



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL
ANTIHELMÍNTICO DE DERIVADOS DEL BENCIMIDAZOL
EN CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps* CEPA ORF

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

DAVID GARCÍA VILCHIS

DIRECTOR DE TESIS: Dr. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2007



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.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández

Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez

Dra. Irene Patricia del Arenal Mena

La presente tesis fue realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, U.N.A.M siendo parte del programa de estudios de Posgrado en Ciencias Biológicas.

APOYOS ECONÓMICOS RECIBIDOS

Beca CONACYT con el número de registro de becario: 200720.

PAEP convocatoria 2007.

CLAVE DE PROYECTOS QUE FINANCIARON LA TESIS

PAPIIT-UNAM [IN201003, IN216107]

CONACYT [V43629-M]

No quiero ser chispa que incendie ó fuego que arda,
quiero ser calor de cerca y luz a la distancia.

AGRADECIMIENTOS

A la B. Olivia Reynoso Ducoing por el apoyo durante la realización de esta tesis, la corrección de estilo, el aliento y enseñarme como debe manejarse un laboratorio de investigación científica.

A mis compañeros en el laboratorio: Mario, Cristina, Mónica, Laura, Liliana, América, Xochitl, Yamile y Carlos, por la amistad y hacer del laboratorio un lugar agradable.

Al Dr. Rafael Castillo, Dra. Alicia Hernández, Dr. Francisco Hernández y la Dra. Lilian Yopez por proporcionar los derivados del bencimidazol empleados y la atención prestada al proyecto de investigación

Al Dr. Sergio Rodríguez Morales por la ayuda prestada al realizar el análisis conformacional de las estructuras químicas de los bencimidazoles y sus comentarios.

Al Dr. Juan Molina Guarneros por permitirme realizar gran parte de la investigación en sus instalaciones y a la Q.F.B Maribel Soto Núñez por todo el apoyo técnico que me brindo durante la misma.

Al Dr. Marco Tulio González Martínez y al M.C Victor Manuel Torres Flores por prestarme el espectrofluorometro en el que se realizaron las determinaciones, por todo el apoyo técnico y sus comentarios.

A la B. Nallely Cabrera González y al Dr. Ruy Pérez Monfort por facilitarme la ultracentrifuga y la ayuda técnica.

A la Dra. Limei Shang Hi por facilitarme el microscopio estereoscópico acoplado a epifluorescencia en el que hice las observaciones de los cisticercos.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a la persona que ha sido para mí un ejemplo de fortaleza, de cómo se puede vivir una vida con entereza y pasión. De como ser y estar. A mi madre.

A mi hermano: por la comprensión, el apoyo incondicional que siempre me dio, la grata compañía y por hacer de mi vida una vida feliz.

A mis amigos: Jesús, Luís, Cesar, Roberto, Rocío y Alejandra, por estar junto a mí en los momentos malos y hacer de los buenos excepcionales.

ÍNDICE GENERAL

Tema	Página
Resumen	v
Introducción	vii
I. Antecedentes	1
1.1 Modelo experimental murino de cisticercosis por <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF	1
1.2 Química Medicinal.....	3
1.3 Análisis Conformacional	4
1.4 Biotransformación del CMFDA	4
1.5 Bencimidazoles	5
1.6 Albendazol	6
1.7 Desarrollo de fármacos antihelmínticos.....	7
II. Hipótesis y Objetivos	9
III. Material y Métodos	10
3.1 Diseño experimental.....	10
3.2 Obtención de cisticercos	11
3.3 Preparación del medio de cultivo.....	11
3.4 Preparación de soluciones de los derivados del bencimidazol	11
3.5 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de los derivados del bencimidazol en cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	12
3.6 Marcaje de los cisticercos con CMFDA	12
3.7 Obtención de imágenes de los cisticercos.....	12
3.8 Cuantificación de fluorescencia en los cisticercos.....	12
3.9 Análisis estadístico de los resultados de cuantificación de fluorescencia	13
3.10 Análisis conformacional de los derivados del bencimidazol.....	13

IV. Resultados	14
4.1 Adaptación, registro y evaluación de la marca fluorescente.....	14
4.2 Evaluación cualitativa del marcador fluorescente en cisticercos tratados con compuestos derivados del bencimidazol	15
4.3 Evaluación cuantitativa de la fluorescencia emitida por el CMFDA en cisticercos tratados con ABZ y SOABZ	15
4.4 Evaluación de la interacción del CMFDA con los compuestos bencimidazólicos	19
4.5 Estimación de la CE_{50} del SOABZ en cisticercos marcados fluorescentemente con CMFDA	21
4.6 Evaluación del efecto de los derivados del BZM en cisticercos de <i>T. crassiceps</i>	22
4.7 Análisis conformacional de las estructuras químicas de algunos compuestos bencimidazólicos	23
V. Discusión de resultados	26
Conclusiones y Perspectivas	ix
Bibliografía	x

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURA 1. Ciclo de vida natural de <i>Taenia crassiceps</i>	2
FIGURA 2. Estructura del anillo del bencimidazol.....	5
FIGURA 3. Albendazol.....	6
FIGURA 4. Principales metabolitos del albendazol.....	7
FIGURA 5. Cisticercos marcados fluorescentemente con 2 μ M de CMFDA.....	14
FIGURA 6. Cisticercos marcados fluorescentemente con 8 μ M de CMFDA.....	14
FIGURA 7. Cisticercos mantenidos en cultivo en ausencia y presencia de SOABZ.....	15
FIGURA 8. Cisticercos cultivados en presencia de ABZ y SOABZ, marcados fluorescentemente.....	16
FIGURA 9. Determinación de la fluorescencia emitida por el CMFDA de cisticercos tratados con ABZ y SOABZ.....	17
FIGURA 10. Comparación de fluorescencia emitida por fluido vesicular y SSAF a diferentes longitudes de onda de excitación.....	18
FIGURA 11. Determinación cuantitativa de la fluorescencia emitida por el CMFDA en tejido y fluido vesicular de cisticercos tratados con ABZ y SOABZ.....	19
FIGURA 12. Evaluación de la interacción de los derivados del BZM con el CMFDA durante su difusión.....	20
FIGURA 13. Evaluación de la interacción de los derivados del BZM con el CMFDA.....	20
FIGURA 14. CE_{50} del SOABZ determinada con fluorescencia.....	21
FIGURA 15. Comparación del efecto de diferentes derivados del BZM en la capacidad de biotransformación del CMFDA de los cisticercos.....	22
FIGURA 16. Cisticercos cultivados en ausencia o presencia de SOABZ y RCB15.....	23
FIGURA 17. Análisis conformacional de las estructuras químicas del SOABZ y RCB15.....	24
FIGURA 18. Comparación del potencial electrostático de derivados del BZM.....	25
TABLA I. Derivados del bencimidazol.....	8

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ABZ- Albendazol

BZM- Bencimidazoles

CE₅₀- Concentración efectiva 50

Cmax- Concentración máxima

CMFDA- 5-clorometilfluoresceina diacetato

CMF- 5-clorometilfluoresceina (marcador activado)

CMF-GSH- complejo formado por la unión de 5-clorometilfluoresceina y glutatión

DMSO- Dimetil sulfóxido

FV- Fluido vesicular

GSH- Glutatión

OMS- Organización Mundial de la Salud

SOABZ- Sulfóxido de albendazol

SSAF- Solución salina a nivel fisiológico

T- Tejido

T_{1/2}- Tiempo de vida media

UAF- Unidades arbitrarias de fluorescencia

RESUMEN

En la presente tesis se describe un método de evaluación del potencial antihelmíntico de derivados del bencimidazol, se tomo como modelo experimental cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF y como fármaco de referencia sulfóxido de albendazol (SOABZ). El método se basa en la utilización del marcador fluorescente 5-clorometilfluoresceína diacetato (CMFDA), mediante el cual se mide la capacidad que tienen los cisticercos de transformar al CMFDA en un compuesto fluorescente.

En el presente estudio se demuestra que la variación en la fluorescencia emitida por cisticercos tratados con los derivados del bencimidazol y marcados con CMFDA, es un parámetro con el cual puede evaluarse la actividad antihelmíntica de estos compuestos.

La evaluación macroscópica del efecto del SOABZ y la valoración cualitativa de los cambios en la intensidad de fluorescencia, realizada mediante microscopia confocal y un microscopio estereoscópico acoplado a epifluorescencia, muestra que altera la morfología de los cisticercos y disminuye la intensidad de fluorescencia emitida por el marcador con respecto al grupo sin tratamiento.

La evaluación cuantitativa de las variaciones en la intensidad de fluorescencia emitida por los cisticercos tratados con SOABZ y marcados con CMFDA, se realizó en un espectrofluorómetro y se determino una CE_{50} para el SOABZ de 0.070 $\mu\text{g/ml}$, el cual es un valor similar al reportado en la literatura.

Una vez estandarizado el método de evaluación, se evaluó a los derivados del bencimidazol propuestos. Con base a estas mediciones, se encontró que de los seis derivados del bencimidazol a evaluar, el compuesto RSD16 mostró una disminución en dicha actividad semejante al SOABZ. Que los compuestos GNV14, RSD7, RSD8 no mostraron actividad cestocida significativa en este modelo experimental. Dos de los compuestos: el RCB15 y el RCB20 no pudieron ser evaluados por este método, debido a que a los tres días de exposición los cisticercos presentaron perdida total del fluido vesicular, por lo que estos compuestos mostraron ser los mas efectivos para dañar a los parásitos.

Por último, el análisis conformacional del SOABZ y del compuesto RCB15, mostró diferencias como el tamaño de la molécula, los grupos cloro y trifloruro, así como variaciones en el potencial electrostático de la molécula. Estas diferencias moleculares probablemente son la causa de que la proteína blanco de los derivados RCB15 y RCB20, no haya sido la β -tubulina, sino otra proteína o molécula afin a estos compuestos y ello podría ser una de las razones del por qué fueron más activos que el SOABZ y el resto de los compuestos.

ABSTRACT

Chemotherapy is the best way for immediately controlling parasitic diseases, however the majority of drugs are old and they were produced without any rational drug design. Because of this, it is important to consider developing of new antiparasitic drugs that include knowledge in medicinal chemistry, proteomics, cell biology, etc. In addition, the use of parasitic experimental models could offer a new opportunity to test the designed compounds in order to establish if they are potential antiparasitic drugs. The purpose of the present thesis is to explore a new strategy by using a vital fluorescent marker as a tool for evaluation potential cestocide drugs in *in vitro* maintained cysticerci of *T. crassiceps* ORF strain. For this, some benzimidazolic derivatives were tested and their effects compared with SOABZ as positive control. After the parasites were treated, they were cultivated in presence of the fluorescent marker CMFDA (5-clorometilfluoresceina diacetato) in order to measure, by fluorescence quantitative analysis, if they had the capability to transform the non-fluorescent compound to a fluorescent marker. Results indicate that variation of the emitted fluorescence was induced because of the bencimidazol treatments and depending of the derivative was the low emission of fluorescence. In addition, macroscopic and microscopic observations were performed in order to have qualitative parameters that can be contrasted with those obtained in absent of any treatment. Quantitative fluorescence evaluation produced similar pharmacological CE₅₀ value as those obtained using non-fluorescence strategy. Two of the six evaluated derivatives were not evaluated because they produced more rapid and intense reactions against parasites. Molecule modelation of one of the most potent derivative, RCB-15, compared against SOABZ, present a different spatial conformation that could be related to its higher activity against *T. crassiceps* cysticerci. Because of that, in comparison with the SOABZ molecule, RCB-15 could have a protein target that apparently is not tubulin.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias ocupan un sitio importante como parte de los problemas de salud producidas por enfermedades infecciosas que afectan al mundo, principalmente en países en vías de desarrollo como el nuestro (Flisser, 2006).

Dentro de estas enfermedades, una de las de mayor importancia en la salud pública de México es la causada por el céstodo *Taenia solium*. De las dos parasitosis que produce, la taeniosis, se presenta cuando el adulto se encuentra en el intestino del ser humano y le produce una enfermedad asintomática; mientras que, cuando el ser humano se infecta con la forma larvaria, desarrolla la cisticercosis o bien produce la neurocisticercosis cuando el metacéstodo se aloja en el Sistema Nervioso Central (Flisser, 2006). Esta última es la enfermedad que más daño causa en la salud humana porque afecta principalmente a individuos económicamente activos y les produce una enfermedad incapacitante que requiere un tratamiento prolongado y una atención médica costosa. Cuando ambas enfermedades tienen que ser tratadas clínicamente, el tratamiento farmacológico ha estado basado en el empleo de fármacos antiparasitarios y cestocidas de amplio espectro tal como el albendazol (ABZ), un derivado de los bencimidazoles (BZM) (Hotez y col. 2006; Cook, 1998). Este fármaco antihelmíntico ha sido muy utilizado ya que es barato y efectivo; sin embargo, tiene algunas limitantes, como son: una baja biodisponibilidad debido a que es insoluble en agua (Dayan, 2003), se han reportado casos de resistencia debido al empleo masivo de fármacos antihelmínticos (Lacey, 1988, Wolstenholme y col. 2003), además, existen reportes de ineficacia del tratamiento en otros parásitos (Ingold y col. 1999).

El uso de quimioterapia para el tratamiento de afecciones parasitarias es una medida apoyada y recomendada por la OMS debido a que en la actualidad no existen métodos preventivos que ayuden a controlar efectivamente las enfermedades producidas por parásitos. Aún cuando en algunos tipos de enfermedades parasitarias, como el caso de la cisticercosis, ya existen prospectos de vacunas (Flisser y col. 2004), falta todavía mucho tiempo para que sean producidas a gran escala y se valore qué tan efectivas resultan para ser aplicadas a la población que lo requiera. Debido a que la quimioterapia sigue siendo la mejor opción al tratamiento de las enfermedades parasitarias y a que es necesario eliminar las limitantes que presentan estos compuestos, el reto es encontrar un fármaco que sea realmente efectivo.

Los fármacos derivados de los BZM han sido de los más antiguamente empleados para el tratamiento de enfermedades parasitarias, desde hace 40 años se introdujo el tiabendazol como un fármaco de amplio espectro y su empleo permitió establecer los criterios toxicológicos y de eficacia de la terapia antiparasitaria para todos los derivados del BZM. Por tales causas, desde ese entonces se enfocó la atención en el desarrollo de nuevos fármacos utilizando al anillo bencimidazólico, la molécula base del tiabendazol. Como resultado se desarrollaron nuevos fármacos con diversa actividad antiparasitaria como el febendazol, el mebendazol y el ABZ. Con esto se demostró que era posible efectuar cambios en la actividad y el espectro antiparasitario de compuestos derivados del BZM mediante cambios en su estructura y se consideró que esta molécula podría ser la base para el desarrollo de nuevos antihelmínticos (Lacey, 1988; 1994). Un ejemplo de ello es el

denominado compuesto “alfa” que es resultado de realizar modificaciones al anillo del bencimidazol; se ha demostrado que este compuesto tiene acción *in vitro* contra *Fasciola* (Vera-Montenegro, 2004) he incluso en formas resistentes al tratamiento con derivados del BZM (McConville y col. 2007).

