

00559



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE
PERMEABILIDAD APARENTE UTILIZANDO A LA
LINEA CELULAR CACO-2 COMO MODELO
in vitro DE DERIVADOS DEL
1-METILBENCIMIDAZOL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(FARMACIA-BIOFARMACIA)
P R E S E N T A
Q.F.B. RAUL MORALES HURTADO

BAJO LA DIRECCION DE: DRA. LILIAN YEPEZ MULIA



MEXICO, D. F.

2000

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COORDINACIÓN DEL PROGRAMA
DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS QUÍMICAS



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

BIÓL. FRANCISCO INCERA UGALDE

Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado.

Presente

Me es grato informarle que el alumno RAÚL MORALES HURTADO presentará próximamente su examen para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas (Farmacia), quien defenderá el proyecto de investigación titulado: "Determinación del coeficiente de permeabilidad aparente utilizando a la línea celular Caco-2 como modelo *in vitro* de derivados del 1-metilbencimidazol" ante el siguiente jurado:

Presidente	Dr. Gilberto Castañeda Hernández	CINVESTAV
Vocal	Dr. Rafael Castillo Bocanegra	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dra. Helgi Jung Cook	Facultad de Química, UNAM
Primer suplente	Dr. Héctor Ponce Monter	IMSS
Segundo suplente	Dr. Francisco Hernández Luis	Facultad de Química, UNAM

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, D. F., 25 de agosto, 2000

DR. RAYMUNDO CEA OLIVARES

Coordinador del Programa de Maestría
y Doctorado en Ciencias Químicas

c. c. p.: Miembros del Jurado
Presidente del SAO
Departamento de Control Escolar
Interesado
Expediente

Dr. Raymundo Cea Olivares
Tel./Fax 55 50 91 96

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios, por mantenerme con buena salud, por permitirme terminar los estudios de posgrado, por darme unos padres maravillosos, una esposa inigualable y una familia incomparable.

A mis padres.

Muchas gracias, por todo el apoyo incondicional que siempre me han brindado, por ser tan comprensivos y pacientes, por darme lo más importante: la vida. Espero que esta tesis sea una pequeña recompensa por todos los desvelos y enojos que les he hecho pasar. Los quiero mucho.

A Noemi.

Mi compañera, gracias por soportar esos enojos que tengo en ocasiones, por aceptar que sea parte de tú vida y por todos esos grandes momentos de alegría que pasamos. Por todo tu apoyo y ayuda incondicional, que me han permitido llevar a buen termino mis estudios de maestría y la escritura de este documento. Te amo, espero que no acaben todos estos momentos a tu lado, que son alicientes en mi camino y los cuales me permiten continuar con mi preparación y superación personal. Te amo.

A mi familia.

Gracias, por todo el apoyo que siempre me han brindado. Por ser tan amables y por sus comentarios que enriquecen mi vida.

A mis suegros, Olga y Emigdio.

Gracias, por darme una mujer tan linda, aunque traviesa. Por todo su apoyo y aceptación a convivir y pasar tantos momentos agradables. Espero que siempre estemos unidos.

A la Dra. Lilián Yépez Mulia.

Gracias, por permitirme continuar en su laboratorio, por enseñarme las virtudes de la investigación, por compartir sus experiencias y sembrar en mí ese amor por la investigación y la enseñanza. Le deseo lo mejor siempre.

Al Dr. Roberto Cedillo Rivera.

Gracias, por aceptar que participe en el grupo de investigación. Por todo el apoyo, tanto económico como moral, que en forma incondicional me proporciona. Por demostrar que la vida se tiene que disfrutar en todo momento, aunque parezca que se torna difícil.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra.

Gracias, por permitirme convivir con su grupo. Por todas sus opiniones, siempre tan valiosas y atinadas, ya que gracias a ello se logró enriquecer este trabajo de investigación.

Al Dr. Francisco Hernández Luis y M. en C. Alicia Hernández Campos.

Gracias, por su colaboración para incrementar mi participación en los proyectos de investigación y por la oportunidad que me brindaron al mandarme al IMSS y apoyarme para mi estancia en Estados Unidos.

Al Dr. Ismael Hidalgo y familia.

Gracias, por permitirme ingresar en su casa y abrirme las puertas en su laboratorio, a pesar de no conocerme. Deseo que esta tesis, sea una muestra de agradecimiento por todo su apoyo y su valiosa experiencia.

A Hilda, Nancy, María de Jesús, Fernando Calzada y Violeta.

Por todo su apoyo y muestras de amistad que siempre me guían en mi carrera académica.

A Carlos, Vicente, Ruth, Miriam, Ernesto, Diana, Leticia y Elizabeth.

Gracias, por compartir sus experiencias y por el apoyo que me han brindado durante nuestros estudios de posgrado.

A todo el personal del IMSS y de la UNAM.

Por todas sus muestras de apoyo y aliento, además de su preocupación durante mi estancia en estas instituciones.

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO A CABO EN:

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

Laboratorios Absorption Systems en la Ciudad de Exton, Pennsylvania, USA.

EL PRESENTE TRABAJO FUE FINANCIADO POR:

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto No. 25920-M

El Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México a través del proyecto No. IN204998

Los estudios de Maestría por el CONACYT mediante la beca 116424, durante el período de Marzo de 1997 a Agosto de 1998.

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
4. OBJETIVO GENERAL	31
5. OBJETIVOS PARTICULARES	31
6. METODOLOGÍA.....	32
6.1 Método analítico.....	32
6.2 Determinación del coeficiente de distribución (logD)	32
6.3 Determinación del coeficiente de permeabilidad aparente (Papp).....	33
6.3.1 Línea celular	33
6.3.2 Integridad de las monocapas	33
6.3.3 Preparación de compuestos.....	34
6.3.4 Experimentos de transporte.....	34
6.3.4.1 Apical a Basolateral.	34
6.3.4.2 Basolateral a Apical	35
6.3.5 Control de calidad.....	35
6.3.6 Determinación del coeficiente de permeabilidad aparente (Papp). .	36
7. RESULTADOS	37
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	55
9. CONCLUSIONES	61
10. BIBLIOGRAFÍA	62
11. ANEXO.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Etapas del desarrollo de nuevos fármacos.	3
Tabla 2. Prevalencia global de infecciones por helmintos.	6
Tabla 3. Perfil terapéutico de fármacos empleados en el tratamiento de helmintiosis humana.	7, 8
Tabla 4. Derivados bencimidazólicos con actividad antiparasitaria a nivel intestinal y sistémico.	10
Tabla 5. Derivados bencimidazólicos sintetizados en la Facultad de Química.	15
Tabla 6. Reducción de la actividad metabólica (%) de los organismos adultos y larvas musculares de <i>Trichinella spiralis</i> en presencia de los derivados del 1-metilbencimidazol.	16
Tabla 7. Compuestos seleccionados.	30
Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas determinadas para los derivados del 1-metilbencimidazol.	37
Tabla 9. Coeficiente de distribución y partición determinados para los derivados del 1-metilbencimidazol.	37
Tabla 10. Concentración (μM) obtenida en el estudio de apical a basolateral para el compuesto 4.	38
Tabla 11. Concentración (μM) obtenida en el estudio de basolateral a apical para el compuesto 4.	38
Tabla 12. Concentración (μM) obtenida en el estudio de apical a basolateral para el compuesto 8.	40
Tabla 13. Concentración (μM) obtenida en el estudio de basolateral a apical para el compuesto 8.	40
Tabla 14. Concentración (μM) obtenida en el estudio de apical a basolateral para el compuesto 12.	42
Tabla 15. Concentración (μM) obtenida en el estudio de basolateral a apical para el compuesto 12.	42

Tabla 16. Concentración (μM) obtenida en el estudio de apical a basolateral para el compuesto 16 .	44
Tabla 17. Concentración (μM) obtenida en el estudio de basolateral a apical para el compuesto 16 .	44
Tabla 18. Concentración (μM) obtenida en el estudio de apical a basolateral para el albendazol .	46
Tabla 19. Concentración (μM) obtenida en el estudio de basolateral a apical para el albendazol .	46
Tabla 20. Concentración (μM) obtenida en el estudio de apical a basolateral para el mebendazol .	48
Tabla 21. Concentración (μM) obtenida en el estudio de basolateral a apical para el mebendazol .	48
Tabla 22. Concentración promedio (μM) obtenida en el estudio de apical a basolateral para los compuestos analizados.	49
Tabla 23. Concentración promedio (μM) obtenida en el estudio de basolateral a apical para los compuestos analizados.	51
Tabla 24. Coeficiente de permeabilidad aparente obtenidos de los compuestos analizados.	52
Tabla 25. Actividad <i>in vivo</i> de los compuestos 4 , 8 , 12 , 16 y albendazol sobre las larvas musculares de <i>Trichinella spiralis</i> .	53

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Paradigma en el diseño de nuevos fármacos.	4
Figura 2. Barreras de la biodisponibilidad.	18
Figura 3. Membrana gastrointestinal y formas de transporte de fármacos.	19
Figura 4. Morfología de la mucosa intestinal.	20
Figura 5. Morfología de la mucosa gastrointestinal.	21
Figura 6. Morfología del enterocito.	23
Figura 7. Comparación entre la membrana gastrointestinal y la monocapa de células Caco-2.	26
Figura 8. Cinética de absorción del compuesto 4 determinada del lado apical al basolateral.	39
Figura 9. Cinética de absorción del compuesto 4 determinada del lado basolateral al apical.	39
Figura 10. Cinética de absorción del compuesto 8 determinada del lado apical al basolateral.	41
Figura 11. Cinética de absorción del compuesto 8 determinada del lado basolateral al apical.	41
Figura 12. Cinética de absorción del compuesto 12 determinada del lado apical al basolateral.	43
Figura 13. Cinética de absorción del compuesto 12 determinada del lado basolateral al apical.	43
Figura 14. Cinética de absorción del compuesto 16 determinada del lado apical al basolateral.	45
Figura 15. Cinética de absorción del compuesto 16 determinada del lado basolateral al apical.	45
Figura 16. Cinética de absorción del albendazol determinada del lado apical al basolateral.	47
Figura 17. Cinética de absorción del albendazol determinada del lado basolateral al apical.	47

Figura 18.	Cinética de absorción del mebendazol determinada del lado apical al basolateral.	48
Figura 19.	Cinética de absorción del mebendazol determinada del lado basolateral al apical.	49
Figura 20.	Cinética de absorción promedio de los compuestos 4, 8, 12, 16, albendazol y mebendazol determinada del estudio de apical a basolateral.	50
Figura 21.	Cinética de absorción promedio de los compuestos 4, 8, 12, 16, albendazol y mebendazol determinada del estudio de basolateral a apical.	51
Figura 22.	Coefficiente de permeabilidad aparente como una función de la lipofilidad.	52
Figura 23.	Actividad biológica <i>in vivo</i> como una función de la permeabilidad aparente.	54

INTRODUCCIÓN

Un aspecto de gran importancia que debe considerarse en el diseño y síntesis de nuevos compuestos con actividad biológica es su biodisponibilidad oral, siendo ésta uno de los principales enfoques en el desarrollo farmacéutico de nuevos compuestos (Hidalgo y Bocharadt, 1990a; Irvine y cols., 1999).

La biodisponibilidad oral de un compuesto, depende de su absorción en el intestino delgado. Por lo cual, es necesario incrementar el conocimiento de los mecanismos básicos involucrados en la paso de fármacos a través del epitelio intestinal, con la finalidad de poder diseñar y sintetizar moléculas con características fisicoquímicas que le permitan ser absorbidos en el epitelio intestinal (Fagerholm y cols., 1996).

Actualmente, existen diversas metodologías para determinar la posible biodisponibilidad de un fármaco. Una de las más empleadas es la medición de la permeabilidad aparente de un compuesto a través de la línea celular Caco-2. Las células Caco-2, cuando se cultivan sobre membranas semipermeables, forman una barrera epitelial altamente funcional, con marcada similitud morfológica y bioquímica al epitelio columnar del intestino delgado (Artursson y Borchardt, 1997).

Existen estudios que demuestran que los valores de permeabilidad aparente (Papp), obtenidos de un compuesto empleando la línea celular Caco-2, correlacionan con la absorción intestinal de este compuesto determinado en humanos (Artursson y Karlsson, 1991; Collett y cols., 1996; Rubas y cols., 1996a; Lennernäs, 1997). El modelo de la línea celular tiene gran utilidad, no sólo como una herramienta para estudios mecanísticos de la absorción de fármacos, sino también como un modelo para seleccionar fármacos con buena capacidad de absorción (Artursson, 1990; Irvine y cols., 1999).

Como producto de investigación en el desarrollo de nuevos antiparasitarios, en la actualidad se dispone de compuestos para curar o controlar la mayoría de las parasitosis

intestinales; aunque sólo algunos de éstos son capaces de actuar a nivel sistémico, tales como el albendazol y el prazicuantel, la actividad antiparasitaria sistémica no está exenta de problemas. Por un lado, algunos compuestos como los derivados bencimidazólicos tienen una farmacocinética errática y variable, debido principalmente a sus propiedades fisicoquímicas, como su baja solubilidad acuosa. Por otro lado, algunos tratamientos son costosos y prolongados y en algunos casos se necesitan altas concentraciones del fármaco para poder lograr la erradicación total de los parásitos. Debido a esto es necesario buscar nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones parasitarias sistémicas.

Con el interés de contar con nuevos compuestos derivados del bencimidazol, con mejores características de solubilidad y actividad biológica, en el departamento de Farmacia, de la Facultad de Química de la UNAM, se sintetizaron 4 series de compuestos derivados del 1-metilbencimidazol con diferentes sustituyentes en posición 2 (metilo, amino, mercapto y metiltio) y con cloro en posición 5 y/ó 6. Algunos de estos compuestos tuvieron muy buena actividad al ser evaluados *in vitro* en contra del protozooario intestinal *Giardia lamblia* y contra la fase enteral y sistémica del nematodo *Trichinella spiralis*.

Considerando lo anterior, resulto de interés determinar el coeficiente de permeabilidad aparente de los compuestos derivados del 1-metilbencimidazol que en los ensayos *in vitro* hayan tenido actividad contra *T. spiralis* en particular contra la fase sistémica del parásito. Para esta determinación se empleó como modelo de selección farmacológica, la línea celular Caco-2.

ANTECEDENTES

El desarrollo de nuevos fármacos tiene diferentes características, las cuales involucran una serie de metodologías de selección de las diversas moléculas. Una de las principales problemáticas que se presentan para que un compuesto activo alcance la aprobación de uso clínico, es el alto costo en dinero y tiempo (Palm y cols., 1997). Las etapas que abarcan desde el descubrimiento hasta la aprobación de un fármaco se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1. Etapas del desarrollo de nuevos fármacos.

Estado	Actividad	Duración	Compuestos
Descubrimiento	Síntesis y selección	2 – 10 años	5,000 – 10,000
Pruebas pre-clínicas	Pruebas <i>in vitro</i> y en animales	3.5 años	250
Fase I	20 – 80 voluntarios sanos para determinar la seguridad y dosis	8 meses	
Fase II	100 – 300 pacientes voluntarios para determinar eficacia y efectos adversos	1.2 años	
Fase III	1,000 – 3,000 pacientes voluntarios para monitorear la eficacia y efectos adversos	3 años	5
Revisión y aprobación por FDA	Posible interacción con la FDA	2.5 años	
Duración total = 12 – 15 años Costo total = US\$ 500 millones			1

Tomado de Hidalgo (1999).

Algunas de las razones por las cuales los compuestos que se diseñan no alcanzan su empleo en la clínica son: alta toxicidad, no presentar la eficacia adecuada o la presentación de efectos adversos, problemas de mercadeo y pobres propiedades biofarmacéuticas.

Para la obtención de nuevos compuestos, en un tiempo menor y con menor costo, se sugiere la siguiente estrategia (figura 1).

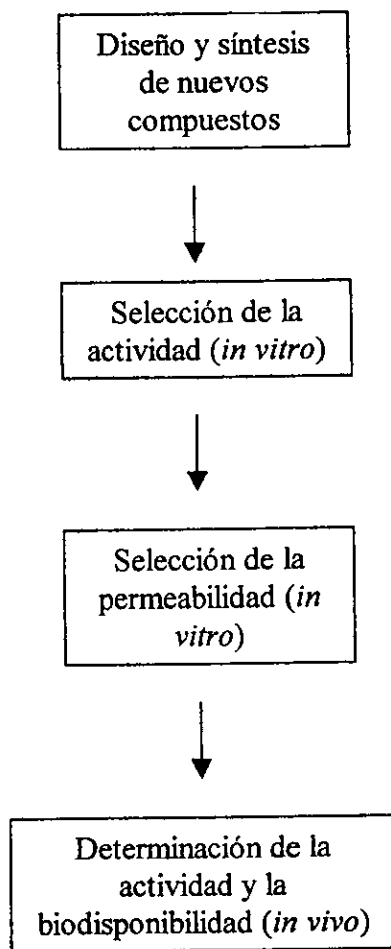


Figura 1. Estrategia en el diseño y selección de nuevos fármacos.

El primer paso en la obtención de nuevos fármacos es el diseño y síntesis de nuevas moléculas. Algunos autores han desarrollado descriptores de actividad utilizando algunas propiedades fisicoquímicas de las moléculas, como el coeficiente de partición. Sin embargo, en algunos casos las predicciones y la correlación se rompe al incrementar la diversidad estructural (Artursson y Karlsson, 1991). Por otro lado, Palm y cols. (1997) han demostrado que existe una fuerte correlación entre la fracción que se absorbe y el área polar superficial dinámica para un número de estructuras diversas. Actualmente, una de las estrategias en el diseño y síntesis de nuevas moléculas, es encontrar una “molécula líder” de la cual se derivan una serie de compuestos.

