

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

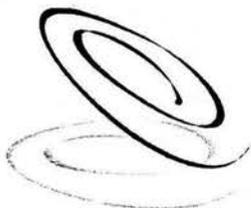
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE NITAZOXANIDA, TIZOXANIDA Y ANÁLOGOS  
ESTRUCTURALES DEL  
ALBENDAZOL COMO AGENTES CESTOCIDAS EN EL MODELO DE *Taenia crassiceps***

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.F.B. JUAN CARLOS PILIADO VELASCO



Posgrado  
**Ciencias  
Químicas**

TUTOR: HELGI HELEN JUNG COOK    AÑO: 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*A la*

**Dra Helgi Helen Jung Cook**

Le agradezco haberme brindado la oportunidad de trabajar con usted, su paciencia para la elaboración de este proyecto y su gran apoyo.

*A los compañeros del laboratorio de Neuropsicofarmacología:*

**Dinora González, Nelly Castro, Francisca Palomares, Araceli Salazar, Sergio Mares, Héctor y al Sr. Maurilio.**

A todos ustedes gracias por tolerarme, por darme la oportunidad de formar parte del laboratorio y por apoyarme incondicionalmente en los momentos que los necesite.

*A la jefa del laboratorio de Neuroinmunología:*

**Guadalupe Palencia y todo su equipo de trabajo.**

Gracias por brindarme un espacio y hacerme sentir como en casa.

*A*

**CONACYT**

Que me otorgó apoyo económico para la realización del proyecto.

Este trabajo se desarrolló en los laboratorios de Neuropsicofarmacología y Neuroinmunología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”

México, D.F.

## ÍNDICE

|  | Pág. |
|--|------|
| <b>I INTRODUCCIÓN</b>  | 1    |
| <b>II OBJETIVOS</b>  | 3    |
| <b>III HIPÓTESIS</b>   | 4    |
| <b>IV GENERALIDADES</b>  | 5    |
| 4.1 <i>Taenia solium</i>   |      |
| 4.1.1 Descripción biológica  | 5    |
| 4.1.2 Ciclo biológico  | 7    |
| 4.2 Cisticercosis  |      |
| 4.2.1 Neurocisticercosis   | 9    |
| 4.2.2 Tratamiento  | 10   |
| 4.2.3 La teneasis/cisticercosis como un problema<br>de salud pública                       | 11   |
| 4.3 <i>Taenia crassiceps</i> como modelo experimental de cisticercosis<br>humana y porcina |      |
| 4.3.1 Ciclo biológico  | 11   |
| 4.3.2 Semejanza de <i>Taenia crassiceps</i> con <i>Taenia solium</i>                       | 15   |
| 4.3.3 Evaluación <i>in vitro</i> de compuestos cestocidas                                  | 17   |
| 4.4 Compuestos bencimidazólicos  |      |
| 4.4.1 Mecanismo de acción  | 19   |
| 4.4.2 Series bencimidazólicas probadas   | 19   |
| 4.4.2.1 Serie CARB   | 20   |
| 4.4.2.2 Serie PVB  | 21   |
| 4.4.2.3 Serie FHL  | 22   |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.5 Nitazoxanida  |           |
| 4.5.1 Propiedades fisicoquímicas  | 24        |
| 4.5.2 Farmacocinética   | 25        |
| 4.5.2.1 Absorción   | 25        |
| 4.5.2.2 Distribución  | 25        |
| 4.5.2.3 Metabolismo   | 25        |
| 4.5.2.4 Eliminación   | 26        |
| 4.5.3 Propiedades farmacológicas  | 26        |
| 4.5.4 Mecanismo de acción   | 28        |
| 4.5.5 Efectos adversos  | 28        |
| <b>V DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>  | <b>30</b> |
| 5.1 Generalidades   |           |
| 5.1.1 Disolventes y reactivos   | 30        |
| 5.1.2 Material y equipo experimental  | 30        |
| 5.1.3 Material biológico  | 31        |
| 5.1.4 Fármacos y compuestos   | 31        |
| 5.2 Metodología   |           |
| 5.2.1 Obtención de cisticercos  | 32        |
| 5.2.2 Medio de cultivo  | 32        |
| 5.2.3 Preparación de soluciones   |           |
| 5.2.3.1 Solución de albendazol  | 33        |
| 5.2.3.2 Soluciones de compuestos bencimidazólicos   | 34        |
| 5.2.3.3 Soluciones de nitazoxanida y tizoxanida   | 35        |
| 5.2.3.4 Soluciones de blanco de disolventes   | 36        |
| 5.3 Evaluación del efecto cestocida <i>in vitro</i>   |           |
| 5.3.1 Prueba de exclusión de viabilidad con<br>Azul de Tripano  | 38        |
| 5.4 Determinación de la concentración efectiva 50 (CE <sub>50</sub> ) de<br>nitazoxanida y tizoxanida | 39        |

---

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| <b>VI</b>   | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>  | 40 |
|             | 6.1 Estudios <i>in vitro</i>   |    |
|             | 6.1.1 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto y mortalidad en el<br>modelo de <i>Taenia crassiceps</i> | 40 |
|             | 6.1.1.1 Albendazol (Control positivo)  | 40 |
|             | 6.1.1.2 Compuestos bencimidazólicos  | 42 |
|             | 6.1.1.3 Nitazoxanida y Tizoxanida  | 50 |
|             | 6.1.2 Curvas dosis-respuesta de nitazoxanida y tizoxanida  | 54 |
| <b>VII</b>  | <b>CONCLUSIONES</b>  | 57 |
| <b>VIII</b> | <b>BIBLIOGRAFÍA</b>  | 59 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   | Pág. |
|---|------|
| <b>Figura 1.</b> A: Excólex; B: proglótido; C: huevo de <i>T. solium</i> .  | 6    |
| <b>Figura 2.</b> Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>  | 8    |
| <b>Figura 3.</b> Ciclo de vida de <i>Taenia crassiceps</i>  | 12   |
| <b>Figura 4.</b> Ciclo de reproducción asexual de <i>T. crassiceps</i>  | 14   |
| <b>Figura 5.</b> Esquema de la membrana vesicular de un cisticerco  | 16   |
| <b>Figura 6.</b> Estructura del albendazol  | 18   |
| <b>Figura 7.</b> Estructuras químicas de la serie FHL   | 23   |
| <b>Figura 8.</b> Estructura química de la nitazoxanida  | 24   |
| <b>Figura 9.</b> Principales metabolitos de nitazoxanida  | 27   |
| <b>Figura 10.</b> Cisticercos de <i>T. crassiceps</i> bajo tratamiento de albendazol  | 41   |
| <b>Figura 11.</b> Cisticercos de <i>T. crassiceps</i> después de prueba de exclusión de viabilidad con Azul de Tripano                                      | 41   |
| <b>Figura 12.</b> Estructuras químicas CARB-4 y CARB-7  | 44   |
| <b>Figura 13.</b> Estructuras químicas PVB-Lc y PVB-Ld  | 45   |
| <b>Figura 14.</b> Estructuras químicas FHL-13 y FHL-15  | 47   |
| <b>Figura 15.</b> Estructuras químicas FHL-18 y FHL-19  | 48   |
| <b>Figura 16.</b> Estructura química CARB-1 y FHL-19  | 49   |
| <b>Figura 17.</b> Cisticercos de <i>T. crassiceps</i> bajo tratamiento de nitazoxanida y tizoxanida   | 50   |
| <b>Figura 18.</b> Porcentaje de mortalidad de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> bajo tratamiento de albendazol, nitazoxanida y tizoxanida (0.942 $\mu$ M) | 52   |
| <b>Figura 19.</b> Porcentaje de mortalidad de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> bajo tratamiento de albendazol, nitazoxanida y tizoxanida (9.42 $\mu$ M)  | 53   |
| <b>Figura 20.</b> Curvas dosis-respuesta de nitazoxanida y tizoxanida   | 55   |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  | Pág. |
|--|------|
| <b>Tabla I.</b> Estructuras de la serie CARB   | 20   |
| <b>Tabla II.</b> Estructuras de la serie PVB   | 21   |
| <b>Tabla III</b> Concentraciones de nitazoxanida y tizoxanida para<br>construir la curva dosis-respuesta de cada compuesto                     | 39   |
| <b>Tabla IV.</b> Porcentajes de mortalidad de cisticercos de <i>T. crassiceps</i><br>después de tratamiento los compuestos bencimidazólicos    | 43   |
| <b>Tabla V.</b> Porcentajes de mortalidad de cisticercos de <i>T. crassiceps</i><br>después del tratamiento con nitazoxanida y tizoxanida      | 51   |
| <b>Tabla VI.</b> Porcentajes de mortalidad de cisticercos de <i>T. crassiceps</i><br>en las curvas dosis-respuesta                             | 54   |
| <b>Tabla VII.</b> CE <sub>50</sub> de albendazol, sulfóxido de albendazol,<br>nitazoxanida y tizoxanida en cisticercos de <i>T. crassiceps</i> | 56   |

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Esquema 1.</b> Preparación de la solución de albendazol en medio de cultivo                               | 33 |
| <b>Esquema 2.</b> Diagrama de diluciones realizadas para la evaluación<br>de los compuestos bencimidazólicos | 34 |
| <b>Esquema 3.</b> Diagrama de diluciones realizadas para la evaluación<br>de nitazoxanida y tizoxanida       | 35 |

## I. INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades parasitarias a la que se enfrenta la población mexicana con una alta incidencia, mayor que la reportada en otros países de Latinoamérica, es la cisticercosis.<sup>1</sup> La prevalencia de cisticercosis en México es de 1 por cada 166,666 sujetos y cada año se reporta un promedio de 500 nuevos casos.<sup>2</sup> Por esta razón, la Secretaría de Salud en México cataloga la cisticercosis como un problema de salud pública.

El estudio y la comprensión de la cisticercosis son relativamente nuevos, considerando que se tienen registros de esta enfermedad de más de 2000 años de antigüedad.<sup>3</sup> En general, en el mundo entero, la investigación para la búsqueda de fármacos cestocidas no lleva más de 30 años. En México, los primeros estudios epidemiológicos de la enfermedad se dan en la década de 1970.

La cisticercosis es una enfermedad muy compleja, cuya manifestación depende del lugar en que se aloje el parásito y si el parásito está en forma activa o inactiva.<sup>4</sup> Cuando el cisticerco se alberga en el sistema nervioso (neurocisticercosis) puede, o no existir una sintomatología y cuando la hay, ésta depende del número de quistes, su tamaño, su localización y la respuesta inflamatoria que despiertan.

El tratamiento que actualmente se ofrece para la neurocisticercosis, cuando hay una forma activa, consiste en: uso de fármacos cestocidas, uso de analgésicos para la disminución de la inflamación, uso de fármacos sintomáticos, procedimientos quirúrgicos tanto para la derivación de líquido cefalorraquídeo, como para la extracción de parásitos.<sup>3</sup> Los fármacos cestocidas con los que actualmente se cuenta para el tratamiento de esta enfermedad son el prazicuantel y el albendazol.<sup>5</sup> Sin embargo, ninguno de los dos son cien por ciento de efectivos.

Con base en lo anteriormente mencionado, se hace necesario contribuir a la solución de un problema de salud pública importante, tanto a través de programas preventivos, como a través de la búsqueda de nuevas moléculas con actividad cestocida.

En este proyecto se evaluaron catorce nuevos compuestos bencimidazólicos en fase experimental, sintetizados en la Facultad de Química de la UNAM, y que han presentado actividad antiparasitaria contra *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* y contra el helminto *Trichinella spiralis*.<sup>6</sup>

Así mismo, se evaluó un fármaco con reconocida actividad antiparasitaria, catalogado como de amplio espectro y de reciente introducción al mercado: la nitazoxanida. Se decidió también evaluar a su metabolito Tizoxanida, ya que éste es el principal compuesto encontrado en plasma después de su administración y el cual presenta actividad antiparasitaria.<sup>7</sup>

## II. OBJETIVOS

- ◆ Determinar la actividad cestocida *in vitro* de catorce compuestos bencimidazólicos utilizando el modelo de *Taenia crassiceps*.
- ◆ Hacer un análisis acerca de la relación estructura-actividad que presentan los catorce compuestos bencimidazólicos en el modelo de *Taenia crassiceps*.
- ◆ Determinar la actividad cestocida *in vitro* de la nitazoxanida y su metabolito activo utilizando el modelo de *Taenia crassiceps*.
- ◆ Determinar la potencia de los compuestos que presenten actividad cestocida.

### III. HIPÓTESIS

Los catorce nuevos compuestos bencimidazólicos, así como la nitazoxanida y su metabolito activo tizoxanida presentarán efecto cestocida *in vitro* en el modelo de *Taenia crassiceps*.

## IV. GENERALIDADES

### 4.1 *Taenia solium*

#### 4.1.1 Descripción biológica

El cestodo de *Taenia solium* es un parásito capaz de desarrollar dos formas de enfermedad en el ser humano, éstas dependen de la fase de crecimiento del parásito que infecta al huésped: la forma adulta o solitaria causa teniasis y la forma larvaria o cisticerco causa cisticercosis.<sup>8</sup> En fase adulta es un gusano plano y segmentado, el cual se nutre por medio de su membrana, por lo que no cuenta con un aparato digestivo como tal; puede llegar a medir hasta 8 metros de longitud. La cabeza o excólex de forma globular de 1 mm de diámetro cuenta con un rostelo con doble corona de ganchos (22 a 32 ganchos) y cuatro ventosas con los que se fija. Al ser la tenia una hermafrodita, su cuerpo o estróbila es una cadena de cientos de proglótidos que contiene órganos sexuales desarrollados. Los proglótidos más cercanos al cuello están inmaduros e indiferenciados, mientras que los más distantes están totalmente diferenciados y contienen una gran cantidad de huevecillos esferoides (~50000 c/u) que miden de 10 a 12  $\mu\text{m}$  de diámetro, por lo que se dice que se encuentran grávidos. La fase larvaria es una pequeña vesícula de membranas translúcidas, de forma ovoide, que mide de 8 a 12 mm por 4 a 8 mm. Dentro de la vesícula se puede encontrar un punto blanco que corresponde al escólex invaginado y está llena de líquido<sup>9-10</sup> (Figura 1).

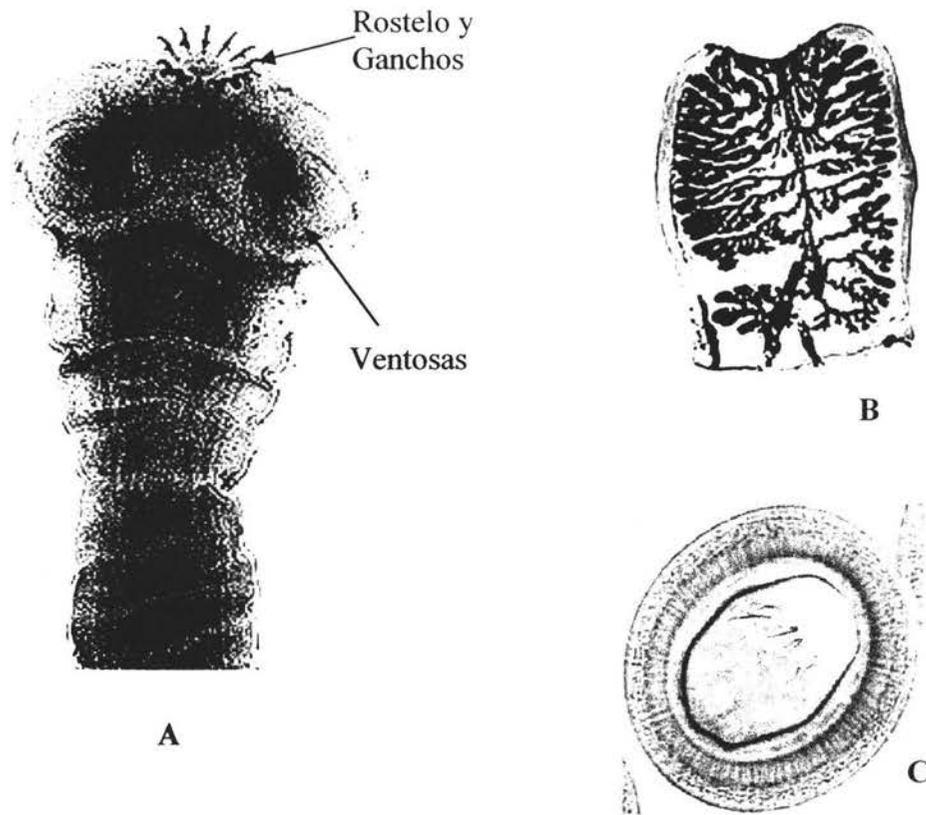


Figura 1. A: excólex; B: proglótido; C: huevo de *T. solium*.

