex Inhibits Microtubule Elongation at Both Plus and Minus Ends. *The Journal of Biological Chemistry*. 1983; Vol 258(7): pp. 4190-4194.
- 32.- Sherline P, Bodwin C. K. & Kipnis D. M. A New Colchicine Binding Assay for Tubulin. *Analytical Biochemistry*. 1974; 62: pp. 400-407.
- 33.- Townsend L.B. & Wise D.S. The Synthesis and Chemistry of Certain Anthelmintic Benzimidazoles. *Parasitology Today*. 1990; Vol 6(4): pp. 107-112.
- 34.- Roos M.H. The Molecular Nature of Benzimidazole Resistance in Helminths. *Parasitology Today*. 1990; Vol 6(4): pp. 125-127.
- 35.- Lacey E. & Prichard R. K. Interaction of Benzimidazoles (BZ) With Tubulin from BZ-Sensitive and BZ-Resistant Isolates of *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1986; 19: pp. 171-181.
- 36.- Gill J. H. & Lacey E. The Kinetics of Mebendazole Binding to *Haemonchus contortus* Tubulin. *International Journal of Parasitology*. 1992; Vol 22(7): pp. 939-946.
- 37.- Crossley R. & Holberton D. V. Characterization of Proteins from the Cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *Journal of Cell Science*. 1983; 59: pp. 81-103.
- 38.- Crossley R. & Holberton D. V. Assembly of 2.5 nm Filaments from Giardin, a Protein Associated With Cytoskeletal Microtubules in *Giardia lamblia*. *Journal of Cell Science*. 1985; 78: pp. 205-231.
- 39.- Gottschall D.W, Theodorides V.J. & Wang R. The Metabolism of Benzimidazole Anthelmintics. *Parasitology Today*. 1990; Vol 6(4): pp. 115-124.
- 40.- Waller P.J. Resistance in Nematode Parasites of Livestock to the Benzimidazole Anthelmintics. *Parasitology Today*. 1990; Vol 6(4): pp. 127-129.
- 41.- The Merck Index. Twelfth Edition. *Merck & Co., Inc.* 1996; pp. 39 y 352.
- 42.- Jung H. Medina L. Garcia L. Fuentes I. & Moreno R. Absorption Studies of Albendazole and Some Physicochemical Properties of the Drug and its Metabolite Albendazole Sulphoxide. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1998; 50: pp. 43-48.
- 43.- Motulsky H. *The GraphPad Guide to Analyzing Radioligand Binding Data*. GraphPad Software Inc. 1995-96; pp. 3-6.

- 44.- Choosing or Entering Equations. *Graph Pad Prism*. pp. 313-314.
- 45.- Manjarrez A. N, Luna. C. H, Pérez M. y Soria A. O. Obtención de O-Fenilendiaminas Sustituidas con Cloruro Estanoso en Medios No Acuoso. *Revista de la Sociedad Química de México*. **1986**; Vol 30(2): pp. 52-54.
- 46.- Hernández C. A. Síntesis de Bencimidazoles con Actividad Antihelmíntica Potencial. *Tesis de Maestría*. **1990**
- 47.- Morales Z. N. Estudio Sobre la Síntesis del Albendazol. *Tesis de Maestría*. **1992**
- 48.- Cativiela C, García J.I. Marin A, Valls N. & Elguero J. Molecular Electrostatic Potential-Anthelmintic Activity Relationships of 5H-Mebendazole and Some Related Heterocyclic Carbamates. *Farmaco*. **1989**; 44(7,8): pp. 671-682.
- 49.- SATOH T, MITSUO N, NISHIKI M, NANBA K & SUZUKI S. A New Powerful and Selective Reducing Agent Sodium Borohydride-Palladium Chloride System. *Chemical Letters*. **1981**; pp. 1029-1030.
- 50.- Shelansky M. I. Gaskin F. & Cantor C. R. Microtubule Assembly in the Absence of Added Nucleotides. *Proceeding National Academy of Science USA*. **1973**; 70: pp.765-768.
- 51.- Keister D. B. Axenic Culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 Medium Supplemented with Bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical. Medicine and Hygiene*. **1983**; 77: pp. 487-488.
- 52.- Principles of ECL Detection. *Amersham Life Science ECL Luminol*. pp. 5.
- 53.- Revisión Bibliográfica para el Médico General. *Academia Nacional de Medicina México*. **Junio de 1997**; Vol 2(4): pp. 1-2.
- 54.- Using Microsoft Excel to Calculate Vmax and Km from the v/[A] curve. *Enzyme Kinetics Chapter 2. Excel Curve Fitting*. **1999**; pp. 1-3.
- 55.- Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. *PLM Edición 44 México*. **1998**. pp. 99 y 2103.
- 56.- Dawson P. J. Gutteridge W. E. & Gull K. Purification and Characterisation of Tubulin from Parasitic Nematode, *Ascaridia galli*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **1983**; 7: pp. 267-277.

- 57.- Scudder P. H. Electron flow in Organic Chemistry. *John Wiley & Sons. Inc.* 1992. pp. 82, 138, 143, 152, 155-156.

APENDICES.

I. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.

II. GRAFICAS Y CROMATOGRAMAS.

III. ESPECTROSCOPIA.

1.- INSTRUMENTACION.

- Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin Elmer con transformada de Fourier modelo FT-IR-1600 en pastilla de bromuro de potasio, las señales se dan en cm^{-1} .
- Los espectros de resonancia magnética protónica (RMN^1H) a 300 MHz se obtuvieron en un equipo Varian EM-390, utilizándose dimetilsulfóxido o cloroformo deuterados como disolventes, y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna de cero ppm. Los desplazamientos químicos se dan en ppm.
- Los espectros de masas de impacto electrónico (EI) y de alta resolución, fueron obtenidos en espectrómetro de masas JEOL JMS-SX102A, los picos se reportan en m/z .
- Los puntos de fusión fueron determinados con un equipo Buchi modelo 530 y no están corregidos.
- Para concentrar las soluciones se empleó un rotavapor de la marca Buchi RE 111, con vacío generado por una bomba Felisa modelo 1600 ajustada a 55 cm de Hg y condensador de hielo seco.

2.- CROMATOGRAFIA.

- La cromatografía en capa fina se realizó en placas Silica Gel 60 F-254, con soporte de vidrio de la marca Merck. Para visualizar los compuestos orgánicos se empleó una lámpara de luz ultravioleta UVGL-25 mineral light lamp de 254 a 366 nm. Los sistemas de elución empleados en la cromatografía en capa fina fueron:

APENDICE I. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Sistema	Composición	Proporción
1	Hex: CHCl ₃ : AcOEt	50: 35: 15
2	HEX: AcOEt	95: 5 10 mL+ CH ₃ COOH (1 gota).
3	HEX: AcOEt	85: 15
4	CHCl ₃ : CH ₃ OH	99: 1
5	CHCl ₃ : CH ₃ OH	95: 5 10 mL+ NH ₄ OH (1 gota).
6	CHCl ₃ : CH ₃ OH	98: 2 10 mL+ HCOOH (1 gota).
7	CHCl ₃ : CH ₃ OH	90: 10 10 mL+ NH ₄ OH (1 gota).
8	CHCl ₃ : CH ₃ OH	90: 10

3.- REACTIVOS Y DISOLVENTES.

- Una parte de los reactivos empleados en la parte química así como también la mayoría de los reactivos biológicos y amortiguadores utilizados en la parte biológica, pertenecen a la marca SIGMA-ALDRICH. La otra parte de los reactivos utilizados en la parte química así como también, los disolventes orgánicos y todos los ácidos utilizados pertenecen a las marcas JT BAKER y MALLINCKRODT. El DMSO empleado en la parte biológica fue de SIGMA.
- El [³H]borohidruro de sodio de 75 Ci/mmol, 25mCi/mL utilizado para el tritiado del albendazol fue de la marca Dupont.
- El cloruro de paladio usado como catalizador en el proceso de tritiación del albendazol fue de la marca Aldrich.
- El albendazol utilizado para la ruta sintética No. 3 y para elaborar las curvas patrón fue de la marca SIGMA y el empleado como referencia fue de SmithKline-Beecham.

APENDICE I. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- La identificación de las proteínas se llevó a cabo utilizando suero de cabra anti-ratón acoplado a peroxidasa de Zymed y el reactivo luminol empleado fue de la marca Amersham Life Science.
- Los marcadores de pesos moleculares empleados en la electroforesis de las muestras de tubulina corresponden a Prestained Protein Molecular Weight Standards de GIBCO BRL Life Technologies con un rango de peso molecular de 14,300 a 200,000 Daltons.
- Para el revelado de la película de identificación de proteínas se emplearon fijador y revelador GBX de Kodak.

4.- SOLUCIONES, AMORTIGUADORES Y MEDIO DE CULTIVO.

1.- Preparación del medio de cultivo para *Giardia lamblia*.

A) Componentes del medio de cultivo para *Giardia lamblia*¹⁴.

Volumen total 6 litros.

Componente	Cantidad del componente
Peptona	187.5 g
Glucosa	62.22 g
Cloruro de sodio	12 g
L-Cisteína	12 g
Fosfato de potasio monobásico	6.18 g
Fosfato de potasio dibásico	3.72 g
Acido ascórbico	1.2 g
Citrato férrico	0.138 g
Bilis bovina	4.8 g
Suero de bovino adulto	300 mL
Solución antibiótica 1:50	60 mL

B) Método de preparación de la solución del medio de cultivo para *Giardia lamblia*.

En 4.5 litros de agua purificada (bidestilada y deionizada con una conductividad de 1.7 mhos), se disolvieron uno por uno todos los componentes a excepción de la bilis bovina. La solución obtenida se llevó a un pH de 7.1 con solución de hidróxido de sodio 10 N. Posteriormente, la solución se llevó a un volumen de 5.7 litros con más agua purificada y se distribuyó en 6 botellas de

vidrio Schott Duran de un litro, que ya contenían 35 varillas de vidrio de 15 cms cada una; de tal forma que cada botella contenía 950 mL de la solución preparada. Las 6 botellas se esterilizaron en una olla de presión por calor húmedo por 20 min. A 121°C y 15 lbs/plg² de presión.

C) Solución de bilis de bovino.

Los 4.8 g de bilis de bovino se disolvieron en 60 mL de agua purificada y se esterilizó por filtración a través de un filtro Millipore de 0.25 µm en un portafiltro de 25 mm.

D) Solución antibiótica 1:50.

El contenido de un frasco ampula de Pengesod (1,000,000 U) y de Estreptomaxin (1 g) Lakeside, se disolvió en 4 mL de agua esterilizada. Luego estos 4 mL se llevaron a un volumen final de 250 mL con más agua estéril para hacer una dilución final 1:50.

E) Suero de bovino adulto descomplementado.

Un frasco de 400 mL de suero de bovino adulto Microlab, fue descomplementado al calentarlo en baño de agua a 56°C por una hora.

F) Obtención del medio de cultivo para *Giardia lamblia*.

En campana de flujo laminar de aire filtrado y con las botellas de la solución del medio de cultivo a temperatura ambiente, se agregaron a cada una de ellas 50 mL de suero de bovino adulto, 10 mL de la solución de bilis de bovino y 10 mL de la solución antibiótica 1:50. Finalmente las botellas se cerraron y se homogeneizaron lentamente con rotación manual para obtenerse así 6 litros de medio de cultivo selectivo para *Giardia lamblia*.

2.- Solución amortiguador RB.

- MES 100 mM
- EGTA 1Mm
- MgSO₄ 1mM

APENDICE I. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- pH= 6.8 ajustado con hidróxido de sodio 10 N.

3.- Solución amortiguador MM.

- MES 100 mM
- $MgSO_4$ 1mM
- pH= 6.7 ajustado con hidróxido de sodio 10 N.

4.- Solución amortiguador PEM.

- PIPES 100 mM
- EGTA 1Mm
- $MgSO_4$ 1mM
- pH= 6.9 ajustado con hidróxido de sodio 10 N.

5.- Solución amortiguador PM.

- PIPES 100 mM
- $MgSO_4$ 1mM
- pH= 6.9 ajustado con hidróxido de sodio 10 N.

6.- Solución amortiguador PBS.

- NaH_2PO_4 0.23 g.
- $NaHPO_4$ 1.15 g.
- NaCl 9 g.
- Agua purificada 1,000 mL
- pH= de 7.2 a 7.4

7.- Solución amortiguador de corrida 10X

- Tris base 30 g.
- Glicina 144 g.
- SDS 20 % 50 mL.
- EDTA 0.2 M 40 mL.
- Agua purificada 1000 mL.
- pH 8.3

8.- Solución amortiguador de muestra 2X.

- 4X Tris-Cl/SDS pH 6.8 25 mL.
- Glicerol 20 mL.

APENDICE I. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- SDS 4 g.
- 2-Mercaptoetanol 2 mL.
- Azul de bromofenol 1 mg
- Agua cbp 100 mL.

9.- Solución amortiguador de transferencia.

- Tris base 30.2 g.
- Glicina 144.2 g.
- Agua 1800 mL.
- Ajustar pH de 8.3 con más glicina.
- Agua cbp 2000 mL.

10.- Solución de azul de Coomasie.

- Metanol 100 mL.
- Acido acético 10 mL.
- Azul brillante de Coomasie 250 mg.
- Agua cbp 100 mL.

11.- Solución desteñidora.

- Metanol 150 mL.
- Acido acético 300 mL.
- Agua cbp 3000 mL.

12.- Reactivo de Bradford 5X.

- Azul de Coomasie G-250 250 mg.
- Etanol absoluto 125 mL.
- Acido ortofosfórico al 85% 250 mL.
- Agua cbp 500 mL.

13.- Gel Separador 10%.

- Acrilamida 30% / bisacrilamida 0.8% 10 mL.
- Tris.Cl 4X/SDS, pH 8.8 7.5 mL.
- Agua 12.5 mL.
- Tetrametilendiamina 20 μ L.
- APS 10% 100 μ L.

APENDICE I. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

14.- Gel Concentrador.

- Acrilamida 30%/bisacrilamida 0.8% 1.3 mL.
- Tris.Cl 4X/SDS, pH 6.8 7.5 mL.
- Agua 7.1 mL.
- Tetrametilendiamina 10 μ L.
- APS 10% 50 μ L.

15.- Rojo de Ponceau.

- Rojo de Ponceau al 0.5% en ácido acético al 2%.

16.- Solución de leche descremada 5%.

- Leche descremada en polvo 5 g.
- PBS-Tween 0.05% cbp 100 mL.

17.- Negro de Amido 0.1%.

- Negro de amido 100 mL.
- Acido acético 10 mL.
- Metanol 10 mL.

5.- EQUIPOS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS EN LA PARTE BIOLÓGICA.

- Para centrifugar las muestras obtenidas durante la fase de aislamiento de las tubulinas se emplearon los siguientes equipos:

1.- Centrifuga Sorvall RC-5B. Dupont Instruments.

2.- Centrifuga Sorvall RC-5. Dupont Instruments.

3.- Centrifuga Sorvall RC-3B. Dupont Instruments.

4.- Ultracentrifuga Beckman L5-50.

5.- La centrifugación de los tubos eppendorf de 1.5 mL que fueron en el experimento de unión, se llevaron a cabo en una centrifuga Eppendorf 5804 R para 30 tubos.

- La homogeneización del material biológico fresco se realizó en los siguientes equipos:

APENDICE I. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

1.- Homogeneizador Tekmar, utilizado para la preparación de la muestra de tubulina de cerebro de rata.

2.- Licuadora Osterizer pulse matic de 5 velocidades con vaso de vidrio y homogeneizador de tejidos Thomas Phila USA B 353 con pistilo de teflón, se utilizaron en la preparación de la muestra de tubulina de *Ascaris suum*.

- Durante la etapa de aislamiento de la tubulina de *Ascaris suum*, se empleó una bomba peristáltica Rabbit Peristaltic pump de RAININ Instrument, un microfraccionador GILSON modelo FC-80K y un detector GILSON modelo 111.
- Las incubaciones de las muestras y de los medios de cultivo para *Giardia lamblia* se llevaron a cabo en una incubadora Forma Scientific modelo 3185 Water-Jacketed calibrada a 37°C.
- Para la conservación de las diferentes muestras se empleó un ultra refrigerador Forma Scientific modelo calibrado a -80°C.
- Para la medición de pH en la preparación de las soluciones amortiguadoras, se empleó un potenciómetro pH meter 26 Radiometer Copenhagen.
- La concentración de las muestras de *Giardia lamblia* y *Ascaris suum* se llevó a cabo en tubos de diálisis de membrana de celulosa SIGMA utilizando polietilenglicol de la misma marca.
- Las micropipetas que se utilizaron fueron GILSON Pipetman de 10, 20, 200 y 1,000 μL .
- El agitador orbital utilizado fue un Clay Adams Brand NUTATOR modelo 421105 de BECTON DICKINSON.
- La cuantificación proteica se realizó por el método de Bradford en placas de ELISA leídas en equipo Bio-Rad Microplate Reader 450, empleándose filtro de 595nm.
- La electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% se llevó a cabo en una cámara para electroforesis Bio-Rad modelo "Mini-protean II Cell" empleándose una fuente de poder Buchler 3-1500 a 100 volts.
- La transferencia de los geles de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa (blot), se llevó a cabo en una cámara de transferencia semi seca Bio-Rad modelo

IMM-1, empleándose una fuente de poder Microblot a 200 mA y papel de nitrocelulosa Bio-Rad Trans-blot de 0.45 μm de poro de la marca SIGMA.

- El revelado para la identificación de las muestras de tubulina se llevó a cabo en Cassette de exposición modelo X-omatic de Kodak, con película radiográfica Kodak X-omat.
- Para el análisis densitométrico se llevó a cabo el scan del gel de poliacrilamida (conteniendo las tres muestras de tubulina) en un equipo EAGLE EYE II STRATAGENE modelo EE II still video. La estimación de la pureza de las muestras de tubulina se realizó a través del programa "Sigma-Gel" Jandel Scientific Versión 1 1994-1995, en un equipo de computo Compaq con procesador Pentium II y 128 MB en RAM.