Por lo anteriormente mencionado y con base a lo descrito para el diseño racional de fármacos, el grupo enfocado hacia la Química Medicinal del Dr. Rafael Castillo de la Facultad de Química de la UNAM, ha sintetizado nuevos derivados del BZM buscando mejorar sus propiedades como: actividad antihelmíntica, solubilidad, biodisponibilidad y estabilidad. Con el presente proyecto se inicia la evaluación biológica de varios de los derivados de los BZM diseñados y sintetizados por el grupo mencionado, para determinar si algunos de ellos presentan actividad cestocida. En la presente tesis se valoro el efecto de los derivados en un modelo experimental de cisticercosis murina con cisticercos de *Taenia crassiceps* de la cepa ORF y se selecciono al SOABZ, el metabolito activo del ABZ en el cual radican las cualidades de fármaco antiparasitario (Dayan, 2003), como el cestocida de referencia, ya que el efecto que tiene en los parásitos ha sido bien caracterizado (Palomares y col. 2004; 2006; 2007). Para la evaluación del efecto de los compuestos en los cisticercos de *T. crassiceps* se presenta la estandarización de una estrategia experimental que consiste en la medición de un marcador fluorescente, el CMFDA. Este compuesto se transforma de un agente de libre difusión a través de membranas plasmáticas y no fluorescente, a otro impermeable y fluorescente (Haugland, 2005). Estas propiedades sirvieron para evaluar el efecto de los derivados del BZM sobre la capacidad de los parásitos de transformar el CMFDA en un compuesto fluorescente y con esto determinar su efectividad sobre los cisticercos.

ANTECEDENTES

1.1. Modelo experimental murino de cisticercosis por *Taenia crassiceps* cepa ORF

T. crassiceps es un céstodo perteneciente al *Phylum Platyhelmintha*, Familia *Taeniidae*, grupo en el que se encuentran organismos de gran importancia médica en países en desarrollo, como *Echinococcus granulosus* y *Taenia solium*. En forma general se incluyen a estos organismos dentro del término helminto, que significa gusano parásito. *T. crassiceps* presenta diferentes estadios de desarrollo como todos los ténidos: una fase larvaria o metacéstodo conocida como cisticerco y una adulta, conocida también como tenia o parásito adulto. Es un parásito común del zorro rojo (*Vulpes vulpes L.*) y su metacéstodo *Cysticercus longicollis* se encuentra en pequeños roedores y en topos. En el ciclo de vida, el zorro es el huésped definitivo de la *Taenia* y pequeños roedores son los hospederos intermediarios que alojan a los cisticercos. El ciclo inicia cuando un roedor ingiere alimento o agua contaminada con heces fecales que contienen huevos o proglótidos grávidos de tenias, estos huevos, al llegar al intestino, se transforman en oncósferas, las cuales son transportadas por vía sanguínea a varios tejidos subcutáneos y a la cavidad abdominal. Una vez implantadas, se desarrollan hasta metacéstodos y desarrollan una espesa estructura en el interior del cisticerco, la cual constituirá el futuro escólex (Freeman, 1962). El ciclo continúa cuando el zorro ingiere accidentalmente a los metacéstodos contenidos en los tejidos de los roedores infectados; en el tracto gastrointestinal, los cisticercos evaginan y liberan el escólex. Esta región de las tenias se fija inmediatamente al intestino del zorro mediante la corona de ganchos y las ventosas que lo constituyen. Transcurridos entre 40 y 50 días de la infección, las tenias se encuentran bien desarrolladas y en la parte final de su cadena estrobilar se encuentran proglótidos grávidos que contienen huevos fértiles. A los dos meses de infección, los proglótidos grávidos, son desechados junto con las heces al medio ambiente (Freeman, 1962). El zorro además de ser el huésped definitivo puede ingerir heces contaminadas con huevos, se liberan las oncosferas en el tracto gastrointestinal y son transportadas por vía sanguínea a tejidos y músculos en donde se desarrollan los cisticercos. La figura 1 muestra, de manera esquemática, como se da el ciclo de vida de *T. crassiceps*.

A diferencia de los cisticercos de otros ténidos, los cisticercos de *T. crassiceps* se pueden reproducir asexualmente por gemación cuando se encuentran en la cavidad peritoneal de diferentes especies de roedores; un cisticerco mide de 3-5 mm y después de ser inoculado en la cavidad peritoneal de un roedor se generan pequeños brotes exógenos o gemas, las cuales se despegan del cisticerco inicial y forman nuevos cisticercos (Freeman, 1962).

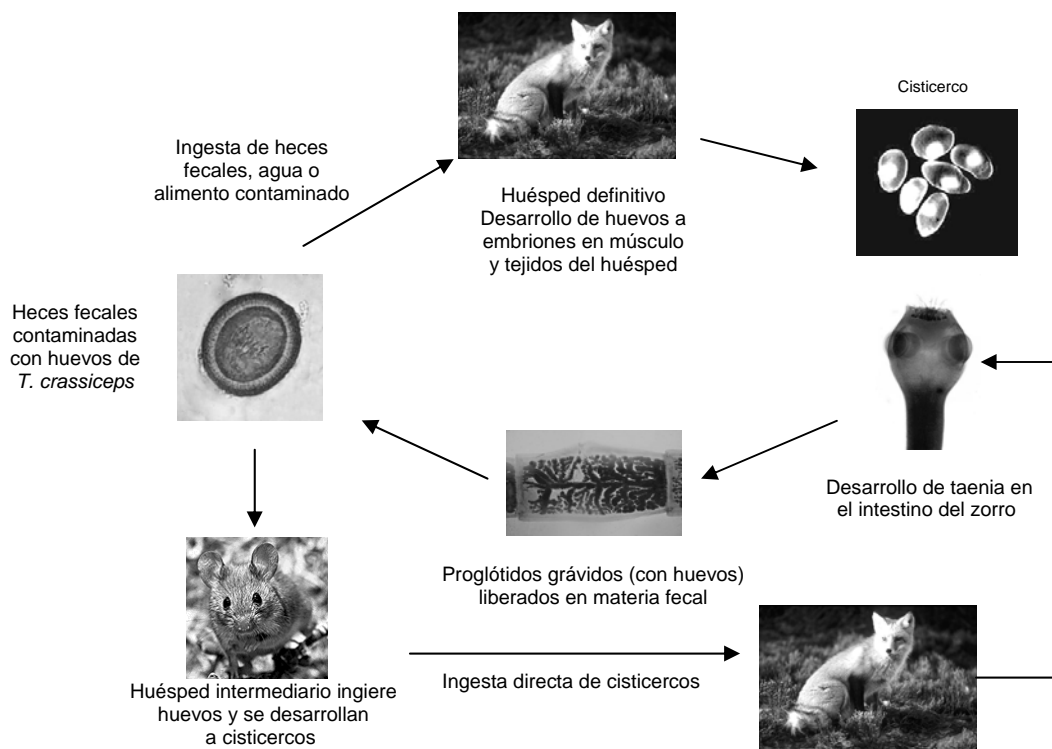


Figura 1. Ciclo de vida natural de *Taenia crassiceps*.

Fuente: elaboración propia a partir de lo reportado en Freeman, 1962.

Por estas características, los cisticercos de *T. crassiceps* son un modelo experimental de cisticercosis murina de fácil mantenimiento dentro del laboratorio, ya que los parásitos se pueden obtener en cantidades suficientes para los estudios por inoculaciones seriadas en la cavidad peritoneal de los ratones. A partir de los cisticercos de *T. crassiceps* se han obtenido diferentes cepas: en 1952 el Dr. Freeman hizo el aislamiento de la cepa ORF a partir del zorro rojo y reportó una serie de estudios sobre la biología del estadio larvario del parásito, en el que se estableció que dicha cepa perdió la capacidad de infectar a especies caninas después de ser mantenida en el laboratorio por inoculaciones seriadas en la cavidad peritoneal de roedores (Freeman, 1962). Al comparar la cepa ORF con la cepa silvestre KBS aislada en 1965 de una rata de agua en Michigan, se reportaron anomalías morfológicas significativas, ya que a diferencia de la cepa KBS la cepa ORF carece del escólex y el rostelo (Kuhn y col. 1972). Se encuentra reportado el hecho de que los cisticercos de la cepa ORF se reproducen más rápidamente que los cisticercos de la cepa KBS (Kuhn y col. 1972), es a partir de este trabajo de investigación que se propone que las diferencias morfológicas y reproductivas podrían deberse a una mutación genética. Posteriormente se estableció el cariotipo de ambas cepas y se encontró que la cepa KBS tiene 16 cromosomas y la cepa ORF tiene 14, los cromosomas son idénticos morfológicamente entre ambas cepas pero falta un par de cromosomas en la cepa ORF. Por estas razones se concluyó que las anomalías que presenta la cepa ORF en cuanto a la

morfología y su reproducción descritas anteriormente son el resultado de una aneuploidía (Kuhn, 1972).

Los cisticercos de *T. crassiceps* presentan a nivel ultraestructural, una morfología semejante a los cisticercos de *T. solium*: son vesiculares, llenos de fluido vesicular y delimitados por un tegumento sincicial continuo, el cual está unido a una capa germinal en la cual se asientan los diferentes tipos de células que la constituyen (Ambrosio y col. 1994)

1.2. Química Medicinal

La química medicinal también conocida como química farmacéutica es un área interdisciplinaria que requiere la participación de la química orgánica, bioquímica, química computacional, farmacología, farmacognosia, biología molecular y estadística. Se encarga del desarrollo de nuevos fármacos e involucra aspectos como la identificación, diseño, síntesis y la realización de estudios clínicos de nuevos compuestos susceptibles a ser empleados con fines terapéuticos. Incluye el estudio de los fármacos existentes con afinidad por la molécula blanco que sean susceptibles de modificarse químicamente en su estructura para desarrollar a partir de estos, nuevos compuestos con mayor selectividad al blanco, que sean menos tóxicos y que podrían convertirse en moléculas modelo para desarrollar nuevos fármacos (Parry-Smith, 2003). Esto se logra mediante el estudio de las propiedades biológicas y la relación cuantitativa estructura-actividad de los fármacos existentes y su posible modificación mediante cambios en su estructura química. En los últimos 20 años se ha incrementado nuestra comprensión de la bioquímica, biología celular y molecular de los agentes patógenos que provocan las enfermedades parasitarias que afectan al hombre. Se ha puesto especial atención al metabolismo y estructuras celulares que son diferentes entre el huésped y el parásito, los cuales son potenciales blancos de acción de los nuevos fármacos a desarrollar (Fairlamb y col. 2003).

El primer paso en el descubrimiento de un fármaco es la identificación de un nuevo compuesto activo, que usualmente se encuentra después de probar diferentes moléculas, hasta que se encuentra una con la actividad biológica deseada. El segundo paso es la modificación de la estructura química del nuevo compuesto activo o farmacóforo para mejorar sus propiedades químicas y actividad biológica. La relación cuantitativa de estructura-actividad del farmacóforo es de vital importancia para encontrar nuevos activos líderes, que tengan mayor actividad biológica (potencia), una buena farmacocinética y que no sean tóxicos. Un paso intermedio involucra el desarrollo de modelos experimentales de evaluación *in vitro* e *in vivo* para evaluar los compuestos y así descartar aquellos que no presentan actividad biológica, de aquellos que podrían tener algún efecto terapéutico. En el último paso se desarrolla una vía de síntesis del compuesto que permita producirlo en grandes cantidades y al menor precio posible, así como, de una buena formulación farmacéutica, esto con la finalidad de hacer estudios clínicos en los pacientes que requieran el tratamiento.

El modelado molecular se define como la generación y visualización de la estructura molecular realista y las propiedades fisicoquímicas asociadas a un compuesto, teniendo como finalidad el predecir la estructura y estabilidad de sistemas químicos. Es una herramienta que da ideas sobre la relación de estructura molecular y la actividad biológica de los compuestos.

1.3. Análisis conformacional

Las moléculas de interés medicinal pueden adoptar más de una conformación, entendiéndose como conformación de una molécula al tipo de arreglos de sus átomos en el espacio. A los diferentes arreglos obtenidos por rotaciones alrededor de un enlace sencillo o enlace sigma se les llama conformaciones y están definidas por la energía potencial de la molécula (Wade, 1993).

Las conformaciones puras y únicas no se pueden aislar, porque las moléculas están en constante movimiento a través de todas las conformaciones posibles y éstas están presentes en diferentes cantidades. Sin embargo, estas conformaciones no están igualmente favorecidas; la conformación más favorecida o más estable será la que requiera la menor energía potencial para formarse. La energía potencial se define como la energía que posee un cuerpo en función de su posición en el espacio, es así que las moléculas requieren mayor o menor energía para adoptar ciertas conformaciones debido a la posición que ocupan en el espacio los átomos respecto a otros en la misma molécula. Al estudio de la energía de diversas conformaciones se le llama análisis conformacional y éste es útil para determinar que conformaciones están favorecidas energéticamente (Wade, 1993).

1.4. Biotransformación del CMFDA

Para evaluar la actividad antiparasitaria de los derivados del BZM se utilizó el marcador fluorescente CMFDA, compuesto que en un primer paso difunde libremente a través de la membrana celular; una vez dentro de la célula el marcador fluoresce cuando los enlaces ester son hidrolizados por esterasas intracelulares y los grupos acetato liberados. Finalmente, mediante una reacción catalizada por la enzima glutatión-S-transferasa, se une con el tripéptido glutatión (GSH), lo que provoca que el marcador conjugado a GSH sea impermeable a la membrana celular y el no conjugado difunda pasivamente al exterior de la célula (Haugland, 2005). El hecho de que el marcador requiera una hidrólisis enzimática para que comience a fluorescer y que finalmente se una a GSH, asegura que al obtener una marca fluorescente en el parásito ésta se origine a partir de una actividad enzimática eficiente, sin la cual el CMFDA no podría ser transformado. El glutatión (glutamilcisteinilglicina) es de gran relevancia a nivel celular y está formado por tres aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina. Se encuentra ampliamente distribuido en tejidos animales, plantas y distintos microorganismos y es sintetizado por casi todas las células de origen animal (Meister, 1994). Es un agente antioxidante que protege a las células de los radicales derivados de oxígeno, metales pesados, radiación, es un cofactor enzimático y antitoxinas (Meister, 1988). Se encuentra principalmente en el citosol a concentraciones milimolares que lo convierten en uno de los antioxidantes intracelulares más concentrados. La concentración de GSH intracelular es un índice de la vitalidad celular, ya que indica la posibilidad de resistir efectos tóxicos adversos (Meister, 1988). El compuesto fluorescente CMFDA se ha empleado como marcador vital en céstodos de copépodos, para investigar la interacción huésped-parásito (Kurtz y col. 2002) y se ha utilizado exitosamente para cuantificar GSH como indicador de toxicidad celular en hepatocitos de trucha arcoiris (Lilius y col. 1996) y, con la misma finalidad en timocitos de rata (Uhea-Ishibashi y col. 2004). También se ha empleado para evaluar el efecto de fármacos en otras especies, como lo reportado en la evaluación de fármacos en *Aspergillus*

(Balajee y col. 2005). Es a partir de estos estudios y la importancia que tiene el GSH en la homeostasis celular por lo que en el presente proyecto se propuso emplear el CMFDA como marcador vital, ya que requiere ser transformado por el parásito para convertirse en un compuesto fluorescente y, finalmente, la fluorescencia emitida por el marcador transformado, es un índice de la actividad enzimática de los cisticercos, la cual probablemente se vea afectada por los derivados del BZM.

