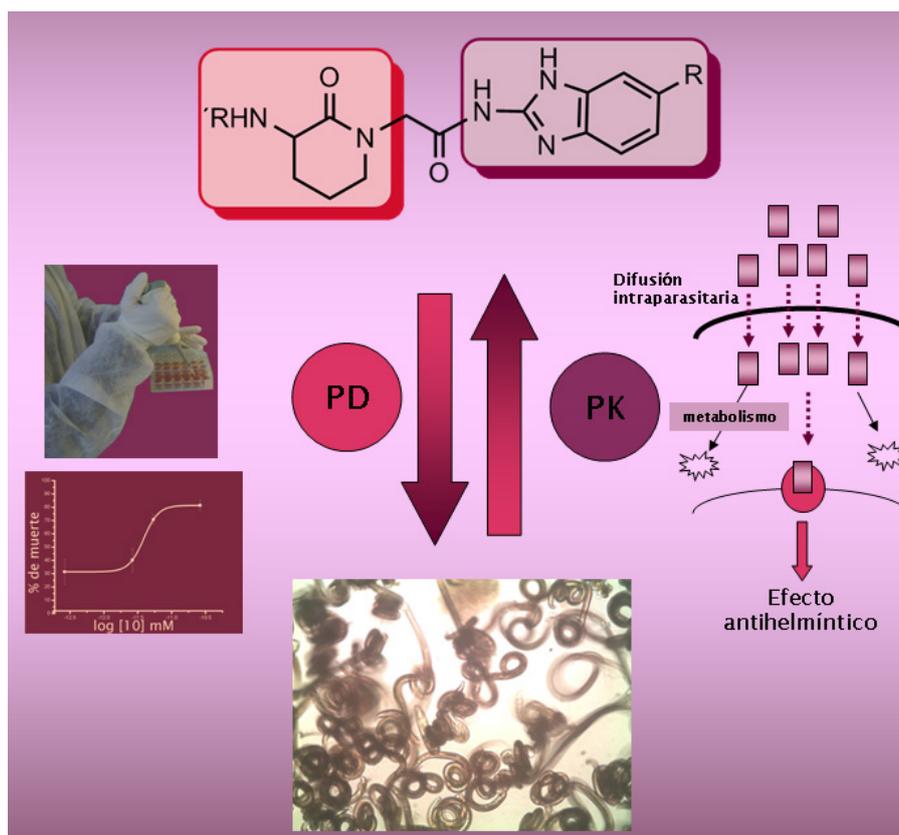


Tesis de Doctorado en Química

Síntesis, caracterización y evaluación biológica de nuevos agentes antiparasitarios



Q.F. Ana Beatriz Munguía Tarallo
Área Farmacología, Depto. CIENFAR
Montevideo, Diciembre de 2014

Universidad de la República
Facultad de Química – PEDECIBA Química

Tesis de Doctorado en Química

Síntesis, caracterización y evaluación biológica de nuevos agentes antiparasitarios

Q.F. Ana Beatriz Munguía Tarallo

Área Farmacología, Depto. CIENFAR, Facultad de
Química

Directores de Tesis:

Dra. Laura Domínguez – Dr. Eduardo Manta

Montevideo, Diciembre de 2014

AGRADECIMIENTOS

A Laura, mi directora de tesis, por haberme guiado no sólo en el ámbito académico, sino también en lo humano. En lo primero, agradecer por la libertad que me ha dado para trabajar, siempre escuchando y “dejando hacer y ser”. En lo humano, gracias por el cariño, por el apoyo en momentos muy duros y también por celebrar conmigo las cosas buenas que han venido. Gracias por acompañarme y ayudarme a crecer.

A mi director, Eduardo, por su apoyo en todo momento y sus numerosos aportes, siempre transmitidos con una gran calidad docente. Gracias por contagiar esa pasión por la química.

A mi compañera de Farmacología-LEA, Jenny Carolina, por el apoyo de siempre y el cariño, por haber realizado los ensayos de actividad antihelmíntica y por aportar siempre su visión de bióloga parasitóloga.

A mis compañeros del grupo Farmacología-LEA, Pablo, Romi, Majo, Xime, Andrés, Maca, Mauri y la benjamina, Eli. Algunos ya en otros lares, pero todos han dejado su huella, gracias por todo lo que me han enseñado, por el cariño que me dan y porque gracias a ustedes he ido estos 8 años a trabajar con alegría. Gracias compas!

A los compañeros del laboratorio de Química Farmacéutica, por todo lo que me ayudaron y me enseñaron, por muchas tardes divertidas.

Al Dr. Ricardo Faccio por sus aportes y ayuda en los cálculos computacionales realizados en esta tesis. Gracias por tanta paciencia y por lograr transmitir conceptos tan complejos con tanta sencillez.

A las Profesoras de Idioma Español, Ana María Tarallo y Graciela Munguía, por su ayuda con la edición de la tesis.

A Horacio Pezaroglo por haber realizado los espectros de RMN.

Al laboratorio de Bioquímica de Facultad de Química, por permitirme realizar las medidas de proteínas en su laboratorio.

Al Área Analítica del Polo Tecnológico de Pando por haber realizado la espectrometría de masas de alta resolución.

Al Laboratorio de Fisiología Biológica de la Facultad de Ciencias, y especialmente a la Dra. Ana Denicola, por haberme “introducido” al mundo de las enzimas y permitirme trabajar y aprender en su laboratorio.

Al Laboratorio de Bioquímica de Facultad de Medicina, y especialmente a la Dra. Lucia Piacenza, por enseñarme y permitirme usar el equipo Odyssey para realizar western blot cuantitativo.

Al Dr. Pablo Alonzo y el Tec. Marcelo López del Campo Experimental del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, y al Dr. Martín Breijo, Prof. Agreg. de la URBE, Facultad de Medicina, por su invaluable colaboración y asistencia técnica para el mantenimiento de la infección artificial de *H. contortus* en ovinos, en el Campo Experimental del Instituto de Higiene.

Al Frigorífico “Las Moras”, Chiadel S.A., La Paz, Canelones, por permitirme ingresar a sus instalaciones y trabajar en su línea de proceso para obtener *H. contortus* de abomasos de ovinos.

Al laboratorio LUSA por la donación de los benzimidazoles antihelmínticos.

Al PEDECIBA Química por su apoyo financiero durante los estudios de posgrado.

A la ANII por el financiamiento de una beca de maestría (Beca BE_POS_2009_1090), una beca de doctorado (BE_POS_2011_1_3544) y el financiamiento de un proyecto de iniciación a la investigación (modalidad III, proyecto FMV_3_2011_1_6177) siendo la responsable quien suscribe.

A INIA por el financiamiento del proyecto n°259, a cargo de la Dra. Laura Domínguez, en el marco del cual se realizaron las primeras gestiones para importar la cepa Kirby de *H. contortus* y mantenerla en el Campo Experimental del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina.

A la CAP por el financiamiento de una beca de doctorado.

A la Facultad de Química, docentes, funcionarios y estudiantes, por hacer de esta casa de estudios mi segundo hogar.

A mis amigos, por estar siempre, compartiendo alegrías y tristezas, dando fuerzas cuando una no las tiene.

A mi hermana de la vida, Patricia, gracias por toda una vida de amistad.

A mis suegros, porque me han recibido con tanto amor en su familia. Gracias por su fortaleza, son un ejemplo de vida. A Nico, gracias por tu lucha y tu valor, gracias por enseñarnos lo que es realmente importante en la vida.

A mi familia que se encuentra del otro lado del charco, gracias por tanto cariño y por haberme apoyado siempre, a pesar de los 10000 km de distancia. A mi Mamina, la persona más sabia sobre la tierra, gracias por ese infinito amor de abuela.

A mi familia, por el apoyo y el amor incondicional, porque siempre han creído en mí. A mi madre, luchadora incansable, que nos ha dado todo y más, gracias infinitas. A mi padre, por alimentar mi curiosidad científica desde chiquita y por seguirnos cuidando, desde dónde esté. A mi hermana y amiga, un cable a tierra que no me permite perder la perspectiva y que hace un año nos dio el regalo más hermoso de la vida, León.

A Ricardo, compañero de todas las horas, siempre creyendo en mí, no existen palabras para agradecer tanto amor. Gracias por estos 11 años juntos, vamos por más, siempre juntos, siempre fuertes.

A mi madre

RESUMEN

El trabajo desarrollado en la presente tesis doctoral se enmarcó en una línea de investigación interdisciplinaria del grupo en la búsqueda y desarrollo de nuevos antihelmínticos. Dentro de los antecedentes del mismo, fueron sintetizados derivados de 2-amino- δ -valerolactamas, una nueva serie de compuestos que presentaron una importante actividad antihelmíntica *in vitro*, usando el nemátodo de rata *Nippostrongylus brasiliensis*, larva L4, pero con muy baja actividad *in vivo*, en ratas infectadas con dicho nemátodo. Mediante estudios de difusión intraparasitaria *ex vivo* en *N. brasiliensis*, se confirmó la muy baja o nula capacidad de estos derivados valerolactama de ingresar al medio intraparasitario. Estos estudios sentaron las bases para plantear la hipótesis de que la baja eficacia de los compuestos valerolactama se debe a su muy baja capacidad de difusión intraparasitaria.

Considerando las evidencias experimentales mencionadas, en la presente tesis se diseñó la síntesis de nuevos derivados con el objetivo de modificar ciertas propiedades fisicoquímicas, como la lipofilia, y mejorar así los perfiles de difusión intraparasitaria. Para obtener estos nuevos compuestos se recurrió a la estrategia de hibridación molecular, sintetizando una serie de derivados híbridos valerolactama-benzimidazol.

Complementariamente se evaluó la actividad antihelmíntica *in vitro* de los nuevos compuestos, en el modelo de *N. brasiliensis* L4, así como la actividad *in vivo* de uno de los derivados híbridos más promisorios, en ratas infectadas con el mismo nemátodo.

Además, se estudiaron las propiedades fisicoquímicas y electrónicas, mediante cálculos computacionales *ab initio*. Se optimizó la geometría de los compuestos sintetizados y se obtuvieron descriptores fisicoquímicos y electrónicos. La lipofilia fue determinada de forma experimental, mediante método de HPLC de fase reversa.

Finalmente, se desarrollaron y validaron dos modelos de difusión intraparasitaria *ex vivo*, uno de ellos sobre el céstodo *Mesocestoides vogae* (larva tetrathyridia) y otro con el nemátodo de interés en animales de producción, *Haemonchus contortus* (estadio adulto). A través de estos modelos fue posible evaluar la capacidad de difusión intraparasitaria de las moléculas híbridas, y corroborar el acierto de la estrategia de hibridación molecular para mejorar la difusión intraparasitaria. Estos modelos fueron de utilidad además, para estudiar de forma preliminar, la biotransformación que sufren los compuestos ensayados en ambos helmintos, ya que el metabolismo aumentado puede servir para la defensa de los parásitos contra tales fármacos, y por tanto resultar un mecanismo complementario de resistencia a antihelmínticos.

ÍNDICE

Capítulo introductorio Introducción general	pág. 01
Capítulo 1 Síntesis de nuevos derivados híbridos valerolactama- benzimidazol	pág. 43
Anexo Capítulo 1 Espectroscopía RMN	pág. 79
Capítulo 2 Evaluación de la actividad antihelmíntica y aproximación al mecanismo de acción	pág. 97
Capítulo 3 Optimización de la geometría molecular y determinación de descriptores fisicoquímicos y electrónicos	pág. 125
Anexo Capítulo 3 Teoremas de Kohn y Hohenberg	pág. 149
Capítulo 4 Desarrollo de modelo de difusión <i>ex vivo</i> en el céstodo <i>Mesocestoides vogae</i> (larva tetrathyridia)	pág. 151
Capítulo 5 Desarrollo de modelo de difusión <i>ex vivo</i> en el nemátodo <i>Haemonchus contortus</i> (estadio adulto)	pág. 175
Capítulo 6 Conclusiones generales y perspectivas	pág. 207
Anexo Capítulo 6. Trabajos publicados en el marco de la presente tesis	pág. 215
Acta de la defensa de la presente tesis doctoral.	pág. 231

CAPÍTULO INTRODUCTORIO

Introducción general

Introducción	pág. 03
Antecedentes	pág. 23
Bibliografía	pág. 31

INTRODUCCIÓN

La problemática de las helmintiasis

Las infecciones provocadas por helmintos en humanos son de las más comunes en países tropicales y en desarrollo. Los lugares con mayores niveles de infecciones por helmintos se encuentran en las regiones de África Sub-Sahariana, este de África, Asia y América del Sur, significando más de dos mil millones de personas infectadas (Kumar y Misra-Battacharya, 2013).

Las especies de mayor prevalencia en infecciones en humanos son *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiuria* y anquilostomas como *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale* (de Silva *et al.*, 2003). El riesgo de morbilidad generada por las infecciones con nemátodos intestinales en humanos está relacionado fuertemente con el número de parásitos que alberga un individuo (intensidad de la infección) y la presentación de la morbilidad se relaciona con la cronología de la infección, migración y desarrollo del parásito en el hospedador humano (Brooker, 2010).

Estos parásitos comprometen el estatus nutricional, afectan los procesos cognitivos, inducen reacciones en tejidos (como granuloma), y provocan obstrucciones intestinales o prolapso rectal (Brooker, 2010). Las infecciones crónicas con estos nemátodos no presentan altas tasas de mortalidad, pero sus efectos de morbilidad pueden agravar cuadros en pacientes enfermos con HIV/ SIDA, tuberculosis, malaria o alergias (Hotze *et al.*, 2006).

Si bien las infecciones por geohelmintos son las de mayor prevalencia, le siguen en importancia las infecciones generadas por nemátodos filarias, provocando filariasis linfática, y schistosomiasis provocada por tremátodos *Schistosoma spp.*

Las infecciones por helmintos no sólo afectan a la salud humana sino también a la salud animal, siendo las helmintiasis en animales de producción una de las limitaciones más importantes en la productividad ganadera a nivel mundial. Los helmintos *Teladorsagia circumcincta*, *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus vitrinus* o *columbriformis* y *Nematodirus battus*, son las especies de nemátodos parásitos de mayor afectación en la producción de ganado ovino en climas templados (Sargison, 2012). Estos parásitos limitan la productividad de animales infectados por diferentes mecanismos: por afectar directamente la alimentación (asociado a cambios hormonales en el hospedador que llevan a una reducción en la ingesta de alimentos, Forbes *et al.*, 2009); por causar daños directos sobre tejidos, afectando la

funcionalidad del órgano; anemia por pérdida de sangre como consecuencia del carácter hematofago del parásito, como es el caso de *H. contortus*. De este modo, los efectos fisiopatológicos netos se reflejarán en desbalance de fluidos y electrolitos, anemia, deficiencia de proteínas, pérdida de peso, diarrea y muerte.

Las infecciones provocadas por nemátodos gastrointestinales en animales de producción.

Las nematodosis gastrointestinales o gastroenteritis verminosas son enfermedades causadas por diferentes géneros de gusanos nemátodos que habitan el tracto digestivo de los rumiantes, caracterizadas por generar inapetencia, síndromes de mala digestión-absorción, anemia, edemas, diarreas, disminución de la producción y en algunos casos, la muerte del animal. Estas parasitosis están ampliamente distribuidas en las zonas tropicales y templadas, lo que garantiza condiciones ambientales apropiadas para la supervivencia de los estadios externos, aumentando las probabilidades para su transmisión a nuevos hospedadores, especialmente animales jóvenes debido a su baja respuesta inmunitaria. Adicionalmente, cuando estas parasitosis se vuelven crónicas, generalmente pasan desapercibidas, causando grandes pérdidas económicas que se mantienen ocultas en la productividad disminuida del rebaño.

En las áreas donde se practica ampliamente el pastoreo, Australia, Sudáfrica y Uruguay (como los mayores productores de ovinos), se ha informado que las infecciones por nemátodos son las más importantes dentro de las que afectan al ganado ovino, con pérdidas anuales estimadas en U\$S 222 millones, U\$S 45 millones y U\$S 42 millones respectivamente (Waller, 2006).

Los efectos sobre la capacidad productiva de ganado vacuno infectado con nemátodos gastrointestinales fueron comunicados en varias publicaciones (Shaw *et al.*, 1998; Sanson *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2013) donde se compara la ganancia de peso y producción lechera en animales tratados con antihelmínticos contra animales no tratados que presentan infecciones subclínicas o clínicas con nemátodos gastrointestinales. Como resultado, en aquellos que fueron tratados se observó un incremento de peso de 150 a 315 g/ día, y de 0.35 a 1 kg/ día en la producción de leche, respecto a animales infectados no tratados. Las infecciones por nematodos gastrointestinales llevan a pérdidas en la producción de lana y en el peso que van hasta un 21 y 47% respectivamente (Charlier *et al.*, 2014). Así mismo, en ovejas tratadas con antihelmínticos, su producción lechera aumenta entre un 9 y 40% (Cringoli *et al.*, 2009), y en ovejas prepúberes tratadas versus no tratadas, las primeras

aumentan el número de ciclos estrales (20 vs 7), así como el número y peso de corderos nacidos por oveja (Mavrogianni *et al.*, 2011).

En base a lo expuesto, **el control de las helmintiasis a través del uso de quimioterápicos antihelmínticos**, ha sido la estrategia principalmente utilizada, tanto por eficacia, como seguridad y costos. En la tabla 1 se resumen los mecanismos de acción de los principales fármacos antihelmínticos clásicos (adaptación de Martin, 1997)

Tabla 1. Mecanismos de acción de fármacos antihelmínticos clásicos (adaptada de Martin, 1997)

Mecanismo de acción	Principio activo	Año de ingreso al mercado
Agonistas nicotínicos (aumenta entrada de Na ⁺ y Ca ²⁺)	Levamisol Pirantel Morantel	1970s
Inhibidores de acetilcolinesterasa	Haloxon Diclorvos	1960s
Agonistas de GABA (aumenta permeabilidad a Cl)	Piperazina	1950s
Potenciadores de glutamato (aumento de permeabilidad a iones Cl)	Ivermectina Abamectina	1980s
	Milbemicina oxima Doramectina Moxidectina	1990s
Aumento de la permeabilidad al Ca ²⁺	Praziquantel	1970s
Unión a β- tubulinas (evitan polimerización de tubulinas para formar microtúbulos)	Tiabendazol Cambendazol Albendazol Albendazol sulfóxido Febendazol Mebendazol Flubendazol Triclabendazol	1960s y 1970s
Protón ionóforos (desacoplan fosforilación oxidativa)	Closantel Rafoxanida	1980s
Inhibición del metabolismo del malato	Diamfenetida	1970s
Inhibición de fosfoglicerato quinasa y mutasa	Clorsulon	1970s
Inhibición del metabolismo del ácido araquidónico y estimulación de la inmunidad innata	Dietilcarbamazina	1950s

Los benzimidazoles y su uso en la quimioterapia antihelmíntica.

Los benzimidazoles antihelmínticos son uno de los grupos más estudiados y ampliamente difundidos, por su baja toxicidad para el hospedador así como su amplio espectro de acción (nemátodos, céstodos y tremátodos) tanto a nivel veterinario como humano. El efecto antihelmíntico surge por unión selectiva de los benzimidazoles a las β - tubulinas del parásito, llevando a disrupción de los microtúbulos (Tabla 1). Este mecanismo de acción retrasa su inicio respecto al de otros antihelmínticos como la Ivermectina o Levamisol que actúan sobre la coordinación neuromuscular del parásito. Por lo tanto, se *requerirán concentraciones del fármaco sostenidas en el tiempo para asegurar la eliminación de los parásitos*, razón por la cual es relevante el conocimiento de sus propiedades farmacocinéticas (Mottier y Lanusse, 2001).