6.- PARTE RADIOLOGICA.

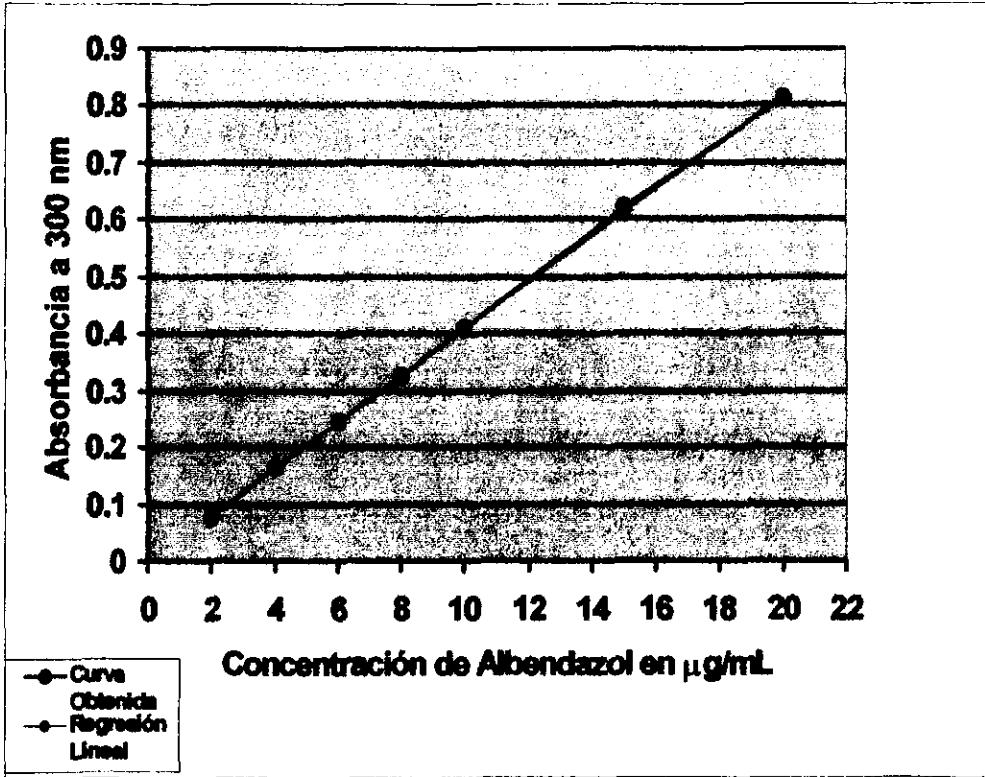
- El barrido espectrofotométrico de UV/Visible de 200 a 500 nm y la curva patrón de albendazol; así como la cuantificación espectrofotométrica del [^3H]albendazol, se llevaron a cabo con un espectrofotómetro Beckman DU-68 utilizándose celdas de cuarzo de un centímetro de paso de luz.
- La determinación de la pureza de la muestra de [^3H]albendazol se realizó en un equipo de HPLC Beckman System Gold con inyección manual "Rheodyne" y loop de 20 μL , equipado con dos bombas binarias modelo 126, detector de UV modelo 166 y una columna Phenomenex Spherisorb 5 ODS (1) de 125 mm x 4.6 mm.
- La determinación de la actividad específica del [^3H]albendazol, así como las mediciones radiológicas en los experimentos de unión, se llevaron a cabo en un *Contador de Centelleo Beckman modelo LS-6000SC*, empleándose los estándares: de tritio con 104845 dpm y el blanco de la marca Beckman. El cocktail de liquido de centelleo utilizado fue Insta-Gel de la marca Packard.
- El cálculo de las constantes de los experimentos de unión se realizó a través del programa Excel curve fitting empleándose la versión Microsoft Excel 2000 y

APENDICE I. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

la herramienta "Solver", en un equipo de computo Compaq con procesador Pentium II y 128 MB en RAM.

1.- GRAFICA DE LA CURVA PATRON DE ALBENDAZOL POR ESPECTROFOTOMETRIA.

Absorbancia a 300 nm Vs. Concentracion de Albendazol en $\mu\text{g/mL}$.



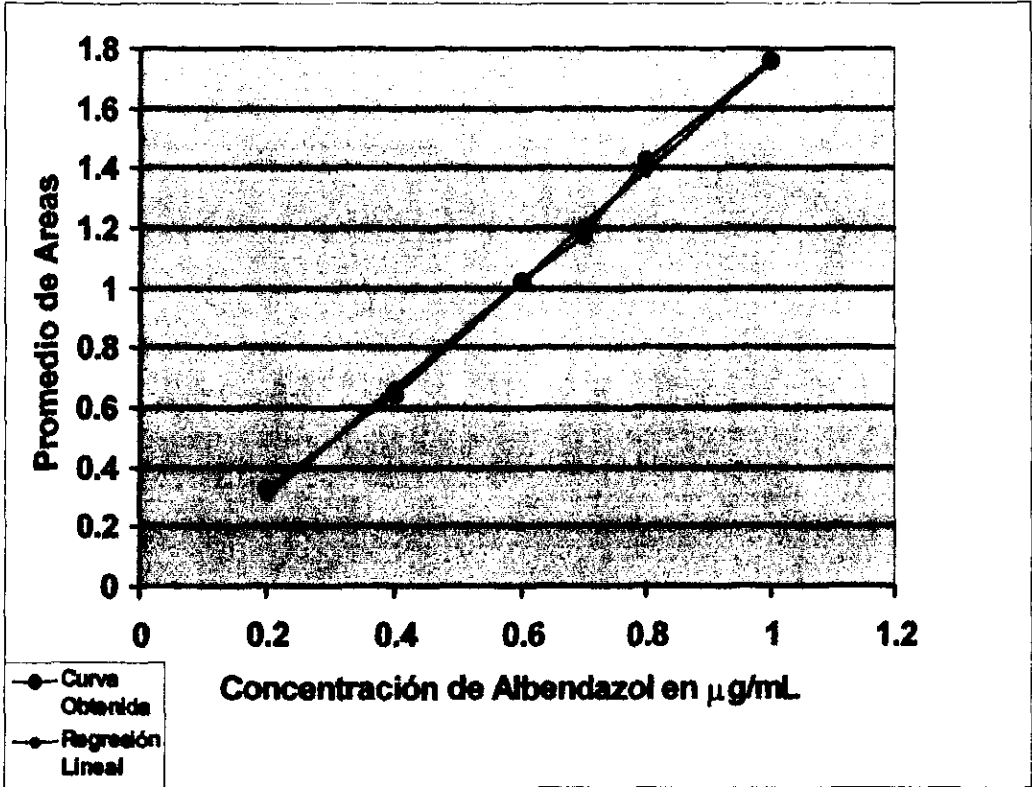
Datos de la regresión lineal de la curva:

Concentración de Albendazol en $\mu\text{g/mL}$ vs. Absorbancia a 300 nm:

- $b = 0.00085$
- $m = 0.04095$
- $r = 0.99985$.

2.- GRAFICA DE LA CURVA PATRON DE ALBENDAZOL POR HPLC.

Promedio de Areas Vs. Concentracion de Albendazol en $\mu\text{g/mL}$.

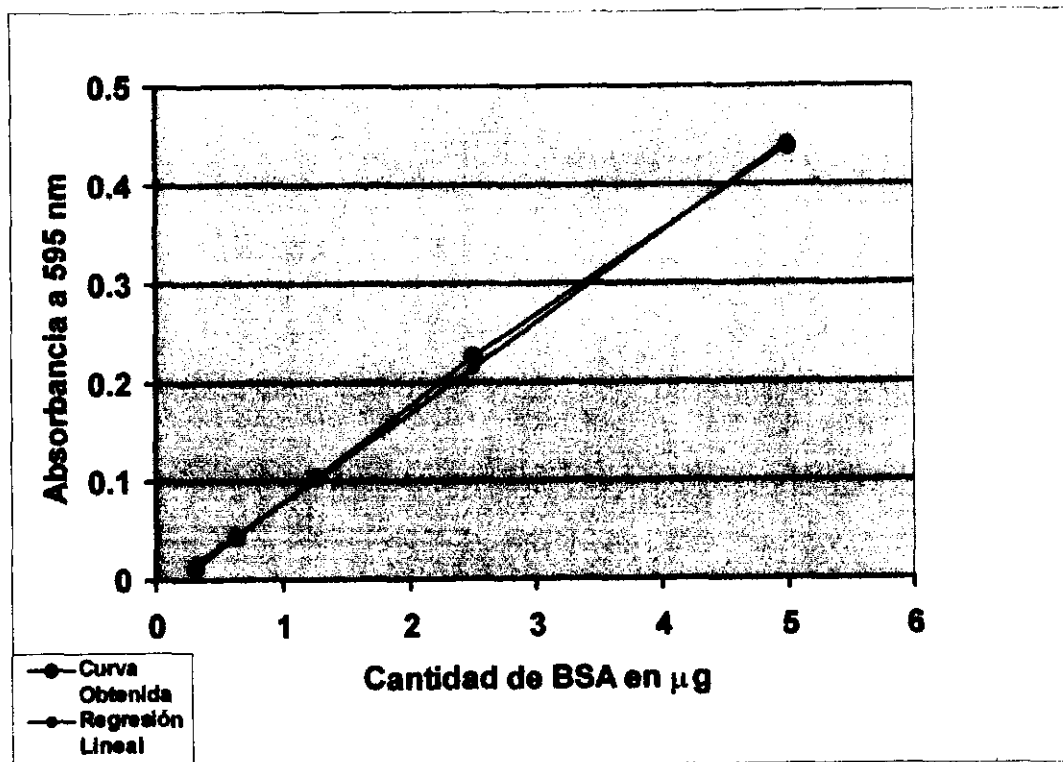


Datos de la regresión lineal de la curva:
 Concentración en $\mu\text{g/mL}$ vs. Promedio de Areas.

- $b = -0.058598$
- $m = 1.8128$
- $r = 0.99858$

3.- GRAFICA DE LA CURVA PATRON DE BSA POR ESPECTROFOTOMETRIA.

Absorbancia a 595 nm Vs. Cantidad de BSA en μg .

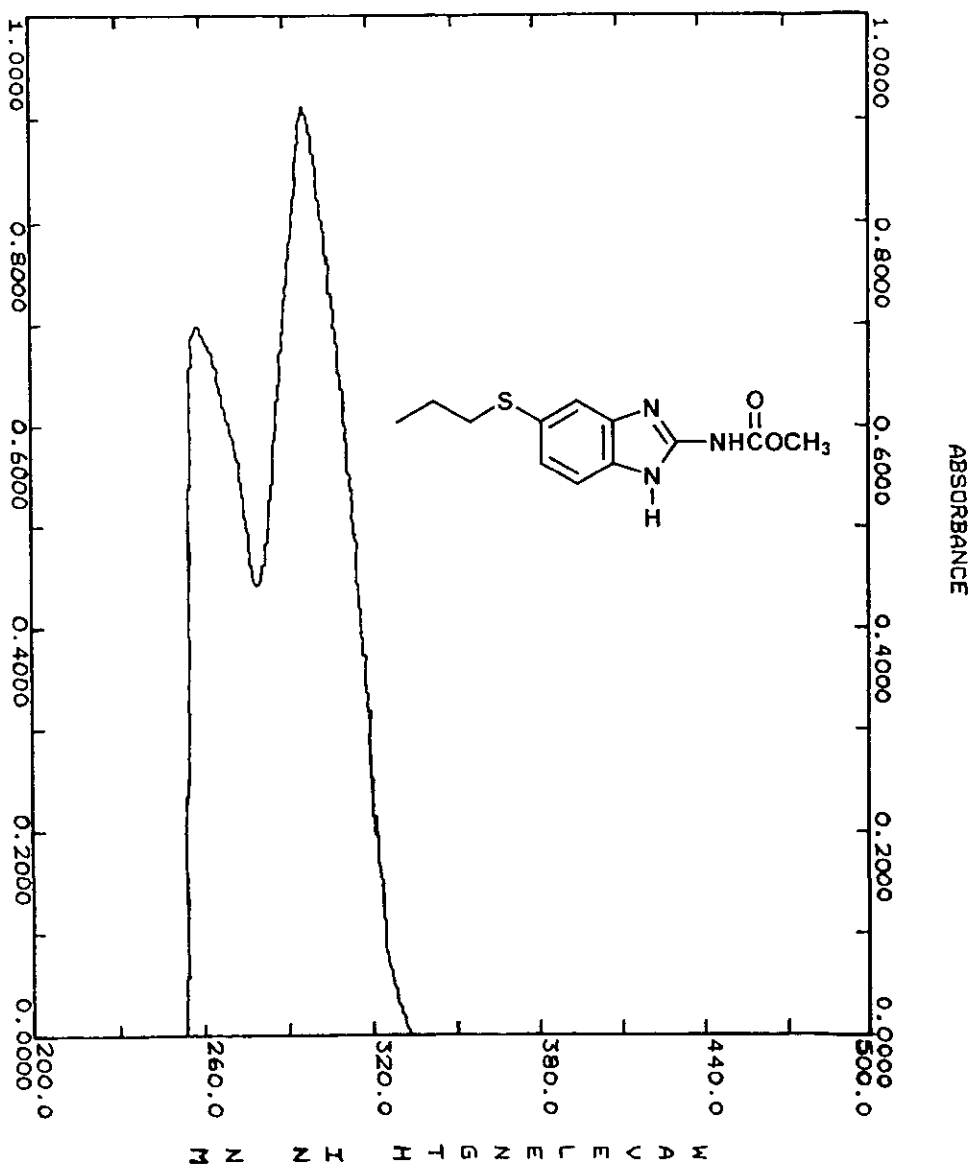


Datos de la regresión lineal de la curva:

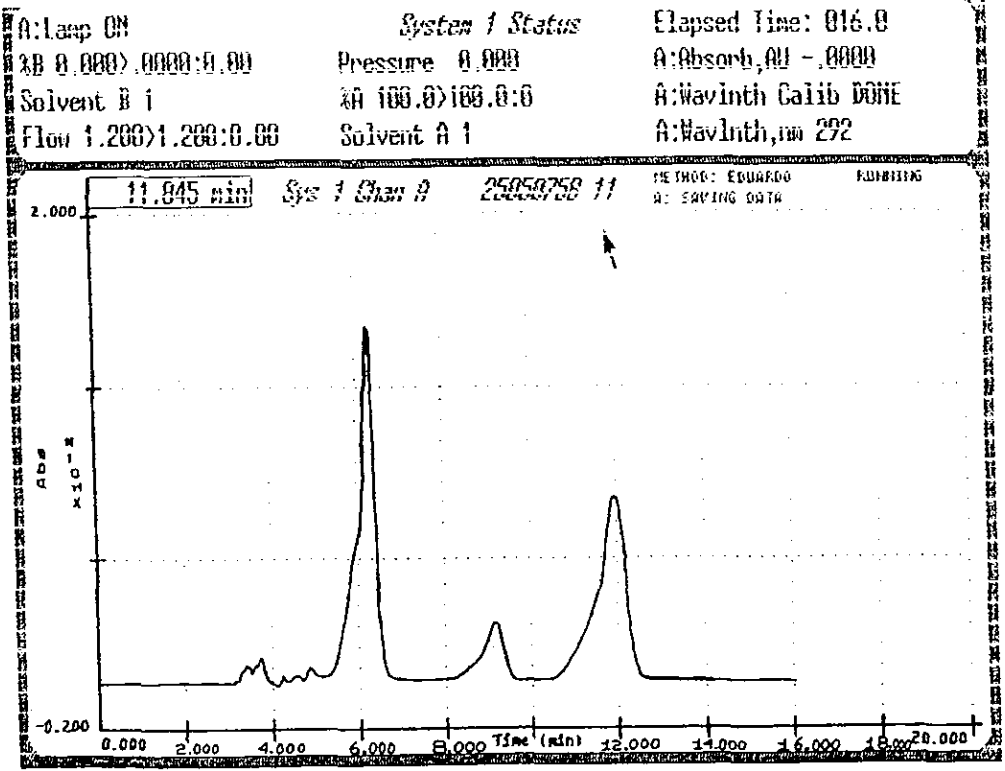
Cantidad de BSA en μg vs. Absorbancia a 595 nm:

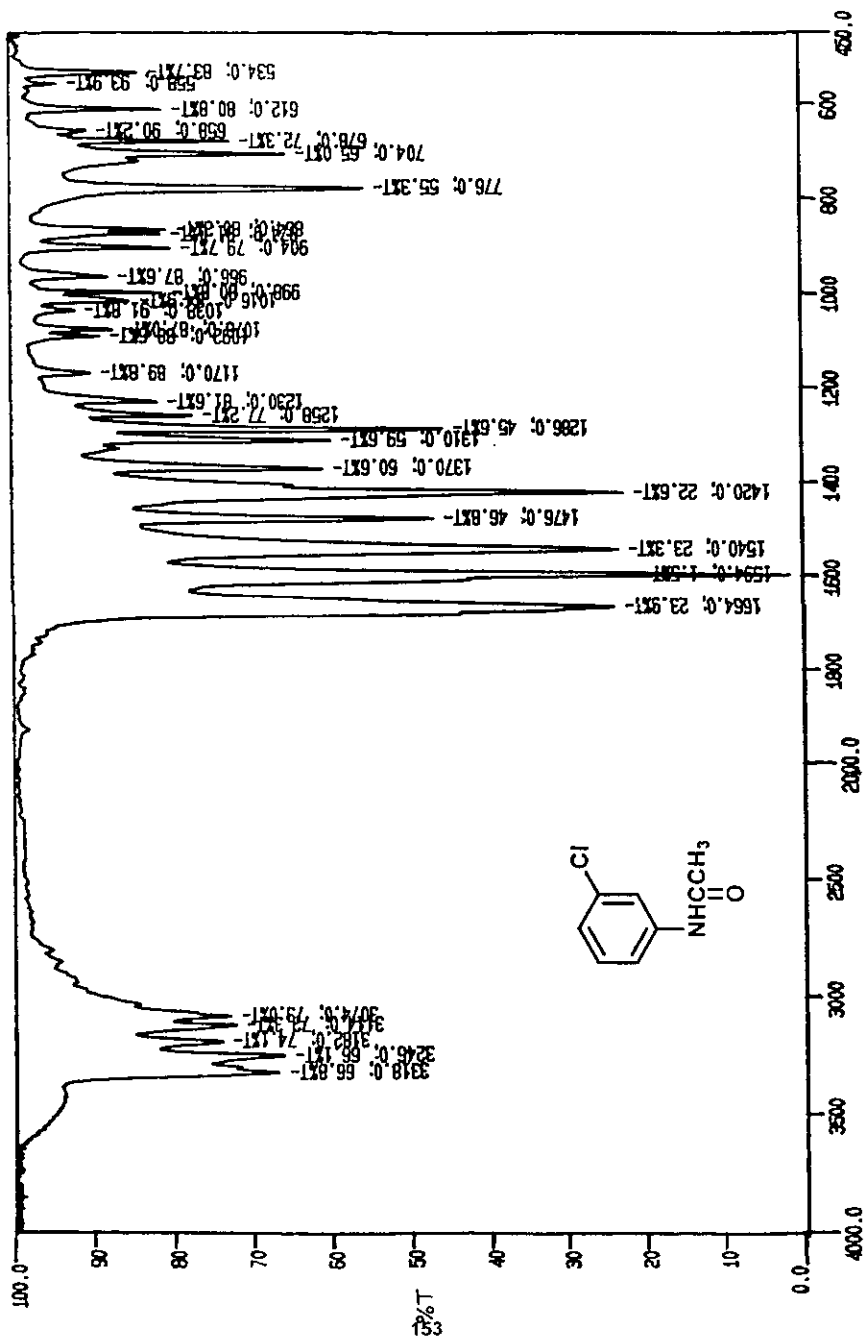
- $b = -0.011939$
- $m = 0.091018$
- $r = 0.9992829$

4.- CROMATOGRAMA EN BARRIDO DE UV/VISIBLE PARA EL ALBENDAZOL
EN DMSO DE 200 A 500 nm.