De manera particular, entre los compuestos que se utilizan para el tratamiento de diversas infecciones parasitarias por helmintos, destacan los derivados del anillo bencimidazol (**albendazol**, **mebendazol** y **tiabendazol**), los cuales presentan un amplio espectro de actividad, que incluye parásitos nematodos, trematodos y cestodos. Actualmente, el anillo del bencimidazol ha sido una de las estructuras más empleadas, realizándose en esta molécula diversos cambios estructurales, con la finalidad de obtener compuestos con actividad antiparasitaria intestinal y extraintestinal. Lo anterior, es posible debido a la versatilidad de la molécula que permite llevar a cabo diversos cambios estructurales; la adición de estructuras al anillo y la fácil obtención de los materiales necesarios para la química de este producto (Sharma, 1994).

La importancia de producir nuevos compuestos con actividad antiparasitaria se basa, en que en la actualidad, las enfermedades parasitarias siguen siendo un grave problema de salud pública en el mundo. Uno de los reportes clásicos de infecciones por helmintos, es el publicado por Stoll (1947), en el cual, estimando que en ese momento la población mundial era de 2.1 billones de personas, encontró que cerca de 650 millones se encontraban infectadas con *Ascaris lumbricoides*. En forma similar, estimó que para infecciones como trichuriasis, enterobiasis y strongyloidiasis, la población infectada era de 350, 209 y 35 millones respectivamente. A pesar de las diferentes estrategias que se han implementado para la prevención y tratamiento de este tipo de infecciones, algunos

reportes indican que con el incremento en la población mundial, la prevalencia de este tipo de infecciones se incrementa proporcionalmente (Horton, 1990) (Tabla 2).

Tabla 2. Prevalencia global de infecciones por helmintos.

	1947 ^a	1984 ^b
Ascaris	650	1100 – 1300
Hookworm	450	1000
Trichuris	350	500 – 1000
Enterobius	209	300 – 500
Strongyloides	35	50 – 100

^a Población mundial 2.1 billones de personas. ^b Población mundial 4.3 billones de personas. Tomado de Horton (1990).

Los helmintos son organismos diversificados, varían en su ciclo biológico, en su fisiología, en su evolución, en el hábitat que ocupan dentro del huésped y en su susceptibilidad a los quimioterápicos. La gravedad de la infección, tanto en el hombre, como en otros hospederos, está dada por la intensidad de la exposición.

Muchos de los medicamentos utilizados en la quimioterapia de las diferentes infecciones parasitarias, se han derivado del uso empírico y tradicional. La quimioterapia racional se basa en el trabajo del patólogo Paul Ehrlich en los años 1870's y 1880's. La aplicación por Ehrlich de la selectividad de los compuestos en el tratamiento de las infecciones por bacterias y protozoarios inició la quimioterapia moderna (Croft, 1994).

Por otro lado, como consecuencia del progreso sustancial ocurrido con el descubrimiento y el desarrollo de fármacos, particularmente en medicina veterinaria, en la actualidad se dispone de agentes efectivos capaces de curar o controlar la mayoría de las infecciones humanas producidas por helmintos intestinales. Algunos de los compuestos que se utilizan en la actualidad para el tratamiento de las diversas infecciones por helmintos se enlistan a continuación (Tabla 3).

Tabla 3. Perfil terapéutico de fármacos empleados en el tratamiento de helmintosis humana.

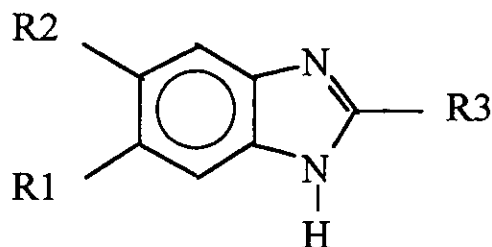
Fármaco (Inventor/compañía)	Dosis recomendada en adulto (oral)	Helmintiasis
amoscanato (Ciba-Geigy)	7 mg/kg por 3 días	Schistosomiasis
bithionol (I.G. Farbenind, Monsanto)	30 – 50 mg/kg distribuido en 10 a 15 dosis o en días alternados	Paragonimiasis e infección por <i>F. hepática</i>
diclorofeno (Burton T. Bush)	2 a 3 g cada 8 horas por 3 dosis	Infecciones por <i>T. solium</i> y <i>T. saginata</i>
dietilcarbamazina (American Cyanamid)	4-6 mg/kg (citrato) ó 2-3 mg (base) dado en 3 dosis durante 14-21 días	Filiariasis linfática y loasis
ivermectina (MSD)	Dosis única de 100-200 µg/kg	Filiariasis linfática
levamisol (Janssen, ICI)	Dosis única de 2.5 mg/kg	Ascariasis
metronidazol (Rhone-Poulenc)	250 mg 3 veces al día por 3 días	Infección por el parásito de Guinea
metrifonato (Bayer)	7.5 mg/kg por 5 días	Cisticercosis
niridazol (Ciba)	25 mg/kg por 7 días	Schistosomiasis
praziquantel (E. Merck, Bayer)	50 mg/kg/día por 15 días 25 mg/kg por 3-6 días Dosis única de 40 mg/kg	Cisticercosis Schistosomiasis
tetracloroetileno (Columbia-Southern)	0.1 mL/kg (max. 5 mL) en ayuno	Infecciones por <i>Ancylostoma</i> y <i>Heterophyes</i> sp.
niclosamida (Bayer)	2 g (divididos en 4 tabletas masticables)	Todas las infecciones por gusanos planos

oxamniquina (Pfizer)	15 mg/kg dos veces al día por 3 días	<i>Schistosomia mansoni</i>
pamoato de pirantel (Pfizer)	Dosis única de 10 mg/kg (max.1 g) 10-20 mg/kg	Ascariasis, enterobiasis Infecciones por <i>Ancylostoma</i>
pamoato de oxantel (Pfizer)	Dosis única de 10-20 mg/kg (base)	Trichuriasis
piperazina (Dow, BDH, etc.)	75 mg/kg (max. 3.5-4 g) por 2 días	Ascariasis, enterobiasis
cambendazol (MSD)	5 mg/kg	Strongyloidiasis
mebendazol (Janssen)	100 mg dos veces al día por 3 días 200 mg dos veces por 20 días 400-600 mg 3 veces al día por 21-30 días	Ascariasis, enterobiasis, trichuriasis, strongyloidiasis Capiliariasis Quiste hidatídico
flubendazol (Janssen)	200 mg diariamente por 3 días ó 100 mg dos veces por días durante 3 días	Infecciones por <i>Ancylostoma</i> y trichuriasis
albendazol (SKF)	Dosis única de 400 a 800 mg	Ascariasis, enterobiasis, trichuriasis, strongyloidiasis e infecciones por <i>Ancylostoma</i>
tiabendazol (MSD)	25 mg/kg (max. 3g en dosis diaria)	Enterobiasis, trichinosis, strongyloidiasis, capilariasis, larva migrans cutánea y toxocariasis

Tomado de Sharma (1994).

Con respecto al tratamiento de las diferentes parasitosis tisulares, se requiere de productos que alcancen concentraciones plasmáticas adecuadas para erradicar la infección. Algunos medicamentos tienen actividad biológica o farmacológica adecuada, pero por lo general tienen otras características no deseables, por ejemplo, alta toxicidad, insolubilidad o problemas para su metabolismo; persistiendo la imperiosa necesidad de disponer de fármacos adecuados para combatir distintos tipos de infecciones sistémicas como la cisticercosis, equinococosis, la filariasis y la trichinellosis, las cuales requieren para su tratamiento de grandes dosis y tratamientos largos. Por lo que, se requiere diseñar nuevas estructuras, con mejores características de solubilidad, permeabilidad y metabolismo. En la actualidad, una gran variedad de estructuras químicas se han probado como moléculas líderes, como sustancias antiparasitarias. Uno de los grupos que ha dado resultados exitosos es el de los bencimidazoles, algunos de los cuales ya se utilizan en la clínica (Tabla 4).

Tabla 4. Derivados bencimidazólicos con actividad antiparasitaria a nivel intestinal y sistémico.



Nombre genérico	R ¹	R ²	R ³
fenzidol	H	H	Ph
tiabendazol	H	H	Tiazol-4-il
cambendazol	H	NHCCCCOO-iPR	Tiazol-4-il
carbendazim	H	H	NHCOOMe
lobendazol	H	H	NHCOOEt
benomil	CONHBu-n	H	NHCOOMe
parbendazol	H	n-Bu	NHCOOMe
mebendazol	H	COPh	NHCOOMe
flubendazol	H	COC ₆ H ₄ -4-F	NHCOOMe
ciclobendazol	H	CO-C-C ₃ H ₅	NHCOOMe
nocodazol	H	CO-tien-2-il	NHCOOMe
fenbendazol	H	SPh	NHCOOMe
oxfendazol	H	SOPh	NHCOOMe
albendazol	H	S-n-Pr	NHCOOMe
oxibendazol	H	O-n-Pr	NHCOOMe
luxabendazol	H	4-FC ₆ H ₄ SO ₃	NHCOOMe
triclabendazol	Cl	2,3-Cl ₂ C ₆ H ₃ O	SMc
ricobendazol	H	SO-n-Pr	NHCOOMe

Tomado de Sharma (1994).

La primera estructura sintetizada fue el **tiabendazol**. Este fármaco es activo contra una gran variedad de nematodos que infestan el tracto gastrointestinal de animales domésticos;

tiene actividad larvicida y ovicida *in vitro* en concentraciones muy bajas (Brown y cols., 1961).

Aunque el mecanismo de acción primario del **tiabendazol** se desconoce, se cree que inhibe el sistema fumarato reductasa específico de las mitocondrias de los helmintos, posiblemente por interacción con una quinona endógena. El **tiabendazol** se absorbe rápidamente después de su administración oral, las concentraciones máximas en plasma se alcanzan 1 hora después de su administración; pero sólo un pequeño porcentaje, cerca del 2%, llega a circulación sanguínea. La mayor parte se excreta dentro de las 24 horas, por la orina, como **5-hidroxtiabendazol** conjugado como glucurónido o como sulfato. Aunado a lo anterior, Kean y Hoskins (1964) y Webster (1985), encontraron una gran incidencia de reacciones alérgicas graves hacia este producto.

Kean y Hoskins (1964) demostraron que el **tiabendazol** destruye al parásito *Trichinella spiralis* cuando se administra a ratones o cerdos, 24 horas después de la infección. El **tiabendazol** a dosis de 50 mg/kg de peso corporal/día, puede evitar la aparición de síntomas adversos si se administra a partir del segundo día de la ingestión de carne infectada con el parásito, o mitiga la enfermedad, si se da entre el quinto y el noveno día tras la infección.

Otro derivado bencimidazólico sintetizado es el **mebendazol**, muy utilizado particularmente contra nematodos gastrointestinales donde su acción es independiente de su concentración sistémica. Este fármaco es efectivo en ascariasis, capilariasis intestinal, enterobiasis, trichuriasis, anquilostomiasis y en trichinellosis. El fármaco es activo tanto en los estadios larvarios, como en los adultos de los nematodos que producen estas infecciones y es ovicida para *Ascaris* y *Trichuris* (Keystone y Murdoch, 1979). La inmovilización y la muerte de parásitos, susceptibles al **mebendazol**, se produce lentamente y su eliminación del tracto gastrointestinal puede no completarse hasta varios días después del tratamiento con este fármaco. El fármaco produce la desaparición selectiva de los microtúbulos citoplasmáticos de las células tegumentarias e intestinales de

los parásitos afectados, así como la alteración de las sustancias secretorias acumuladas en el aparato de Golgi, la secreción de acetilcolinesterasa y el consumo de glucosa y el agotamiento del glucógeno (Watts y cols., 1982; Bughio y cols., 1994). Por otro lado, Boczon y cols. (1984) encontraron que esta acción se debe a que afecta al complejo succinato deshidrogenasa-fumarato reductasa y afecta a la cadena del transporte de electrones entre una quinona y la NADH deshidrogenasa.

El **mebendazol** se absorbe en forma deficiente y errática. Las concentraciones del fármaco en el plasma son bajas y no reflejan la dosis ingerida (Witassek y cols., 1981; Levin, 1983). El **mebendazol** presenta metabolismo de primer paso, dando lugar a dos metabolitos el metil 5-(4-hidroxi-bencil)-1H-2-benzimidazol carbamato de metilo y 2-amino-5-benzoil-1H-2-benzimidazol carbamato de metilo.

Otro derivado benzimidazólico es el **albendazol**, que en la actualidad es un fármaco antihelmíntico de amplio espectro, que se utiliza tanto en el tratamiento de Ascariasis (*Ascaris lumbricoides*), Tricocefalosis (*Trichuris trichuria*), Enterobiasis (*Enterobius vermicularis*), Uncinariasis (*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*), Solitarias (*Hymenolepis nana* y *Taenia spp*), Estrongiloidosis (*Strongyloides stercoraria*), trichinellosis (*T. spiralis*) y cisticercosis (*C. cellulosae*). Este fármaco ha mostrado una mayor eficacia en el tratamiento de las helmintosis comparándolo con otros benzimidazoles, como el flubendazol, mebendazol, etc. (McCracken y Lipkowitz, 1990; Katiyar y cols., 1994). Además, Saimont y cols. (1983), demostraron que el **albendazol** es muy bien tolerado por los pacientes.

El **albendazol** ejerce su efecto antihelmíntico, en forma similar al mebendazol. Después de la administración oral del **albendazol** (15 mg/kg), se absorbe, alcanzando aproximadamente entre las dos y cuatro horas concentraciones plasmáticas máximas (3-5 µg/ml). De una dosis comercial de 400 mg, sólo el 5% se absorbe en el tracto intestinal. Esto es debido a su limitada solubilidad en el fluido gastrointestinal (Marriner y cols., 1986).

El **albendazol** tiene un extenso metabolismo de primer paso, por lo que es difícil detectarlo en plasma u orina, como tal. Sus principales metabolitos son el **sulfóxido de albendazol**, que presenta una gran actividad antihelmíntica y una vida media en plasma de aproximadamente 8.5 horas; y **sulfona de albendazol** que no presenta actividad alguna (Penicaut y cols., 1981).

El **sulfóxido de albendazol** alcanza su máxima concentración entre las 2 y las 4 horas en el humano (Marriner y Bogan, 1980; Penicaut y cols., 1981), se liga a proteínas plasmáticas en forma variable, aunque se ha observado que lo hace en un 70%. Existe una gran variabilidad en los niveles plasmáticos máximos alcanzados en individuos tratados, al igual que las áreas bajo la curva. Se ha considerado al **sulfóxido de albendazol** como el responsable de la acción del **albendazol**; debido principalmente a que el **albendazol** no se encuentra como tal en el plasma (McCracken y Lipkowitz, 1990).

Aunque existen pocos reportes sobre la farmacocinética del **albendazol**, en pacientes con cisticercosis cerebral, a los que se les administró **albendazol** a una dosis de 15 mg/kg de peso, sólo se detectó **sulfóxido de albendazol** en plasma y los niveles fueron muy variables entre los pacientes. El tiempo medio de residencia del **sulfóxido de albendazol** es de 14 a 20 horas, y el tiempo medio de absorción de entre 10 a 15 horas (Jung y cols., 1992).

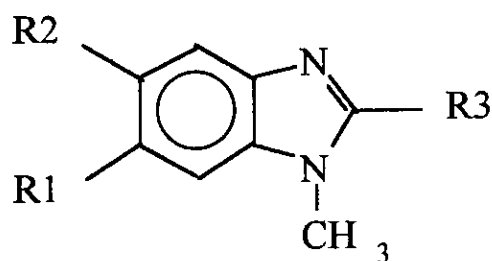
Además, Jung y cols. (1998), han demostrado que la solubilidad del **albendazol** es mayor en dimetilsulfóxido y ácido acético que en soluciones acuosas. Por otro lado, encontraron que el **albendazol** se absorbe en el tracto gastrointestinal de ratas en el siguiente orden: ileón>yeyuno>colon>duodeno. Por último, la cinética de absorción que se encontró a lo largo de todo el tracto gastrointestinal fue de orden cero. Con respecto al **sulfóxido de albendazol**, este es menos soluble que el **albendazol**, se encuentra en forma no ionizada a pH 7.4, lo cual explica el paso a través del fluido cerebroespinal.

Algunos autores han reportado que la absorción del **albendazol** se lleva a cabo por un proceso no saturable como la difusión pasiva (Prieto y cols., 1991; Jung y cols., 1998). En estos estudios se concluyó que la solubilidad y no la liposolubilidad es la etapa limitante en el proceso de absorción del **albendazol**.

A pesar de los grandes esfuerzos realizados para obtener compuestos con un espectro de actividad amplio que actúen no sólo a escala intestinal, sino a nivel extraintestinal con mejores características de solubilidad que el **albendazol**, éste sigue siendo uno de los bencimidazoles de mayor uso a escala mundial.

A este respecto, como una estrategia para obtener compuestos con amplio espectro de actividad biológica, con procesos de síntesis sencillos y económicos, en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM, se sintetizaron 16 derivados del anillo bencimidazol. Estos compuestos presentan en la posición 1, un grupo metilo, con lo cual evita el equilibrio tautomérico, propio del anillo bencimidazol. En la posición 5 y/ó 6 se colocó un radical cloro y en la posición 2 se colocan diversos grupos funcionales (Tabla 5).