Dentro de la familia de los benzimidazoles, los derivados metil-carbamatos, como Febendazol (FEB), Albendazol (ABZ) (figura 1) se caracterizan por ser muy poco solubles en agua, produciendo una limitación en su formulación a formas de suspensiones, pastas o gránulos para la administración oral o intrarruminal. Esta baja hidrosolubilidad también conlleva una limitada absorción gastrointestinal (GI). Por consiguiente, dentro de las propiedades biofarmacéuticas que comparte este grupo químico de antihelmínticos, se encuentra la baja biodisponibilidad (fracción de la dosis del principio activo disponible en el tejido blanco), que presentan las formas farmacéuticas comercializadas, y que está ampliamente documentada (Sanyal, 1998; Delatour *et al.*, 1990; Evrard *et al.*, 2002)

En pequeños animales y en el humano, una dosis única de un benzimidazol antihelmíntico es mucho menos efectiva que en rumiantes. El pequeño volumen del tubo digestivo y el corto tiempo de pasaje del contenido GI a lo largo del tracto GI, limitan la disolución y dan lugar a una pobre absorción y baja biodisponibilidad de estos fármacos en monogástricos. Las condiciones fisiológicas diferenciales entre rumiantes y monogástricos, especialmente en la parte anterior del tubo digestivo, presentan diferencias notables en los patrones de absorción GI y en el comportamiento cinético resultante de los fármacos (Lanusse y Prichard, 1993).

Cuando una suspensión antihelmíntica es depositada en el rumen, las partículas sólidas se mezclan y se distribuyen en el contenido ruminal. El gran volumen del rumen y la permanencia prolongada del alimento en el mismo, aumentan el tiempo que estos fármacos permanecen en dicho órgano, retardando su pasaje al tracto GI posterior. Por consiguiente el rumen actúa como reservorio y prolonga la duración del proceso de absorción de los compuestos benzimidazoles, aumentando su biodisponibilidad plasmática, en comparación con los individuos monogástricos.

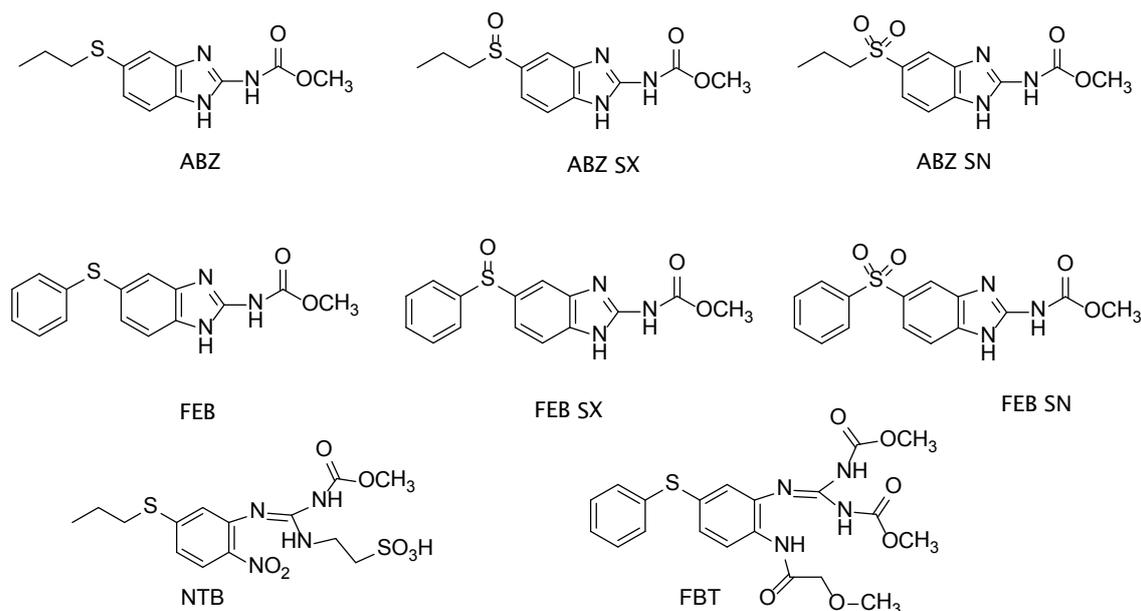


Figura 1. Estructuras químicas de los benzimidazoles antihelmínticos Albendazol (ABZ), Febendazol (FEB), sus metabolitos sulfóxidos (ABZ SX y FEB SX) y sulfonas (ABZ SN y FEB SN) y de las prodrugas Netobimina (NTB) y Febantel (FBT), que sufren biotransformación para dar ABZ y FEB respectivamente.

Una de las características de los benzimidazoles es que poseen un anillo imidazol que contiene un átomo de nitrógeno básico y uno ácido, así pues, la molécula a determinado pH podrá encontrarse protonada ($pK_a \sim 5-6$) o desprotonada ($pK_a \sim 12$) (figura 2) (Danaher *et al.* 2007). Una vez que el fármaco pasa del rumen al abomaso su pH ($pH 2-4$) favorecerá la disolución de los benzimidazoles antihelmínticos respecto al rumen ($pH 5.5-6.5$). Esto se debe a que estos fármacos presentan un pK_a que va desde 6 a 7.8 Del mismo modo, al ser los benzimidazoles bases débiles, se encontrarán mayormente no ionizadas al pH plasmático, favoreciendo su buena distribución tisular y la de sus metabolitos (Lanusse y Prichard, 1993).

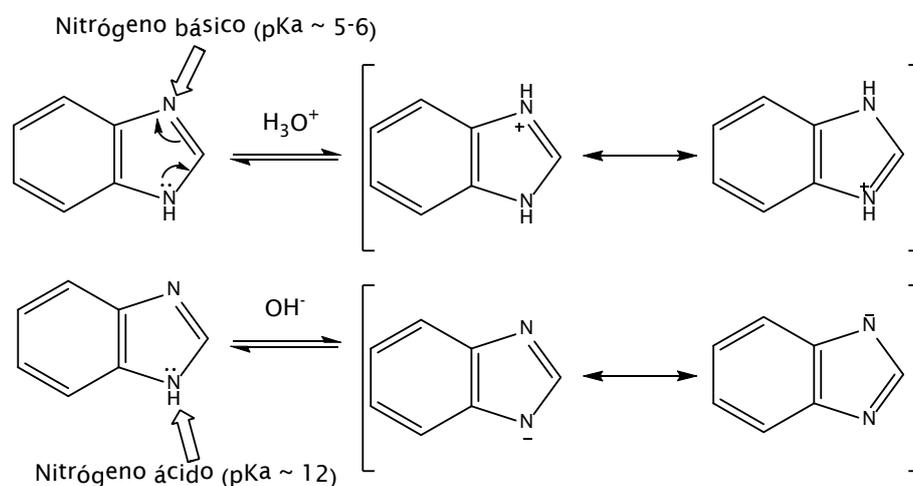


Figura 2. Ionización del anillo benzimidazol en condiciones ácidas o básicas

Una vez absorbidos, los benzimidazoles son extensamente metabolizados principalmente a nivel hepático en todas las especies estudiadas (Gyurik *et al.*, 1981). Para el caso de ABZ y FEB, sus principales metabolitos surgen de la oxidación dando los sulfóxidos ABZ SX y FEB SX (activos) respectivamente y, estos a su vez se oxidan dando las sulfonas correspondientes (inactivas) (figura 1). Si bien el ABZ SX como FEB SX presentan menores afinidades por las tubulinas que sus compuestos precursores, son los principales responsables de la actividad antihelmíntica, dada la corta semivida de eliminación de sus precursores (ABZ, FEB) (Lacey, 1988).

El ABZ no es detectado en plasma luego de administración enteral en ovejas y bovinos acorde a lo mencionado antes, ya que al no alcanzar la circulación sistémica, el ABZ SX puede ser el único metabolito activo que actúe sobre helmintos ubicados en zonas diferentes al tracto GI (ej. *Fasciola hepatica* que se ubica en conductos biliares o para el caso de parásitos pulmonares) (Álvarez *et al.*, 1999). Este hecho podría explicar, sumado a una menor capacidad de difusión de las barreras parasitarias de dichos metabolitos (ver más adelante), la baja eficacia que presentan ABZ y FEB para tratar las parasitosis sistémicas.

Los benzimidazoles antihelmínticos y el tratamiento de parasitosis sistémicas

Debido a la baja biodisponibilidad mencionada que presentan los benzimidazoles antihelmínticos comercializados, se han ensayado y comunicado diferentes estrategias para mejorarla, principalmente para aumentar la eficacia en parasitosis sistémicas, que consistieron en:

a) *La administración de profármacos.* Se trata de una conocida estrategia para mejorar, entre otros, la absorción de fármacos. Consiste en modificaciones químicas sobre la molécula de interés, a efectos de mejorar su solubilidad, y por tanto su biodisponibilidad. Los profármacos son inactivos *per se* y requieren de conversión enzimática para escindir y liberar el fármaco activo al tejido blanco de interés. Los profármacos netobimina (Hapadex, Intervet-Shering-Plough) y febantel (Bayverm, Bayer) ejemplifican profármacos de ABZ y FEB (figura 1), respectivamente. Estrategias análogas se han aplicado sobre el mebendazol (Nielsen *et al.*, 1994)

b) *La administración de los metabolitos ABZ SX o FEB SX:* bajo la hipótesis de que su mayor hidrosolubilidad permitiría una mejor solubilización, favoreciendo su absorción GI se han desarrollado especialidades farmacéuticas con ABZ SX o FEB SX, como principio activo. A pesar de su menor afinidad por las tubulinas, respecto a ABZ o FEB, las concentraciones sistémicas elevadas de los sulfóxidos (Domínguez *et al.*, 1995), podrían compensar parcialmente su menor afinidad por su blanco farmacológico. Esto

explicaría resultados de eficacia similares cuando se comparan iguales formulaciones con dosis menores del compuesto sulfóxido (4.5 mg/kg para FEB SX, oral en ovinos) respecto a su precursor (7.5 mg/kg para FEB, oral en ovinos).

c) *Tecnología farmacéutica*: el estudio y desarrollo de formulaciones innovadoras para los benzimidazoles antihelmínticos, con el objetivo de incrementar su biodisponibilidad, también ha sido explorado. En este sentido, se desarrollaron matrices lipídicas para favorecer la absorción y lograr aumentar la biodisponibilidad de ABZ (Savio *et al.*, 1998) y de ABZ SX (Domínguez *et al.*, 1998). A su vez, se usó como estrategia farmacotécnica a las dispersiones sólidas, incorporando a los benzimidazoles en carriers hidrofílicos (ejemplo, poloxamer 188, polietilenglicol 6000, etc). Las formulaciones fueron evaluadas en perros (Castro *et al.*, 2013a) y en ratones (Castro *et al.*, 2013b), resultando en ambos modelos un incremento de la biodisponibilidad de ABZ comparando contra formulaciones convencionales.

Los benzimidazoles antihelmínticos y el tratamiento de parasitosis gastrointestinales en rumiantes

Sin embargo, en rumiantes, y en particular para infecciones parasitarias GI (no sistémicas) se justifican otras estrategias para mejorar la eficacia de tratamientos con benzimidazoles antihelmínticos.

En el caso de los rumiantes, se ha comunicado que los sulfóxidos de los benzimidazoles pueden sufrir reducción por parte de la flora bacteriana. En particular, el ABZ SX que es distribuido al rumen o intestino, puede ser reducido a ABZ por la flora bacteriana de dichos órganos, pudiendo funcionar como fuente o aporte de ABZ en el tracto GI. *Ésta sulforeducción puede ser de notable importancia para la eficacia de éstos fármacos sobre parásitos GI*, ya que como se mencionara antes, la potencia de los compuestos precursores sobre las tubulinas es mayor que para los sulfóxidos. Esta interesante observación fue confirmada al estudiar la captación de ABZ y ABZ SX por parte de especímenes de *H. contortus* recuperados de abomasos de ovinos tratados con ABZ intraruminal (Álvarez *et al.*, 2000). Efectivamente, se confirmaron mayores concentraciones intraparasitarias para ABZ que para ABZ SX en *H. contortus* recuperados de dichos abomasos.

Por otra parte, resulta oportuno mencionar otros abordajes interesantes desde la tecnología farmacéutica. Las mismas han tenido en cuenta las particularidades discutidas previamente en relación a: las claras diferencias del tracto gastrointestinal de los rumiantes respecto a monogástricos; que el tracto GI resulta el tejido blanco donde se alojan parásitos como *H. contortus* (abomaso); evidencias experimentales

como las mencionadas para el ABZ, el cual ingresa al parásito desde los reservorios mucosa y el fluido abomasal.

Efectivamente, y contrario a buscar aumentar la biodisponibilidad sistémica de los benzimidazoles antihelmínticos, se han diseñado dispositivos intraruminales para mantener y/o liberar concentraciones del antihelmíntico en el rumen y de allí al abomaso, de manera controlada en el tiempo. Básicamente se ha trabajado en los siguientes dispositivos: de disolución simple o sistemas de desintegración, los cuales tienen un control limitado sobre la velocidad de liberación del principio activo; sistemas de matrices con liberación retardada del principio activo; sistemas de liberación continua del activo; sistema de liberación del activo en pulsos (Vandamme y Ellis, 2004), en la tabla 2 se ejemplifican algunos de estos dispositivos que llegaron a ser comercializados para bovinos.

Tabla 2. Dispositivos de liberación ruminal comercializados (adaptación de Vandamme y Ellis, 2004)

Marca comercial	Material utilizado	Método y duración de la liberación	Fármaco formulado	Cantidad de fármaco utilizado en la formulación de cada dispositivo	Dosis habitual en bovinos (oral, mg/kg)/ cantidad de fármaco (g) para bovinos de 400 kg
Paratec Flex [®]	Etilvinil acetato	Sistema de matriz (± 90 días)	Morantel tartrato	19.8 g	10/ 4
Chronomint ic [®]	Etilvinil acetato + polvo de hierro	Sistema de matriz (± 90 días)	Levamisol clorhidrato	22.05 g	7.5/ 3
Repidose [®]	Hierro, polivinil cloruro, varilla metálica bioerosionable	Sistema de liberación en pulsos (5 x 21-23 días)	Oxfendazol (FEB SX)	7.5 g	2.5/ 1
Ivomec SR Bolus [®]	Membrana semipermeable (acetato de celulosa) y una tableta osmótica	Sistema de liberación prolongada (± 135 días)	Ivermectina	1.72 g	0.2/ 0.08

Dentro de las posibles razones por las cuales algunos de los dispositivos presentados en la tabla 2 no resultaron fructíferos en el mercado se encuentran: la cantidad de principio activo que implica por dispositivo (entre 5-21 veces mayor que la empleada por animal dosificado con formas farmacéuticas convencionales); los altos costos de los materiales para fabricar los dispositivos; los tiempos de espera para consumo de la carne o la leche de los animales tratados (para Repidose[®] el tiempo de

espera para consumir la carne de los animales tratados es de 7 meses y no está aprobado su uso en vacas lecheras cuya leche sea para consumo humano).

Llegado a este punto, surge que el principio universal en el que converge la farmacocinética (qué le hace el organismo al fármaco) y la farmacodinamia (qué le hace el fármaco al organismo), definiendo la concentración disponible de fármaco que llega al tejido blanco de interés, se torna más complejo cuando se considera una patología como las helmintiasis y la relación hospedador-parásito.

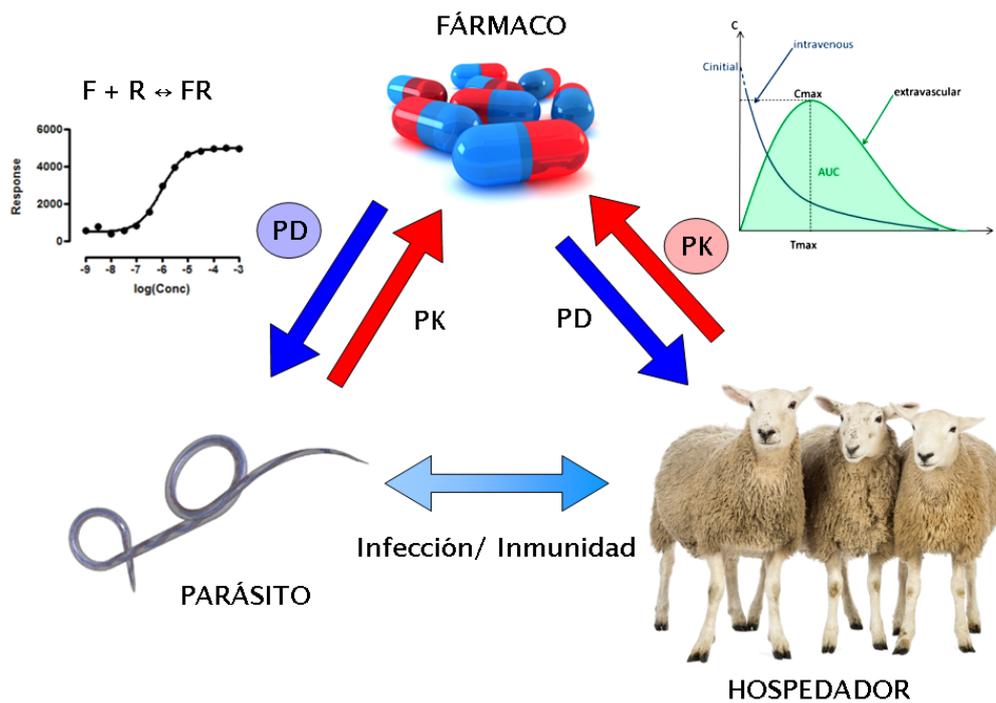


Figura 3. Se muestra en esta figura la interrelación entre el fármaco antihelmíntico, el parásito y el hospedador, quedando en evidencia que la interacción del fármaco con su blanco (farmacodinamia, PD), dependerá no solo de aspectos farmacocinéticos (PK) del hospedador, sino también del parásito.

Efectivamente, como se muestra en la figura 3, no sólo los aspectos vinculados al hospedador (farmacodinámicos: PD, y farmacocinéticos: PK) que definen, como se dijo, la llegada de un fármaco en concentración y tiempo suficiente al tejido blanco para desencadenar el efecto, deben ser considerados para interpretar la eficacia de un tratamiento de helmintiasis por un fármaco, sino además la PD y PK del propio parásito sobre el fármaco.

Este enfoque resulta bastante novedoso, en cuanto al aporte e incluso sobre el éxito de la intervención farmacológica prevista sobre el parásito. Una vez que el fármaco alcanza el tejido blanco donde se instala el parásito a desafiar, debe atravesar

la barrera externa parasitaria (difusión intraparasitaria) para alcanzar su blanco de acción y desencadenar el efecto antihelmíntico (ver capítulo 4, figura 4.2).

Existen varias contribuciones comunicadas al respecto (Álvarez *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2007; Vokřál *et al.*, 2013) que demostraron experimentalmente esta observación y orientaron para modificar regímenes terapéuticos, entre otras.

En este trabajo, se aportarán nuevas evidencias con un enfoque diferente, sobre cómo el uso de ensayos de difusión intraparasitaria permitieron explicar observaciones (como falta de eficacia *in vivo* de nuevos fármacos activos *in vitro*), así como resultar ser una herramienta útil para la optimización de nuevos antihelmínticos.

Nuevos fármacos antihelmínticos introducidos en el mercado.

En suma, los problemas clínicos y económicos generados por helmintiasis en especies productivas, contaron durante décadas, con un importante arsenal terapéutico de antihelmínticos eficaces, seguros, de bajos costos y con variados mecanismos de acción, así como de amplio espectro de acción. Esta "era de oro" en la que el control químico de las helmintiasis en especies productivas fue exitosa, justificó que no fueran registrados en el mercado nuevos antihelmínticos por un periodo de 30 años (Epe y Kaminsky, 2013).

Sin embargo, con la aparición de resistencia a los antihelmínticos comercializados en animales de producción, incluidas las lactonas macrocíclicas de última generación y amplio espectro de acción, se instaló un fenómeno mundial, descrito en ascenso y de gran impacto y preocupación para el sector productivo (Kaplan, 2012).

Desde entonces, se han registrado en el mercado tres nuevas clases de antihelmínticos, los ciclooctadepsipéptidos (emodepside, Profender® en asociación con praziquantel), derivados de amino-acetonitrilos (monepantel, Zolvix®) y derivados de espiroindol (derquantel, Startec®, en combinación con abamectina) (Epe y Kaminsky, 2013) (figura 4).