#### 4.1.2 Ciclo biológico

El único huésped definitivo natural de la *T. solium* es el ser humano y la prevalencia de la teniasis /cisticercosis depende exclusivamente del vínculo que el hombre establece con los animales y en particular con el cerdo, (Figura 2).

En condiciones naturales, la *T. solium* habita solamente dentro del intestino delgado del ser humano, por lo regular sólo se encuentra una sola tenia, la cual puede llegar a vivir hasta 25 años. Cada 4 ó 5 días, que es el tiempo que tardan en madurar los proglótidos, se desprenden de forma espontánea y son evacuados hacia el exterior en la materia fecal del huésped. La primera expulsión de proglótido de la *T. solium* generalmente ocurre entre 62 y 72 días después de la infección.

La putrefacción de los proglótidos grávidos en el medio ambiente permite la liberación de los huevecillos que pueden alcanzar al cerdo, el huésped intermediario natural por distintos medios. Generalmente, se acepta que los huevecillos se adquieren al ingerir alimentos y líquidos contaminados, aunque es posible que existan otros mecanismos de transmisión.

En el tubo digestivo del huésped intermediario las enzimas proteolíticas y las sales biliares proveen la señal para la activación de la oncosfera (embrión de tenia) contenida en el huevecillo. Una vez activadas, las oncosferas penetran la pared intestinal del huésped hasta alcanzar los capilares linfáticos y sanguíneos que las distribuyen a una variedad de órganos y tejidos.

El ciclo se cierra cuando el ser humano ingiere carne insuficientemente cocida proveniente de un cerdo con cisticercosis. De esta forma, las enzimas gástricas e intestinales, así como las sales biliares, activan al cisticerco para que se fije en la pared intestinal donde crece y se diferencia hasta convertirse en un adulto productor de proglótidos grávidos.<sup>8,11-13</sup>

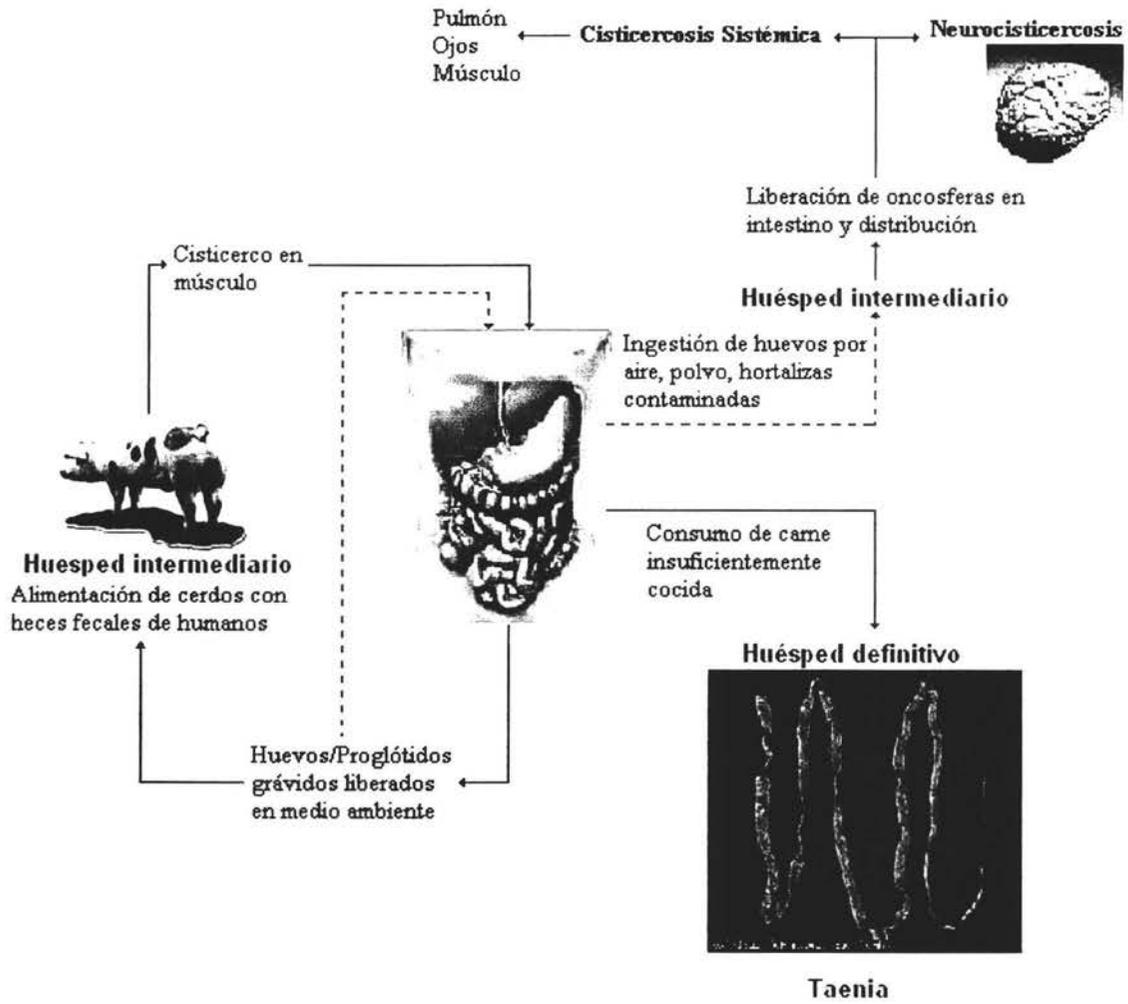


Figura 2. Ciclo de vida de *Taenia solium*

## 4.2 Cisticercosis

La cisticercosis afecta prácticamente cualquier tejido del huésped intermediario. Cuando se aloja en los ventrículos cerebrales o en el espacio subaracnoideo, el cisticerco puede medir de 3 a 6 cm de longitud, mientras que cuando se localiza en el parénquima cerebral o en el músculo mide aproximadamente 0.5cm de longitud. Las manifestaciones clínicas dependen del número y localización de los cisticercos y de la extensión y la severidad de la respuesta inflamatoria del huésped.<sup>14</sup>

### 4.2.1 Neurocisticercosis

La neurocisticercosis es una enfermedad causada por la presencia de larvas de *T. solium* en el sistema nervioso central (SNC). La neurocisticercosis puede adoptar distintas formas según la región del SNC en el que se aloje el parásito, el grado y tipo de la inflamación del tejido del huésped, las estructuras neurales afectadas y las consecuencias anatómicas y fisiopatológicas que provoca la presencia del parásito en el huésped. Las manifestaciones clínicas son amplias, que van desde sintomáticas hasta cuadros neurológicos graves. La epilepsia es la manifestación clínica más frecuente de la neurocisticercosis, se observa en 50 al 80 % de los casos.<sup>15</sup>

#### 4.2.2 Tratamiento

El tratamiento de la neurocisticercosis depende del estado en que se encuentre el cisticerco. Si se encuentra viable, el tratamiento farmacológico es exitoso. Si se encuentra no viable, como granuloma o calcificación, el tratamiento es innecesario y se recomienda, en caso de haber alguna sintomatología, el uso de antiepilépticos y glucocorticoides.

En la forma activa se utilizan fármacos cestocidas. En la actualidad sólo existen dos fármacos que han probado una actividad exitosa, ellos son el prazicuantel (PZQ) y el albendazol (ALB).<sup>16</sup>

#### 4.2.3 La teniasis/cisticercosis como un problema de salud pública.

La teniasis y cisticercosis producidas por *Taenia solium* son un problema de salud pública importante en varios países en desarrollo de África, América Latina y Asia.

Reportes sobre la frecuencia de teniasis intestinal en México señalan que el 0.2 al 3.4 % de la población está infectada, lo que da una incidencia de 3.8 por cada 100,000 habitantes. En tanto que la cisticercosis comprende cifras más bajas, aunque no por eso deja de ser alarmante. Se habla de que en promedio aparecen 500 nuevos casos de cisticercosis cada año, lo que da una incidencia poblacional de 0.6 por 100,000 habitantes. Estos datos son una estimación de la incidencia de cisticercosis, ya que no se toman en cuenta a las poblaciones rurales en los que el diagnóstico no existe.

El estudio epidemiológico de la teniasis/cisticercosis en México inicia con informes de necropsias y casos observados en servicios neurológicos. En la década de 1970, los estudios epidemiológicos se dirigían hacia la prevalencia de *T. solium*. En la década de 1980 se buscaban los factores de transmisión y el desarrollo de métodos estandarizados para el diagnóstico. Finalmente, en 1990 se iniciaron estudios que ofrecían estrategias para el control de la teniasis/cisticercosis.<sup>2</sup>

### **4.3 *Taenia crassiceps* como modelo experimental de cisticercosis humana y porcina.**

La cisticercosis encontrada en el huésped intermediario natural de la *Taenia solium*, el cerdo, es el modelo ideal para el estudio de esta enfermedad, así como para el estudio de factores que determinan la sobrevivencia o muerte del parásito desde un punto de vista biológico y farmacológico. Debido a la dificultad en el manejo de este modelo y al elevado costo que implica su manutención, el modelo experimental natural es poco utilizado en estudios experimentales. Por tal motivo desde hace varios años se utiliza una alternativa, la cual ha demostrado ser más práctica y útil en la búsqueda de resultados que se asemejen al modelo natural.

La alternativa utilizada es la cisticercosis murina, causada por la *Taenia crassiceps*.

#### **4.3.1 Ciclo biológico**

En condiciones naturales, el ciclo de vida de la *T. crassiceps*, requiere al zorro como huésped definitivo de la *Taenia* adulta y a pequeños roedores como huéspedes intermediarios (Figura 3).

La *T. crassiceps* habita solamente dentro del intestino delgado del zorro; cuarenta días después de la fijación del metacéstodo en el intestino, la estructura de la *Taenia* está conformada en su totalidad. En la parte final de la tenia adulta se ubican los proglótidos, donde se producen los huevos. La primera expulsión de los segmentos de proglótidos maduros de la *T. crassiceps* con huevecillos ocurre alrededor de los dos meses después de la infección en las heces fecales.

Los proglótidos grávidos liberan los huevecillos en el medio ambiente, alcanzan por distintos medios al roedor, el huésped intermediario natural. Los huevecillos se adquieren al ingerir alimentos y líquidos contaminados.

Un vez en el tubo digestivo del huésped intermediario, las enzimas proteolíticas y las sales biliares proveen la señal para la activación de la oncosfera (embrión de tenia) contenida en el huevecillo.

Las oncosferas activadas penetran la pared intestinal del huésped hasta alcanzar los capilares linfáticos y sanguíneos que las distribuyen a órganos y tejidos.

El ciclo se cierra cuando el zorro ingiere roedores con cisticercosis.<sup>17</sup>

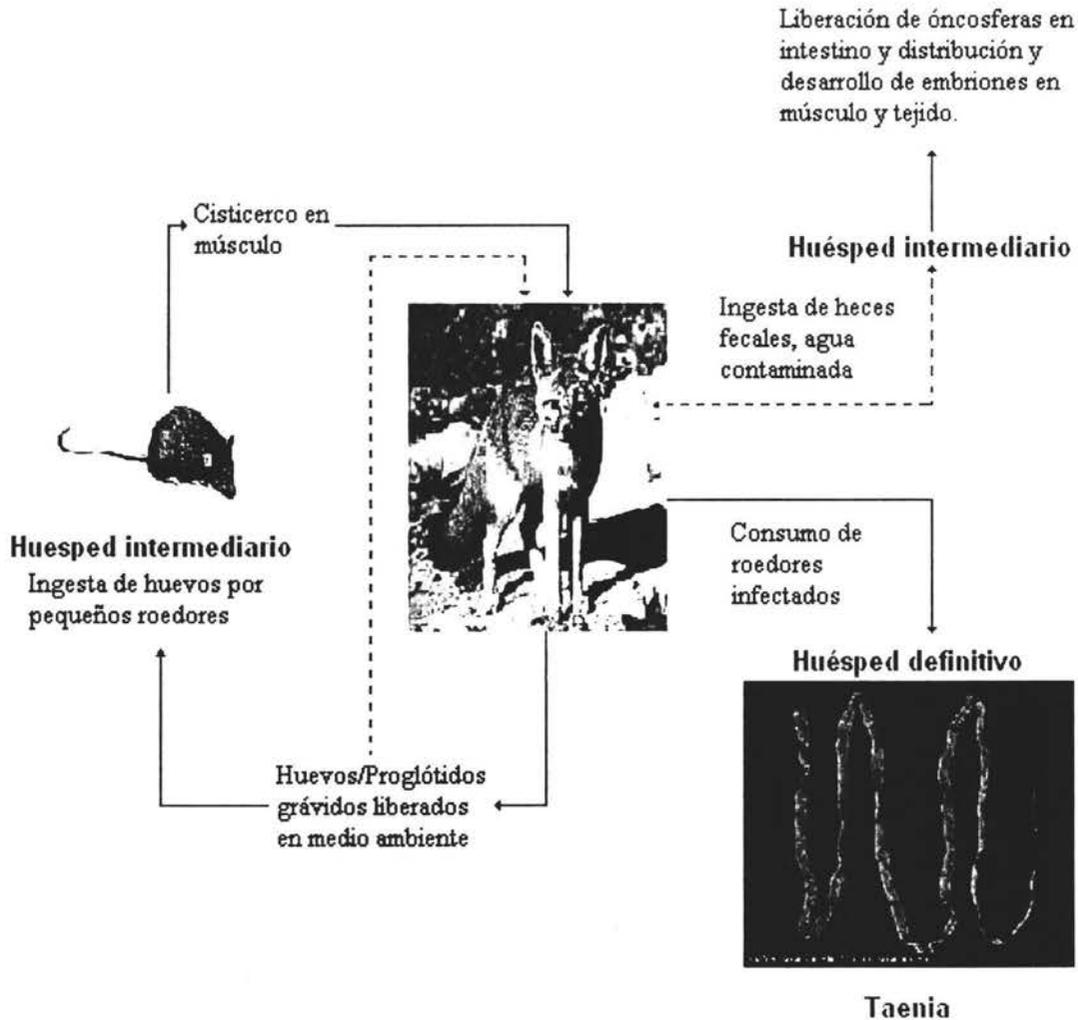


Figura 3. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*

El uso de *T. crassiceps* ofrece varias ventajas tanto en el manejo como en la reproducibilidad de los experimentos, gracias a que la reproducción de esta taenia puede ser de manera asexual por gemación cuando se encuentra en la cavidad peritoneal de diferentes especies de roedores (Figura 4).