1.5. Bencimidazoles

La estructura química de la molécula base de los bencimidazoles se muestra en la figura 2. Esta se compone de dos estructuras cíclicas fusionadas; una bencénica, con los sustituyentes R1 y R2 y otra, diazólica, con los sustituyentes R3 y R4; en donde se presupone que radica la interacción con la tubulina, la proteína blanco de este tipo de compuestos (Lacey, 1988).

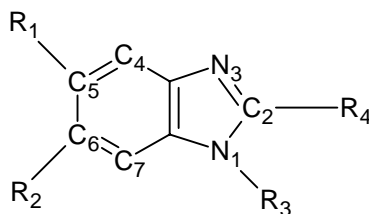


Figura 2. Estructura del anillo del bencimidazol. El anillo se forma, a su vez, de estructuras cíclicas: una bencénica y la otra diazólica. Se observa la numeración que se asigna a cada uno de los átomos del anillo y en los cuales están representados los diferentes sitios en los que se hacen las sustituciones en la molécula (R1, R2, R3 y R4).

Por las propiedades del anillo del bencimidazol, los compuestos derivados del bencimidazol se han utilizado desde hace 40 años para la producción de agentes antiparasitarios y tratamiento de enfermedades parasitarias, por lo que han tenido una amplia aplicación tanto en la medicina humana como en la veterinaria. El primer derivado del bencimidazol, aprobado para su uso en humanos, fue el tiabendazol y a partir de este derivado se establecieron los parámetros toxicológicos y de eficacia antiparasitaria en este tipo de fármacos (Lacey, 1988). Posteriormente, al anillo del bencimidazol se le hicieron diferentes sustituciones químicas y con ellas se encontró que se podía modificar la actividad biológica del compuesto, con lo cual se llegó al desarrollo de nuevos derivados del bencimidazol (Mackellar, Jackson. 2004). Entre ellos, el mebendazol, efectivo en el tratamiento contra protozoarios aprobado para su uso en humanos en 1972; el febendazol, un fasciolicida y el albendazol, para el cual se demostró que era un antiparasitario de amplio espectro y para el que se aprobó su uso en humanos en 1980 (Hotez y col. 2006).

Por el uso indiscriminado, en medicina veterinaria, de algunos compuestos bencimidazólicos, los parásitos han desarrollado resistencia al tratamiento (Lacey, 1988, 1994); fue en el año de 1973 en que se dio el primer reporte de resistencia al cambendazol (Hotez y col. 2006). Sin embargo, en la medicina humana, a principios de los años 90, se aplicaron tratamientos antiparasitarios masivos de una sola dosis de ABZ en niños de edad escolar (Hotez y col. 2006) para lograr la cura efectiva contra helmintos, lo cual demostró la importancia del uso de estos compuestos en la salud de los individuos. Estudios recientes

han llevado a que el ABZ sea considerado como el fármaco de elección para el tratamiento de la neurocisticercosis (Cook, 1998).

1.6. Albendazol

Este es un derivado bencimidazólico de amplio espectro antiparasitario (Figura 3). Tiene efectividad contra tremátodos, nemátodos y céstodos y su proteína blanco principal es la β -tubulina; cuando se une a esta proteína, el ABZ inhibe su polimerización y evita que se formen los microtúbulos (Lacey, 1988) con lo que se conduce directa o indirectamente a que se presente una cascada de cambios bioquímicos y fisiológicos que dañan a los parásitos. Entre los cambios que se generan se encuentran (Lacey, 1994): la disminución en la captación de glucosa con lo que bajan los niveles energéticos del parásito, se inhibe la formación del uso acromático de las células por la inhibición de la formación de los microtúbulos, se afecta la acción de la fumarato reductasa y todo ello altera distintos procesos metabólicos y conlleva a la pérdida de la homeostasis celular, un gran desequilibrio bioquímico y finalmente, a la muerte o expulsión de los parásitos por el huésped. Según los análisis de mutaciones que confieren resistencia a distintos parásitos al tratamiento con ABZ y los análisis computacionales de empalme molecular entre el SOABZ y la estructura de la β -tubulina de *Haemonchus contortus*, generada por computación, se ha establecido que el sitio de unión a la β -tubulina se encuentra entre la región amino terminal y la región intermedia de esta proteína (Fairweather y col. 2004).

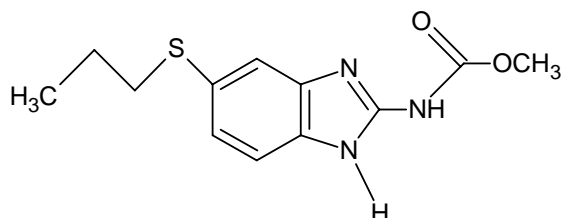


Figura 3. Albendazol. Nombre químico: [5- (propiltio)- 1H-bencimidazol-2-il] carbamato. Fórmula condensada: C₁₂ H₁₈ N₃ O₂S. PM: 265.342

En lo referente a su farmacodinámica, se ha encontrado que la absorción del ABZ es gastrointestinal y, dada su alta hidrofobicidad, menos de un 5% del derivado es absorbido. Sin embargo, si el fármaco se administra en conjunto con alimentos grasos, su porcentaje de absorción aumenta. Se ha encontrado que luego de ser administrado por vía oral, prácticamente no se le detecta en el plasma debido a la rápida metabolización que sufre en el hígado, ahí se convierte a SOABZ y por ello se considera a éste como el metabolito activo del ABZ (Dayan, 2003). El SOABZ se une alrededor de un 70% a proteínas plasmáticas (Dayan, 2003), puede cruzar la barrera hematoencefálica y por ello se le detecta en el líquido cefalorraquídeo hasta en un 43% respecto a su concentración en plasma (Jung y col. 1990). Después de que se le administra por vía oral a una concentración de 400 mg de albendazol (entre 6-8 mg/Kg en adultos), el SOABZ alcanza una C_{max} de 0.16-0.25 mg/L entre 2 y 3 horas de su administración y su T_{1/2} se ha encontrado en el intervalo de 8-12 horas (Dayan, 2003). En lo que se refiere a su biotransformación, es la

oxidación del ABZ en el hígado que genera al SOABZ, la cual depende de una reacción enzimática catalizada por la flavina monooxigenasa y por el citocromo P450. Parte del SOABZ es oxidado todavía más, hasta generar el metabolito sulfona al cual se le considera farmacológicamente inactivo (Figura 4).

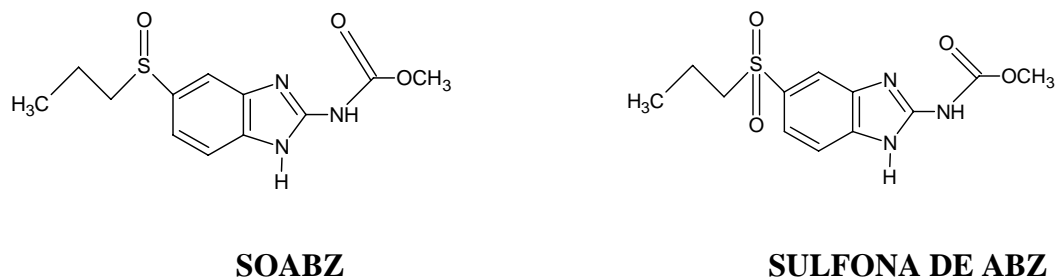


Figura 4. Principales metabolitos del albendazol. Luego de que el ABZ ha sido administrado es rápidamente metabolizado en el hígado formando dos metabolitos; el SOABZ y la sulfona de ABZ.

1.7. Desarrollo de fármacos antihelmínticos

Como se mencionó anteriormente, el tiabendazol estableció los parámetros de tratamiento y eficacia en las enfermedades parasitarias (Lacey, 1988; 1994), su amplio espectro de acción y la baja toxicidad hacia el huésped marcaron los estándares para los nuevos derivados del BZM y otro tipo de antihelmínticos que le siguieron (Lacey, 1994). Aún así el tiabendazol presentaba algunas desventajas, como la pronta inactivación del compuesto mediante una hidroxilación debido a su metabolismo en el hígado. Para eliminar esta limitante se incorporó un grupo isopropil-carbamato en la posición 5 del anillo del benzimidazol formando el cambendazol y se demostró que los BZM sustituidos en dicha posición eran más potentes (Lacey, 1994). Posteriormente, vinieron los llamados BZM de segunda generación, como el ABZ, los cuales tienen un grupo metil-carbamato en la posición 2 del anillo del benzimidazol (Lacey, 1994), en el se encuentra el sitio de interacción con la proteína blanco de estos compuestos, la β -tubulina (Lacey, 1988). También se demostró experimentalmente que el nivel de eficacia de los compuestos depende de la orientación de los sustituyentes en la posición 5 (R1) del anillo del benzimidazol (McCracken, Lipkowitz, 1990).

Con estos antecedentes y debido a que los derivados del BZM aún presentan ciertas limitantes, como la baja solubilidad que afecta directamente su biodisponibilidad y la aparición de resistencia en los parásitos al tratamiento con estos derivados (Lacey, 1988) se considero realizar diversas sustituciones químicas al anillo benzimidazólico para diseñar otros derivados, con la idea de eliminar estas limitantes. Una vez diseñados los derivados y sintetizados por el grupo del Dr. Rafael Castillo en la Facultad de Química de la UNAM, se decidió valorar algunos de ellos para determinar si presentaban efecto en los cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF. Los derivados seleccionados se presentan en la tabla I, en donde se indican las sustituciones que se hicieron al anillo benzimidazólico.

TABLA I.- Derivados del bencimidazol

Clave del Compuesto	Sustituyente	Estructura Química
GNV14	R1=2-3 diclorofenoxi R2=H R3= H R4= CF ₃	
RSD7	R1=Cl R2=H R3=CH ₃ R4=SH	
RSD8	R1=Cl R2=H R3=CH ₃ R4=SCH ₃	
RSD16	R1=Cl R2=Cl R3=CH ₃ R4=SCH ₃	
RCB15	R1=2-3 diclorofenoxi R2=Cl R3= H R4= CF ₃	
RCB20	R1= 1-naftiloxi R2= Cl R3= H R4= CF ₃	
ALBENDAZOL	R1= sulfoxido R2=H R3=H R4= NHCOOCH ₃	

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Es posible evaluar, mediante la determinación de la capacidad de biotransformación del CMFDA, el efecto *in vitro* de los derivados del BZM en cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF.

OBJETIVO GENERAL

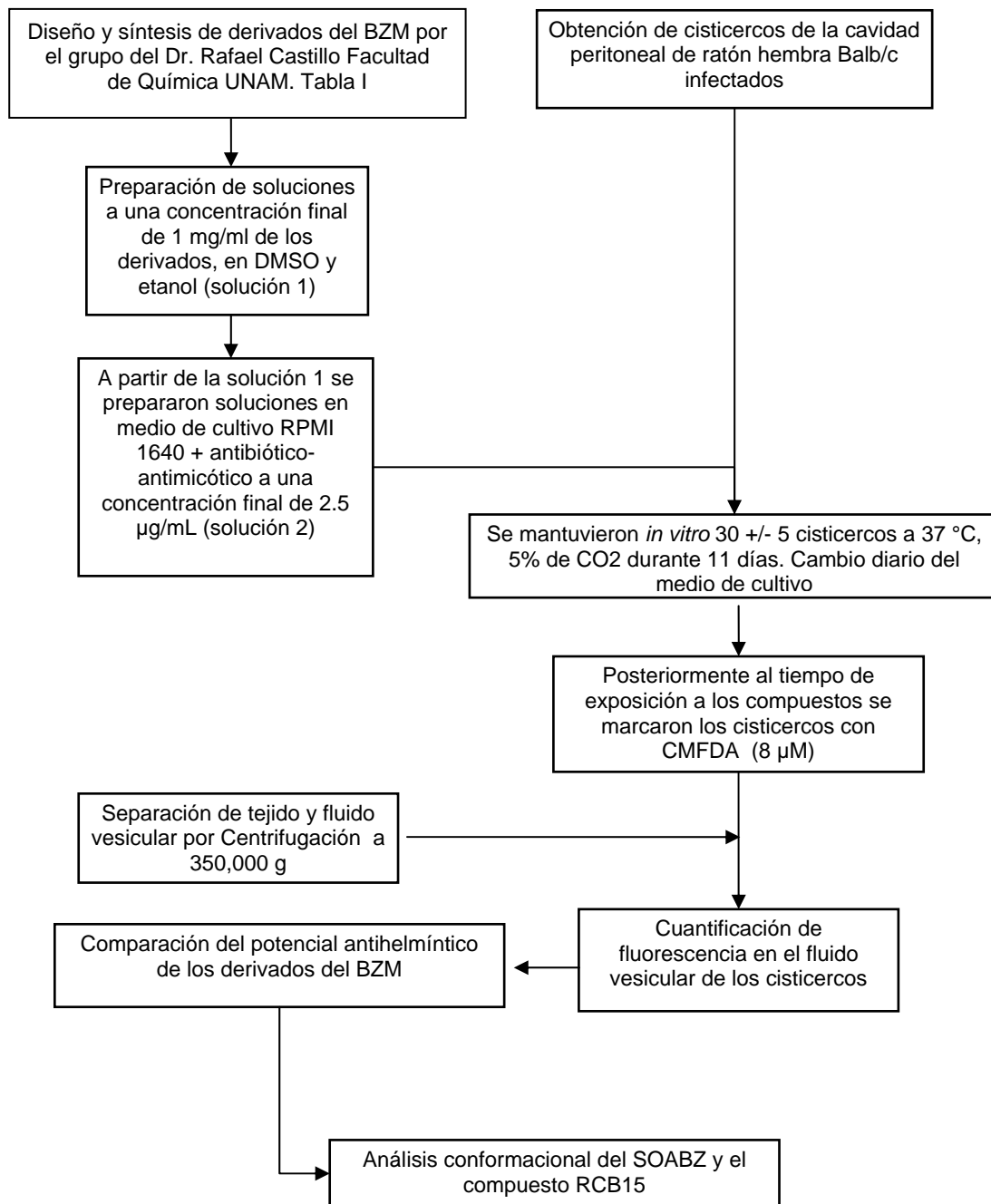
Estandarizar una técnica que permita hacer una determinación de tipo cuantitativo del efecto de los derivados del BZM en cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

Objetivos Particulares:

1. Establecer si es posible evaluar el efecto *in vitro* de derivados del BZM en cisticercos de *T. crassiceps* al utilizar CMFDA.
2. Determinar la CE_{50} del SOABZ.
3. Determinar y comparar el potencial antihelmíntico de derivados del BZM.
4. Establecer si existe relación entre las estructuras químicas de los compuestos y su actividad biológica.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental



3.2. Obtención de cisticercos

Los cisticercos se obtuvieron de ratones hembras Balb/c de 4 semanas de edad, inoculados intraperitonealmente con 30 +/- 5 cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF. Cuatro meses post-infección los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los cisticercos de la cavidad peritoneal en condiciones de esterilidad. Los cisticercos se lavaron tres veces con SSAF pH 7.2 y se retiraron los más pequeños con una propipeta de plástico estéril hasta tener una población con un tamaño promedio de 3-4 mm, finalmente se almacenaron hasta su uso a 4° C en SSAF pH 7.2 suplementado con antibiótico-antimicótico (penicilina-G, estreptomina, anfotericina-B) marca GIBCO BRL. La cepa de cisticercos se mantuvo durante el proyecto de investigación por inoculaciones intraperitoneales seriadas de ratón a ratón.