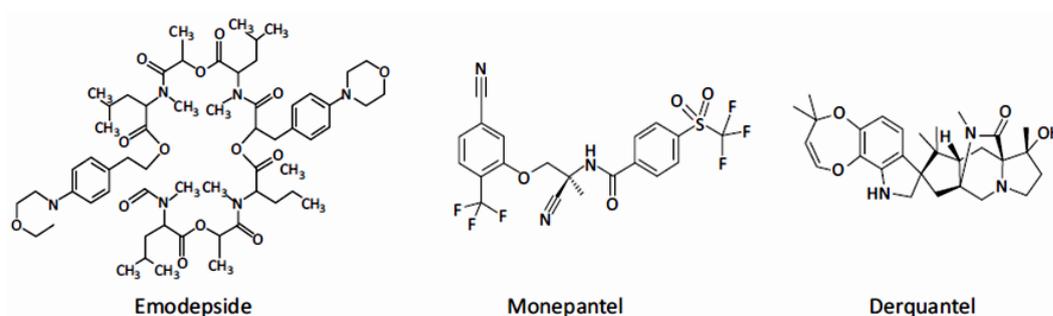


Figura 4. Estructuras químicas de emodepside, derquantel y monepantel

El emodepside pertenece a la familia de los ciclooctadepsipéptidos, es un fármaco semisintético derivado del producto de fermentación PF1022A proveniente del hongo *Mycelia sterilia*. Su mecanismo de acción (figura 5) se basa en la unión a dos blancos. Uno es el receptor acoplado a proteína G tipo-latrofilina presináptico (receptor HC110-R, en *H. contortus*), cuya unión produce el bloqueo de la entrada de calcio a la célula (Saeger *et al.*, 2001). El segundo blanco, considerado el principal, es el canal iónico de potasio, activado por calcio, SLO-1 (Guest *et al.*, 2007), cuya unión genera su activación y aumento del eflujo de potasio al medio extracelular, generando hiperpolarización de membrana.

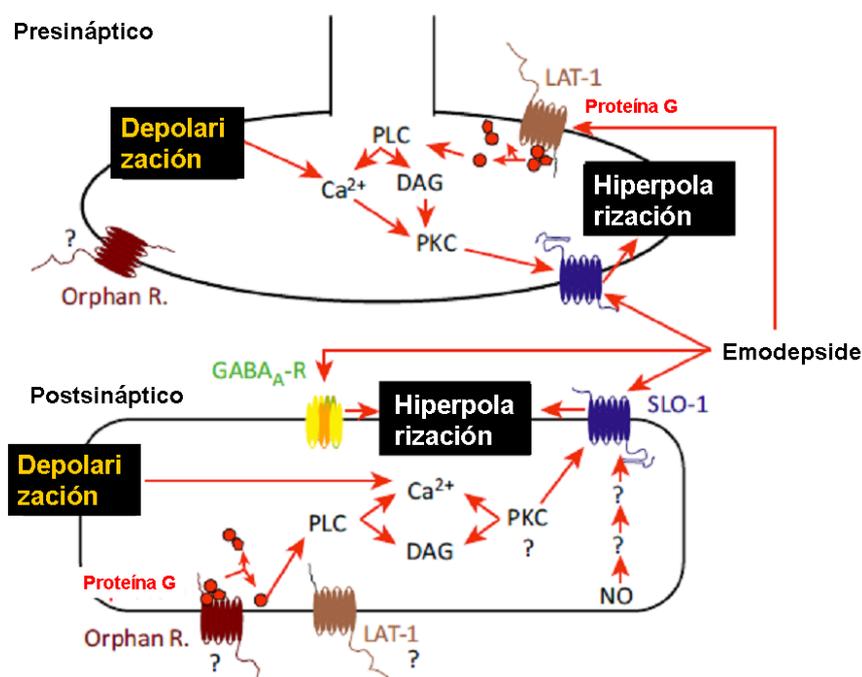


Figura 5. Mecanismo de acción de emodepside. Este fármaco desarrolla su efecto a través de la interacción con el receptor acoplado a proteína G, tipo latrofilina (LAT-1), antagonizando el mismo, y actuando sobre el canal de potasio activado por calcio (SLO-1), activando el mismo (figura adaptada de Krüken, *et al.*, 2012)

El fármaco monepantel, derivado de amino-acetonitrilos, es un modulador alostérico positivo de los receptores nicotínicos de la subfamilia DEG-3, exclusivos de

nemátodos (MPTL-1 en *H. contortus* y ACR-23 en *C. elegans*, ambas son homoméricas) (Rufener *et al.*, 2009; Rufener *et al.*, 2013; Baur *et al.*, 2014) (figura 6). El receptor nicotínico blanco para los agonistas nicotínicos clásicos, como levamisol, presenta una composición en sus subunidades diferentes a la de los receptores nicotínicos sobre los que actúa el monepantel (Holden-Dye *et al.*, 2013), esto explica por qué monepantel presenta eficacia sobre nemátodos resistentes a levamisol (Kaminsky *et al.*, 2008).

Por otra parte, derquantel es un antagonista selectivo del receptor nicotínico subtipo B, en músculo de nemátodos (Qian *et al.*, 2006). El compuesto tiene un mayor efecto antagonista sobre el receptor nicotínico susceptible a pirantel, que sobre el receptor sensible a levamisol (Buxton *et al.*, 2014).

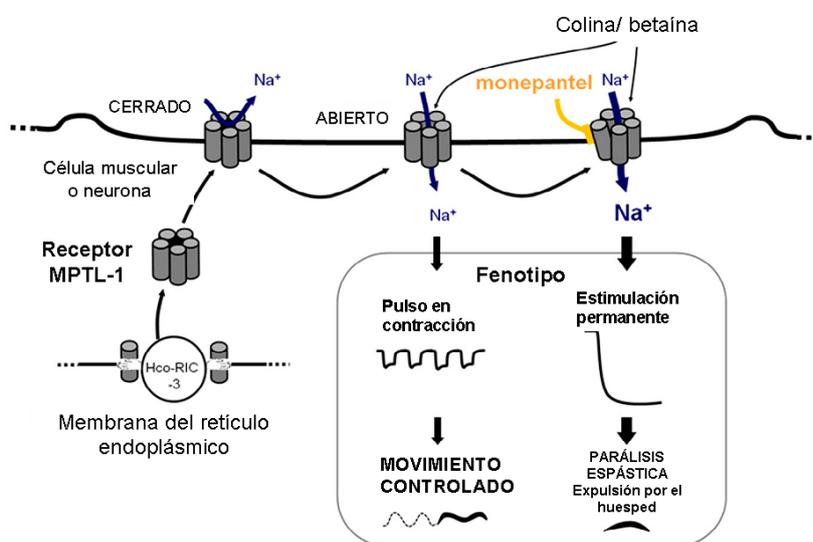


Figura 6. Mecanismo de acción de monepantel. Se ilustra la interacción del monepantel con su ligando en *H. contortus*, Hco-MPTL-1, un receptor nicotínico. La unión del ligando endógeno colina o betaína al receptor produce la apertura de un canal de sodio, permitiendo la entrada del ion al medio intracelular, generando despolarización. La interacción de monepantel con MPTL-1 resulta en un estímulo permanente o contracción provocando una parálisis espástica y expulsión del parásito por el huésped (figura adaptada de Kotze *et al.*, 2014)

Si bien el desarrollo de estos fármacos resultó del reconocimiento del vacío terapéutico en el que se encuentra el tratamiento de helmintiasis en especies productivas, la experiencia clínica desde su puesta en el mercado es muy escasa como para evaluar su impacto favorable.

El fenómeno del desarrollo de resistencia a los fármacos antihelmínticos

Dentro de las causas más frecuentes que han llevado al desarrollo de resistencia a la gran mayoría de los antihelmínticos disponibles en el mercado, se destacan: el uso intensivo de estos fármacos, la falta de diagnóstico para la selección

del antihelmíntico más adecuado, la calidad e intercambiabilidad de las especialidades farmacéuticas comercializadas (no verificadas), entre otras.

La resistencia a antihelmínticos en nemátodos de rumiantes, principalmente, involucra especies de alto potencial biótico como *H. contortus* y *T. colubriformis*. El primer caso de resistencia a ivermectina fue registrado en Sudáfrica (van Wyk *et al.*, 1988). A lo largo del continente Africano se han comunicado casos de resistencia a antihelmínticos en 14 países, destacando Kenia y Sudáfrica en cantidad de casos, los cuales principalmente involucran a *H. contortus* (Vatta y Lindberb, 2006).

Así mismo en Australia, en el año 2011, entre el 80 y 70% de las granjas presentaban resistencia a avermectinas en *H. contortus* y *T. circumcincta*. La prevalencia de resistencia a benzimidazoles y levamisol es aún mayor, cercana al 100%, y para los nemátodos *T. circumcincta* y *Trichostrongylus spp.* Recientemente, en el año 2013, se informó el primer caso de resistencia al nuevo fármaco Monepantel (ingresado al mercado en 2009), en una granja de cabras, en Nueva Zelanda. Los nemátodos aislados que desarrollaron resistencia fueron *T. circumcincta* y *T. colubriformis* (Scott *et al.* 2013).

A pesar de que la velocidad con la que emergen cepas resistentes en zonas de clima templado es lenta, la prevalencia de resistencia está creciendo por toda Europa. La mayoría de los casos relacionados a resistencia a antihelmínticos que se han informado, refieren a benzimidazoles o levamisol, y con número en aumento para lactonas macrocíclicas (Papadopoulos *et al.*, 2008). Por ejemplo, para el año 2009, en el Reino Unido, se encontró que más del 97% de establecimientos de producción de ganado ovino presentaban resistencia a benzimidazoles, y cerca de un 40% a imidazotiazoles como el levamisol, siendo el género predominante *Teladorsagia spp.* (Taylor *et al.*, 2009).

En los países de la región Mediterránea, la resistencia a antihelmínticos también está presente, pero aún no ha alcanzado niveles críticos. En España, por ejemplo, la resistencia a benzimidazoles antihelmínticos va de un 18 a un 35%, y para las lactonas macrocíclicas entre un 3 y 16%, siendo el género predominante *Trichostrongylus spp.* (Papadopoulos, *et al.*, 2012).

En el continente Americano, la situación de resistencia a antihelmínticos ha sido explorada principalmente en el sur del continente (Argentina, Brasil y Uruguay), donde la industria de ganado ovino es de mayor importancia. Estos países, junto con Paraguay, forman el área del continente con mayor prevalencia de ovinos infectados con helmintos resistentes. En la tabla 3 (adaptación de Torres-Acosta *et al.*, 2012) se

informan los casos reportados de resistencia en ovinos, en establecimientos del continente Americano.

Particularmente en Uruguay, el 91% de la superficie se encuentra bajo pastoreo, y el 6.5% del PBI se debe a producción ganadera. El fenómeno de resistencia a antihelmínticos en nuestro país ha sido descrito por el grupo del Dr. Nari y colaboradores (Nari *et al.* 1996), donde se realizó un relevamiento en granjas de nuestro país, abarcando el 80% de la población de ovinos. Dicho estudio reveló que el género *Haemonchus* presentó resistencia a los 3 grupos de antihelmínticos estudiados (Albendazol, Levamisol e Ivermectina). Otro estudio más reciente (Mederos *et al.*, 2005), retrospectivo a diagnósticos de resistencia antihelmíntica en ovinos realizados durante 2000-2005 por el Laboratorio de Salud Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), mostró que el 97.7% de los casos presentaban resistencia a Benzimidazoles, el 82.3% a Levamisol, 28.5% a Moxidectina y el 89.2% a Ivermectina, siendo los géneros involucrados *Haemonchus* y *Trichostrongylus*. **Estos resultados revelaron una tendencia alarmante de resistencia antihelmíntica en ovinos en Uruguay con pronunciado aumento en la última década.**

Tabla 3. Datos de reportes de resistencia a antihelmínticos en ovinos infectados con nemátodos gastrointestinales en el continente Americano (adaptación de Torres-Acosta *et al.*, 2012).

País	Porcentaje de establecimientos que presentaron resistencia a:							Género de parásitos	N° de granjas	Año del reporte
	BZ	LEV	IVM	MOX	CLO	Comb	Mult			
Brasil	90	84	13	-	20	73	NR	<i>H, Tel, Tri</i>	182	1996
	100	66	100	-	100	33	100	NR	6	1996
	100	95	28	-	-	-	79	<i>H, Tri</i>	29	1997
	88	41	59	-	-	-	64	<i>H, Tri, Oes</i>	16	2003
	88	38	78	23	56	38	NR	<i>H, Tel, Tri, C.</i>	42	2004
	100	86	100	86	93	75	100	<i>H, Tel, Tri, C.</i>	16	2010
								<i>Oes</i>		
	89	30	80	33	80	-	100	NR	10	2010
Argentina	40	22	6	-	-	11	20	<i>H, Tel, Tri</i>	65	1996
	53	25	50	-	56	-	50	NR	32	2005
Uruguay	80	71	1	-	-	-	65	<i>H, Tel, Tri</i>	252	1996
	80	60	60	-	-	-	NR	<i>H, Tel, Tri</i>	25	2002
	91	65	65	0	62	-	NR	NR	23	2003
	96	80	85	26	90	-	NR	NR	82	2003
Paraguay	73	68	73	-	-	-	NR	NR	37	1996
USA	96	53	65	15	-	-	42	<i>H</i>	26	2008
	100	50	100	-	-	-	NR	<i>Tri</i>	2	2008
México	25	-	-	-	-	-	-	<i>H, Tel, Tri, C.</i>	8	2003
	58	0	36	-	-	-	18	<i>H, Tri.</i>	12	2003
	15	-	-	-	-	-	-	<i>H</i>	38	2003
	100	16	72	-	-	-	58	NR	19	2005
	0	-	10	-	-	-	-	<i>H, Tel</i>	20	2006
	78	0	17	-	-	-	9	<i>H, Tri</i>	24	2007
	74	0	65	-	-	-	53	<i>H, Tri</i>	20	2007
Cuba	0	50	0	-	-	50	-	<i>Tri</i>	2	2004
Nicaragua	0	33	33	-	-	-	33	NR	3	2005
Costa Rica	85	-	71	-	-	-	NR	<i>H, Tri</i>	7	2009

Legenda: BZ: benzimidazoles; LEV: levamisol; IVM: ivermectina; MOX: moxidectina; CLO: closantel; Comb.: combinaciones; Mult.: múltiple; *H*: *Haemonchus spp.*; *Tel*: *Teladorsagia spp.*; *Tri*: *Trichostrongylus spp.*; *C*: *Cooperia spp.*; *Oes*: *Oesophagostomum spp.*; -: no incluido en el estudio; NR: no reportado.

La resistencia a agentes quimioterápicos es un problema ampliamente establecido en la terapéutica, donde un tratamiento que inicialmente era eficaz para

eliminar un invasor (ej. patógeno, tumor) deja de serlo. Los conocimientos acerca de los mecanismo de resistencia a quimioterápicos provienen principalmente del campo de los antineoplásicos, donde es claro que la resistencia celular puede ser inherente (donde las células no son susceptibles al fármaco desde un comienzo) o adquirida (donde las células en un comienzo fueron susceptibles al fármaco y luego se convierten en resistentes) (James *et al.*, 2009)

Los mecanismos de resistencia generalmente están asociados a cambios en la proteína blanco del fármaco, o por modulación de la concentración del fármaco en el sitio de acción. Tanto en la quimioterapia para el cáncer, como bacterias y parásitos (particularmente helmintos), se ha visto que dicha resistencia puede ocurrir por cambios o mutaciones en el gen que codifica para el blanco del quimioterápico, lo que lleva a una disminución en la unión del principio activo a su blanco. También existen otras vías por las cuales el efecto se puede ver disminuido, como por ejemplo, cambios en las enzimas que se encargan de metabolizar los quimioterápicos para su eliminación, así como un aumento en la expresión de proteínas de eflujo que son capaces de expulsar el fármaco hacia el exterior celular. Estas últimas dos vías son además, mecanismos de resistencia a múltiples drogas (James *et al.*, 2009) (figura 7).

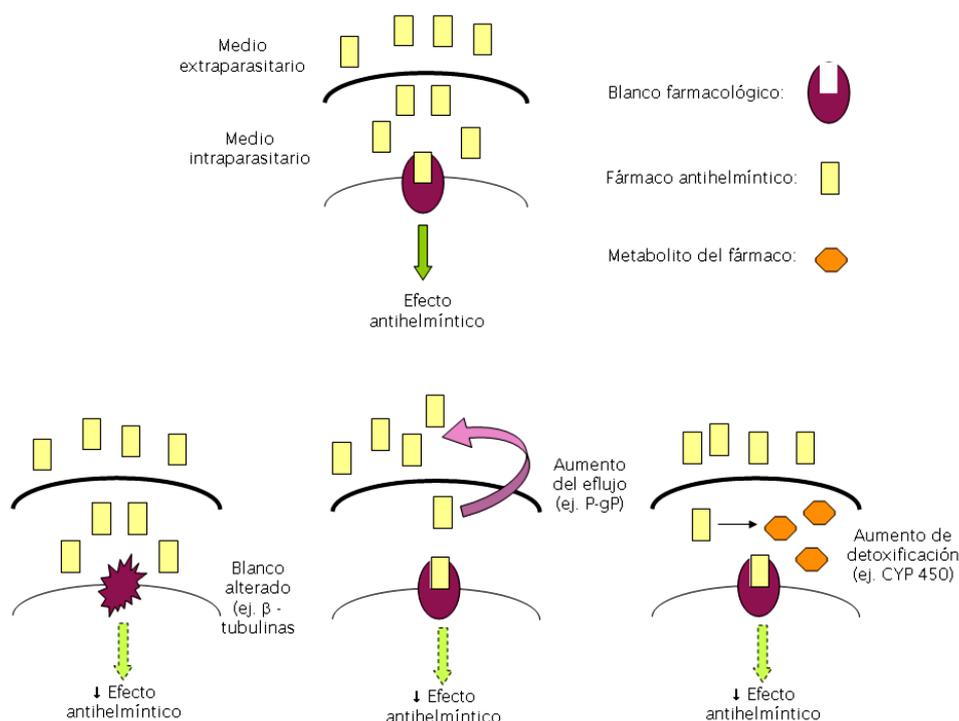


Figura 7. Representación esquemática de los principales mecanismos de resistencia a los fármacos antihelmínticos. La capacidad del fármaco para ingresar al medio intraparásitario y unirse a su blanco para desencadenar el efecto antihelmíntico (ejemplificado en la parte superior del esquema) puede verse disminuido por diferentes mecanismos, como: aumento del eflujo al medio extraparásitario; aumento de la metabolización parasitaria (detoxificación) del fármaco antihelmíntico, o cambios en el blanco farmacológico que afecta la unión del fármaco.

A continuación se profundizará en algunos de estos mecanismos de resistencia, al estado actual de conocimiento en helmintos.

Cambios genéticos en el blanco molecular del fármaco antihelmíntico y resistencia

Las poblaciones de parásitos son genéticamente heterogéneas, y esta diversidad genética lleva a variaciones en la respuesta a los fármacos. Varios polimorfismos de un único nucleótido (*single- nucleotide polymorphisms, SNPs*) se han asociado con resistencia. El cambio en un único nucleótido puede llevar a una sustitución en un aminoácido en la proteína blanco del antihelmíntico, y ese cambio puede afectar la afinidad del fármaco por su blanco, llevando a una disminución de la eficacia.

Muchos trabajos experimentales han tratado de asociar las mutaciones específicas con las poblaciones resistentes, destacando dentro de las más estudiadas aquellas vinculadas a la resistencia a benzimidazoles antihelmínticos.

Los benzimidazoles actúan sobre la proteína β - tubulina, evitando la formación de los microtúbulos y por ende lleva a la muerte parasitaria (ya que el rol fisiológico de los microtúbulos dentro del citoesqueleto resulta fundamental para el desarrollo, crecimiento, y procesos de detoxificación celular). La resistencia a estos fármacos está asociada a varias SNPs en el gen que codifica para su blanco, el isotipo 1 de β -tubulinas, en las cuales se sustituyen: la fenilalanina (Phe) por tirosina (Tyr) en las posiciones 200 (F200Y, Kwa *et al* 1993, 1994) y 167 (F167Y, Silvestre y Cabaret, 2002) y en la posición 198 donde se sustituye glutamato (Glu) por alanina (Ala) (E198A, Ghisi *et al* 2007), siendo la de mayor importancia F200Y respecto al fenotipo resistente a benzimidazoles.