Tabla 5. Derivados bencimidazólicos sintetizados en la Facultad de Química.



Compuesto	R1	R2	R3
1	H	H	CH ₃
2	H	H	NH ₂
3	H	H	SH
4	H	H	SCH ₃
5	Cl	H	CH ₃
6	Cl	H	NH ₂
7	Cl	H	SH
8	Cl	H	SCH ₃
9	H	Cl	CH ₃
10	H	Cl	NH ₂
11	H	Cl	SH
12	H	Cl	SCH ₃
13	Cl	Cl	CH ₃
14	Cl	Cl	NH ₂
15	Cl	Cl	SH
16	Cl	Cl	SCH ₃

En términos generales, como se mencionó con anterioridad, después de la síntesis de nuevos compuestos, se requiere llevar a cabo la determinación *in vitro* de su actividad biológica, para posteriormente determinar su comportamiento de permeabilidad. A los compuestos activos con buenas características de solubilidad y permeabilidad se les evalúa su actividad y biodisponibilidad *in vivo*.

La primera selección de la actividad biológica de estos compuestos contra parásitos, se llevó a cabo mediante un ensayo *in vitro* basado en la reducción de la sal de tetrazolium (MTT) empleando organismos adultos y larvas musculares de *Trichinella spiralis*, los cuales representan la fase enteral y sistémica del parásito respectivamente. La reducción del MTT indica la capacidad metabólica del parásito, por lo que cuando la reducción del MTT, medida en absorbencia a 750 nm es menor con respecto al control, esto es indicativo de que el compuesto evaluado tiene actividad contra el parásito. Además, en este ensayo se incluyó como control positivo al **albendazol** (Tabla 6).

Tabla 6. Reducción de la actividad metabólica (%) de los organismos adultos y larvas musculares de *T. spiralis* en presencia de los derivados del 1-metilbencimidazol.

Compuesto	Adulto	Larva muscular
albendazol	28	22
1	6	25
2	NR	9
3	NP	NP
4	NP	NP
5	8	14
6	NR	12
7	23	7
8	34	24
9	25	14
10	NR	14
11	NP	NP
12	14	9
13	23	24
14	NR	26
15	15	30
16	29	22

NP = No se probó NR = No redujo

Los resultados obtenidos indican que en general los compuestos 8, 13, 16 obtuvieron los mayores porcentajes de actividad *in vitro* contra ambas fases del parásito *Trichinella spiralis*. Cabe mencionar que estos compuestos tuvieron una actividad antihelmíntica similar a la del albendazol.

A pesar de que estos compuestos presentaron actividad contra la fase muscular de *T. spiralis*, para seleccionar un compuesto con actividad sistémica es importante determinar su permeabilidad; ya que, la mayoría de los compuestos que se utilizan en la clínica, se administran por vía oral. Lo anterior debido principalmente a la comodidad en la administración, que no se necesitan materiales especiales para la dosificación y en general los procesos de fabricación no son costosos, por lo que se requiere continuar con la evaluación de la permeabilidad de los compuestos que *in vitro* resultaron activos.

Por otro lado, Amidon y cols. (1995) determinaron que la disolución de un fármaco en el tracto gastrointestinal y la permeabilidad intestinal son los factores más importantes que controlan la biodisponibilidad de un fármaco.

La biodisponibilidad de una sustancia se define como la cantidad y velocidad a la cual una molécula activa llega a la circulación sistémica. La biodisponibilidad involucra diversos componentes biológicos entre los cuales están; las velocidades de disolución y liberación del fármaco de su forma farmacéutica, la permeabilidad intestinal, el metabolismo intestinal, la estabilidad en plasma, el metabolismo hepático de primer paso y la excreción biliar (figura 2). Así, la biodisponibilidad es un parámetro farmacocinético que nos describe el grado de absorción y metabolismo de un fármaco administrado por vía oral. La biodisponibilidad está relacionada con su eficacia contra diversas enfermedades sistémicas.

La velocidad de disolución y liberación se puede caracterizar por métodos *in vitro*; sin embargo, las velocidades de absorción, metabolismo y eliminación, son difíciles de medir en forma exacta por métodos *in vitro* (Rubas y cols., 1996b).

Así mismo, la absorción está influida por la relación dosis/disolución, la degradación química y/o el metabolismo en el lumen, complejos de unión luminal, tránsito intestinal y la permeabilidad efectiva (P_{eff}) a través de mucosa intestinal (Lennernäs, 1997).

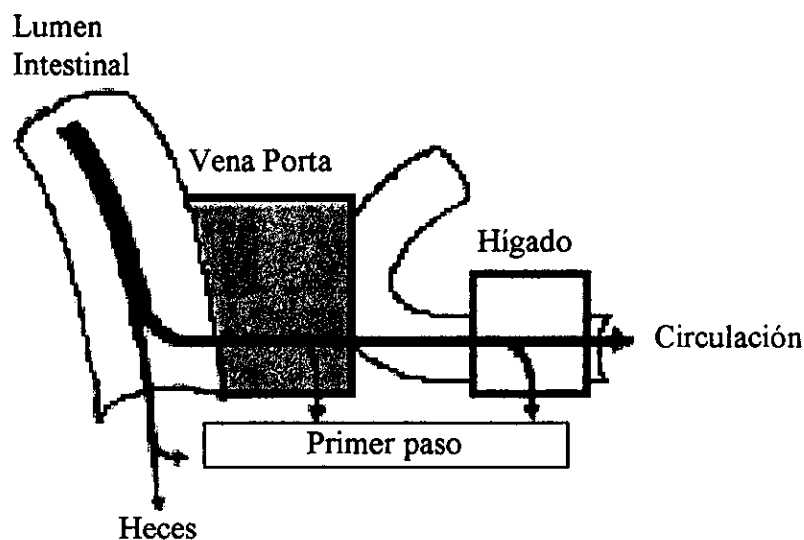


Figura 2. Barreras de la biodisponibilidad.

La P_{eff} es una de las variables que controlan la cantidad y velocidad de la absorción. Refleja el transporte en la membrana y la permeabilidad de la mucosa celular incluyendo los procesos de paso a través de membrana (Lennernäs, 1997).

Desde un punto de vista fisiológico, la absorción es el proceso por el cual sustancias del medio externo tienen acceso al ambiente interno. Es un proceso de tipo unidireccional. En el hombre, el tracto gastrointestinal, los pulmones y la piel representan los sitios más importantes de entrada de materiales exógenos. En cada uno de estos sitios, el movimiento de sustancias se lleva a cabo a través de tejidos, que sirven como barreras anatómicas.

Las sustancias se pueden absorber de 2 formas principalmente; por la vía paracelular o por la vía transcelular (figura 3). En la primera vía el fármaco pasa a través de las uniones

estrechas entre las células, es considerada la principal forma de paso para la absorción de pequeñas moléculas hidrofílicas, así como moléculas cargadas e incluso de algunos fármacos de bajo peso molecular (Madara y Pappenheimer, 1987). La absorción ocurre en forma de difusión pasiva, en la cual el paso a través de la membrana celular es la etapa limitante en el proceso de absorción (Fagerholm y cols., 1996; Pade y Stavchansky, 1997).

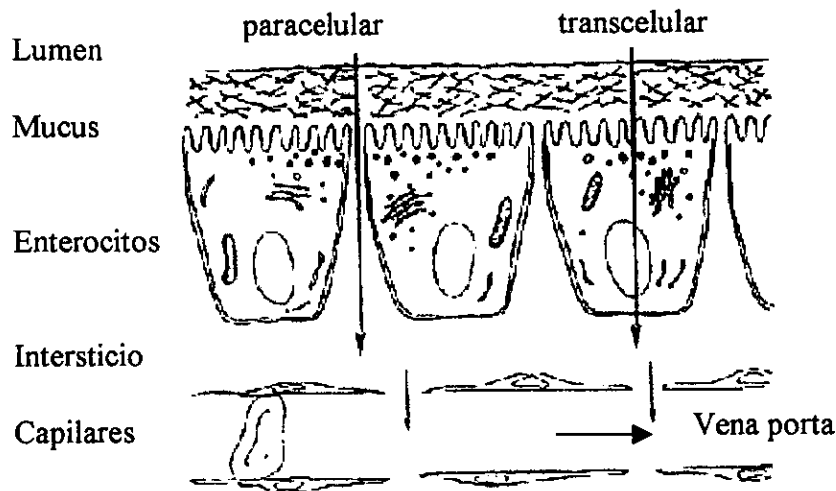


Figura 3. Membrana gastrointestinal y formas de transporte de fármacos.

En relación con la segunda vía, ésta involucra el paso de compuestos dentro de la célula. Se lleva a cabo con compuestos con características lipofílicas, por procesos de transporte pasivo, activo o facilitado.

Para compuestos que se absorben pasivamente, la contribución de cada una de estas vías al transporte dependen del pK_a , coeficiente de partición, radio molecular y la carga del fármaco, del pH de la solución luminal y el área superficial disponible para la absorción y permeabilidad a través de las diferentes capas. La permeabilidad de la monocapa celular es una combinación de la permeabilidad a través de las vías transcelular y paracelular (Pade y Stavchansky, 1997).

El principal sitio de absorción de un fármaco después de su administración por vía oral, son las células del intestino delgado. Una sustancia del medio externo que logra acceder al ambiente interno por medio del canal alimenticio, primero entra por la boca, pasa por el esófago, entra al estómago y por último al intestino delgado. A todo lo largo del tracto gastrointestinal, la sustancia está en contacto con las células del epitelio, las cuales forman una capa, conocida como mucosa. En cada una de las partes del tracto gastrointestinal, la mucosa tiene diferentes características morfológicas y una especialización funcional, la cual se observa por la variación morfológica en las diferentes regiones intestinales, como en el área superficial disponible para la absorción y/o en la densidad de las uniones estrechas, en la composición y la fluidez lipídica (Brasitus y Dubeja, 1985; Collet y cols., 1997) (figura 4).

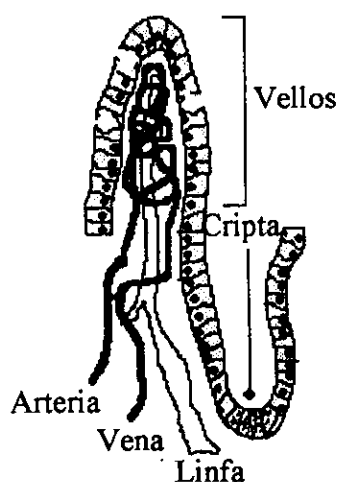


Figura 4. Morfología de la mucosa intestinal

El intestino delgado es un tubo contorneado, conformado por cuatro capas: mucosa, submucosa, muscularis y serosa. La mucosa se puede subdividir en: epitelio vellosos, células epiteliales generadoras de la cripta, diversas células especializadas que se encuentran en las vellosidades y el epitelio de la cripta. Al microscopio la mucosa parece estar conformada de crestas, conocidas como *valvulae conniventes* o válvulas de

Kerkring, que corren oblicuamente a través del tracto intestinal e incrementan el área superficial en 2 a 3 veces, con relación a la superficie serosa. Las crestas, bajo el microscopio de óptico, se observan como proyecciones en forma de dedo, conocidas como vellos (*villi*), las cuales tienen una altura de 200-1000 μm . Estos vellos incrementan la capacidad de absorción, no sólo al incrementar en ocho veces la superficie disponible, también como resultado de sus contracciones rítmicas espontáneas, bombeando el contenido a lo largo de toda la estructura y hasta los vasos linfáticos de la submucosa (figura 5).

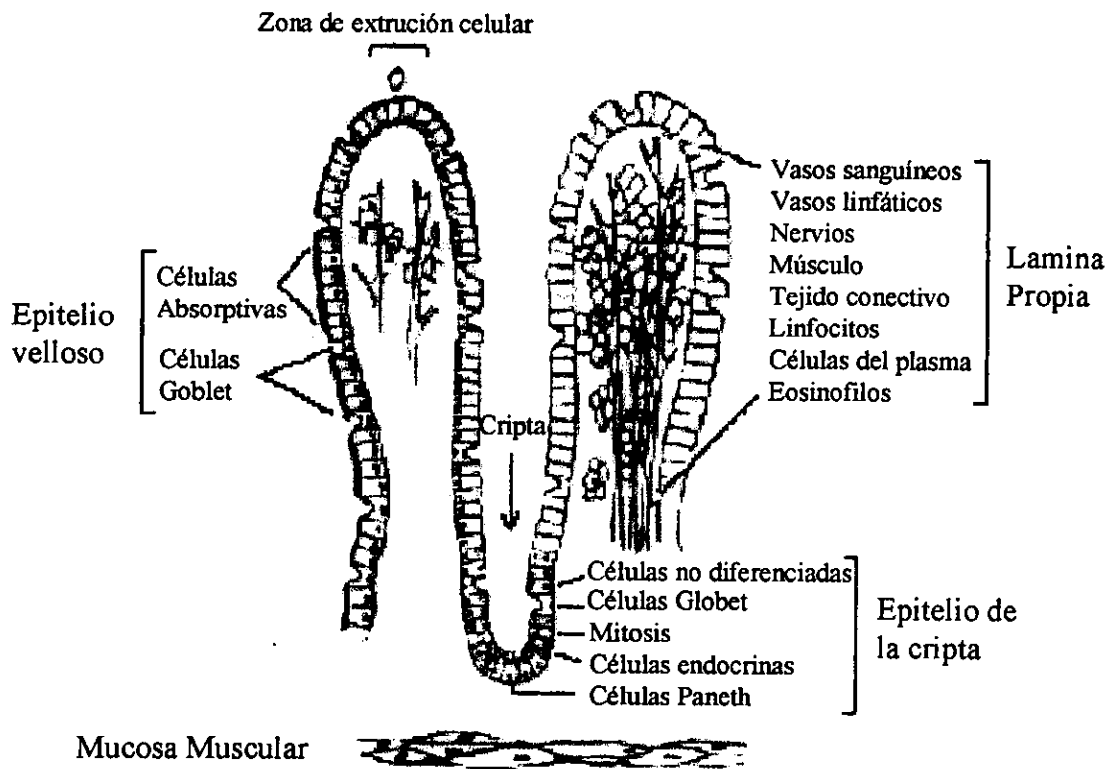


Figura 5. Morfología de la mucosa gastrointestinal

Los vellos de la mucosa y sus criptas están cubiertos por una sola capa de epitelio compuesto principalmente de dos tipos de células: las células columnares y las células

calciformes secretoras de moco. Las células epiteliales descansan sobre una membrana basal que las separa del tejido conectivo del vello, la lámina propia.

Las células más importantes y numerosas del epitelio, son los enterocitos. Estos tienen entre sus caras laterales interdigitaciones y conexiones desmosómicas complejas; en sus vértices se sostienen en contacto estrecho por un complejo de unión especializado, con lo cual se conserva así la continuidad estructural de la mucosa. La característica más distintiva de la mucosa intestinal, es el borde apical de cepillo, que consiste de una disposición regular de microvellosidades de 1 μm de largo y 0.1 μm de diámetro, recubiertas por un glucocálix rico en carbohidratos elaborados por los enterocitos, el cual se piensa no sólo tiene una función protectora, sino también un papel importante en la modificación y presentación del contenido luminal a los enterocitos.

Los enterocitos tienen un alto contenido de mitocondrias, un sistema de Golgi notable y los lisosomas en la parte apical. Los lisosomas son organelos que contienen hidrolasa ácida y comprende los cuerpos densos, vesículas autofásicas y cuerpos multivesiculares. También hay un retículo endoplásmico liso y rugoso bien desarrollado. El núcleo ocupa la zona basal del enterocito y se encuentra en la mitad baja del epitelio, que carece de complejos de unión, en donde hay una gran variación en la separación entre las paredes celulares. Pegada a la cara basal de los enterocitos se encuentra una lámina basal delicada, pero bien formada (figura 6).

Los enterocitos tienen muchos transportadores en ambas superficies, que le facilitan la absorción de diversas sustancias, entre algunos de ellos están el transportador de glucosa dependiente de sodio, el cual no se localiza fácilmente en diversas líneas celulares y en algunos casos, disminuye su actividad por los diversos mecanismos de extracción y purificación de los componentes celulares (Dantzig y Bergin, 1990). Así como, enzimas en el borde de cepillo como la sacarosa isomaltasa, leucina aminopeptidasa y la folato conjugasa (Rigtrup y Ong, 1992).