3.3. Preparación del medio de cultivo

Para los estudios *in vitro* se utilizó medio de cultivo RPMI 1640 marca GIBCO BRL, adicionado con 2.2 g de HEPES, 2.2 g de H₂CO₃ y 10 ml de antibiótico-antimicótico (penicilina G, estreptomina, anfotericina B) marca GIBCO BRL, el medio de cultivo se ajustó a pH 7. Se esterilizó con membranas de filtración de 0.22 µm marca MILLIPORE y se almacenó a 4°C hasta su uso.

3.4. Preparación de las soluciones de los derivados del bencimidazol

Los derivados del BZM fueron diseñados y sintetizados en el laboratorio del Dr. Rafael Castillo del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química UNAM (Tabla I). Para preparar las soluciones de los compuestos en medio de cultivo, se partió de una solución con una concentración de 1 mg/ml del compuesto (solución 1). La solución 1 se preparó como se indica a continuación: en un matraz volumétrico de 10 ml se disolvieron 10 mg del compuesto en estudio en 5 ml de DMSO, posteriormente se agregaron 3 ml de etanol y se aforo a 10 ml con agua destilada.

Para determinar la CE₅₀ del sulfóxido de albendazol se prepararon, a partir de la solución 1, soluciones en medio de cultivo con una concentración final de 2.5, 1, 0.25, 0.1, 0.025, 0.01 µg/ml (solución 2). Para la evaluación del efecto de los compuestos GNV14, RSD7, RSD8, RCB15, RSD16 y ABZ se utilizó una concentración única de 2.5 µg/ml, debido a que esta concentración el efecto del SOABZ, que es el compuesto de referencia, es evidente en los cisticercos.

Como solución control en todos los casos se utilizó medio de cultivo con 0.125% de DMSO y 0.075% de etanol, que fueron las concentraciones finales de los disolventes en la solución 2.

3.5. Evaluación *in vitro* del efecto de los derivados del BZM en cisticercos de *T. crassiceps*

Grupos de 30 +/- 5 cisticercos se incubaron *in vitro* en presencia de los derivados del bencimidazol durante 11 días. Los cisticercos se colocaron en placas multipozos de 2.5 cm de diámetro (NUNC), a los cuales se les adicionaron 4 ml de medio de cultivo con el compuesto a evaluar y su control correspondiente preparado como se indica en la sección 3.4. Se determinó la CE₅₀ del SOABZ a las concentraciones indicadas anteriormente y los otros derivados en estudio se evaluaron a una concentración única de 2.5 µg/ml. Cada uno de los experimentos efectuados se hizo por triplicado. Los cultivos se mantuvieron a 37°C, con 5% de CO₂ y 90% de humedad en una incubadora NUAIRE Modelo UN-4750 y se trabajaron en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar marca NUAIRE modelo UN-426-300. El medio de cultivo se cambió diariamente para asegurar que los cisticercos estuvieran expuestos a una concentración constante del compuesto a evaluar.

3.6. Marcaje de los cisticercos con CMFDA

Los cisticercos se marcaron con CMFDA (Molecular Probes) como se describe a continuación (Haugland 2005): una vez finalizado el tiempo de exposición de los cisticercos a los derivados del BZM, se retiró el medio de cultivo con el derivado y se sustituyó por 2 ml de medio de cultivo con CMFDA a una concentración de 8 µM. Se incubó durante 45 minutos a 37°C y 5% de CO₂ y 90% de humedad. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo con CMFDA y se agregó medio de cultivo fresco a temperatura ambiente, se incubó 30 minutos a 37°C, con 5% de CO₂ y 90% de humedad. Finalmente, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 3 ml de una solución de formaldehído al 3.7% y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se retiró la solución de formaldehído y se lavaron los cisticercos 3 veces con SSAF pH 7.2. Los cisticercos se protegieron de la luz y se almacenaron a 4°C.

3.7. Obtención de imágenes de los cisticercos

Los cisticercos marcados fluorescentemente se observaron y fotografiaron en un microscopio confocal invertido (Bio Rad modelo 1024) a 488 nm de absorción y 510 nm de emisión con un objetivo 4x. También se utilizó para este fin un microscopio estereoscópico invertido marca Olympus, modelo SZX7, acoplado a un equipo de epifluorescencia, con una lámpara de mercurio de 100W y un filtro de 510 nm para detectar la fluorescencia emitida. Las imágenes mostradas en la figura 16 se tomaron con una cámara Kodak Z700 de 4.0 megapíxeles.

3.8. Cuantificación de fluorescencia en los cisticercos

Los cisticercos se incubaron en presencia de los derivados del BZM y posteriormente se marcaron fluorescentemente con CMFDA y se fijaron con formaldehído, después de fijarlos se centrifugaron a 351,955 g (90,000 RPM) durante 30 min. a

temperatura ambiente en una ultracentrífuga (BECKMAN modelo TL-100). De este proceso se obtuvieron dos fracciones: un sobredanante que fue el fluido vesicular y un botón, el tejido de los cisticercos. El tejido del cisticercos se homogenizó y la suspensión resultante se diluyó en 2.5ml de agua destilada, del fluido vesicular se tomaron 25 μ l y se diluyó en 2.5 ml de agua destilada, ambas soluciones se adicionaron a una cubeta de cuarzo por separado y se midió la fluorescencia a 490 nm de excitación y con un filtro de corte a 515 nm para la emisión (Hauglan 2005) en un espectrofluorómetro (Photon Technology Internacional). Como blanco se utilizó agua destilada.

3.9. Análisis estadístico de los resultados de cuantificación de fluorescencia

Todos los experimentos se efectuaron por triplicado, con su control correspondiente, en el cual los cisticercos no se expusieron a ningún compuesto derivado del BZM. Los resultados obtenidos se procesaron con el programa GraphPad PRISM V. 4.02, en el caso de la determinación de la CE_{50} del SOABZ, se utilizó un análisis de correlación no lineal con pendiente variable y para la comparación del efecto de GNV 14, GNV21, RSD8, RSD7, RSD16 se utilizó la media de cada triplicado y se graficó con su desviación estándar correspondiente.

3.10. Análisis conformacional de los derivados del BZM

Con la finalidad de hacer el análisis conformacional y obtener la estructura tridimensional de los derivados del bencimidazol utilizados en el estudio, las estructuras químicas se introdujeron en el programa de cómputo Sybyl V. 7.2 para determinar su conformación más estable y el potencial electrostático de la molécula.

RESULTADOS

4. 1. Adaptación, registro y evaluación de la marca fluorescente

Como se muestra en la figura 5, se obtuvo un marcaje fluorescente de los cisticercos con CMFDA a una concentración de 2 μM . Según lo observado por microscopía confocal, el marcaje no alteró la morfología de los parásitos, aunque bajo estas condiciones se encontró que el marcaje fluorescente no era homogéneo para todos ellos (figura 5). Por esto, se decidió evaluar el marcaje a concentraciones mayores de CMFDA (4, 6 y 8 μM); lo observado mediante un microscopio estereoscópico invertido equipado con epifluorescencia, mostró que a una concentración de 8 μM de CMFDA, la marca fluorescente presente en los parásitos fue homogénea e intensa (figura 6). En todos los casos, independientemente de las concentraciones de CMFDA empleada, no hubo alteración de la morfología de los cisticercos.

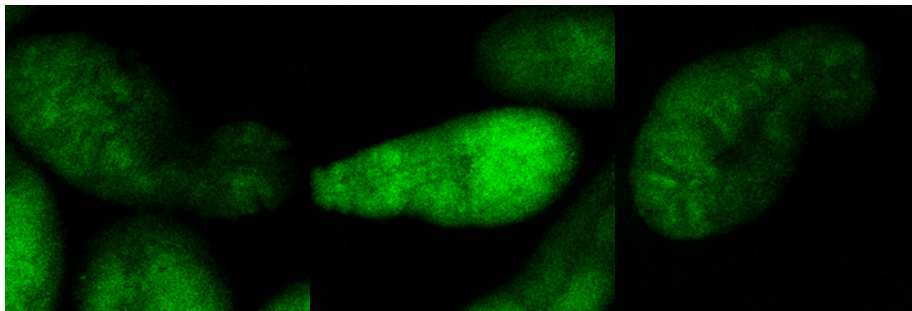


Figura 5. Cisticercos marcados fluorescentemente con 2 μM de CMFDA. Los cisticercos se marcaron bajo las condiciones descritas en la sección 3.6. Imagen obtenida en un microscopio confocal invertido (Bio-Rad, modelo 1024) a 488 nm de excitación y 510 nm de emisión. Los cisticercos presentan un marcaje fluorescente heterogéneo. Aumento 4x.

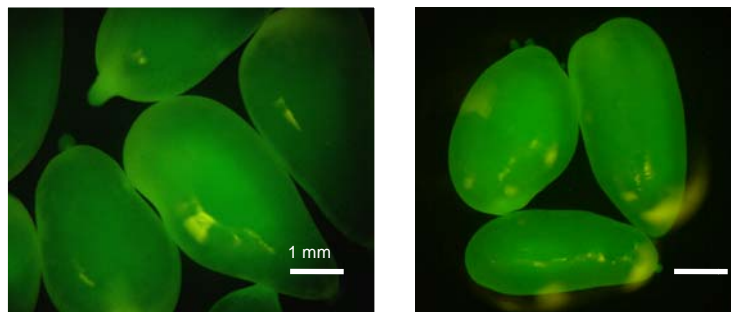


Figura 6. Cisticercos marcados fluorescentemente con 8 μM de CMFDA. Imagen obtenida en un microscopio estereoscópico invertido acoplado a un equipo de epifluorescencia, lámpara de mercurio de 100W y filtro de 510 nm (Olympus, modelo SZX7). El marcaje fluorescente fue homogéneo.

4.2. Evaluación cualitativa del marcador fluorescente en cisticercos tratados con compuestos derivados del bencimidazol

Con la finalidad de evaluar el efecto *in vitro* de los compuestos químicos, dos grupos de cisticercos se mantuvieron en cultivo durante 7 días, uno de ellos se incubó en presencia de SOABZ (2.5 µg/ml), el otro grupo se considero como control y sólo se le adicionaron los disolventes empleados. Al término de la incubación, los parásitos se marcaron con CMFDA y se fijaron con formaldehído. Los efectos de las condiciones del cultivo para ambos grupos se registraron mediante la observación en un microscopio confocal, tanto por la técnica de Nomarsky, como por la detección de fluorescencia. Como se observa en la figura 7, en las imágenes obtenidas por Nomarsky, sólo los cisticercos tratados con el SOABZ se volvieron opacos y perdieron su fluido vesicular, mientras que no hubo cambio alguno en los cisticercos del grupo control. En cuanto a la fluorescencia, mientras que los cisticercos del grupo control presentaron una fluorescencia intensa, los cisticercos del grupo tratado con SOABZ mostraron un descenso en la marca fluorescente, Figura 7.

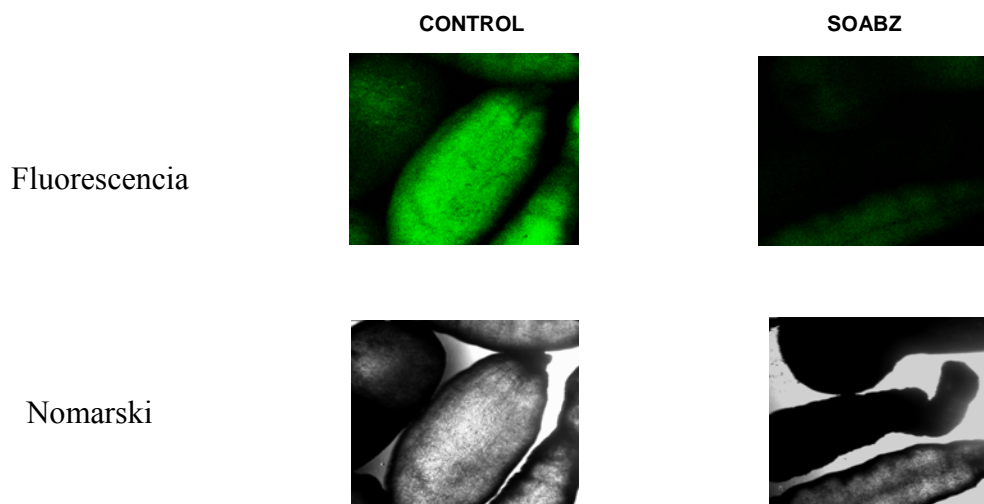


Figura 7. Cisticercos mantenidos en cultivo en ausencia y en presencia de SOABZ. El grupo control no recibió tratamiento, mientras que el experimental se trato con SOABZ (2.5 µg/ml). Luego de 7 días de cultivo, los parásitos se marcaron con 2 µM de CMFDA, se fijaron con formaldehído y se observaron en un microscopio confocal ajustado para una observación a 488 nm de excitación y 510 nm de emisión del fluoróforo. También se hicieron observaciones a luz visible, bajo la técnica de Nomarski. Las observaciones se hicieron con un objetivo 4X.

4.3. Evaluación cuantitativa de la fluorescencia emitida por el CMFDA en cisticercos tratados con ABZ y SOABZ

Como era evidente que el tratamiento de los cisticercos con SOABZ disminuía la intensidad de la fluorescencia emitida por el CMFDA (figura 7), se consideró necesario hacer una evaluación cuantitativa del marcaje. Por ello, se capturaron las imágenes de cisticercos tratados con ABZ y SOABZ en un fotodocumentador (figura 8), los cuales se marcaron con CMFDA al terminar el tratamiento. En la figura 8 se observa que la

intensidad de fluorescencia de los parásitos tratados disminuye con respecto al control. Estas imágenes se analizaron con el programa *Quantity One*, el cual permite realizar determinaciones cuantitativas de la fluorescencia. Dicho programa efectúa la cuantificación por área de la imagen, por lo que se definió a cada pozo como el área a cuantificar. Debido a que las placas presentaron autofluorescencia, se determinaron los valores de autofluorescencia de pozos vacíos, los cuales se consideraron como los valores basales.