Así mismo, se ha visto que la relevancia de las diferentes SNPs para generar un fenotipo resistente a benzimidazoles, difiere entre especies de parásitos, e inclusive entre cepas de la misma especie (Kotze *et al.* 2014). Por este motivo, se debe estudiar en mayor profundidad la importancia de cada una de las SNPs, o sea, lograr correlacionar la frecuencia de alelos para una determinada SNP y las consecuencias que trae en el fenotipo (resistencia). En tal sentido, se encontró para una población de *H. contortus*, que aquellos que presentaban mayor nivel de resistencia, eran homocigotos resistentes en la posición 198 (Kotze, *et al.* 2012); mientras que se ha demostrado que una población de *H. contortus* homocigoto resistente en la posición 200 fue la que sobrevivió a la dosis más alta de albendazol (Barrère *et al.*, 2012). Estas diferencias en los resultados recuerda la posibilidad de que el mecanismo de resistencia particular (cambio en el blanco molecular), esté asociado a un mecanismo no específico, como

sobre-expresión de glicoproteína P (P-gPs) o aumento en el metabolismo del fármaco por parte del parásito (Kotze *et al.*, 2014).

Las lactonas macrocíclicas por otro lado, actúan sobre receptores acoplados a canal iónico de cloruro, activados por glutamato (GluCIRs). En el año 1998, Blackhall y colaboradores reportan un aumento en la presencia de un alelo para el gen que codifica la subunidad α del receptor GluCIR (sitio de unión a ivermectina), en cepas de *H. contortus* resistentes a ivermectina y moxidectina. Algo a tener en cuenta, es que dichas cepas de *H. contortus* fueron generadas por exposiciones repetidas a ivermectina o moxidectina en dosis sub-terapéuticas (no fueron aisladas de campos con ovinos infectados). Si bien se ha sugerido en diferentes estudios (Lynagh y Lynch, 2010; El-Abdellati *et al.*, 2011; Williamson *et al.*, 2011) que existen mutaciones en la proteína blanco de las lactonas macrocíclicas, que afectan la susceptibilidad a las mismas, no se ha identificado hasta el momento alguna mutación que explique el fenotipo de resistencia observado en cepas de nemátodos aisladas de campos. Esto lleva a considerar, además, la participación de otros potenciales mecanismos de resistencia, como la expresión aumentada de P-gps (Lespine *et al.*, 2012).

Por otro lado, para levamisol se han encontrado evidencias de una disminución en la expresión de los genes *Hco-unc-63a* y *Hco-unc-29*, que codifican para las subunidades del receptor nicotínico blanco de levamisol (Sarai *et al.*, 2013).

Papel de la familia de transportadores ABC en el desarrollo de resistencia

Las proteínas transportadoras de la superfamilia ABC (*ATP-binding cassette*), dentro de las que se encuentra la glicoproteína- P (P-gp, MDR-1), cumplen un rol fisiológico en la detoxificación celular, al expulsar al medio extracelular, por transporte activo, moléculas endógenas o exógenas.

A diferencia de lo que ocurre para mamíferos, los nemátodos presentan un importante número de genes homólogos a ABCB1 (codifican para P-gps), ABCCs (codifican para *Multidrug resistance proteins, MRPs*) y medio- transportadores (*ABC half transporters*) que se relacionan con la sub-familia (ABCB) (Lespine *et al.*, 2012). En el genoma de *C. elegans* se identificaron sesenta genes correspondientes a transportadores ABC (Sheps *et al.* 2004), sin embargo, varios de estos se encuentran involucrados con el transporte específico de metabolitos endógenos. En *H. contortus* se han reportado las secuencias totales de diez genes que codifican para P-gps (Lainig *et al.*, 2013).

En la tabla 4 (adaptada de Lespine *et al.*, 2012), se resume el rol de los transportadores ABC en la resistencia a antihelmínticos. Así por ejemplo, se estudió el rol de los transportadores MDR, utilizando un marcador fluorescente (rodamina 123) en huevos de *H. contortus* resistentes a tiabendazol y albendazol. Se constató una disminución en la acumulación del marcador en los huevos de las cepas resistentes a benzimidazoles respecto a la susceptible, lo que se asociaría a un aumento en la actividad P-gp en las cepas resistentes (Beugnet *et al.*, 1997).

En el mismo sentido, se ha informado más recientemente cambios en la frecuencia de alelos en un gen que codifica para P-gp, comparando cepas de *H. contortus* resistente y susceptible al benzimidazol cambendazol (Blackhall *et al.*, 2008). También se ha comunicado cambios en el transporte de triclabendazol en *Fasciola hepatica*, comparando una cepa resistente y otra susceptible a triclabendazol, observando concentraciones intraparitarias menores de triclabendazol y su metabolito sulfoxidado en la cepa resistente, estando esto asociado a una actividad incrementada de la P-gp ABCB1. Por lo tanto el mecanismo de eflujo aumentado por P-gp en *F. hepatica* estaría participando en el desarrollo de resistencia a triclabendazol (Mottier, *et al.*, 2006).

Tabla 4. Helmintos en los cuales los transportadores MDR están involucrados en la resistencia a antihelmínticos (adaptación de Lespine *et al.*, 2012)

Helmintos	Antihelmínticos	Evidencia molecular/genética	Referencia	Otras evidencias	Referencia
<i>C. elegans</i>	Ivermectina	Nivel de expresión	James y Davey, 2009		
<i>H. contortus</i>	Ivermectina	Nivel de expresión Cambios en frecuencia de alelos	Xu <i>et al.</i> , 1998; Prichard y Roulet, 2007 Blackhall <i>et al.</i> , 1998; Le Jambre <i>et al.</i> , 1999; Sangster, <i>et al.</i> , 1999.	Agente que inhibe transporte por MDR	Xu <i>et al.</i> , 1998; Molento y Prichard, 1999; Bartley <i>et al.</i> , 2009.
	Cambendazol Tiabendazol	Cambios en frecuencia de alelos	Blackhall <i>et al.</i> , 2008	Agente que inhibe transporte por MDR	Beugnet <i>et al.</i> , 1997
<i>T. circumcincta</i>	Ivermectina	Polimorfismo y nivel de expresión	Dicker <i>et al.</i> , 2011	Agente que inhibe transporte por MDR	Bartley <i>et al.</i> , 2009
<i>F. hepatica</i>	Triclabendazol Triclabendazol sulfóxido			Agente que inhibe transporte por MDR	Mottier <i>et al.</i> , 2006

Para el caso de las lactonas macrocíclicas, se ha comunicado para *C. elegans* una asociación entre la pérdida de funcionalidad de las P-gps y un aumento de susceptibilidad a ivermectina. Se ha propuesto que todas las P-gps en este nemátodo interactúen con dicha lactona macrocíclica, destacando las P-gp1, 2, 8, 9, 11 y 12 (Janssen *et al.*, 2013).

Otro tipo de abordaje que evidencia la participación de transportadores en los mecanismos de resistencia, involucró el estudio de la incidencia de diferentes inhibidores de P-gps sobre la eficacia de ivermectina, tanto en gusanos susceptibles como en la reversión de la falta de respuesta en gusanos resistentes a este antihelmíntico. En efecto, la actividad *in vitro* para ivermectina, en cepas resistentes y susceptibles de *T. circumcincta* y *H. contortus*, aumentó cuando además se incluyeron inhibidores de P-gps (valsopodar, verapamilo y ácido plurónico, Barteley *et al.*, 2009). En estudios comparativos de eficacia en corderos infectados naturalmente con nematodos gastrointestinales resistentes, también demostraron un efecto positivo al coadministrar ivermectina con loperamida (modulador de la P-gP) (Lifschitz *et al.*, 2010)

Existen evidencias para la ivermectina que sugieren un rol modulador sobre los genes que codifican para los transportadores ABC en nemátodos. En efecto, para *C. elegans* se describió una sobre-expresión de varios transportadores ABC en nemátodos expuestos repetidas veces a ivermectina (Ardelli y Prichard, 2008). En el mismo sentido, se ha comunicado una sobre-expresión constitutiva de un número de genes para P-gp en cepas de *H. contortus* resistentes a múltiples fármacos (Williamson *et al.*, 2011).

Estos resultados demuestran la participación de las P-gps de helmintos, en los mecanismos de desarrollo de resistencia a varios fármacos, al contribuir en la reducción de la concentración eficaz del antihelmíntico en su blanco molecular, resultando en pérdida de eficacia. A su vez, la sobre-expresión de P-gps lleva al fenómeno de resistencia cruzada, es decir, una vez que el parásito desarrolla resistencia mediante este mecanismo a un agente como por ejemplo, ivermectina, podrá afectar la concentración intraparasitaria de otros antihelmínticos que sean ligandos de P-gp, como es el caso de triclabendazol, afectando la eficacia de este último también.

Rol del metabolismo de xenobióticos en el desarrollo de resistencia a antihelmínticos

Como se mencionó anteriormente, los mecanismos de resistencia se pueden diferenciar en mecanismos farmacodinámicos-mediados (cambios en el blanco terapéutico) y farmacocinéticos-mediados. Los últimos incluyen procesos como la disminución del ingreso o aumento del eflujo de fármaco al medio extra parasitario, así como el aumento en la inactivación del fármaco (metabolismo), llevando a una disminución de la concentración de fármaco activo en el medio intraparasitario, reduciendo así el efecto.

La información a la fecha respecto a las vías oxidativas involucradas en la detoxificación de xenobióticos por parte de parásitos helmintos, no es del todo clara (Kotze *et al.*, 2006; Cvilink *et al.*, 2009) y, menos aún, su papel como mecanismo complementario en el desarrollo de resistencia a antihelmínticos.

Uno de los pocos ejemplos donde se describe el papel del aumento del metabolismo oxidativo vinculado al posible desarrollo de resistencia, lo constituye el caso del benzimidazol triclabendazol. Efectivamente, para este último se observó una oxidación más importante y rápida, tanto para el propio triclabendazol (para dar el sulfóxido, activo), como para su metabolito activo triclabendazol sulfóxido (para dar la sulfona, inactiva) en la cepa resistente de *F. hepática* (comparado con la cepa susceptible, Álvarez *et al.*, 2005).

Se han desarrollado algunos estudios donde se comparó la biotransformación de ABZ en cepas de *H. contortus* susceptibles y resistentes a antihelmínticos. En ese sentido, no se observaron diferencias relevantes en las enzimas estudiadas con rol oxidativo (peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa), así como se comprobó ausencia de actividad CYP 450 en las diferentes cepas ensayadas. Recientemente, en la misma comunicación, se describe por primera vez actividad de la enzima de fase II UDP-glucosil transferasa en *H. contortus*, la que además resultó mayor en las cepas resistentes (Vokřál *et al.*, 2013).

En este estado del conocimiento, y en base a los antecedentes recogidos, queda claramente expuesta la importancia y prevalencia de las helmintiasis, en particular en especies productivas, y el impacto económico (entre otros) que genera al sector productivo el desarrollo de resistencia a antihelmínticos. Este fenómeno mundialmente descrito con gran preocupación, justifica entre otros, el dedicar esfuerzos para la búsqueda y descubrimiento de nuevas moléculas antihelmínticas y nuevos mecanismos de acción. A su vez, resulta indispensable el abordaje interdisciplinario, profundizando

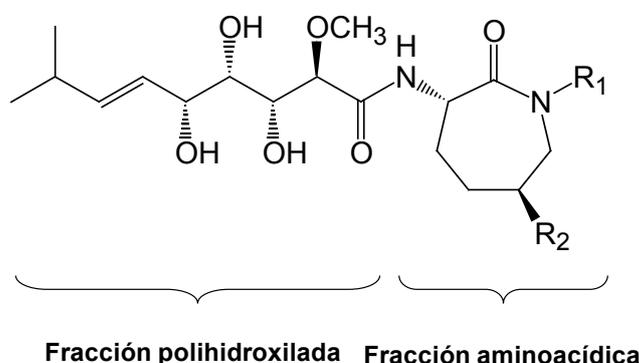
en la comprensión de aspectos moleculares y bioquímicos de los helmintos parásitos, así como los mecanismos de defensa generados por el invasor en la relación hospedador-parásito, llegando a través de esta interdisciplinaridad a una comprensión integrada que permita el uso racional de los nuevos agentes. En tal sentido, basta con ejemplificar con los recientes casos comunicados de resistencia al nuevo antihelmíntico Monepantel.

ANTECEDENTES

En una línea de investigación interdisciplinaria, del grupo de Farmacología, en el que se desarrolló la presente Tesis Doctoral, y el grupo de Química Farmacéutica (a cargo del Prof. E. Manta) se ha venido trabajando en la búsqueda de nuevos agentes con actividad antihelmíntica. De manera breve, la estrategia utilizada consistió en trabajar en simplificaciones estructurales de metabolitos de origen marino de interés (Micotiazol, Mahler *et al.*, 2006; Bengazoles, Sellanes *et al.*, 2006; Phorboxazoles, Fontana *et al.*, 2008 y Bengamidas, Gordon *et al.*, 1997), utilizando bioensayos de actividad antihelmíntica (Gordon *et al.*, 1997; Domínguez *et al.*, 2000; Saldaña *et al.*, 2001 y 2003; Patente de Invención n°14424, Mendina *et al.*, 2014) como herramientas para la selección y optimización de los candidatos como potenciales antihelmínticos.

En particular, en el marco de una tesis doctoral (Gordon, 1998), se sintetizó la familia de derivados de la 2-amino- δ -valerolactama, precursores a análogos inferiores de las Bengamidas.

Las Bengamidas son productos naturales aislados de esponjas del género *Jaspis*, y constan de la unión de una fracción polihidroxilada con una fracción aminoacídica, figura 8.



Bengamida	R ₁	R ₂
A	H	OCO(CH ₂) ₁₂ CH ₃
B	CH ₃	OCO(CH ₂) ₁₂ CH ₃
E	H	H
Y	H	OH
Z	CH ₃	OH

Figura 8. Estructura química de algunas Bengamidas.

Estos productos de origen marino presentaron importantes actividades biológicas, destacándose las actividades antitumoral y antihelmíntica (Crews y Hunter, 1993).

Las Bengamidas han sido ampliamente estudiadas por diversos grupos de investigación, presentando importante acción antitumoral (Zinder *et al.*, 2001; Zhang, *et al.*, 2013), contra *Mycobacterium tuberculosis* (Lu *et al.*, 2012) y resultaron ser potentes inmunomoduladores (Jonson *et al.*, 2012).

La bengamida B es uno de los miembros más potentes de la familia, causando inhibición del crecimiento en todas las líneas de células tumorales humanas ensayadas, en concentraciones del rango nanomolar (Thale *et al.*, 2001). A pesar de que la bengamida B es un líder estructural, su baja disponibilidad para encontrarlo en la naturaleza, la complejidad de su síntesis y su baja solubilidad detuvieron su desarrollo como agente terapéutico.

Los estudios de aproximación al mecanismo de acción de estos compuestos naturales, identificaron como blanco a la enzima metionina aminopeptidasa (MetAp). La metionina es el amonoácido iniciador de la cadena proteica (N-terminal) en el proceso de síntesis, el cual luego es escindido por las metionina aminopeptidasas. Por lo tanto, la inhibición de esta enzima afecta el procesamiento post-transduccional de las proteínas (Towbin *et al.*, 2003).

Por medio de una aproximación basada en estudios de proteómica en células tratadas con un análogo de bengamida E, el LAF389 (figura 9), se demostró que cierto grupo de proteínas en células tratadas con LAF389 presentaron una alteración en su movilidad (en gel de electroforesis 2D), respecto a los controles. Se vio que el tratamiento con dicho compuesto mantenía la metionina amino-terminal, sugiriendo que el derivado bengamida, de manera directa o indirecta inhibía la MetAp (Towbin *et al.*, 2003).

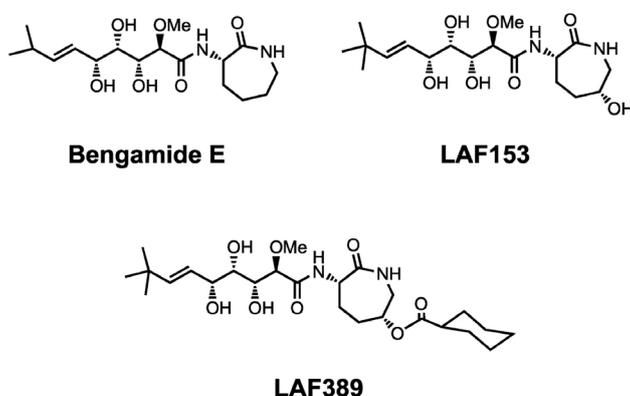


Figura 9. Estructuras de la Bengamida E y sus análogos estructurales LAF389 y LAF153. Figura obtenida de Towbin *et al.*, 2003

En el mismo trabajo se informó la estructura cristalográfica de la proteína MetAp con el ligando LAF, pudiéndose confirmar que este compuesto se une de manera similar a los péptidos endógenos, en tanto los grupos hidroxilo de la cadena polihidroxilada, coordinan el centro de dos átomos de cobalto presentes en el sitio activo de la enzima (figura 10) (Towbin *et al.*, 2003).

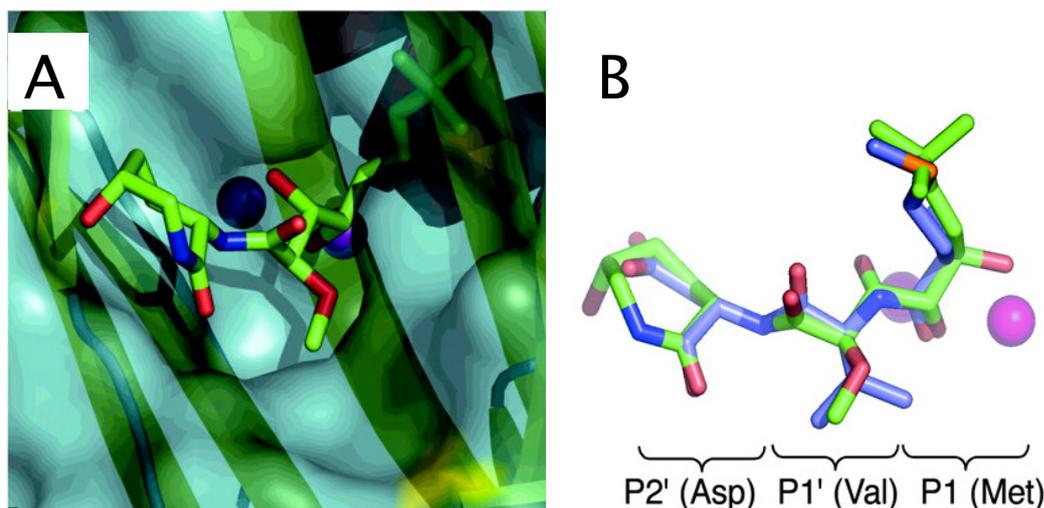
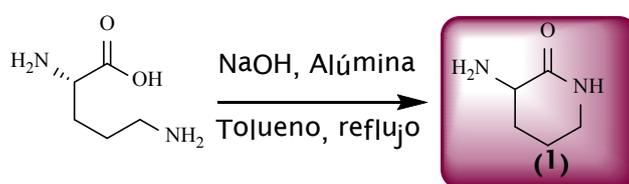


Figura 10. A. Se muestra el inhibidor LAF153 en el sitio activo de la enzima MetAp. Se puede ver que el anillo caprolactama se encuentra en la zona más externa de la hendidura del sitio activo, y que los átomos de oxígeno de los hidroxilos se coordinan con los átomos de cobalto (en azul). B. Se superpone el tripéptido Met-Val-Asp (azul), sustrato de MetAp, con el compuesto LAF153 (verde), viéndose similitud estérica entre ambos compuestos.

Contrariamente a la abundante investigación realizada y comunicada en relación al interés como potenciales antitumorales, no se han comunicado nuevos avances respecto al potencial antihelmíntico inicialmente observado para las Bengamidas.

Como parte de los resultados del trabajo interdisciplinario de los grupos mencionados y como antecedentes vinculados a este trabajo de Tesis, se llevó a cabo la síntesis y evaluación biológica de análogos inferiores a las Bengamidas, como simplificación estructural de la parte aminoácida, dando lugar a una nueva familia de derivados de la 2-amino- δ -valerolactama (Gordon *et al.*, 1997; Gordon, 1998). Estos compuestos se obtienen a partir de la ciclodeshidratación del aminoácido L-ornitina, sobre alúmina básica a reflujo en tolueno:



Dichos precursores fueron evaluados en el modelo *in vitro* de actividad antihelmíntica contra el nematodo *Nippostrongylus brasiliensis* L4 (Gordon *et al.*, 1997), presentando todos ellos relevante actividad nematocida, superando a los patrones antihelmínticos empleados para calibrar el modelo (Albendazol, Febendazol, Levamisol).