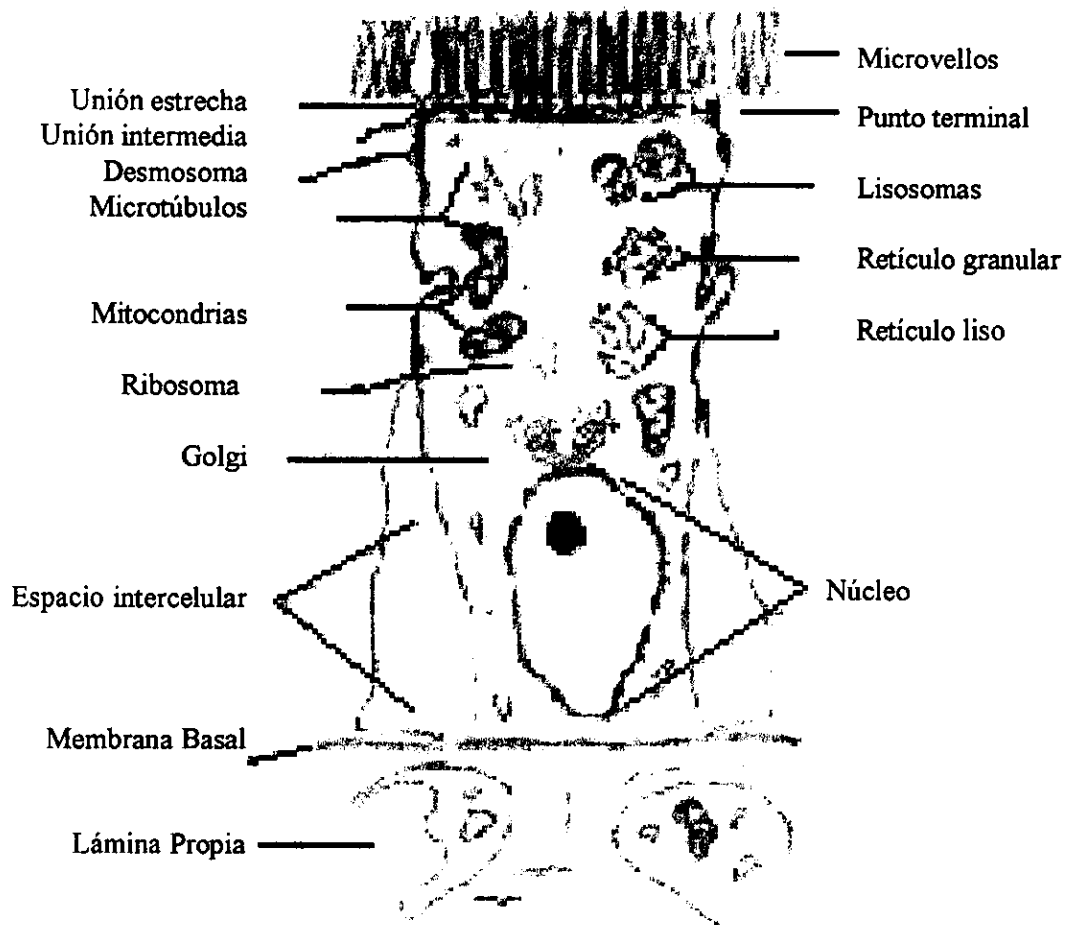


Figura 6. Morfología del enterocito.

Para determinar la permeabilidad intestinal, inicialmente se midió la excreción urinaria de diversas sustancias de prueba, como la lactulosa, polietilenglicol y EDTA ^{51}Cr . Sin embargo, estas técnicas *in vivo* eran afectadas por factores biológicos como el tránsito intestinal, el metabolismo y la eliminación renal, lo cual no refleja la real permeabilidad intestinal (Lennernäs, 1997).

En la actualidad, existen diversas técnicas que se han desarrollado para la determinación de la permeabilidad intestinal y del proceso de absorción, entre éstas se incluyen técnicas *in situ* como circuitos intestinales e intestino y colon perfundido y técnicas *in vitro* como

el saco invertido, células aisladas de la mucosa intestinal y vesículas aisladas de la membrana del borde de cepillo (Hidalgo y cols., 1989; Stewart y cols., 1995).

El uso de la técnica del saco invertido y los circuitos intestinales se fundamenta en que, un compuesto es administrado en el lado luminal y la velocidad de desaparición de este lado se asume que es igual a la velocidad de absorción. La limitante radica en que, existen compuestos que se pueden unir a la superficie celular o en sitios intracelulares después de ingresar al epitelio intestinal, además existen compuestos que pueden ser metabolizados en el lumen o durante el transporte transepitelial. Para estas técnicas la velocidad de absorción obtenida bajo el anterior supuesto será una velocidad sobrestimada del valor real (Hidalgo y cols., 1989; Lundin y cols., 1990).

Con respecto al intestino perfundido, la técnica consiste en tomar muestras de sangre o linfa de las venas mesentéricas y ductos linfáticos, esto nos permite estimar mejor la velocidad de absorción, su limitante principal es que no proporciona mayor información sobre el proceso involucrado en el transporte transmucoso de los fármacos (Hidalgo y cols., 1989).

Las células aisladas de la mucosa se han utilizado en diversos estudios de transporte a nivel celular y/o molecular. El principal problema es la limitada viabilidad, por lo general, son viables durante 30 a 45 minutos. Además, el proceso de aislamiento de las células de la mucosa produce pérdida de la polaridad celular y puede causar daño sustancial a las células. Por otro lado, las vesículas de la membrana del borde de cepillo son estructuras relativamente simples, las cuales no tienen la limitante de la viabilidad, pero son relevantes sólo en estudios de interacción de los compuestos con el borde de cepillo, sin proporcionar ningún dato sobre el transporte intracelular. Además, en ocasiones la preparación de las vesículas puede alterar las enzimas o los receptores que pueden estar involucrados en el transporte transepitelial y/o en el metabolismo (Hidalgo y cols., 1989; Rigtrup y Ong, 1992; León y cols., 1993).

Las técnicas *in situ* como *in vitro* mencionadas, presentan algunas limitaciones en la versatilidad de la determinación, en la viabilidad celular del tejido o fracciones celulares aisladas, en la conservación y obtención de la polaridad celular, el difícil acceso al lado basolateral de las células, la presencia de numerosas capas de tejido y la pérdida de la capacidad metabólica del tejido o cultivo celular (Hidalgo y Borchardt, 1990b).

La determinación de la permeabilidad intestinal y del proceso de absorción también puede realizarse mediante el empleo de líneas celulares epiteliales. Para esto, a partir de los años 80's se han tratado de obtener líneas celulares derivadas de enterocitos o establecer cultivos de células del epitelio intestinal. Para llevar a cabo lo anterior, se han establecido tanto líneas celulares derivadas del enterocito normal como diversas líneas celulares provenientes de algunos adenocarcinomas de humano utilizando inductores de una diferenciación enterocítica.

Con respecto a la primera alternativa, Quaroni y cols. (1979) establecieron una línea de células permanentes del intestino de rata; sin embargo, esta línea no desarrolló ningún patrón de diferenciación morfológico ni bioquímico a enterocito maduro.

Con respecto a la segunda alternativa, algunos autores han demostrado que la adición de sustancias como butirato de sodio y DMSO incrementan significativamente la actividad de algunas de las enzimas asociadas al borde de cepillo en línea celulares provenientes de cáncer colorectal; sin embargo, no se obtiene una diferenciación estructural (Kim y cols., 1980). Por otro lado, Pinto y cols. (1982) encontraron que si reemplazaban la glucosa por galactosa en el medio de cultivo de la línea HT29, obtenían una diferenciación estructural y funcional parcial de la línea.

Con la intención de extender esta misma experiencia a otras líneas de células, observaron que una de ellas, la línea celular Caco-2, que proviene de un adenocarcinoma de colón de humano, bajo condiciones estándar de cultivo *in vitro* y en ausencia de inductores de

diferenciación, espontáneamente exhibe signos de diferenciación estructural y polarización (Pinto y cols., 1983; Hidalgo y cols., 1989).

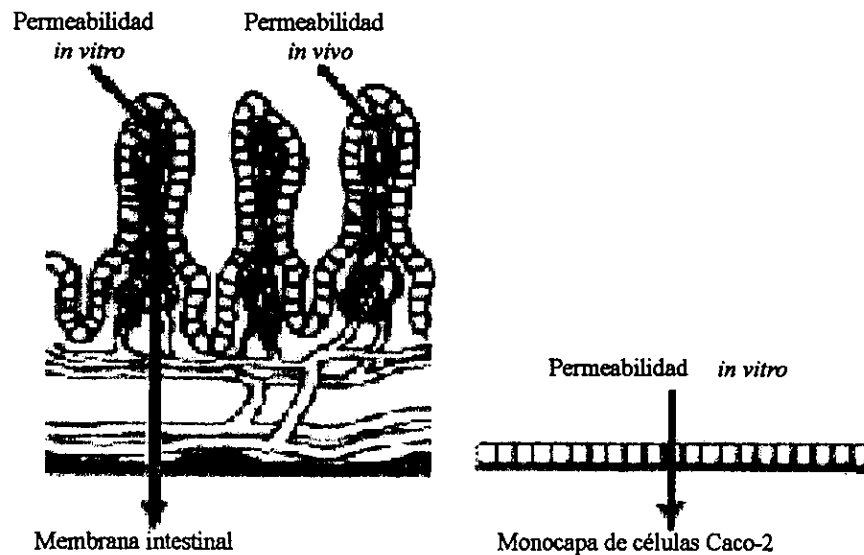


Figura 7. Comparación entre la membrana gastrointestinal y la monocapa de células Caco-2.

La monocapa celular al día 16 de cultivo, consiste de células de aproximadamente 30 μm , que poseen una similitud morfológica a la descrita para un epitelio columnar simple del intestino delgado. La diferenciación es total cuando se llega a la confluencia, que se obtiene a los 6 – 7 días de incubación (Hidalgo y cols., 1989). Mediante microscopía de transmisión se observa que la parte superior de la monocapa se cubre con microvellosidades típicas del borde de cepillo, las cuales se extienden perpendicularmente hacia la superficie (Pinto y cols., 1983).

La diferenciación funcional se caracteriza por altos niveles de diversas enzimas asociadas al borde de cepillo, además de poseer marcadores bioquímicos distribuidos entre sus 2 superficies celulares (apical y basolateral). En la superficie apical, los niveles de fosfatasa

alcalina y sacarosa-isomaltosa son cercanos al 50% de los encontrados en preparaciones similares del intestino delgado de humano y 10% en el caso de aminopeptidasas. La actividad específica en la membrana se enriquece de 8 a 10 veces, comparada con el inicio. En la membrana basolateral se localizan receptores para la transferrina y el factor de crecimiento epidermal (Dantzig y Bergin, 1990). La diferenciación enterocítica funcional de las microvellosidades del borde de cepillo se asocia con la formación de domos los cuales son típicos de monocapas de transporte epitelial.

En la línea celular Caco-2, se han descrito diversos mecanismos de transporte, entre ellos: la bomba transmembrana de 170 KD, conocida como glicoproteína-P (P-gp), la cual es responsable del desarrollo de resistencia a multifármacos (Augustijs y cols., 1993), el transportador del ácido fólico, de glucosa dependiente de sodio (Blais y cols., 1987), de dipéptidos (Dantzig y Bergin, 1990; Inui y cols., 1992), de fosfatos dependiente de sodio (Mohrmann y cols., 1986) y un antiportador Na^+/H^+ (Wali y cols., 1989), de ácidos biliares que se expresa a las 2 semanas (Hidalgo y Borchardt, 1990b) y el transportador de aminoácidos (Hidalgo y Borchardt, 1990a). Por otro lado, la línea celular Caco-2 tiene baja actividad de monoacilglicerol transferasa, lo que indica que esta vía de entrada no es muy activa en comparación con las células en el intestino normal (Mehran y cols., 1995), expresa fenol – sulfotransferasa, UDP-glucuronil transferasa y algunas de las isoenzimas del citocromo P_{450} (Raeissi y cols., 1997).

La resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de la monocapa celular es dependiente del número de pases llevados a cabo, la TEER se incrementa de 96.6 a 173 Ωcm^2 al día 6. El valor de TEER es mayor en la línea celular al encontrado en el intestino delgado (300 Ωcm^2 contra 140 Ωcm^2) lo cual indica la presencia de uniones celulares más estrechas (Collett y cols., 1996).

Actualmente, algunos autores han propuesto diversas clasificaciones en base de la permeabilidad intestinal y la disolución *in vitro* de los fármacos. La clasificación más aceptada es la descrita por Amidon y cols. (1995), que propone un esquema de

clasificación biofarmacéutico en el cual se correlacionen la disolución y la biodisponibilidad determinada como permeabilidad. Así se clasifican a los fármacos en 4 clases: Clase I. Solubilidad alta - permeabilidad alta; Clase II. Solubilidad baja – permeabilidad alta; Clase III. Solubilidad alta – permeabilidad baja y Clase IV. Solubilidad baja – permeabilidad baja. Utilizando esta clasificación, se sugiere que productos con una permeabilidad efectiva (P_{eff}) superior a 4×10^{-4} cm/seg se consideran como de permeabilidad alta (> 95%) y compuestos que su disolución no sea mayor de 15 minutos, como de disolución alta.

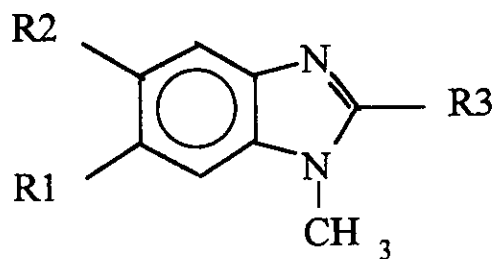
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los bencimidazoles son un grupo de fármacos que se emplean en el tratamiento de las enfermedades por helmintos. Sin embargo, a pesar de su amplia actividad en diversas parasitosis a nivel intestinal, su uso en parasitosis extraintestinales es limitado, debido principalmente a su escasa absorción en el ámbito intestinal; lo que tiene como consecuencia una baja concentración del fármaco en plasma. Con el fin de obtener fármacos con mejores características de solubilidad y un espectro de actividad biológica amplio, en el Departamento de Farmacia, de la Facultad de Química de la UNAM, se sintetizaron 4 series de compuestos derivados del 1-metilbencimidazol con diferentes sustituyentes en posición 2 (metilo, amino, mercapto y metiltio) y con cloro en posición 5 y/o 6. Algunos de estos compuestos al ser evaluados *in vitro* en contra del protozoario intestinal *Giardia lamblia* y de la fase enteral y parenteral del nemátodo *Trichinella spiralis*, tuvieron muy buena actividad. Cabe mencionar que los compuestos 8 y 16 tuvieron buena actividad antihelmíntica *in vitro* contra ambas fases de desarrollo de *Trichinella spiralis*. Estos compuestos tienen el mismo sustituyente en posición 2 (metiltio) y con cloro en posición 5 y en posiciones 5 y 6 respectivamente. Sin embargo, un paso importante en la obtención de compuestos con actividad biológica en el ámbito sistémico es contar con fármacos con buena biodisponibilidad oral y ésta depende entre otros factores, de su permeabilidad a través del epitelio intestinal. Existen varias técnicas que se emplean actualmente en la determinación de la permeabilidad intestinal y del proceso de absorción. En la actualidad, la línea celular Caco-2 se emplea en la medición de la permeabilidad aparente de diversos compuestos. Su utilidad radica en la similitud de la línea celular con el epitelio columnar del intestino delgado.

Considerando lo anterior, se seleccionaron los compuestos derivados del 1-metilbencimidazol 8 y 16, los cuales presentaron actividad contra la fase sistémica de *T. spiralis*. Con la finalidad de determinar su permeabilidad aparente empleando como modelo a la línea celular Caco-2. Además, en este estudio se incluyeron los compuestos 4 y 12 con la finalidad de correlacionar algunas características fisicoquímicas de los compuestos con su permeabilidad. Los compuestos 4, 8, 12 y 16 son metilbencimidazoles que en la posición

2 de la molécula presentan un grupo metilto y en las posiciones 5 y/o 6 tienen o no un grupo Cl (Tabla 7).

Tabla 7. Compuestos seleccionados.



Compuesto	R1	R2	R3
4	H	H	SCH ₃
8	H	Cl	SCH ₃
12	Cl	H	SCH ₃
16	Cl	Cl	SCH ₃

OBJETIVO GENERAL

Conocer algunas de las propiedades biofarmacéuticas de los compuestos 2-metiltio-1-metilbencimidazol (4), 5-cloro-2-metiltio-1-metilbencimidazol (8), 6-cloro-2-metiltio-1-metilbencimidazol (12) y 5,6-dicloro-2-metiltio-1-metilbencimidazol (16) y su actividad antiparasitaria *in vivo*.

OBJETIVO PARTICULAR

Determinar el coeficiente de permeabilidad aparente de los compuestos empleando la línea celular Caco-2.

Determinar la correlación entre el coeficiente de permeabilidad aparente y el coeficiente de distribución de los compuestos.

Determinar la correlación entre el coeficiente de permeabilidad aparente y la actividad antiparasitaria *in vivo* de los compuestos.

METODOLOGIA

1. METODO ANALITICO

Para la determinación y cuantificación de los compuestos derivados del 1-metilbencimidazol (4, 8, 12, 16) así como al albendazol y mebendazol, se utilizó el método analítico de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), desarrollado y validado por los laboratorios Absorption System en Exton, Pennsylvania (USA). Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron:

Equipo: Bomba Perkin Elmer Serie 200

Detector UV/VIS Perkin Elmer HPLC 785

Integrador Programa Turbochrom Versión 4.1 (Perkin Elmer)

Condiciones cromatográficas:

Fase móvil trietilamina al 0.1% ajustada a pH 3.1 con H₃PO₄:Acetonitrilo
(25:75)

Flujo 0.3 mL/min

Longitud de onda 260 nm

Columna Hypersil C18 BDS, tamaño de poro 3 µm, longitud 100 x 2 mm

2. DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE DISTRIBUCION (logD)

- a) **Solución stock.** Se prepararon en DMSO soluciones de cada uno de los compuestos (4, 8, 12, 16, albendazol y mebendazol) a una concentración de 10 mM.
- b) En un tubo eppendorff de 1.9 mL se colocaron 0.75 mL de 1-octanol y 0.75 mL de PBS pH 7.4, se adicionaron 15 µL de la solución stock de los compuestos. Se agitó la mezcla durante 30 minutos en vortex, posteriormente la solución se centrifugó por 10 minutos a 10,000 rpm. Las dos fases se separaron y se cuantificaron los compuestos por el método analítico anteriormente descrito.

3. DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE PERMEABILIDAD APARENTE (Papp)

Línea celular.

Se utilizó la línea celular Caco-2 ASI4, la cual fue proporcionada por el Dr. Ismael Hidalgo de los laboratorio Absorption Systems (Exton, PA). Las células se cultivaron en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), conteniendo 10% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomycin y de 1 mM de piruvato de sodio. Las células se mantuvieron y crecieron en cajas de cultivo de 75 cm² a 37°C, 85% de humedad relativa y 5% de CO₂. Las células se recultivaron cada 4 días obteniéndose de cada caja de cultivo 3 nuevas cajas, utilizando una solución de tripsina-EDTA (anexo A), a una confluencia en la línea celular no mayor del 80%. Para los estudios de permeabilidad, las células se cultivaron sobre membranas de policarbonato en insertos Transwell® de 12 mm de diámetro interno, 0.4 µm de tamaño de poro y una área de cultivo de 1.13 cm², previamente cubiertas con una capa de solución 3.64 mg/mL de colágena de rata tipo I (Lakeside). Las células se utilizaron entre los pases 58 y 61, y se cultivaron a una densidad de 60,000 células/cm². El medio de cultivo en los insertos se cambió a las 24 horas de iniciado el cultivo, posteriormente cada tercer día, hasta el día 8 de cultivo, y por último se cambió el medio cada día (volumen apical 0.5 mL, volumen basolateral 1.5 mL), hasta el día de realización del experimento (día 28 a 30).

Integridad de las monocapas.

Previo a la realización de los experimentos de transporte, las monocapas celulares de 28 a 30 días de cultivo, se lavaron y preincubaron a 37°C y 5% de CO₂, por una hora con el amortiguador de transporte (solución salina balanceada de Hank pH 7.2 conteniendo 10 mM de D-glucosa y 10 mM de HEPES). La integridad de la monocapa se determinó midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), utilizando un voltímetro para tejido

epitelial EVOM y un electrodo EndHom-12 (World Precision Instruments, Sarasota, FL). En los experimentos de transporte, se utilizaron sólo monocapas con valores de TEER entre 450 y 650 Ωcm^2 .

Preparación de compuestos.

Para los estudios de transporte las soluciones stock de los compuestos (10 mM) en DMSO, se diluyeron a una concentración de 50 μM con el amortiguador de transporte (concentración final del DMSO 0.1%).

Experimentos de transporte.

Los ensayos de transporte se llevaron a cabo en ambas direcciones; del lado apical al lado basolateral (A – B) y del lado basolateral al lado apical (B - A). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Se incluyeron **albendazol** y **mebendazol** en los experimentos de transporte

1. Apical a Basolateral.

Los insertos se colocaron en pozos conteniendo 1.5 mL del amortiguador de transporte, la solución apical se cambió por 0.5 mL de la solución que contenía a cada compuesto y los insertos se incubaron a 37°C y atmósfera al 5% de CO₂, con agitación constante a 3@ en un agitador orbital. Los insertos fueron cuidadosamente cambiados de pozo en pozo, conteniendo en cada uno 1.5 mL del amortiguador de transporte fresco (lado basal), a los tiempos de 15, 30, 45, 60 y 90 minutos. A los diferentes tiempos, se tomaron 500 μl del lado basolateral (cada uno de los pozos). A los 90 minutos se tomó una alícuota de 200 μl del lado apical de la monocapa la cual sirvió como la solución donadora. Las muestras colectadas a los diferentes tiempos se guardaron a 4°C hasta su análisis.

2. Basolateral a Apical.

A monocapas de células Caco-2, crecidas en insertos (diferentes a los empleados en la medición A-B) se les cambió la solución basolateral (amortiguador de transporte), por la solución que contiene a cada compuesto a una concentración de 50 μM en el amortiguador de transporte (1.5 mL). Las muestras (200 μl) se obtuvieron del lado apical a los tiempos de 15, 30, 45, 60 y 90 minutos y se agregaron 200 μl de amortiguador de transporte libre de compuesto. Por otro lado, a los 90 minutos se tomó una alícuota de 200 μl del lado basolateral de la monocapa el cual sirvió como la solución donadora.

Control de calidad.

Al término de los experimentos de transporte, se midió la velocidad de flujo de un marcador hidrofílico, el amarillo de Lucifer (LY), el cual se utiliza como marcador de integridad de la monocapa, determinándose si los compuestos presentan algún efecto sobre la monocapa. Para llevar a cabo lo anterior, se retiró completamente la solución del lado donador (apical o basolateral), según sea el caso y los insertos se colocaron en pozos nuevos que contenían en el lado basolateral sólo el amortiguador de transporte y en todos los casos independientemente del experimento de transporte, se colocaron 500 μl de una solución 1 mM de LY en amortiguador de transporte en el lado apical. Los insertos se incubaron por 1 hora sin agitación a 37°C y atmósfera al 5% de CO_2 . Terminada la incubación se tomaron 100 μl de la solución en el lado basolateral y se leyó en un lector de fluorescencia (Fluostar modelo 403-0098) con un filtro de emisión de 538 nm y un filtro de excitación de 485 nm. Para la cuantificación, se utilizó una curva estándar de LY en el rango de concentraciones de 5 a 0.3125 μM . Monocapas con un valor de coeficiente de permeabilidad aparente de LY $\geq 1 \times 10^{-8}$ cm/seg se consideran monocapas normales sin efecto de los diferentes compuestos.

Determinación del coeficiente de permeabilidad aparente (Papp).

Las muestras obtenidas de los estudios de transporte se analizaron y cuantificaron con el método analítico previamente descrito. Para calcular el Papp se graficó la cantidad acumulada del compuesto que se absorbe con respecto al tiempo, calculándose la pendiente de la regresión lineal de la curva (dC/dt) y sustituyendo el valor obtenido en la siguiente ecuación:

$$P_{app} = \frac{dC/dt * V}{A * C_0}$$

donde: dC/dt es la velocidad de paso del compuesto a través de la monocapa

V es el volumen en el lado receptor

C₀ es la concentración de la solución en el lado donador

A es el área de cultivo de la monocapa

RESULTADOS

Las propiedades fisicoquímicas obtenidas para los derivados analizados, así como del albendazol y mebendazol se presentan en las tablas 8 y 9.

Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas determinadas para los derivados del 1-metilbencimidazol.

Compuesto	Fórmula molecular	P.M.	Rf (sistema)	Punto de fusión
4	C ₉ H ₁₀ N ₂ S	178.26	0.53	53 – 54
8	C ₉ H ₉ ClN ₂ S	212.65	0.69	92 – 93
12	C ₉ H ₉ ClN ₂ S	212.65	0.69	80.5 – 81.5
16	C ₉ H ₈ Cl ₂ N ₂ S	247.09	0.66	121 – 122
Albendazol	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ SO ₂	265.33	ND*	ND
Mebendazol	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	295.29	ND	ND

*ND = No determinado

Tabla 9. Coeficiente de distribución y partición determinados para los derivados del 1-metilbencimidazol.

Compuesto	LogP calculado*	LogD determinado
4	2.73 ± 0.57	2.23
8	3.32 ± 0.59	3.04
12	3.32 ± 0.59	3.01
16	3.79 ± 0.6	3.99
Albendazol	3.01 ± 0.86	3.66
Mebendazol	2.42 ± 0.89	2.07

*LogP calculado con el programa ACS-demo.

La cuantificación de las muestras colectadas a los diferentes tiempos, en los ensayos de transporte, se realizó empleando el método analítico mencionado en metodología. Las concentraciones obtenidas de 3 insertos para el compuesto 4 durante la determinación A-B a los diferentes tiempos se presentan en la tabla 10. La concentración obtenida por el mismo compuesto durante la determinación de B-A se puede observar en la tabla 11. Los valores obtenidos para el compuesto 4 del lado A-B y B-A a los diferentes tiempos se presentan en las figuras 8 y 9.

Tabla 10. Concentración (μM) obtenida en el estudio de apical a basolateral para el compuesto 4.

Tiempo (min)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Promedio \pm DS*
15	4.1748	3.7841	3.9885	3.9825 \pm 0.19
30	7.0504	6.2183	6.6227	6.6304 \pm 0.41
45	9.6714	8.4410	8.6373	8.9165 \pm 0.66
60	12.5837	10.6518	10.5777	11.2711 \pm 1.13
90	15.8865	13.3584	12.9258	14.0569 \pm 1.59

*DS = Desviación estándar.

Tabla 11. Concentración (μM) obtenida en el estudio de basolateral a apical para el compuesto 4.

Tiempo (min)	Inserto 4	Inserto 5	Inserto 6	Promedio \pm DS
15	10.7766	10.1975	11.4241	10.7994 \pm 0.61
30	17.6434	12.4512	18.3064	16.1337 \pm 3.20
45	21.4204	19.1089	22.1488	20.8927 \pm 1.58
60	27.6931	24.7175	27.1679	26.5261 \pm 1.58
90	32.9590	31.3269	33.2087	32.4982 \pm 1.02

Figura 8. Cinética de absorción del compuesto 4 determinada del lado apical al basolateral.

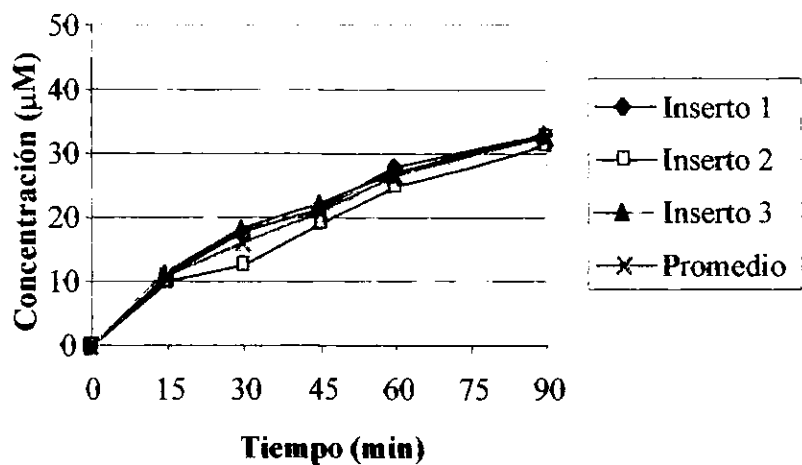
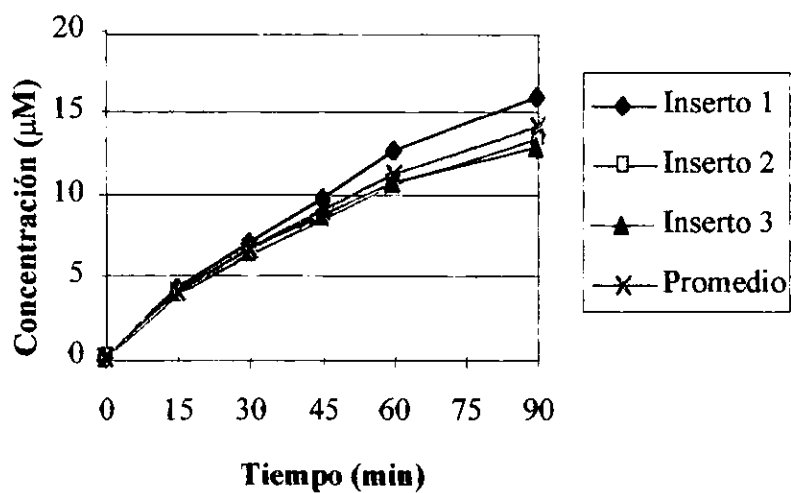


Figura 9. Cinética de absorción del compuesto 4 determinada del lado basolateral al apical.



Con respecto al compuesto 8, las concentraciones obtenidas en los ensayos de A-B y de B-A y su representación gráfica se muestran en la tabla 11 y 12 y las figuras 10 y 11 respectivamente.

Tabla 12. Concentración (μM) obtenida en el estudio de apical a basolateral para el compuesto 8.

Tiempo (min)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Promedio \pm DS
15	5.0523	5.0386	5.1137	5.0682 \pm 0.04
30	8.2018	7.7509	7.6295	7.8607 \pm 0.30
45	11.4117	9.9351	9.6661	10.3376 \pm 0.93
60	14.5383	12.1729	11.7380	12.8164 \pm 1.50
90	17.7754	14.4422	13.7025	15.3067 \pm 2.16

Tabla 13. Concentración (μM) obtenida en el estudio de basolateral a apical para el compuesto 8.

Tiempo (min)	Inserto 4	Inserto 5	Inserto 6	Promedio \pm DS
15	13.4272	14.3323	15.6409	14.4668 \pm 1.11
30	28.8190	31.3947	30.9171	30.3769 \pm 1.37
45	32.1145	36.2970	35.2951	34.5689 \pm 2.18
60	33.9583	38.0451	39.1205	37.0413 \pm 2.72
90	37.0318	41.6136	41.2560	39.9672 \pm 2.54

Figura 10. Cinética de absorción del compuesto 8 determinada del lado apical al basolateral.

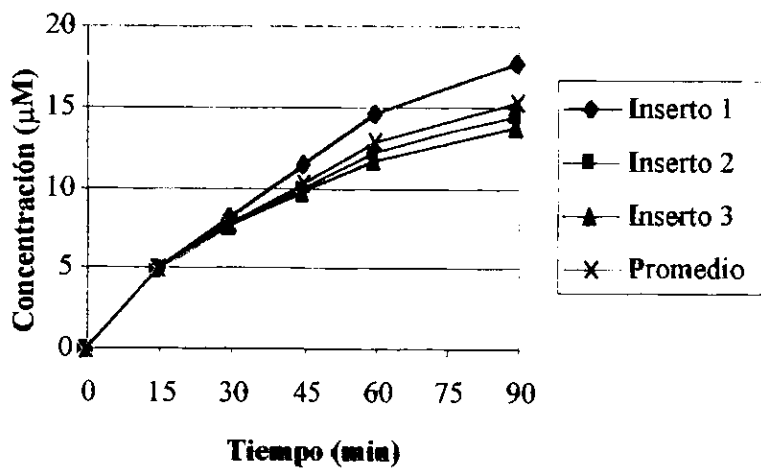
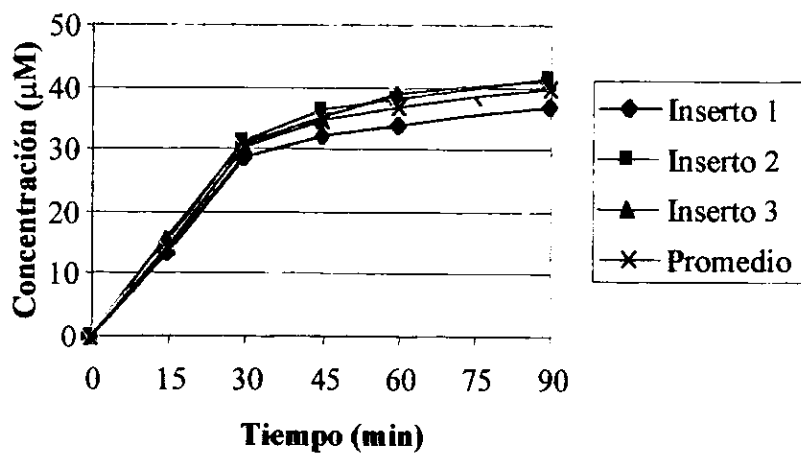


Figura 11. Cinética de absorción del compuesto 8 determinada del lado basolateral al apical.



Las concentraciones obtenidas por el método analítico en los ensayos A-B y B-A del compuesto 12, se presentan en la tabla 14 y 15 y su representación gráfica en las figuras 12 y 13.

Tabla 14. Concentración (μM) obtenida en el estudio de apical a basolateral para el compuesto 12.

Tiempo (min)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Promedio \pm DS
15	3.0583	3.0526	3.3848	3.1652 \pm 0.19
30	6.4759	6.0662	6.4482	6.3301 \pm 0.22
45	9.5103	8.5825	8.9079	9.0002 \pm 0.47
60	11.9729	10.4415	10.7518	11.0554 \pm 0.80
90	15.1122	13.2448	13.4928	13.9499 \pm 1.01

Tabla 15. Concentración (μM) obtenida en el estudio de basolateral a apical para el compuesto 12.

Tiempo (min)	Inserto 4	Inserto 5	Inserto 6	Promedio \pm DS
15	10.5691	11.2477	11.3606	11.0591 \pm 0.42
30	18.7094	19.9335	19.6540	19.4323 \pm 0.64
45	23.7631	24.9759	25.3978	24.7122 \pm 0.84
60	24.8994	26.5841	27.5543	26.3459 \pm 1.34
90	28.5626	31.9467	32.7133	31.0742 \pm 2.20

Figura 12. Cinética de absorción del compuesto 12 determinada del lado apical al basolateral.