### **Ciclo asexual de *T. crassiceps***

En la cavidad peritoneal, el metacestodo desarrolla pequeños brotes exógenos, los cuales se diferencian por el aparente alargamiento de las estructuras del mismo; así por la cuarta semana de infección algunos brotes se han despegado de la madre, formando nuevos cisticercos.

La mayoría de los brotes con un surco indistinguible son metacéstodos jóvenes, que se desprenden mientras tienen 2 mm de diámetro. El cisticerco adulto frecuentemente mide más de 5 por 3 mm en tamaño y presenta un desarrollo total del escólex por la quinta semana. En infecciones a largo plazo el cisticerco puede medir más de 11 por 6 mm.<sup>18</sup>

Debido a que los cisticercos de *T. crassiceps* se mantienen y reproducen fácilmente en el peritoneo de ratones, se permite controlar el número de parásitos que se necesitan para la experimentación y homogenizar la edad de los parásitos cuando se establece la fecha de inoculación; así mismo se pueden utilizar diferentes cepas de cisticercos, las cuales ofrecen diferentes características, tanto anatómicas como de desarrollo, lo que permite adecuar el tipo de cisticerco al tipo de experimento. En cuanto al huésped, se utiliza sólo una variedad de ratón por lo que la composición genética del huésped es homogénea, su manejo no es difícil y el costo de manutención no es elevado, lo que disminuye trabajo y costos en la investigación.

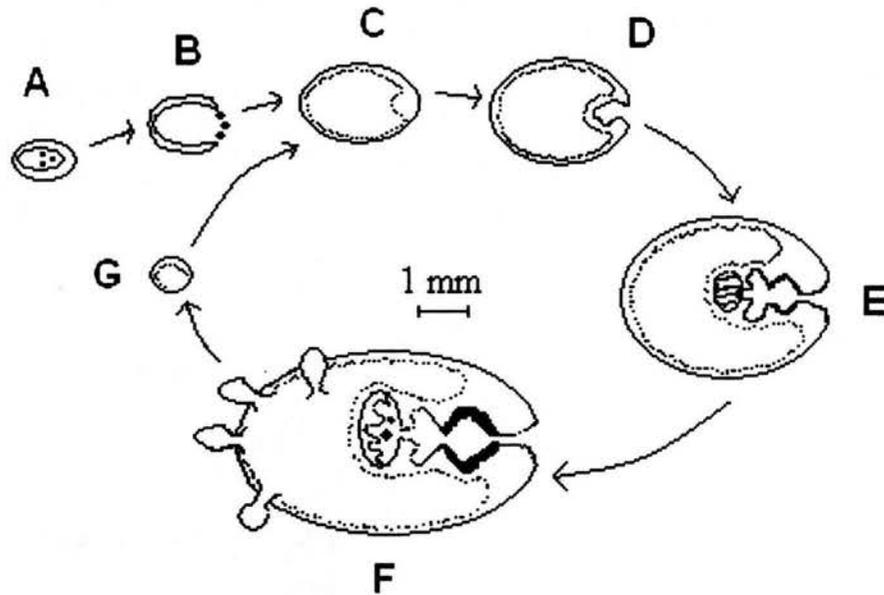


Figura 4. Ciclo de reproducción asexual de *T. crassiceps*. A: huevo, B: oncosfera libre del caparazón, C: gema temprana, D: gema con excólex y canal invaginado, E: cisticerco típico, F: cisticerco madre con gemas, G: gema hija que continua el ciclo.

Este proyecto utiliza la *Taenia crassiceps* cepa ORF, la cual se caracteriza por ser una estructura puramente vesiculares y no evaginan al no contar con el excólex, permitiendo trabajar con los cisticercos, por periodos más largos de tiempo en la experimentación *in vitro*; así mismo, el desarrollo de esta cepa es relativamente rápida si se compara con otras, como la W, lo que permite tener cantidades suficientes de cisticercos en periodos cortos de tiempo.<sup>19,20</sup>

#### 4.3.2 Semejanza de *Taenia crassiceps* con *Taenia solium*

A pesar de la existencia de una gran variedad de cestodos (cisticercos, cisticercoides, plerocercoides, etc.), ello no implica que la citoarquitectura sea igual de variada.<sup>21</sup> Los cisticercos de *T. crassiceps* son más pequeños que los de *T. solium*, pero tienen un gran parecido anatómico, especialmente en la membrana vesicular. Si se observaran las membranas vesiculares de ambos cisticercos, varias serían las estructuras similares, la capa más externa es un tegumento sincicial y continuo en toda la superficie, el cual presenta una membrana plasmática externa plegada en microtricas (similar a las microvellosidades de los ribetes de cepillo); la membrana que delimita el tegumento sincicial hacia el interior es la lámina basal, bajo la cual se encuentra una capa muscular en la que se observan algunas estructuras celulares como células flama y depósitos de glucógeno y lípidos,<sup>22</sup> (Figura 5).

La proporción de los principales constituyentes como: proteínas, lípidos y carbohidratos (en forma de glucógeno en su mayoría), es semejante entre las dos especies. En ambas especies el contenido de carbohidratos tiende a ser alto mientras que la proporción de proteínas es relativamente baja.<sup>23</sup>

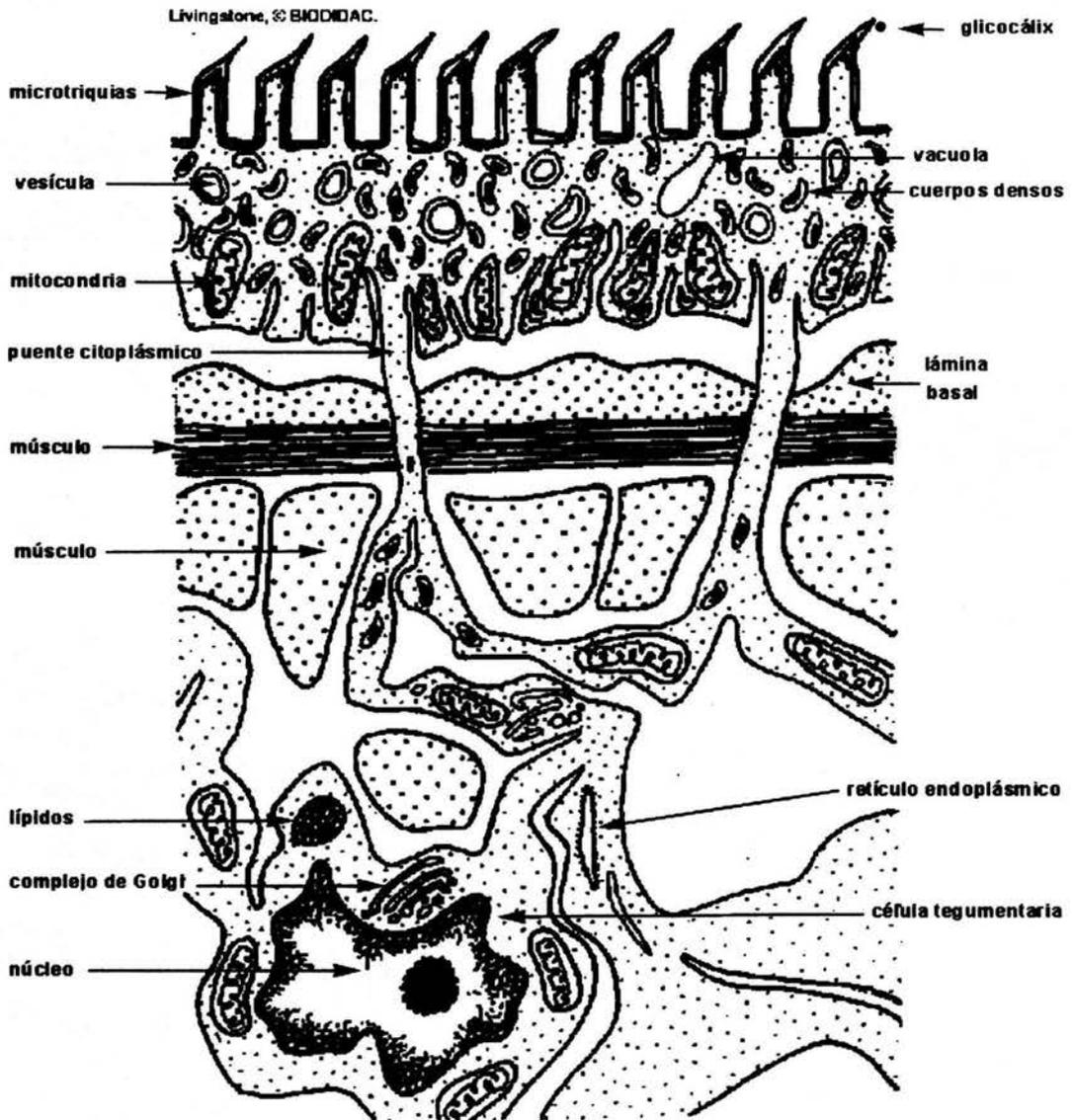


Figura 5. Esquema de la membrana vesicular de un cisticerco.<sup>24</sup>

En un estudio realizado en el laboratorio de neuropsicofarmacología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, se encontró que existe una relación lineal entre los datos de mortalidad de ambas especies, con una pendiente de 1.36, lo cual indica que *T. crassiceps* puede ser usado como un modelo confiable para evaluar el efecto *in vitro* de fármacos cestocidas<sup>25</sup>.

### **4.3.3 Evaluación *in vitro* de compuestos cestocidas**

La técnica utilizada en este proyecto para la manutención de cisticercos *in vitro* fue desarrollada en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, “Dr. Manuel Velasco Suárez”, en el 2002.<sup>26</sup> Para los fines de este proyecto dicha técnica permitió llevar a cabo la evaluación de nueva moléculas con posible actividad cestocida sobre el modelo de *T. crassiceps*.

#### 4.4 Compuestos bencimidazólicos

Los compuestos bencimidazólicos surgen desde el descubrimiento del tiabendazol por Brown y col., 1961.<sup>27</sup> De ahí en adelante se desarrollaron varios derivados bencimidazólicos para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales causadas por parásitos, tanto en animales como en humanos. Entre los compuestos bencimidazólicos desarrollados en las últimas tres décadas para el tratamiento de enfermedades causadas por helmintos se encuentran el ALB, fenbendazol, flubendazol y mebendazol.

Cabe mencionar que el amplio uso antihelmíntico de los compuestos BZ en animales ha conducido en algunas ocasiones al desarrollo de resistencia a los agentes terapéuticos.<sup>28,29</sup>

El bencimidazol (BZ) de elección utilizado para el tratamiento de la cisticercosis es el ALB, el cual ha demostrado ser efectivo contra el céstodo *T. solium*. El ALB presenta problemas para llegar a nivel sistémico, debido a su baja solubilidad en medios acuosos, por la presencia del carbamato de metilo en la posición 2 (Figura 6), que conduce a una baja absorción y por tanto a una alta variabilidad de niveles plasmáticos.<sup>30,31</sup>

La eficacia, el bajo costo y su fácil administración, hacen de este BZ, un fármaco de primera elección para enfermedades producidas por protozoarios y/o helmintos,<sup>32</sup> lo que facilita su uso a gran escala en humanos y aumenta también la probabilidad de resistencia de los organismos hacia este fármaco.

Considerando que en la actualidad sólo existen dos fármacos efectivos para el tratamiento de la neurocisticercosis, es de gran importancia llevar a cabo la búsqueda de nuevas moléculas.

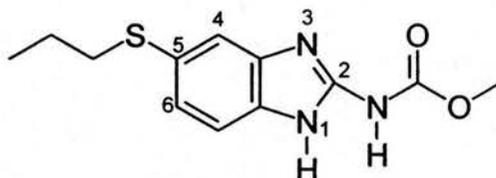


Figura 6. Estructura química del ALB, se muestra la numeración del anillo bencimidazólico.

En la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de cisticercosis y en específico de la neurocisticercosis; en la Facultad de Química de la UNAM, se ha trabajado en la síntesis de nuevos compuestos bencimidazólicos, que en base a su estructura química sean más solubles en medios acuosos, para así evitar la gran variabilidad presentada por el albendazol.

#### 4.4.1 Mecanismo de acción de compuestos bencimidazólicos.

La acción antihelmintica de los BZ es debida a la inhibición de la captación de glucosa por los parásitos,<sup>33</sup> los compuestos bencimidazólicos desbaratan los microtúbulos por medio de la inhibición de la polimerización de la tubulina dentro de los microtúbulos, siendo la  $\beta$ -tubulina la molécula blanco de los compuestos bencimidazólicos.<sup>34,35</sup> La actividad selectiva de los BZ contra el parásito, se debe a la alta afinidad de los BZ a la tubulina del parásito más que a la del huésped.<sup>36</sup> Así, se produce la inmovilización del parásito y su muerte ocurre lentamente.

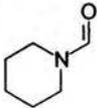
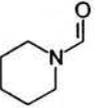
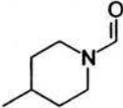
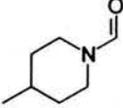
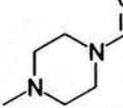
#### 4.4.2 Series bencimidazólicas probadas.

Los catorce nuevos compuestos BZ que se evaluaron en el modelo de *T. crassiceps*, son parte de la línea de investigación sobre el diseño de fármacos que lleva a cabo el grupo del Dr. Castillo Bocanegra del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM, los compuestos fueron diseñados factorialmente y se eligieron en base a la eficacia que han presentado contra algunas especies de protozoarios como *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* y contra el helminto *Trichinella spiralis*.<sup>6</sup> Los catorce compuestos evaluados se dividieron en tres series (CARB, PVB, FHL) y permitieron hacer un estudio exploratorio acerca de la influencia que presentan diferentes grupos funcionales en el anillo bencimidazólico y su actividad sobre el modelo de *T. crassiceps*.

## 4.4.2.1 Serie CARB

La serie CARB consta de 5 análogos estructurales CARB-1, CARB-2, CARB-3, CARB-4 y CARB-7. Las características estructurales de esta serie son: en la posición 1 se mantiene el hidrógeno, que ha demostrado ser indispensable para presentar una actividad antihelmíntica óptima;<sup>34</sup> en la posición 2, la serie contiene un grupo metiltio, que aumenta la liposolubilidad y el cual ha demostrado no bajar la actividad de compuestos en protozoarios como *G. lamblia* y *E. histolytica*, e incluso ha reducido el % de viabilidad del helminto *T. spiralis*;<sup>6</sup> en la posición 5 se introdujeron diferentes carboxamidas, donde el nitrógeno forma parte de un ciclo de seis átomos. Se espera una relación directa entre la voluminosidad de la carboxamida con un aumento o disminución de la actividad. En dos compuestos se introdujo un átomo de cloro, para observar como influye un elemento electronegativo en la actividad (Tabla I).

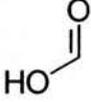
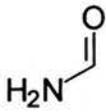
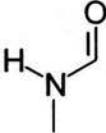
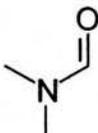
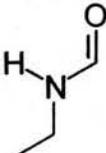
Tabla I. Estructuras de la serie CARB

| Compuesto | R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub> |
|-----------|---|----------------|
| CARB-1    |  | H              |
| CARB-2    |  | Cl             |
| CARB-3    |  | H              |
| CARB-4    |  | Cl             |
| CARB-7    |  | H              |

## 4.4.2.2 Serie PVB

La serie PVB consta también de 5 análogos estructurales PVB-K, PVB-La, PVB-Lb, PVB-Lc y PVB-Ld. Las características principales de esta serie son: el hidrógeno en la posición 1; un grupo metiltio en la posición 2. En la posición 5 se introdujo un ácido carboxílico para el compuesto PVB-K y carboxamidas para los demás compuestos de las series que varían en el número de metilos presentes en ellas, se tiene por tanto grupos donadores de electrones. Se espera una relación directa entre la voluminosidad de la carboxamida con un aumento o disminución de la actividad, (Tabla II).

