



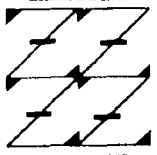
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA DE DOS NUEVOS DERIVADOS BENCIMIDAZOLICOS CONTRA LA TRIQUINELOSIS EXPERIMENTAL EN RATON.

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE LICENCIADO EN QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO PRESENTA JOSE GONZALEZ AGUILAR

UNAM FES ZARAGOZA



LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR DE TESIS: DRA. LILIAN YEPEZ MULIA

MEXICO, D. F.,

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme permitido tener salud e inteligencia para alcanzar esta meta, por brindarme el más inmenso tesoro que puede tener un ser humano: una familia.

A mis padres; Julio González Nuñez y María Flora Aguilar Castro por haberse atrevido a invertir en el negocio que menor retribución tiene en esta vida, la educación de un hijo. Gracias por todas aquellas cosas que debieron sacrificar por mí, por las noches de angustia y desvelo que les cause, por todo el trabajo extra que realizaron para que pudiera continuar mis estudios, no me alcanzarán la vida para darles las gracias, que dios los bendiga y cuide siempre.

A mis hermanos; Laura, Alberto y Patricia por su comprensión y cariño en los momentos más difíciles, por soportar que no les dedicará más tiempo aún cuando ustedes me necesitaban, por hacerme compañía y aligerar la carga cuando esta parecía doblegarme, peor sobre todo por preocuparse por mí, porque gracias a ustedes no me hizo falta nada.

A Gonzalo y Brenda por los buenos momentos que pasamos durante este tiempo, por aceptarme como un miembro más de su nueva familia.

A mis abuelos, tíos, primos y familia en general por sus buenos deseos para que culminará mis estudios.

Al personal del Laboratorio de Parasitología de la UIMEIP-Pediatría, CMN Siglo XXI: Amparo, Jesús, Rosa María, Lilia, Luz María, Nancy por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo, en especial a la Bióloga Amparo por el tiempo y los conocimientos que amablemente destino para mi adiestramiento.

A la Dra. Lilián Yépez Mulia por la sapiencia y atingencia con que supo encausarme para concluir prontamente este trabajo, por la amabilidad de su trato, por la paciencia y tolerancia mostradas cuando las cosas no marcharon bien, por darme la oportunidad de formar parte temporalmente de su equipo de trabajo, por haber confiado en mí, gracias.

A la Q.F.B. Patricia Vidal Millán por su valiosa asesoría, tanto como profesora como durante la realización de esta tesis, por sus consejos y conocimientos aportados en beneficio de mi formación.

Al Q.B.P. Joel Saucedo, a la Q.F.I. Estela Valencia y al Q.F.B. Manuel Orduña, por contribuir con su punto de vista crítico en el mejoramiento de este trabajo.

Al Dr. Rafael Castillo y al Dr. Francisco Hernández por su contribución en la síntesis de los compuestos evaluados, además por colaborar en la obtención de una beca económica, gracias porque fueron los primeros en abrirme una puerta en este camino.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A la UNAM por su aportación económica mediante el programa PAPIIT, proyecto 2021/02 para la realización de este trabajo.

A la srta. Haydeé Montes por acompañarme durante este camino, por la ayuda moral que me brindo, por todos los momentos buenos y malos que compartimos, por enseñarme a vivir y luchar por algo, pero sobre todo por soportarme a su lado, por evitar que sucumbiera en el intento y ayudarme a superarme como persona, por cargar con mis viscidudes sin queja alguna. Por su entusiasmo contagioso y su buena vibra gracias.

A las persona que haya omitido mencionar y que en alguna etapa de mis estudios formaran parte de mi núcleo de trabajo, mis parabienes.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	3
2. Fundamentación teórica.....	6
2.1 Taxonomía del género <i>Trichinella</i>	6
2.2 Ciclo Biológico de <i>T. spiralis</i>	7
2.3 Cuadro Clínico de la triquinelosis.....	9
2.4 Epidemiología.....	11
2.5 Diagnóstico.....	13
2.6 Tratamiento.....	15
2.7 Mecanismo de acción de los compuestos bencimidazólicos.....	17
2.8 Relación Estructura Química-Actividad Biológica de compuestos derivados del bencimidazol.....	19
3. Planteamiento del Problema.....	25
4. Objetivos.....	29
5. Hipótesis de trabajo.....	30
6. Material y Métodos.....	30
6.1.1 Equipo	30
6.1.2 Material.....	31
6.1.3 Reactivos.....	31
6.2 Metodología.....	32
6.2.1 Desparasitación de los animales de experimentación.....	32
6.2.2 Preservación del ciclo de vida del parásito.....	33
6.2.3 Obtención de larvas musculares (LM) de <i>T. spiralis</i>	33
6.2.4 Obtención de adultos de <i>T. spiralis</i>	34

6.2.5 Determinación de la actividad biológica " in vivo " de los compuestos bencimidazólicos RCB16 y RCB20 contra la fase enteral (adultos) de <i>T. spiralis</i>	35
6.2.6 Determinación de la actividad biológica " in vivo " de los compuestos bencimidazólicos RCB16 y RCB20 contra la fase sistémica (larva muscular) de <i>T. spiralis</i>	35
6.3 Tipo de Estudio.....	36
6.4 Población.....	36
6.5 Criterios.....	36
6.5.1 Inclusión.....	36
6.5.2 Exclusión.....	36
6.5.3 Eliminación.....	36
6.6 Variables.....	37
6.6.1 Independientes.....	37
6.6.2 Dependientes.....	37
7. Resultados.....	38
8. Discusión de Resultados.....	46
9. Conclusiones.....	49
10. Aportaciones y Sugerencias.....	50
11. Anexos.....	51
11.1 Preparación de solución reguladora de fosfatos pH 7.4.....	51
11.2 Preparación de Bacto Agar al 0.2%.....	51
11.3 Formulación en que se suspendieron los compuestos.....	52
11.4 Análisis Estadístico.....	52
12. Referencias Bibliográficas.....	54

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias son uno de los principales problemas de salud pública y veterinaria alrededor del mundo, principalmente por la morbilidad y mortalidad que causan. Estimaciones hechas alrededor de 1980, con una población mundial aproximada de 4.3 billones de personas, existían entre 1100-1300 millones de casos de ascariasis, 1000 millones de uncinariasis, 500-1000 millones de personas con trichuriasis, 300-500 millones con enterobiasis, 400 millones con filariasis y entre 50-100 millones con strongyloidiasis⁴⁸. De acuerdo a una estimación hecha por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1992, anualmente mueren alrededor del mundo aproximadamente 2.5 millones de personas a causa de enfermedades parasitarias, siendo 2 causadas por protozoarios (malaria y amebiasis) y una por helmintos (uncinariasis)⁴⁸. Aunque este problema se agudiza en países con clima tropical, no sólo es responsabilidad de estos países buscar la manera de remediar la situación, ya que debido a la globalización tanto económica como social que existe hoy en día, es obligación de todos buscar nuevas alternativas para el control, prevención y tratamiento de las enfermedades causadas por estos parásitos.

Dentro de las helmintiasis, la triquinosis causada por el nematodo *Trichinella spiralis* resulta de importancia, ya que tiene una distribución mundial y no respeta condición social, así lo demuestran los brotes que se han presentado en países de primer mundo como Francia, Alemania, Italia y Estados Unidos por citar algunos³⁹. Estos brotes han sido asociados principalmente al consumo de derivados cárnicos de cerdo y caballo mal cocidos. México no es la excepción y esta parasitosis ocupaba en 1990 el quinto lugar en cuanto a morbilidad¹. Tomando en consideración los pobres estándares higiénicos en cuanto a la obtención, manejo, procesamiento y distribución de los productos derivados de carne tanto porcina como equina, que se practican en México, este problema podría ir en aumento.

Los esfuerzos en el control de infecciones por parásitos helmintos se basan principalmente en el tratamiento con antiparasitarios. Los agentes terapéuticos con los que se cuenta en la actualidad incluyen a los derivados bencimidazólicos (albendazol, mebendazol, oxfendazol, triclabendazol, entre otros),

tetrahidropirimidinas (pyrantel y morantel), imidazotiazoles (levamisol), lactonas macrocíclicas (ivermectina y moxidectina) y praziquantel; estos fármacos atacan tanto parasitosis intestinales como sistémicas^{9, 12, 23}.

En el caso de la triquinosis, la terapia antiparasitaria que se utiliza en su control está basada en los derivados bencimidazólicos como mebendazol, albendazol, oxfendazol, entre otros⁹. De éstos, el que presenta mayor actividad a nivel intestinal es el albendazol, pero a nivel sistémico ninguno de estos compuestos es realmente eficaz, puesto que para alcanzar niveles plasmáticos adecuados se necesitan tratamientos muy prolongados²⁹. Lo anterior es debido principalmente a la poca absorción intestinal que tienen los derivados bencimidazólicos (sólo se absorbe aproximadamente un 5% de una dosis de albendazol administrada por vía oral). La insolubilidad de estos compuestos es una característica negativa que limita su uso a tratamientos largos y costosos y en consecuencia poco efectivos.

En cuanto al mecanismo de acción de los derivados bencimidazólicos se tiene conocimiento de que éstos inhiben la polimerización de la tubulina para la formación de microtúbulos, lo que desencadena una serie de eventos bioquímicos que traen como consecuencia la muerte del parásito, este es el mecanismo principal para explicar su actividad antihelmíntica^{28, 48}.

Un aspecto de interés en el control de la triquinosis, es la creciente aparición de parásitos resistentes a los derivados bencimidazólicos^{13, 17, 45, 49, 53}. Enos y Coles (1990) demostraron en el nematodo *Caenorhabditis elegans* una mutación en la subunidad- β de la tubulina, que confería resistencia a dicho parásito al efecto de mebendazol, albendazol, parbendazol y cambendazol¹⁶. Estudios moleculares realizados por Kwa y cols. (1994), usando técnicas de PCR, demostraron en el nematodo *Haemonchus contortus* una correlación total entre la resistencia a los derivados bencimidazólicos con el reemplazo de un aminoácido (fenilalanina por tirosina) en la posición 200 de la β -tubulina²⁵. Resultados similares fueron reportados por Elard y Humbert (1999) en el helminto *Teladorsagia circumcincta*¹⁵. Considerando lo anterior, es de vital importancia el diseño, síntesis y evaluación de nuevos compuestos con actividad antiparasitaria. Con esta finalidad, se ha escogido la molécula del bencimidazol, como fuente generadora de nuevos fármacos, por ser un heterociclo muy versátil, susceptible de

un sin número de modificaciones químicas, que dan como resultado una gran variedad de compuestos con diferentes características en cuanto a su comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, así como su actividad biológica.

En el diseño y síntesis de nuevos compuestos hay que considerar una característica relevante como lo es la solubilidad: compuestos más solubles tendrán una mejor absorción a nivel intestinal y así tener efectividad a nivel sistémico, aumentando los niveles plasmáticos y en consecuencia requiriéndose la administración de dosis bajas y por periodos más cortos. Con lo anterior, se combatiría de manera más eficiente parasitosis sistémicas y en el caso de la triquinelosis la fase de larva muscular.

El paso siguiente a la síntesis de nuevos compuestos es la evaluación de su actividad biológica " in vitro ", que funciona como un primer paso en el tamizaje. Sin embargo, la evaluación de la actividad antiparasitaria " in vitro " no permite determinar la permeabilidad de estos nuevos compuestos, que en el caso de infecciones sistémicas es una de las principales limitantes en su biodisponibilidad y por consiguiente en su eficacia antiparasitaria, siendo necesario evaluar la actividad " in vivo " de los compuestos de interés seleccionados " in vitro ".

Una vez que se evalúa la actividad antiparasitaria de los nuevos compuestos, se pueden realizar estudios relacionados con la estructura-actividad de una molécula determinada, dando la pauta en la síntesis de otras moléculas con mayor actividad antiparasitaria.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. FUNDAMENTACION TEÓRICA

2.1 TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Trichinella*

El género *Trichinella*, conformado por parásitos helmintos, infecta a un buen número de especies animales tanto carnívoros como herbívoros e inclusive al humano. La clasificación taxonómica de este parásito es la siguiente:

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

Tomado de Beaver (1986)¹⁰.