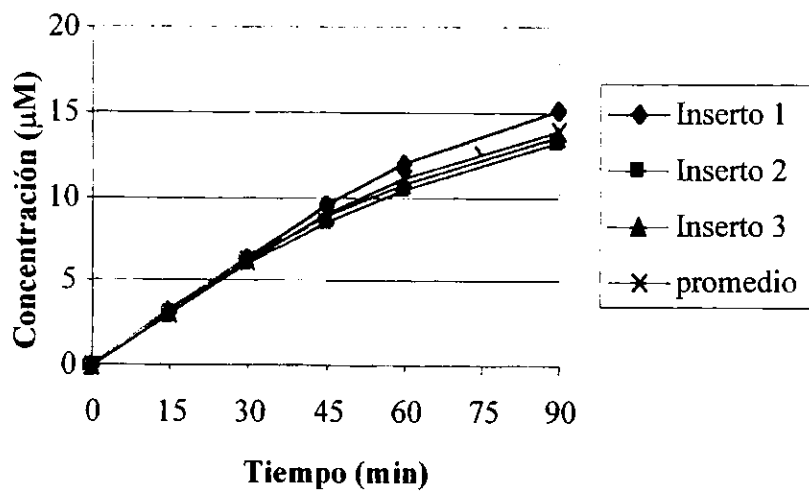
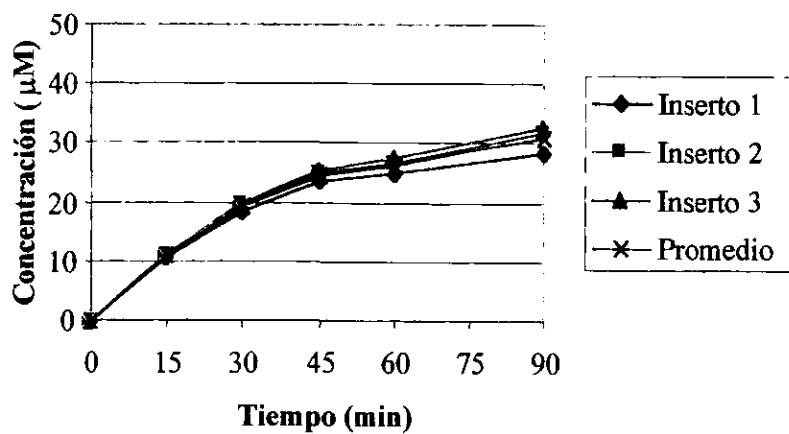


Figura 13. Cinética de absorción del compuesto 12 determinada del lado basolateral al apical.



En las tablas 16 y 17, se presentan las concentraciones obtenidas en los ensayos de A-B y B-A del compuesto 16 y en las figuras 14 y 15 su representación gráfica.

Tabla 16. Concentración (μM) obtenida en el estudio de apical a basolateral para el compuesto 16.

Tiempo (min)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Promedio \pm DS
15	2.6242	2.4004	2.5475	2.5241 \pm 0.11
30	6.1687	5.7751	5.8705	5.9381 \pm 0.20
45	9.9271	8.9275	8.7785	9.2110 \pm 0.62
60	13.6218	11.7789	11.3067	12.2358 \pm 1.22
90	19.4583	16.1876	16.0549	17.2336 \pm 1.92

Tabla 17. Concentración (μM) obtenida en el estudio de basolateral a apical para el compuesto 16.

Tiempo (min)	Inserto 4	Inserto 5	Inserto 6	Promedio \pm DS
15	6.3345	6.2434	3.3072	5.2951 \pm 1.72
30	15.0422	15.2056	13.6967	14.6482 \pm 0.82
45	22.8918	23.0504	22.1511	22.6977 \pm 0.48
60	27.2302	29.6162	28.6845	28.5103 \pm 1.20
90	34.4691	37.3898	38.5078	36.7889 \pm 2.08

Figura 14. Cinética de absorción del compuesto 16 determinada del lado apical al basolateral.

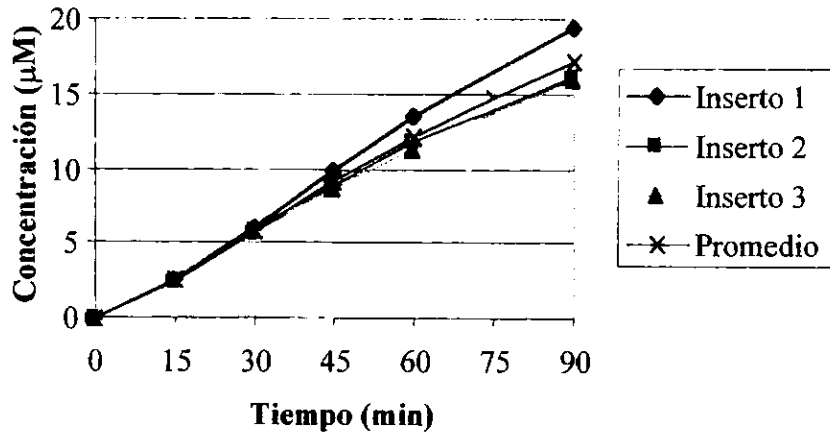
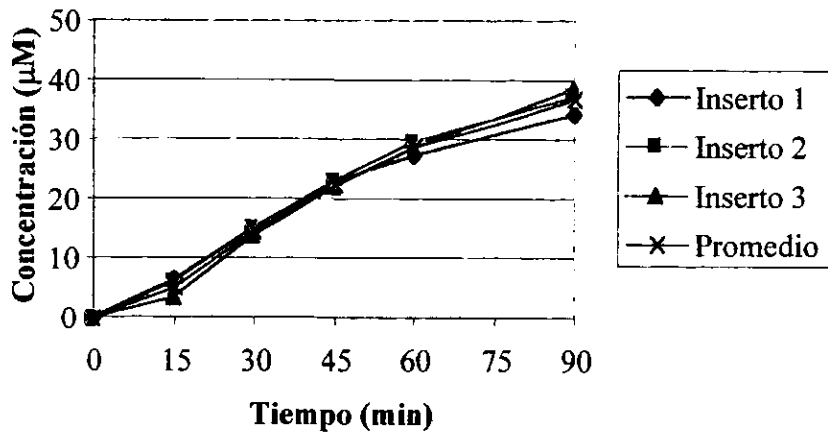


Figura 15. Cinética de absorción del compuesto 16 determinada del lado apical al basolateral al apical.



En los estudios de transporte, se incluyeron al **albendazol** y **mebendazol**. Las concentraciones obtenidas en los ensayos de A-B y B-A para estos compuestos, se presentan en las tablas 18, 19, 20 y 21 y su representación gráfica en las figuras 16, 17, 18 y 19.

Tabla 18. Concentración (μM) obtenida en el estudio de apical a basolateral para el **albendazol**.

Tiempo (min)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Promedio \pm DS
15	0.1772	0.2224	0.2676	0.2224 ± 0.04
30	0.4354	0.5453	0.5921	0.5242 ± 0.08
45	0.6989	0.8097	0.8621	0.7903 ± 0.08
60	1.0785	1.0444	1.1241	1.0823 ± 0.04
90	1.7208	1.6781	1.6621	1.6870 ± 0.03

Tabla 19. Concentración (μM) obtenida en el estudio de basolateral a apical para el **albendazol**.

Tiempo (min)	Inserto 4	Inserto 5	Inserto 6	Promedio \pm DS
15	0.8014	1.0017	1.0491	0.9507 ± 0.13
30	1.8591	1.9803	2.5828	2.1407 ± 0.38
45	2.7971	3.1703	3.3425	3.1033 ± 0.27
60	2.9901	3.2904	3.6644	3.3149 ± 0.33
90	4.0101	4.4705	4.9407	4.4738 ± 0.46

Figura 16. Cinética de absorción del **albendazol** determinada del lado apical al basolateral.

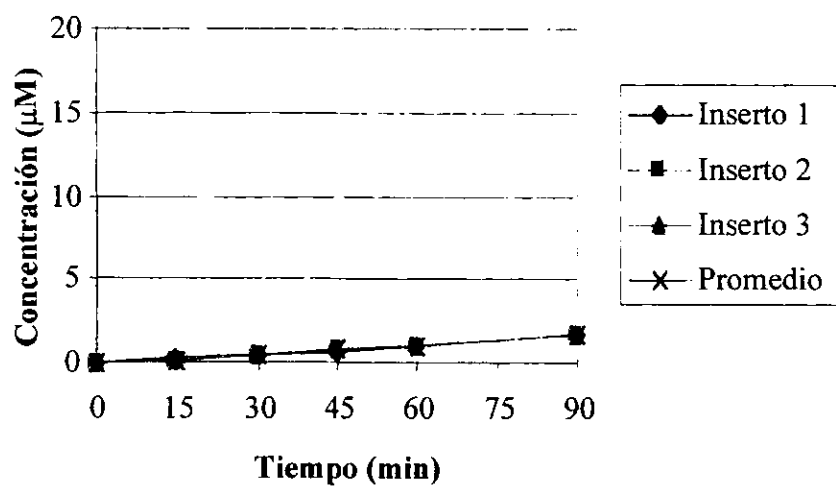


Figura 17. Cinética de absorción del **albendazol** determinada del lado basolateral al apical.

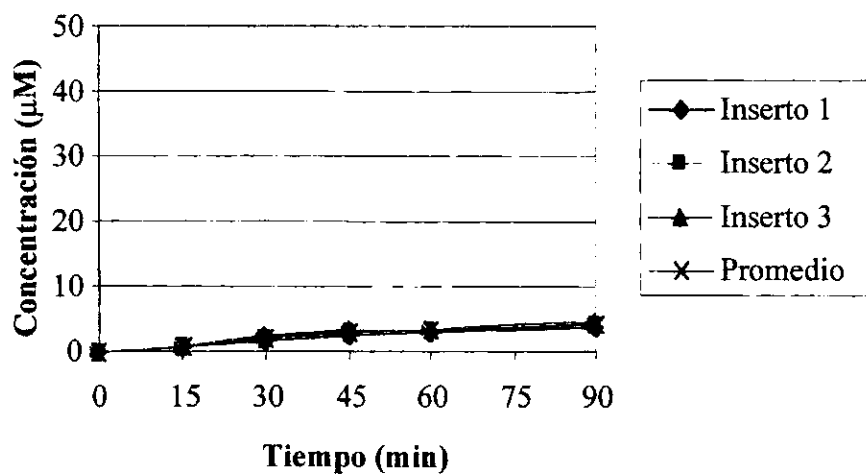


Tabla 20. Concentración (μM) obtenida en el estudio de apical a basolateral para el compuesto **mebendazol**.

Tiempo (min)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Promedio \pm DS
15	2.1713	2.2042	2.1440	2.1732 ± 0.03
30	4.2438	4.1666	4.0690	4.1598 ± 0.08
45	6.2577	5.9934	5.8688	6.0400 ± 0.19
60	7.6513	7.3056	7.1361	7.3643 ± 0.26
90	9.8416	9.4137	9.0540	9.4365 ± 0.39

Tabla 21. Concentración (μM) obtenida en el estudio de basolateral a apical para el compuesto **mebendazol**.

Tiempo (min)	Inserto 4	Inserto 5	Inserto 6	Promedio \pm DS
15	4.2612	4.4879	4.5059	4.4184 ± 0.13
30	6.2945	6.2879	7.1581	6.5802 ± 0.50
45	6.3390	6.4228	8.4545	7.0721 ± 1.19
60	6.5391	6.5119	8.6408	7.2306 ± 1.22
90	6.7165	6.5454	8.8963	7.3861 ± 1.31

Figura 18. Cinética de absorción del **mebendazol** determinada del lado apical al basolateral.

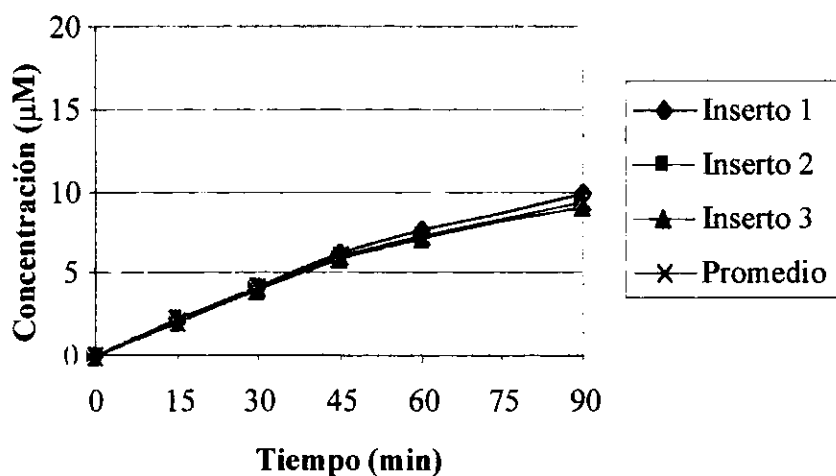
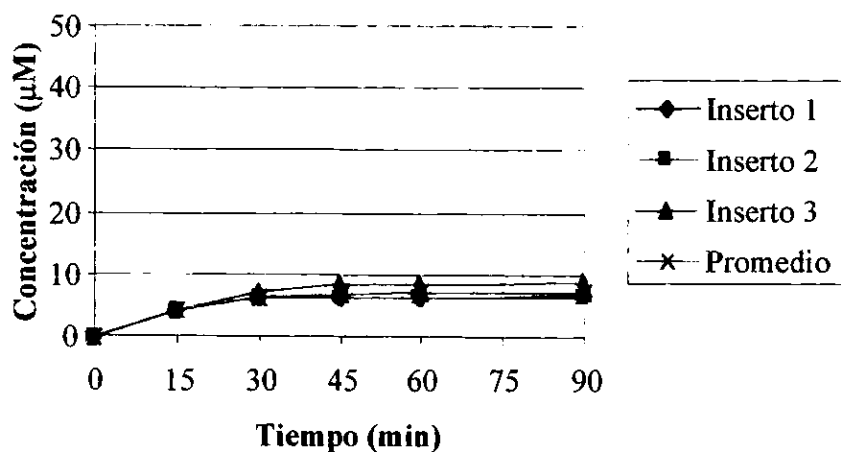


Figura 19. Cinética de absorción del **mebendazol** determinada del lado basolateral al apical.

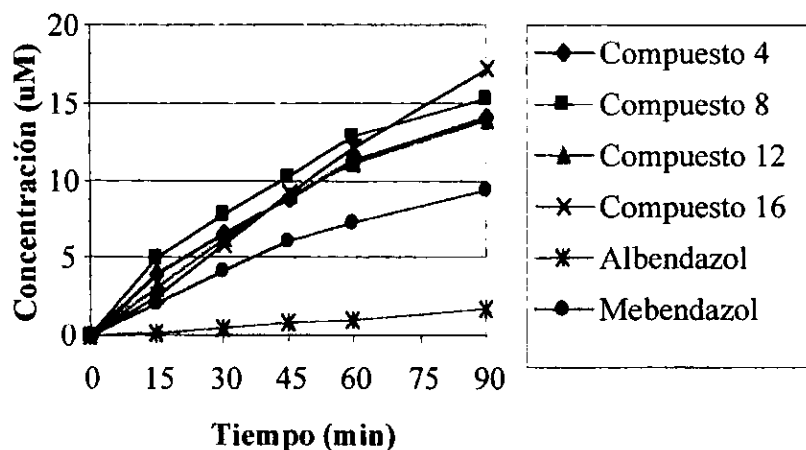


En la tabla 22, se observan los valores promedio de todos los compuestos analizados en este estudio, determinado del lado apical al lado basolateral. La cinética promedio de estos compuestos se observa en la figura 20. Los compuestos que se absorben en mejor concentración son los compuestos **8** y **16**, mientras que el **albendazol** es el compuesto con menor absorción, con una concentración acumulada de 1.68 µM a los 90 minutos. Con respecto a los otros compuestos, todos se absorben en mejor cantidad que el **albendazol** y **mebendazol**, obteniéndose cantidades entre 13 y 14 µM. Cabe resaltar el comportamiento del **mebendazol**, el cual en este ensayo tiene una mejor permeabilidad que el **albendazol**.

Tabla 22. Concentración promedio (µM) obtenida en el estudio de apical a basolateral para los compuestos analizados.

Tiempo (min)	Compuesto 4	Compuesto 8	Compuesto 12	Compuesto 16	Compuesto albendazol	Compuesto mebendazol
15	3.9825	5.0682	3.1652	2.5241	0.2224	2.1732
30	6.6304	7.8607	6.3301	5.9381	0.5242	4.1598
45	8.9165	10.3376	9.0002	9.2110	0.7903	6.0400
60	11.2711	12.8164	11.0554	12.2358	1.0823	7.3643
90	14.0569	15.3067	13.9499	17.2336	1.6870	9.4365

Figura 20. Cinética de absorción promedio de los compuestos 4, 8, 12, 16, albendazol y mebendazol determinada del estudio de apical a basolateral.



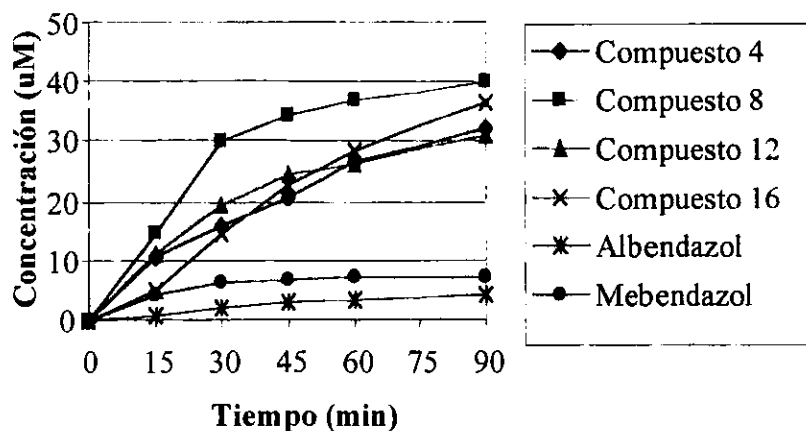
Con respecto a los valores promedio obtenidos en el estudio del lado basolateral al lado apical y la cinética de absorción, se puede observar en la tabla 23 y figura 21. Los compuestos que se absorben mejor son el compuesto 8 y el 16. En el compuesto 8 se observa un rápido incremento de la concentración y al final de la gráfica la tendencia a llegar a una meseta. Sin embargo, en la cinética de absorción del compuesto 16 se observa un incremento constante en la concentración que se absorbe y no se observa la tendencia de haber llegado a una meseta. Los compuestos 4 y 12 tienen una cinética similar.