Sobre la estructura del compuesto 1 se realizó modulación química (Tesis de Doctorado, Dr. P. Mendina, 2009), obteniéndose 2-amino-alkil derivados, 2-acil-amino derivados, bis-derivados y derivados alquilados sobre el nitrógeno 6 del anillo valerolactama (figura 11, adaptada de Mendina, 2009).

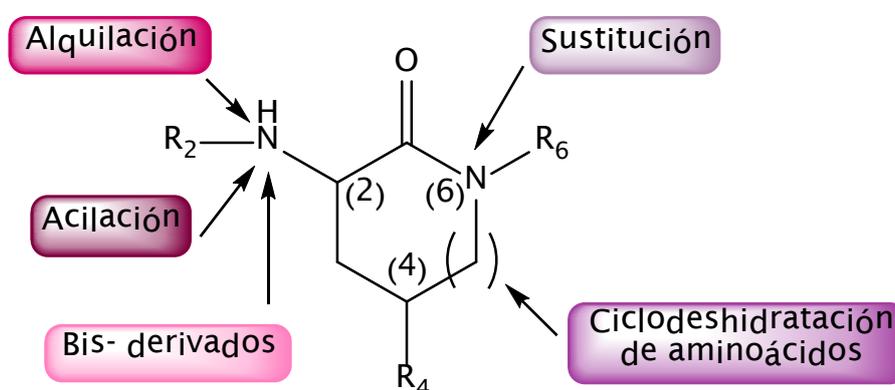
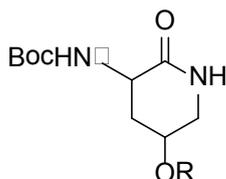


Figura 11. Modificaciones moleculares realizadas para el proceso de farmacomodulación sobre derivados 2-amino- δ -valerolactamas (Tesis de doctorado del Dr. Pablo Mendina, 2009)

Estos derivados presentaron una excelente actividad antihelmíntica *in vitro* en el modelo de *N. brasiliensis*, L4, siendo hasta 7 órdenes de actividad mayores que el patrón utilizado, Albendazol (ABZ).

Sin embargo, cuando alguno de estos derivados (figura 12) se administraron a ovinos infectados naturalmente con nemátodos, la eficacia de estos productos a la dosis ensayada resultó moderada-baja, y notoriamente inferior a ABZ, en igual dosis (Mendina, 2009).



1a: R= H

1b: R= CO(CH₂)₁₂CH₃ (Miristato)

Figura 12. Estructuras de los derivados valerolactama 1a y 1b

Para comprender estos resultados, se realizaron estudios farmacocinéticos de tales derivados (administrados vía oral en una monodosis) en ovinos sanos, comprobando una rápida eliminación, pero muy buena biodisponibilidad. A continuación, y para comprender la falta de correlación de actividad *in vitro*- *in vivo* de estos derivados, se decide explorar la velocidad de difusión intraparasitaria de los mismos.

En efecto, si se considera la situación estática del modelo de actividad *in vitro* en el cual el nemátodo es desafiado con el fármaco en cuestión a una determinada concentración por un período de cinco días dista mucho de la situación *in vivo*.

Por tanto, además de los aspectos farmacocinéticos del hospedador (PK) que determinan la llegada del fármaco al tejido blanco en cantidad y tiempo suficiente para desencadenar el efecto, es momento de considerar (como ya se mencionara antes) aspectos farmacológicos (PD y PK) vinculados al parásito. Efectivamente, un factor como la velocidad de difusión intraparasitaria puede resultar limitante en una situación dinámica y quedar enmascarada en las condiciones del modelo *in vitro*.

En suma, un compuesto con baja velocidad de difusión intraparasitaria, al desafiar al parásito por un tiempo prolongado (5 días) *in vitro*, podría atravesar barrera parasitaria y acceder a su blanco de acción para desencadenar su respuesta. Por tanto, periodos de incubación prolongados *in vitro* de este compuesto, compensarían la baja velocidad de difusión intraparasitaria.

Para confirmar esta posible hipótesis, se realizaron estudios de difusión intraparasitaria *ex vivo* sobre *N. brasiliensis*, L4 (Mendina, 2009). Tales estudios, consisten en incubar los parásitos en un medio adecuado y con una concentración determinada del fármaco en cuestión, y analizar a tiempos determinados la concentración intraparasitaria del fármaco. Los resultados obtenidos en estos experimentos para dos derivados valerolactama, y el albendazol (ABZ) usado como patrón, se muestran en tabla 5 (adaptada de Mendina, 2009).

Tabla 5. Estudios *ex vivo* de ABZ y los derivados valerolactama 1a y 1b, en *N. brasiliensis* L4 (adaptación de Mendina, 2009), a una concentración en el medio de incubación de 40 μ M.

Producto	Concentración intraparasitaria (nmol/ 100 mg de proteínas)	
	1.5 hs	6 hs
ABZ	27	249
1a	N.D.	N.D.
1b	---	N.D.

N.D.: no detectado

Estos resultados confirmaron la baja-nula capacidad de estos derivados valerolactama de ingresar al medio intraparasitario (a la concentración y tiempo de incubación ensayados), y por tanto **sentó las bases para plantear la hipótesis de que la baja eficacia de estos compuestos se debió a su muy baja capacidad de difusión intraparasitaria.**

En la presente Tesis Doctoral, en base a los antecedentes del grupo antes descritos, se tomó como punto de partida la serie de derivados valerolactama.

Considerando las evidencias experimentales ya mencionadas, se diseñó la síntesis de nuevos derivados con el objetivo de modificar ciertas propiedades fisicoquímicas (lipofilia) y así mejorar los perfiles de difusión intraparasitaria. Para verificar este objetivo, se desarrollaron e integraron, a los ensayos farmacológicos de actividad antihelmíntica con los que cuenta el grupo, **estudios de difusión intraparasitaria ex vivo.**

Para la obtención de estos nuevos derivados se recurrió a la **estrategia de hibridación molecular**, habiéndose sintetizado una nueva serie de **compuestos híbridos valerolactama- benzimidazol**. En el capítulo 1, se describirán los fundamentos de esta estrategia, aplicada para varios propósitos en el área de la Química Farmacéutica, así como su potencialidad para el diseño de nuevos fármacos. En particular, para este trabajo de tesis, se fundamentará el uso del núcleo benzimidazólico en la hibridación con las valerolactamas (capítulo 1).

Como diseño general de trabajo, los estudios que se mencionan a continuación, se realizaron de manera comparativa entre los benzimidazoles antihelmínticos comercializados, sus compuestos híbridos valerolactama-benzimidazol derivados, y el derivado valerolactama.

En éste sentido, se evaluó la actividad antihelmíntica *in vitro* de los nuevos derivados sintetizados, en el modelo de nemátodo de rata, *N. brasiliensis*, larva L4, así como la actividad *in vivo* de uno de los derivados híbridos más promisorios, en ratas infectadas con el mismo nemátodo (capítulo 2).

De forma comparativa también se estudiaron las propiedades fisicoquímicas y electrónicas, mediante cálculos computacionales *ab initio*, se optimizó la geometría de los compuestos sintetizados y se obtuvieron descriptores fisicoquímicos y electrónicos (volumen molecular, momento dipolar, energías de HOMO-LUMO, iso-superficies de

HOMO-LUMO). La lipofilia fue determinada de forma experimental, mediante método de HPLC de fase reversa para los compuestos sintetizados (capítulo 3).

Finalmente, se desarrollaron y validaron dos modelos de difusión intraparasitaria *ex vivo*, uno de ellos sobre el céstodo *Mesocostoides vogae* (larva tetrathyridia) y otro con el nemátodo de interés en animales de producción, *Haemonchus contortus* (estadio adulto) (capítulos 4 y 5 respectivamente). Estos modelos, como ya se mencionó, tuvieron como fin el evaluar la capacidad de difusión al medio intraparasitario de las nuevas moléculas híbridas, y corroborar el acierto de la estrategia de hibridación para mejora el ingreso al parásito de la serie valerolactama. Así mismo, estos modelos fueron de utilidad para estudiar, de forma preliminar, la biotransformación que sufren los compuestos ensayados en ambos helmintos, ya que como fuera mencionado, el metabolismo aumentado puede ser un mecanismo complementario de resistencia a antihelmínticos.

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez, L., Mottier, L., Lanusse, C. Drug transfer into target helminth parasites. *Trends Parasitol.*, **2007**, *23*, 97- 104.

Álvarez, L., Solana, H., Mottier, L., Virkel, G., Fairweather, I., Lanusse, C. Altered drug influx/ efflux and enhanced metabolic activity in triclabendazole- resistant liver flukes. *Parasitology*, **2005**, *131*, 501- 510.

Álvarez, L., Sánchez, S., Lanusse, C. In vivo and ex vivo uptake of albendazole and its sulphoxide metabolite by cestode parasites: relationship with their kinetic behaviour in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, **1999**, *22*, 77- 86.

Ardelli, B., Prichard, R. Effects of ivermectin and moxidectin on the transcription of genes coding for multidrug resistance associated proteins and behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *J. Nematol.*, **2008**, *40*, 290-298.

Barrère, V., Alvarez, L., Suarez, G., Ceballos, L., Moreno, L., Lanusse, C., Prichard, R. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the β -tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.*, **2012**, *186*, 344-349.

Bartley, D., McAllister, H., Bartley, Y., Dupuy, J., Menez, C., Alvinerie, M., Jackson, F., Lespine, A. P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, **2009**, *136*, 1081-1088.

Baur, R., Beech, R., Sigel, E., Rufener, L. Monepantel irreversibly binds to and opens *H. contortus* MPTL-1 and *C. elegans* ACR-20 receptors. *Mol. Pharmacol.*, **2014**, doi:10.1124/mol.114.095653

Beugnet, F., Gauthey, M., Kerboeuf, D. Partial in vitro reversal of benzimidazole resistance by the free-living stages of *Haemonchus contortus* with verapamil. *Vet. Rec.*, **1997**, *141*, 575-576

Blackhall, W., Prichard, R., Beech, R. P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. *Vet. Parasitol.*, **2008**, *152*, 101-107

Blackhall, W., Pouliot, J., Prichard, R., Beech, R. *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin- and moxidectin- selected strains. *Exp. Parasitol.*, **1998**, *90*, 42-48.

Brooker, S. Estimating the global distribution and disease burden of intestinal nematode infections: Adding up the numbers- A review. *Int. J. Parasitol.*, **2010**, *40*, 1137-1144.

Buxton, S., Charvet, C., Neveu, C., Cabaret, J., Cortet, J., Peineau, N., Abongwa, M., Courtot, E., Robertson, A., Martin, R. Investigation of acetylcholine receptor diversity in a nematode parasite leads to characterization of tribendimidine- and derquantel-sensitive nAChR. *PLoS Pathog.*, **2014**, *10*, e1003870.

Castro, S., Dib, A., Suarez, G., Allemandi, D., Lanusse, C., Sanchez, S., Palma, S. Comparative plasma exposure of albendazole after administration of rapid disintegrating tablets in dogs. *Biomed Res Int.*, **2013a**: 920305.

Castro, S., Sanchez, S., Urbizu, L., Confalonieri, A., Ceballos, L., Lanusse, C., Allemandi, D., Palma, S. Enhanced dissolution and systemic availability of albendazole formulated as solid dispersions. *Pharm. Dev. Technol.*, **2013b**, *18*, 434-442.

Charlier, J., van der Voort, M., Kenyon, F., Skuce, P., Vercruyse, J. Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants, *Trends. Parasitol.*, **2014**, *30*, 361-367.

Crews, P., Hunter, L. The search for antiparasitic agents from marine animals. En *Marine Biotechnology Volume I: Pharmaceutical and Bioactive Natural Products*. Attaway, D., Saborsky, O. (Editores), **1993**, Plenum Press, New York, USA, pág 343.

Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Mezzino, L., Vercruyse, J., Jackson, F. Evaluation of targeted selective treatments in sheep in Italy: Effects on faecal worm egg count and milk production in four case studies. *Vet. Parasitol.*, **2009**, *164*, 36-43.

Cvlink, V., Lamka, J., Skálová, L. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug Metab. Rev.*, **2009**, *41*, 8-26

Danaher, M. De Ruyck, H., Crooks, S., Dowling, G., O'Keeffe, M. Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *J. Chromatogr. B.*, **2007**, *1*, 1-37.

Delatour, P., Benoit, E., Lechenet, I., Besses, S. Pharmacokinetics in sheep and cattle of albendazole administered by an intraruminal slow release capsule. *Res. Vet. Sci.*, **1990**, *48*, 271-275.

de Silva, N., Brooker, S., Hotez, P., Montresor, A., Engels, D., Savioli, L. Soil-transmitted helminths: updating the global picture. *Trends Parasitol.*, **2003**, *19*, 547- 551.

Dicker, A., Nisbet, A., Skuce, P. Gene expression changes in a P-glycoprotein (Tci-pgp-9) putatively associated with ivermectin resistance in *Teladorsagia circumcincta*. *Int. J. Parasitol.*, **2011**, *41*, 935- 942.

Domínguez, L., Saldaña, J., Chernin, J. Use of L4 larvae of *Nippostrongylus brasiliensis* for the in vivo screening of anthelmintic drugs. *Canad. J. Vet. Res.*, **2000**, 160- 163.

Domínguez, L., Savio, E., Saldaña, J., Malanga, A., Quevedo, D., Camarote, C., Ochoa, A., Fagiolino, P. Lipid matrix of albendazole sulphoxide: is an alternative for systemic infections?. *Bolletino chimico farmaceutico*, **1998**, *137*, 383- 386.

Domínguez, L., Fagiolino, P., Gordon, S., Manta, E. Bioavailability comparison between albendazole and albendazole sulphoxide in rats and man. *Il Farmaco*, **1995**, *50*, 697- 702.

El-Abdellati, A., De Graef, J., Van Zeveren, A., Donnan, A., Skuce, P., Walsh, T., Wolstenholme, A., Tait, A., Verycrusse, J., Claerebout, E., Geldhof, P. Altered avr-12B gene transcription patterns in ivermectin-resistant isolates of the cattle parasites, *Cooperia oncophora* and *Ostertagia ostertagi*. *Int. J. Parasitol.*, **2011**, *41*, 951- 957.

Epe, C., Kaminsky, R. New advancement in anthelmintic drugs in veterinary medicine. *Trends Parasitol.*, **2013**, *29*, 129- 134.

Evrard, B., Chiap, P., DeTullio, P., Ghalmi, F., Piel, G., Van Hees, T., Crommen, J., Losson, B., Delattre, L. Oral bioavailability in sheep of albendazole from a suspension and from a solution containing hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J. Control. Release*, **2002**, *85*, 45- 50.

Fontana, C., Incerti, M., Moyna, G., Manta, E. Conformational analysis of phorboxazole bis-oxazole oxane fragment analogs by NMR spectroscopy and molecular modeling simulations. *Magn. Reson. Chem.*, **2008**, *46*, 36-41.

Forbes, A., Warren, M., Upjohn, M., Jackson, B., Jones, J. Charlier, J., Fox, M. Associations between blood gastrin, ghrelin, leptin, pepsinogen and *Ostertagia ostertagi* antibody concentrations and voluntary feed intake in calves exposed to a trickle infection with *O. ostertagi*. *Vet. Parasitol.*, **2009**, *162*, 295- 305.

Ghisi, M., Kaminsky, R., Mäser, P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodos. *Vet. Parasitol.*, **2007**, *144*, 313-320.

Gordon, S. "Nuevos antihelmínticos derivados de la 2-amino- δ -valerolactama. Síntesis y evaluación biológica". Tesis doctoral, 1998,, Facultad de Química, Udelar.

Gordon, S., Costa, L., Incerti, M., Manta, E., Saldaña, J., Domínguez, L., Mariezcurrena, R., Suescun, L. Synthesis and *in vitro* anthelmintic activity against *Nippostrongylus brasiliensis* of new 2-amino-4-hydroxy- δ -valerolactam derivatives. *Il Farmaco*, **1997**, *52*, 603-608.

Guest, M., Bull, K., Walker, R., Amliwala, K., O'Connor, V., Harder, A., Holden-Dye, L., Hopper, N. The calcium- activated potassium channel, SLO-1, is required for the action of the novel cyclo-octadepsipeptide anthelmintic, emodepside, in *Caenorhabditis elegans*. *Int. J. Parasitol.*, **2007**, *37*, 1577- 1588.

Gyurik, R., Chow, A., Zaber, B., Brunner, E., Miller, J., Villani, A., Petka, L., Parish, R. Metabolism of Albendazole in cattle, sheeps, rats and mice. *Drug Metab. Dispos.*, **1981**, *9*, 503- 508

Holden-Dye, L., Joyner, M., O'Connor, V., Walker, R. Nicotinic acetylcholine receptors: A comparison of the nAChRs of *Caenorhabditis elegans* and parasitic nematodes. *Parasitol. Int.*, **2013**, *62*, 606-616.

Hotez, P., Molyneux, D., Fenwick, A., Ottesen, E., Ehrlich, S., Sachs, D. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS Med*, **2006**, *35*, e102.

James, C., Davey, M. Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. *Int. J. Parasitol.*, **2009**, *39*, 213-220.

James, C., Hudson, A., Davey, M. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest?. *Trends Parasitol*, **2009**, *25*, 328-335.

Janssen, I., Krücken, J., Demeler, J., von Samson-Himmelstjerna, G. *Caenorhabditis elegans*: modest increase of susceptibility to ivermectin in individual P- glycoprotein loss-of-function strains. *Exp. Parasitol.*, **2013**, *134*, 171-177.

Johnson, T., Sohn, J., Vaske, Y., White, K., Cohen, T., Vervoort, H., Tenney, K., Valeriote, F., Bjeldanes, L., Crews, P. Myxobacteria versus sponge- derived alkaloids: The bengamide family indentified as potent immune modulating agents by scrutiny of LC-MS/ ELSD libraries. *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, *20*, 4348-4355.

Kaminsky, R., Ducray, P., Jung, M., Clover, R., Rufener, L., Bouvier, J., Schorderet, S., Wenger, A., Wieland-Berghausen, S., Goebel, T., Gauvry, N., Pautrat, F., Skripsky, T., Froelich, O., Komoin-Oka, C., Westlund, B., Sluder, A., Mäser, P. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*, **2008**, *452*, 176-180.

Kaplan, R. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.*, **2012**, *186*, 70- 78.

Kinder F., Versace R., Bair K., Bontempo J., Cesarz D., Chen S., Crews P., Czuchta A., Jagoe C., Mou Y., Nemzek R., Phillips P., Tran L., Wang R., Weltchek S., Zabłudoff S. Synthesis and Antitumor Activity of Ester-Modified Analogues of Bengamide B. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 3692-3699.

Kotze, A, HuntP., Skuce, P., von Samson-Himmelstjerna, G., Martin, R., Sager, H., Krüken, J., Hodgkinson, J., Lespine, A., Jex, A., Gilleard, J., Beech, R., Wolstenholme, A., Demeler, J., Robertson, A., Charvet, C., Neveu, C., Kaminsky, R., Rufener, L., Alberich, M., Menez, C., Prichard, R. Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist*, **2014**, *4*, 164- 184.

Kotze, A., Cowling, K., Bagnall, N., Hines, B., Ruffell, A., Hunt, P., Coleman, G. Relative level of thiabendazole resistance associated with the E198A and F200Y SNPs in larvae

of a multidrug resistant isolate of *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.*, **2012**, *2*, 92-97.

Kotze, A.C., Dobson, R.J., Chandler, D. Synergism of rotenone by piperonyl butoxide in *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in vitro: potential for drug-synergism through inhibition of nematode oxidative detoxification pathways. *Vet. Parasitol.*, **2006**, *136*, 275-282.

Krüken, J., Harder, A., Jeschke, P., Holden-Dye, L., O' Connor, V., Welz, C., von Samson-Himmelstjerna, G. Anthelmintic ciclooctadepsipeptides: complex in structure and mode of action. *Trends. Parasitol.*, **2012**, *28*, 385- 394.

Kumar, A., Misra-Bhattacharya, S. Current drug targets for helminthic diseases. *Parasitol. Res.*, **2013**, *112*, 1819-1831.

Kwa, M., Veenstra, J., Roos, M. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **1994**, *63*, 299-303.