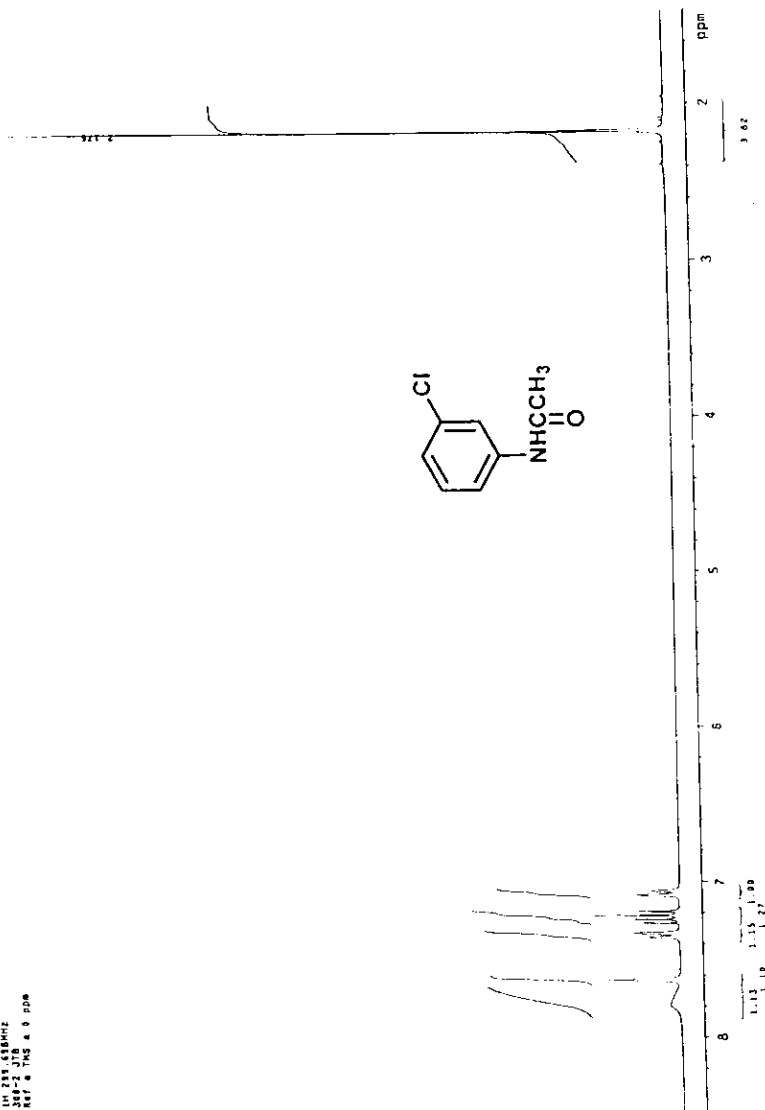
5.- CROMATOGRAMA DEL ANALISIS POR HPLC DE LA SOLUCION DE TRITIO-ALBENDAZOL.





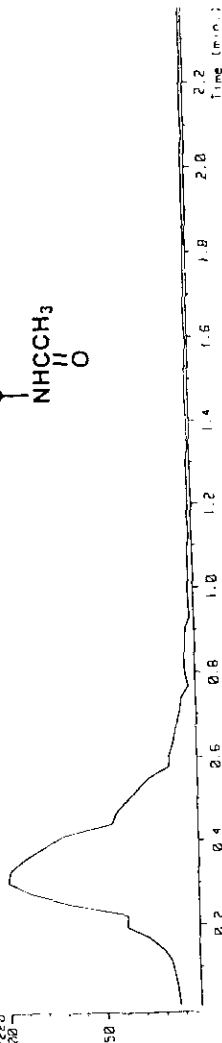
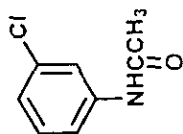
CH-1
ESPECTRO No. 1 IR (KBr) DE LA 3-CLORO ACETANILIDA.

USA1
 18/oct/77
 Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
 Laboratorio de Química Orgánica
 IN 231 618MHz
 200-2 JMS
 Ref. 0.1Mg & 0.10M

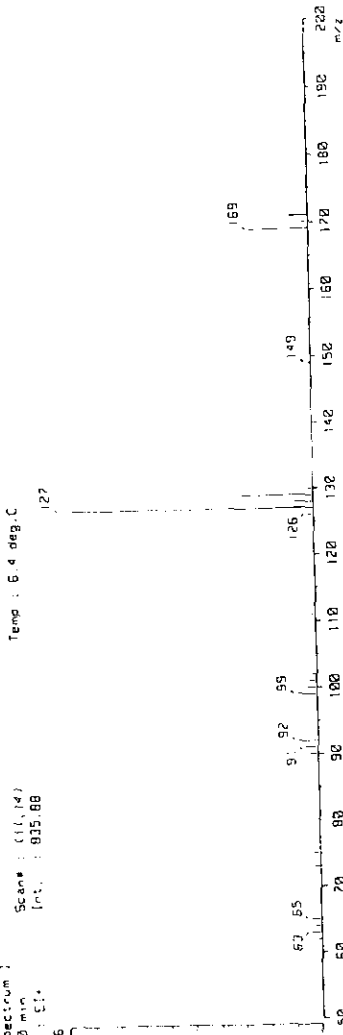


ESPECTRO No. 2 ¹H RMN (300 MHZ) EN CDCl₃ DE LA 3-CLORO ACETANILIDA.

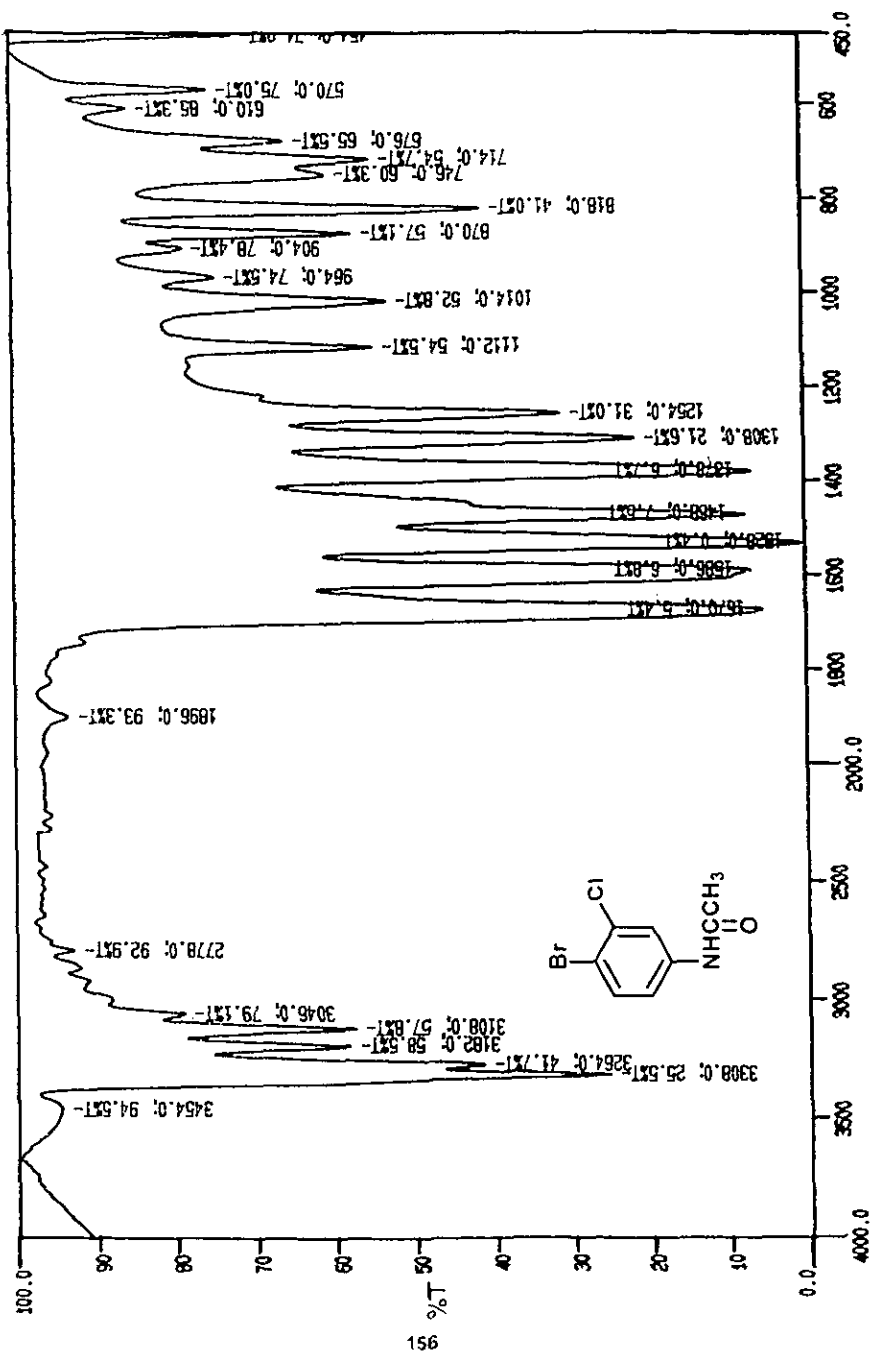
(TIC)
 Date : 11-Aug-97 20:43
 Data : 01126_EPP-00_003
 Sample :
 Note : USP1, Fac. de Quimica, UNPM.
 Inlet : Direct (on mode EI+)
 Ion Species : Normal Ion (M⁺-Linear)
 FIC Range : m/z 50 to 180
 Output RT Range : 0.00 to 2.37 min
 P3752220



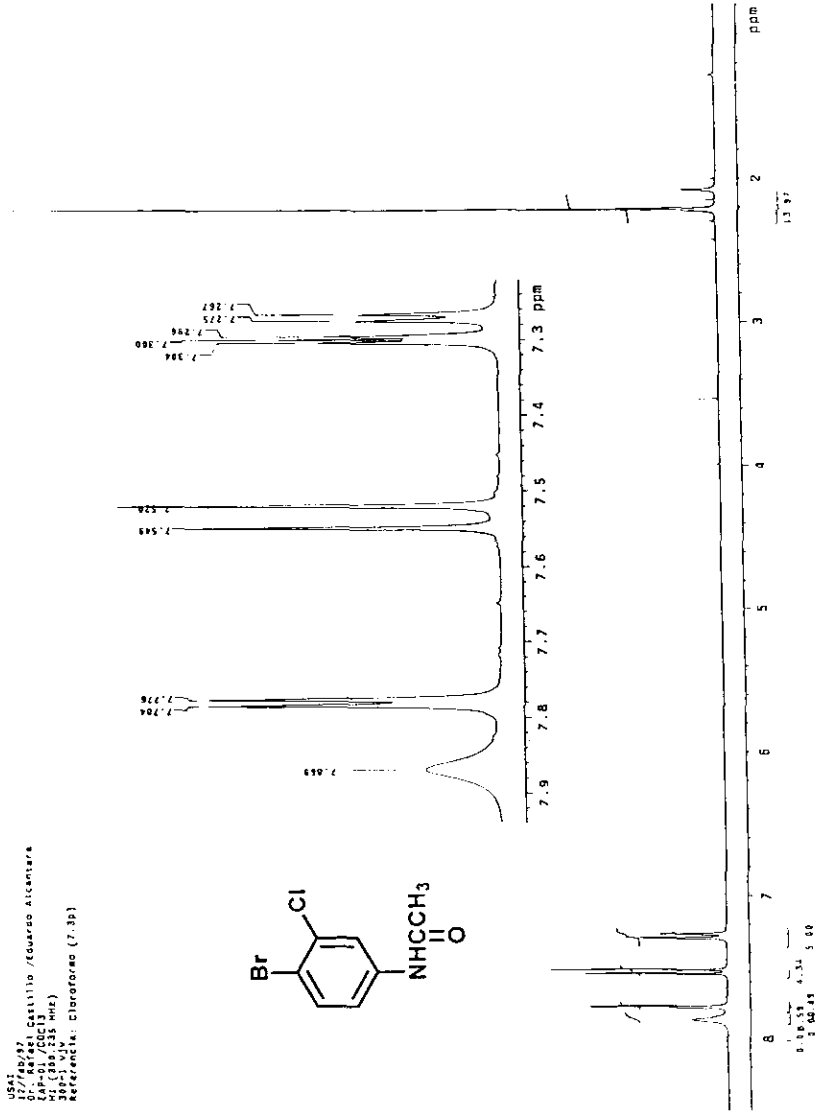
(Mass Spectrum)
 Scan# : (1, 14)
 RT : 0.30 min
 Ion Mode : EI+
 6764796
 180



ESPECTRO No. 3 EM (IE) DE LA 3-CLORO ACETANILIDA.