Tabla II. Estructuras de la serie PVB

| Compuesto | R <sub>1</sub>  |
|-----------|---|
| PVB-k     |  |
| PVB-La    |  |
| PVB-Lb    |  |
| PVB-Lc    |  |
| PVB-Ld    |  |

#### 4.4.2.3 Serie FHL

La serie FHL consta de 4 compuestos análogos estructurales al albendazol FHL-13, FHL-15, FHL-18 y FHL-19, las características estructurales de esta serie se mencionan a continuación (Figura 7):

- ◆ FHL-13

Este compuesto es casi idéntico al ALB, la única diferencia radica en la presencia de un grupo metilo en la posición 1 del anillo bencimidazólico en lugar del hidrógeno. El objetivo de evaluar esta estructura es determinar si la presencia del hidrógeno es indispensable para mantener la actividad antihelmíntica en el modelo de *T. crassiceps*.

- ◆ FHL-15

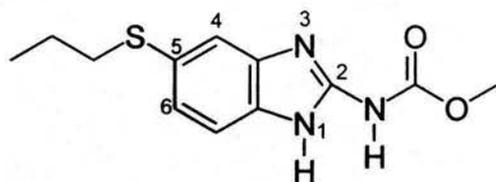
Este compuesto al igual que el FHL-13, es casi idéntico al ALB, la diferencia radica en la presencia de un grupo metilo en el nitrógeno del carbamato de metilo presente en la posición 2 del anillo bencimidazólico. La intención del cambio es determinar si la presencia del hidrógeno es indispensable para mantener la actividad antihelmíntica en el modelo de *T. crassiceps*.

- ◆ FHL-18

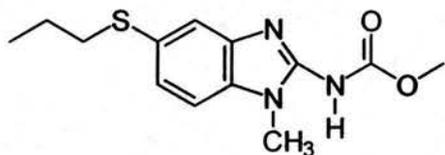
Este compuesto es diferente al ALB por la presencia del sustituyente en la posición 5, el radical tiene la característica de ser voluminoso, además de contener un grupo nitro.

● FHL-19

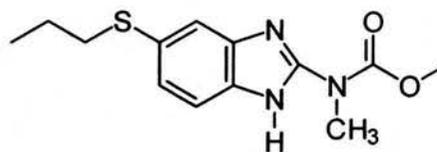
Este compuesto, al igual que el FHL-18, guarda la diferencia en la carboxamida presente en la posición 5 del anillo bencimidazólico. El objetivo de evaluar esta estructura fue por principio observar la efectividad en el modelo de *T. crassiceps* y después hacer una comparación del resultado obtenido con el del compuesto de la serie CARB-1 y observar que tanto afecta en la actividad, la presencia de un grupo carbamato de metilo o metiltio en la posición 2 del anillo bencimidazólico.



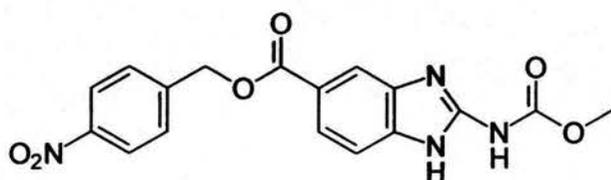
ALB



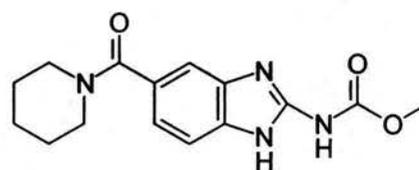
FHL-13



FHL-15



FHL-18



FHL-19

Figura 7. Estructuras químicas de la serie FHL, se muestra además la estructura del ALB con la respectiva numeración del anillo bencimidazólico.

## 4.5 Nitazoxanida

La nitazoxanida (NTZ) es un agente antimicrobiano de amplio espectro con actividad contra protozoarios, nematodos, cestodos, trematodos y bacterias anaerobias.<sup>7</sup>

### 4.5.1 Propiedades Fisicoquímicas

Nombre químico: 2-acetiloxi-*N*-(5-nitro-2-tiazolil)benzamida.

Nombres comerciales: Alinia, Daxon.

Fórmula condensada: C<sub>12</sub> H<sub>9</sub> N<sub>3</sub> O<sub>5</sub> S

Fórmula estructural:

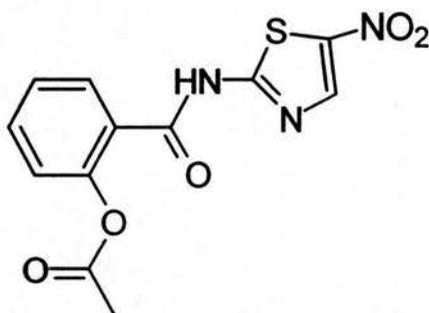


Figura 8. Estructura química de nitazoxanida

Peso Molecular: 307.3

Apariencia: Polvo amarillo amorfo

Solubilidad: muy poco soluble en agua, poco soluble en etanol, ligeramente soluble en acetona y soluble en dimetilsulfóxido.

Punto de fusión: entre 202 y 204°C

Estabilidad: estable a temperatura ambiente, estable a temperatura de 4°C por al menos 8 días en solución de DMSO, acetonitrilo y acetona.

## 4.5.2 Farmacocinética

### 4.5.2.1 Absorción

Después de una dosis oral de [<sup>14</sup>C] Nitazoxanida 500 mg en humanos, 32% de la radioactividad fue recobrada en orina y 66% en las heces, indicando una absorción significativa en el tracto gastrointestinal. La administración con alimentos incrementa claramente la biodisponibilidad de los dos metabolitos activos la Tizoxanida (TIZ) y el Glucuronido de Tizoxanida (TIZG) aunque la velocidad de absorción disminuye, así mismo los niveles plasmáticos de TIZ y TIZG incrementan linealmente en proporción a dosis de 1 – 3 g.<sup>37</sup> La velocidad de absorción no se ve afectada por administraciones repetidas,<sup>38</sup> (Figura 9).

### 4.5.2.2 Distribución

Una vez absorbida en el hombre, la NTZ se hidroliza al metabolito activo tizoxanida (TIZ). Estudios de unión a proteínas demostraron que la tizoxanida se une extensamente >97.5 % a proteínas plasmáticas.<sup>39</sup>

### 4.5.2.3 Metabolismo

La NTZ se metaboliza extensamente, es rápidamente hidrolizada por acetilesterasas de las paredes del intestino y el hígado, así como por esterases plasmáticas formando el metabolito activo TIZ<sup>39</sup>; adicionalmente, la TIZ al presentar un grupo nucleofílico alcohol sigue una segunda fase de metabolización, es sustrato para la enzima uridin difosfato-glucuronosiltransferasa (UTG) que le transfiere un grupo glucuronilo desde el ácido uridin-5-difosfo- $\alpha$ -D-glucurónico (UDP-GA) dando como resultado el segundo metabolito activo, el TIZG. Así mismo, la TIZ se metaboliza conjugándose con sulfato para dar otro metabolito, el sulfato de TIZ<sup>40</sup>.

#### 4.5.2.4 Eliminación

La TIZ se excreta principalmente en heces y sólo el 5.4 % de la dosis se excreta en orina. El glucurónido de TIZ y el sulfato de TIZ se excretan en orina, así como el sulfato de TIZ-hidroxilado, ácido salicílico y aminonitrotiazol, estos dos últimos en un 2.8 y 0.1% de la dosis, respectivamente.

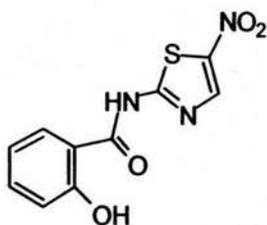
Se determinó que la vida media en plasma de la TIZ en pacientes sanos varía de entre 1.03 y 1.6 h,(Figura 9).

#### 4.5.3 Propiedades farmacológicas

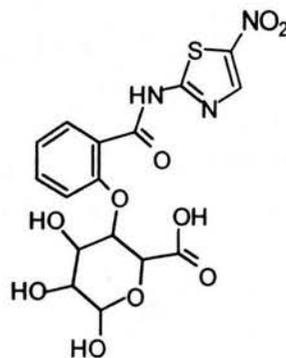
El primer reporte de NTZ se da en 1976 con la síntesis y la publicación del 100 % de efectividad contra *Hymenolepis nana* var. *fraterna* en ratón, con fines veterinarios por Rossignol y Cavier. En 1984 se describe por primera vez su uso en humanos como fármaco cestocida el cual fue efectivo en una dosis sencilla contra *Taenia saginata* y *Hymenolepis nana*.<sup>41</sup>

A partir de 1994, han habido varios reportes de estudios pre-clínicos y clínicos que evalúan la actividad de NTZ contra una gran variedad de protozoarios, cestodos, trematodos, nematodos y bacterias que infectan el tracto gastrointestinal, a continuación se mencionan *Dipylidium caninum*, *Taenia psiformis*, en perros; *Taenia taeniaformis* en gatos, *Moniezia expansa*, *Avitellina centripunctata*, *Stilesia globipunctata* y *Thysaniezia ovilla* en ovejás; *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Blastocystis hominis*, *Balantidium coli*, *Isospora belli*, *Cyclospora cayatanensis*, son algunos de los protozoarios en los que la NTZ ha probado ser activa; así mismo, en cestodos como *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana*, *Echinococcus multilocularis*; trematodos como, *Fasciola hepática*; nematodos como, *Syphacia obvelata*, *Uncinaria stenocephala*, *Trichuris vulpis*, *Trichuris trichiura*; y en algunas bacteria como *Helicobacter pylori*, *Clostridium perfringens* y *Campylobacter*.<sup>42-52</sup>

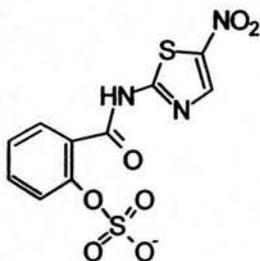
De forma general, en los estudios clínicos para el tratamiento de protozoarios la NTZ fue administrada en dosis de 500 mg cada 12 horas por tres días en adolescentes y adultos, 200 mg cada 12 horas en niños de entre 4 y 11 años y 100 mg cada 12 horas en niños de entre 1 y 3 años<sup>7</sup>.



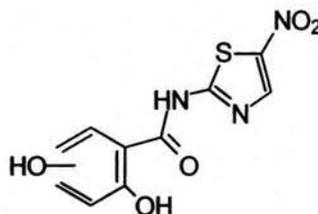
Tizoxanida



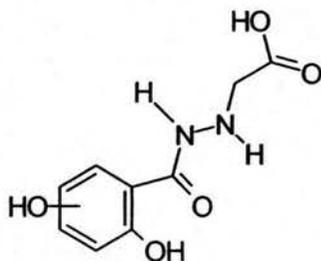
Glucurónido de tizoxanida



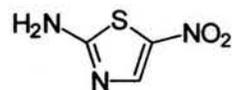
Sulfato de tizoxanida



Tizoxanida hidroxilada



Ácido salicílico



2-Amino-5-nitrotiazol

Figura 9. Principales metabolitos de NTZ.

#### 4.5.4 Mecanismo de Acción

Hasta ahora sólo se ha propuesto un mecanismo de acción para NTZ, como otros nitro-heterociclos: el fármaco interfiere en las reacciones de transferencia de electrones que se presentan en organismos anaeróbicos, donde el grupo nitro toma un electrón para la formación de un radical anión nitro, la NTZ parece ser más selectiva que el metronidazol donde la evidencia preliminar sugiere la inhibición de la piruvato:ferrodoxin oxidoreductasa (PROF), una enzima vital del metabolismo intermedio central en estos organismos.<sup>53,54</sup>

#### 4.5.5 Efectos Adversos

En estudios de toxicidad llevados a cabo por Murphy y col., 1984, en ratones, ratas, gatos y perro, se encontró que la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) fue mayor a 10,000 mg/Kg, mientras que dosis orales consecutivas en ratas tan elevadas como 450 mg/Kg por día y por un periodo de 90 días, produjeron sólo signos menores de toxicidad. NTZ no fue mutagénico cuando fue probado contra *Salmonella typhimurium* con y sin activación metabólica<sup>41</sup>.

En un estudio llevado a cabo por Stockis y col. en 2002, donde se asegura la tolerabilidad de NTZ en 32 voluntarios sanos después de una dosis oral única de 1 a 4 g, se presentaron eventos adversos leves como son: diarrea, dolor abdominal, flatulencias y náuseas, todos de una severidad media y que no requirieron tratamiento alguno. Se concluyó que la NTZ puede ser administrada de manera segura hasta dosis orales únicas de 4g, bajo condiciones de ayuno y con alimentos.<sup>37</sup>

En otro estudio llevado a cabo por Stockis y col. ese mismo año, se aseguró la tolerabilidad de NTZ en 16 voluntarios sanos después de administrarles de 0.5 a 1 g por 7 días. Los eventos adversos fueron de una intensidad media, ninguno de éstos requirió tratamiento a excepción del dolor abdominal en un solo sujeto. Los eventos adversos más frecuentes después de la administración de NTZ fueron trastornos gastrointestinales, como diarrea, dolor abdominal, flatulencias, náuseas y dispepsia. Todos los voluntarios presentaron orina descolorida y sólo 4 voluntarios del grupo de la dosis más alta, presentaron dolor de cabeza.<sup>38</sup>

## V. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 5.1.1 Disolventes y reactivos

Dimetil sulfóxido (DMSO), R.A., Merck.

Metanol, R.A., Mallinckrodt.

Bicarbonato de Sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), SIGMA.

Hidróxido de Sodio ( $\text{NaOH}$ ), R.A., J.T. Baker.

Agua desionizada obtenida con un equipo de Milli-Q Water System a una resistividad de  $18\text{m}\Omega\text{cm}^{-1}$ .

Solución salina estéril al 0.9%, PiSA.

Medio de cultivo Eagle Dulbecco's modificación HEPES, SIGMA.

Suero Fetal Bovino, Invitrogen.

Antibiótico-Antimicótico (Penicilina G, estreptomycin, anfotericina B), Invitrogen.

### 5.1.2 Material y equipo experimental

Frascos de cultivo celular de  $25\text{ cm}^2$ , Corning. Inc.

Membranas de filtración de  $0.22\ \mu\text{m}$ , Millipore

Campana de flujo laminar. Modelo HB 2448, HOLTEN.

Incubadora de temperatura controlada con control de flujo de  $\text{CO}_2$ . Modelo 304, NAPCO.

Microscopio de luz invertida. Modelo ICM, Zeis 405.

Balanza analítica. Modelo CP225D, Sartorius.

Baño de ultrasonido. Modelo PC-620R, Branson.

Potenciómetro. Modelo pH 41, Beckman.

### **5.1.3 Material biológico**

Los cisticercos madre de *Taenia crassiceps* de la cepa ORF que sirvieron como base para toda la experimentación, fueron extraídos de dos ratones hembra Balb-C, cada ratón fue amablemente proporcionado por el Dr. Javier Ambrosio Hernández del Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM y por el M.V.Z. Rodolfo Pérez Madrigal del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Los ratones hembra Balb-C fueron proporcionados y mantenidos en el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

### **5.1.4 Fármacos y compuestos**

Los compuestos bencimidazólicos de las series CARB, PVB y FHL fueron sintetizados y amablemente proporcionados por la M. en C. Alicia Hernández Campos y por el Dr. Francisco Luis Hernández del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM.