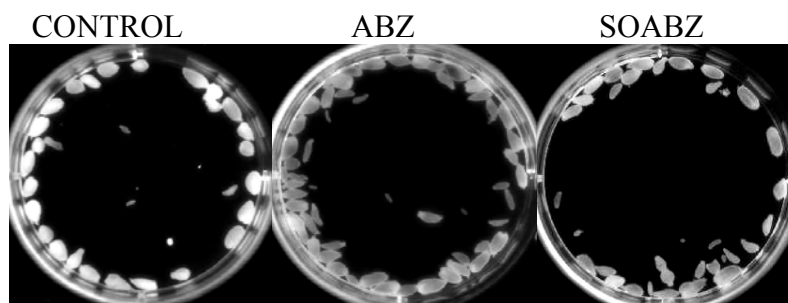


Figura 8. Cisticercos cultivados en presencia de ABZ y SOABZ y marcados fluorescentemente. Las imágenes muestran las placas en que se efectuaron las incubaciones *in vitro*. Se observa el grupo control y dos grupos tratados con ABZ y SOABZ a una concentración de 2.5 $\mu\text{g/ml}$. Luego de los tratamientos, los parásitos se marcaron con CMFDA, se fijaron con formaldehído y se registraron las observaciones en un fotodocumentador por transiluminación registrando la fluorescencia emitida con un filtro a 520nm.

En la figura 9, se presenta una gráfica que muestra la cuantificación realizada en las imágenes obtenidas en el fotodocumentador, en donde los valores de la fluorescencia corresponden a la intensidad de fluorescencia medida por mm cuadrado (INT/mm^2 , eje de las ordenadas), en función de los grupos de triplicados de los cisticercos (abscisa). Según los valores obtenidos, la intensidad promedio es de $2.55 \times 10^6 \text{ INT/mm}^2$ para el grupo control, para los cisticercos tratados con ABZ es de $5.37 \times 10^5 \text{ INT/mm}^2$ y para los tratados con SOABZ, es de $4.06 \times 10^5 \text{ INT/mm}^2$. Según estos resultados, la fluorescencia disminuye en los cisticercos tratados con ABZ y SOABZ en aproximadamente un orden de magnitud respecto a la fluorescencia emitida por los cisticercos del grupo control.

A pesar de que los resultados obtenidos mostraban que había un efecto en la fluorescencia medida para los parásitos del grupo control contra los tratados por los compuestos, hubo mucha complejidad para lograr hacer las mediciones de la fluorescencia; siempre se encontró una gran variabilidad de los valores de autofluorescencia de las placas y ello no permitía establecer los intervalos de fluorescencia obtenidos bajo los diferentes tratamientos.

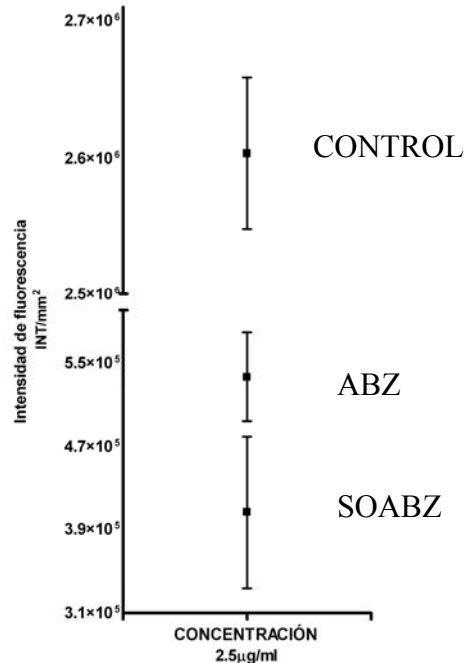


Figura 9. Determinación de la fluorescencia emitida por el CMFDA de cisticercos tratados con ABZ y SOABZ. En la gráfica se muestran los valores promedio de los ensayos mostrados en la figura 8, se indica la desviación estándar calculada para cada uno de los grupos estudiados. Debido a que los valores de fluorescencia obtenidos para el grupo control fueron muy elevados, se hizo un recorte en el eje de las ordenadas.

Por lo complejo que resultó el determinar la fluorescencia por esta estrategia, se consideró necesario encontrar otra alternativa para medir directamente la fluorescencia de los parásitos. Por ello, luego de marcar los cisticercos con CMFDA y fijarlos con formaldehído, se sometieron a centrifugación de alta velocidad (Ambrosio y col. 1994), después de la cual se recuperó el tejido y el fluido vesicular, en los cuales se midió la fluorescencia. Con la finalidad de establecer la longitud de onda a la cual debía registrarse la fluorescencia en un espectrofluorómetro, se realizó un barrido de 450 nm a 550 nm de excitación y se comparó la fluorescencia de fluido vesicular de cisticercos sin tratamiento y marcados con CMFDA contra SSAF pH 7.2, la fluorescencia emitida se detectó con un filtro de corte a 515 nm. Se determinó que la longitud de onda óptima para realizar las determinaciones de la fluorescencia del CMFDA fue de 490 nm de absorción, con un filtro de corte a 515 nm para detectar la emisión de fluorescencia (figura 10). Como se observa, alrededor de los 500 nm, los valores de las emisiones son semejantes; sin embargo, en la longitud de onda de 490 nm sólo para el fluido vesicular se detecta fluorescencia como se indica en la figura con una flecha. Bajo estas condiciones de evaluación, los valores de emisión y de excitación del CMFDA obtenido experimentalmente fueron semejantes a los establecidos por el fabricante que son 492 nm de absorción y 517 nm de emisión (Haughland, (2005).

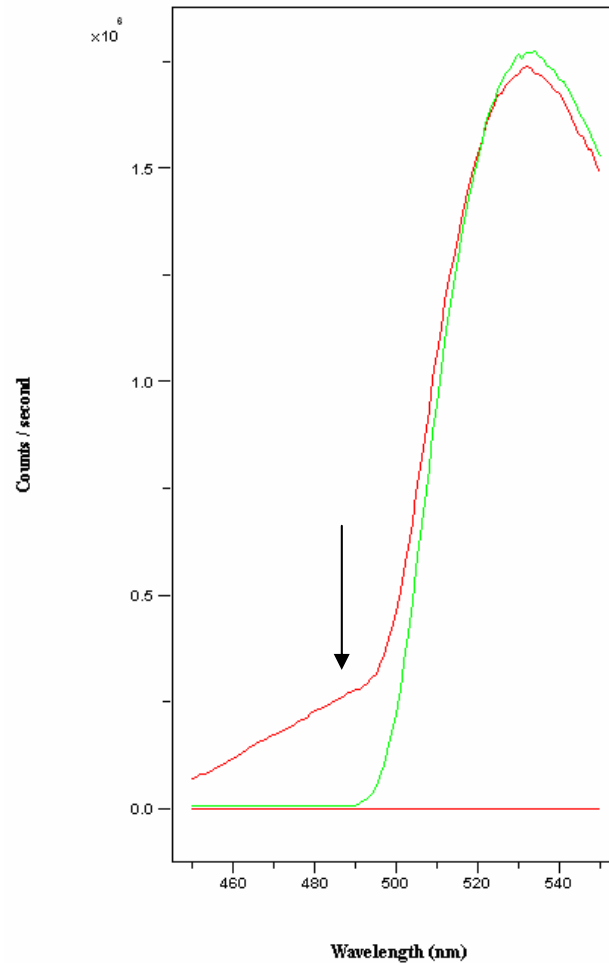


FIGURA 10.- Comparación de fluorescencia emitida por fluido vesicular y SSAF a diferentes longitudes de onda de excitación. Una vez que se obtuvo el tejido y el fluido vesicular de los cisticercos previamente tratados con los compuestos y marcados con CMFDA, se determinó la cantidad de fluorescencia emitida con un filtro de corte a 515 nm, en 25 μ l de fluido vesicular diluidos con 2.5ml de SSAF en un barrido de 450nm a 550nm longitudes de onda de excitación (abscisas). La línea mas intensa representa la fluorescencia medida en el fluido vesicular y la línea punteada, las mediciones que se hicieron para la SSAF utilizada como blanco. La flecha indica la región en la que no hay fluorescencia emitida por la SSAF, pero en la que la fluorescencia emitida por el fluido vesicular se diferencia totalmente.

Una vez que se determinó la longitud de onda optima para la cuantificación de la fluorescencia, se cuantificó la fluorescencia emitida tanto en tejido como en fluido vesicular obtenidos de cisticercos tratados con ABZ y SOABZ a una concentración de 2.5 μ g/ml (Figura 11). En la gráfica se presenta la intensidad de la fluorescencia en el eje de las ordenadas y en el eje de las abscisas se muestran las fracciones analizadas de los cisticercos. De acuerdo con los resultados obtenidos, la fluorescencia detectada en el fluido vesicular de los parásitos es aproximadamente 2.5 veces más alta que en los tejidos y, como también se observa en la misma figura, la fluorescencia detectada en las fracciones de los cisticercos tratados es menor que la determinada para los parásitos del grupo control. A pesar de las diferencias encontradas en las mediciones de fluorescencia de los tejidos, estas fracciones siempre presentaron problemas debido a su solubilización en SSAF y por ello se

estableció que, en lo sucesivo, la estimación de la fluorescencia en los parásitos debería ser efectuada únicamente en el fluido vesicular.

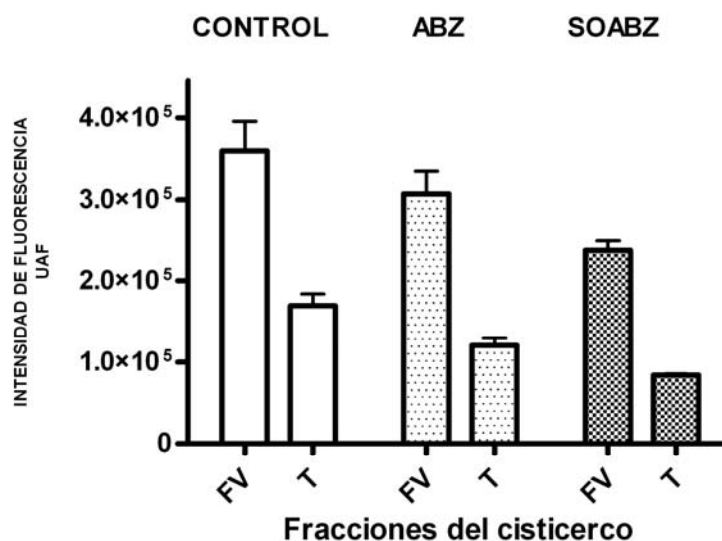


Figura 11. Determinación cuantitativa de la fluorescencia emitida por el CMFDA en tejido y fluido vesicular de cisticercos tratados con ABZ y SOABZ. Una vez que los parásitos se incubaron en ausencia o en presencia de los derivados de BZM, los cisticercos marcados con CMFDA, se fijaron y se centrifugaron a 351,955 g para recuperar su fluido vesicular y tejido. Los resultados presentados y los intervalos de desviación estándar corresponden a determinaciones realizadas en ensayos por triplicado y analizadas estadísticamente mediante el programa GraphPad PRISM versión 4.02. FV: fluido vesicular, T: tejido.

4.4. Evaluación de la interacción del CMFDA con los compuestos bencimidazólicos

Aun cuando la β -tubulina es considerada el principal blanco de los derivados del BZM (Lacey, 1988) no se sabía si el CMFDA podía interactuar con otros compuestos, como los probados en la presente tesis y que los cambios detectados en la intensidad de fluorescencia se debieron a esta interacción y no al efecto de los BZM sobre los cisticercos, por lo tanto se evaluó si los derivados del BZM podrían interactuar con el CMFDA. Para estos fines se hicieron dos tipos de evaluaciones: en una, cuando el CMFDA difunde hacia el interior de los parásitos y la otra, cuando fluoresce y se encuentra unido al glutatión intracelular.

En la primera evaluación, los cisticercos se marcaron con CMFDA en presencia de dos derivados diferentes del BZM, ABZ ó GNV14, a una concentración de 2.5 μ g/ml, para evaluar si hubo alguna interacción BZM-CMFDA durante su difusión. Según lo presentado en la Figura 12, no se encontró diferencia significativa ($P=0.56$) entre la intensidad de fluorescencia determinada en los cisticercos marcados fluorescentemente de los grupos marcados en presencia de los BZM comparados con el grupo control.

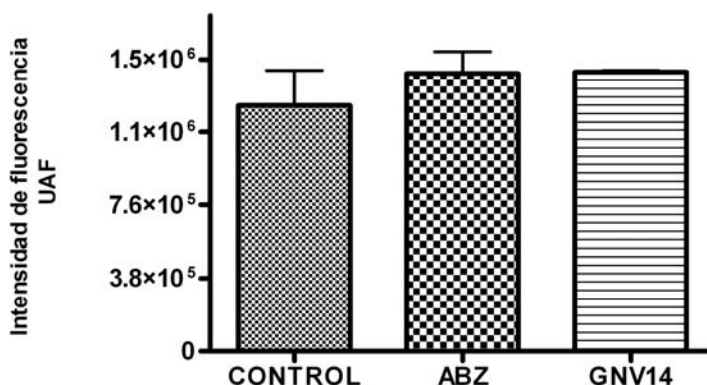


Figura 12. Evaluación de la interacción de los derivados del BZM con el CMFDA durante su difusión. Los parásitos se marcaron con CMFDA en presencia de ABZ ó GNV14 (concentraciones de 2.5 $\mu\text{g/ml}$). Así también, como grupo control, se marcaron los parásitos con CMFDA en ausencia de los compuestos. Los resultados presentados corresponden a la cuantificación de fluorescencia en el fluido vesicular de los cisticercos en series de experimentos efectuados por triplicado.

En la segunda evaluación, luego de que los cisticercos se marcaron con CMFDA y se fijaron, el fluido vesicular que se obtuvo por centrifugación, se fracciono en tres alícuotas. A una de ellas se le determinó la cantidad de fluorescencia que contenían (Control) y se comparó con las mediciones de la fluorescencia de las otras dos alícuotas restantes a las cuales se les adicionó, previo a la determinación de la fluorescencia, 25 μl de ABZ ó GNV 14 a concentraciones de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Esto con la finalidad de determinar si los BZM interactuaban con el marcador y con esto aumentaba o disminuía la fluorescencia. Los resultados que se obtuvieron (figura 13) mostraron que no hubo diferencia significativa en la determinación de la cantidad de fluorescencia en las diferentes muestras de fluido vesicular tratadas como se indicó ($P=0.78$).

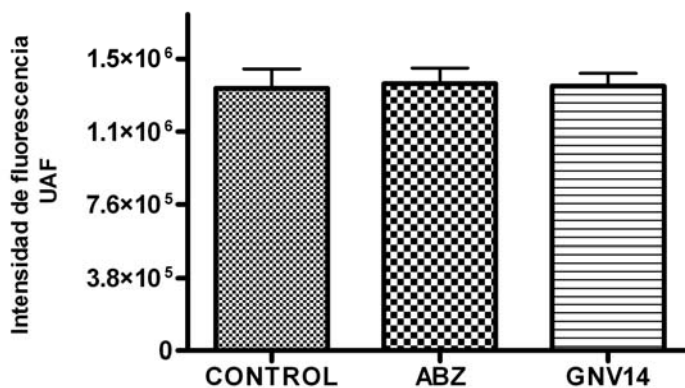


Figura 13. Evaluación de la interacción de derivados del BZM con el CMFDA. El fluido vesicular obtenido de los parásitos marcados con CMFDA, se fraccionó en tres alícuotas; a una se le determinó la intensidad de fluorescencia (control) y a las dos restantes se les adicionó tanto ABZ como GNV14 a una concentración de 2.5 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados mostrados se obtuvieron de un experimento realizado por triplicado.