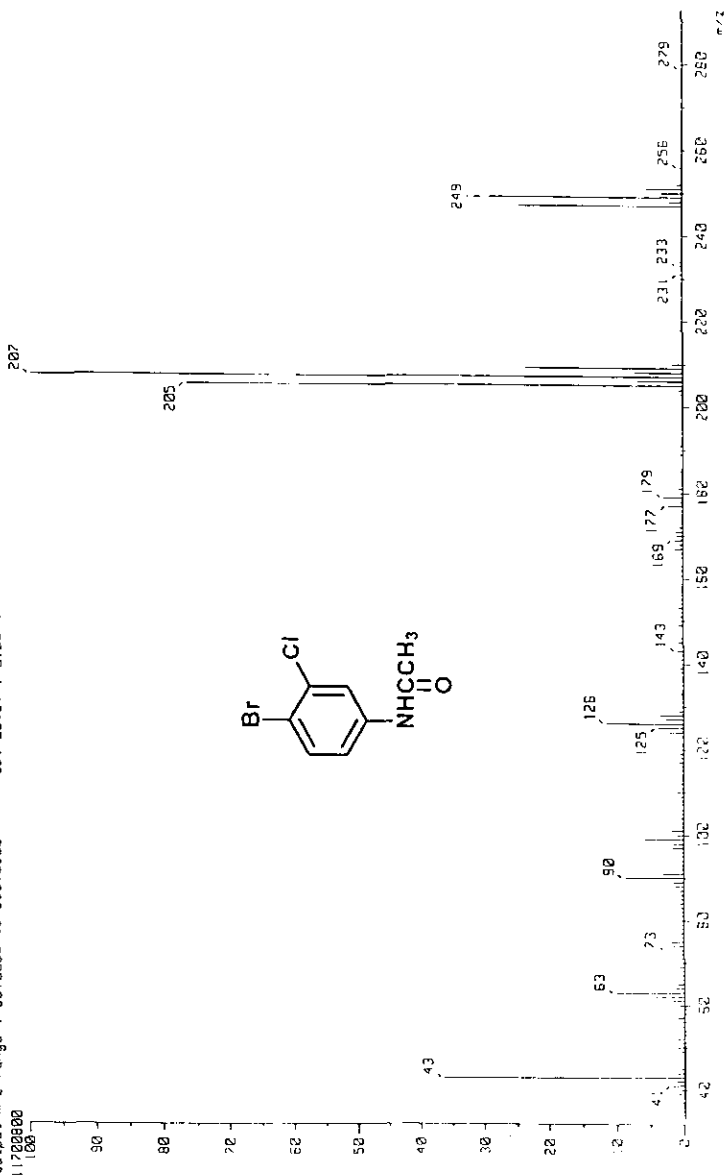


ESPECTRO No. 4 IR (KBr) DE LA 4-BROMO, 3-CLORO ACETANILIDA. CH-1

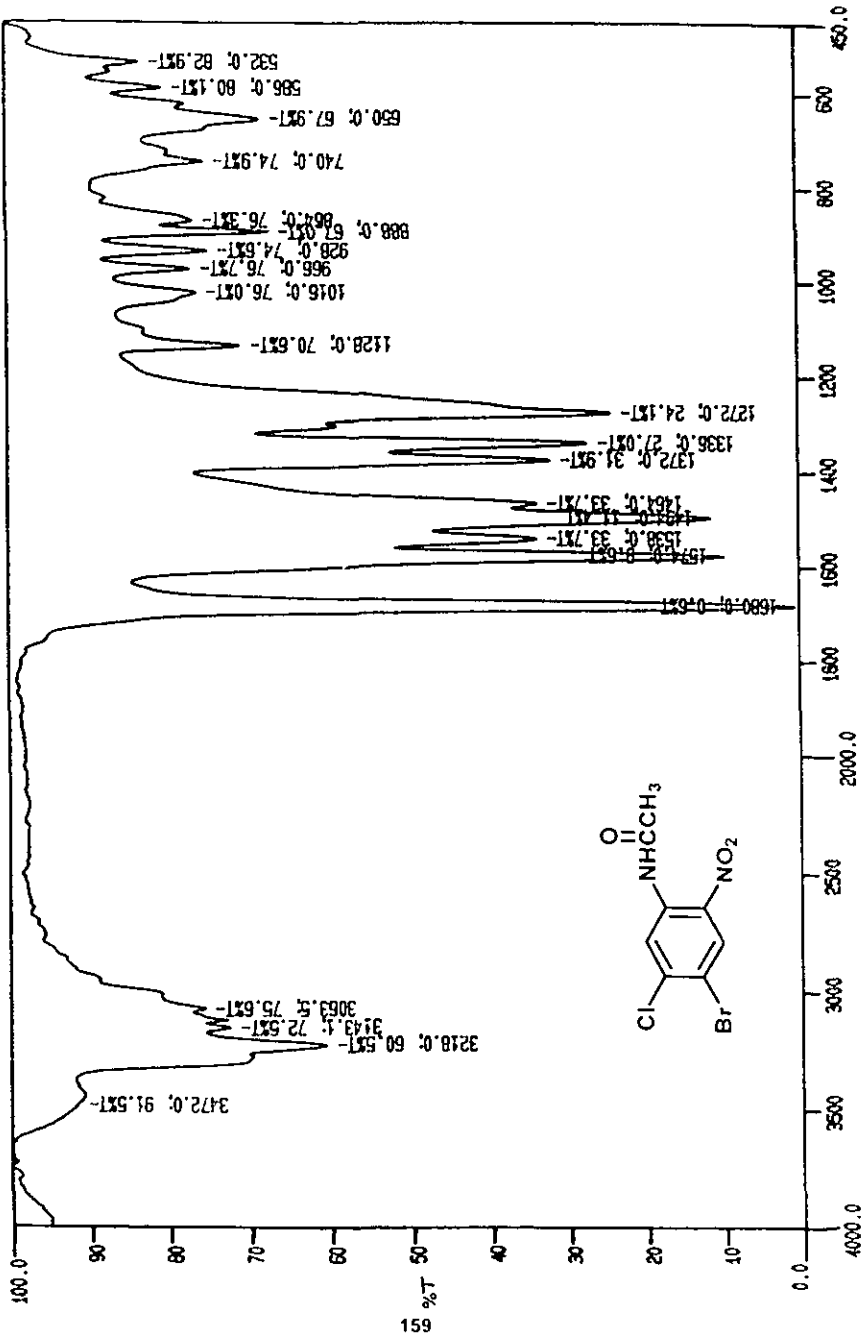


ESPECTRO No. 5 ^1H RMN (300 MHZ) EN CDCl_3 DE LA 4-BROMO, 3-COLORO ACETANILIDA.

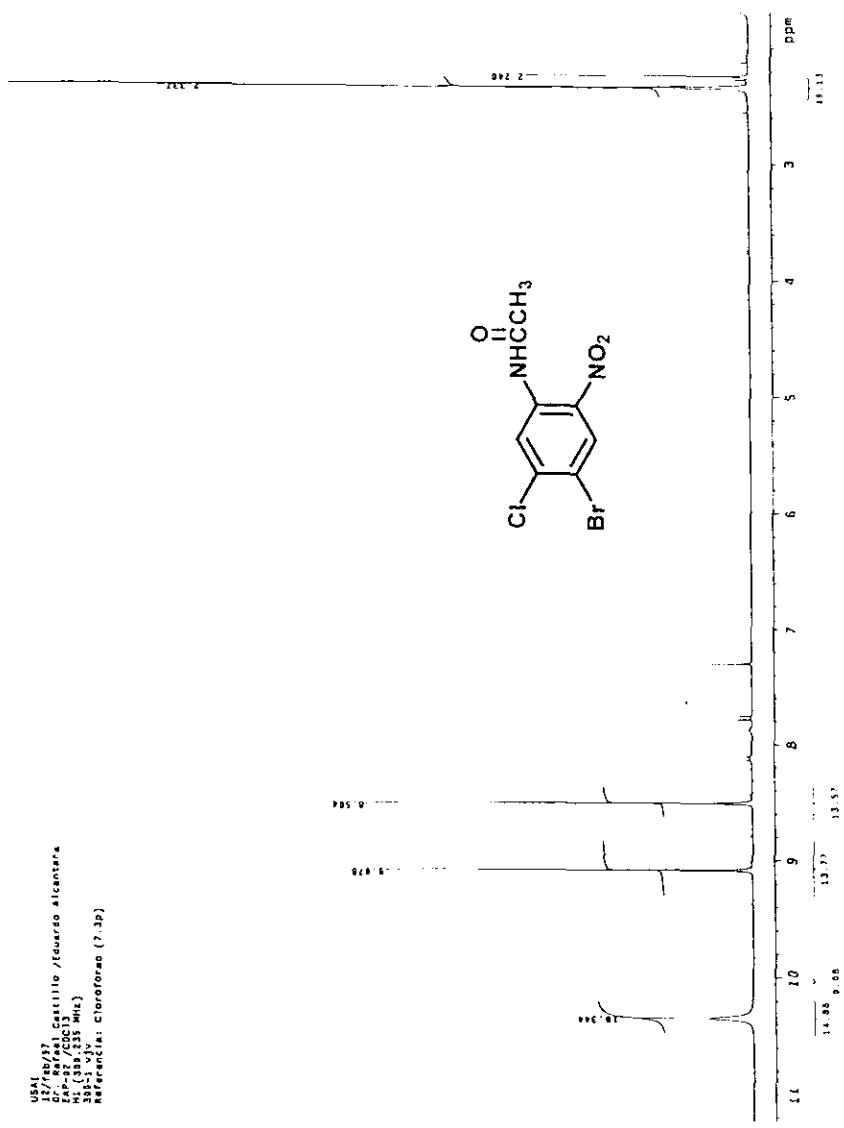
Mass Spectrum :
 Date : 01-Jan-97 14:04
 Data : ERP-01
 Sample : *
 Note : Dr-Rafael Castillo-RXS05
 Inlet : Direct
 Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Regular (MF-Linear)
 Temp : 35.3 deg.C
 RT : 0.62 min Scan# : (16,21)
 BP : m/z 207.0000 Int. : 1115.88
 Output m/z range : 33.0000 to 293.0000
 Cut Level : 0.00 %



ESPECTRO No. 6 EM (IE) DE LA 4-BROMO, 3-CLORO ACETANILIDA.



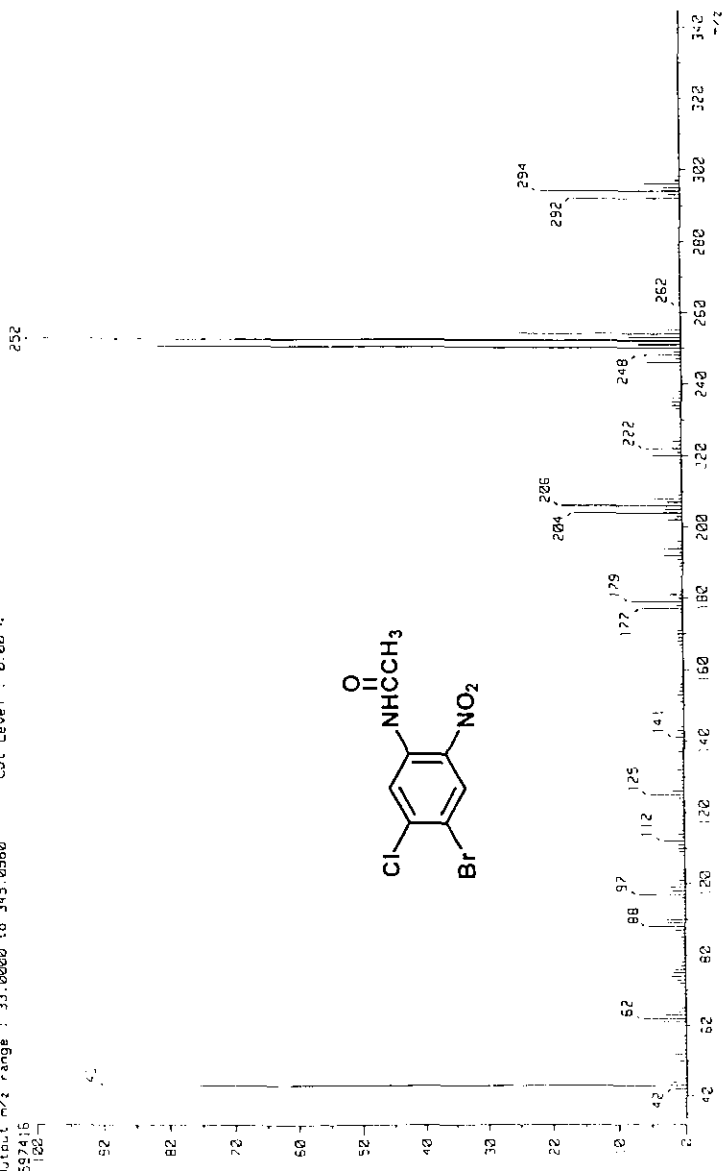
ESPECTRO No. 7 IR (KBr) DE LA 4-BROMO, 5-CLORO, 2-NITRO ACETANILIDA. ^{CH-1}



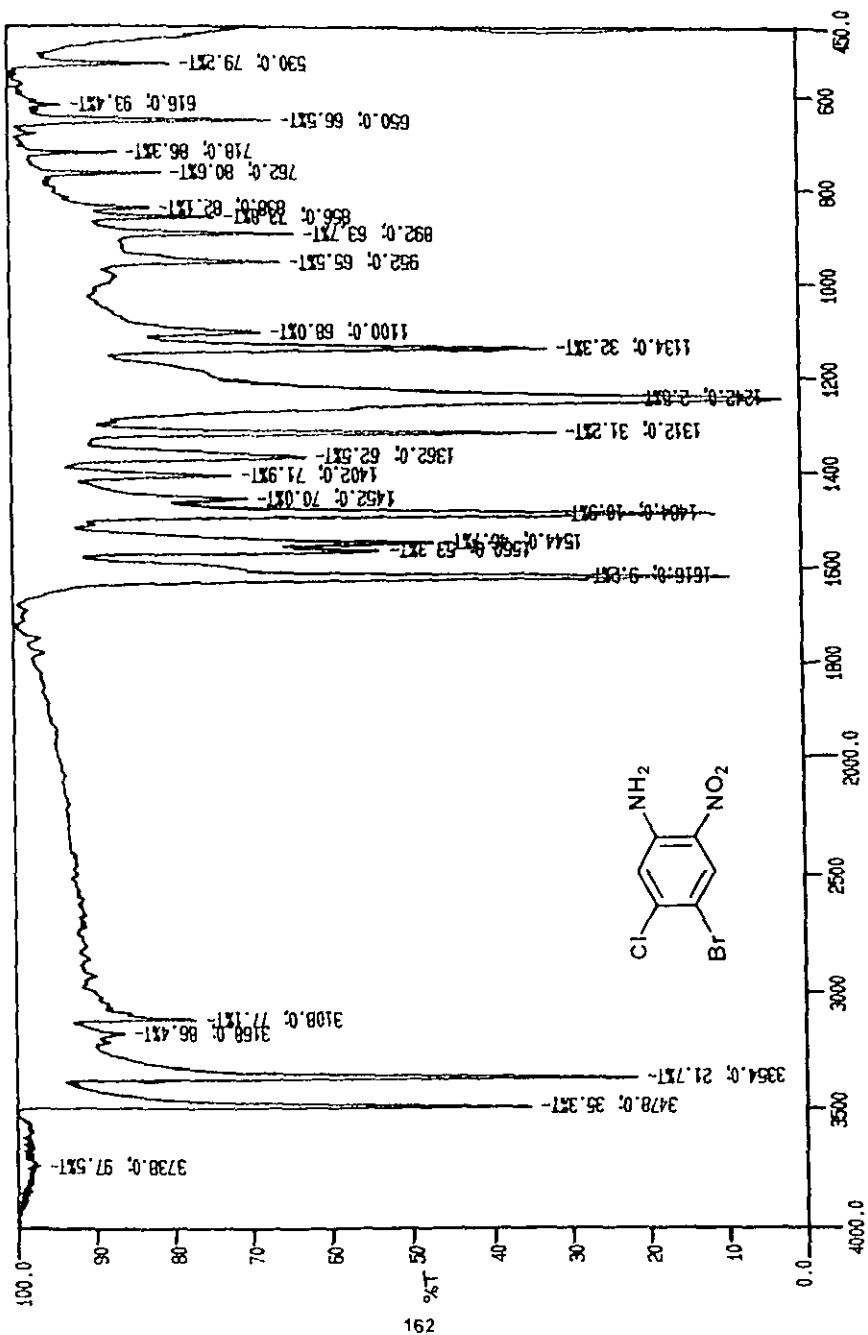
USAF
 DTIC/AF
 Dr. Rafael Castillo /Eduardo Alcantara
 LAP-31 /CDCl₃
 300 MHz
 Referencia: cloroformo (7.26)

ESPECTRO No. 8 ¹H RMN (300 MHZ) EN CDCl₃ DE LA 4-BROMO, 5-CORO, 2-NITRO ACETANILIDA.

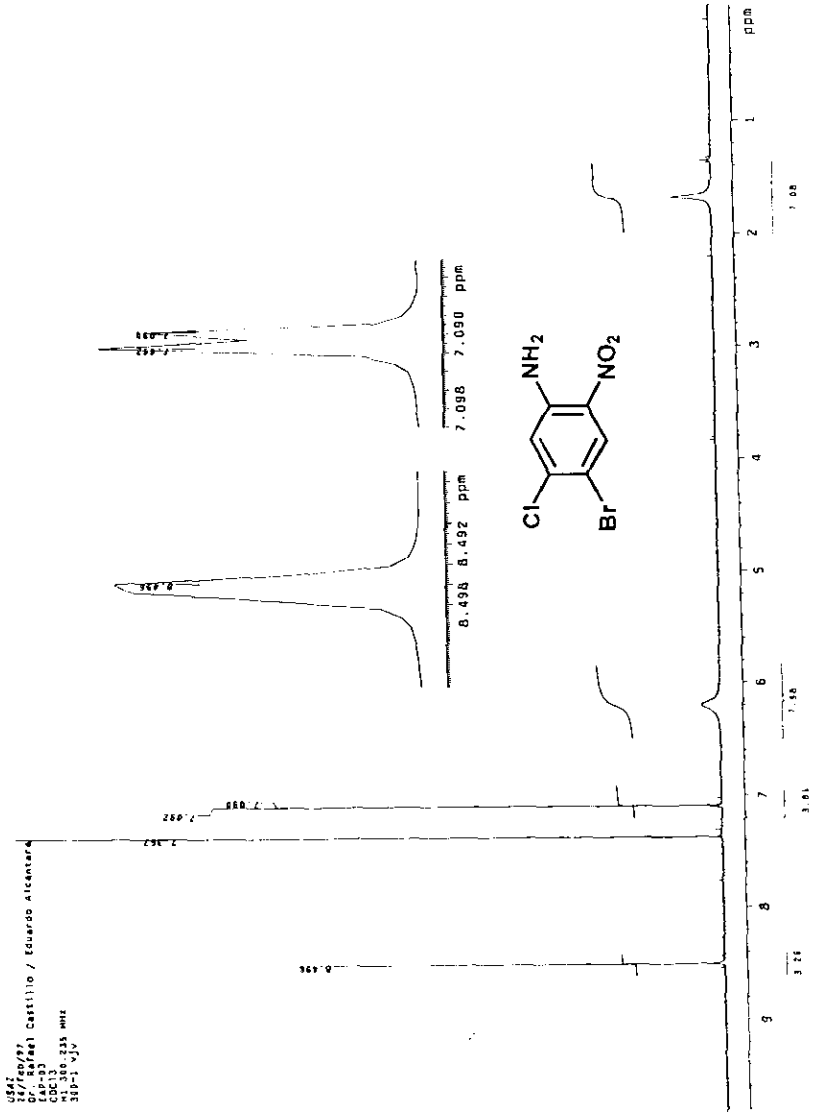
[Mass Spectrum]
 Date : 01-Jan-97 14:08
 Data : ERP-02
 Sample : *
 Note : Dr-Rafael Castillo-RXS05
 Inlet : Direct
 Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Regular (MF-Linear)
 RT : 0.26 min
 Scan# : (5,12)
 BP : m/z 252.0000 Int. : 915.20
 Output m/z range : 33.0000 to 345.0060
 Cut Level : 0.00 %
 592416
 126



ESPECTRO No. 9 EM (IE) DE LA 4-BROMO, 5-CLORO, 2-NITRO ACETANILIDA.