En función de la comparación de patrones isoenzimáticos, secuencias de DNA repetitivo y algunas características biológicas que incluyen; número de larvas recién nacidas por hembra, tiempo de formación de la célula nodriza, índice de capacidad reproductiva en ratones y/o pollos y resistencia de la larva muscular a la congelación^{38, 39, 44}, diferentes aislados de *Trichinella* han sido clasificados en 7 especies y 3 genotipos (**Tabla 1**). Todas estas especies son potencialmente capaces de infectar al ser humano, aunque la mayoría de los casos de triquinosis en humanos son causados por *T. spiralis*.

Tabla 1. Especies y genotipos del género *Trichinella* y su distribución geográfica

Especie o genotipo	Distribución geográfica
<i>T. spiralis</i>	Cosmopolita
<i>T. nativa</i>	Regiones árticas y subárticas
<i>T. britovi</i>	Áreas templadas de la región paleártica
<i>T. murrelli</i>	Estados Unidos
<i>T. nelsoni</i>	África del sur
<i>T. pseudospiralis</i>	Cosmopolita
<i>T. papuae</i>	Papua Nueva Guinea
<i>Trichinella</i> T6	Sur de Canadá, Norte de Estados Unidos
<i>Trichinella</i> T8	Sur de África y Namibia
<i>Trichinella</i> T9	Japón

Tomada y modificada de Murrell y Pozio (2000)³⁹.

2.2 CICLO BIOLÓGICO DE *T. spiralis*

El nematodo *T. spiralis* es un parásito intracelular que lleva a cabo todos sus estadios de desarrollo en un solo hospedero¹.

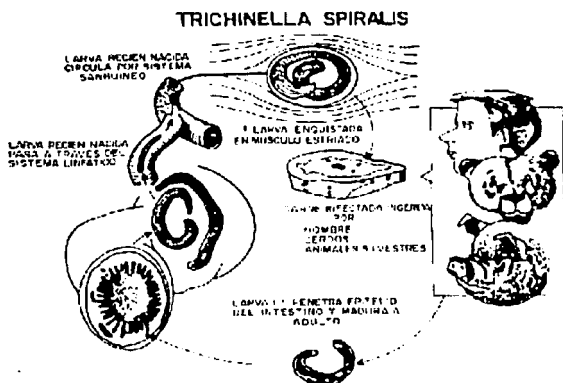
El ciclo de vida de este parásito (**Figura 1**) presenta dos fases: una fase entérica, donde el parásito pasa por cuatro estadios larvarios y el adulto; y la fase parenteral, que incluye la larva recién nacida (LRN) y la larva muscular (LM o L₁).

Durante la fase entérica, el huésped potencial adquiere la triquinosis al ingerir carne de cerdo, caballo, animales silvestres, infectada con la larva muscular enquistada L₁. En el estómago las larvas son liberadas migrando e invadiendo el epitelio columnar y la lámina propia del intestino delgado, preferentemente en duodeno^{51,52}.

Treinta horas después de la infección, larva L₁ pasa por cuatro mudas que se llevan a cabo durante este tiempo y sufre una morfogénesis extensa hasta desarrollar al estado adulto en donde ya existe diferenciación de sexos. La cópula se efectúa presumiblemente entre las 37-40 h posteriores a la infección. Después, los machos mueren y son expulsados; las hembras

umentan de tamaño penetrando más profundamente la mucosa intestinal, llegando incluso a peritoneo y a los ganglios linfáticos mesentéricos. La embriogénesis dura alrededor de 90 h, ya que las larvas recién nacidas en el caso de *T. spiralis*, son liberadas hasta el quinto día después de la infección.

Figura 1. Ciclo biológico de *T. spiralis*.



Tomado de Yépez y Ortega (1994)⁵⁶.

Durante la fase parenteral, las larvas recién nacidas se introducen en la lámina propia del intestino y entran a la circulación arterial vía conducto torácico, pasan por el corazón y los pulmones hasta llegar a invadir células del músculo esquelético y desarrollándose a larva muscular. Los músculos que principalmente invade son diafragma, laringe, lengua, intercostales, bíceps y pectorales. LM induce en la célula muscular cambios que culminan en una nueva unidad hospedera llamada célula nodriza, cuyas funciones se han moldeado para proveer al parásito con nutrientes y exportar desechos.

Cada célula nodriza tiene un plexo de vénulas, que ayudan al transporte de dichas sustancias, la transformación de la célula muscular a célula nodriza involucra la reubicación de todos los componentes musculares específicos con espirales de membranas lisas y agregados de mitocondrias parcialmente disfuncionales, formación de varios núcleos, hipertrofia del glicocáliz en un revestimiento externo de colágena y angiogénesis¹¹. El complejo L₁-célula nodriza puede permanecer estable durante toda la vida del hospedero y no calcificarse; sin embargo, este proceso puede ocurrir a partir de diferentes tiempos de la infección, dependiendo de la especie del hospedero. El ciclo se inicia nuevamente cuando la larva L₁ es transmitida a través del consumo de carne a otro hospedero de la misma especie o de otra diferente.

2.3 CUADRO CLÍNICO DE LA TRIQUINELOSIS

Las manifestaciones clínicas que se presentan al adquirir una infección por *T. spiralis* son sumamente variadas y no siguen un patrón definido como en otros padecimientos causados por helmintos. Una de las principales causas de esta variabilidad es el hecho de que el cuadro clínico que presenta el paciente es dependiente de la carga parasitaria con que se infecta⁵⁶.

En la **Tabla 2** se presentan algunos signos clínicos relacionados con la fase de desarrollo del parásito.

Una de las manifestaciones más graves de la triquinosis es la miocarditis, que no es provocada por la invasión directa de la larva en el músculo cardíaco, sino por la respuesta inmune inflamatoria que provoca la larva recién nacida durante su transporte a través del torrente sanguíneo. La muerte por esta causa suele presentarse entre la cuarta y octava semanas de evolución de la enfermedad, en esta fase el paciente puede sufrir encefalitis y meningitis⁵⁶.

Tabla 2. Fases biológicas progresivas del desarrollo de *Trichinella spiralis* y los correspondientes cuadros clínicos

Fase biológica	Comienzo	Cuadros clínicos
Las larvas ingeridas se desenquistan y penetran en el epitelio intestinal.	2-4 horas	Síntomas gastrointestinales (dolor abdominal, náuseas, diarrea, espasmos abdominales y vómito).
Los gusanos copulan y maduran.	30 horas	
Las hembras depositan las larvas recién nacidas que invaden músculo esquelético.	6 días	Edema de cara y fiebre
	7 días	
Invasión máxima de la fibra muscular.	10 días	Fiebre máxima (40-41°C)
	11 días	
Disminución de la larviposición.	14 días	Miositis y dolores "reumáticos" Eosinofilia y anticuerpos circulantes.
Larvas en los músculos totalmente diferenciadas.	17 días	
	20 días	
Encapsulación precoz. Intestinos prácticamente libres de formas adultas.	21 días	Eosinofilia en su máximo. Miocarditis o encefalitis.
	23 días	
Encapsulación prácticamente completa.	26 días	Síntomas respiratorios.
	1 mes	
	2 meses	Desaparece la fiebre.
Vida máxima de los gusanos en el intestino.	3 meses	Gran probabilidad de muerte por miocarditis o encefalitis.
	6 meses	Convalecencia lenta.
Puede empezar la calcificación de la célula nodriza	8 meses	Desaparecen los síntomas neurológicos y la miocarditis.
	1 año	
La calcificación de la célula nodriza puede ser completa.		
Las larvas pueden seguir siendo viables dentro de las cápsulas calcificadas.	6 años.	

Tomada de Beaver (1986)⁶.

El cuadro clínico descrito anteriormente está sujeto a muchas modificaciones en el comienzo y evolución de la enfermedad, además de que en la mayoría de las infecciones leves no existe una sintomatología característica y la fase temprana de la enfermedad puede confundirse con padecimientos gastrointestinales⁶.

2.4 EPIDEMIOLOGÍA

El género *Trichinella* está ampliamente distribuido alrededor del mundo, en un gran número de animales carnívoros que funcionan como huéspedes incidentales (ej. zorro, jabalí, oso polar, mapache, etc.), inclusive en humanos⁵⁶.

La principal fuente de contagio en humanos es el consumo de carne porcina o equina de animales infectados con *T. spiralis*. Estos animales se infectan ya sea por consumo de desechos de comida infectados con la LM del parásito, por la ingesta de ratas infectadas e inclusive por la mordedura entre ellos mismos¹.

En México, los primeros reportes de triquinosis en humanos fueron hechos por Olvera (1896) estudiando 12 cadáveres en los que no fue diagnosticada la enfermedad⁴¹.

Entre 1952-1997, aproximadamente 758 casos de triquinosis humana fueron reportados oficialmente en México⁴¹, en la mayoría de los casos, las epidemias ocurrieron por el consumo de carne porcina mal cocinada. Los principales estados en que ocurrieron epidemias documentadas oficialmente son: Zacatecas, Estado de México, Durango, Sonora, Chihuahua, Jalisco, Michoacán y en Distrito Federal (**Figura 2**).

En el periodo correspondiente entre 1991-1995, en Europa fueron oficialmente reportados 282 casos en humanos en 7 epidemias diferentes³⁹. El número de pacientes que fallecieron fue muy bajo en comparación con el número de individuos que mostraron síntomas clínicos de la enfermedad.

Figura 2. Estados de la República Mexicana en los cuales se han reportado brotes de triquinosis humana.

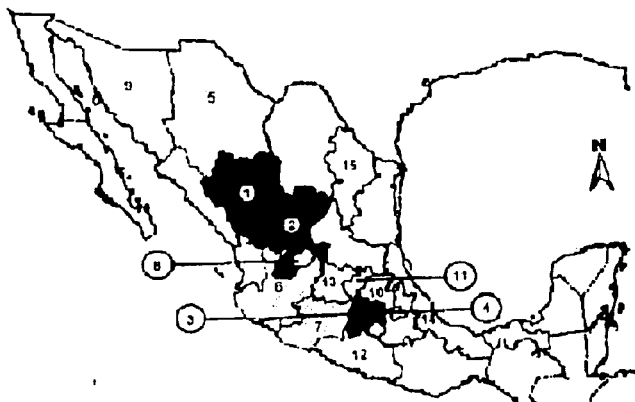


Fig. 2. Estados de alta incidencia (■) incluyen: Durango (1), Zacatecas (2), Estado de México (3), Ciudad de México (4); estados de mediana incidencia (□) incluyen: Chihuahua (5), Jalisco (6), Michoacán (7); estados con baja incidencia (□) incluyen: Aguascalientes (8), Sonora (9), Hidalgo (10), Querétaro (11), Guerrero (12), Guanajuato (13), Veracruz (14) y Nuevo León (15). Tomado de Ortega y cols. (2000)⁴¹.

En México el consumo de carne de cerdo es generalizado, las condiciones de crianza y sacrificio de este animal en rastros clandestinos son deficientes y en condiciones insalubres, razón por la cual es probable que la enfermedad vaya en aumento, además de que es posible que la transmisión se produzca por la ingesta de otras especies de mamíferos (como el caballo). Es necesario realizar estudios epidemiológicos en nuestro país que permitan mejorar el conocimiento de la distribución geográfica del género *Trichinella* en México, así como su prevalencia actual.

2.5 DIAGNÓSTICO

Considerando que los pacientes con síntomas presuntivos de triquinosis tienen como constante el antecedente de consumo de carne de cerdo y/o caballo mal cocinada, es necesario que se apliquen estrategias diagnósticas que permitan detectar de manera más confiable y específica si los animales utilizados para el consumo humano están infectados con *T. spiralis*⁵⁶.

Durante la fase intestinal de la infección, rara vez es posible aislar los parásitos adultos o las larvas musculares en las heces durante la fase diarreica de la enfermedad, ni de fluidos biológicos como sangre, líquido cefalorraquídeo o leche, durante la fase de migración⁶.

Sin embargo cuando las larvas musculares se encuentran enquistadas, el diagnóstico puede establecerse mediante la demostración del parásito en pequeñas muestras de músculo estriado. En 1959, Prost demostró la presencia de la larva muscular de *T. spiralis* en muestras obtenidas de los músculos deltoides, bíceps, gemelos y pectorales que eran comprimidos entre 2 portaobjetos y posteriormente se observaban al microscopio, esta técnica fue denominada triquinoscopia^{3, 56}.

Sin embargo, este método tiene un uso limitado, ya que se pueden pasar por alto hasta un 25% de los animales positivos con cargas parasitarias bajas.