Kwa, M., Veenstra, J., Roos, M. Molecular characterisation of beta-tubulin genes present in benzimidazole-resistant populations of *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **1993**, *60*, 133-143.

Lacey, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int. J. Parasitol.*, **1988**, *18*, 885-936.

Laing, R., Kikuchi, T., Martinelli, A., Tsai, I., Beech, R., Redman, E., Holroyd, N., Bartley, D., Beasley, H., Britton, C., Curran, D., Devaney, E., Gilabert, A., Hunt, M., Jackson, F., Johnston, S., Kryukov, I., Li, K., Morrison, A., Reid, A., Sargison, N., Saunders, G., Wasmuth, J., Wolstenholme, A., Berriman, M., Gilleard, J., Cotton, J. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*: a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biol.*, **2013**, *14*:R88.

Lanusse, C., Prichard, R. Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants. *Drug. Metab. Rev.*, **1993**, *25*, 235- 279.

Le Jambre, J., Lenane, I., Wardrop, A. A hybridization technique to identify anthelmintic resistance genes in *Haemonchus*. *Int. J. Parasitol.*, **1999**, *29*, 1979-1985.

Lespine, A., Menez, C., Bourguinat, C., Prichard, R. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintic prospects for reversing transport- dependent anthelmintic resistance. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug. Resist.*, **2012**, *2*, 58-75.

Lifschitz, A., Entrocasso, C., Álvarez, L., Lloberas, M., Ballent, M., Manazza, G., Virkel, G., Borda, B., Lanusse, C. Interference with P- glycoprotein improves ivermectin activity against adult resistant nematodes in sheep. *Vet. Parasitol.*, **2010**, *172*, 291- 298.

Lu, J., Yuan, X., Ye, Q. Structural analysis of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* methionine aminopeptidase by bengamide derivatives. *Europ. J. Med. Chem.*, **2012**, *47*, 479- 484.

Lynagh, T., Lynch, J. A glycine residue essential for high ivermectin sensitivity in Cys-loop ion channel receptors. *Int. J. Parasitol.*, **2010**, *40*, 1477- 1481.

Mahler, G., Serra, G., Dematteis, S., Saldaña, J., Domínguez, L., Manta, E. Synthesis and biological evaluation of simplified mycothizaole analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 1309- 1311

Martin, R. Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet J.*, **1997**, *154*, 11-34.

Mavrogianni, V., Papadopoulos, E., Fragkou, I., Gougoulis, D., Valasi, I., Orfanou, D., Ptochos, S., Gallidis, E., Fthenakis, G. Administration of a long-acting antiparasitic to pre-pubertal ewe-lambs in Greece results in earlier reproductive activity and improved reproductive performance. *Vet. Parasitol.*, **2011**, *177*, 139- 144.

Mederos A., Gallinal M., Rodríguez S., González H., Silva L. (2005) Diagnósticos de Resistencia a los antihelmínticos en ovinos en Uruguay VIII Congreso Nacional de Medicina Veterinaria Dr. Luis Queirolo Monteverde Montevideo, Uruguay.

Mendina, P., Munguía, B., Espinosa, R., Saldaña, J., Domínguez, L., Manta, E. Derivados de la 2-amino-δ-valerolactama y benzimidazoles que presentan actividad antiparasitaria y en particular antihelmíntica de amplio espectro. Patente de Invención ante la DNPI, título n° 14424, aprobada el 17 de junio de **2014**, Montevideo, Uruguay.

Mendina, P. Optimización de nuevos agents antihelmínticos para su eventual uso en quimioterapia. Tesis Doctoral, bajo la tutoría de los Dres. Laura Domínguez y Eduardo Manta, Facultad de Química, UdelaR, **2009**.

Molento, M., Prichard, R. Effects of the multidrug-resistance-reversing agents verapamil and CL 347, 099 on the efficacy of ivermectin or moxidectin against unselected and drug-selected strains of *Haemonchus contortus* in jirds (*Meriones unguiculatus*) *Parasitol. Res.*, 1999, 85, 1007-1011.

Mottier, L., Alvarez, L., Fairweather, I., Lanusse, C. Resistance-induced changes in triclabendazole transport in *Fasciola hepatica*: ivermectin reversal effect. *J. Parasitol.*, **2006**, 92, 1355-1360.

Mottier, L., Lanusse, C. Bases moleculares de la resistencia a fármacos antihelmínticos. *Revista de Medicina Veterinaria*, **2001**, 82, 74- 85.

Nari A., Salles J., Gil A., Waller P., Hansen J. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Uruguay. *Vet. Parasitol.*, **1996**, 62, 213-222.

Nielsen, L., Sløk, F., Bundgaard, H. N-Alkoxy carbonyl prodrugs of mebendazole with increased water solubility. *Int. J. Pharm.*, **1994**, 102, 231-239.

Papadopoulos, E. Anthelmintic resistance in sheep nematodos. *Small Ruminant Res.*, **2008**, 76, 99- 103.

Papadopoulos, E., Gallidis, E., Ptochos, S., Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A selected review. *Vet Parasitol.*, **2012**, 189, 85- 88.

Prichard, R., Roulet, A. ABC transporters and beta-tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. *Parasitology*, **2007**, 134, 1123-1132.

Qian, H., Martin, R., Robertson, A. Pharmacology of N-, L- and B- subtypes of nematode nAChR resolved at the single- channel level in *Ascaris suum*. *FASEB J.*, **2006**, 20, 2606-2608.

Rufener, L., Bedoni, N., Baur, R., Rey, S., Glauser, D., Bouvier, J., Beech, R., Sigel, E., Puoti, A. *acr-23* Encodes a Monepantel-Sensitive Channel in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathogens*, **2013**, DOI: 10.1371/journal.ppat.1003524.

Rufener, L., Mäser, P., Roditi, I., Kaminsky, R. *Haemonchus contortus* Acetylcholine Receptors of the DEG-3 Subfamily and Their Role in Sensitivity to Monepantel. *PLoS Pathogens*, **2009**, *5*, 1-11.

Saeger, B., Schmitt-Wrede, H., Dehnhardt, M., Benten, W., Krücken, J., Harder, A., von Samson-Himmelstjerna, G., Wiegand, H., Wunderlich, F. Latrophilin-like receptor from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* as target for the anthelmintic depsipeptide PF1022A. *FASEB J.*, **2001**, *15*, 1332-1334.

Saldaña J., Casaravilla C., Marín M., Fernández C., Domínguez L. The toxicity of praziquantel against *Mesocestoides vogae* (syn. Corti) tetrathyridia can be assessed using a novel in vitro system. *Parasitol. Res.*, **2003**, *89*, 467-472.

Saldaña, J., Marín, M., Fernández, C., Domínguez, L. *In vitro* taurocholate- induced segmentation and clustering of *Mesocestoides vogae* (syn. Corti) tetrathyridea (Cestoda) – inhibition by cestocidal drugs. *Parasitol. Res.*, **2001**, *87*, 281 – 286.

Sangster, N., Bannan, S., Weiss, A., Nulf, S., Klein, R., Geary, T. *Haemonchus contortus*: sequence heterogeneity of internucleotide binding domains from P-glycoproteins. *Exp. Parasitol.*, **1999**, *91*, 250–257.

Sanson, D., Derosa, A., Oremus, G., Foil, L. Effect of horn fly and internal parasite control on growth of beef heifers. *Vet. Parasitol.*, **2003**, *117*, 291–300.

Sanyal, P. The disposition kinetics of albendazole following the administration of single and divided doses to cattle and buffalo. *Vet. Res. Com.*, **1998**, *22*, 87-96.

Sarai, R., Koop, S., Coleman, G., Kotze, A. Acetylcholine receptor subunit and P-glycoprotein transcription patterns in levamisole- susceptible and -resistant *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.*, **2013**, *3*, 51- 58.

Sargison, N. Pharmaceutical treatments of gastrointestinal nematode infections of sheep- Future of anthelmintic drugs. *Vet. Parasitol.*, **2012**, *189*, 79- 84.

Savio, E., Domínguez, L., Malanga, A., Quevedo, D., Saldaña, J., Camarote, C., Ochoa, A., Fagiolino, P. Lipidic matrix of albendazole: an alternative for systemic infections. *Bollettino Chimico Farmaceutico*, **1998**, *137*, 345-349.

Scott, I., Pomroy, W., Kenyon, P., Smith, G., Adlington, B., Moss, A. Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.*, **2013**, *198*, 166-171.

Sellanes, D., Scarone, L., Mahler, G., Manta, E., Baz, A., Dematteis, S., Saldaña, J., Domínguez, L., Wipf, P., Serra, G. Synthesis and Evaluation of Anthelmintic and Cytotoxic Properties of Bis- 1,3-Azole Analogs of Natural Products. *Lett. Drug Des. Discov.*, **2006**, *3*, 35-43.

Shaw, D., Vercruyse, J., Claerebout, E., Dorny, P. Gastrointestinal nematode infections of first-grazing season calves in Western Europe: general patterns and the effect of chemoprophylaxis. *Vet. Parasitol.*, **1998**, *75*, 115- 131.

Sheps, J., Ralph, S., Zhao, Z., Baillie, D., Ling, V. The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biol.*, **2004**, *5*, R15.

Silvestre, A., Cabaret, J. Mutation in position 167 of isotype I beta-tubulin gene of *Trichostrongylid* nematodes: role in benzimidazole resistance?. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **2002**, *120*, 297-300.

Taylor, M., Learmount, J., Lunn, E., Morgan, C., Craig, B. Multiple resistance to anthelmintics in sheep nematodes and comparison of methods used for their detection. *Small. Rumin. Res.*, **2009**, *86*, 67-70.

Thale, Z., Kinder, F., Bair, K., Bontempo, J., Czuchta, A., Versace, R., Phillips, P., Sanders, M., Wattanasin, S., and Crews, P. Bengamides revisited: new structures and antitumor studies. *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 1733-1741.

Torres-Acosta, J., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Caballero, A., Cuéllar-Ordaz, J. Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. *Vet. Parasitol.*, **2012**, *189*, 89-96.

Towbin, H., Bair, K., De Caprio, J., Eck, M., Kim, S., Kinder, F., Morollo, A., Mueller, D., Schindler, P., Song, H., van Oostrum, J., Versace, R., Voshol, H., Wood, J., Zabludoff, S., Phillips, P. Proteomics-based target identification: bengamides as a new class of methionine aminopeptidase inhibitors. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 52964- 52971.

Vandamme T., Ellis, K. Issues and challenges in developing ruminal drug delivery systems. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **2004**, *56*, 1415-1436.

Van Wyk, J., Malan, F. Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxanide and the benzimidazoles in South Africa. *Vet. Rec.*, **1988**, *123*, 226-228.

Vatta, A., Lindberg, A. Managing anthelmintic resistance in small ruminant livestock of resource-poor farmers in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, **2006**, *77*.

Vokřál, I., Jirásko, R., Stuchlíková, L., Bártíková, H., Szotáková, B., Lamka, J., Várady, M., Skálová, L. Biotransformation of albendazole and activities of selected detoxification enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Vet. Parasitol.*, **2013**, *196*, 373-381.

Walker, R., Miller, J., Monlezun, C., LaMay, D., Navarre, C., Ensley, D. Gastrointestinal nematode infection and performance of weaned stocker calves in response to anthelmintic control strategies. *Vet. Parasitol.*, **2013**, *197*, 152-159.

Waller, P. From discovery to development: Current industry perspectives for the development of novel methods of helminths control in livestock. *Vet. Parasitol.*, **2006**, *139*, 1-14.

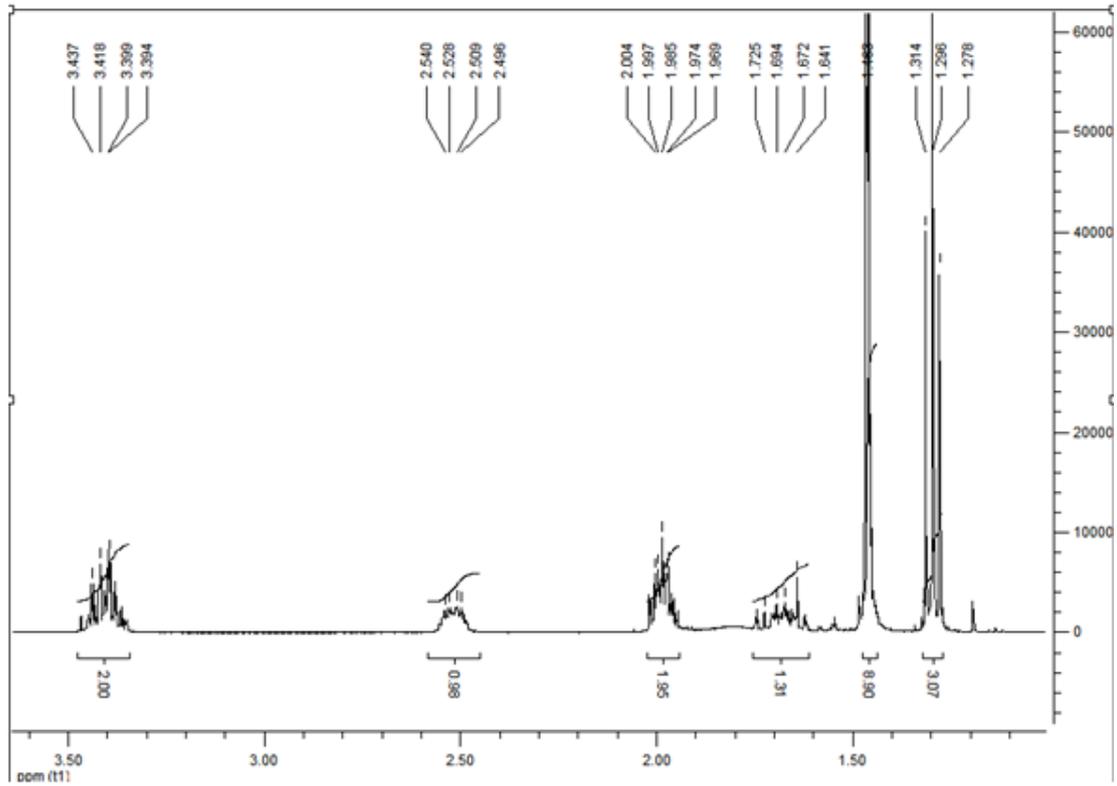
Williamson, S., Storey, B., Howell, S., Harper, K., Kaplan, R., Wolstenholme, A. Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphism in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **2011**, *180*, 99-105.

Xu, M., Molento, M, Blackhall, W., Ribeiro, P., Beech, R., Prichard, R. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **1998**, *91*, 327-335.

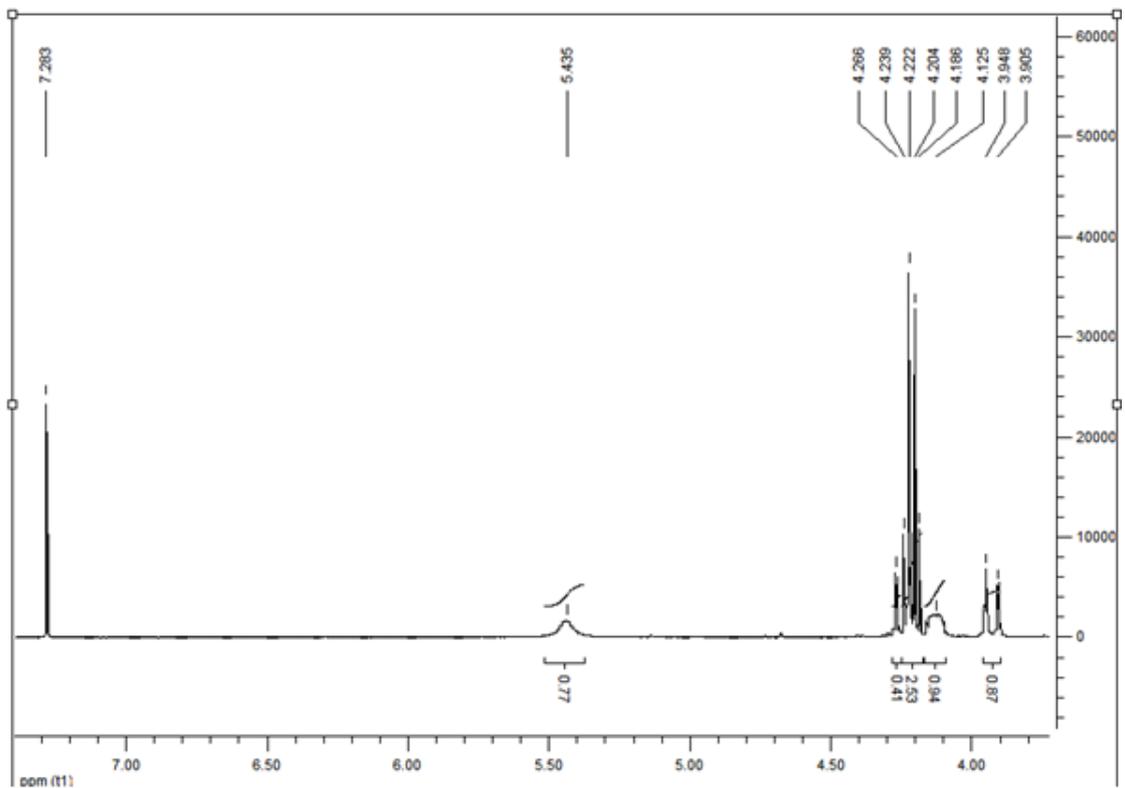
Zhang, W., Liang, Q., Li, H., Meng, X., Li, Z. Concise synthesis and antitumor activity of Bengamide E and its analogs. *Tetrahedron*, **2013**, *69*, 664- 672.