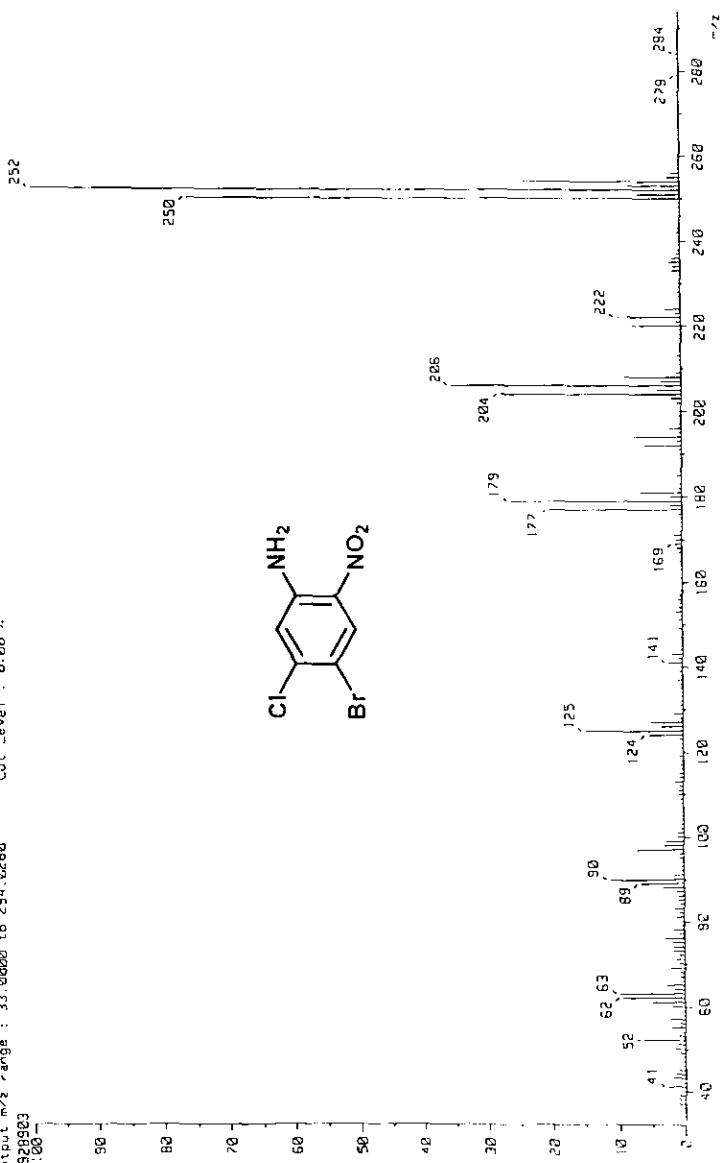
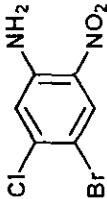


ESPECTRO No. 10 IR (KBr) DE LA 4-BROMO, 5-CLORO, 2-NITRO ANILINA. CH-1

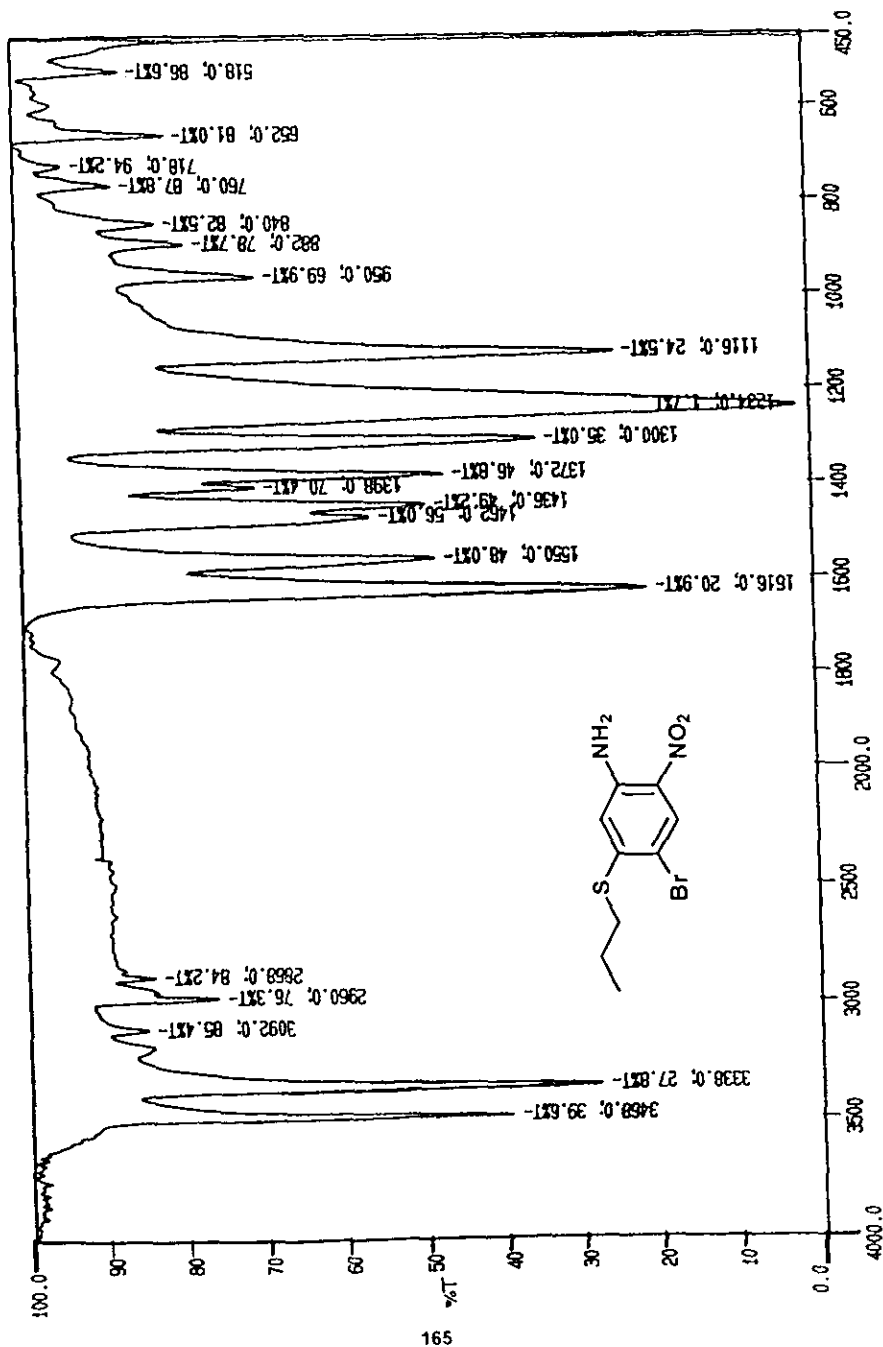


ESPECTRO No. 11 ¹H RMN (300 MHZ) EN CDCl₃ DE LA 4-BROMO, 5-CLORO, 2-NITRO ANILINA.

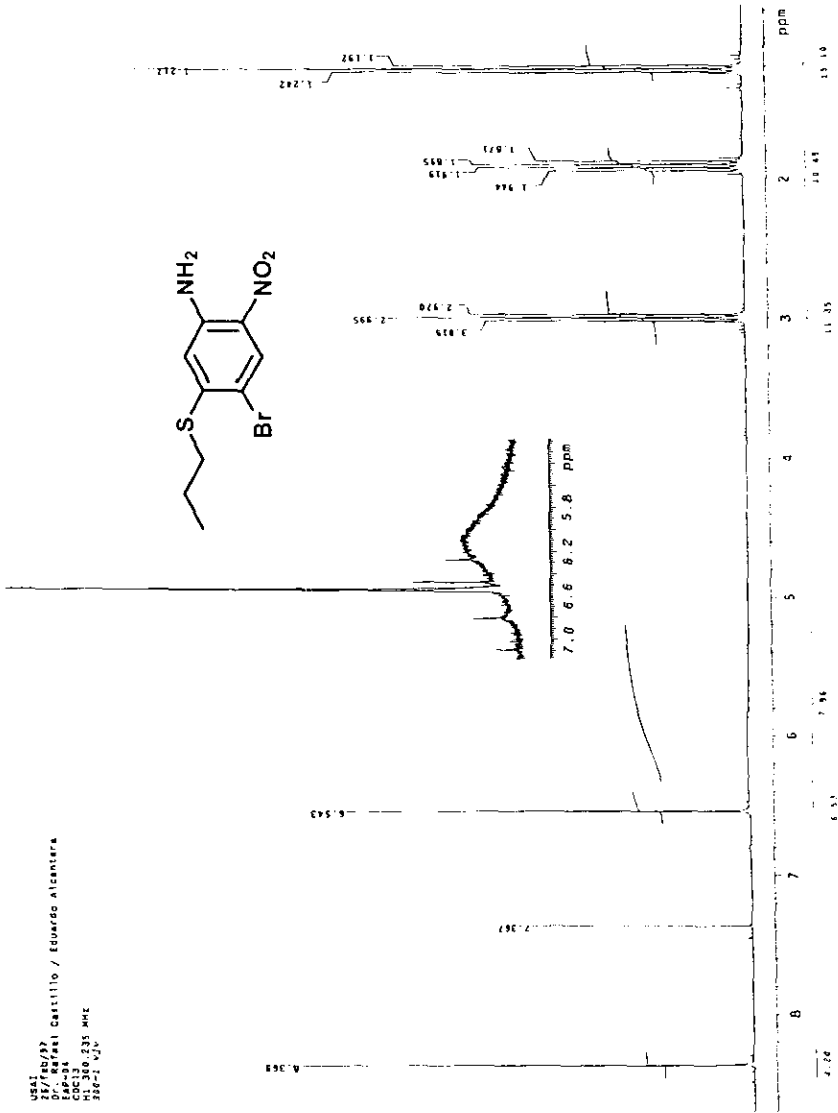
(Mass Spectrum)
 Date : 12-Feb-97 10:46
 Sample : EPP-03
 Note : Dr-Rafael-Castillo-RX505
 Inlet : Reserv.
 Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Regular (MF-Linear)
 Scans : (11,19)
 RT : 2.51 min
 BP : m/z 252.00000 Int. : 1328.36
 Output m/z range : 33.00000 to 294.02600
 Cut Level : 0.00 %
 13928903



ESPECTRO No. 12 EM (IE) DE LA 4-BROMO, 5-CLORO, 2-NITRO ANILINA.



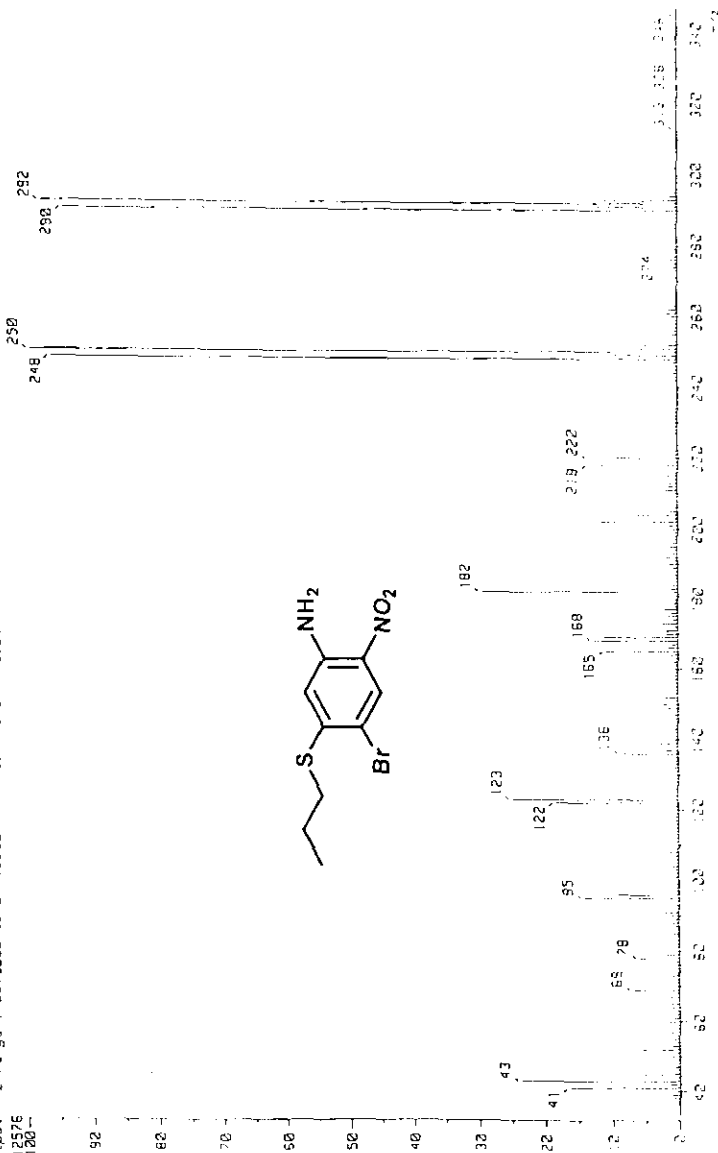
ESPECTRO No. 13 IR (KBr) DE LA 4-BROMO, 2-NITRO, 5-PROPILOTIO ANILINA. CH-1



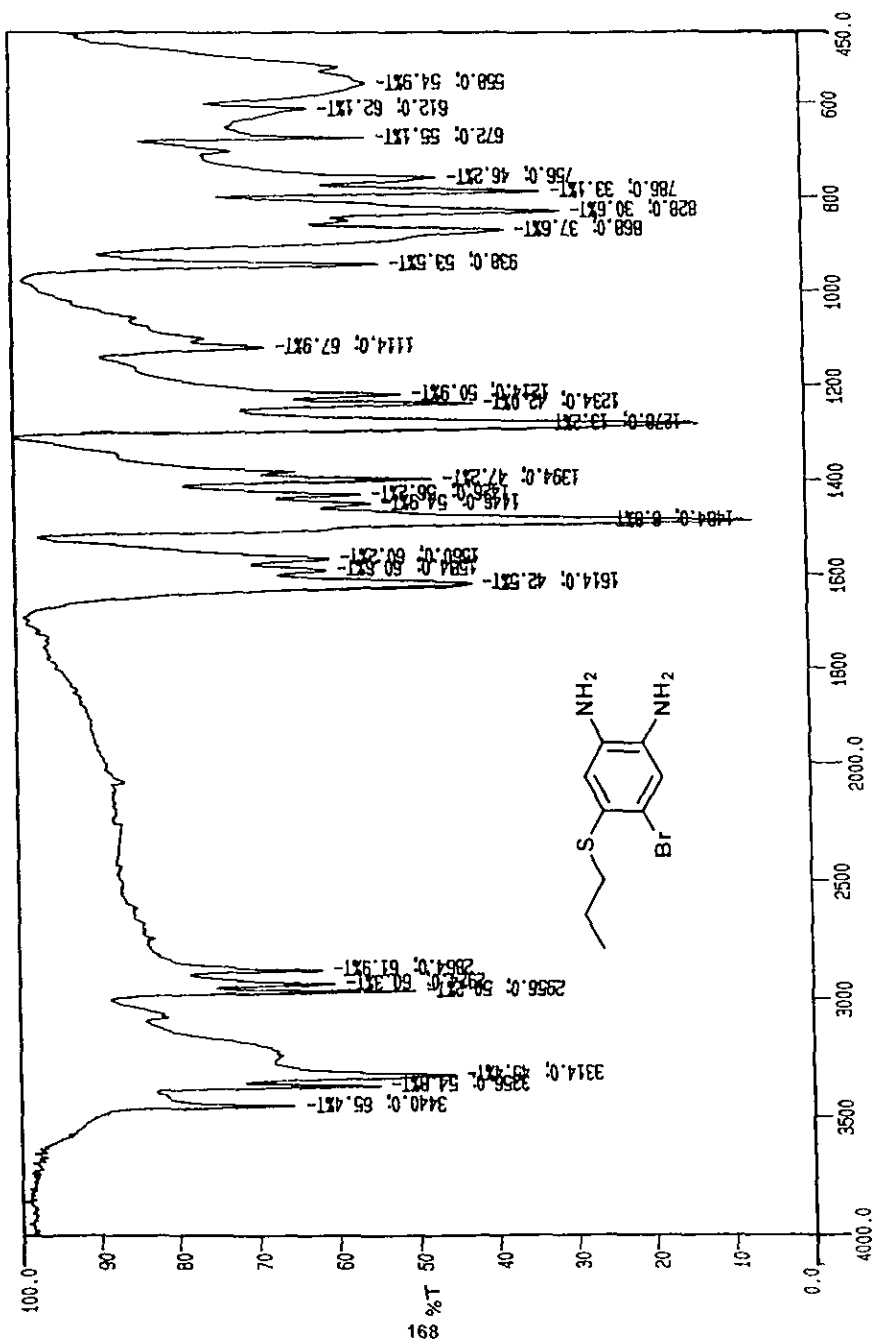
ESPECTRO No. 14 ¹H RMN (300 MHZ) EN CDCl₃ DE LA 4-BROMO, 2-NITRO, 5-PROPILOTIO ANILINA.