Estándar primario de Nitazoxanida, Lote 45876J.

El metabolito activo Tizoxanida fue sintetizado y amablemente proporcionado por el Dr. Rafael Castillo Bocanegra del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM.

Estándar primario de Albendazol, Lote 119H1040. SIGMA

## 5.2 Metodología

### 5.2.1. Obtención de cisticercos

Los cisticercos madre de *Taenia crassiceps* (cepa ORF) se obtuvieron de ratones hembra Balb/c con 6 – 8 semanas de infección experimental. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y por medio de una incisión en la cavidad peritoneal se extrajeron los cisticercos

Después de ser extraídos los cisticercos se depositaron en cajas petri y se lavaron inmediatamente con solución salina estéril al 0.9 %, suplementada con antibiótico-antimicótico al 1.0 %. Para llevar a cabo los estudios se seleccionaron únicamente aquellos cisticercos que mantenían intacta su membrana celular y fluido quístico, por medio de la observación al microscopio.

Con la finalidad de tener lotes de parasitos disponibles durante todo el proyecto se realizaron inoculaciones seriadas de cisticercos en ratones hembra Balb/C de 5 semanas de vida. La inoculación se realizó por vía intraperitoneal, se suspendieron 30 cisticercos en 0.5 mL de solución salina estéril al 0.9 %.

### 5.2.2. Medio de cultivo

A 1 L de medio de cultivo Eagle Dulbecco's modificación HEPES se le adicionó 3.7 g de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) para obtener una concentración 50 mM y se ajustó el pH a un valor de 7.3 con hidróxido de sodio (NaOH) 0.8 N.

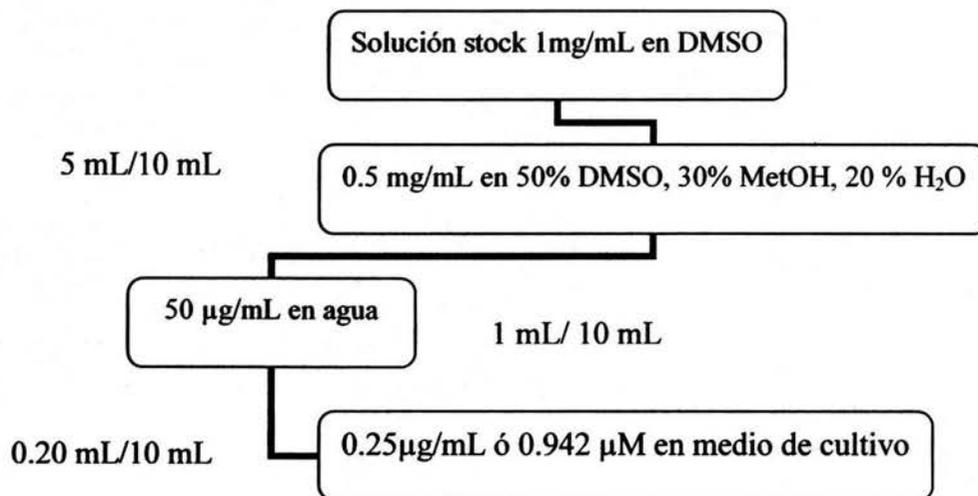
El medio de cultivo se suplementó con suero fetal bovino hasta obtener una concentración final del 10 % y se adicionó una mezcla de antibiótico-antimicótico a las siguientes concentraciones: 100 U penicilina/mL, 100  $\mu\text{g}$  de estreptomycin/mL y 0.25  $\mu\text{g}$  de anfotericina B/mL.

El medio de cultivo suplementado se filtró a través de membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, bajo flujo laminar, para evitar su contaminación. Se almacenó en refrigeración hasta el momento de su uso.

### 5.2.3 Preparación de soluciones

#### 5.2.3.1 Solución de albendazol

Se preparó una solución stock de ALB de 1 mg/mL en DMSO, una vez preparada esta solución se transfirieron 5 mL de ésta a un matraz volumétrico de 10 mL, se le agregó 3 mL de metanol y se aforó con agua. A partir de esta última solución se realizó una dilución intermedia con agua. Para obtener la concentración final, la dilución se llevó a cabo en medio de cultivo (Esquema 1). Las diluciones se realizaron el mismo día para evitar precipitación del fármaco.



Esquema 1. Procedimiento para la preparación de la solución de albendazol en medio de cultivo.

Los cambios que presentaron los cisticercos bajo tratamiento con ALB son una referencia de mortalidad para llevar un control de la experimentación y para observar posibles errores en los resultados.

### 5.2.3.2 Soluciones de los compuestos bencimidazólicos en medio de cultivo.

Para evaluar la eficacia de los compuestos bencimidazólicos se prepararon concentraciones molares equivalentes a una concentración de  $0.942 \mu\text{M}$ , ya que a esta concentración el albendazol presenta un 100 % de eficacia *in vitro* (*T. crassiceps*).<sup>26</sup> Así mismo se prepararon soluciones a concentraciones 10 (sol. II) y 100 (Sol III) veces mayores.

La preparación de las soluciones de los compuestos bencimidazólicos en medio de cultivo se llevó a cabo de la siguiente forma:

Se preparó una solución stock en DMSO para obtener una concentración de  $0.5 \text{ mg/mL}$ . A partir de la solución stock de cada uno de los compuestos se realizaron diluciones intermedias con agua. La dilución final se preparó en el medio de cultivo (Esquema 2). Las diluciones para cada compuesto se realizaron el mismo día con la finalidad de evitar degradación o precipitación.



Esquema 2. Diagrama general de las diluciones realizadas para la evaluación de los compuestos bencimidazólicos.

### 5.2.3.3 Soluciones de nitazoxanida y tizoxanida en medio de cultivo

Se prepararon soluciones de NTZ y TIZ en medio de cultivo a la concentración molar a la que el albendazol presenta el 100 % de efectividad *in vitro*, así como dos concentraciones adicionales, una diez veces mayor (II) y otra 10 veces menor (III).

La preparación de las disoluciones de los compuestos en medio de cultivo se realizó de la siguiente forma:

Se prepararon soluciones stock de NTZ y TIZ en DMSO a una concentración de 0.5 mg/mL y 0.16 mg/mL de DMSO respectivamente. A partir de la solución stock se realizaron diluciones intermedias con agua. La concentración final de las soluciones se preparó en medio de cultivo (Esquema 3).



Esquema 3. Diagrama general de las diluciones realizadas para la nitazoxanida y tizoxanida.

#### **5.2.3.4 Soluciones de blanco de disolventes en medio de cultivo**

Para llevar un control en cada experimento se prepararon soluciones en medio de cultivo a la misma proporción de disolventes que el contenido en las soluciones de los compuestos de las series CARB, PVB, FHL, la NTZ y la TIZ. Debido a que las soluciones de los compuestos tenían diferentes cantidades de disolventes, se tomó como blanco la solución de aquel compuesto que tuviera la cantidad más alta de disolvente.

### 5.3 Evaluación del efecto cestocida *in vitro*

En frascos de cultivo celular se depositaron 5 mL de medio de cultivo conteniendo el compuesto a probar y se colocó cuidadosamente en cada frasco 25 cisticercos. Para cada compuesto y cada concentración se trabajó por duplicado o triplicado.

Los frascos se incubaron a una temperatura de 37 °C y una atmósfera al 5 % de CO<sub>2</sub>, por un periodo de once días. Para mantener el pH y la viabilidad de los cisticercos se cambió el medio de cultivo con el compuesto cada 48 h. Se determinó la mortalidad de los cisticercos por observación a través de microscopio de luz invertida cada 48 horas.

Una referencia de los tiempos y la metodología de la evaluación de los compuestos se tomó de lo publicado por Palomares y col., (2004), acerca del tiempo de exposición mínima *in vitro* que requirió el PZQ y ALB para matar al 100% de los cisticercos de *T. crassiceps*.<sup>26</sup>

Los criterios para evaluar la mortalidad de los cisticercos fueron los siguientes.

- 1) Pérdida de fluido quístico
- 2) Pérdida de la movilidad del cisticerco
- 3) Pérdida de la movilidad de la membrana
- 4) Prueba de exclusión de viabilidad con Azul de Tripano.

Con el fin de determinar la reproducibilidad del estudio, la evaluación de cada compuesto se llevó a cabo en dos diferentes días y con lotes de cisticercos diferentes.

### **5.3.1 Prueba de exclusión de viabilidad con Azul de Tripano.**

Una vez finalizado el periodo de incubación (11 días), los cisticercos se lavaron con solución salina al 0.9% y se colocaron en pozos de cultivo, los cuales contenían 4 mL de solución salina. A cada pozo se le agregó 175  $\mu$ L de una solución al 0.4 % de azul de tripano en agua y después de 1 hora se realizó un registro de los cisticercos teñidos. Los cisticercos vivos no se tiñen con el azul de tripano, mientras que los muertos presentan tinción total en toda su estructura.

#### 5.4 Determinación de la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) de NTZ y TIZ.

Con la finalidad de obtener la CE<sub>50</sub> se prepararon soluciones stock de NTZ y TIZ en DMSO a una concentración de 0.5 mg/mL y 0.16 mg/mL respectivamente. Al igual que con los compuestos bencimidazólicos, a partir de la solución stock se realizaron diluciones intermedias con agua para cada compuesto. La dilución final, mostrada en la Tabla III se preparó en medio de cultivo

Tabla III. Concentraciones de NTZ y TIZ utilizadas para construir la curva dosis-respuesta de cada compuesto.

| Concentración | Nitazoxanida<br>( $\mu\text{M}$ ) | Tizoxanida<br>( $\mu\text{M}$ ) |
|---------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| 1             | 0.139                             | 0.0942                          |
| 2             | 0.203                             | 0.139                           |
| 3             | 0.301                             | 0.203                           |
| 4             | 0.438                             | 0.301                           |
| 5             | 0.641                             | 0.438                           |
| 6             | 0.942                             | 0.641                           |
| 7             | 1.39                              | 0.942                           |

Los cisticercos se expusieron a cada uno de las soluciones de los fármacos durante el periodo de once días de la evaluación *in vitro* a las condiciones experimentales anteriormente descritas y se evaluó su mortalidad tomando los mismos criterios.

Con los resultados obtenidos se elaboraron las curvas dosis-respuesta para cada fármaco. La CE<sub>50</sub> se calculó a partir de las curvas dosis-respuesta mediante análisis *Probit* utilizando el programa estadístico SPSS versión 9.0, se transformaron los resultados de mortalidad a valores *logit* y se graficaron en función del logaritmo de la concentración, se obtuvieron también los correspondientes intervalos de confianza.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSION

### 6.1 Estudios *in vitro*

#### 6.1.1 Evaluación *in vitro* del efecto y mortalidad en el modelo de *T. crassiceps*

##### 6.1.1.1 Albendazol (Control Positivo)

La solución stock de ALB de 1 mg/mL fue clara y transparente. Al hacer la transferencia a agua se presentó precipitación de tal forma que se utilizó un cosolvente (metanol) para ayudar a la disolución en agua. Al efectuar las diluciones intermedias en agua, ya no se presentó precipitación del ALB. La dilución final en medio de cultivo no presento precipitación y la concentración final de disolventes no presentó efecto tóxico alguno sobre los cisticercos.

Al evaluar el efecto del ALB sobre los cisticercos, se encontró que a partir del segundo día de tratamiento se presentó una pérdida gradual de su movilidad general. También se observó una contracción gradual de la membrana durante los once días de tratamiento debido a la pérdida del fluido quístico, lo cual fue evidente por la notable reducción del volumen del cisticerco, hasta un 50% del tamaño original, así como por la opalescencia en la membrana de los cisticercos con tratamiento (Figura 10).

Al utilizar la microscopia de luz invertida se observó una perdida de la motilidad de la membrana y una extensa vacuolización del tegumento.

El efecto del ALB sobre la mortalidad de los cisticercos fue el esperado, lo cual concuerda con lo reportado por Palomares y col., 2004, cuando los cisticercos fueron expuestos a la concentración de  $0.942 \mu\text{M}$  el rango de mortalidad osciló entre 97 a 100 %.<sup>26</sup>

Los resultados de mortalidad fueron corroborados con la prueba de exclusión de viabilidad con azul de tripano (Figura 11).

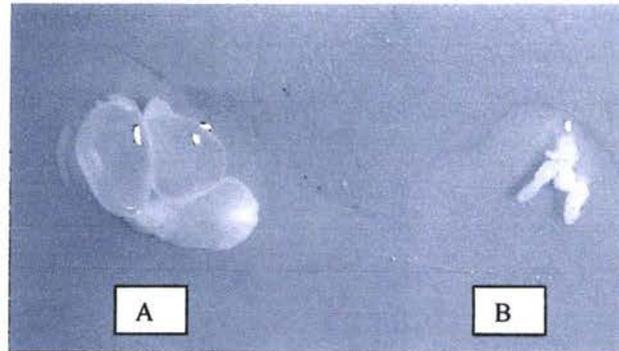


Figura 10. Cisticercos de *T. crassiceps* bajo 2 diferentes tratamientos, (A) blanco de disolventes y (B) albendazol  $0.942 \mu\text{M}$ .

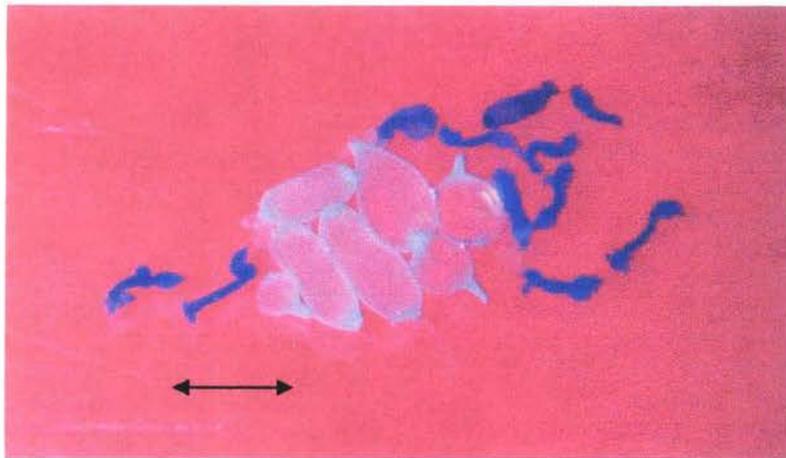


Figura 11. Cisticercos de *T. crassiceps* después de la prueba de exclusión de viabilidad con azul de tripano. Los cisticercos traslucidos se consideran viables, mientras que los teñidos de azul se consideran muertos.

## Compuestos bencimidazólicos

Las soluciones stock de los compuestos bencimidazólicos de 0.5 mg/mL fueron claras y transparentes. Al efectuar la dilución intermedia en agua no se presentó precipitación de ninguno de los compuestos y no se necesitó un cosolvente (metanol) como en el caso de la solución de ALB. La dilución final en medio de cultivo para cada compuesto no presentó precipitación y la concentración final de DMSO no presentó efecto tóxico alguno sobre los cisticercos.

El efecto observado sobre los cisticercos con los compuestos de estas tres series de manera general fue muy parecido al efecto observado con el albendazol. Al igual que con albendazol se observó la pérdida gradual de la movilidad general y contracción de la membrana debido a la pérdida del fluido quístico. La reducción del volumen del cisticerco fue notable, llegando hasta un 50 % del tamaño original. Al compararlos con los cisticercos control, la membrana se observó que era opalescente

Los resultados de mortalidad de los cisticercos bajo tratamiento con los compuestos de la serie CARB, PVB y FHL se presentan en la Tabla IV. Así mismo, también se muestran los resultados obtenidos con el albendazol con la finalidad de comparar el porcentaje de mortalidad.