4.5. Estimación de la CE_{50} del SOABZ en cisticercos marcados fluorescentemente con CMFDA

La determinación de la CE_{50} del SOABZ se realizó en cisticercos cultivados por once días, bajo diferentes concentraciones del compuesto (2.5, 1, 0.25, 0.1, 0.025, 0.01 $\mu\text{g/ml}$). Al terminar el tiempo de cultivo, los cisticercos se marcaron con CMFDA y se recuperó el fluido vesicular, en el cual se cuantificó la fluorescencia emitida. En la figura 14 se muestran los resultados que se obtuvieron en un ensayo por triplicado, el cual está integrado en una gráfica en la que el eje de las ordenadas corresponde a la intensidad de fluorescencia (UAF), mientras que en el eje de las abscisas se presenta el logaritmo de cada una de las concentraciones del SOABZ utilizadas en estos ensayos. Según la gráfica, mientras que la concentración del SOABZ aumenta hacia la derecha del eje de las abscisas, la fluorescencia disminuye. A pesar de la variabilidad en la intensidad de fluorescencia de los grupos de cisticercos tratados con SOABZ a 1 y 2.5 $\mu\text{g/ml}$ (corresponden a 0 y 0.4 en el eje de las ordenadas en la figura 14), se determinó el promedio estimado de la CE_{50} que es de 0.070 $\mu\text{g/ml}$ (log concentración -1.15) con un intervalo de confianza al 95% de 0.017 a 0.276 $\mu\text{g/ml}$ (log concentración -1.75 a -0.55).

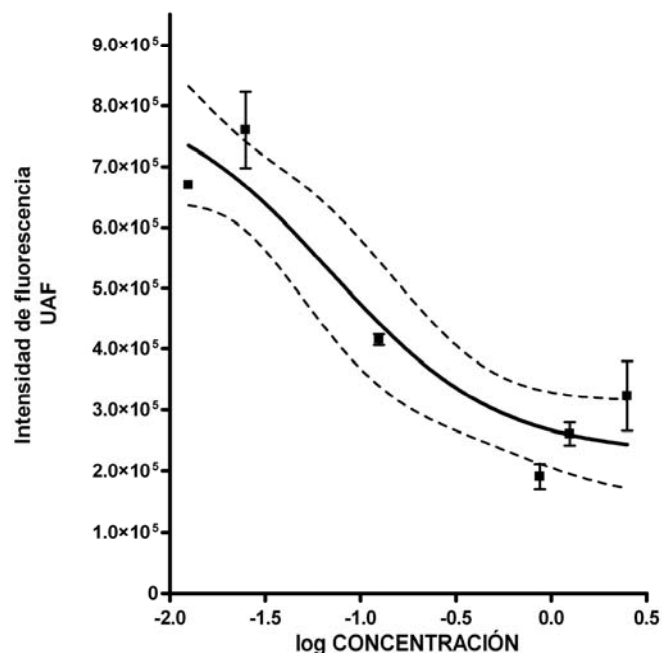


Figura 14.- CE_{50} del SOABZ determinada con fluorescencia. Luego de la incubación de los cisticercos durante 11 días en presencia de diferentes concentraciones de SOABZ (0.01, 0.025, 0.1, 0.25, 1, 2.5 $\mu\text{g/ml}$), los parásitos se recuperaron, se marcaron con CMFDA, se fijaron y se obtuvo el fluido vesicular. La determinación de la intensidad de la fluorescencia (UAF) en función de la concentración (log concentración) se graficó y de ahí se calculó el valor de CE_{50} exactamente a la mitad de la pendiente que desciende de la curva. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

4.6. Evaluación del efecto de los derivados del BZM en cisticercos de *T. crassiceps*

Los compuestos que se evaluaron fueron: GNV14, RSD7, RSD8, RSD16 y RCB15, todos ellos bajo una misma concentración (2.5 µg/ml), el efecto se midió a los 11 días que corresponde al tiempo en que se observó el máximo efecto del SOABZ. Al terminar el tratamiento los parásitos se marcaron con CMFDA, se fijaron, se recuperó el fluido vesicular y se determinó el contenido de fluorescencia. El control positivo fue el fluido vesicular de cisticercos incubados con SOABZ y el control negativo fue fluido vesicular de cisticercos mantenidos en cultivo en ausencia de compuesto.

En la figura 15 se muestran los resultados obtenidos del efecto observado de los diferentes derivados del BZM sobre los cisticercos; en el eje de las ordenadas se representa la capacidad de los cisticercos para transformar al CMFDA en un compuesto fluorescente y que se une al glutatión intracelular, en las abscisas se comparan los diferentes compuestos bencimidazólicos utilizados en la presente tesis. Debido a que los cisticercos tratados con el compuesto RCB15 y RCB20 perdieron totalmente el fluido vesicular, no hubo posibilidad alguna de efectuar la medición de fluorescencia, por lo que estos resultados se presentan en la figura 16. Como se observa en la figura 15, los parásitos del grupo control tienen la capacidad de transformar al CMFDA en un compuesto fluorescente, que se consideró con un 100%, mientras que los tratados con SOABZ y el RSD16 parecen haber producido una disminución en tal capacidad de biotransformación (71% y 74% respectivamente). Según los resultados de la misma figura, los compuestos RSD7, RSD8 y GNV14 no alteraron de manera significativa la capacidad de biotransformación del CMFDA en los cisticercos.

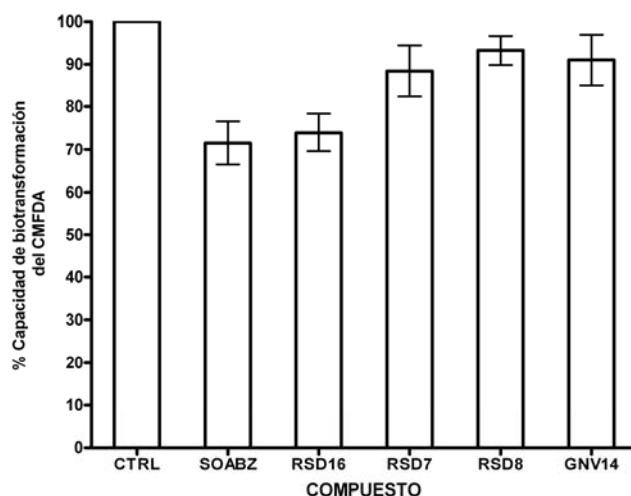


Figura 15. Comparación del efecto de diferentes derivados del BZM en la capacidad de biotransformación del CMFDA de los cisticercos. Los cisticercos se cultivaron durante 11 días en presencia de 2.5 µg/ml de diferentes derivados del BZM, al finalizar el cultivo, se marcaron con CMFDA, se fijaron, se recuperó el fluido vesicular y en este se determinó la fluorescencia (498nm de excitación y con un filtro de corte a 515 nm de emisión). En el eje de las ordenadas se presenta el porcentaje de la capacidad de biotransformación del CMFDA, en el eje de las abscisas se muestran los diferentes derivados del BZM evaluados. Cada uno de los ensayos efectuados se realizó por triplicado.

A diferencia de los efectos encontrados con los derivados del BZM presentados en la figura 15, el RCB15 (del que se muestra su efecto en la figura 16) y el RCB20 fueron los que más daño produjeron en los cisticercos. Como se observa, los parásitos tratados con el

SOABZ, luego de 11 días de cultivo presentaron disminución de su tamaño por pérdida de fluido vesicular y opalescencia en los tejidos, pero a diferencia de este compuesto, los parásitos que recibieron tratamiento con el compuesto RCB15 tuvieron una pérdida total de fluido vesicular y su tejido se hizo totalmente opaco. El efecto que se observó es que el RCB15 dañó a los parásitos desde el primer día y los efectos se fueron recrudeciendo conforme transcurrían los días de cultivo.

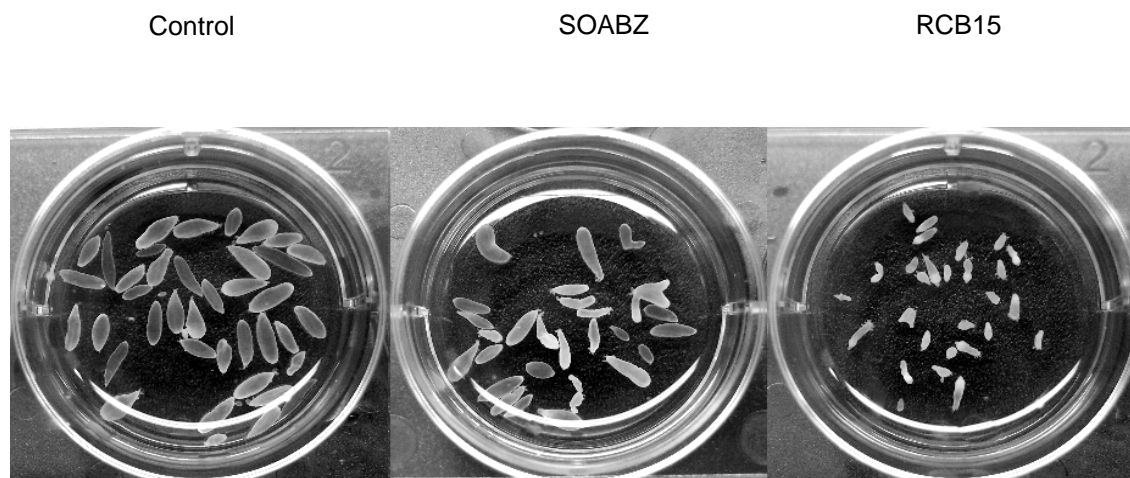


Figura 16. Cisticercos cultivados en ausencia o en presencia de SOABZ y RCB15. Los parásitos se incubaron *in vitro*, durante 11 días de cultivo, en ausencia de compuestos benzimidazólicos (control) o en presencia de los mismos (SOABZ y RCB15 respectivamente) a una concentración de 2.5 $\mu\text{g/ml}$. El efecto del compuesto RCB15, comparado con el producido por el SOABZ, es notorio por los cambios que produjo tanto en la forma como en el tamaño de los parásitos. Las imágenes de los parásitos se tomaron con una cámara Kodak Z700 de 4.0 megapíxeles

4.7. Análisis conformacional de las estructuras químicas de algunos compuestos benzimidazólicos

Con la finalidad de determinar la conformación molecular de los compuestos SOABZ y RCB15, se realizó un análisis de sus estructuras tridimensionales mediante el programa Sybyl V7.2 y se obtuvieron las imágenes de la figura 17, las cuales muestran los conformeros más estables; es decir, las estructuras químicas tridimensionales que requieren la menor energía para su formación.

Una representación simple del anillo del benzimidazol se muestra en la figura 2. En la figura 17 se aprecia como los sustituyentes que diferencian a la molécula del SOABZ, con respecto al RCB15, están localizadas en las regiones R1 (diclorofenoxi), R2 (Cl) y R4 (CF₃).

Con base en las estructuras químicas mostradas en la figura 17, se generó el potencial electrostático de las moléculas y se presenta en la figura 18, aquí las estructuras están proyectadas de la misma forma que las de la figura 17. Se observa que la estructura tridimensional del SOABZ parece ser más alargada que la del RCB15, debido a que este último no tiene un grupo carbamato (NHCOOCH₃) unido al anillo del benzimidazol (posición R4), porque se sustituyó durante su síntesis por una entidad triflorometilada (CF₃). También, en la posición R1 del RCB15, hay una sustitución del grupo sulfóxido por

el grupo dicloro-fenoxi y el RCB15 presenta un grupo Cl en la posición R2 del anillo del bencimidazol. En la figura 18, el potencial electrostático se presenta del lado izquierdo en un intervalo de colores que van del azul al rojo, siendo el rojo el que representa un potencial electrostático negativo y el azul positivo. Tal potencial de electronegatividad es un índice de la capacidad de interacción de los compuestos con otras moléculas. Por los colores que se presentan en el compuesto RCB15 se deduce que este es un compuesto con diferentes zonas de colores en comparación con el del SOABZ.

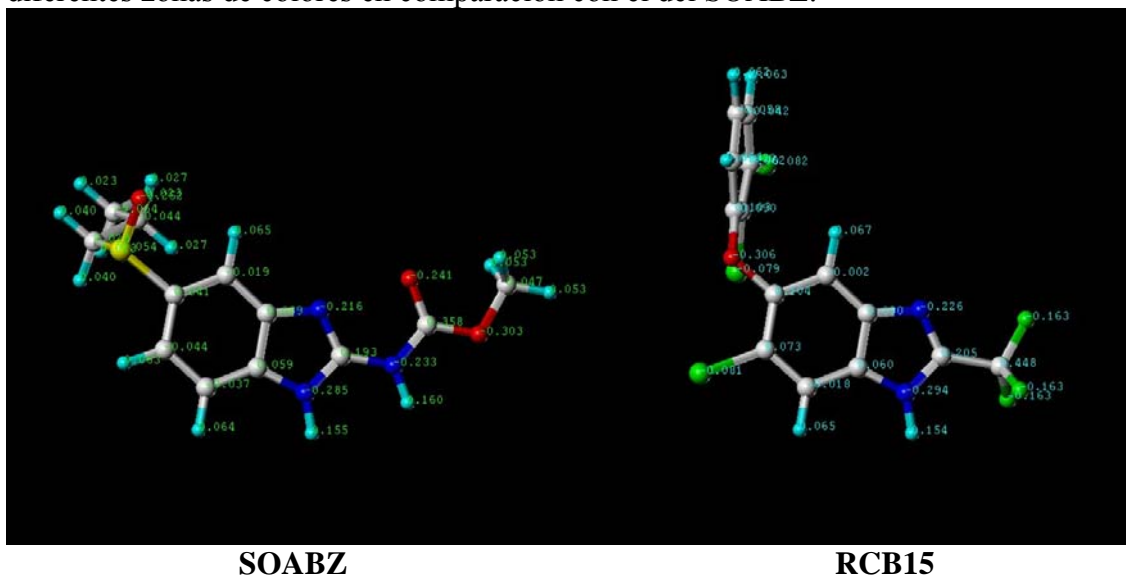


Figura 17. Análisis conformacional de las estructuras químicas del SOABZ y RCB15. Los conformeros del SOABZ y del RCB15 se obtuvieron del programa computacional Sybyl V7.2 Se muestran las estructuras químicas en forma de esqueleto; el anillo del bencimidazol se proyecta en un plano de frente al lector, mientras que los otros anillos se presentan hacia el fondo de la imagen. Ambas estructuras presentan una misma orientación y proporción. Los átomos de las moléculas están representados por colores, los cuales corresponden a: H₂ = azul claro, N = azul oscuro, S = amarillo, O₂ = rojo, Cl y F = verde.