UBA1
25/EU/97
PAP-84
PAP-84
C6C13
300.135 MHz
P1=1.00

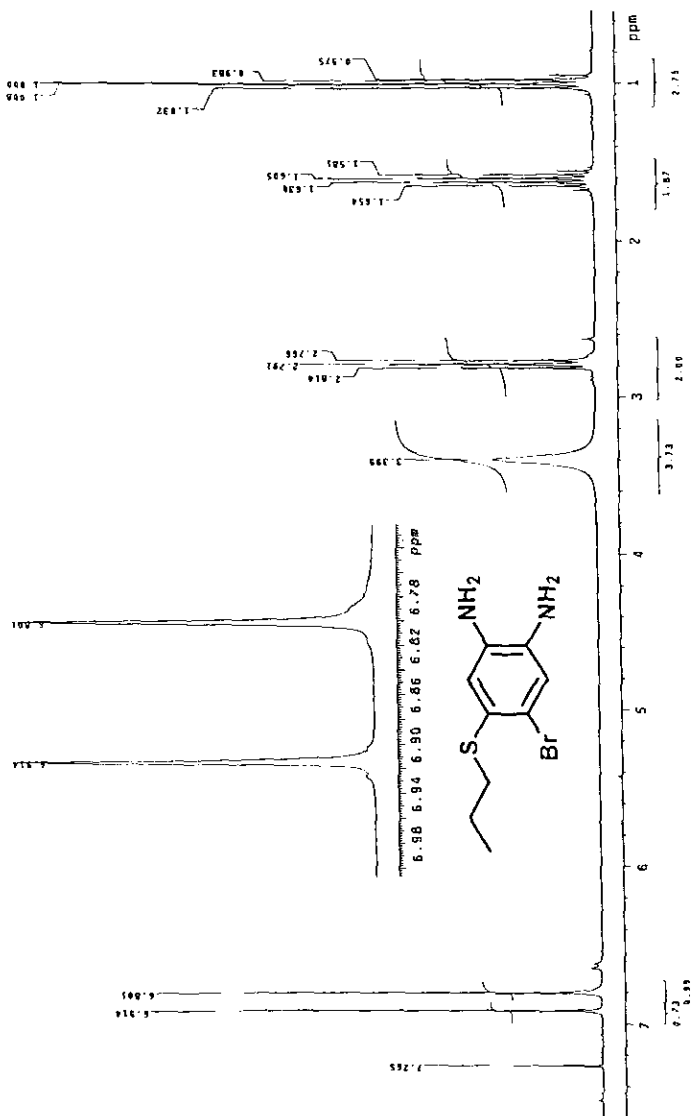
(Mass Spectrum)
 Date : 12-Feb-97 12:17
 Data : Epp-04
 Sample : *
 Note : Dr-Rafael-Castillo-RX585
 Inlet : Reserv.
 Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Regular (MF-Linear)
 RT : 1.31 min Scan# : (37,38)
 BP : m/z 250,0000 Int. : 602.01
 Output m/z range : 33.90000 to 347.9330
 Cut Level : 0.00 X
 63 | 2575
 120



ESPECTRO No. 15 EM (IE) DE LA 4-BROMO, 2-NITRO, 5-PROPILO ANILINA.

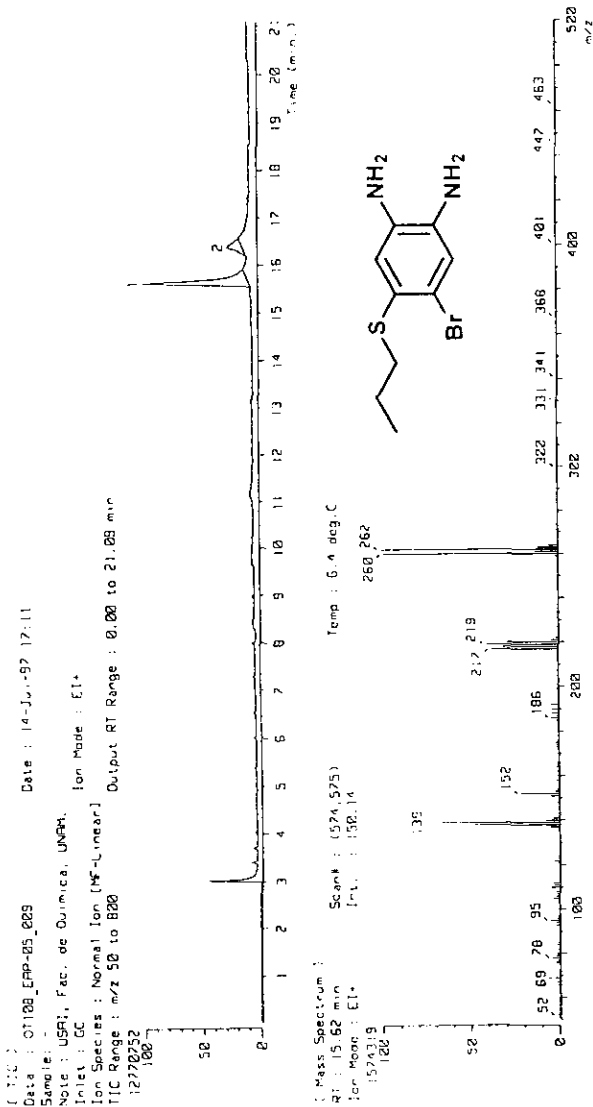


ESPECTRO No. 16 IR (KBr) DE LA 4-BROMO, 5-PROPILTIO, 1, 2-FENILENDIAMINA. CM-1

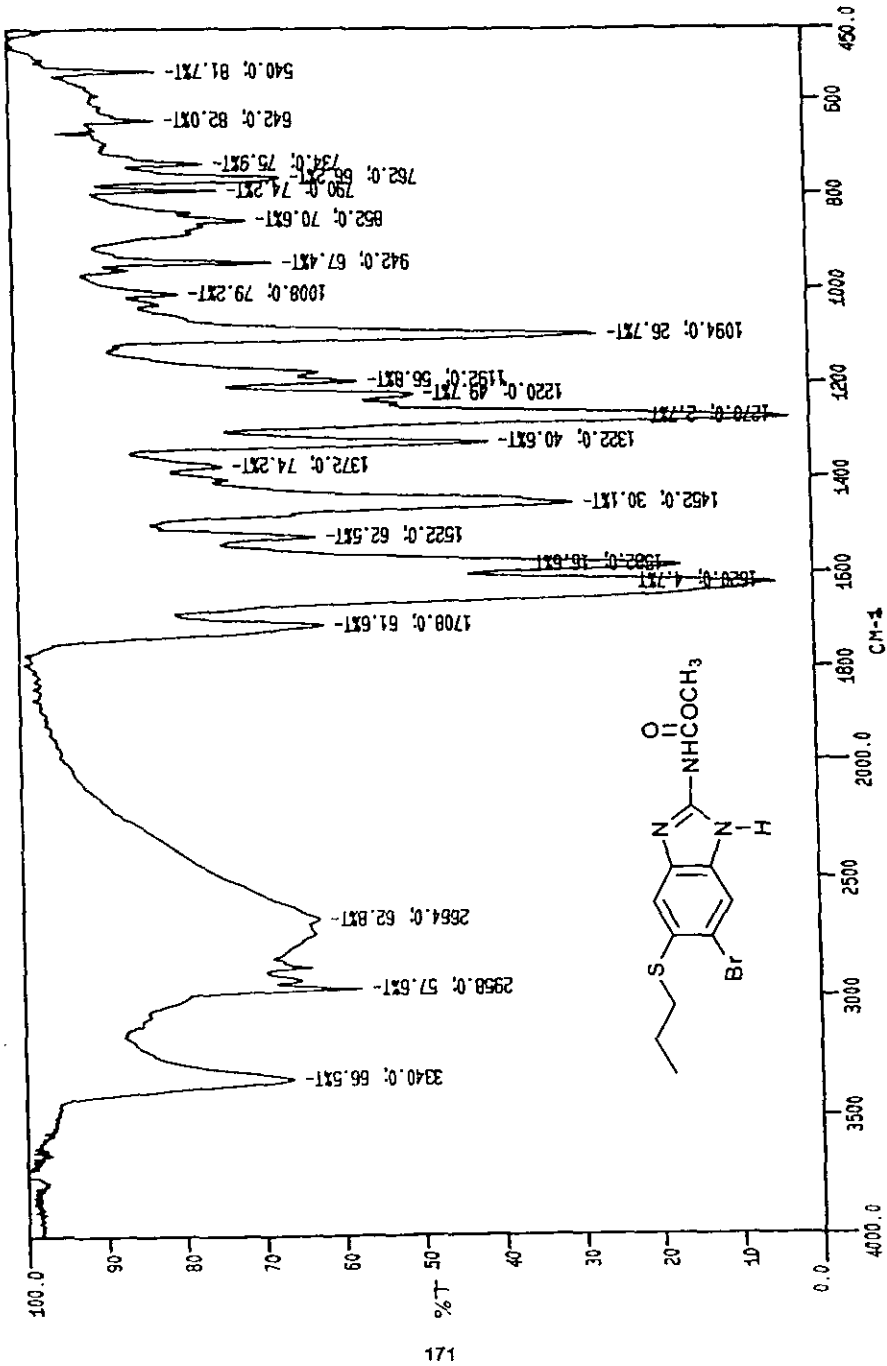


ESPECTRO No. 17 ¹H RMN (300 MHz) EN CDCl₃ DE LA 4-BROMO, 5-PROPILTIO, 1, 2-FENILENDIAMINA.

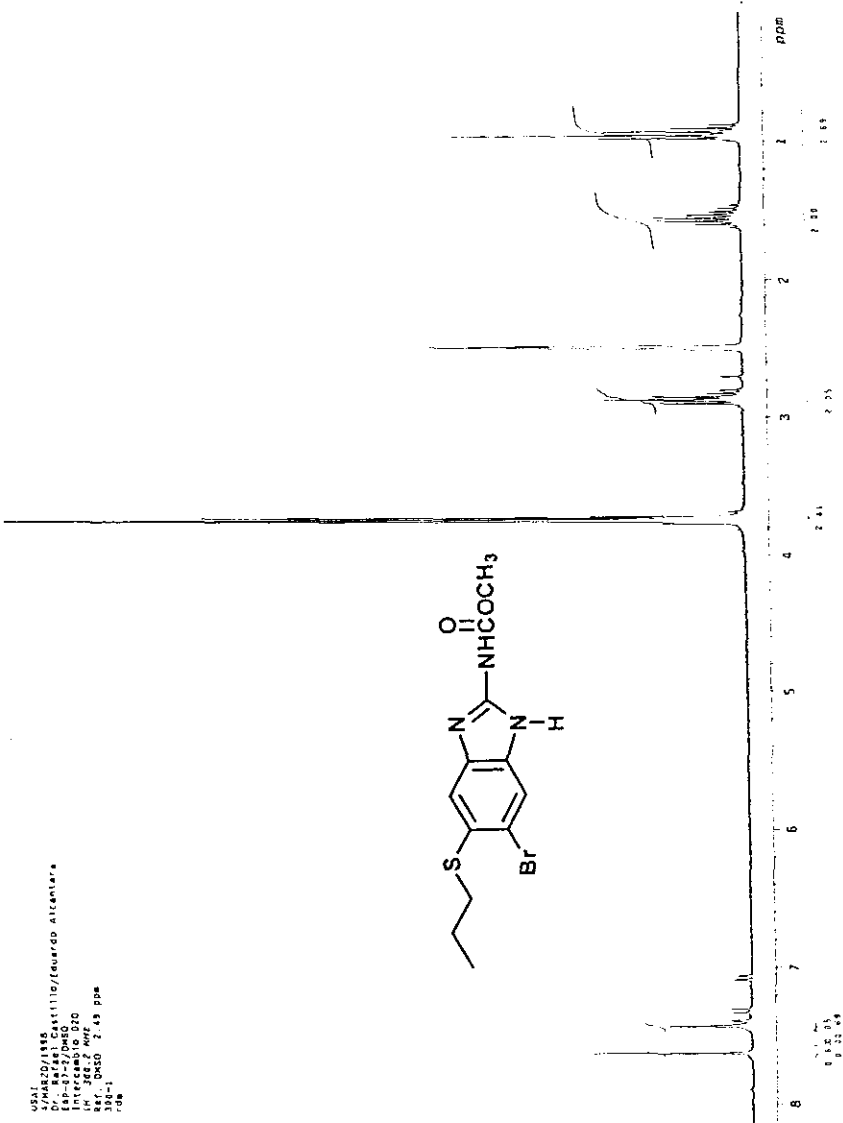
USAI
 10/11/10/21
 D. J. B. CASTILLO
 Eduardo ALCANTARA
 M. J. B. GONZALEZ
 M. J. B. GONZALEZ
 388-2-437
 Referencia con TMS



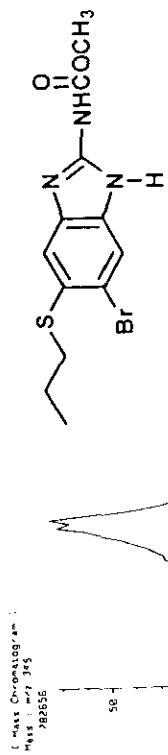
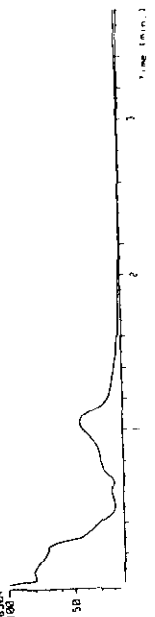
ESPECTRO No. 18 EM (IE) DE LA 4-BROMO, 5-PROPILTIO, 1, 2-FENILENDIAMINA.



ESPECTRO No. 19 IR (KBr) DEL 6-BROMO ALBENDAZOL.
OBTENIDO POR LA RUTA SINTETICA I.



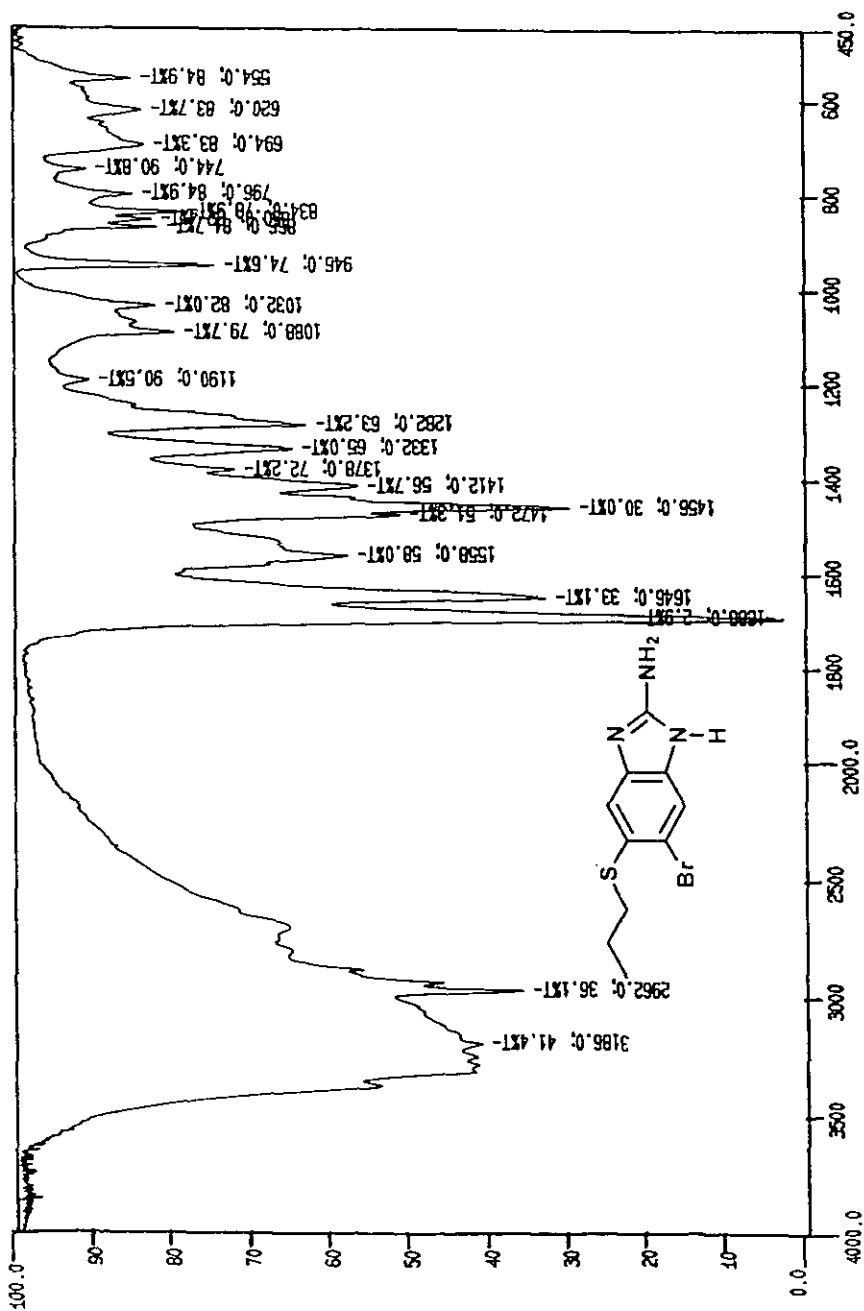
[TIC]
 Date : 10-Nov-97 19:38
 Sample :
 Inlet : Direct
 TIC Range : 0.00 to 3.21 min
 Output RT Range : 0.00 to 3.21 min
 67246584



[Mass Spectrum]
 RT : 1.04 min
 Ion Mode : EI+
 2837614
 186



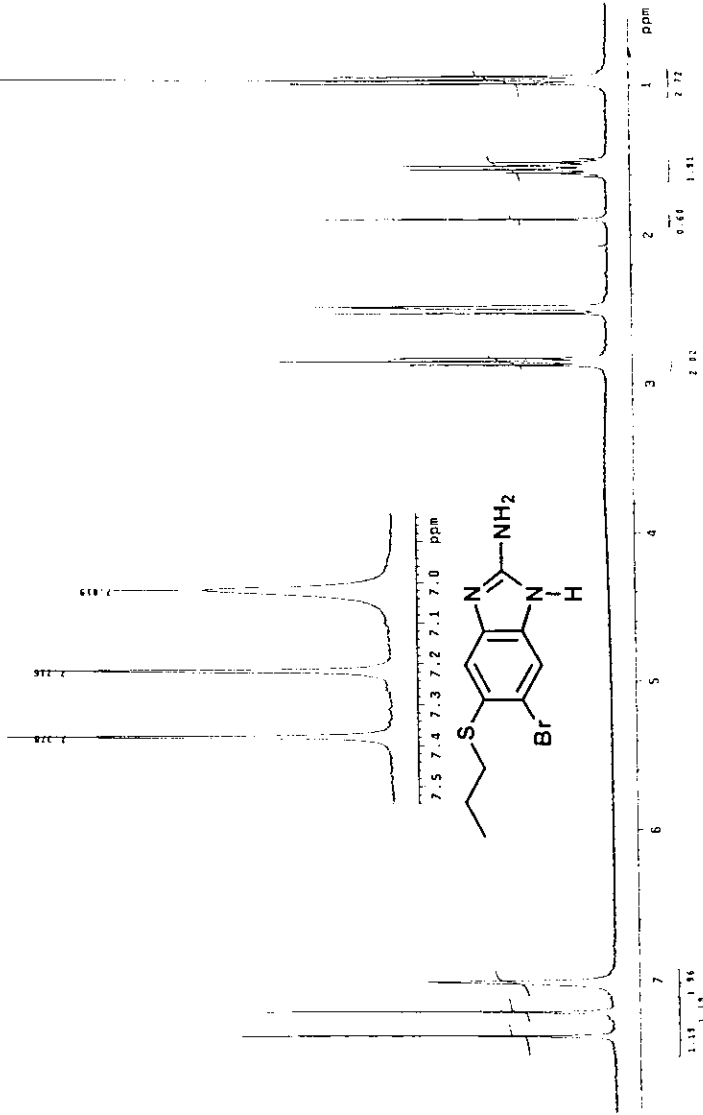
ESPECTRO NO. 21 EM (IE) DEL 6-BROMO ALBENDAZOL.
 OBTENIDO POR LA RUTA SINTETICA I.