Los países europeos, suelen utilizar como método diagnóstico en los rastros porcinos y/o equinos la digestión artificial de una biopsia de músculo obtenido de diafragma o lengua de los animales a examinar empleando pepsina/HCl al 1%. Este método es mucho más sensible que la triquinoscopia y permite la detección de infecciones con una carga parasitaria baja⁵⁶.

En la actualidad, una alternativa que se emplea en el diagnóstico de la triquinosis es el uso de métodos serológicos para la detección en suero u otro fluido biológico de anticuerpos o antígenos específicos de *T. spiralis*, sin la necesidad de aislar al parásito. Uno de los métodos más conocidos es el ensayo de ELISA, que es sumamente sensible para la detección tanto de anticuerpos como de antígenos⁵⁶.

A partir de que en 1975 se demostró la utilidad práctica del ELISA, su sensibilidad y especificidad han sido numerosamente estudiadas. Su eficacia con respecto a otros métodos empleados rutinariamente como la triquinoscopia y la digestión artificial ha sido comparada, inclusive contra otros métodos serológicos como inmunofluorescencia, contraelectroforesis y fijación de complemento³.

La técnica de ELISA tiene una alta sensibilidad para la detección de cerdos infectados con *T. spiralis*, sin embargo la especificidad alcanzada no es del todo satisfactoria. Cuando se utiliza un extracto total de la larva muscular del parásito con la finalidad de rastrear anticuerpos en suero, el hecho de no usar un antígeno purificado reduce la posibilidad de detectar niveles bajos de anticuerpos específicos, además de provocar un número considerable de falsos positivos. Por lo que, se han utilizado antígenos de superficie y antígenos de secreción-excreción purificados con anticuerpos monoclonales, obteniéndose incrementos tanto en la sensibilidad como en la especificidad⁵⁶.

Estudios inmunológicos han demostrado la existencia de un epitopo muy inmunogénico en estas moléculas, el carbohidrato tivelosa, un azúcar específico del género *Trichinella*, ya que ningún otro helmineto lo presenta. En base a esto, se ha sugerido su uso para el diagnóstico de la triquinosis en cerdos, sin embargo este azúcar también está presente en la pared celular de bacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*, las cuales están involucradas frecuentemente en infecciones porcinas, razón por la cual ésta latente la posibilidad de encontrar reacciones cruzadas⁵⁶.

Por último, un nuevo enfoque que se ha buscado es la utilización de la técnica de amplificación de DNA (PCR) del parásito, usando oligonucleótidos complementarios a una secuencia repetida de DNA de 1700 pares de bases de *T. spiralis*, detectándose específicamente infecciones por este parásito¹⁴.

2.6 TRATAMIENTO

Los principales fármacos utilizados para tratar de combatir la infección causada por el nematodo *T. spiralis* son en su mayoría derivados bencimidazólicos⁹.

El primer fármaco utilizado para erradicar la triquinosis a nivel intestinal con resultados alentadores fue el tiabendazol, sintetizado por los laboratorios Merck Sharp y Dohme a mediados de 1960^{9, 48}. Desafortunadamente este bencimidazol provocaba reacciones colaterales indeseables, entre ellas, anorexia, vértigo, diarrea, hipoglucemia, bradicardia e hipotensión. Además, el hecho de que el tiabendazol tiene descubiertas las posiciones 5 y 6 del anillo bencimidazólico, incrementa su metabolismo de primer paso, razón por la cual su tiempo de vida media era de 11 minutos en ratas. Por tales motivos, el tiabendazol tuvo un uso limitado⁴⁸.

Con la introducción de este fármaco se inició una nueva generación de antiparasitarios, con lo cual se estimuló la investigación y síntesis en varias partes del mundo de diferentes derivados bencimidazólicos, hasta que los laboratorios Janssen lanzaron al mercado el mebendazol, un nuevo fármaco ampliamente usado y que tuvo un enorme impacto en el tratamiento de infecciones intestinales causadas por helmintos⁹. Sin embargo, indudablemente con el descubrimiento del albendazol en 1979 por los laboratorios Smith-Kline-French, se encontró al más efectivo agente antihelmíntico, de mayor espectro de acción y sobre todo, que combate con mayor eficacia las infecciones sistémicas causadas por helmintos, entre ellos *T. spiralis*²¹.

McCracken en 1978 demostró en un estudio comparativo entre albendazol y mebendazol contra *T. spiralis* en ratones, que la eficacia de ambos compuestos es directamente proporcional a la dosis administrada, además encontró que el albendazol era más activo que el mebendazol contra la fase adulta, mientras que el mebendazol fue más activo que el albendazol contra la larva migratoria (a una dosis de 50 mg/kg de peso). Este mismo estudio reveló, que para el tratamiento de la fase enteral es fundamental el momento en que se administra el fármaco; utilizando las mismas dosis pero a diferentes tiempos (2 hrs y 72 hrs post-infección respectivamente), la eficacia prácticamente se duplica (100% contra 45-56%) para ambos compuestos³³.

Por otra parte, McCracken y cols. (1982) utilizaron diferentes formas de dosificación del mebendazol sobre la fase enteral de la triquinelosis en ratones y obtuvieron resultados interesantes³⁴. Una dosis única de 150 mg/Kg de peso de mebendazol administrada al tercer día post-infección o dividida en tres dosis diarias de 50 mg/Kg peso entre los días 3-5 post-infección, redujo la carga parasitaria en un 78% y 62% respectivamente.

De igual forma, cuando se comparó el efecto producido por 15 mg/Kg de peso de mebendazol sobre la fase adulta de *T. spiralis* dosificados al tercer día post-infección, administrándose 3 dosis de 5 mg/Kg de peso o 2 dosis de 7.5 mg/Kg de peso cada 8 horas respectivamente, se observó una eficacia terapéutica del 8% de reducción de la carga parasitaria con el primer método y un 51% con el segundo método.

Grzywinski y Karmanska (1990) mostraron en ratones la eficacia del luxabendazol sobre las diferentes fases de la triquinelosis¹⁶. Administrando una dosis diaria de 20 mg/Kg de peso de dicho fármaco entre los días 5-9 post-infección se obtuvo un 100% de reducción de los parásitos adultos. La misma dosis administrada diariamente entre los días 10-14 post-infección eliminó el 98.9% de las larvas recién nacidas y entre los días 35-39% post-infección redujo 99.9% la cantidad de larvas musculares del parásito.

López-García y cols. (1997) demostraron en ratones la mayor eficacia terapéutica del albendazol (94.7%) sobre su derivado sulfóxido, ricobendazol (65.5) contra la fase larva muscular de *T. spiralis*³⁰.

Con estos estudios se pone de manifiesto la importancia del régimen de dosificación del fármaco.

Como se puede observar, los resultados obtenidos en animales son muy alentadores para algunos derivados bencimidazólicos, sin embargo en el caso de otros fármacos antiparasitarios clásicos como ivermectina y algunas otras avermectinas²², sobre la fase muscular del parásito, han tenido resultados negativos.

Actualmente, los fármacos usados para combatir la fase enteral y parenteral de la triquinelosis en humanos incluyen al mebendazol (5 mg/Kg/día durante 7 días) , una combinación de tiabendazol y flubendazol, así como albendazol que es el fármaco de elección por

ser menos tóxico, más barato y con una actividad similar a la del mebendazol^{9, 21}.

Una de las alternativas que se ha buscado para mejorar la biodisponibilidad del albendazol, es en función de su reformulación.

Así, López García y cols. (1993) demostraron una mayor eficacia del albendazol sobre la fase larva muscular de *T. spiralis* al emplear una solución líquida de etoxidiglico²⁹.

Penicaut y cols. (1981) determinaron el perfil farmacocinético del albendazol tanto en ratas como en humanos. Estos autores encontraron que dicho fármaco se elimina principalmente en orina (87 %) y heces (13 %). Otro dato revelador en este estudio es el hecho de que el 97% del fármaco es eliminado como sulfóxido o sulfona de albendazol durante las primeras 24 h posteriores a la administración de albendazol por vía oral en ratas Wistar. Con respecto a su distribución, se encontró que el nivel plasmático máximo se alcanzó a las 3 h posteriores a la administración del fármaco, aunque cabe resaltar que este valor máximo sólo constituye un 5% de la dosis total administrada (10 mg/Kg de peso) en ratas, disminuyendo rápidamente para prácticamente desaparecer entre las 12-18 h. En humanos sigue un patrón de distribución similar ya que el nivel plasmático máximo se encontró a las 3 h con un tiempo de vida media de 8.5 h⁴³.

2.7 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS COMPUESTOS BENCIMIDAZÓLICOS

El mecanismo de acción de los bencimidazoles ha sido revisado ampliamente, aún cuando no se conoce con precisión el mecanismo exacto de todos los bencimidazoles, actualmente se reconoce que los bencimidazoles pueden ejercer su efecto antihelmíntico al inhibir el complejo enzimático succinato deshidrogenasa-fumarato reductasa, la incorporación de glucosa por parte del parásito y/o inhibiendo la polimerización de la tubulina para formar microtúbulos e inhibiendo la fosforilación oxidativa^{7, 28, 37, 46}.

De estos mecanismos propuestos, el más revisado es el que implica la inhibición de la polimerización de la tubulina para la formación de microtúbulos. Actualmente se sabe que los bencimidazoles se unen irreversiblemente a la subunidad- β de la tubulina, lo cual trae como resultado que no se puedan ensamblar más subunidades y que no se lleve a cabo la polimerización con la subunidad- α , lo cual evita la formación de los microtúbulos, indispensables para el transporte y desecho de nutrientes en el parásito^{27, 24}.

Estudios realizados recientemente han demostrado que el mebendazol, uno de los más representativos e importantes compuestos bencimidazólicos, se une con mucha mayor afinidad a la subunidad- α de la tubulina que a la subunidad- β , antes de la polimerización de ambas subunidades, después de que se lleva a cabo la polimerización, se incrementa la afinidad del mebendazol a la tubulina, esto probablemente por la formación de nuevos receptores originados por la unión de α y β tubulina⁴².

Para que exista un adecuado acoplamiento al sitio de unión con la tubulina, en la estructura química de los derivados bencimidazólicos es obligatoria la presencia de un átomo de hidrógeno en posición 1 del anillo bencimidazólico²⁷ y un grupo carbamato de metilo en posición 2⁴⁰.

Por otra parte, se sugiere (McCracken y Lipkowitz, 1990; McCracken y Stillwell, 1991) que uno de los posibles mecanismos implicados para una óptima actividad biológica de los compuestos bencimidazólicos, es su capacidad para actuar como desacopladores de la fosforilación oxidativa, disipando el gradiente de protones que se genera normalmente en la membrana mitocondrial, con este fenómeno se vuelve permeable la membrana mitocondrial a los protones (en condiciones normales no lo es) y con esto se interrumpe el proceso de fosforilación oxidativa^{36, 37}. Se tienen datos de la capacidad desacopladora del grupo trifluorometilo (McCracken y Stillwell, 1991) en posición 2 del anillo bencimidazólico, por lo que el desacoplar la fosforilación oxidativa trae como resultado una disminución en la síntesis de ATP, privando con esto a la célula de su principal fuente energética, llevando al parásito a un estado de parálisis e inclusive a la muerte³⁷.

2.8 RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA-ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE COMPUESTOS DERIVADOS DEL BENCIMIDAZOL

Para el estudio de la relación estructura-actividad de los bencimidazoles, es necesario por principio de cuentas, conocer los sitios susceptibles de modificaciones químicas (Figura 3) en dicha molécula.

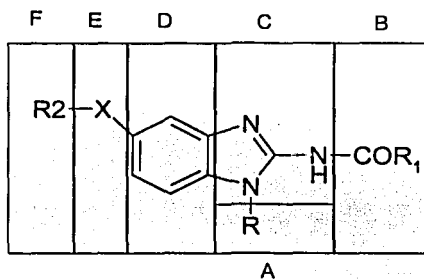


Figura 3. Estructura desglosada del anillo bencimidazólico (Tomada de Sharma, 1994)⁴⁷.