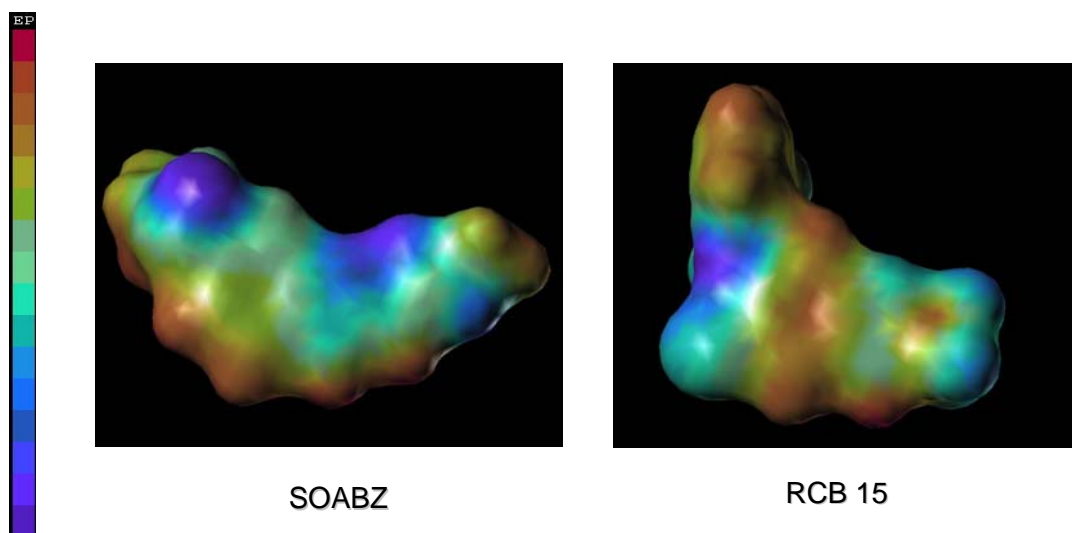


Figura 18. Comparación del potencial de electrostático de derivados del BZM. Una vez generadas las estructuras del SOABZ y del RCB15 como se muestra en la figura 13 y usando el mismo programa computacional, se hicieron los cálculos del potencial electrostático de cada zona de la molécula. Cada una de las zonas tiene diferentes colores representados en la tira del lado izquierdo. El color rojo corresponde a la zona potencial de electrostático negativo y la azul a uno positivo.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La necesidad de llevar a cabo evaluaciones precisas del efecto de los compuestos derivados de los BZM en los cisticercos, llevó a la búsqueda y estandarización de un sistema cuantitativo que permitiera determinar mediante la capacidad de biotransformación del CMFDA en un compuesto fluorescente por los cisticercos, el grado en que resultan afectados por los compuestos en estudio. Otros investigadores ya habían reportado la evaluación *in vitro* del SOABZ en el mismo parásito, sólo que dicha evaluación estaba relacionada con la morfología y el movimiento de los parásitos (Palomares y col. 2004; 2006; 2007) que en el presente trabajo de tesis se consideraron de tipo cualitativo. El interés de encontrar una forma cuantitativa de evaluar el efecto de los derivados del BZ propuestos, llevó a emplear un marcador fluorescente como el CMFDA que ayudo a resolver el problema planteado. El marcador ya había sido empleado para el marcaje fluorescente en céstodos de copépodos (Kurts y col. 2002) y por ello se decidió valorar si funcionaba en los cisticercos que también son céstodos. Adicionalmente, este marcador fluorescente se ha utilizado para evaluar el efecto de fármacos en otros organismos, como *Aspergillus* (Balajee y col. 2005) y, se ha encontrado que es útil como marcador vital debido a que para detectarlo necesita ser transformado de un compuesto no fluorescente a uno fluorescente por el organismo en el que se use. El CMFDA presenta varias características que lo hacen útil como marcador vital: **1.** Tiene la capacidad de atravesar por difusión pasiva cualquier tipo de membrana biológica. **2.** Requiere de un metabolismo activo en el organismo que lo contiene, para convertirse por hidrólisis enzimática en un compuesto fluorescente y volverse impermeable a la membrana celular, cuando se une a glutatión intracelular mediante una reacción catalizada por la glutatión-S-transferasa. La transformación es dependiente de uno de los principales sistemas de detoxificación celular (Meister, 1988) por lo que se le ha empleado para cuantificar el glutatión intracelular en linfocitos de trucha arcoiris (Lilius y col.1996). **3.** La fluorescencia emitida por el CMFDA transformado es un parámetro cuantificable que refleja directamente la actividad metabólica del organismo en el que se emplea.

Durante la estandarización del marcaje en los cisticercos, se inició con una concentración de 2 μM de CMFDA, esto basado en lo reportado para los céstodos de copépodos (Kurts y col. 2002). Sin embargo, como se observó en las imágenes presentadas en la figura 5, no hubo un marcaje homogéneo de los parásitos y se tuvo que evaluar el CMFDA a concentraciones mayores. Para ello se consideró lo que se publicó para la evaluación de fármacos en hongos (Balajee y col.2005), en donde se utilizó un amplio intervalo de concentraciones (2.5 a 15 μM), por ello se decidió que se evaluarían concentraciones de 4, 6 y 8 μM . Bajo estas condiciones, el mejor marcaje fluorescente se obtuvo a 8 μM , en donde, aparte de que los parásitos se marcaron homogéneamente, lo hicieron con una buena intensidad, mantuvieron su integridad y, sobre todo, no sufrieron alteración en su morfología como se mostró en la figura 6. Por estas causas se determinó que el marcaje de los cisticercos con CMFDA a una concentración de 8 μM era la mejor concentración para los ensayos de evaluación *in vitro* del efecto de los derivados del BZM en estudio. El marcaje fluorescente de los cisticercos fue heterogéneo a la concentración de 2 μM , probablemente, por que bajo esta concentración no se exigió el funcionamiento

máximo de la maquinaria enzimática necesaria para transformar y activar al CMFDA. También, pudo deberse a que estos parásitos son más grandes que los céstodos de copépodos y por ello, necesitaron una mayor concentración para marcarse homogéneamente.

Una vez estandarizado el marcaje fluorescente en los cisticercos, se empleó para evaluar el efecto de derivados del BZM planteados en el presente proyecto de investigación. La hipótesis planteada fue que el efecto de los derivados del BZ se vería reflejado en la intensidad de fluorescencia emitida por el CMFDA en los parásitos tratados, debido a que, si los derivados del BZM eran efectivos en el modelo experimental, provocarían una disminución en la capacidad de biotransformar el CMFDA en un compuesto fluorescente.

Entre los derivados del BZM empleados actualmente en la clínica para tratamiento de parasitosis, en especial de cisticercosis producida por *T. solium*, el ABZ es uno de los fármacos de elección; este antiparasitario es de amplio espectro y se ha utilizado ampliamente para tratar diferentes enfermedades parasitarias. En lo referente a su biotransformación, se sabe que este fármaco es metabolizado rápidamente a SOABZ, el cual se considera como su principio activo (Dayan, 2003) por ello se le tomó como compuesto de referencia a lo largo de toda la investigación. Como se muestra en la figura 7, el efecto del SOABZ en los cisticercos se vio reflejado en la disminución de la intensidad de fluorescencia en los parásitos tratados, lo cual indicó que el SOABZ altera, de alguna forma, la capacidad de biotransformación del CMFDA. Las observaciones de la disminución de la fluorescencia se acompañaron con cambios en la morfología de los parásitos, según lo obtenido en las imágenes por Nomarski, donde se observó que los tejidos estaban opacos y perdieron parte del fluido vesicular. Estos resultados indicaron que la fluorescencia emitida por el CMFDA fue afectada por un derivado de los BZM, el SOABZ, lo cual sustentó la hipótesis planteada al inicio de la investigación. Se estableció, que ya se podría llevar a cabo la evaluación de los daños que pudieran ejercer los derivados del BZM que se planteó probar. Sin embargo, para hacer un análisis cuantitativo del efecto de estos derivados, se tenía que hacer una cuantificación de la fluorescencia del CMFDA transformado. Todo esto, con la finalidad de que la evaluación del efecto de los compuestos no estuviera sometida a mediciones cualitativas, como la continua observación del aspecto de los parásitos, sus movimientos ó el empleo del azul de tripano como marcador vital (Palomares y col. 2004).

La fluorescencia se cuantificó a través de la captura de imágenes de los pozos con cisticercos en un fotodocumentador Chemi-doc (Bio-Rad) y su posterior análisis con el software *Quantity One*. Se definió previamente el área donde se cuantificó y el filtro para detectar la fluorescencia. Con este sistema fue posible cuantificar la fluorescencia en los diferentes grupos de parásitos. Como se muestra en la figura 9, la intensidad de fluorescencia del grupo control fue mayor que la de los grupos tratados con ABZ y SOABZ, la diferencia entre los valores de intensidad de fluorescencia mostró ser hasta de un orden de magnitud entre el grupo control y el tratado con el SOABZ. Estos resultados concordaron con las diferencias en la intensidad de fluorescencia de los distintos grupos observados en las figuras 7 y 8. Resultó interesante que, al comparar la intensidad de fluorescencia del grupo tratado con ABZ y el tratado con SOABZ, en el primero había una mayor fluorescencia que en el segundo, lo cual indicó que el SOABZ alteró más la capacidad de biotransformación del CMFDA de los cisticercos que el ABZ, diferencia imposible de determinar de manera visual a partir de la figura 8. En esta figura solamente

se pudieron ver las diferencias más significativas entre el grupo control y los tratados, pero no las diferencias entre los tratados con ABZ y SOABZ. La cuantificación de fluorescencia emitida por el CMFDA transformado fue la forma de evaluar el efecto de los compuestos derivados del BZM, sin embargo, aún cuando la cuantificación fue factible, la estrategia con la que se realizó mostró ser complicada dado que las cajas de cultivo presentaban una elevada autofluorescencia que resultó difícil de eliminar durante las cuantificaciones.

Por lo anterior, se consideró necesario recurrir a un espectrofluorómetro y con ello realizar una mejor cuantificación de la fluorescencia. Otro problema se presentó: no fue posible evaluar a los parásitos enteros como se había hecho en el fotodocumentador y para ello se separó el tejido del fluido vesicular de los parásitos como fue reportado por Ambrosio y col. en 1994. Para determinar la fluorescencia en ambas fracciones de los parásitos, se probaron diferentes formas de solubilización del tejido porque las suspensiones obtenidas dificultaban la cuantificación de la fluorescencia, se estandarizó la dilución del fluido vesicular. Adicionalmente, se establecieron los parámetros de excitación y emisión del fluoróforo como se mostró en la figura 10 y las condiciones de las lecturas en el espectrofluorómetro. Una vez ajustados los parámetros de lectura, se cuantificó la fluorescencia en tejido y fluido vesicular y se confirmó nuevamente que había diferencias entre los grupos tratados con ABZ y con SOABZ (Figura 11) y se estableció que las variaciones en la intensidad de fluorescencia eran reflejo del efecto de los compuestos sobre los parásitos. Se encontró que la fluorescencia en fluido vesicular fue 2.5 veces mayor que la que se encontró en el tejido. De acuerdo con estos resultados, el marcador fluorescente se acumuló en este compartimiento y ello podría deberse a varias causas: **1.** La ultracentrifugación a la que fueron sometidos los parásitos influyó para que los contenidos en el tejido se hubieran movido hacia el fluido vesicular como si se les hubiera “exprimido”. **2.** Cabría la posibilidad de que en el fluido vesicular de los cisticercos exista una gran actividad de esterasas o una alta concentración de glutatión y por ello, el compuesto pudo quedar atrapado en esta fracción del parásito. **3.** El CMFDA pudo ser hidrolizado y, posteriormente llevado hacia el fluido vesicular. A partir de los resultados obtenidos no fue posible determinar por cual de las causas se detectó al CMFDA en mayor proporción en fluido vesicular que en el tejidos del cisticerco, pero los resultados fueron contundentes en el sentido que las siguientes determinaciones deberían ser efectuadas en el fluido vesicular de los parásitos.

Varias inquietudes surgieron durante la estandarización en la evaluación del efecto de los compuestos en los parásitos y su correlación con la medición de la fluorescencia producida, el problema fue que no se encontró reporte alguno que indicase si el marcador fluorescente pudo interactuar con algún otro compuesto como los probados en el presente trabajo de investigación. Se determinó si el CMFDA pudo haber interactuado directamente con los derivados del BZM, ya que si ello hubiese sido así implicaría que los cambios registrados en la fluorescencia, hubieran estado asociados a la interacción directa de los derivados del BZM con el CMFDA. Por ello, se evaluaron dos aspectos que dieron información al respecto. En el primero, se determinó si el CMFDA podría ser impedido por una unión, algún impedimento estérico o cualquier interacción con los derivados del BZM para entrar por difusión pasiva a la célula, por esto se agregaron el CMFDA y el derivado del BZM en la misma solución de marcaje y posteriormente se marcaron los cisticercos con esta solución CMFDA-BZM. Si hubiese existido alguna interacción entre el CMFDA y los derivados del bencimidazol, la intensidad de fluorescencia disminuiría comparada con el control, en el que la solución de marcaje solo contenía CMFDA. Según lo que se obtuvo en

la figura 12, no se encontró diferencia significativa entre la fluorescencia detectada en el grupo control y el grupo en el que se adicionó la mezcla de CMFDA/SOABZ o CMFDA/GNV14, lo cual mostró que no hubo interacción entre los compuestos. Finalmente para descartar si existía alguna interacción entre el CMFDA fluorescente (CMF) conjugado a glutatión intracelular (CMF-GSH) y los derivados del BZM, se llevo a cabo el experimento mostrado en la figura 13, en el que a una solución que contenía fluido vesicular con CMF-GSH se le agregaron los derivados del BZM. De los resultados obtenidos se pudo comprobar que los derivados no disocian el complejo o lo transforman de alguna manera que afecten las mediciones de la intensidad, por lo tanto los derivados del BZM parecen no tener efecto directo sobre el CMFDA transformado.

Una vez estandarizada la cuantificación espectrofluométrica del CMFDA transformado, en donde se demostró que los cambios en la intensidad de fluorescencia estaban asociados directamente al tratamiento al que se sometían a los parásitos, se consideró adecuado comparar los resultados obtenidos por la técnica estandarizada con lo reportado en dos trabajos que registraron el efecto del SOABZ en cisticercos de *T. crassiceps* (Palomares y col. 2004 y 2007). En tales estudios la CE_{50} encontrada fue de 0.068 y 0.081 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente y con intervalos de confianza al 95% de 0.041 a 0.112 y de 0.054 a 0.135 $\mu\text{g/ml}$ para ambos casos. En la figura 14, se muestra que la CE_{50} determinada mediante la cuantificación del marcador fluorescente en cisticercos tratados con SOABZ fue de 0.070 $\mu\text{g/ml}$ con un intervalo de confianza de 0.017 a 0.276 $\mu\text{g/ml}$; de acuerdo a estos resultados, el valor de la CE_{50} obtenido, fue cercano a los dos reportados. Existieron algunas diferencias entre los intervalos de confianza, estas podrían deberse a que en el intervalo de altas concentraciones (de $\log 0.5$ a $\log -1$ de la figura 14, los cuales corresponden a las concentraciones de 2.5 a 0.1 $\mu\text{g/ml}$) los valores son mas homogéneos por el daño producido por el SOABZ en los parásitos, mientras que, a menores concentraciones (de $\log -1$ a $\log -2$ que corresponden de 0.1 a 0.01 $\mu\text{g/ml}$ en la misma figura) los valores son heterogéneos porque no hubo un efecto tan marcado en los parásitos. Por lo tanto, la evaluación del CMFDA transformado no es confiable cuando se exponen a los parásitos a bajas concentraciones de SOABZ, ésto podría deberse a que las alteraciones del metabolismo de los parásitos son mínimas a estas concentraciones. Por ello, se determinó evaluar los derivados del BZM propuestos a una concentración de 2.5 $\mu\text{g/ml}$, concentración a la cual el efecto del SOABZ fue evidente.