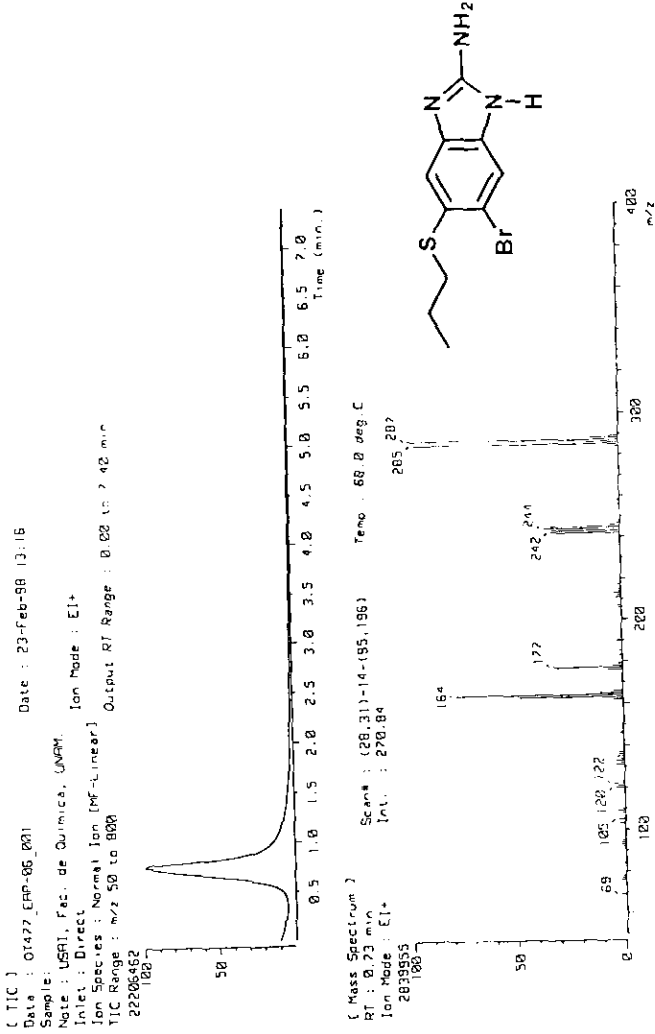
CH-1

ESPECTRO No. 22 IR (KBr) DEL 2-AMINO, 6-BROMO, 5-PROPILOTIO BENCIMIDAZOL.

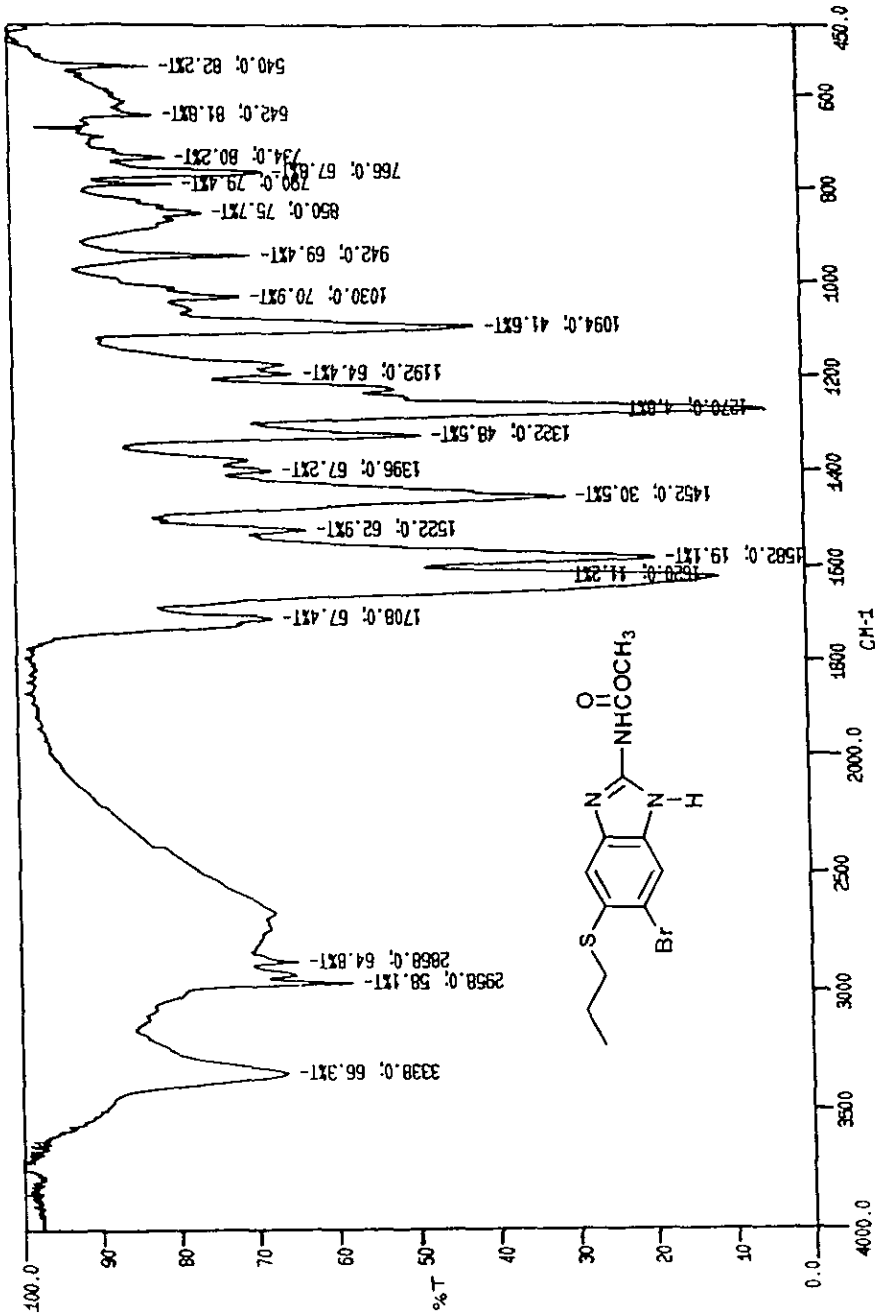
USAF FERRASO 1888
 DZ FERRASO
 DZ FERRASO Cast 1110/Eduardo Alcantara
 EAP-58/DMSO
 312
 312
 312
 REF. a 2.43 ppm DMSO
 TCM



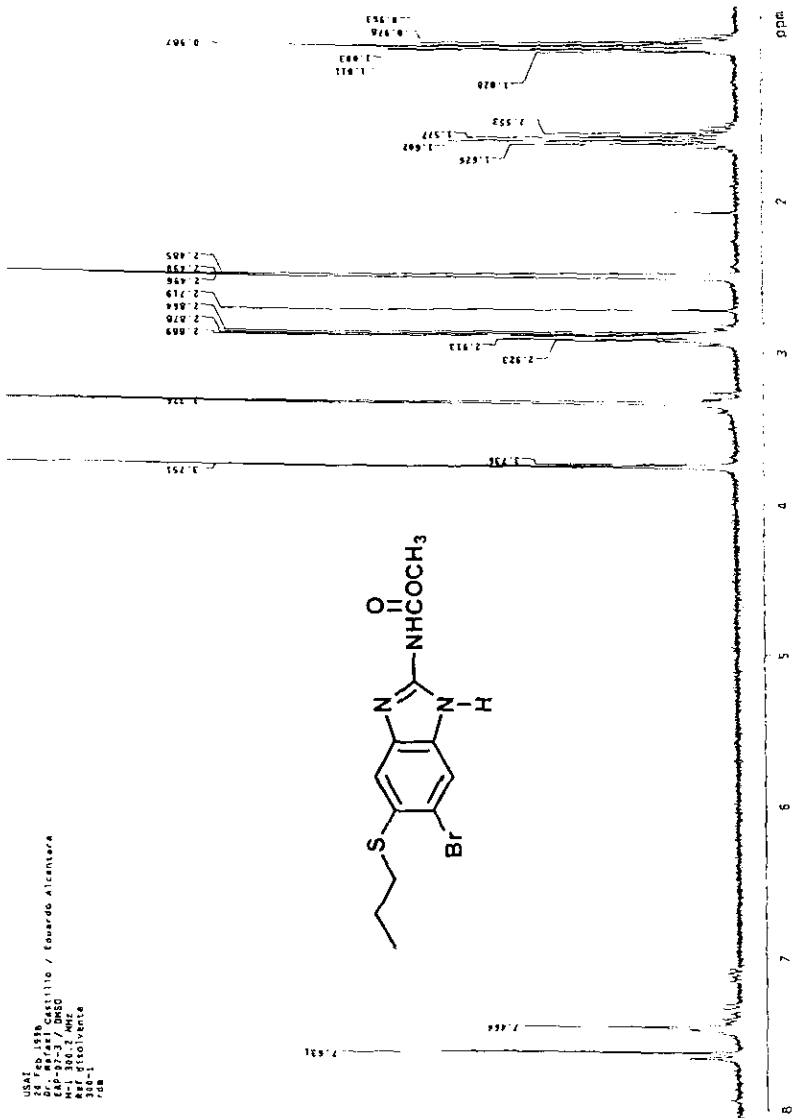
ESPECTRO No. 23 ¹H RMN (300 MHZ) EN ²H DMSO DEL 2-AMINO, 6-BROMO, 5-PROPILOTIO BENCIMIDAZOL.



ESPECTRO No. 24 EM (IE) DEL 2-AMINO, 6-BROMO, 5-PROPILOTIO BENCIMIDAZOL.

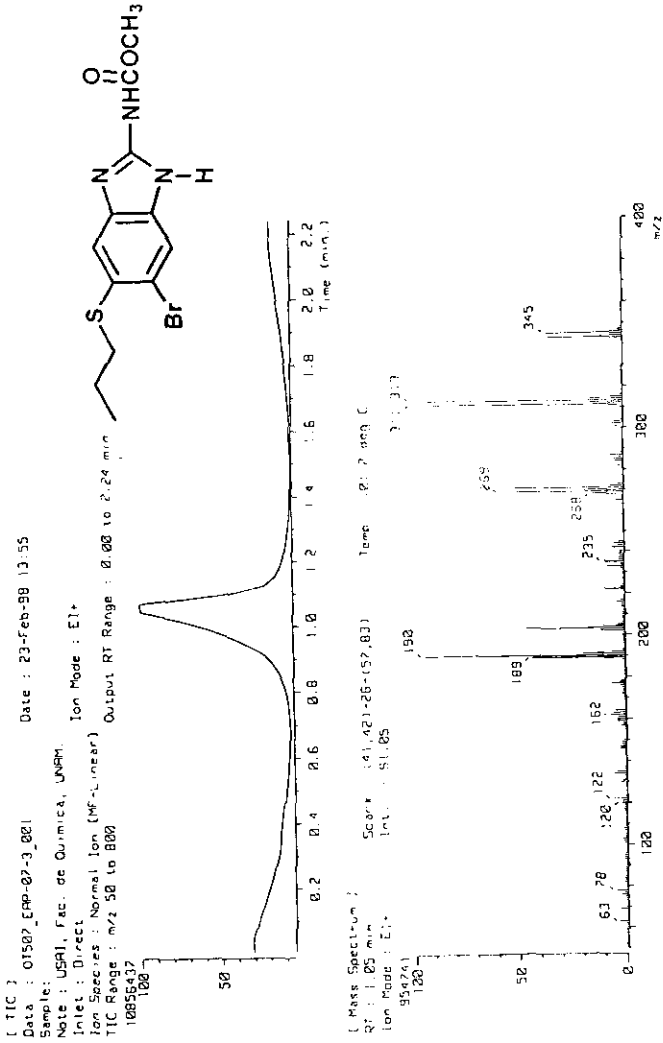


ESPECTRO No. 25 IR (KBr) DEL 6-BROMO ALBENDAZOL.
OBTENIDO POR LA RUTA SINTETICA II.

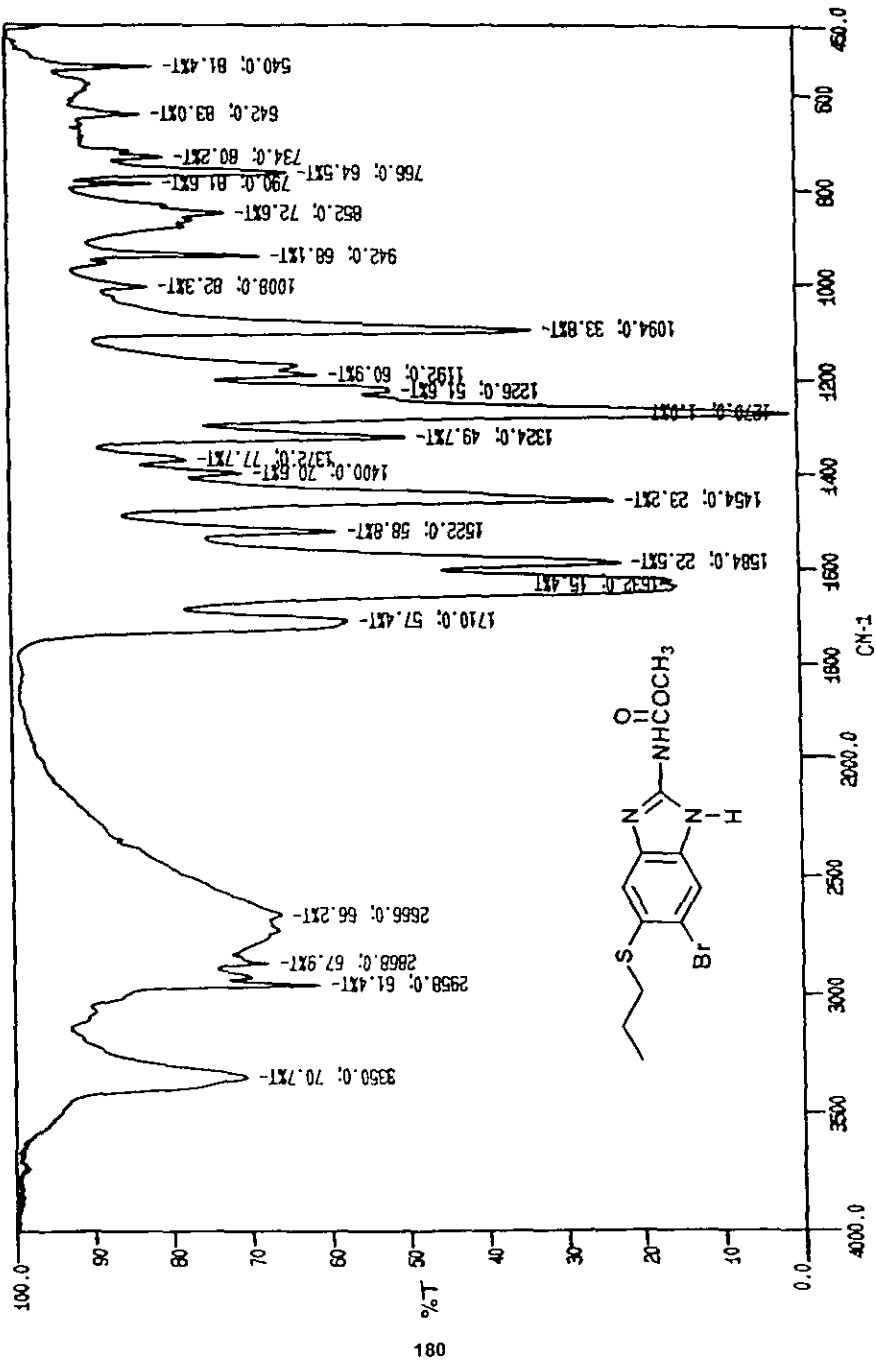


ESPECTRO No. 26 ¹H RMN (300 MHz) EN ²H DMSO DEL 6-BROMO ALBENDAZOL.
OBTENIDO POR LA RUTA SINTETICA II.