Ahora bien, para la posición A, el sustituyente R puede ser H, CH₃, COR, (CH₂)_nR, etc, aunque la actividad óptima se obtiene con la presencia del átomo de hidrógeno, lo cual favorece la unión de los compuestos bencimidazólicos al sitio de acción en la tubulina. Por otra parte, se ha demostrado que la presencia del grupo metilo (-CH₃) en esta posición reduce la capacidad para desacoplar la fosforilación oxidativa a nivel mitocondrial, lo cual trae como resultado una menor actividad^{36, 47}.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

La posición B es crucial para la actividad biológica de los derivados bencimidazólicos, salvo el tiabendazol y el triclabendazol que presentan el grupo tiazolil y metililto respectivamente, los demás compuestos con actividad antihelmíntica comprobada presentan el grupo metoxicarbonilamino ($-\text{NHCOOCH}_3$), indispensable para la inhibición de la polimerización tubulina-microtúbulos⁴⁰. La actividad obtenida puede ser de moderada a buena, con los derivados acíclicos ($R_1 = \text{metil o etil}$) y ureas ($R_1 = \text{NRR}'$). También se han probado otro tipo de átomos directamente unidos al anillo imidazólico del bencimidazol, entre estos se encuentran: $-\text{SH}$, $-\text{SR}$, $-\text{OR}$, etc, aunque el resultado es poco alentador, pues ninguno de los compuestos evaluados ha logrado alcanzar la actividad biológica de los compuestos ya existentes.

La posición C, que implica la presencia del grupo guanidino (**Figura 3**), prácticamente se mantiene constante, ya que el reemplazo de alguno de los átomos de nitrógeno, ya sea por oxígeno, azufre o carbono disminuye la actividad, aunque no se sabe con claridad la razón de esto.

La posición D generalmente se mantiene también constante, ya que la inserción de un átomo de nitrógeno en el anillo bencénico da como resultado una pobre actividad antihelmíntica.

Por último, las posiciones E y F están implicadas en la selectividad contra helmintos intestinales y sistémicos, además de influir en el perfil farmacocinético de los compuestos bencimidazólicos. En la posición E, los grupos que favorecen más la actividad biológica son: O, S, SO, SO₂, OSO, CO, CONH, NHCO y CH₂. En la posición F se encuentran normalmente alquilos, cicloalquilos, alquenos, arilos y heteroarilos⁴⁸.

Al respecto, Lacey y Watson (1985) demostraron la influencia de diferentes sustituyentes en la posición 5 y/o 6 (E y/o F de la **figura 3**) del anillo bencimidazólico en una serie de 2-(carbamato de metil)-bencimidazoles sobre la polimerización de tubulina obtenida de cerebro de oveja²⁶. Los resultados obtenidos muestran que si el sustituyente es de naturaleza polar, la actividad de dichos compuestos disminuye (ej. grupos nitro, hidroxilo o amino).

Por otra parte, la presencia de un halógeno grande (Cl o Br) incrementan la capacidad para inhibir la polimerización de tubulina, mientras que el halógeno más pequeño (F) disminuye dicha actividad. El tamaño del sustituyente también tiene influencia sobre la actividad de estos compuestos, se analizaron 2 series de compuestos con una cadena de átomos de carbono con longitud variable. La primera fue del grupo metoxi (1 carbono) al octiloxi (8 carbonos), en esta serie se encontró que la actividad se incrementa conforme aumenta el tamaño de la cadena, aunque el cambio más notable se obtiene del metoxi al propoxi (3 carbonos), a partir de este grupo y hasta el octiloxi el incremento es mínimo. La segunda serie fue del grupo metil (1 carbono) al butil (4 carbonos), el comportamiento fue similar ya que la actividad se incrementa del grupo metil al propil (3 carbonos) mientras que con el grupo butil la actividad disminuyó. La explicación propuesta para este comportamiento se basa en la hidrofobicidad de estos compuestos, ya que existe una correlación de tipo no lineal sino parabólico entre este parámetro y la capacidad para inhibir la polimerización de tubulina, es decir que existe un valor limitante en el punto máximo de la parábola, por lo que al alejarse de este punto (en ambas direcciones) la actividad disminuye.

Además, las posiciones E y F están directamente relacionadas con el metabolismo de los compuestos bencimidazólicos.

En un estudio realizado por Hennessy (1991) con cuatro compuestos bencimidazólicos¹⁹ (albendazol, fenbendazol, triclabendazol y oxfendazol), se demostró que cuando en la posición F se encuentra una cadena alifática (como en el caso del albendazol), la posición E es susceptible de sufrir una pronta oxidación, con la formación de metabolitos más polares y por consecuencia más solubles, que son transportados con mayor facilidad en el plasma. De hecho ahora también se sabe que dichos metabolitos mantienen cierta actividad biológica, aunque dicha actividad es menor que la mostrada por el compuesto que inicialmente se administra^{31, 30}.

Por lo contrario, cuando en la posición F se encuentra un grupo aromático o voluminoso (como en el caso del fenbendazol y oxfendazol), la posición E esta más protegida y se ve disminuida su oxidación, lo cual trae como resultado una mayor vida media del fármaco pero un menor transporte en plasma y por lo tanto, menor actividad sistémica¹⁹.

Por otra parte, estos compuestos evaluados sufren un gran metabolismo de primer paso en el hígado, con la formación de metabolitos hidroxilados, más solubles que el compuesto original, las posiciones que sufren tal efecto son: la cadena alifática o aromática (posiciones E y F de la figura 3) y la posición 4 del anillo bencénico.

Posteriormente estos metabolitos hidroxilados sufren un metabolismo de segunda fase, vía conjugación con ácido glucurónico, sulfatos o glutatión, para ser eliminados posteriormente a través de la orina y la bilis¹⁹.

Este mecanismo permite una rápida detoxificación del organismo, lo que no permite alcanzar concentraciones plasmáticas adecuadas de dichos compuestos y por lo tanto su eficacia terapéutica a nivel sistémico es limitada, ya que se requieren altas dosis y tratamientos prolongados para sostener las concentraciones necesarias y así obtener resultados satisfactorios.

De manera interesante, Solana y cols. (2001) realizaron un estudio comparativo del metabolismo del albendazol por diferentes parásitos helmintos; *Fasciola hepática* (trematodo), *Moniezia expansa* (cestodo) y *Ascaris suum* (nematodo)⁵⁰. Los resultados obtenidos mostraron que la actividad sulfoxidativa de los parásitos a nivel hepático se divide en 2 vías: microsómica (vía citocromo P-450) y citosólica (vía sistema enzimático Flavin Mono-Oxigenasa). La mayor actividad se observó en la vía microsómica para los 3 parásitos, aunque con una diferencia significativamente mayor en el metabolismo del trematodo con respecto del cestodo y nematodo. Este comportamiento, explica la menor susceptibilidad de *F. hepática* con respecto a *M. expansa* y *A. suum* al tratamiento con albendazol ya que metaboliza más rápida e intensamente dicho compuesto a su metabolito sulfoxido, que es menos activo que el albendazol, razón por la cual son necesarias dosis elevadas por tiempos prolongados para erradicar a la duela hepática. Este trabajo reveló también, que este mecanismo sulfoxidativo no es enantio-selectivo, es decir que al metabolizarse el albendazol se obtiene una mezcla racémica constituida por aproximadamente 50% de (-)-sulfoxido de albendazol y 50% del (+)-sulfoxido de albendazol⁵⁰.

Otro estudio que contribuye a entender el modo de acción antihelmíntica de los derivados bencimidazólicos es el realizado por Alvarez y cols. (2001). Los autores realizaron un estudio comparativo de la difusión " ex vivo " del albendazol y su metabolito sulfóxido en dos diferentes parásitos: *Ascaris suum* y *Fasciola hepática*². Los resultados muestran que el albendazol tuvo una mayor difusión que su metabolito sulfóxido en ambos parásitos, sin embargo, el valor máximo de difusión para el trematodo fue un poco más del doble que el obtenido para el nematodo. Lo anterior puede deberse a la diferencia de lipofilicidad, ya que un fármaco como el albendazol puede tener una mayor captación a través de la superficie externa de los parásitos (llamada cutícula en nematodos y tegumento en trematodos y cestodos) que su metabolito sulfóxido que es más hidrofílico. Por otra parte, la complejidad de la estructura cuticular con respecto al tegumento puede explicar la menor difusión observada en *A. suum* con respecto a *F. hepática*. Las grandes regiones lipídicas de la cutícula representan una barrera determinante para la velocidad de transporte pasivo. Aunado a esto, la mayor superficie de contacto del trematodo con respecto al nematodo favorece el proceso de transporte pasivo, con lo cual se complementa la explicación de los resultados obtenidos².

McCraken y Lipkowitz (1990) realizaron una descripción química de cinco derivados bencimidazólicos; sulfóxido de albendazol, oxfendazol, oxibendazol, cambendazol y triclabendazol (**Tabla 3**). De los parámetros calculados, dos presentan una estrecha correlación con su actividad " in vivo " sobre el parásito *Hymenolepis diminuta*. Por principio de cuentas, un fármaco con un elevado porcentaje de superficie polar accesible a un disolvente, será más soluble en disolventes polares como el agua y será transportado más fácilmente al sitio donde ejerce su acción, de tal forma que la actividad de un fármaco se incrementa de manera no lineal con el incremento del porcentaje de superficie polar. La segunda relación es entre el momento dipolar y la actividad. Este parámetro probablemente afecta las propiedades de transporte del fármaco, especialmente a través de un medio hidrofóbico en el cual el fármaco no es muy soluble. De tal forma, moléculas con momento dipolar alto serán más solubles en disolventes polares, pero lo más importante es que se generarán interacciones dipolo-dipolo que favorecen el reconocimiento y la unión con su sitio activo³⁵.

Tabla 3. Descripción molecular de sulfóxido de ABZ, OXF, OBZ, CBZ y TBZ.

Molécula	Calor de formación (Kcal)	Momento dipolar (Debye)	Potencial de ionización (Kcal/mol)	HOMO (Kcal/mol)	LUMO (Kcal/mol)	Área polar (Å ²)
Sulfóxido ABZ	14.8	6.20	8.99	-8.99	-0.45	101.5
OXF	65.4	6.09	9.01	-9.01	-0.38	104.7
OBZ	-58.0	2.62	8.51	-8.51	-0.16	80.3
CBZ	31.4	1.67	8.45	-8.45	-0.81	77.0
TBZ	117.9	2.17	8.69	-8.69	-0.76	38.0

Tomada y modificada de McCracken y Lipkowitz (1990)³⁵

* ABZ, albendazol; OXF, oxfendazol; OBZ, oxiabendazol; CBZ, cambendazol; TBZ, triclabendazol.

Resultados similares fueron obtenidos por estos mismos investigadores al realizar un estudio comparativo " in vivo " entre sulfóxido de albendazol y oxiabendazol sobre el parásito *H. diminuta*. Aportaron la idea de que las energías tanto del Máximo Orbital Molecular Ocupado (HOMO) como del Mínimo Orbital Molecular Desocupado (LUMO) están implicadas en las reacciones redox que sufren los derivados bencimidazólicos y que indirectamente tienen implicaciones en su metabolismo. Una molécula que tenga una mayor energía HOMO será más fácilmente oxidada y su metabolismo se incrementará por la acción de complejos enzimáticos que implique intermediarios electrofílicos, mientras que la molécula que tenga una menor energía LUMO será más fácilmente reducida y en consecuencia será rápidamente metabolizada por reacciones enzimáticas que implique intermediarios nucleofílicos³⁵.

Es evidente que existen diferentes sustituyentes en el anillo bencimidazólico que afectan de manera directa la actividad antiparasitaria de los derivados bencimidazólicos, por lo que resulta de gran interés que en el diseño y síntesis de nuevos compuestos se consideren estos aspectos, además de realizar estudios de relación estructura-actividad.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

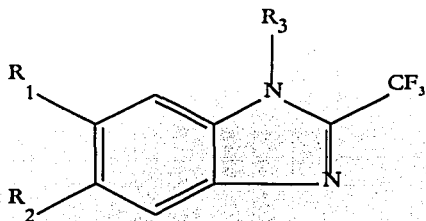
Los compuestos bencimidazólicos son la mejor opción para el tratamiento de infecciones por parásitos helmintos, entre ellas la triquinosis. El compuesto derivado del bencimidazol que presenta mayor actividad a nivel intestinal es el albendazol, pero a nivel sistémico ninguno de los compuestos antiparasitarios es realmente eficaz, puesto que para alcanzar niveles plasmáticos adecuados se necesitan tratamientos con dosis altas y muy prolongados, esto debido a la poca absorción intestinal que tienen los derivados bencimidazólicos.