ANEXO CAPÍTULO 1- RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

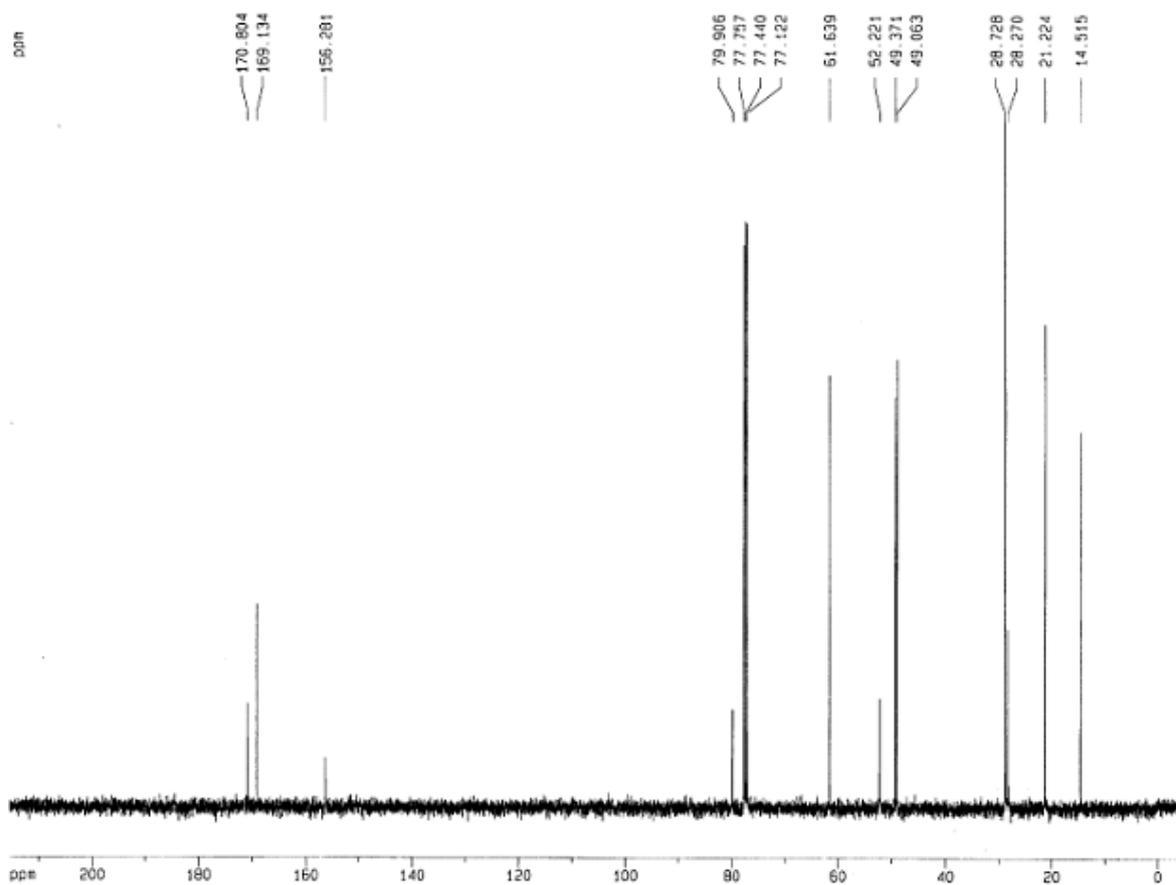
(3) H¹ en CDCl₃



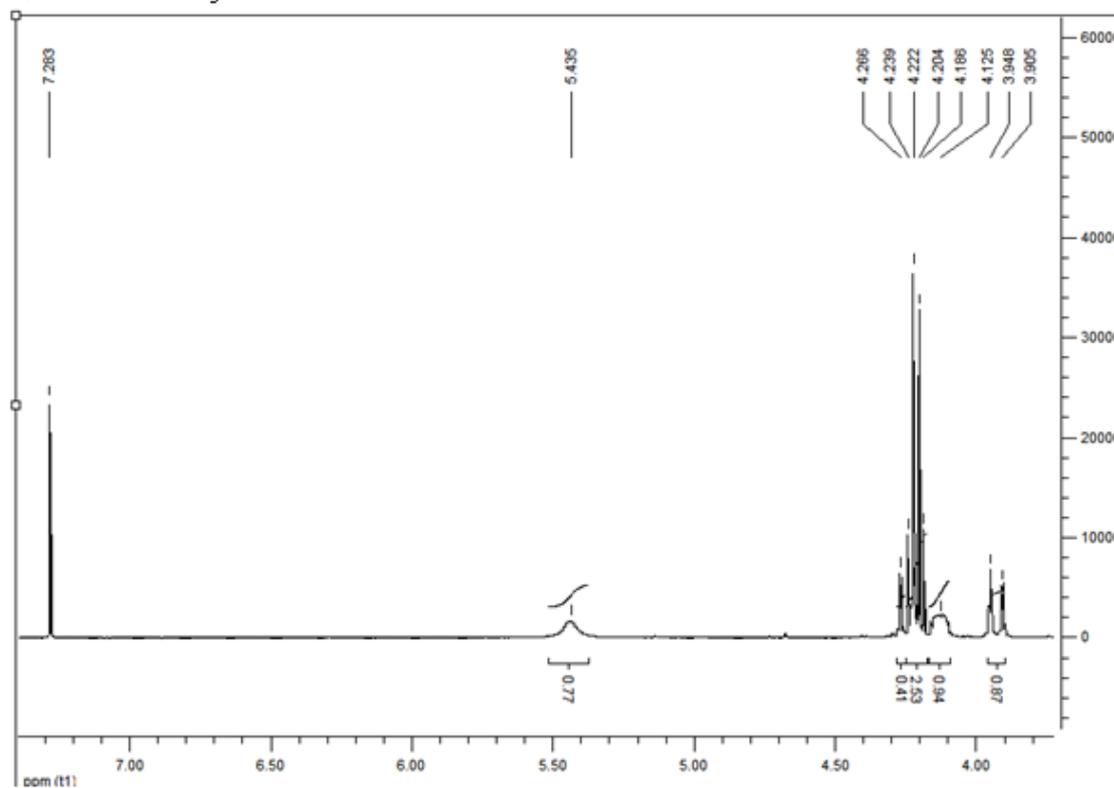
Cont. (3) H¹ en CDCl₃



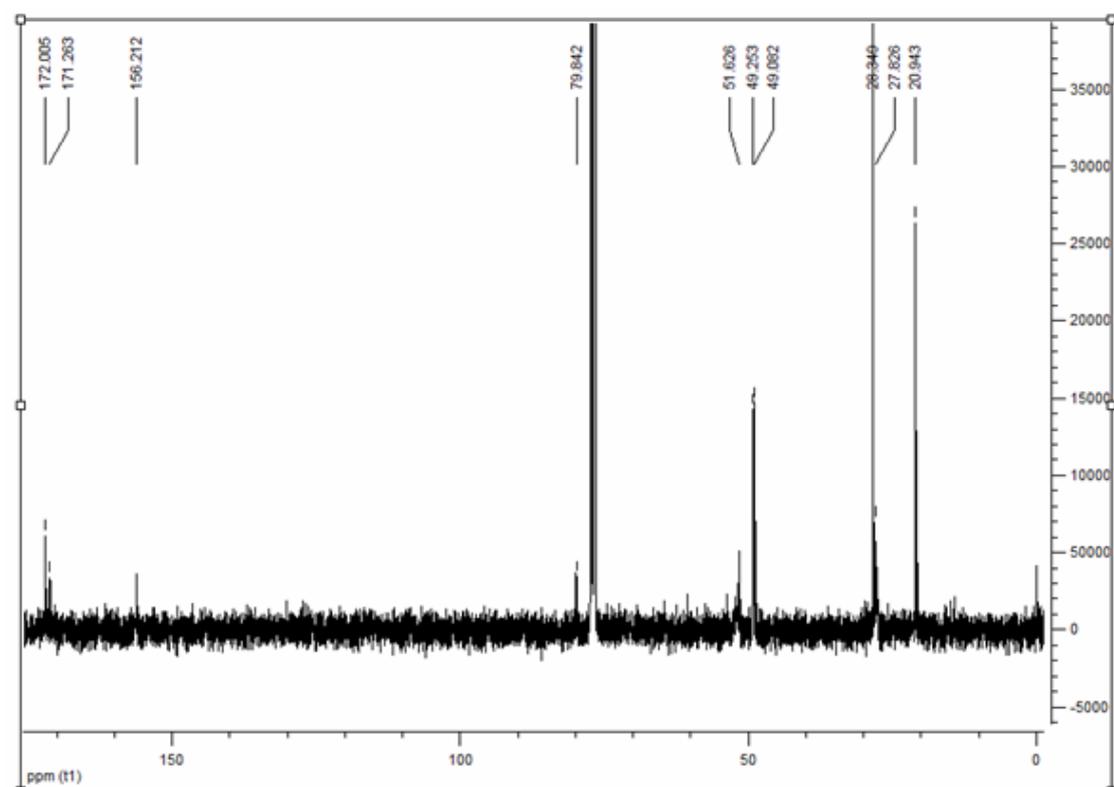
(3) C¹³ en CDCl₃



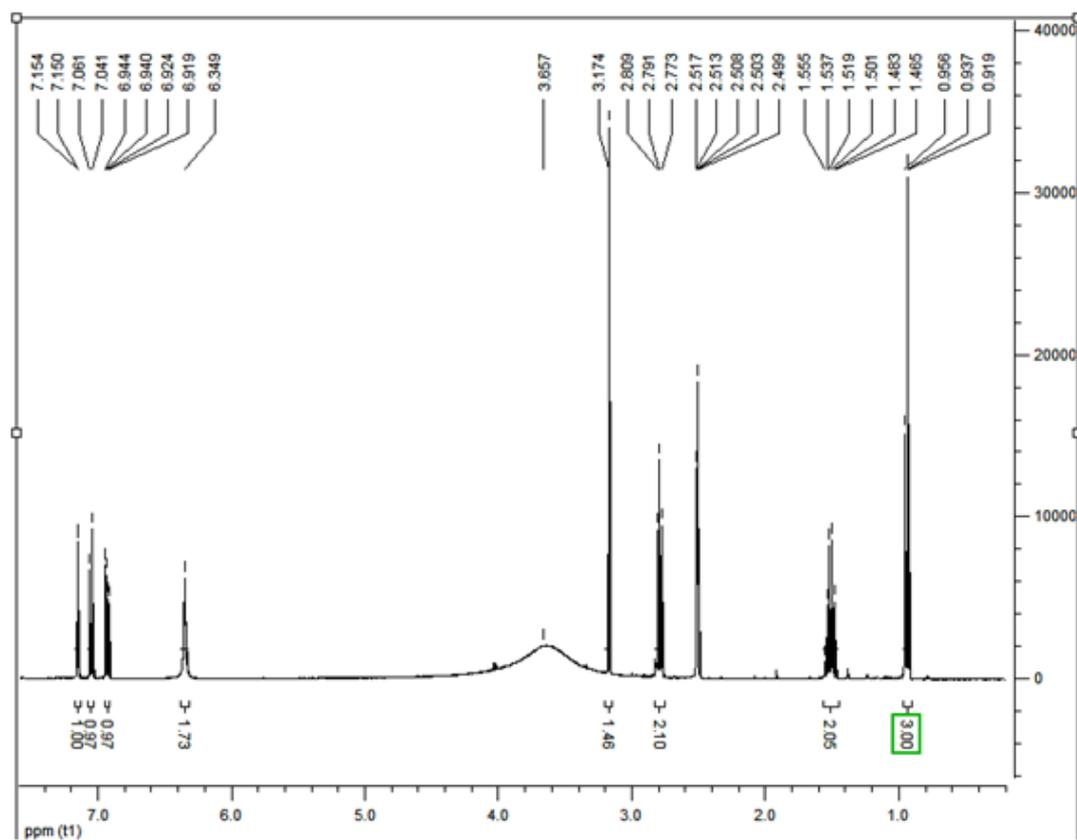
(4) H¹ en CDCl₃



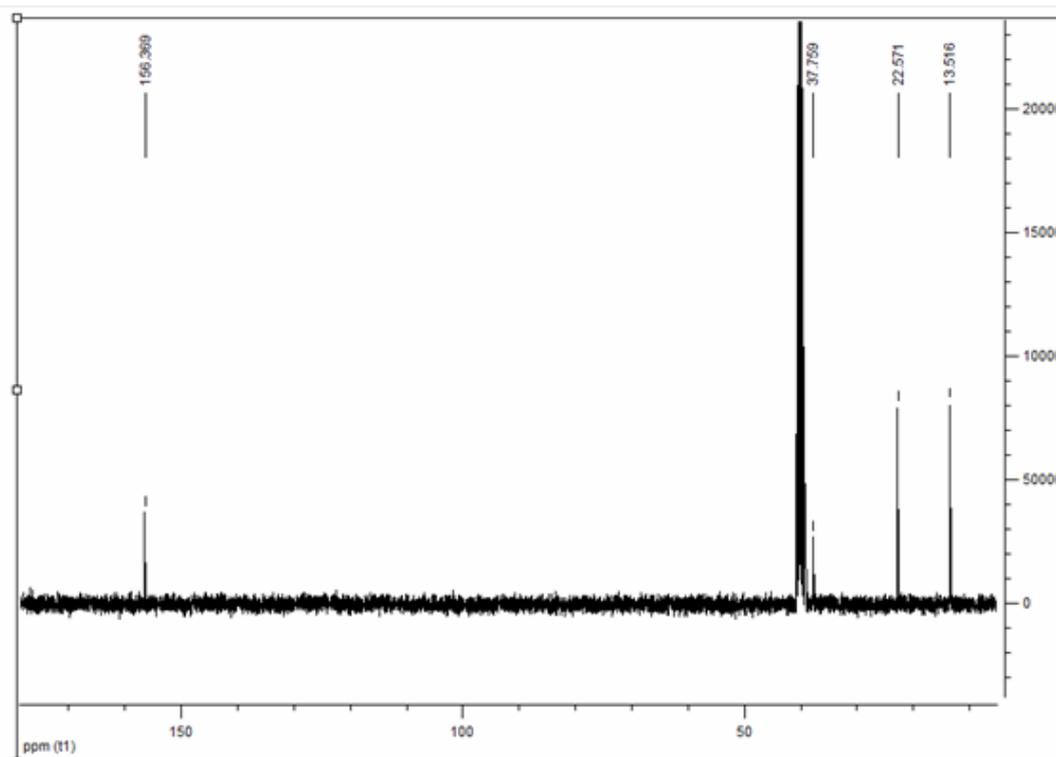
(4) C¹³ en CDCl₃



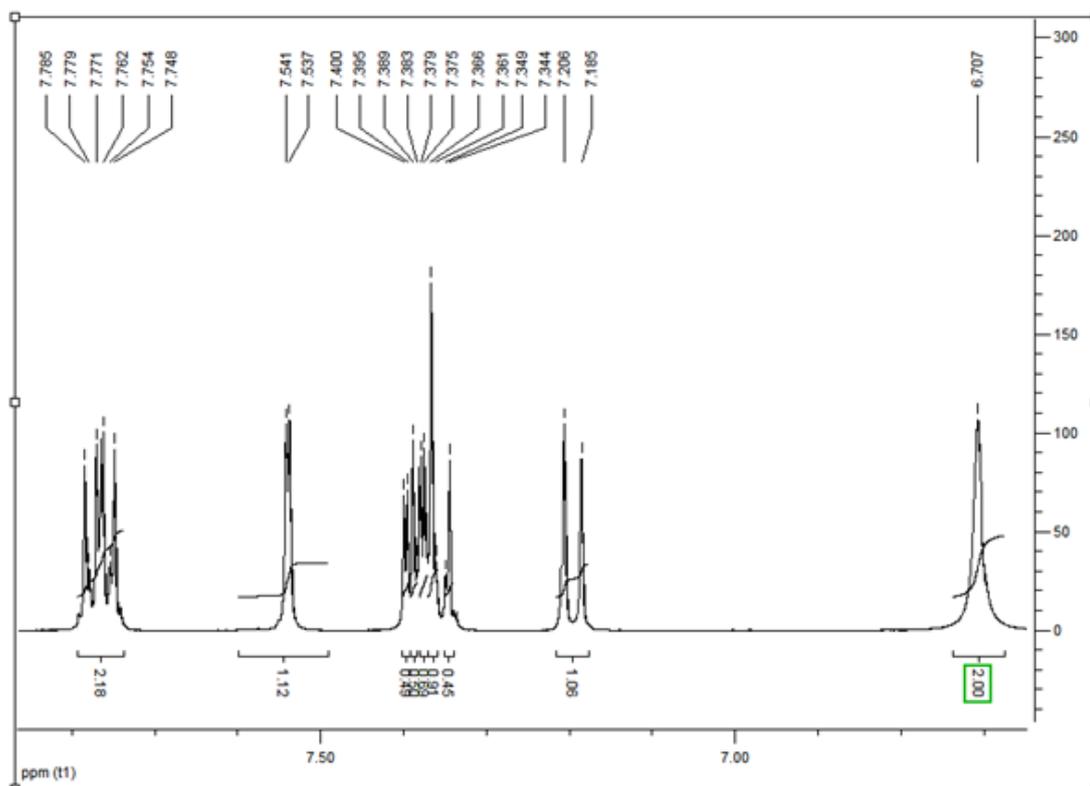
(5) H¹ en DMSO



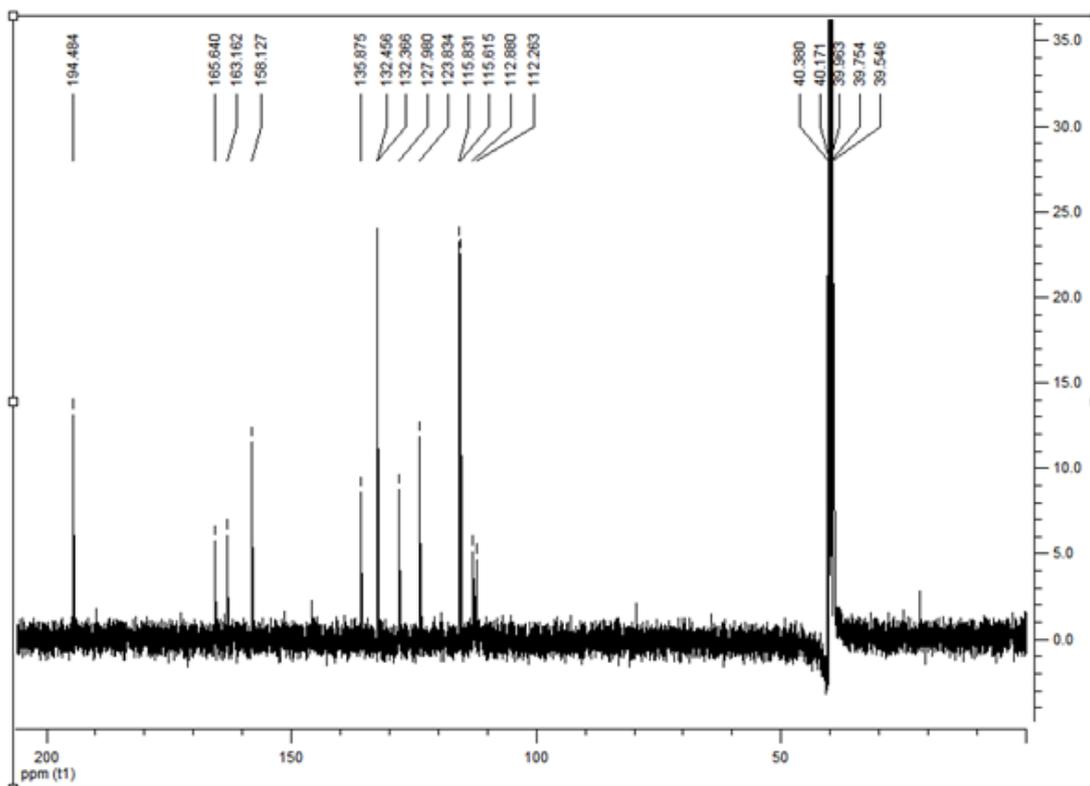
(5) C¹³ en DMSO