Con respecto al albendazol y mebendazol, estos compuestos se absorben muy poco en este sistema, de hecho no se observa un aumento importante de la concentración de estos compuestos a partir de los 45 minutos.

Tabla 23. Concentración promedio (μM) de los compuestos **4**, **8**, **12**, **16**, **albendazol** y **mebendazol** obtenida en el estudio de basolateral a apical para los compuestos analizados.

Tiempo (min)	Compuesto 4	Compuesto 8	Compuesto 12	Compuesto 16	Compuesto albendazol	Compuesto mebendazol
15	10.7994	14.4668	11.0591	5.2951	0.9507	4.4184
30	16.1337	30.3769	19.4323	14.6482	2.1407	6.5802
45	20.8927	34.5689	24.7122	22.6977	3.1033	7.0721
60	26.5261	37.0413	26.3459	28.5103	3.3149	7.2306
90	32.4982	39.9672	31.0742	36.7889	4.4738	7.3861

Figura 21. Cinética de absorción promedio determinada del estudio de basolateral a apical.



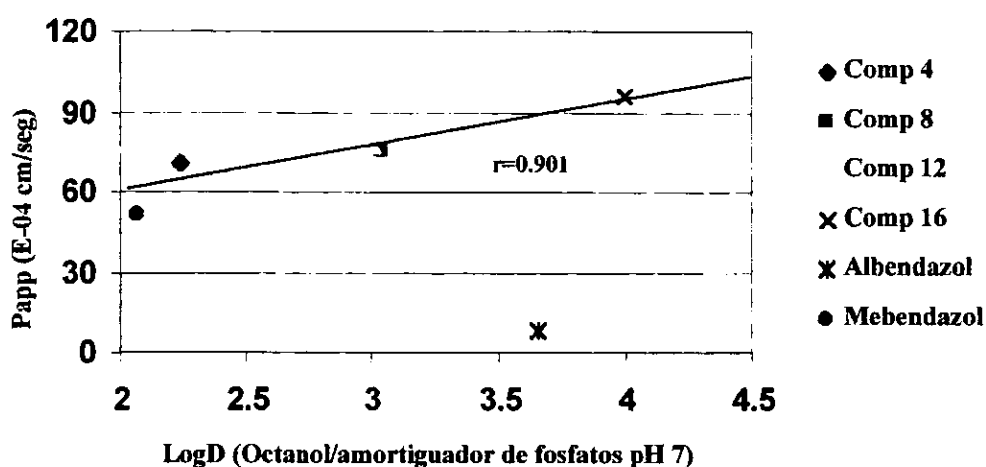
Con respecto al cálculo del valor del coeficiente de permeabilidad aparente, de cada uno de los compuestos estudiados, estos se enlistan en la tabla 24. El compuesto que mejor coeficiente de permeabilidad aparente tiene, en la cinética de apical a basolateral, es el compuesto **16**, seguido de los compuestos **12**, **8**, **4**, **mebendazol** y **albendazol**. Con respecto al estudio de basolateral a apical, los compuestos **8**, **4** y **12** tienen la mejor velocidad de absorción, posteriormente los compuestos **16**, **mebendazol** y **albendazol**.

Tabla 24. Coeficiente de permeabilidad aparente obtenidos de los compuestos analizados.

Compuesto	Papp (x 10 ⁻⁵ cm/seg) Apical a Basolateral	Papp (x 10 ⁻⁵ cm/seg) Basolateral a Apical	Papp B-A/A-B	Papp A-B/B-A
4	7.12	9.57	1.34	0.74
8	7.59	14.2	1.87	0.53
12	7.77	9.57	1.23	0.81
16	9.56	7.64	0.79	1.25
Albendazol	0.84	1.06	1.26	0.79
Mebendazol	5.15	4.34	0.84	1.18

Por último, para determinar si los grupos cloro introducidos al anillo bencimidazol, tenían algún efecto sobre el Papp, se correlacionó los valores obtenidos de LogD con respecto a los valores obtenidos de Papp (A-B) (figura 22). Se observa una buena correlación entre estos dos parámetros $r=0.901$, para los compuestos **4**, **8**, **12** y **16**, lo cual indica que existe una relación directa entre el número de grupos cloro presentes en el anillo bencimidazol y un incremento en el valor del Papp calculado.

Figura 22. Coeficiente de permeabilidad aparente como una función de la lipofilidad.



Un aspecto de gran relevancia, es la actividad biológica de los compuestos 4, 8, 12 y 16 evaluada *in vivo* en contra de la larva muscular de *Trichinella spiralis* (López, 1999) (Tabla 25) y su correlación con el coeficiente de permeabilidad determinado en este estudio para cada uno de ellos.

Tabla 25. Actividad *in vivo* de los compuestos 4, 8, 12, 16 y albendazol sobre las larvas musculares de *Trichinella spiralis*.

Compuesto	No. de LM/ratón ± DS (% de reducción)*
Control	19091 ± 3314
4	14474 ± 3058 (24)
8	10933 ± 2976 (43)
12	13563 ± 3019 (24)
16	8753 ± 942 (54)
Albendazol	1881 ± 533 (90)

*Promedio de 3 experimentos DS = Desviación estándar

Tomado de López (1999).

Como se puede observar en la tabla de actividad biológica *in vivo* de los compuestos 4, 8, 12 y 16 sobre la fase parenteral del parásito *Trichinella spiralis*, el compuesto que presenta mayor actividad es el **albendazol** y posteriormente el compuesto 16. Por otro lado, la permeabilidad determinada con el sistema Caco-2, nos indica que de los derivados del 1-metilbencimidazol, el compuesto 16 tiene la mejor permeabilidad, seguido de los compuestos 8 y 12. La relación entre la permeabilidad aparente y la actividad biológica *in vivo* de estos compuestos se observa en la figura 23. A pesar de que la permeabilidad aparente determinada para el **albendazol** fue baja (0.84×10^{-5} cm/seg) en comparación con

el compuesto **16** (9.56×10^{-5} cm /seg), el **albendazol** tiene mayor actividad antihelmíntica a nivel sistémico.

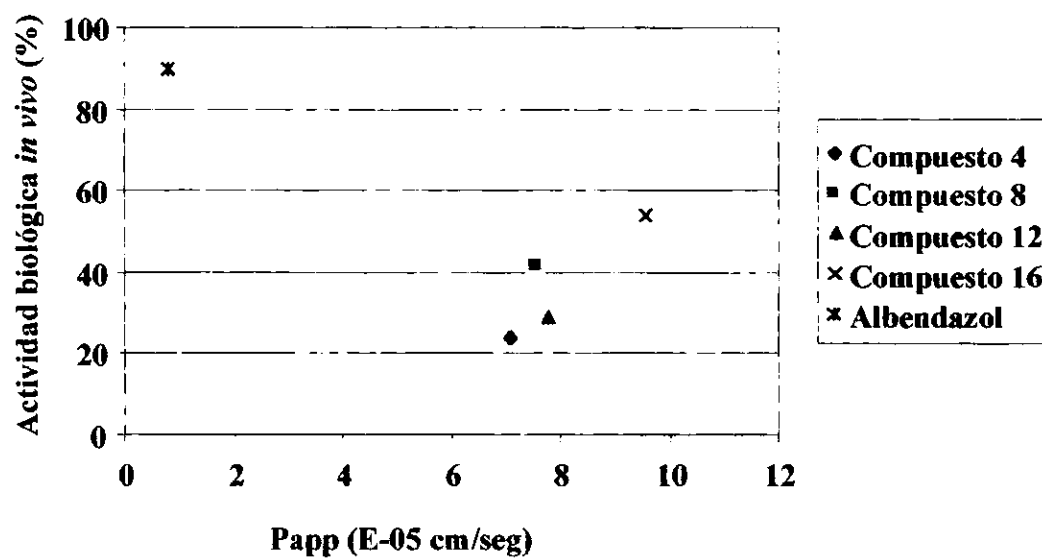


Figura 23. Actividad biológica *in vivo* como una función de la permeabilidad aparente.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El anillo bencimidazol, se ha caracterizado por ser una molécula líder en la cual se pueden realizar diversos cambios estructurales en diversas posiciones del anillo, actualmente se han obtenido compuestos con actividad antiparasitaria, como el **tiabendazol**, **mebendazol** y **albendazol** (Tabla 4). Sin embargo, la mayoría de los compuestos sintetizados tiene una farmacocinética errática y variable, debido principalmente a sus propiedades fisicoquímicas, como su baja solubilidad acuosa. En algunos casos, como en el **tiabendazol** y **mebendazol** impide que tenga una buena actividad biológica contra parásitos extraintestinales.

A este respecto, la actividad antihelmíntica de los nuevos compuestos derivados del 1-metilbencimidazol, sintetizados en el Departamento de Farmacia, se evaluó en un ensayo *in vitro* empleando el método de reducción del MTT. En este ensayo, se puso de manifiesto que dos compuestos, el **8** y el **16** (Cl en 5 y Cl en 5 y 6), tienen actividad contra la fase enteral (organismos adultos) y parenteral (larva muscular) de *Trichinella spiralis*. Sin embargo, a pesar de que estos compuestos tienen actividad contra la fase muscular del parásito, este tipo de ensayo no considera el proceso de absorción de los compuestos, que como se mencionó anteriormente, es uno de los factores importantes para que se manifieste una mejor eficiencia en su actividad sistémica.

Considerando lo anterior, resultó de interés determinar la permeabilidad aparente de los compuestos **8** y **16** empleando las células Caco-2. Además, con la finalidad de realizar estudios de estructura-permeabilidad, actividad biológica y propiedades fisicoquímicas se incluyeron los compuestos **4** y **12** que al igual que el **8** y **16**, tienen en posición 2 un grupo metiltio y en el caso del compuesto **4** no tiene sustituyentes Cl en las posiciones 5 y 6, a diferencia del **12** que tiene Cl en posición 6.

Con respecto a las propiedades fisicoquímicas determinadas para esta serie de compuestos, se observó que con la adición de los radicales cloro al anillo, se incrementan los valores de algunas propiedades químicas de los compuestos, como el punto de fusión y la

liposolubilidad representada por el logP calculado y el logD determinado (Tablas 8, 9 y figura 22). Algunos autores como Wils y cols. (1994) y Testa y cols. (1996), han reportado este mismo comportamiento, en el cual la introducción de grupos funcionales como el Cloro, Yodo y Flúor incrementan la lipofilia de una molécula. Estos autores sugieren además, que en compuestos con LogD mayores de 3.5, el coeficiente de permeabilidad disminuye con el incremento en la lipofilia.

A este respecto, el logD del compuesto **16** y del **albendazol** fue mayor de 3.5 (3.99 y 3.66 respectivamente), sugiriendo que su coeficiente de permeabilidad sería bajo. Por otro lado, el **mebendazol** tienen una liposolubilidad baja, en comparación con los compuestos sintetizados en la Facultad de Química.

Los compuestos **8** y **12** tienen características similares, esto se debe a que son compuestos en los cuales, la principal diferencia entre ellos radica en la posición del sustituyente cloro. El compuesto **8** lo presenta en la posición 5 y el compuesto **12** lo presenta en la posición 6, ambos compuestos tienen en las posiciones contrarias un grupo hidrógeno, teniendo valores de logD similares (3.04 y 3.01 respectivamente). El compuesto **4** que no tiene sustituyente Cl y el **mebendazol** tuvieron los valores de logD más bajos (2.07 y 2.23 respectivamente).

Con respecto a la determinación del coeficiente de permeabilidad aparente, todos los compuestos se absorben en mayor cantidad que los bencimidazoles comerciales, **albendazol** y **mebendazol**. Por otro lado, de los derivados del bencimidazol sintetizados, el compuesto con mejor coeficiente de permeabilidad es el compuesto **16**, (9.56×10^{-5} cm/seg) sugiriendo que se puede absorber en mejor cantidad que los otros compuestos.

A pesar de que, se ha sugerido que compuestos con LogD mayor de 3.5 disminuyen su Papp, en el compuesto **16** no se observó en este estudio esta correlación. Esto puede deberse a que la lipofilia no es un factor aislado, ya que depende del balance de fuerzas inter e intramoleculares. La lipofilia es un parámetro farmacocinético, que se calcula como logP, el cual es sólo válido para una entidad química simple y por otro lado, el coeficiente de distribución se refiere a una mezcla de especies químicas las cuales

generalmente dependen del pH. Por lo cual, es necesario determinar el efecto del cambio de pH sobre las moléculas, que puedan provocar protonación de estas, principalmente en el nitrógeno de la posición 3 del anillo. Lo cual implicaría que compuestos que se encuentren protonados a pH fisiológico no pueden atravesar la monocapa celular, por vía paracelular (entre células, por difusión simple).

Es importante considerar que la absorción de un compuesto involucra diversas etapas como son: la liberación del compuesto de su forma farmacéutica, la disolución en el fluido intestinal, la interacción del compuesto con las enzimas y microorganismos intestinales, el paso a través de la membrana gastrointestinal, el efecto de primer paso y la recirculación enterohepática. Además, la membrana gastrointestinal, está compuesta de una capa de mucus, por grupos de células en forma estratificada y por células formando criptas intestinales, las cuales, incrementan el área de absorción para los compuestos. Por lo que, en el caso de la línea celular Caco-2, es posible que el Papp calculado en este estudio para los diferentes compuestos puede estar sobrestimado.

Por otro lado, algunos autores como Yee (1997) reportan que el coeficiente de permeabilidad de los compuestos se pueden correlacionar con la permeabilidad en humanos de la siguiente manera:

Compuestos con un $P_{app} < 0.1 \times 10^{-5}$ cm/seg son compuestos que se absorben pobremente (0 – 20%).

Compuestos con un P_{app} entre 0.1 y 1×10^{-5} cm/seg son compuestos que se absorben moderadamente (20 – 70%).

Compuestos con un $P_{app} > 1 \times 10^{-5}$ cm/seg son compuestos que se absorben bien (70 – 100%).

Esto ubica a los compuestos sintetizados y al **mebendazol**, en compuestos que se absorben bien entre un 70 y un 100%, en el caso del **albendazol** este queda en los compuestos que se absorben moderadamente (20–70%). Esto implicaría que en el caso de todos los compuestos excepto el **albendazol**, la permeabilidad a través de la capa celular, no es el

proceso limitante en su absorción y que ésta depende de otros factores, como su solubilidad.

En la clínica los compuestos **albendazol** y **mebendazol**, se emplean como antiparasitarios de amplio espectro. El **albendazol** se diseñó con la finalidad de mejorar algunas características fisicoquímicas del **mebendazol**, entre ellas su solubilidad. El **albendazol** se absorbe 20 veces más que el **mebendazol** y es efectivo contra diversos parásitos de ubicación tisular; sin embargo, es muy poco soluble en agua. En este estudio se determinó que el **mebendazol** es un compuesto que tienen una mejor permeabilidad que el **albendazol** (Papp 5.15 y 0.84×10^{-5} cm/seg respectivamente). Lo anterior sugiere, que el **mebendazol** es un compuesto, donde la permeabilidad a través de la línea celular, no es el paso limitante en la biodisponibilidad, en este caso es su solubilidad acuosa su principal limitante.

Esto nos permite sugerir que en los compuestos con anillo bencimidazol, se necesitan obtener datos no sólo de permeabilidad sino de solubilidad, metabolismo en el tracto gastrointestinal y en el hígado, durante el primer paso de la molécula.

Además, es importante considerar que aunque el modelo de la monocapa de la línea celular Caco-2 nos proporciona información acerca de la permeabilidad de diferentes compuestos no cuenta con todas las capas fisiológicas de la membrana gastrointestinal, por lo que es posible que los bencimidazoles interactuen de forma significativa con alguno o algunos componentes de la membrana gastrointestinal de los cuales depende finalmente su permeabilidad. Esta interacción puede provocar en el caso del **mebendazol** una disminución de la cantidad de fármaco que se absorbe a través de la membrana. Además, se tiene que tomar en cuenta que en el presente estudio todos los compuestos se probaron a una concentración de 50 μ M, en donde todos los compuestos se encontraban totalmente solubles, además de no precipitarse al pH que se empleó. Lo cual es un caso ideal, en donde no se llega a ningún proceso de saturación del sistema.

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

Con respecto al **albendazol**, este compuesto se ha comprobado que se biotransforma en el intestino a **sulfóxido de albendazol**, este metabolito es más soluble y lipofílico que el **albendazol**, por lo cual *in vivo* puede tener una mejor absorción que el **mebendazol**. Por otro lado, no se ha podido cuantificar **albendazol** en plasma de humano, lo cual indica un gran metabolismo intestinal y de primer paso en el hígado.