Como se puede observar en la Tabla IV, ninguno de los compuestos de las tres series probadas mostró una mortalidad similar a la encontrada con el albendazol.

Con base a estos resultados y realizando una relación básica de las estructuras químicas de los compuestos con la actividad que presentaron, se encontró que:

Tabla IV. Porcentajes de mortalidad de cisticercos de *T. crassiceps* después de tratamiento con cada uno de los compuestos a las diferentes concentraciones probadas. Se presenta promedio  $\pm$  E.E., n = 2

| Compuesto     | 0.942 $\mu$ M                    | 9.42 $\mu$ M                     | 94.2 $\mu$ M                     |
|---------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Albendazol    | 98.8 $\pm$ 0.8                   | 100 $\pm$ 0                      | No probado                       |
| Carb 1        | 0 $\pm$ 0                        | 3.3 $\pm$ 3.1                    | No probado                       |
| Carb 2        | 0 $\pm$ 0                        | 4.3 $\pm$ 1.4                    | No probado                       |
| Carb 3        | 2.5 $\pm$ 2.5                    | 3.5 $\pm$ 2.9                    | No probado                       |
| <b>Carb 4</b> | <b>6.5 <math>\pm</math> 3.1</b>  | <b>18.5 <math>\pm</math> 1.5</b> | <b>85.5 <math>\pm</math> 0.5</b> |
| <b>Carb 7</b> | <b>4.0 <math>\pm</math> 2.1</b>  | <b>10 <math>\pm</math> 1.9</b>   | <b>55.5 <math>\pm</math> 3.5</b> |
| PVB-K         | 2.5 $\pm$ 1.4                    | 8 $\pm$ 3.4                      | No probado                       |
| PVB-La        | 0.8 $\pm$ 0.8                    | 11.8 $\pm$ 2.5                   | No probado                       |
| <b>PVB-Lb</b> | <b>12.5 <math>\pm</math> 2.5</b> | <b>19.0 <math>\pm</math> 2.5</b> | <b>58.5 <math>\pm</math> 3</b>   |
| <b>PVB-Lc</b> | <b>17.3 <math>\pm</math> 2.6</b> | <b>18.0 <math>\pm</math> 2.7</b> | <b>31.0 <math>\pm</math> 3</b>   |
| PVB-Ld        | 4.6 $\pm$ 2.6                    | 5.0 $\pm$ 2.3                    | No probado                       |
| <b>FHL-13</b> | <b>26.5 <math>\pm</math> 0.5</b> | No probado                       | No probado                       |
| <b>FHL-15</b> | <b>48 <math>\pm</math> 2</b>     | No probado                       | No probado                       |
| <b>FHL-18</b> | <b>85.3 <math>\pm</math> 0.9</b> | No probado                       | No probado                       |
| <b>FHL-19</b> | <b>82.8 <math>\pm</math> 2.3</b> | No probado                       | No probado                       |

Los 5 compuestos de la serie CARB, presentaron una efectividad menor al 10% a la concentración de 0.942  $\mu$ M, concentración a la cual el albendazol mostró casi 100 % de efectividad.

A la concentración de 9.42  $\mu$ M, sólo dos compuestos de los cinco evaluados mostraron un aumento considerable sobre el porcentaje de mortalidad, el compuesto CARB 4 el cual incrementó 3 veces y el CARB 7 que incrementó el doble.

Con base en estos resultados de efectividad, se incrementó la concentración de estos dos compuestos cien veces más, encontrándose una respuesta notablemente mayor.

Los compuestos CARB 4 y CARB 7 poseen grupos funcionales completamente diferentes a los que posee el ALB en las posiciones 2 y 5 del anillo bencimidazólico (Figura 12), la razón del mejor comportamiento de estos dos compuestos con respecto a los otros de la misma serie en cuanto a actividad, puede ser debida a la presencia de radicales más voluminosos en la posición 5 del anillo y en el caso específico de CARB-4 el cual presenta mayor actividad, podría ser debido a la presencia del átomo de cloro en la posición 6 del anillo. Estas diferencias podrían conferirles un mecanismo de eliminación diferente al que presenta el albendazol. Los compuestos presentaron una mayor solubilidad en medios acuosos con respecto al albendazol al momento de llevar a cabo las diluciones, característica fisicoquímica que les podría conferir una ventaja en cuanto a su disolución, absorción y por tanto quizá mayor biodisponibilidad con respecto al albendazol.

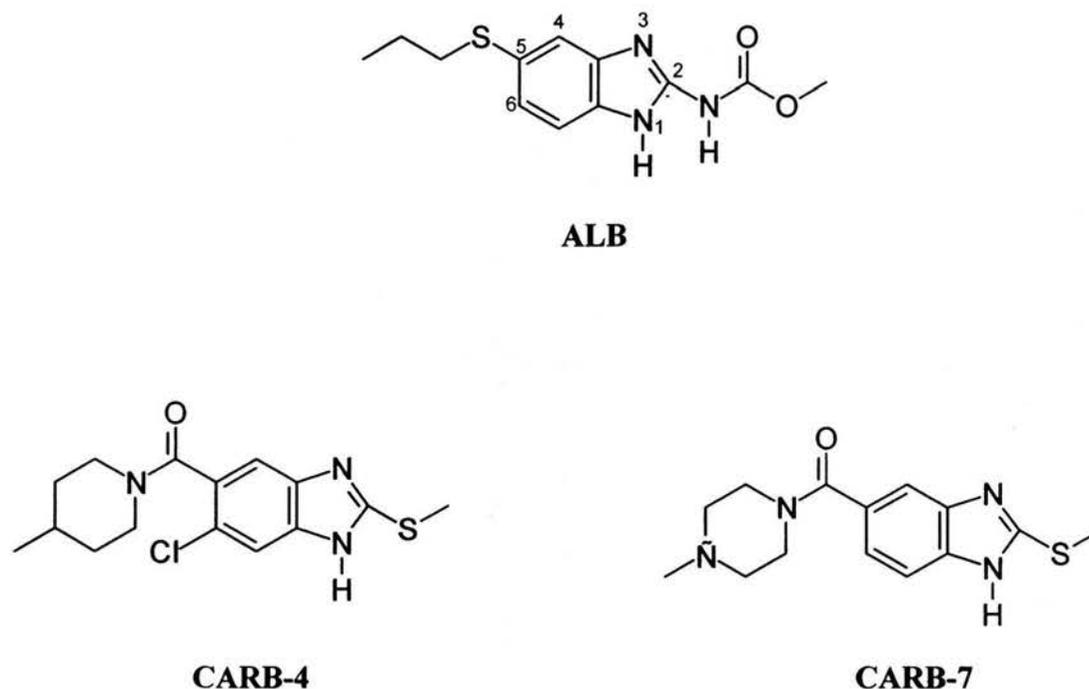
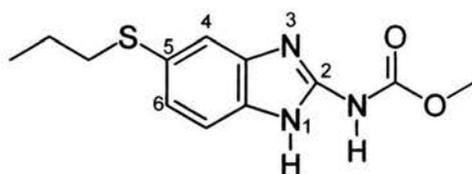


Figura 12. Estructuras químicas

Al analizar los resultados de la serie PVB se encontró que sólo los compuestos PVB-Lb y PVB-Lc de los cinco compuestos probados presentaron una actividad cestocida mayor al 10 % cuando se usó la concentración de 0.942  $\mu\text{M}$ , concentración a la cual el albendazol mostró 98.8 % de mortalidad. En la búsqueda de mayor actividad, al igual que con la serie CARB, se probaron los cinco compuestos a una concentración 10 veces mayor y se observó un ligero aumento en la actividad de cada uno, en el caso específico de los compuestos PVB-Lc no se observó el aumento esperado (Tabla IV). Al aumentar 100 veces la concentración de aquellos compuestos que tuvieron una actividad mayor a 15%, PVB-Lb y PVB-Lc, se observó que la actividad se mantuvo casi constante con respecto a la actividad que presenta el albendazol a una concentración 100 veces menor.

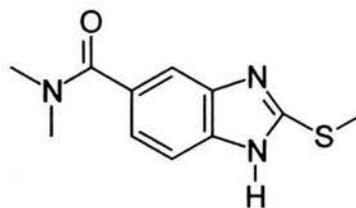
Los compuestos PVB-Lb y PVB-Lc, al igual que la serie CARB poseen grupos funcionales completamente diferentes a los que posee el albendazol en las posiciones 2 y 5 del anillo bencimidazólico (Figura 13), su mejor comportamiento en relación a los otros análogos en cuanto a actividad, puede ser debida a la presencia en los dos casos de grupos voluminosos en la posición 5 del anillo, es necesario aumentar el número de ensayos para llegar a una conclusión más sólida.



ALB



PVB-Lb



PVB-Lc

Figura 13. Estructuras químicas

El bajo porcentaje de mortalidad observada con los compuestos de la serie CARB y PVB al usar la concentración de 0.942  $\mu\text{M}$  muestra que a pesar de que han mostrado actividad sobre otros modelos como *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichinella spiralis*, no son efectivos en *T. crassiceps*.

Al analizar los resultados de mortalidad junto con las estructuras químicas se encontró que el anillo bencimidazólico que es la única estructura semejante en las dos series con el ALB, no es suficiente para que ejerzan un efecto cestocida sobre el modelo de *T. crassiceps*.

Con respecto a los grupos funcionales de la posición 5 del anillo bencimidazólico que fueron utilizados en las dos series, se observó una ligera relación entre el efecto cestocida con la voluminosidad creciente del grupo presente.

La discusión del grupo metiltio presente en la posición 2 del anillo bencimidazólico, que se mantuvo constante en las dos series de compuestos, se hace más adelante tomando en cuenta la serie FHL.

El análisis de los resultados de este primer estudio exploratorio con la serie FHL mostró lo siguiente:

El objetivo de introducir el grupo metilo en los compuestos FHL-13 y FHL-15 fue obtener moléculas casi idénticas a la estructura del albendazol, con mayor solubilidad acuosa y con la misma actividad aparente, lo cual no fue observado. Los dos compuestos poseen una estructura química casi idéntica a la del albendazol, la diferencia estructural radica en que cada uno de ellos posee un grupo metilo en vez de hidrógeno en la posición 1 para el caso del compuesto FHL-13 y en el caso del compuesto FHL-15, en el nitrógeno del carbamato (Figura 14).

Los hidrógenos presentes en la posición 1 del anillo bencimidazólico y en el nitrógeno del grupo carbamato de la estructura química del albendazol (Figura 14) son indispensables para mantener la actividad cestocida de la molécula en el modelo de *T. crassiceps*, ya que con los compuestos FHL-13 y FHL-15 de la serie, se observó un descenso en la actividad cestocida aproximadamente del 70 % y 40 %, respectivamente (Tabla IV).

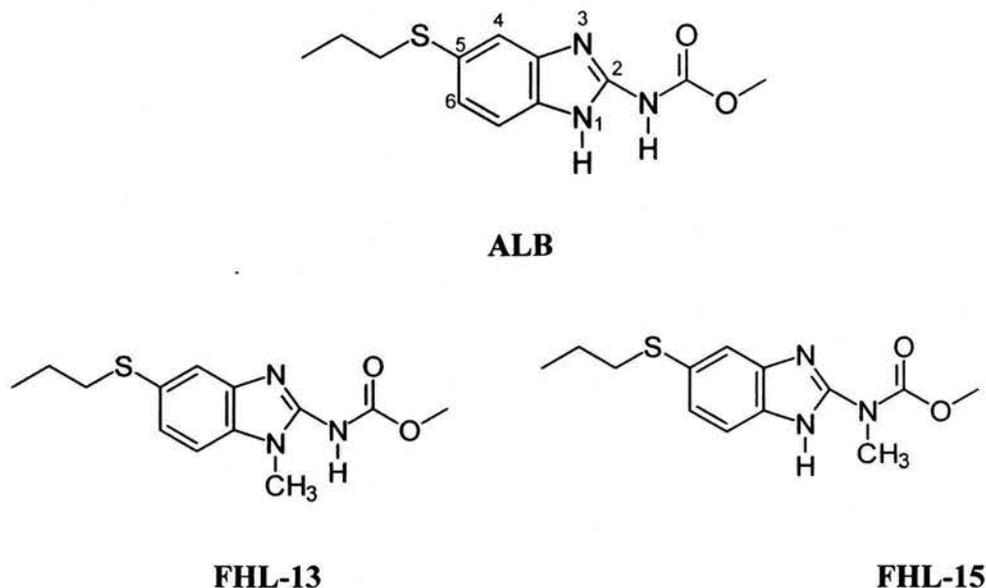


Figura 14. Estructuras químicas.

Estos resultados concuerdan con lo publicado por Lacey en cuanto a la relación que existe entre la actividad óptima antihelmíntica con la presencia del hidrógeno en la posición uno del anillo bencimidazólico<sup>34</sup>.

Después de evaluar los compuestos FHL-18 y FHL-19 a la concentración de 0.942  $\mu\text{M}$ , los resultados obtenidos mostraron que estos dos compuestos tienen gran potencial como agentes cestocidas, ya que el efecto observado sobre la mortalidad de los cisticercos fue solamente 15 % menor al efecto observado con el albendazol (Tabla IV).

Estos compuestos también poseen una estructura similar a la del albendazol, ya que cuentan con el anillo bencimidazólico y el grupo carbamato en la posición 2 del anillo, sin embargo en la posición 5 no cuentan con el grupo propiltio presente en el albendazol, característica que podría cambiar su metabolismo *in vivo*, (Figura 15).

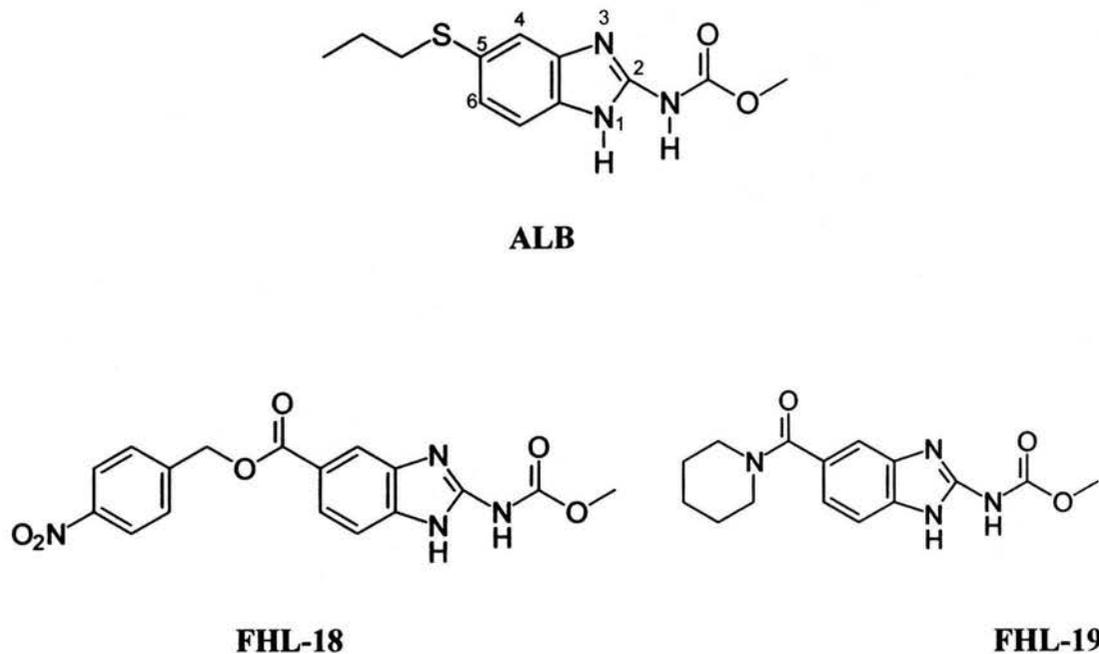


Figura 15. Estructuras químicas.