Debido a que se fijó una concentración única y lo que se deseaba era comparar el efecto de los compuestos en los parásitos, se determinó expresar la intensidad de fluorescencia como la capacidad de biotransformación del CMFDA por los cisticercos expuestos a los compuestos utilizados. Se consideró para ello, que los cisticercos sin tratamiento tuvieron la capacidad de llevar a cabo una biotransformación del CMFDA al cien por ciento. Es decir el efecto de los compuestos que dañaron a los parásitos, es inversamente proporcional a la capacidad de biotransformación de los cisticercos. Aparentemente, los compuestos GNV14, RSD8, RSD7 no dañaron a los parásitos porque no hubo disminución significativa en su capacidad de biotransformación. En el caso del compuesto RSD16, se encontró que tiene efectos similares al SOABZ, llama la atención que este compuesto, comparado con el SOABZ, presenta diferencias estructurales importantes como son la falta del grupo sulfóxido y del grupo carbamato en las posiciones R1 y R4 respectivamente (la comparación puede verse en las estructuras moleculares presentadas en la figura 4 y tabla I respectivamente). La posibilidad de que el RSD16 haya actuado de manera semejante al SOABZ podría estar basada en que el metilo que presenta

en la posición 1 de la molécula aún le permite al compuesto interactuar con la β -tubulina y, de la misma manera, los átomos de cloro en las posiciones R1 y R2 le dan mayor estabilidad.

Hubo dos derivados de los BZM, el RCB15 y el RCB20 que produjeron daños serios en los parásitos, al grado que no hubo posibilidad alguna para hacer una cuantificación de la fluorescencia debido a que hubo pérdida total del fluido vesicular en los cisticercos. Llamó la atención que estos compuestos produjeron cambios en la morfología de los parásitos desde los primeros días de su incubación con los compuestos. Por lo consiguiente, se consideró que estos dos compuestos tuvieron mayor capacidad de dañar a los cisticercos en comparación con el SOABZ y por estas causas se puso atención en ellos.

Con los resultados obtenidos y con la idea de cubrir el objetivo relacionado con la determinación de si la estructura química de los derivados se asociaba con su actividad biológica, se llevó a cabo un análisis conformacional tanto del RCB15 como del SOABZ, para poder establecer qué cambios en las moléculas pudieron haber sido las responsables del efecto registrado. Con un programa de cómputo, se obtuvieron las estructuras conformacionales más favorecidas energéticamente; es decir, la conformación que requiere la menor energía para formarse (Figura 17), sin embargo, las moléculas pueden adoptar otras conformaciones de mayor energía debido a que están en constante movimiento a través de todas las conformaciones posibles y están presentes en diferentes cantidades. El SOABZ es una molécula tautomérica porque el grupo sulfóxido puede estar en constante movimiento entre las posiciones R1 y R2 y ello es la causa de la inestabilidad de la molécula. En el caso de los compuestos RCB15 y RCB20, no son tautómeros porque el grupo Cl unido al anillo del bencimidazol en la posición R2, impide que los grupos en la posición R1 tengan un movimiento constante y ello estabiliza a la molécula. Mientras que los grupos cloro presentes en la molécula del RCB15 le confieren estabilidad y con esto son metabolizadas lentamente por los organismos. Lo anterior hace que moléculas semejantes al compuesto RCB15 y RCB20 pudieran ser potenciales cestocidas con una alta biodisponibilidad y que tuvieran mayor efecto que el SOABZ. Las estructuras tridimensionales del SOABZ y del RCB15 muestran que el primero es más largo y ello se debe a las sustituciones del RCB15 en la posición R4 como se indicó en la presentación de resultados. El triflorometilo que se colocó en la molécula se espera que haya aumentado su solubilidad, lo cual podría ser una ventaja sobre el SOABZ que es prácticamente insoluble en agua (Dayan, 2003). Con base a lo mencionado, cabría esperar que el RCB15 tuviera una mayor solubilidad que el SOABZ y, nuevamente, una mejor biodisponibilidad debido a que se esperaría un incremento en su absorción.

En lo relacionado con la proteína blanco de los compuestos, se ha propuesto que el SOABZ interactúa con la β -tubulina, dicha interacción se da entre el grupo carbamato y el grupo metilo (en posición R3 y R4 respectivamente) del compuesto y la región amino terminal y la región intermedia de la proteína (Lacey, 1988, Fairweather, 2004). El hecho de que el efecto del compuesto RCB15 en los parásitos sea mayor que el ejercido por el SOABZ, se debe a las modificaciones que se realizaron en el compuesto, ya que éstas alteraron el potencial electrostático de las moléculas (figura 18) y su conformación. Estas modificaciones pudieron alterar su forma de interactuar con la proteína blanco o probablemente pueden interactuar con otra distinta. Una de las maneras en que se podría determinar si hubo cambio en la interacción con la β -tubulina, sería mediante un sistema de análisis proteómico, con el cual se determinaría que proteínas están relacionadas con el

efecto encontrado sobre los parásitos y el papel que juegan en su sobrevivencia e integridad. Es probable que la proteína o proteínas blanco del compuesto RCB15 sean distintas a la β -tubulina, debido a que el RCB15 produce un efecto casi inmediato sobre la integridad de los parásitos. La β -tubulina es una proteína constitutiva implicada en la formación de microtúbulos, los cuales son los encargados del transporte de nutrientes y la excreción de sustancias de desecho, el SOABZ al inhibir la polimerización de los microtúbulos impide que éstos lleven a cabo sus funciones, llevando a una disminución en los niveles energéticos en el parásito así como a un desequilibrio bioquímico debido en parte a la intoxicación que sufre al no poder excretar sustancias de desecho (Lacey, 1994). El efecto que el SOABZ produce *in vitro* a los cisticercos se hace evidente a los once días, de acuerdo a los resultados mostrados y a lo reportado en la literatura (Palomares y col. 2004). A diferencia del SOABZ, el compuesto RCB15 tiene efecto macroscópico en los parásitos desde las primeras 24 horas de exposición, es por ello que se propone que la proteína blanco podría ser diferente a la β -tubulina.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF tienen la capacidad de transformar al CMFDA en un compuesto fluorescente y esta resulto afectada por los derivados del BZM, como el ABZ y el SOABZ. Las alteraciones que se presentaron durante la transformación del CMFDA cuando se expusieron los cisticercos a compuestos derivados del BZM, permitieron determinar si un compuesto tiene o no actividad cestocida.

La estandarización de éste método cuantitativo de evaluación de fármacos en ténidos, es de vital importancia para la investigación de nuevos compuestos con potencial acción cestocida. Aunque estos compuestos deben ser valorados en formas larvianas de otros céstodos de importancia en la salud pública, como los cisticercos de *T. solium*, en el cual se esperarían resultados similares, dado que existen similitudes morfológicas y biológicas.

Según los resultados obtenidos en el presente proyecto de investigación, es evidente que hay una relación estructura-efecto para los compuestos que se evaluaron. El compuesto RSD16, a pesar de ser una molécula diferente al SOABZ, tuvo una actividad semejante y los compuestos RSD7, RSD8, GNV14 no presentaron actividad significativa. El compuesto RCB15 y RCB20 tienen potencial como fármacos cestocidas; sin embargo, como se menciono anteriormente, habrían de efectuarse estudios con otros céstodos para valorar estas posibilidades. En este sentido es claro que el papel que juega la química medicinal en el diseño, la síntesis y la evaluación de fármacos potenciales cobra una importancia vital en la búsqueda de nuevos antiparasitarios, los cuales pudieran tener mejor efecto que los que se encuentran actualmente en el mercado.

Un aspecto realmente interesante que requiere ser abordado, es la definición de qué proteínas podrían ser el blanco del compuesto RCB15 y RCB20. En la actualidad, por la tecnología con la cual se cuenta, no sólo se espera diseñar y sintetizar una molécula con ciertas características que la hagan efectiva, sino que también se espera llegar a conocer detalladamente al blanco farmacológico. La conjunción entre el conocimiento generado por la química medicinal, los estudios de tipo proteómico y de biología celular de los organismos en estudio, seguramente podrán abrir nuevas puertas para el desarrollo de mejores fármacos antiparasitarios. Por consiguiente, para el caso de los compuestos derivados del BZM basados en el RCB15 y RCB20 sería interesante identificar sus blancos, las alteraciones a nivel tisular (tanto en el aspecto estructural, como ultraestructural) que producen en los organismos en estudio y correlacionar esta información con el mecanismo de acción con el que probablemente dañó a los parásitos.

BIBLIOGRAFÍA

- **Ambrosio, J.** Landa, A. Merchant, M. Laclette J.P. 1994. Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. Archives of Medical Research. 25:3, 325-330.
- **Balajee, S.A.**, Imhof, A., Gribskob, J.L., Marr, K.A.(2005). Determination of antifungal drug susceptibilities of *Aspergillus* species by a fluorescence-based microplate assay. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 55:1, 102–105.
- **Cook, G.C.**, (1998) Taeniasis and cysticercosis. Journal of the Royal Society of Medicine. 91:10, 534-535.
- **Dayan, A.D.** (2003) Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. Acta Tropica. 86:2-3,141-59.
- **Fairlamb, A.H.**, Ridley, R.G., Vial. H.J. (2003) Discovery and drug development for tropical diseases: new opportunities, new trends. Drugs against parasitic diseases: R&D methodologies and issues. En WHO. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). 5-7
- **Fairweather, I.**, Robinson, M.W., McFerran, N., Trudgett, A., Hoey, L. (2004) A possible model of benzimidazole binding to β -tubulin disclose invoking an inter-domain movement. Journal of Molecular Graphics and Modelling. 23:3, 275-284.
- **Flisser, A.** (2006) Where are the tapeworms? Parasitology International. 55 Suppl:S, 117-20.
- **Flisser, A.** Gauci, G.C., Zoli, A., Martinez-Ocaña, J., Garza-Rodriguez, A., Domínguez-Alpizar, J.L., Maravilla, P., Rodríguez-Canul, R., Avila, G., Aguilar-Vega, L., Kyngdon, C., Geerts, S., Lightowers, M.W. (2004) Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. Infection and Immunity. 72:9, 5292-5297.
- **Freeman, R.S.** (1962) Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). Canadian Journal of Zoology. 40, 969-990
- **Haugland, R.P.** 2005. "Handbook of fluorescent probes and research products" Molecular Probes.
- **Hotez, J.P.**, Bethony, J., Bottazzi, M.E., Brooker, S., Diemert, D., Loukas, A. (2006). New technologies for the control of human hookworm infection. Trends in Parasitology. 22:7, 327-331.
- **Ingold, K.**, Bigler, P., Thorman, W, Cavaliero., T., Gottstein, B., Hemphill, A. (1999) Efficacies of albendazole sulfoxide and albendazole sulfone against *In vitro*-cultivated *Echinococcus multicularis* metacestodes. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 43:5, 1052-61.
- **Jung, H.**, Hurtado, M., Sanchez, M., Medina, M.T., Sotelo, J. (1990) Plasma and CFS levels of albendazole and praziquantel in patients with neurocysticercosis. Clinical Pharmacology. 13:6, 559-564.

- **Kuhn, R.E.**, Smith, J.K., Esch, G.W. (1972) Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda)-I. Aneuploidy in the anomalous ORF strain. *International Journal of Parasitology*. 2, 261-263.
- **Kurtz, J.**, Ineke, T.V., Christen, M. (2002) Fluorescent vital labelling to track cestodes in a copepod intermediate host. *Experimental Parasitology*. 100, 36-43.
- **Lacey, E.** (1988) The role of cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal of Parasitology*. 18, 885-936.
- **Lacey, E.** (1994) Biochemistry of benzimidazole resistance. *Acta Tropica*. 56:(7), 242-262.
- **Lilius, H.** Hastabacka, T., Isomaa, B. (1996). A combination of fluorescent probes for evaluation of cytotoxicity and toxic mechanism in isolates rainbow trout hepatocytes. *Toxicology in vitro*. 10, 341-348.
- **McConville, M.**, Brennan, G.P., MacCoy, M., Castillo, R., Hernandez-Campos, A., Ibarra, F., Fairweather, I. (2007) Immature triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: tegumental responses to *in vitro* treatment with the sulphoxide metabolite of the experimental fasciolicide compound alpha. *Parasitology research*. 100:2, 365-377.
- **McCracken, R.O., Lipkowitz, K.B.** (1990) Experimental and theoretical studies of albendazole, oxibendazole and tioxidazole. *Journal of Parasitology*. 76:2, 180-185.
- **Mckellar, Q.A.**, Jackson, F. (2004) Veterinary anthelmintics: old and new. *Trends in Parasitology*. 20:10 456-461
- **Meister, A.** (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *The Journal of Biological Chemistry*. 263:33, 17205-17208.
- **Meister, A.** (1994) Glutathione-Ascorbic acid antioxidant system in animals. *The Journal of Biological Chemistry*. 269:13, 9397-9400.
- **Palomares, F.**, Palencia, G. Pérez, R. González-Esquível, D. Castro, N. Jung Cook, H. (2004) *In vitro* Effects of Albendazole Sulfoxide and Praziquantel against *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* Cysts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48:6, 2302-2304.
- **Palomares, F.**, Palencia, G., Ambrosio, J.R., Ortiz, A., Jung-Cook, H. (2006) Evaluation of the efficacy of albendazole sulphoxide and praziquantel in combination on *Taenia crassiceps* cyst: *in vitro* studies. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 57:3, 482-488.
- **Palomares-Alonso, F.**, Piliado, J.C., Palencia, G., Ortiz-Plata, A., Jung-Cook, H. (2007) Efficacy of nitazoxanide, tizoxanide and tizoxanide/albendazole sulphoxide combination against *Taenia crassiceps* cyst. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 59:2, 212-218.
- **Parry-Smith, D.J.** (2003) Overview of bioinformatics and application in drug discovery. *Drugs against parasitic diseases: R&D methodologies and issues*. En WHO. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). 75-82
- **Ueha-Ishibashi T.** (2004). Property of thimerosal-induced decrease in cellular content of glutathione in rat thymocytes: a flow cytometric study with 5-chloromethylfluorescein diacetate. *Toxicology in Vitro*. 18:5, 563-569.

- **Vera-Montenegro, Y.**, Ibarra-Velarde, F. Liébana-Hernández, E., Quiroz-Romero, H., Castillo-Bocanegra, R., Hernández-Campos, A., Ochoa-Galván, P. (2003) Efficacy of an experimental fasciolicide against immature and mature *Fasciola hepatica* in artificially infected calves. *Parasitology Research*. 92:3, 211-214.
- **Wade, L.G.** (1993) *Química Orgánica*. 2ª ed. Prentice-Hall Hispanoamericana S.A. 99-105.
- **Wolstenholme, J.A.**, Fairweather, I., Prichard, R., Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N.C. (2004) Drug resistance in veterinary helminth. *Trends in Parasitology*. 20:10, 469-476.