Además, la aparición de parásitos resistentes a los tratamientos antihelmínticos de uso común es cada vez más frecuente y aunado a las pocas opciones de tratamiento eficaz existentes actualmente, cobra primordial importancia el estudio constante e intensivo de moléculas nuevas con actividad antihelmíntica de amplio espectro de acción y de síntesis menos costosa.

Es por esto que el grupo de investigación del Dr. Castillo del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM, ha sintetizado compuestos derivados de bencimidazol, con mejores características de solubilidad, cuya actividad antiparasitaria contra los protozoarios *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba histolytica* y contra el helminto *T. spiralis* ha sido evaluada en colaboración con la Dra. Lilián Yépez Mulia en el Laboratorio de Parasitología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP) del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional (CMN) Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Estos estudios han permitido realizar la correlación estructura química-actividad, y continuar con la síntesis de nuevos compuestos derivados del bencimidazol.

Entre estos nuevos compuestos, se encuentran los derivados bencimidazólicos con sustituyente trifluorometilo en posición 2, reportados por Navarrete y cols. en 2001 (**Figura 4**). La potencial actividad antiparasitaria "in vitro" contra los parásitos *G. lamblia*, *E. histolytica* y *T. spiralis* fue evaluada, así como la capacidad de estos compuestos para inhibir la polimerización de la tubulina de cerebro de rata⁴⁰.

Figura 4. 2-(Trifluorometil)-bencimidazoles sintetizados



Compuesto	R ¹	R ²	R ³
16	H	H	H
17	Cl	H	H
18	Cl	Cl	H
19	H	H	CH ₃
20	Cl	H	CH ₃
21	H	Cl	CH ₃
22	Cl	Cl	CH ₃

Tomado de Navarrete y cols. (2001)⁴⁰.

Los resultados obtenidos en este estudio, indicaron que los compuestos 16, 18, 19, 20, 21 y 22 fueron más activos *contra G. lamblia* que el metronidazol, fármaco de elección en el tratamiento de la giardiasis. Por otra parte, el compuesto 20 presenta una actividad similar a la del albendazol contra el mismo parásito. En relación a la eficacia contra *E. histolytica*, todos los compuestos fueron ampliamente superiores al metronidazol y albendazol. Con respecto al efecto sobre la larva muscular de *T. spiralis*, solo el compuesto 20 presentó una actividad similar al albendazol, los demás compuestos fueron menos activos⁴⁰.

La evaluación del efecto de estos compuestos sobre la polimerización de la tubulina, reveló que ninguno de estos compuestos inhibe este proceso. Los autores sugieren que para

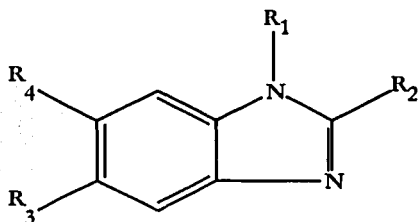
dicho proceso es indispensable la presencia de un grupo carbamato de metilo en posición 2 y un átomo de hidrógeno en posición 1, esto último es concordante con lo propuesto por Lacey (1990)²⁸.

Otros compuestos sintetizados por este grupo de investigación, incluyen 7 derivados del bencimidazol denominados RCB14-RCB16 y RCB19-RCB22 (**Figura 5**). La actividad biológica " in vitro " de estos compuestos a diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 0.5, 1.0 µg/mL) ha sido determinada en contra de la fase LM de *T. spiralis*, mediante el método enzimático-colorimétrico del MTT [Bromuro de (3,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]. Los resultados obtenidos mostraron que uno de los compuestos, el RCB20, a todas las concentraciones utilizadas tuvo, una eficacia similar a la del albendazol. El porcentaje máximo de reducción de la actividad metabólica con respecto al control fue de 56% y se obtuvo a la concentración de 1.0 µg/mL, comparada con un 48% del albendazol a la misma concentración.

En el primer paso de selección " in vitro " el compuesto RCB20 presentó buena actividad antihelmíntica sin embargo, este ensayo no proporciona información acerca de la capacidad del compuesto para atravesar la barrera intestinal y ser efectivo a nivel sistémico. A este respecto, el parásito nematodo *T. spiralis* tiene una fase de desarrollo intestinal representada por el organismo adulto y otra fase sistémica representada por la larva muscular, de tal forma que el compuesto RCB20 puede ser evaluado a ambos niveles.

Por otro lado, con la finalidad de tratar de establecer una relación estructura-actividad y considerando que el compuesto RCB16 tiene los mismos sustituyentes en posiciones 1, 5 y/o 6 (**Figura 5**) que el compuesto RCB20 pero difieren en el sustituyente en la posición del anillo bencimidazólico, trifluorometilo para RCB20 y metililo para RCB16, es de interés comparar " in vivo " la actividad de estos compuestos. Los resultados obtenidos permitirán determinar el efecto de esta modificación química sobre la eficacia de dichos compuestos.

Figura 5. Estructura química de los derivados bencimidazólicos RCB14-RCB16 y RCB19-RCB22.



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
14	H	SH	1-naftoxi/Cl	Cl/1-naftoxi
15	H	CF ₃	2,3-diclorofenoxi/Cl	Cl/2,3-diclorofenoxi
16	H	SCH ₃	1-naftoxi/Cl	Cl/1-naftoxi
19	CH ₃	SH	1-naftoxi	Cl
20	H	CF ₃	1-naftoxi/Cl	Cl/1-naftoxi
21	CH ₃	SCH ₃	1-naftoxi	Cl
22	CH ₃	SCH ₃	1-naftoxi	H

Los ensayos de actividad " in vitro " contra la fase muscular de *T. spiralis* sirvieron como primer método de selección de nuevos compuestos, sin embargo, es necesario realizar la evaluación de la actividad antihelmíntica " in vivo " del compuesto RCB20 ya que de esta forma se pueden valorar otras características fisicoquímicas del compuesto, como son su solubilidad y permeabilidad. Estos dos parámetros son importantes ya que de ellos depende en gran medida que el compuesto pueda atravesar la barrera intestinal y alcanzar concentraciones en plasma óptimas para tener actividad antiparasitaria a nivel sistémico.

Considerando lo anterior, en el presente trabajo de tesis se propuso la evaluación de la actividad biológica de los compuestos RCB16 y RCB20 " in vivo " contra las fases entérica (fase adulta) y sistémica (fase LM) de *T. spiralis*, incluyendo al albendazol como control positivo.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad biológica de dos nuevos derivados bencimidazólicos en contra de la fase enteral y sistémica de *T. spiralis* en ratones infectados con este parásito.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la actividad antihelmíntica " in vivo " de los compuestos RCB16 y RCB20 sobre la fase adulta (enteral) del nematodo *T. spiralis* comparándola con la del albendazol.
- Determinar la actividad antihelmíntica " in vivo " de los compuestos derivados del bencimidazol RCB16 y RCB20 sobre la fase larva muscular (sistémica) del parásito *T. spiralis* comparándola con la del albendazol.
- Establecer una relación estructura-actividad para los compuestos bencimidazólicos RCB16 y RCB20, en función a su eficacia sobre la fase enteral y sistémica de *T. spiralis*.

5. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Estudios realizados previamente han puesto de manifiesto que el sustituyente trifluorometilo en posición 2 del anillo bencimidazólico confiere una mayor capacidad desacopladora de la fosforilación oxidativa, por lo que el compuesto RCB20 tendrá una mayor actividad antihelmíntica que el albendazol y el compuesto RCB16 contra LM y adulto del nematodo *T. spiralis*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1.1 EQUIPO

- Agitador Gerhardt RO5 (Gerhardt. Bonn, Alemania)
- Agitador para tubos (Vortex Genie 2 Fisher)
- Aparato modificado de Bearman
- Centrífuga Clínica Sorvall RT 6000D (Ohio, USA)
- Centrífuga de tubos eppendorf (5415C, Brinkmann Instruments)
- Incubadora de CO₂ (Water/Jacketed, NU2500E. Nuair, Alemania)
- Microscopio óptico (Nikon 119)
- Picadora de carne Moulinex
- Ultraturrax type 18/10 S1 Ikawerk Janke and Kunkel

6.1.2 MATERIAL

- Cánulas de 1.7mm diámetro
- Equipo de disección
- Micropipetas (Gilson) de 20, 200, 1000 μ L
- Puntas plásticas de 200 y 1000 μ L (Biological)
- Tamiz metálico # 40
- Tubos eppendorf de 1.5 y 2.0 mL
- Tubos falcón de 15 mL (Costar)

6.1.3 REACTIVOS

- Ácido clorhídrico concentrado (Merck, México)
- Albendazol (Smithkline Beecham, México)
- Bacto agar (0140-01, Difco laboratories. Michigan, USA)
- Cloruro de sodio (Merck, México)
- Éter etílico (Sigma de México)
- Fosfato monobásico de potasio (Baker, México)
- Fosfato dibásico de sodio (Baker, México)
- Pepsina. 1:2500, 140U/mg; sólido 920 U/mg de proteína obtenida de mucosa estomacal porcina. Lote 45H0867 (Sigma Chemical C.O. St. Louis M.O, USA)

6.2 METODOLOGÍA

La síntesis de los derivados bencimidazólicos RCB16 y RCB20, se realizó por el grupo del Dr. Castillo del Departamento de Farmacia del anexo de la Facultad de Química, UNAM. Las pruebas de actividad biológica " in vivo " sobre la fase sistémica (larva muscular) y la fase enteral (adultos) de *T. spiralis* se llevaron a cabo en el laboratorio de Parasitología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, con la asesoría de la Dra. Lilián Yépez Mulia.

6.2.1 DESPARASITACIÓN DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

A ratones machos de la cepa BALB/c de entre 20-30g de peso, se les administraron 100 μ L de una mezcla (20mg-20mg/Kg de peso) de albendazol-nitazoxanida por vía oral, con la ayuda de una sonda gástrica.

La dosificación se distribuyó de la siguiente manera: durante los primeros 7 días consecutivos se administró la mezcla desparasitante, posteriormente se dejó un periodo de 7 días de reposo, al cabo de este tiempo se administró nuevamente la mezcla desparasitante durante el mismo tiempo que la primera dosis y se dejó transcurrir un nuevo período de 7 días de reposo.

Al término del último periodo de reposo, se recolectaron por grupo (10 ratones) muestras de heces, las cuales fueron analizadas en fresco. De no encontrarse parásitos, los animales podían ser infectados con larvas musculares de *T. spiralis*, para mantener el ciclo de vida del parásito o para evaluar la actividad de los compuestos. En caso contrario, se administraba nuevamente la mezcla desparasitante por 7 días consecutivos con sus respectivos 7 días de descanso, al cabo de este periodo, se recolectaban nuevamente muestras de heces para analizarse en fresco. Esta dinámica se siguió hasta que no se encontraron parásitos en el análisis de las heces.

6.2.2 PRESERVACIÓN DEL CICLO DE VIDA DEL PARASITO

Ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley o ratones machos de la cepa BALB/c fueron infectados con 5000 o 700 LM respectivamente, por vía oral con la ayuda de una sonda gástrica.

Los animales se mantuvieron bajo condiciones normales de alimentación en el bioterio durante un mínimo de 28 días, tiempo en el cual se completa el ciclo de vida del parásito.

6.2.3 OBTENCIÓN DE LARVAS MUSCULARES (LM) DE *T. spiralis*

LM de *T. spiralis* se obtuvieron siguiendo el procedimiento descrito por Martí y cols. (1987) con algunas modificaciones³².

Ratas de la cepa Sprague-Dawley o ratones de la cepa BALB/c infectados con *T. spiralis* fueron sacrificados y se les despojó de la piel, cabeza, cola, extremidades y vísceras, dejándose únicamente músculo esquelético, teniendo cuidado de no remover el diafragma. El músculo se cortó en pequeños trozos, se trituró en una picadora y se vertieron en una solución de pepsina al 1% (P/V) y HCl al 1% (V/V) en agua destilada, durante 3 h a 37°C.

Para la purificación de LM, se montó un aparato de Bearman modificado, que consistió en un embudo plástico con una manguera en el tallo que tenía adaptado un tubo Falcón de 15 mL; pasadas 3 h se pasó el digerido de músculo a través de un tamiz # 40 (para eliminar restos de músculo no digerido) que se colocó por encima del embudo, las LM se dejaron sedimentar durante 20 min.