Por otro lado, con la finalidad de determinar si existe algún mecanismo de transporte diferente, a la difusión simple, involucrado en el transporte de estos compuestos a través de la línea celular Caco-2, se determinó la relación entre el Papp calculado entre las dos cinéticas (B-A/A-B). Se considera que si existe una relación de más de tres magnitudes, en la cinética de transporte de los compuestos, entonces existe un mecanismo de transporte en la absorción de los compuestos. En otras palabras, si $B-A/A-B = 3$ entonces existe un proceso de reflujo del compuesto a través de la línea celular, provocado por alguno de los transportadores existentes en la membrana basolateral de la línea celular. Además, si $A-B/B-A = 3$ entonces existe un proceso de transporte activo, involucrado en el transporte del compuesto hacia el lado basolateral de la línea celular Caco-2, provocado por algún transportador localizado en la membrana apical de las células.

Con respecto a lo anterior, se determinó que los valores obtenidos de $A-B/B-A$ (Tabla 24) fueron menores a 3, por lo que no existe ningún proceso de transporte activo involucrado en la absorción de ninguno de los compuestos analizados, incluyendo al **albendazol** y al **mebendazol**. Lo cual indica que los productos se absorben por un proceso de difusión pasivo, lo cual se relaciona con lo reportado por Prieto y cols. (1991) y Jung y cols. (1998) para el caso del **albendazol**.

Por último, considerando los resultados de actividad antihelmíntica, es interesante resaltar que en el caso de los derivados del 1-metilbencimidazol los compuestos **8** y **16** que presentaron mayor actividad *in vitro* tuvieron una mejor actividad *in vivo*, siendo el compuesto **16** de mejor actividad. Sin embargo, en cuanto a la poca relación entre el coeficiente de permeabilidad aparente y la actividad biológica *in vivo* de los compuestos **4**, **8**, **12**, **16** y **albendazol** es posible que se deba, como ya se ha mencionado, a la

sobrevaloración del Papp en el modelo de Caco-2, considerándose que existen otros factores en el epitelio intestinal que afecten su permeabilidad, que en determinado momento afecte más a los compuestos **8** y **16** que al **albendazol**. Como se mencionó con anterioridad, los compuestos **8** y **12** tienen características similares, esto se debe a que son compuestos en los cuales, la principal diferencia entre ellos radica en la posición del sustituyente cloro. Estos dos compuestos tienen valores de logD y de Papp similares, sin embargo su actividad biológica es diferente. Esta diferencia pudiera deberse principalmente al hecho de que el compuesto **12** no tiene en la posición 5 un sustituyente, lo cual en compuestos bencimidazólicos se ha sugerido que permite un metabolismo de primer paso activo (Rapsón, 1983). Además, el **albendazol** tiene una mayor actividad antihelmíntica, aún a concentraciones bajas en plasma.

Lo anterior indica que, para poder predecir o determinar la posible biodisponibilidad de un compuesto es necesario realizar, además de ensayos de permeabilidad, estudios de metabolismo intestinal y hepática; así como, la interacción de los compuestos con los diferentes componentes del tracto gastrointestinal. Es importante considerar que existen factores biológicos además, de la barrera gastrointestinal, como la velocidad de vaciamiento gástrico, la motilidad intestinal y la composición del lumen intestinal, que determinan si un compuesto tiene actividad extraintestinal (Raouf y cols., 1997; Hochman y cols., 1998).

CONCLUSIONES

- Los resultados muestran que existe una relación directa entre el número de grupos cloro presentes en las moléculas sintetizadas y un incremento del Papp y de la liposolubilidad.
- Los compuestos evaluados derivados del 1-metilbencimidazol, tienen un coeficiente de permeabilidad aparente mejor que el **albendazol** y el **mebendazol**.
- El transporte tanto de los compuestos **4**, **8**, **12** y **16**, como del **albendazol** y el **mebendazol**, a través de la línea celular Caco-2 se lleva a cabo por un mecanismo de difusión.
- Los compuestos **4**, **8**, **12** y **16** son más permeables que el **albendazol**. Sin embargo, no tienen mejor actividad antihelmíntica que el **albendazol** contra la fase sistémica de *T. spiralis*.
- Aunado a la permeabilidad existen otros factores como el metabolismo, la disolución, la hidrosolubilidad y liposolubilidad y la unión de las moléculas a sitios intra y extracelulares, entre otros, que determinan el que un compuesto pueda tener actividad antiparasitaria en el ámbito sistémico.

BIBLIOGRAFIA

1. Amidon G.L., Lennernäs H., Shah V.P. and Crison J.R. (1995) A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical Research* 12(3):413-420.
2. Artursson P. (1990) Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 79(6):476-482.
3. Artursson P. and Borchardt R. (1997) Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharmaceutical Research* 14(12):1655-1658.
4. Artursson P. and Karlsson J. (1991) Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175(3):880-885.
5. Augustijns P.F., Bradshaw T.P., Gan L.L., Hendren R.W. and Thakker D.R. (1993) Evidence for a polarized efflux system in Caco-2 cells capable of modulating cyclosporin a transport. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 197(2):360-365.
6. Blais A., Bissonnette P. and Berteloot A. (1987) Common characteristics for Na⁺-dependent sugar transport in Caco-2 cells and human fetal colon. *Journal of Membrane Biology* 99:113-125.
7. Boczon K., Olba W. and Olaszek M. (1984) The influence of some anthelmintics on the bioenergetic metabolism of *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis*. *Biochemical Pharmacology* 33(15):2523-2525.
8. Brasitus T.A. and Dudeja P.K. (1985) Regional differences in the lipid composition and fluidity of rat colonic brush-border membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 819:10-17.
9. Brown H.D., Matzuk A.R., Ilves I.R., Peterson L. M., Harris S. A., Sarett L. H., Igerton J. R., Yakstis J. J., Campbell W. C. and Cuckler, A. C. (1961) Antiparasitic drugs. IV. 2-(4'-thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. *Journal of the American Chemical Society* 83: 1764-1765.

10. Bughio N. I., Faubert G. M. and Pichard R. K. (1994) Interaction of mebendazole with tubulin from body wall muscle, intestine, and reproductive system of *Ascaris suum*. *Journal of Parasitology* 80(1): 126-132.
11. Collett A., Sims E., Walker D., He Y., Ayrton J., Rowland M. and Warhurst G. (1996) Comparison of HT29-18-C1 and Caco-2 cell lines as models for studying intestinal paracellular drug absorption. *Pharmaceutical Research* 13(2):216-221.
12. Collett A., Walker D., Sims E., He Y., Speers P., Ayrton J., Rowland M. and Warhurst G. (1997) Influence of morphometric factors on quantitation of paracellular permeability of intestinal epithelia *in vitro*. *Pharmaceutical Research* 14(6):767-773.
13. Croft S. L. (1994) A rationale for antiparasite drug discovery. *Parasitology Today* 10(10): 385-386.
14. Dantzig A.H. and Bergin L. (1990) Uptake of the cephalosporin, cephalexin, by a dipeptide transport carrier in the human intestinal cell line, Caco-2. *Biochimica et Biophysica Acta* 1027:211-217.
15. Fagerholm U., Johansson M. and Lennernäs H. (1996) Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. *Pharmaceutical Research* 13(9):1336-1342.
16. Hidalgo I.J. (1999) Memorias del Curso: Uso de cultivos celulares como sistema modelo para la predicción de absorción intestinal de fármacos. Fecha: 5-7 Julio 1999.
17. Hidalgo I.J. and Borchardt R.T. (1990a) Transport of a large neutral amino acid (phenylalanine) in a human intestinal epithelial cell line: Caco-2. *Biochimica et Biophysica Acta* 1028:25-30.
18. Hidalgo I.J. and Borchardt R.T. (1990b) Transport of bile acids in a human intestinal epithelial cell line, Caco-2. *Biochimica et Biophysica Acta* 1035:97-103.
19. Hidalgo I.J., Raub T.J. and Borchardt R.T. (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96:736-49.
20. Hochman J., Tang C., Leppert P., Strong K., Prendergast K., Olah T., King R. and Fernández C. (1998) The 1998 Charleston Conference: Jerome Hochman Application of the Cell Culture Models to the Evaluation of Drug Absorption and Drug Metabolism.
21. Horton R.J. (1990). Benzimidazoles in a wormy world. *Parasitology Today* 6(4):106.

22. Inui K.I., Yamamoto M. and Saito H. (1992) Transepithelial transport of oral cephalosporins by monolayers of intestinal epithelial cell line Caco-2: specific transport systems in apical and basolateral membranes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 261:195-201.
23. Irvine J., Takahashi L., Lockhart K., Cheong J., Tolan J., Selick H. and Grove R. (1999) MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cells: a tool for membrane permeability screening. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 88(1):28-33.
24. Jung H., Hurtado M., Sánchez M., Medina M. T. and Sotelo J. (1992) Clinical pharmacokinetics of albendazol in patients with brain cysticercosis. *Journal of Clinical Pharmacology* 32: 28-31.
25. Jung H., Medina L., García L., Fuentes I. and Moreno E. R. (1998) Absorption studies of albendazole and some physicochemical properties of the drug and its metabolite albendazole sulphoxide. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 50:43-48.
26. Katiyar S. K., Gordon V. R., McLaughlin G. L. and Edlind T. D. (1994) Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with β -tubulin sequence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38(9): 2086-2090.
27. Kean B. H. and Hoskins D. W. (1964) Treatment of trichinosis with thiabendazole. A preliminary report. *Journal of the American Medicine Association* 190: 852-853.
28. Keystone J. S. and Murdoch J. K. (1979) Mebendazole. *Annual of Internal Medicine* 91: 582-586.
29. Kim Y.S., Tsao D., Siddiqui B., Whitehead J.S., Arnstein, P., Bennett J. and Hicks J. (1980) Effect of sodium butyrate and dimethylsulfoxide on biochemical properties of human colon cancer cells. *Cancer* 45:1185-1192.
30. Lennernäs H. (1997) Human jejunal effective permeability and its correlation with preclinical drug absorption models. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 49:627-638.
31. León A.R., Hol D.S. and Velázquez A. (1993) Studies on the mechanism of biotin uptake by brush-border membrane vesicles of hamster enterocytes. *Archives of Medical Research* 24(2):143-146.
32. Levin, M. L. (1983) Treatment of trichinosis with mebendazole. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32(5): 980-983.

33. López R. N. (1999) Evaluación de la actividad de derivados del 1-metilbencimidazol sobre *Trichinella spiralis*. Tesis QFB. Facultad de Química UNAM.
34. Lundin S., Pantzar N., Hedin L. and Weström B.R. (1990) Intestinal absorption enhancement by sodium taurodihydrofusidate of a peptide hormone analogue (dDAVP) and a macromolecule (BSA) *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Pharmaceutics* 59:263-269.
35. Madara J.L. and Pappenheimer J.R. (1987) Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia. *Journal of Membrane Biology* 100:149-164.
36. Marriner S.E. and Bogan J.A. (1980) Pharmacokinetics of albendazole in sheep. *American Journal of Veterinary Research* 41:1126-1129.
37. Marriner S. E., Morris D. L., Dickson B. and Bogan J. A. (1986) Pharmacokinetics of albendazole in man. *European Journal of Clinical Pharmacology* 30: 705-708.
38. McCracken R. O. and Lipkowitz K. B. (1990) Structure-activity relationships of benzothiazole and benzimidazole anthelmintics: A molecular modeling approach to *in vivo* drug efficacy. *Journal of Parasitology*. 76(6): 853-864.
39. Mehran M., Seidman E., Marchand R., Gurbindo C. and Levy E. (1995) Tumor necrosis factor- α inhibits lipid and lipoprotein transport by Caco-2 cells. *American Journal of Physiology* 269:G953-G960.
40. Mohrmann I., Mohrmann M., Biber J. and Murer H. (1986) Sodium-dependent transport of Pi by an established intestinal epithelial cell line (Caco-2). *American Journal of Physiology* 250:G323-G330.
41. Pade V. and Stavchansky S. (1997) Estimation of the relative contribution of the transcellular and paracellular pathway to the transport of passively absorbed drugs in the Caco-2 cell culture model. *Pharmaceutical Research* 14(9):1210-1215.
42. Palm K., Stenberg P., Luthman K. and Artursson P. (1997) Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans. *Pharmaceutical Research* 14(5):568-571.
43. Penicaut B., Beeck C., Maugein Ph., Parish R., Randolph W., Di Cuollo C. J. y Rossignol J. F. (1981) Albendazol. Perfil farmacocinético. *Compendium de Investigaciones Clinical Latinoamericanas* 1(suplemento 1): 61-66.

44. Pinto M., Appay M., Simon P., Chevalier G., Dracopoli N., Fogh J. and Zweibaum A. (1982) Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer cells by replacement of glucose by galactose in the medium. *Biology of the Cell* 44:193-196.
45. Pinto M., Robine S., Appay M., Kendinger M., Triadou N., Dussaulx E., Lacroix B., Simon P., Haffen K., Fogh J. and Zweibaum A. (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell* 47:323-330.
46. Prieto J.G., Justel, A., Del Estal J.L., Barrio J.P. and Alvarez A.I. (1991) Comparative study on gastric absorption of albendazole and mebendazole in rats. *Comparative Biochemical and Physiology* 100(3):397-400.
47. Quaroni A., Wands J., Trelstad L. and Isselbacher K. (1979) Epithelioid cell cultures from rat small intestine. *Journal of the Cell Biology* 80:248-265.
48. Raeissi S., Guo Z., Dobson G., Artursson P. and Hidalgo I.J. (1997) Comparison of CYP3A activities in a subclone of Caco-2 cells (TC7) and human intestine. *Pharmaceutical Research* 14(8):1019-1025.
49. Raoof A., Moriarty D., Brayden D., Corrigan O.I., Cumming I., Butler J. and Devane J. (1997) Comparison of methodologies for evaluating regional intestinal permeability.
50. Rapson, E.B. (1983) Benzimidazoles in chemotherapy of helminths Parasite. Capitulo 1
51. Rigtrup K. and Ong D. (1992) A retinyl ester hidrolase activity intrinsic to the brush border membrane of rat small intestine. *Biochemistry* 31:2920-2926.
52. Rubas W., Cromwell M., Shahrokh Z., Villagran J., Nguyen T., Wellton M., Nguyen H. and Mrsny R. (1996a) Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85(2):165-169.
53. Rubas W., Cromwell M., Mrsny R., Ingle G. and Elias K. (1996b) *Pharmaceutical Research* 13(1):23-26.
54. Saimont A. G., Meulemans A., Cremieux A. C., Giovanangeli M. D., Hay J. M., Delaitre B. and Coulaud J. P. (1983) Albendazole as a potential treatment for human hydatidosis. *Lancet* ii: 652-656.
55. Sharma S. (1994). Design of new drugs for helminth diseases: lead optimization in benzimidazoles. *Advances in Drug Research* 25:103-172.

56. Stewart B., Chan H., Lu R., Reyner E., Schmid H., Hamilton H., Steinbaugh B. and Taylor M. (1995) Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple *in vitro* and *in situ* models: relationship to absorption in human. *Pharmaceutical Research* 12(5):693-699.
57. Stoll N. (1947) *Journal of Parasitology* 33:1-18.
58. Testa B., Carrupt P., Gaillard P., Billois F. and Weber P. (1996) Lipophilicity in molecular modeling. *Pharmaceutical Research* 13(3):335-343.
59. Wali R., Baum C., Sitrin M. and Brasitus T. A. (1989) Regulation of protein kinase C, intracellular Ca^{2+} and Na^+/H^+ exchange in Caco-2 cells by $1,25(OH)_2D_3$. *Gastroenterology* 96(5):A534.
60. Watts S. D. M., Rapson E. B., Atkins A. M. and Lee D. L. (1982) Inhibition of acetylcholinesterase secretion from *Nippostrongylus brasiliensis* by benzimidazole anthelmintics. *Biochemical Pharmacology* 31(19): 3035-3040.
61. Webster L. T. Fármacos usados en la quimioterapia de las helmintiasis. En: Gilman A. G., Goodman A. S. (1985) *The Pharmacological basis of the therapeutics*. 7th ed. Edit. Mac Millan, New York. pp 1004-1023.
62. Witassek F., Burkhardt B., Eckert J. and Bircher J. (1981) Chemotherapy of alveolar echinococcosis comparison of plasma mebendazole concentrations in animals and man. *European Journal of Clinical Pharmacology* 20: 427-433.
63. Wils P., Warnery A., Phung-ba V., Legrain S. and Scherman D. (1994) High lipophilicity decreases drug transport across intestinal epithelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 269(2): 654-658.
64. Yee S. (1997) *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestine) absorption in man-fact or myth. *Pharmaceutical Research* 14(6):763-766.

ANEXO

Procedimiento de disociación celular

1. Precalentar todos los reactivos en un baño maría a 37°C.
2. Aspirar todo el medio de cultivo de la caja.
3. Adicionar aproximadamente 20 mL de amortiguador de fosfatos salino libre de calcio y magnesio. Dejar por 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Quitar el amortiguador y adicionar 5 mL de solución de tripsina (0.25% p/v) y EDTA (1mM) y agitar suavemente.
5. Remover 3 mL de la solución de tripsina.
6. Incubar la caja de cultivo a 37°C por 5 minutos. Golpear suavemente la caja con la mano para asegurar que todas las células se liberaron.
7. Colocar la caja en posición vertical y adicionar 10 mL de medio de cultivo completo para neutralizar la tripsina.
8. Pipetear continuamente para disociar posibles grumos que se forman entre las células.
9. Transferir el medio de cultivo y las células a un tubo cónico de 15 mL y centrifugar a 2400 rpm por 3 minutos.
10. Eliminar el sobrenadante y resuspender en medio de cultivo completo.
11. Contar y resembrar.