Después de evaluar los compuestos CARB 1 y FHL-19 (Figura 16) a la concentración de 0.942  $\mu\text{M}$ , se encontró que la mortalidad del compuesto CARB 1 fue del 0.0 %, mientras que la del compuesto FHL-19 fue del 82.8 % (Tabla IV). Estos resultados muestran la importancia que tiene la presencia del grupo carbamato en la posición 2 del anillo bencimidazólico para ejercer la actividad cestocida en este modelo.

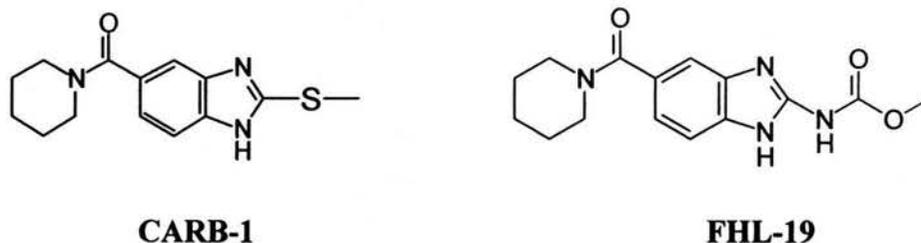


Figura 16. Estructuras químicas.

Los resultados obtenidos con las diferentes series evaluadas y particularmente con los compuestos CARB 1 y FHL-19, así como la relación estructura actividad observada en el modelo de *T. crassiceps*, son la base para continuar la exploración y conocimiento de los compuestos bencimidazólicos en series que mantengan el grupo carbamato en la posición 2 y el hidrógeno en la posición 1 del anillo bencimidazólico.

### 6.1.1.3 Nitazoxanida y tizoxanida

El efecto de NTZ y TIZ en los cisticercos de *T. crassiceps* fue semejante al observado con el ALB. Se observó pérdida gradual de su movilidad general así como la contracción de la membrana debido a la pérdida del fluido quístico. La reducción del volumen del cisticerco fue notable, hasta un 70 % de su tamaño original. Al compararlos con los cisticercos control se observó opalescencia en la membrana (Figura 17).

Con microscopia de luz invertida se observó pérdida de la motilidad de la membrana y presencia de fibrillas en toda la superficie de la membrana del cisticerco. Este último cambio no se observó en aquellos tratados con ALB, ni con los derivados bencimidazólicos.

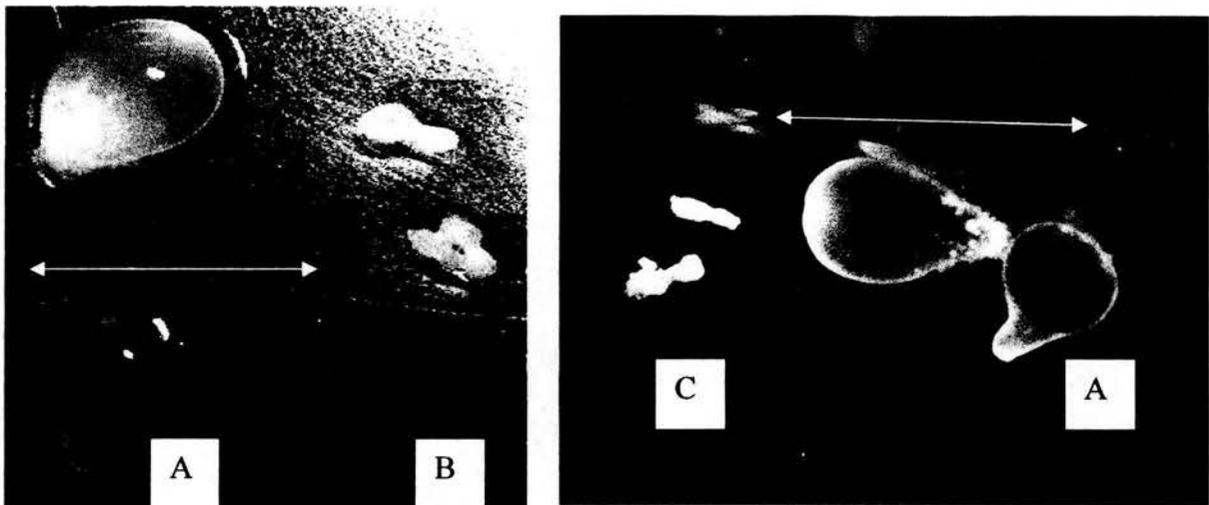


Figura 17. Cisticercos de *T. crassiceps* bajo diferentes tratamientos. A: Blanco de disolventes, B: NTZ 0.942 μM, C: TIZ 0.942 μM.

Los resultados de mortalidad de los cisticercos bajo tratamiento con NTZ, TIZ y ALB, se presentan en la Tabla V

Tabla V. Valores promedio ( $\pm$  E.E) del porcentaje de mortalidad obtenidos con los diferentes compuestos (n = 2).

| Compuesto    | 0.942 $\mu$ M  | 9.42 $\mu$ M | 0.0942 $\mu$ M |
|--------------|----------------|--------------|----------------|
| Albendazol   | 99.4 $\pm$ 0.4 | 100 $\pm$ 0  | No probado     |
| Nitazoxanida | 95 $\pm$ 0.6   | 100 $\pm$ 0  | 0.0 $\pm$ 0    |
| Tizoxanida   | 100 $\pm$ 0    | 100 $\pm$ 0  | 0.0 $\pm$ 0    |

En la Tabla V se puede observar el alto porcentaje de mortalidad y la clara efectividad de estos compuestos en el modelo de *T. crassiceps*.

También muestra que NTZ presentó una efectividad sobre la mortalidad del 95% muy cercano al que presenta el ALB. El metabolito activo, TIZ, presentó una efectividad sobre la mortalidad igual a la del ALB, mostrando con ello que el metabolito activo posee la misma efectividad que el ALB en el modelo *T. crassiceps*.

En el Figura 18 se puede observar el porcentaje de mortalidad a través del tiempo bajo los tres tratamientos. La figura muestra que en los primeros días la mortalidad de los cisticercos alcanza porcentajes mayores con la NTZ y la TIZ respecto al ALB, lo cual indica mayor potencia de ellos a esta concentración.

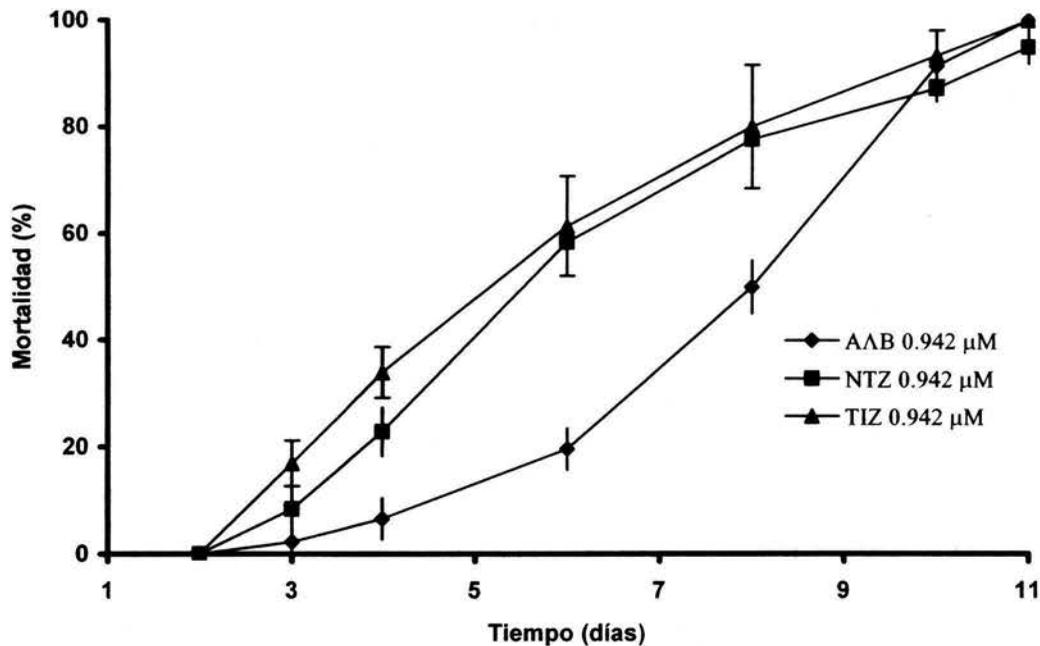


Figura 18. Porcentaje de mortalidad de cisticercos de *T. crassiceps* bajo tratamiento de ALB, NTZ y TIZ. Cada punto representa el porcentaje promedio de cisticercos muertos  $\pm$  E.E. n = 2

Los resultados del efecto de mortalidad con NTZ son similares a los de otros estudios en animales y humanos en los cuales se ha observado 100% de efectividad contra otras variedades de tenias como la *T. pisiformis*, *T. taeniaeformis* y *T. saginata*<sup>41</sup>. Así mismo, en otras especies de metacestodos como *E. multilocularis*,<sup>49</sup> se ha encontrado el mismo efecto.

A una concentración diez veces mayor (9.42  $\mu$ M), se encontró que la TZN resultó ser mas potente que el propio Albendazol (Figura 19).

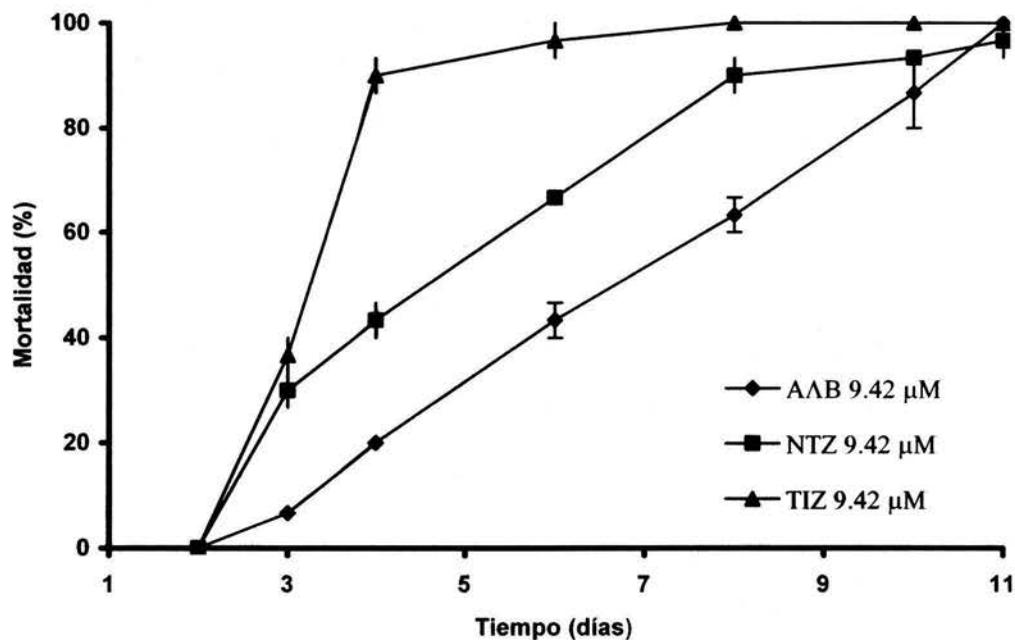


Figura 19. Porcentaje de mortalidad de cisticercos de *T. crassiceps* bajo tratamiento con ALB, NIT, TIZ. Cada punto representa el valor promedio de cisticercos muertos  $\pm$  E.E.  $n = 2$

A una concentración 10 veces menor ( $0.0942 \mu\text{M}$ ) se encontró que ni la NTZ ni la TIZ fueron efectivos

### 6.1.2. Curvas dosis-respuesta de NTZ y TIZ

Una vez evaluada la eficacia cestocida de ambos compuestos, se llevó a cabo el estudio a diferentes concentraciones dentro del rango de actividad ya encontrado. Los resultados se presentan en la Tabla VI.

Tabla VI. Porcentaje de mortalidad a diferentes concentraciones (promedio  $\pm$  E.E., n = 3).

| Concentración ( $\mu$ M) | Nitazoxanida    | Tizoxanida     |
|--------------------------|-----------------|----------------|
| 0.0942                   | --              | 0 $\pm$ 0      |
| 0.139                    | 0 $\pm$ 0       | 5.2 $\pm$ 1.8  |
| 0.203                    | 3.92 $\pm$ 0.04 | 14.4 $\pm$ 1.4 |
| 0.301                    | 11.6 $\pm$ 2.0  | 20.4 $\pm$ 2.6 |
| 0.438                    | 28.6 $\pm$ 1.4  | 32.8 $\pm$ 2.4 |
| 0.641                    | 76.6 $\pm$ 2.8  | 85.6 $\pm$ 0.9 |
| 0.942                    | 94.5 $\pm$ 1.6  | 100 $\pm$ 0    |
| 1.39                     | 100 $\pm$ 0     | --             |

Como se puede observar en la Tabla VI, la Tizoxanida a la concentración de 0.942  $\mu$ M alcanza el 100% de mortalidad al igual que el albendazol, mientras que para obtener el mismo porcentaje con NTZ es necesario aumentar una séptima parte la concentración.

De manera general se observa que con todas las concentraciones, el metabolito activo mostró mayor potencia. La Figura 20 muestra las curvas dosis-respuesta en las que se puede apreciar más claramente las diferencias entre los compuestos.

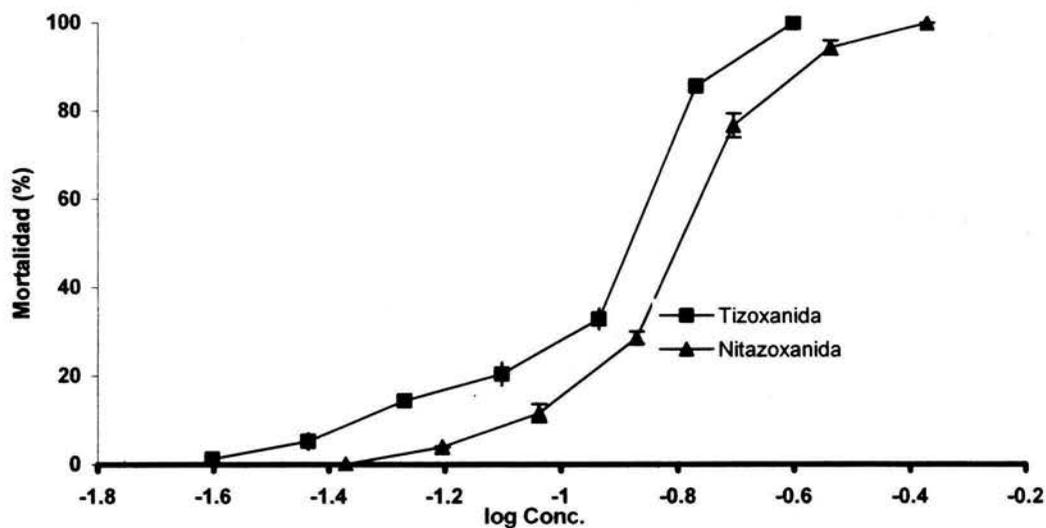


Figura 20. Curvas dosis-respuesta de: Nitazoxanida (▲) y Tizoxanida (■). Cada punto representa el porcentaje promedio de cisticercos muertos  $\pm$  E.E.,  $n = 3$

Para determinar el valor de la concentración que produce el 50% de mortalidad de los cisticercos ( $CE_{50}$ ) se realizó un análisis de regresión *probit*.