LM sedimentadas en el tubo Falcón se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4 con antibióticos (200 U.I. de penicilina y 200 μ g de estreptomycin) tratando de retirar la mayor cantidad posible de desechos musculares. LM obtenidas se resuspendieron en aproximadamente 4-5 mL de PBS y posteriormente se contaron. Para este fin, se realizó una dilución 1:10 de la suspensión de parásitos (10 μ L de la suspensión de parásitos y 90 μ L de bacto agar al 0.2%). En un portaobjetos limpio y desengrasado, se colocaron de la dilución, 10 gotas de 5 μ L cada una. Se contaron los parásitos con el objetivo seco débil (10 x), se determinó el promedio de parásitos contabilizados por gota (5 μ L) y se calculó el número de parásitos totales en la muestra inicial (4-5 mL). Las larvas obtenidas fueron usadas para el ensayo " in vivo " de la evaluación de la actividad antiparasitaria de los compuestos o para mantener el ciclo de vida ratas o ratones.

6.2.4 OBTENCION DE ADULTOS DE *T. spiralis*

Los adultos del parásito se obtuvieron de acuerdo al procedimiento descrito por Dennis y cols (1970) con algunas modificaciones¹⁰.

Ratones infectados con *T. spiralis* fueron sacrificados al sexto día post-infección. La zona abdominal se limpió con alcohol y se realizó una incisión en esta región, se sacaron los intestinos tratando de no maltratarlos, se seleccionó el intestino delgado y se separó de todo el contenido de la región abdominal. El intestino se colocó en una caja petri con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (PBS), se abrió longitudinalmente y se cortó en pequeños pedazos de 3-4 cm de longitud, los cuales se colocaron en un aparato de Bearman modificado que contenía PBS en su interior. Los intestinos se incubaron durante 3 h a 37°C.

Los adultos sedimentados en el tubo Falcón se lavaron con PBS más antibióticos (igual que para LM) tratando de retirar la mayor cantidad posible de desechos.

6.2.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA " in vivo " DE LOS COMPUESTOS BENCIMIDAZÓLICOS RCB16 Y RCB20 CONTRA LA FASE ENTERAL (ADULTOS) DE *T. spiralis* .

Treinta y dos ratones de la cepa BALB/c de 20-30g de peso previamente desparasitados, se infectaron con 700 LM de *T. spiralis*, formándose grupos de ocho ratones cada uno. Al tercer día post-infección, al primer grupo (control negativo) se le administró el mismo volumen (100 μ L) de la formulación en la cual se suspendieron los compuestos a probar; al segundo y tercer grupos se les administraron los compuestos RCB16 y RCB20 a una dosis equivalente a 50 mg/Kg de peso de albendazol. El cuarto grupo se incluyó como control positivo y a los animales se les administraron 50 mg/Kg de peso de albendazol. Los compuestos se administraron por vía oral con la ayuda de una sonda gástrica.

A los seis días post-infección, los cuatro grupos de animales fueron sacrificados y se obtuvieron los parásitos adultos siguiendo la metodología descrita anteriormente. Los parásitos se contaron y se determinó el porcentaje de reducción de la carga parasitaria con respecto al control negativo. Se realizaron dos ensayos para cada dosis usada. De la misma forma se evaluó la dosis de 75 mg/Kg de peso.

6.2.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA " in vivo " DE LOS COMPUESTOS BENCIMIDAZÓLICOS RCB16 Y RCB20 CONTRA LA FASE SISTÉMICA (LARVA MUSCULAR) DE *T. spiralis* .

Cuarenta ratones de la cepa BALB/c de 20-30g de peso se infectaron con 700 LM de *T. spiralis*, formándose cuatro grupos de 10 ratones cada uno. A partir del día 28 post-infección, se les administró por vía oral con la ayuda de una sonda gástrica una dosis diaria por 7 días consecutivos de los compuestos a evaluar. Al primer grupo (control negativo) se le administró el mismo volumen (100 μ L), de la formulación en la cual se suspendieron los compuestos a evaluar; al segundo y tercer grupos se les administraron los compuestos RCB16 y RCB20 a una dosis equivalente a 75 mg/Kg de peso de albendazol.

Al cuarto grupo (control positivo) se le administraron 75 mg/Kg de peso de albendazol. Siete días después de la última dosis, los animales fueron sacrificados por grupo, las LM se obtuvieron como se indicó anteriormente y se procedió a contarlas. El porcentaje de reducción de la carga parasitaria se determinó con respecto al control negativo. Se realizaron dos ensayos para cada dosis utilizada. La dosis de 100 mg/Kg de peso se evaluó de la misma manera previamente descrita.

6.3 TIPO DE ESTUDIO

Retrospectivo, comparativo, transversal, experimental.

6.4 POBLACIÓN

- Ratones machos de la cepa BALB/c

6.5 CRITERIOS

6.5.1 Inclusión: Ratones macho de la cepa BALB/c de 8-10 semanas de nacidos, de 20-30g de peso, sanos y debidamente desparasitados.

6.5.2 Exclusión: Pérdidas de animales por muerte durante el estudio.

6.5.3 Eliminación: Ratones que presenten cualquier tipo de lesión o enfermedad antes y durante el estudio.

6.6 VARIABLES

6.6.1 INDEPENDIENTES:

- Especie de ratón: ratones de la cepa BALB/c.
- Peso del ratón: 20-30g.
- Dosis administrada de los compuestos a probar: 50 y 75 mg/Kg de peso para adultos, 75 y 100 mg/Kg de peso para larva muscular, equivalentes a 50, 75 y 100 mg/Kg de peso de albendazol.
- Régimen de dosificación: Para el estudio del efecto sobre la fase adulto, se aplica una dosis al tercer día post-infección. Para el estudio del efecto sobre la fase larva muscular, a partir del día 28 post-infección se aplica una dosis diaria durante 7 días.

6.6.2 DEPENDIENTES:

- Reducción de la carga parasitaria, de adultos o larvas musculares de *T. spiralis* en función del control negativo.

7. RESULTADOS

En el presente trabajo, se determinó la actividad biológica " in vivo " de los derivados bencimidazólicos RCB16 y RCB20, sobre las fases entérica (adulta) y sistémica (LM) de *T. spiralis*, incluyendo de manera comparativa al albendazol.

Con respecto a la actividad biológica del albendazol, RCB16 y RCB20 sobre la fase adulta de *T. spiralis* (**Tablas 4 y 5, Figura 6**), se encontró que la reducción de la carga parasitaria de estos compuestos a las dosis empleadas fue mayor con respecto al control negativo ($p < 0.05$).

A una dosis de 50 mg/Kg de peso, la eficacia de RCB20 fue similar a la mostrada por el albendazol (69% y 62% respectivamente) y ambas fueron significativamente superiores ($p < 0.05$) a la actividad mostrada por RCB16 cuyo porcentaje de reducción fue de 28%.

Con la finalidad de determinar si la actividad del compuesto RCB20 se incrementaba al aumentar la dosis, se procedió a evaluar la dosis de 75 mg/Kg de peso. A esta concentración se obtuvo una reducción de la carga parasitaria del 73%, en relación con 80% obtenido con el albendazol, siendo estadísticamente semejante ($p < 0.05$).

Tabla 4. Comparación de la eficacia " in vivo " del albendazol, compuesto RCB20 y compuesto RCB16 sobre la fase adulta de *T. spiralis* a una dosis equivalente a 50mg/Kg de peso de albendazol.

Compuesto	No. promedio de adultos/ratón (\pm D.S.)	% Reducción de carga parasitaria (\pm D. S.)
Control	110.5 (\pm 3.5)	-----
Albendazol	41.5 (\pm 3.5) ^{ab}	62 (\pm 2.0)
RCB20	35.0 (\pm 3.0) ^{abc}	69 (\pm 1.5)
RCB16	80.5 (\pm 5.5) ^a	28 (\pm 2.5)

- Ratones de la cepa BALB/c (8 por grupo) fueron infectados con 700 LM de *T. spiralis* por vía oral con la ayuda de una sonda gástrica. A los 3 días post-infección los compuestos RCB20 y RCB16 se administraron por vía oral a una dosis única equivalente a 50 mg/Kg peso de albendazol. Al grupo control sólo se le administró la suspensión en la cual se suspendieron los otros fármacos. Como control positivo se incluyó el albendazol a la misma dosis. A los 6 días post-infección se obtuvieron los parásitos adultos de *T. spiralis* como se indicó en la metodología. Los resultados obtenidos se reportan como el valor promedio de 2 experimentos \pm desviación estándar.

- a) Estadísticamente diferente con respecto al control ($p < 0.05$).
 b) Estadísticamente diferente con respecto a RCB16 ($p < 0.05$).
 c) Estadísticamente semejante con respecto al albendazol ($p < 0.05$).

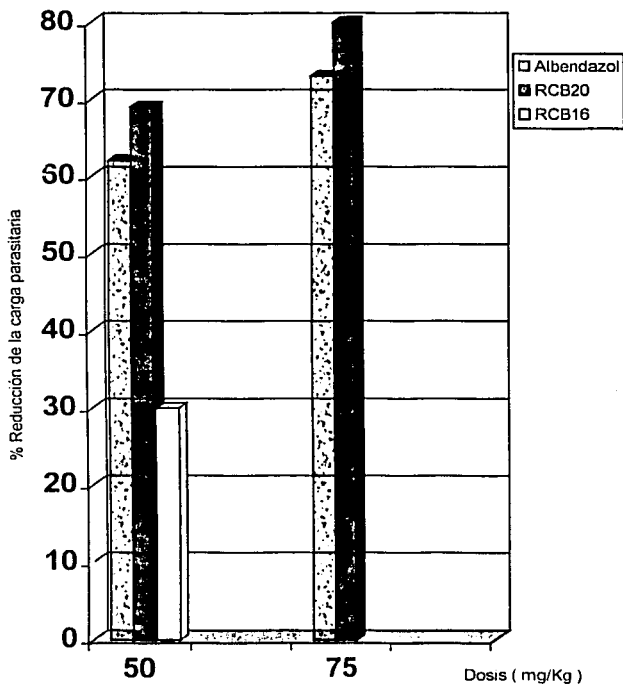
Tabla 5. Comparación de la eficacia " in vivo " del albendazol y compuesto RCB20 sobre la fase adulta de *T. spiralis* a una dosis equivalente a 75mg/Kg de peso de albendazol.

Compuesto	No. promedio de adultos/ratón (±D.S.)	% Reducción de carga parasitaria (±D. S.)
Control	116.5 (±3.5)	-----
Albendazol	32.0 (±5.0) ^a	73 (±3.5)
RCB20	23.5 (±3.5) ^{ab}	80 (±2.4)

- R ratones de la cepa BALB/c (8 por grupo) fueron infectados con 700 LM de *T. spiralis* por vía oral con la ayuda de una sonda gástrica. A los 3 días post-infección el compuesto RCB20 se administró por vía oral una dosis única equivalente a 75 mg/Kg peso de albendazol. El albendazol se incluyó a la misma dosis como control positivo. Al grupo control sólo se le administró la suspensión en la cual se suspendieron los otros fármacos. A los 6 días post-infección se obtuvieron los parásitos adultos de *T. spiralis* como se indicó en la metodología. Los resultados obtenidos se reportan como el promedio de los valores obtenidos de 2 experimentos ± desviación estándar.

- a) Estadísticamente diferente con respecto al control ($p < 0.05$)
 b) Estadísticamente semejante con respecto al albendazol ($p < 0.05$)

Figura 6. Comparación de la eficacia "in vivo" de los compuestos RCB20, RCB16 y albendazol sobre la fase adulta de *T. spiralis*



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En relación a la actividad antihelmíntica de los compuestos RCB16, RCB20 y albendazol sobre la fase LM de *T. spiralis* (Tablas 6 y figura 7), se observó que la disminución de la carga parasitaria a las dosis evaluadas fue mayor con respecto al control negativo ($p < 0.05$).

A una dosis de 75 mg/Kg de peso, la eficacia del albendazol fue de 70%, resultado significativamente mayor ($p < 0.05$) con respecto a la obtenida por RCB20 y RCB16 (41% y 24% respectivamente).

Al incrementar a 100 mg/Kg de peso la dosis del compuesto RCB20, también se incrementó su actividad contra la fase sistémica del parásito, consiguiendo una reducción del 56%, que fue significativamente menor ($p < 0.05$) a la obtenida con el albendazol (80%).