USAE
 02 / 06/1978
 02 / 06/1978
 CAP-07-3 / DMSO
 M-1 306.3 MHz
 318-1 110170016
 728

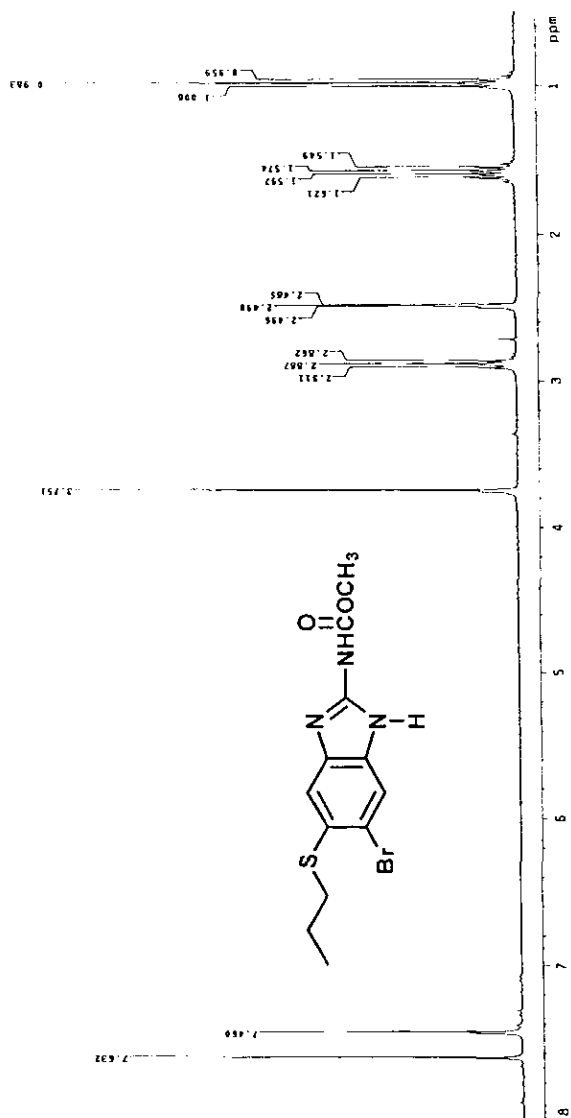


ESPECTRO No. 27 EMI (IE) DEL 6-BROMO ALBENDAZOL.
 OBTENIDO POR LA RUTA SINTETICA II.

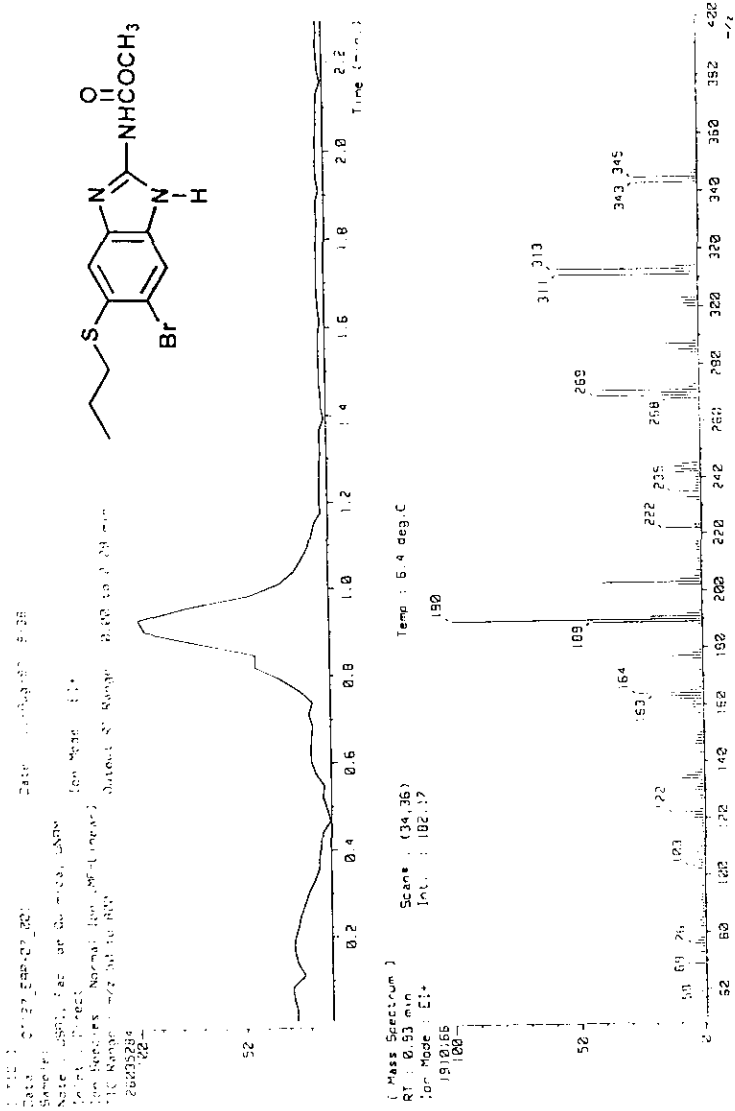


ESPECTRO No. 28 IR (KBr) DEL 6-BROMO ALBENDAZOL.
OBTENIDO POR LA RUTA SINTETICA III.

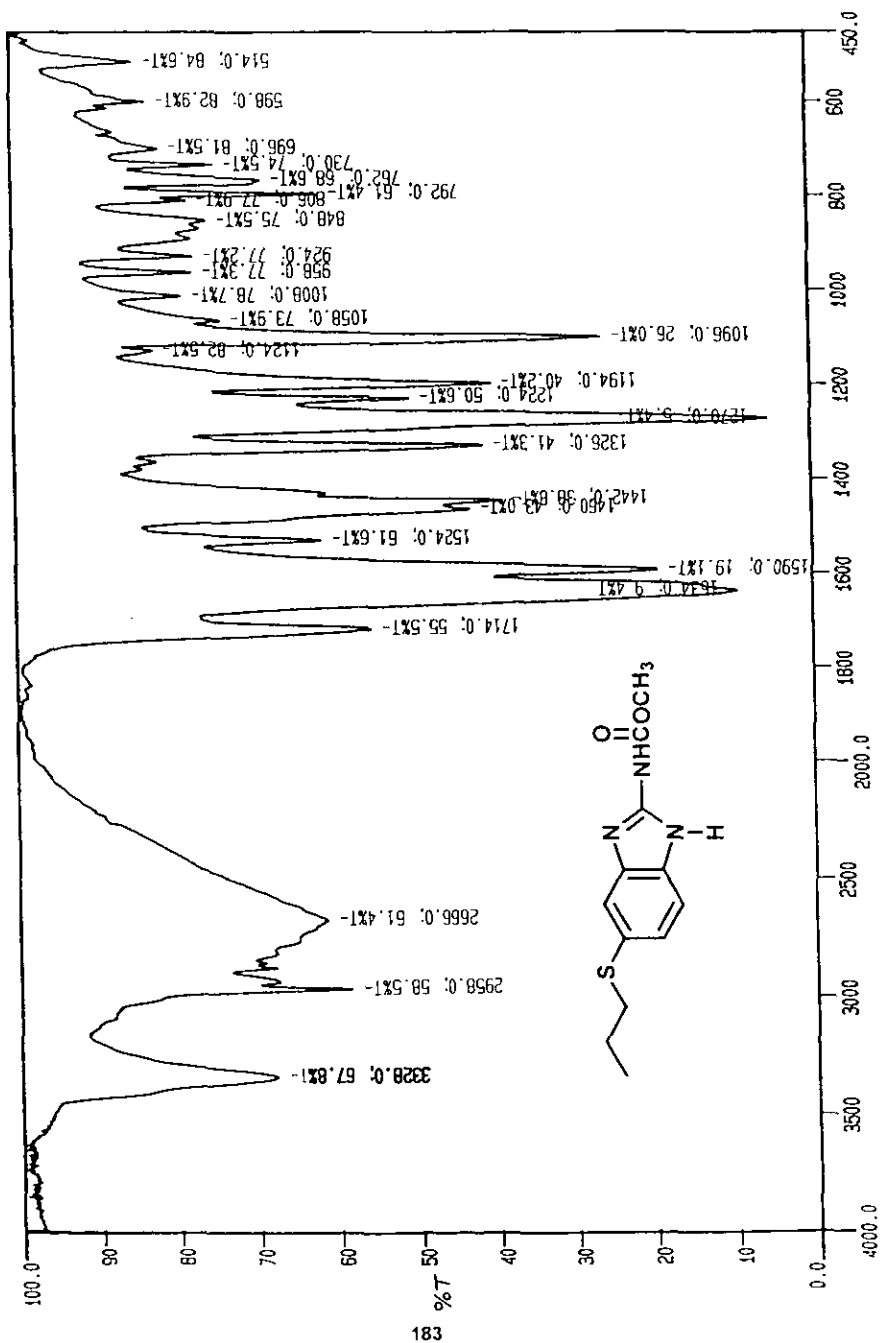
USA2
 3 SOL 177
 03 SOLAS Castiño / Eduardo Alcantara
 CAP-07 / DMSO
 16.031.680 MHz
 400 °C
 400 °C
 Referencia a DMSO 2.45 ppm
 Supresión de TMS



ESPECTRO No. 29 ¹H RMN (300 MHz) EN ²H DMSO DEL 6-BROMO ALBENDAZOL.
 OBTENIDO POR LA RUTA SINTETICA III.

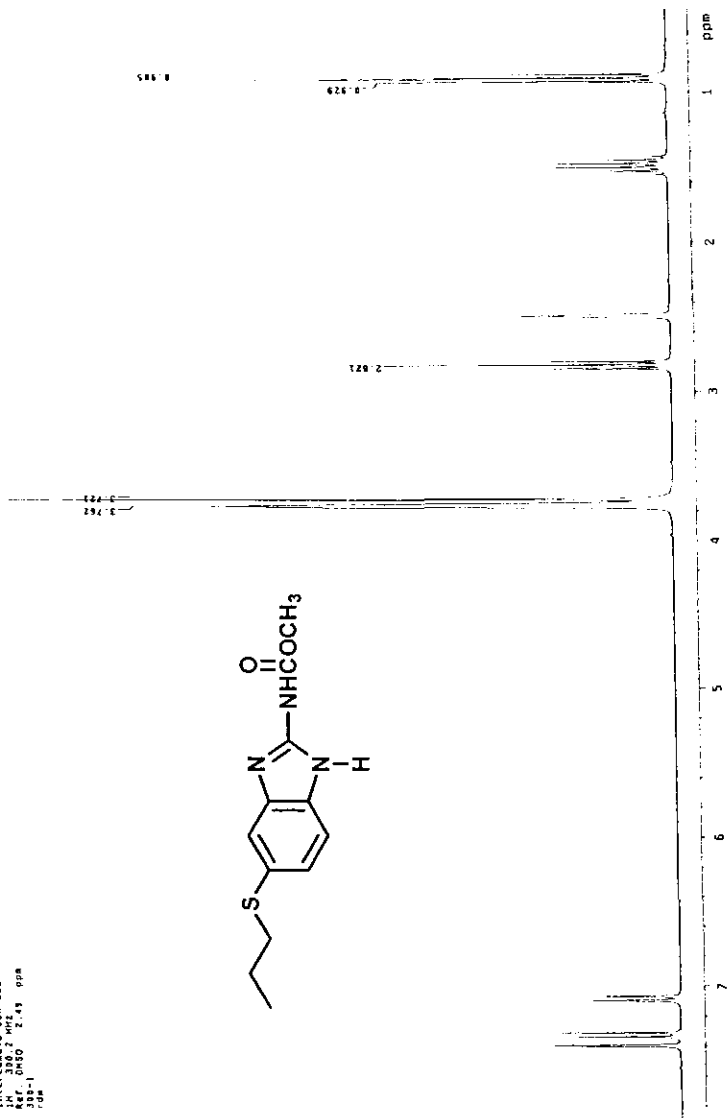
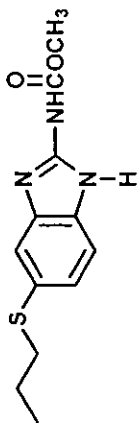


ESPECTRO No. 30 EM (IE) DEL 6-BROMO ALBENDAZOL.
 OBTENIDO POR LA RUTA SINTETICA III.

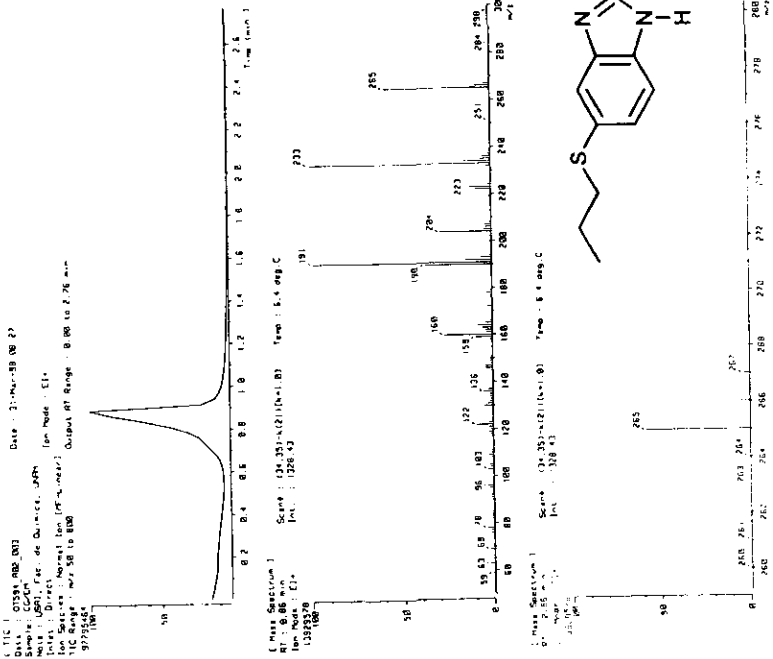


OH-1
ESPECTRO No. 31 IR (KBr) DEL ALBENDAZOL.

USM 44822/1996
 Dr. Rafael Castillo/EGUARDOS ALCANTARA
 282/DMSO-d₆ 400 D20
 1H 300.7 MHz
 500 1 DMSO 2.43 ppm
 TMS



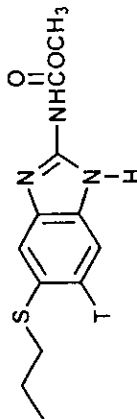
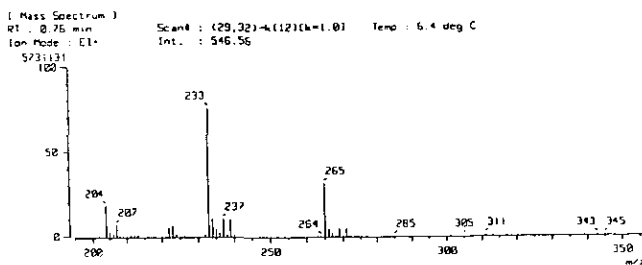
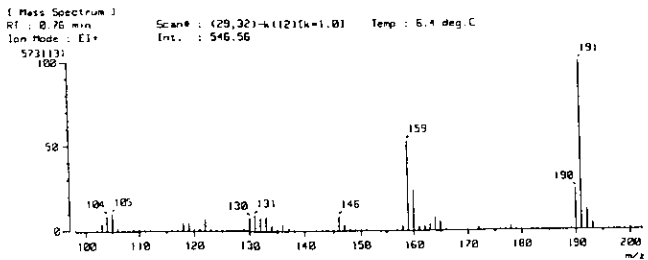
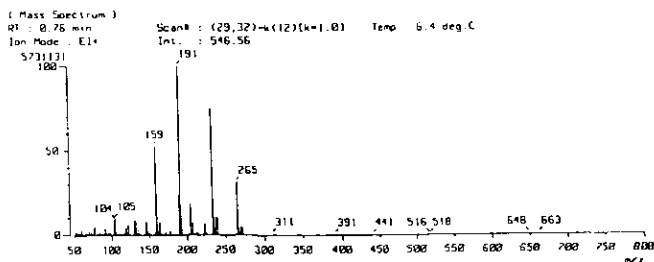
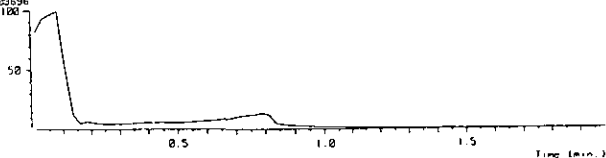
ESPECTRO No. 32 ¹H RMN (300 MHz) EN ²H DMSO DEL ALBENDAZOL.



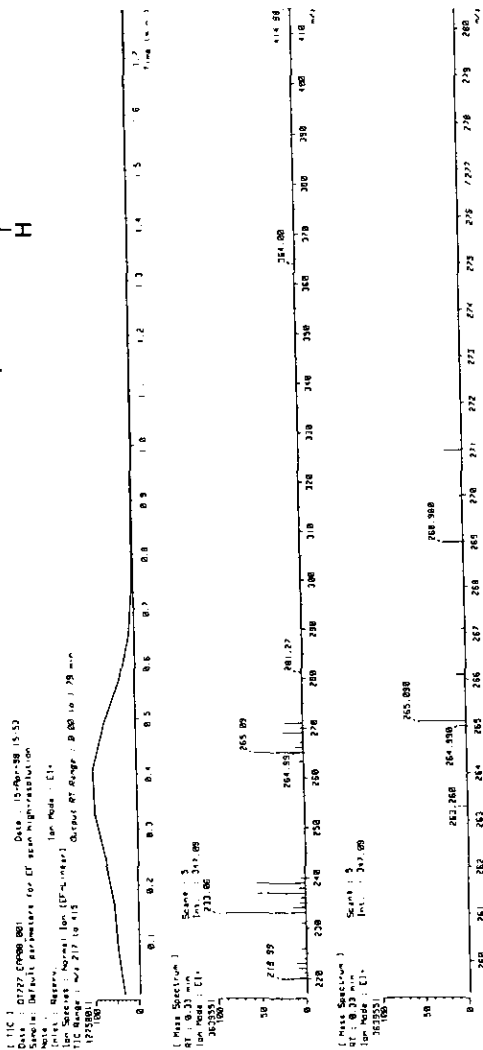
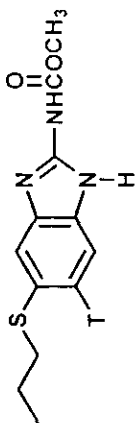
ESPECTRO No. 33 EM (IE) DEL ALBENDAZOL.

APENDICE III. ESPECTROSCOPIA

[TIC]
 Data : 01457_EPP-00_001 Date : 18-Mar-98 10:32
 Sample :
 Note : USRI, Fac. de Química, UNFM.
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Ion Species : Normal Ion [PF-Linear]
 TIC Range : m/z 50 to 800 Output RT Range : 0.00 to 1.98 min
 76140096



ESPECTRO No. 34 EM (IE) DE LA SOLUCION DE TRITIO-ALBENDAZOL.



ESPECTRO No. 35 EM (ALTA RESOLUCION) DE LA SOLUCION DE TRITIO-ALBENDAZOL.