La Tabla VII muestra los valores de la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) de la NTZ, su metabolito activo TIZ y los valores del ALB y del sulfóxido de albendazol (SOALB). Al comparara los valores de NTZ y TIZ no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, ya que los intervalos de confianza se traslapan, por lo que podemos concluir que los dos compuestos tienen la misma efectividad cestocida sobre los cisticercos de *T. crassiceps*.

Al comparar con los valores de CE<sub>50</sub> previamente determinados por Palomares y col., 2004, del ALB y su metabolito activo, el SOALB sobre el mismo modelo de *T. crassiceps*,<sup>26</sup> se puede observar claramente que éstos son más potentes que la NTZ y la TIZ sobre los cisticercos de *T. crassiceps*.

Tabla VII. CE<sub>50</sub> de los fármacos sobre cisticercos de *T. crassiceps*.

| Compuesto                 | CE <sub>50</sub> (µg/mL) | IC <sub>95%</sub> (µg/mL) |
|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Albendazol*               | 0.026                    | 0.022 – 0.029             |
| Sulfóxido de Albendazol*  | 0.068                    | 0.041 – 0.112             |
| Nitazoxanida <sup>1</sup> | 0.154                    | 0.145 – 0.163             |
| Tizoxanida <sup>1</sup>   | 0.113                    | 0.086 – 0.151             |

(\*)Ref. 26, (1) Determinados experimentalmente.

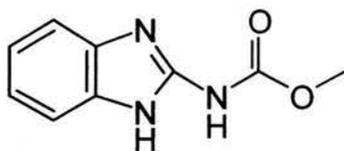
Los resultados de efectividad de la NTZ, la sitúan como una alternativa en el tratamiento de la neurocisticercosis y dado que la NTZ es un fármaco actualmente aprobado por la FDA y que la información acerca de estudios preclínicos de seguridad y tolerancia ya han sido realizados y reportados, se podría continuar con estudios para evaluar la eficacia *in vivo*.

## VII CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que:

- ▶ Los resultados de mortalidad que presentaron los compuestos de las series CARB y PVB fueron bajos con respecto a la eficacia presentada por el albendazol a la misma concentración en el modelo de *T. crassiceps*.
- ▶ De las tres series probadas sólo los compuestos FHL-18 y FHL-19 presentaron una eficacia cercana a la que presenta el albendazol (20 % menor) en el modelo de *T. crassiceps*.
- ▶ Para el modelo de *T. crassiceps* la presencia del hidrógeno en la posición uno del anillo bencimidazólico o en el nitrógeno del carbamato es indispensable para mantener la actividad de la molécula de albendazol.
- ▶ La presencia del grupo metiltio en la posición dos del anillo bencimidazólico disminuyó la actividad cestocida de los compuestos que la presentaban, en el modelo de *T. crassiceps*.
- ▶ La presencia del grupo carbamato en la posición dos del anillo bencimidazólico es indispensable para conservar la actividad cestocida del albendazol en el modelo de *T. crassiceps*.

- ▶ La estructura mínima responsable de la actividad cestocida encontrada para el modelo de *T. crassiceps* con un anillo bencimidazólico como base es:



- ▶ La NTZ y la TIZ presentaron una eficacia similar a la del ALB en el modelo de *T. crassiceps*
- ▶ La NTZ y su metabolito activo TIZ, presentaron un efecto dependiente del tiempo de exposición y de la concentración.

## VIII BIBLIOGRAFÍA

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

1. **Flisser, Ana., et.al.,** (1989). *Cisticercosis Humana y Porcina.*, Ed. Limusa, México, 233-240.
2. **Sarti, E.,** (2002). Epidemiology of *Taenia solium*, Taeniasis and Cysticercosis in Mexico. In: Sing, G., Prabhakar, S., *Taenia solium Cysticercosis. From Basic to Clinical Science*, CABI Publishing, New York, U.S.A. 83-90.
3. **Flisser, Ana, et.al.,** (1996). *Cisticercosis Humana.*, Ed. Manual Moderno, México, 1-4, 33-41.
4. **Sotelo, J., Guerrero, F., Rubio, F.,** (1985). A new classifications based on active and inactive forms. *Arch. Intern. Med.* 145; 442-445.
5. **López, M., et.al.,** (2001). *Neurology*, Nov (2); 1929-1930
6. **Valdez, J., Cedillo, R., Hernández-Campos, A., et.al.,** (2002) Síntesis and Antiparasitic Activity of 1H-Benzimidazole Derivates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 2221-2224.
7. **Gilles, H., Hoffman, P.,** (2002). Treatment of intestinal parasitic infections: a review of nitazoxanida. *TRENDS in Parasitology.* 18 (3); 95-97.
8. **Aluja, A., Escobar, A., Escobedo, F., Flisser, A., Laclette, J., Sarralde, C.,** (1987). *Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para e manejo y control de la cisticercosis causada por Taenia solium.* Biblioteca de la Salud. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
9. **Hird, W., Pullen, M.,** (1979). Tapeworms, meat and man: A brief review and update of cysticercosis caused by *Taenia saginata* and *Taenia solium*. *J. Food Protect.* 42; 58.



10. **Náquira, C.**, (1996). *Taenia solium*: Ciclo biológico y características. In: García, H., Martínez, S., (eds). *Teniasis/Cisticercosis por T. solium*. Editorial Universo S.A. Lima, Perú. 7-11.
11. **Rabiela, M., Rivas, A., Flisser, A.** (1989) Morphological types of *Taenia solium* cysticerci. *Parasitology Today*.5; 357-359.
12. **Gutierrez, Y.**, (1997) *Cysticercus racemosus* type, *coernuros* and *sparganum* of the central nervous system. Biology, anatomy and clinical manifestation. In: Arriaga, R., Nogales-Gaete, J., Werner, A., (eds), *Neurocisticercosis. Aspectos epidemiológicos, patológicos, inmunológicos, clínicos, imagenológicos y terapéuticos*. Arrynog Ediciones. Santiago, Chile. 31-44.
13. **Alarcón, G.**, (1999) Etiología de la cisticercosis. In: Alarcón, G.T., (ed). *Cisticercosis del Sistema Nervioso*. Adad Cía Ltda. Ecuador. 79-106.
14. **Zenteno-Alanís, G.**, (1982) A classification of human cysticercosis. In: Flisser, A., (ed). *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Academic Press. New York, U.S.A. 107-126.
15. **Del Brutto, O.H.**, (1997). Epilepsia y neurocisticercosis. In: Arriaga, R., Nogales-Gaete, J., Werner, A., (eds), *Neurocisticercosis. Aspectos epidemiológicos, patológicos, inmunológicos, clínicos, imagenológicos y terapéuticos*. Arrynog Ediciones. Santiago, Chile. 153-160.
16. **Sotelo, J., Flisser, A.**, (1997). Neurocisticercosis. Practical Treatment Guidelines. *CNS Drugs*. 7; 17-25.
17. **Freeman, R.**, (1962). Studies on the biology of *Taenia crassiceps*. (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Can. J. Zool.* 40; 969-990.
18. **Freeman, R., Murray, F., Shea, M.**, (1973) Intraocular *Taenia crassiceps* (cestoda) Part II. The Parasite. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 22; 493-495.
19. **Dorais, F., Esch, G.**, (1969). Growth rate of two *Taenia crassiceps* strains. *Exp. Parasitol.* 25; 395-398.
20. **Larralde, C., Sciutto, E., Huerta, L., Terrazas, I., Fragoso, G., Trueba, L., Lemus, D.**, (1989). Experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: Factors involved in susceptibility. *Acta Leidensia*. 57 (2); 131-134.

21. **Lumsden, R.**, Voge, M., Sogandares-Bernal, F., (1982). The metacestode tegument: Fine structure, development, topochemistry and interactions with the host. In: Flisser, A., (ed). *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Academic Press. New York, U.S.A. 307-361.
22. **Ambrosio, J.**, (1991). Estudio de la internalización de macromoléculas en cisticercos de *Taenia crassiceps*. *Tesis de Maestría*, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
23. **Smyth, J.**, (1981). Physiology of cestodes. In: *Introducción to animal parasitology*. 2a Ed. Hodder and Stoughton. 278-298.
24. **Tegumento de cestodo** © Biodidac, University of Ottawa. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasito/cestodos/img/tegumentoBIODIDAC.jpg>.
25. **Palomares, F.**, (2003). Evaluación del efecto cestocida resultante de la combinación del sulfóxido de albendazol y praziquantel. *Tesis de Maestría*. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Unidad Xochimilco. UAM.
26. **Palomares, F.**, Palencia, G., Pérez, R., Jung, H., (2004). In vitro effect of albendazole sulfoxide and praziquantel against *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cyst. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(6); 2302-2304.
27. **Brown, D.H.**, Matzuk, A., Ilves, I., Peterson, L., Harris, S., Sarett, L., Egerton, J., Yakstis, J., (1961) Antiparasitic drugs. IV. 2-(4'-Thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. *J. Am. Chem. Soc.* 83; 1764-1765.
28. **El-On, J.**, (2003). Benzimidazole treatment of cystic echinococcosis. *Acta Tropica.* 85; 243-252
29. **Ross, M.**, Kwa, M., Grant, W., (1995). New genetic and practical implications of selections for antihelmintic resistance in parasitic nematodes. *Parasitology Today.* 11; 148-150.
30. **Marriner, S.**, Morris, D., Dickson, B., (1986). Pharmacokinetics of albendazole in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 30; 705-708.
31. **Jung, H.**, Hurtado, M., Sánchez, M., (1992). Clinical pharmacokinetic of albendazole in patients with brain cysticercosis. *Clin. Pharmacol.* 32; 28-31.

32. **Rivera, E., Sotelo, M., (1999).** Tratamiento médico. In: Alarcón, G.T., (ed). *Cisticercosis del Sistema Nervioso*. Adad Cía Ltda. Ecuador. 179-192.
33. **Shet, U., (1975).** Mechanisms of anthelmintic action. *Prog. Drug Res.* 19; 147-157.
34. **Lacey, E., (1988).** The role of the cytoskeletal protein, tubuline, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int. J. Parasitol.* 18; 885-936.
35. **Lacey, E., (1990).** Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol. Today.* 6; 112-115.
36. **Friedman, P., Platzer, E., (1980).** Interaction of anthelmintic benzimidazoles with *Ascaris suum* embryonic tubulin. *Biochim. Biophys. Acta.* 630; 271-278.
37. **Stockis, A., Allemon, A., De Bruyn, S., Gengler, C., (2002).** Nitazoxanide pharmacokinetics and tolerability in man using single ascending doses. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 40 (5); 213-220.
38. **Stockis, A., De Bruyn, S., Gengler, C., Rosillon, D., (2002).** Nitazoxanide pharmacokinetics and tolerability in man during 7 days dosing with 0.5g and 1 g b.i.d. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 40 (5); 221-227
39. **Stockis, A., Deroubaix, X., Lins, R., Jeanbaptiste, B., Calderon, P., Rossignol, F., (1996).** Pharmacokinetics of nitazoxanide after single oral dose administration in 6 healthy volunteers. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 34 (8); 349-351.
40. **Broekhuysen, J., Stockis, A., Lins, R., De Graeve, J., Rossignol, J., (2000).** Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 38 (8); 387-394.
41. **Rossignol, F., Maisonneuve, H., (1984).** Nitazoxanide in the treatment of *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana* infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33 (3); 511-512.
42. **Dubreuil, L., Houcke, I., Mouton, Y., Rossignol, F., (1996).** *In vitro* evaluation of activities of nitazoxanida and tizoxanida against anaerobes and aerobic organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40; 2266-2270.
43. **Romero, R., Guerrero, R., Muñoz, M., Geyne, A., (1997).** Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in México. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91; 701-703.
44. **Rossignol, J., Abaza, H., Friedman, H., (1998).** Successful treatment of human fascioliasis with nitazoxanida. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92; 103-104.

45. **Rossignol, F., Ayoub, A., Ayers, M., (2001).** Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*: A prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide. *J. Infect. Dis.* 184; 103-106..
46. **Rossignol, F., Ayoub, A., Ayers, M., (2001).** Treatment of diarrhea caused by *Giardia intestinalis* and *Entamoeba histolytica* or *E. dispar*: A randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide. *J. Infect. Dis.* 184; 381-384.
47. **Sullayman, I., Nolder, D., Warhurst, D., Rossignol, F., (2002).** *In vitro* activity of nitazoxanida and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 49; 103-111.
48. **Dávila, C., Vasquez, C., Trujillo, B., Huerta, M., (2002).** Nitazoxanide compared with quinifamide and mebendazole in the treatment of helminthic infections and intestinal protozoa in children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66 (3); 251-254.
49. **Stettler, M., Fink, R., Walter, M., Gottstein, B., Geary, T., Rossignol, J., Hemphill, A., (2003).** *In vitro* parasitocidal effect of nitazoxanida against *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2); 467-474.
50. **White, C., (2003).** Nitazoxanide: an important advance in anti-parasitic therapy. *Am. J. Med. Hyg.* 68 (4); 382-383.
51. **Díaz, E., Mondragon, J., Ramirez, E., Bernal, R., (2003).** Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in Mexico. *Am. J. Med. Hyg.* 68 (4); 384-385.
52. **Petri, W., (2003).** Therapy of intestinal protozoa. *TRENDS in Parasitology.* 19 (11); 523-526.
53. **Mégraud, F., Occhialini, A., Rossignol, J., (1998).** Nitazoxanide, a potential drug to eradicate *Helicobacter pylori* with no cross resistance to metronidazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42; 2836-2840.
54. **Abboud, P., Lemee, G., Gargala, G., Brasseur, P., Ballet, J., Borsa-Lebas, F., Caron, F., Favanne, L., (2001).** Successful treatment of metronidazole and albendazole-resistant giardiasis with nitazoxanide in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin. Infect. Dis.* 32; 1792-1794

55. **Jung, H., Hurtado, M., Sanchez, M., Medina, M., Sotelo, J.,** (1990). Plasma and CSF levels of albendazole and praziquantel in patients with neurocysticercosis. *Clin. Neuropharmacol.* 13 (6); 559-564.
56. **Lubega, G., Prichard, R.,** (1990). Specific interaction of benzimidazole anthelmintics with tubulin: high-affinity binding and benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 38; 221-232.
57. **Del Bruto, O., Sotelo, J., Roman, G.,** (1993). Therapy for Neurocysticercosis: A reappraisal. *Clin. Infect. Dis.* 17; 730-735.
58. **Sotelo, J., Del Bruto, O.,** (1994) Neurocysticercosis. In: Chopra, J., Sawhney, I., (eds). *Neurology in tropics*. B.I.Churchill Livingstone. U.K. 227-243
59. **Webe, G.,** (1994). Human cysticercosis: Parasitology, pathology, clinical manifestations and available treatment. *Pharm. Ther.* 64; 175-200.
60. **Dayan, A.,** (2003). Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica.* 86; 141-159.
61. **Pawar, N., Dalal, D., Shimpi, S., Mahulikar, P.,** (2004). Studies of antimicrobial activity of N-alkyl and N-acyl 2-(4-thiazolyl)-1-benzimidazoles. *Eur. J. Pharm. Sciences.* 21; 115-118.