Tabla 6. Comparación de la eficacia " in vivo " del albendazol, compuesto RCB20 y compuesto RCB16 sobre la fase larva muscular de *T. spiralis* a una dosis equivalente a 75 mg/Kg de peso de albendazol

Compuesto	No. promedio de larvas musculares/ratón (±D.S.)	% Reducción de carga parasitaria (±D. S.)
Control	18,044.5 (±1844.5)	-----
Albendazol	5941 (±1034) ^{ab}	70 (±2.7)
RCB20	10775 (±1325) ^{ac}	40 (±1.7)
RCB16	13687 (±938) ^a	24 (±2.6)

- Ratones de la cepa BALB/c (10 por grupo) fueron infectados con 700 LM de *T. spiralis* por vía oral con la ayuda de una sonda gástrica. A los 28 días post-infección los compuestos RCB20 y RCB16 se administraron diariamente por vía oral durante 7 días una dosis equivalente a 75 mg/Kg peso de albendazol. Se incluyó el albendazol a la misma dosis como control positivo. Al grupo control sólo se le administró la suspensión en la cual se suspendieron los otros fármacos. Siete días después de que se administró la última dosis, se obtuvieron las LM como se indicó en la metodología. Los resultados obtenidos se reportan como el valor promedio de 2 experimentos ± desviación estándar.

- a) Estadísticamente diferente con respecto al control ($p < 0.05$).
 b) Estadísticamente diferente con respecto a RCB20 y RCB16 ($p < 0.05$).
 c) Estadísticamente diferente con respecto a RCB16 ($p < 0.05$).

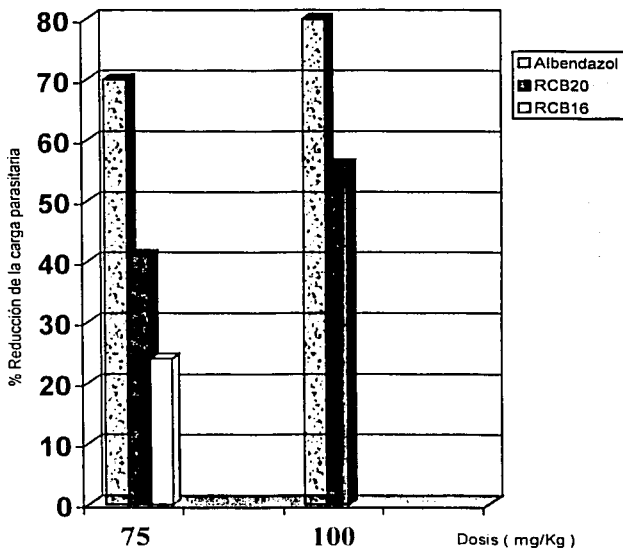
Tabla 7. Comparación de la eficacia " in vivo " del albendazol y compuesto RCB20 sobre la fase larva muscular de *T. spiralis* a una dosis equivalente a 100 mg/Kg de peso de albendazol.

Compuesto	No. promedio de larvas musculares/ratón (\pm D.S.)	% Reducción de carga parasitaria (\pm D.S.)
Control (-)	19,520 (\pm 2880)	-----
Albendazol	3,990 (\pm 870) ^{ab}	80 (\pm 1.5)
RCB20	8,490 (\pm 810) ^a	56 (\pm 2.3)

- Ratones de la cepa BALB/c (10 por grupo) fueron infectados con 700 LM de *T. spiralis* por vía oral con la ayuda de una sonda gástrica. A los 28 días post-infección el compuesto RCB20 se administró diariamente por vía oral durante 7 días una dosis equivalente a 100 mg/Kg peso de albendazol. Se incluyó al albendazol a la misma dosis como control positivo. Al grupo control sólo se le administró la suspensión en la cual se suspendieron los otros fármacos. Siete días después de que se administró la última dosis se obtuvieron las LM como se indicó en la metodología. Los resultados obtenidos se reportan como el valor promedio de 2 experimentos \pm desviación estándar.

- a) Estadísticamente diferente con respecto al control ($p < 0.05$).
 b) Estadísticamente diferente con respecto al compuesto RCB20 ($p < 0.05$).

Figura 7. Comparación de la eficacia "in vivo" de los compuestos RCB20, RCB16 y albendazol sobre la fase LM de *T. spiralis*



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio la actividad biológica " in vivo " de dos nuevos derivados bencimidazólicos fue evaluada en contra del adulto y LM del nematodo *T. spiralis*, incluyendo al albendazol como control positivo.

A nivel intestinal tanto el albendazol como el compuesto RCB20 redujeron de manera significativa con respecto al control la carga parasitaria en los animales infectados con el parásito, incrementándose la actividad de estos compuestos al incrementarse la dosis de ambos compuestos. Sin embargo, a nivel sistémico, el compuesto RCB20 no fue tan activo como el albendazol, aún al incrementarse la dosis. En cambio, el compuesto RCB16

Los compuestos RCB16 (el cual no tuvo actividad a nivel enteral ni sistémico, razón por la cual ya no se evaluó su actividad a otra dosis), y RCB20 difieren únicamente en el sustituyente en posición 2, siendo un trifluorometilo para el RCB20 y un metiltio para RCB16. Los resultados de la actividad " in vivo " de estos compuestos sugieren que la diferencia en su actividad reside en este sustituyente.

McCraken y Stillwell en 1991, demostraron la capacidad para desacoplar la fosforilación oxidativa³⁷ de compuestos bencimidazólicos trifluorometilados en posición 2. Lo anterior pudiera deberse a la gran electronegatividad del átomo de flúor, lo que favorece la disipación de cargas y a su vez de protones.

Durante la evaluación " in vitro " que previamente se había realizado del compuesto RCB20 contra LM de *T. spiralis* empleando el método del MTT^{8, 54, 55} se observó una reducción importante de la actividad metabólica del parásito (56% con respecto al control) reflejando una disminución de la actividad de las deshidrogenasas, lo cual pudo inducir una disminución importante en la síntesis de ATP. Estos resultados sugieren que la eficacia antihelmíntica " in vivo " del compuesto RCB20 pudiera deberse a una actividad desacopladora de la fosforilación oxidativa trayendo como resultado una disminución en la síntesis de ATP, privando a la célula de su principal fuente energética, provocando la muerte del parásito.

El grupo metililo presente en el compuesto RCB16 muestra una menor capacidad para disipar protones, influenciado por la menor electronegatividad y mayor tamaño atómico del átomo de azufre, lo cual probablemente trajo como consecuencia un decremento en la actividad biológica de dicho compuesto.

Por otra parte, se sabe que los derivados bencimidazólicos como el albendazol se unen a la tubulina del parásito, inhibiendo así su polimerización a microtúbulos, lo que desencadena una serie de eventos bioquímicos que traen como consecuencia la muerte del parásito. Lacey en 1988 demostró que es necesario que en la estructura química de los derivados bencimidazólicos este presente un átomo de hidrógeno en posición 1 del anillo bencimidazólico para que se favorezca la unión a la tubulina²⁸. Además, Navarrete y cols. en 2001 demostraron que también es necesaria la presencia de un grupo carbamato de metilo en posición 2 para favorecer la inhibición de la polimerización de la tubulina a microtúbulos⁴⁰.

Existen así mismo evidencias que indican que el átomo de cloro en posición 5 y/o 6 incrementa la unión de los compuestos bencimidazólicos a la tubulina²⁶. Si se analiza la estructura química del compuesto RCB20, es evidente que carece del grupo carbamato de metilo en posición 2, pero mantiene el hidrógeno en posición 1 y además tiene un halógeno como el cloro en posición 5 y/o 6, por lo que es posible que aún pueda presentar cierta unión a la tubulina, por lo que resulta de interés futuro determinar experimentalmente dicha actividad.

El hecho de que el compuesto RCB20 tuviera una actividad estadísticamente similar a la del albendazol contra la fase enteral del parásito, pero que su actividad disminuyera contra la fase sistémica de *T. spiralis*, sugiere la existencia de un problema de permeabilidad a nivel intestinal, lo cual trae como consecuencia que no se alcancen las concentraciones plasmáticas óptimas, con lo que su capacidad antihelmíntica se ve disminuida.

Una manera de caracterizar la permeabilidad del compuesto RCB20 es mediante el empleo de la línea celular Caco-2, la cual en cultivo presenta características de células del epitelio intestinal. Esta línea celular es actualmente empleada para determinar "in vitro" el coeficiente de permeabilidad de diversos compuestos^{4, 5, 20}, que se correlaciona con la absorción oral de estos compuestos en humanos.

De esta forma se determinaría si la permeabilidad del compuesto RCB20 fue la limitante para la actividad a nivel sistémico.

Aunado a esto, el estudio farmacocinético del compuesto RCB20 en modelos biológicos, facilitaría determinar su biodisponibilidad, ya que aparte de la permeabilidad del compuesto, existen otros aspectos como su unión a proteínas, metabolismo, entre otros que afectan la actividad antihelminítica de los compuestos.

Finalmente en cuanto a la relación estructura-actividad, se encontró que el grupo trifluorometilo en posición 2 del anillo bencimidazólico, un grupo 1-naftoxi en posición 5 o 6, un átomo de cloro en posición 5 o 6 y un átomo de hidrógeno en posición 1 confieren una buena actividad antihelminítica. Es importante resaltar, que si se compara la actividad " in vitro " contra LM de *T. spiralis* que mostró el compuesto 20 de Navarrete y cols. (**Figura 4**) que no contiene el grupo 1-naftoxi en posición 5 y/o 6 con la obtenida con el compuesto RCB20 que si lo presenta (32% contra 56% respectivamente a la máxima concentración evaluada). El sustituyente 1-naftoxi pudiera incrementar la actividad antihelminítica de los derivados bencimidazólicos, posiblemente al disminuir su metabolismo de primer paso con lo que su eliminación se retardaría y su actividad se vería favorecida.

9. CONCLUSIONES

- I. El compuesto RCB20 demostró " in vivo " tener una eficacia similar al albendazol contra la fase entérica de *T. spiralis*.
- II. Los compuestos RCB20 y RCB16 mostraron una actividad menor que el albendazol contra la fase LM del parásito.
- III. El grupo trifluorometilo en la posición 2 del anillo bencimidazólico confirió al compuesto RCB20 mayor actividad antihelmíntica que el sustituyente metiltilio al compuesto RCB16.
- IV. Los sustituyentes trifluorometilo en posición 2 y el 1-naftoxi/Cl en posición 5 y/o 6 confieren a la molécula del compuesto RCB20 una actividad antihelmíntica similar a la del albendazol a nivel intestinal, sin embargo, tienen una contribución negativa a nivel sistémico.
- V. La disminución de la actividad del compuesto RCB20 a nivel sistémico pudiera deberse a una baja permeabilidad del compuesto a nivel intestinal.

10. APORTACIONES Y SUGERENCIAS

- ❖ Estudios de permeabilidad " in vitro " del compuesto RCB20 empleando la línea celular Caco-2.
- ❖ Determinar los parámetros farmacocinéticos del compuesto RCB20 en modelos experimentales.
- ❖ Establecer el mecanismo de acción probable de este derivado bencimidazólico.
- ❖ Mejorar y optimizar las propiedades físicas del vehículo en el cual el compuesto se suspende, con el fin de aumentar su permeabilidad.

11. ANEXOS

11.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN REGULADORA DE FOSFATOS pH 7.4

Se disolvieron 1.38g de fosfato dibásico de sodio, 190mg de fosfato monobásico de potasio y 8.0g de cloruro de sodio en agua y se diluyó aproximadamente a 1L. Antes de completar el volumen se ajustó el pH a 7.4 con la ayuda de un potenciómetro.

11.2 PREPARACIÓN DE BACTO AGAR AL 0.2%

Se pesaron 200 mg de bacto agar y se suspendieron en 100mL de agua destilada. Se calienta hasta conseguir solubilizar por completo el polvo (cerca de ebullición) y se completa con agua destilada tibia a un volumen final de 100 mL.

11.3 FORMULACIÓN EN QUE SE SUSPENDIERON LOS COMPUESTOS EVALUADOS

- Pectina.....	1.5%
- Carboximetilcelulosa (CMC) de baja viscosidad.....	0.5%
- Carboximetilcelulosa (CMC) de media viscosidad.....	0.5%
- Sacarina sódica.....	0.2%
- Metilparabeno.....	0.5%
- Propilparabeno.....	0.3%
- Agua.....	c.b.p. 1000mL

11.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la actividad antihelmintica del albendazol y del compuesto RCB20 contra ambas fases de *T. spiralis* a las dosis empleadas, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de un factor completamente aleatorio, empleando como estadígrafo de contraste la distribución F de Fischer. La tabla de ANDEVA utilizada es la siguiente:

Tabla 8. Análisis de Varianza de 1 factor completamente aleatorio

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	f Calculada
Tratamiento (τ_i)	n-1	$\frac{\sum y^2 i.}{n} - \frac{y^2..}{N} = SCT$	$\frac{SCT}{n-1} = MCT$	$\frac{MCT}{MCE} = f \text{ calc.}$
Error experimental	N-n	$\sum \sum y^2 ij - \frac{\sum y^2 i.}{n} = SCE$	$\frac{SCE}{N-n} = MCE$	

SUPUESTOS

Ho 1 = La actividad antihelmíntica del albendazol sobre el organismo adulto de *T. spiralis* es semejante a 50 y 75 mg/Kg de peso.

Ha 1 = La actividad antihelmíntica del albendazol sobre el organismo adulto de *T. spiralis* es diferente a 50 y 75 mg/Kg de peso.

Ho 2 = La actividad antihelmíntica del compuesto RCB20 sobre el organismo adulto de *T. spiralis* es semejante a 50 y 75 mg/Kg de peso.

Ha 2 = La actividad antihelmíntica del compuesto RCB20 sobre el organismo adulto de *T. spiralis* es diferente a 50 y 75 mg/Kg de peso.

Ho 3 = La actividad antihelmíntica del albendazol sobre la fase LM de *T. spiralis* es semejante a 75 y 100 mg/Kg de peso.

Ha 3 = La actividad antihelmíntica del albendazol sobre la fase LM de *T. spiralis* es diferente a 75 y 100 mg/Kg de peso.

Ho 4 = La actividad antihelmíntica del compuesto RCB20 sobre la fase LM de *T. spiralis* es semejante a 75 y 100 mg/Kg de peso.

Ha 4 = La actividad antihelmíntica del compuesto RCB20 sobre la fase LM de *T. spiralis* es diferente a 75 y 100 mg/Kg de peso.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Alcántara P., De la Rosa J. y Correa B. (1992). Triquinelosis, una parasitosis fuera de serie. Publicación Técnica INDRE # 16; México, D.F. 1-10.
- 2) Alvarez L., Mottier M. and Sánchez S. (2001). Ex vivo diffusion of albendazole and its sulphoxide metabolite into *Ascaris suum* and *Fasciola hepatica*. Parasitology Research; 87:929-934.
- 3) Arriaga C., Yépez L. y Ortega G. (1996). Actualidades sobre triquinelosis equina. Revista Latinoamericana de Microbiología; 38:139-150.
- 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 Community; 175:880-885.
- 5) Audus K., Bartel R., Hidalgo I. and Borchardt R. (1990). The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolites studies. Pharmacology Research; 7:435-451.
- 6) Beaver P., Jung R. y Cupp E. (1986). Parasitología Clínica. 2ª edición. Salvat editores. Barcelona, España; 251-260.
- 7) Boczon K., Olbaw 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) Cedillo R., Ramírez A. and Muñoz O. (1992). A rapid colorimetric assay with tetrazolium salt MTT and Phenazine Methasulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. Archives of Medical Research; 23(2):59-61.
- 9) Cook G. (1990). Use of benzimidazole Chemoterapy in human helminthiases: indications and efficacy. Parasitology Today; 4(6): 853-864.

- 10) Dennis T., Despommier D. and Davis N. (1970). Infectivity of the newborn larva of *Trichinella spiralis* in the rat. The Journal of Parasitology; 6(5):929-932.
- 11) Despommier D. (1998). How does *Trichinella spiralis* make itself at home ?. Parasitology Today; 14(8):318-323.
- 12) De Silva N., Guyatt H. and Bundy D. (1997). Anthelmintics. A comparative reviews of their clinical pharmacology. Drugs; 53(5):769-788.
- 13) Dobson R., Lejambre L. and Gill J. (1996). Management of anthelmintic resistance and selection with persistent drugs. International Journal for Parasitology; 26(8-9):993-1000.
- 14) Dupouy J., Soule C., Guillou J., Rouer E., Lavareda S., Acelle T. and Denarous R. (1991). Detection of repetitive sequences of *Trichinella spiralis* by the polimerase chain reaction in experimentally infected mice. Parasitology Research; 77:180-182.
- 15) Elard L. and Humbert J. (1999). Importance of the mutation of aminoacid 200 of the isotype 1 beta-tubulin gene in the benzimidazole resistance of the small-ruminant *Teladorsgia circumcincta*. Parasitology Research; 85:452-456.
- 16) Enos A. and Coles G. (1990). Effect of benzimidazole drugs on tubulin in benzimidazole resistant and susceptible strains of *Caenorhabditis elegans*. International Journal for Parasitology; 20(2):161-167.
- 17) Geerts S., Coles G. and Gryseels B. (1997). Anthelmintic resistance in human helminths: learning from the problems with worm control in livestock. Parasitology Today; 13(4):149-151.
- 18) Grzywinsky L. and Karmanska K. (1993). Efficacy of luxabendazole against different stages of *Trichinella spiralis*. Eight International Conference of Trichinellosis. Ed. by Cambell W., Pozio E. and Bruschi F. 484-489.
- 19) Hennessy D. (1991). Manipulation of benzimidazole pharmacokinetics. International Journal for Parasitology; 21(5):493-495.

- 20) Hidalgo I., Raub T. and Borchardt R. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*; 96:736-749.
- 21) Horton R., Gottschall D., Lacey E., Townsed L. and Vanden Bosche H. (1990). Benzimidazole in a wormy world. *Parasitology Today*; 4(2):106-109.
- 22) Kim C., Cambell W. and Liebman M. (1993). Trial of ivermectin against the muscle phase of trichinellosis. Eight International Conference of Trichinellosis. Ed. by Cambell W., Pozio E. and Bruschi F. 478-483.
- 23) Kohler P. (2001). The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*; 31:336-345.
- 24) Kwa M., Kooyman F., Boerseman J. and Roos M. (1993). Effect of selection for benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* on β -tubulin isotype 1 an isotype 2 genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 191:413-419.
- 25) Kwa M., Veenstra J. and Roos M. (1994). Benzimidazole resistance in *Haemonchus controtus* is correlated with a conserved mutation at aminoacid 200 in β -tubulin isotype 1. *Molecular and Biochemical Parasitology*; 63:294-303.
- 26) Lacey E. and Watson T. (1985). Structure-activity relationships of benzimidazole carbamates as inhibitors of mammalian tubulin, in vitro. *Biochemical Pharmacology*; 34(7):1073-1077.
- 27) Lacey E. (1988). The role of cytoskeletal protein, tubulin in the mode of action an mechanism of drugs resistance to benzimidazole. *International Journal for Parasitology*; 18:908-915.
- 28) Lacey E. (1990). Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today*; 6(2): 112-115.

- 29) López-García L., Torrado S., Ripoll S., Bolas-Fernández F. and Martínez-Fernández R. (1993). *Trichinella spiralis* as a model for the evaluation of generic Benzimidazole-carbamates. Eight International Conference on Trichinellosis. Ed. by Cambell W., Pozio E. and Bruschi F. 417-419.
- 30) López-García M., Torrado S., Torrado J., Martínez R. and Bolas F. (1997). Albendazole versus ricobendazole (albendazol sulphoxide) against enteral an parenteral stages of *Trichinella spiralis* in mice. International Journal for Parasitology; 28:191.
- 31) Mariner S. and Bogan J. (1980). Pharmacokinetics of albendazol in sheep. American Journal of Veterinary Research; 4:1126.
- 32) Martí P., Murrell K. and Gamble R. (1987). *Trichinella spiralis*: immunization of pigs with newborn larva antigens. Experimental Parasitology; 63:68-73.
- 33) McCracken R. (1978). Efficacy of mebendazole and albendazole against *Trichinella spiralis* in mice. Journal of Parasitology; 64(29):214-219.
- 34) McCracken R., García A., and Robins H. (1982). Mebendazole therapy of enteral trichinellosis. Journal of Parasitology; 68(2):259-262.
- 35) McCracken R. and Lipkowitz K. (1990). Experimental and theoretical studies of albendazole, oxibendazole and tioxibendazole. Journal of Parasitology; 76(2):180-185.
- 36) McCracken R. and Lipkowitz K. (1990). Structure-activity relationships of benzothiazole and benzimidazole anthelmintics: a molecular modeling approach to in vivo drug efficacy. Journal of Parasitology; 76(6):853-964.
- 37) McCracken R. and Stillwell H. (1991). A possible biochemical mode of action for Benzimidazole anthelmintics. International Journal for Parasitology; 21(1):99-104.

- 38) Murrell K., Stringfellow F., Dame J., Leiby D., Duffy C. and Schad G. (1987). *Trichinella spiralis* in an agricultural ecosystem. II. Evidence for natural transmisión of *Trichinella spiralis* from domestic swine to wildlife. *Journal of Parasitology*; 73(1):103-109.
- 39) Murrell K. and Pozio E. (2000). Trichinellosis: of zoonosis that won't go quietly. *International Journal for Parasitology*; 30(3):1339-1349.
- 40) Navarrete G., Cedillo R., Hernández A., Yépez L., Hernández F., Valdez J., Morales R., Cortés R., Hernández M. and Castillo R. (2001). Synthesis and antiparasitic activity of 2-(Trifluoromethyl)-benzimidazole derivatires. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*; 11:187-190.
- 41) Ortega G., Arriaga. and Yépez L. (2000). Epidemiology of trichinellosis in México, Central and South America. *Veterinary Parasitology*; 93:201-225.
- 42) Oxberry M., Geary T. and Prichard R. (2001). Assessment of benzimidazole binding to individual recombinant isotypes from *Haemonchus contortus*. *Parasitology*; 122:683-687.
- 43) Penicaut B., Randolph W., Di Cuollo C., Beck C., Parish R. y Rosignol J. (1981). Albendazol: perfil farmacocinético. *Compendium de Investigaciones Clínicas Latinoamericanas*; 1(1):61-65.
- 44) Pozio E., La Rosa G., Rossi P and Murrell D. (1992). Biological Characterization of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. *Journal of Parasitology*; 78(4):647-653.
- 45) Sangster N. and Gill J. (1999). Pharmacology of anthelmintic resistance. *Parasitology Today*; 15(4):141-145.
- 46) Sharma S. and Abuzar S. (1983). The benzimidazole anthelmintics-chemistry and biological activity. *Progress in Drug Research*; 27:85-161.
- 47) Sharma S. (1994). Design of new drugs for helminth diseases. Lead optimization in benzimidazole. *Advances of Drug Research*; 25:154-156.

- 48) Sharma S. and Anand N. (1997). Approaches to design and synthesis of antiparasitic drugs. Elsevier Science. Amsterdam, Netherlands:195-238.
- 49) Silvestre A., Cabaret J. and Humbert J. (2001). Effect of benzimidazole under-dosing on the resistant allele frequency in *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda). Parasitology; 123:103-111.
- 50) Solana H., Rodríguez J. And Lanusse C. (2001). Comparative metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by diferente helminth parasites. Parasitology Research; 87:275-280.
- 51) Stewart G., Kramar G., Reddington J. and Hamilton A. (1980). Studies on in vitro larvavosition by adult *Trichinella spiralis*. Journal of Parasitology; 66(1):94-99.
- 52) Sukhdeo M. (1991). The relationship between intestinal location and fecundity in adult *Trichinella spiralis*. International Journal for Parasitology; 21(7):855-858.
- 53) Terrill T., Kaplan R., Larsen M., Samples O., Miller J. and Gelayes S. (2001). Anthelmintic resistance en goat farms in Georgia: efficacy of anthelmintics against gastroenteral nematodes in two selected goat herds. Veterinary Parasitology; 97:261-268.
- 54) Taylor H. and Morris L. (1988). In vitro culture of *Echinococcus multilocularis*: protoscolicidad action of praziquantel and albendazole sulphoxide. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene; 82:265-267.
- 55) Towson S. and Shay S. (1989). *Onchocerca gutturosa* and *O. volvulus*: studies on the viability and drugs responses of cryopreserved adults worms in vitro. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene; 83:664-669.
- 56) Yépez L. y Ortega G. (1994). Aspectos actuales sobre el diagnóstico de la triquinelosis. Revista Latinoamericana de Microbiología; 36:127-138.