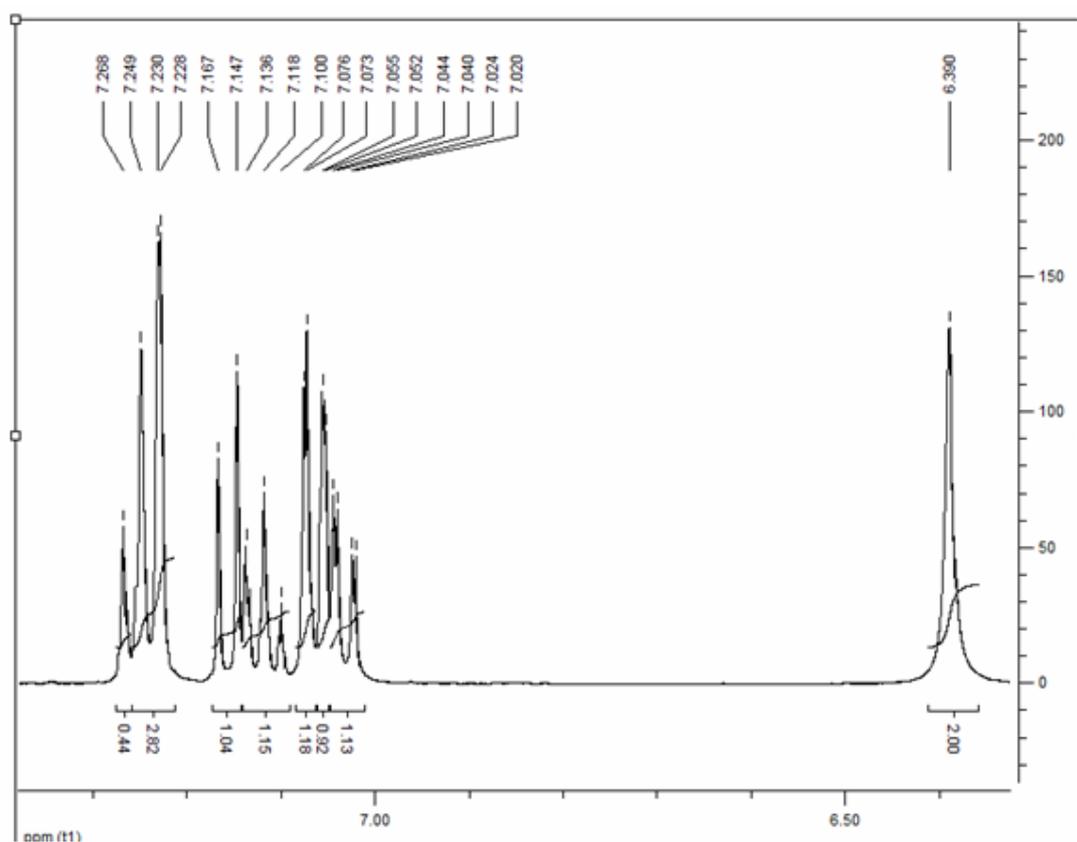
(6) H¹ en DMSO



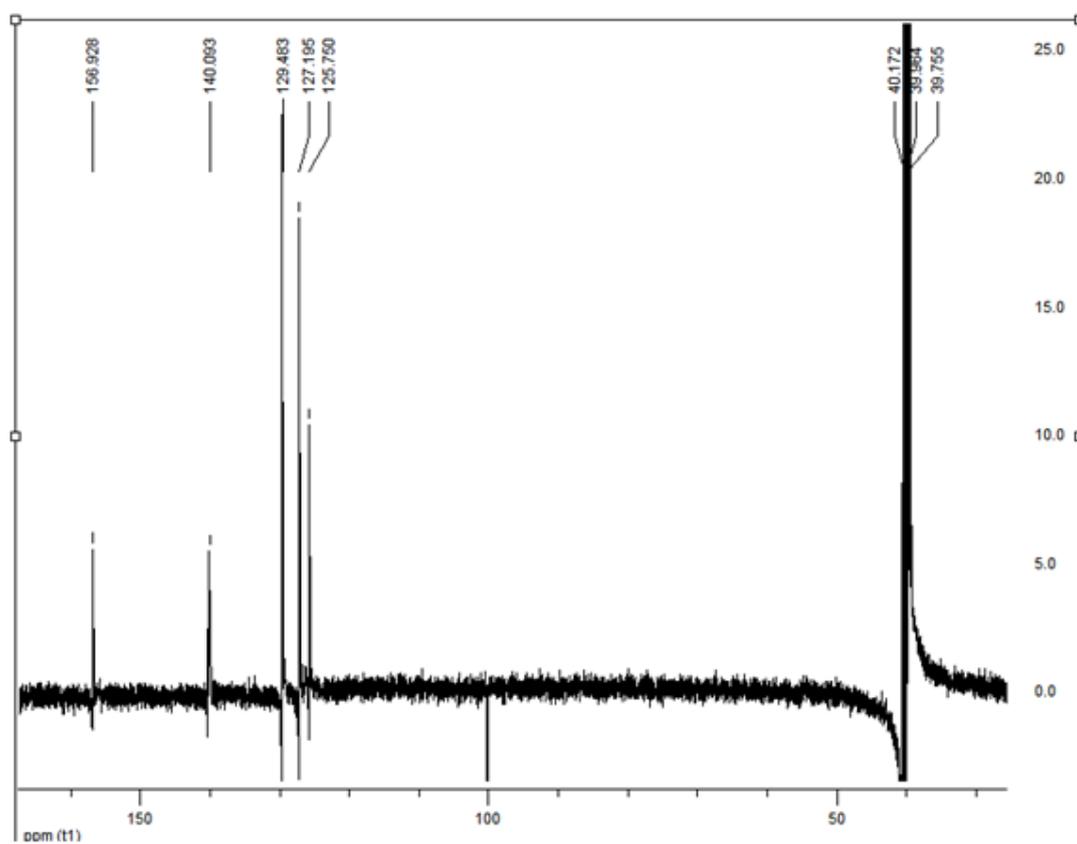
(6) C₁₃ en DMSO



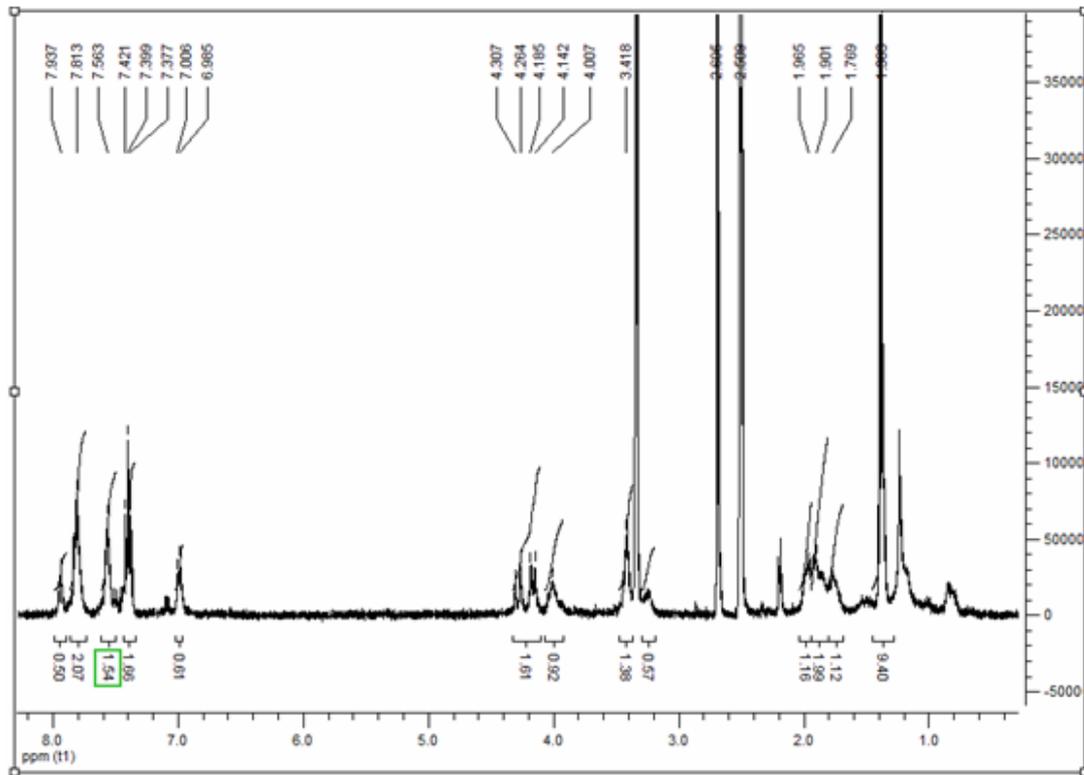
(7) H¹ en DMSO



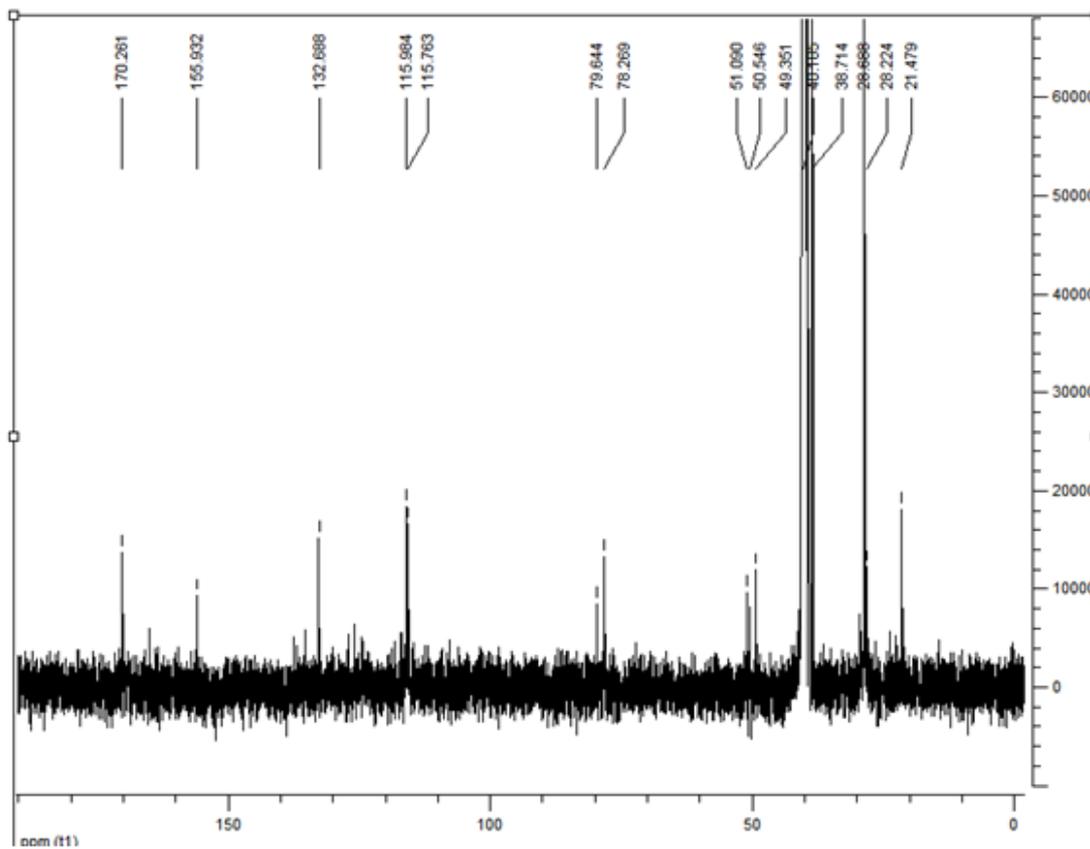
(7) C¹³ en DMSO



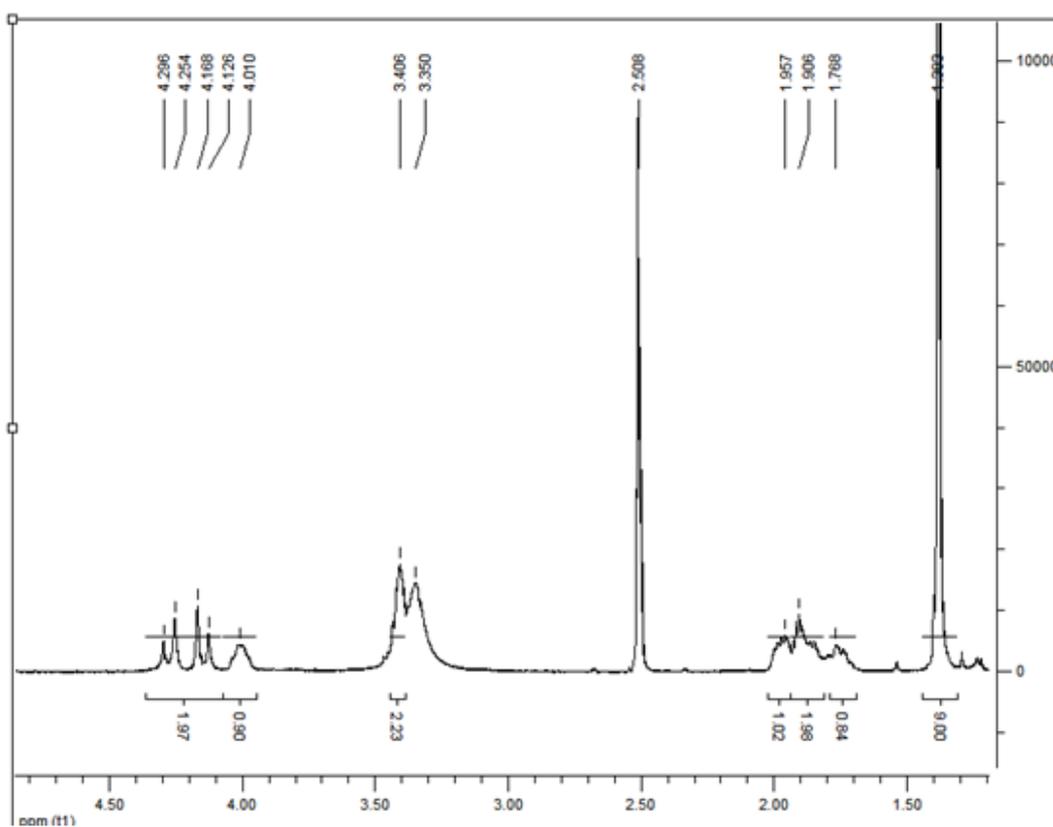
(9) H1 en DMSO



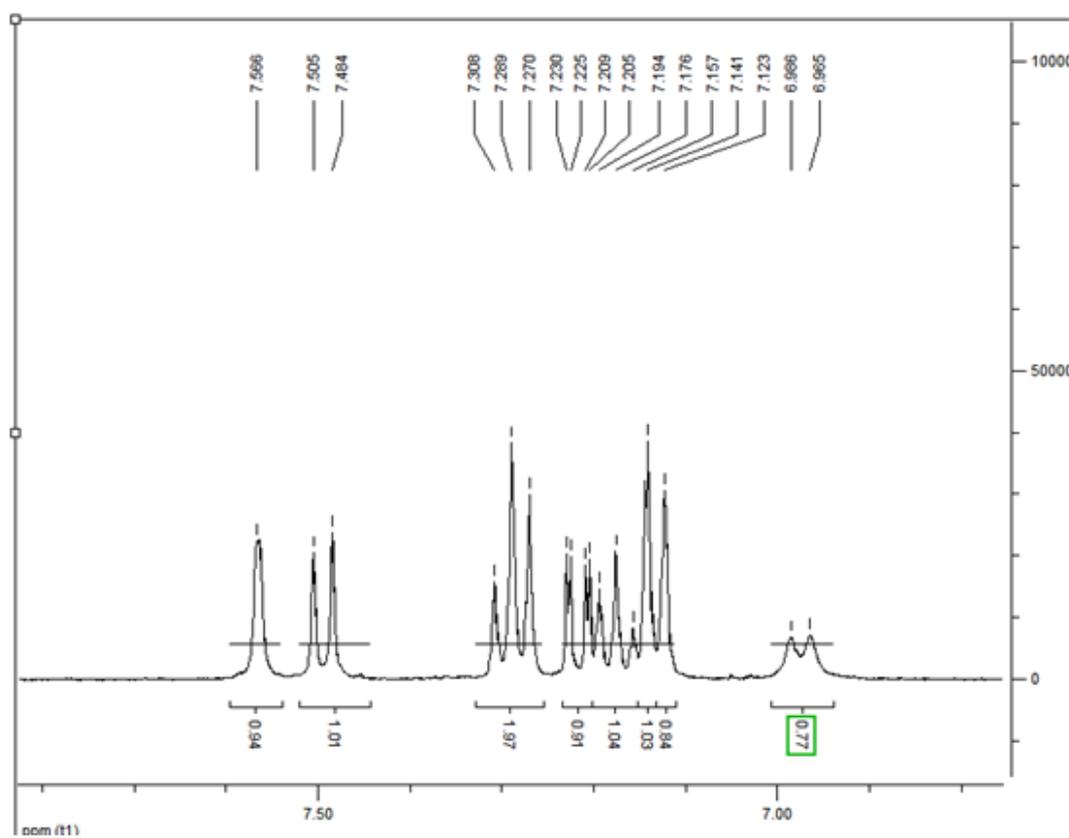
(9) C13 en DMSO



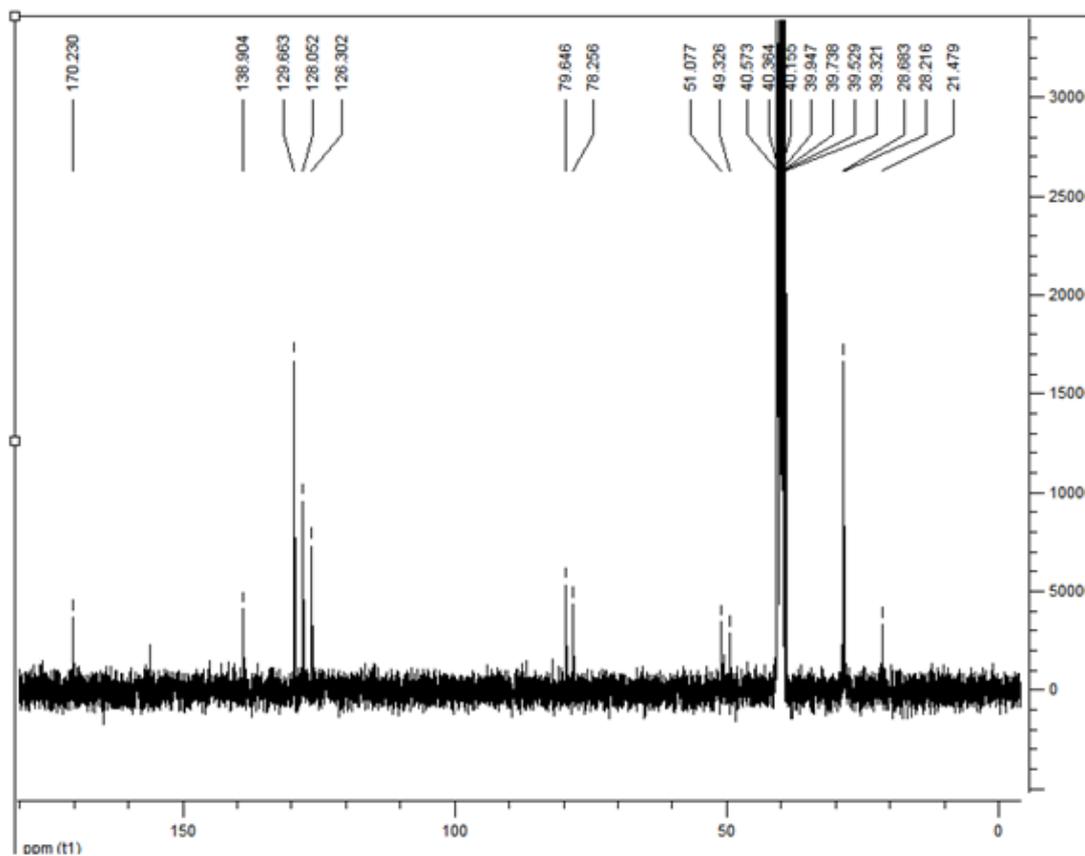
(10) H¹ en DMSO



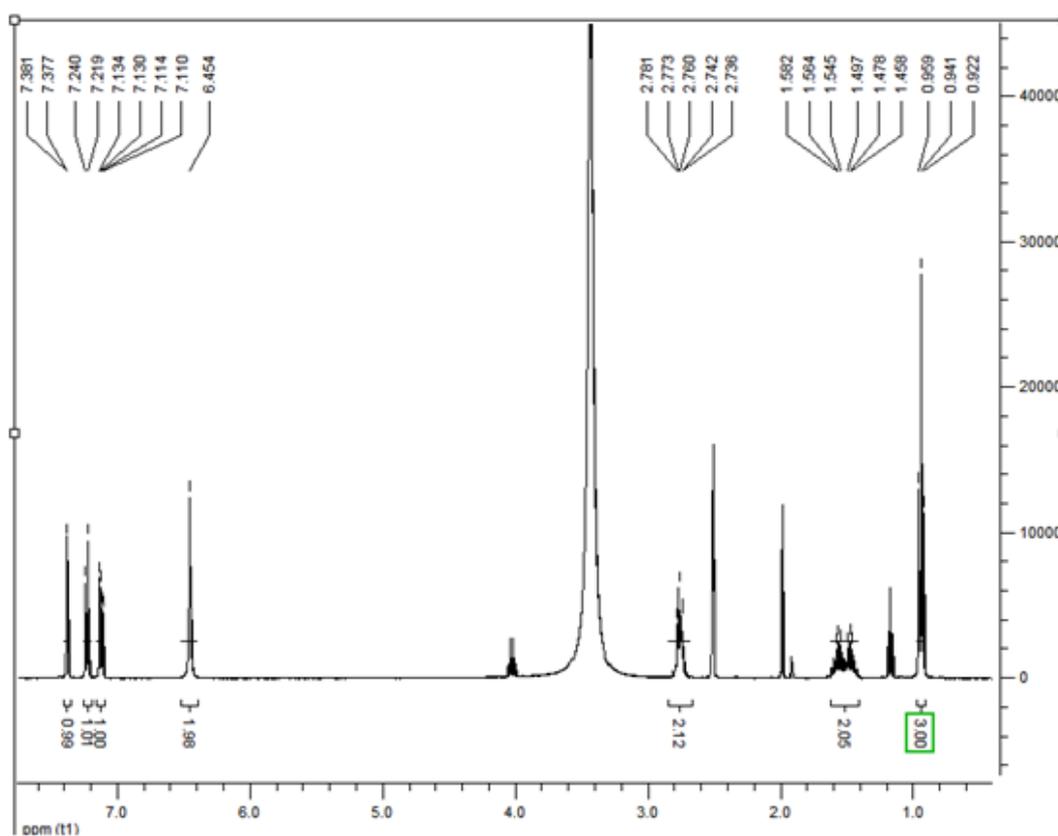
Cont. (10) H¹ en DMSO



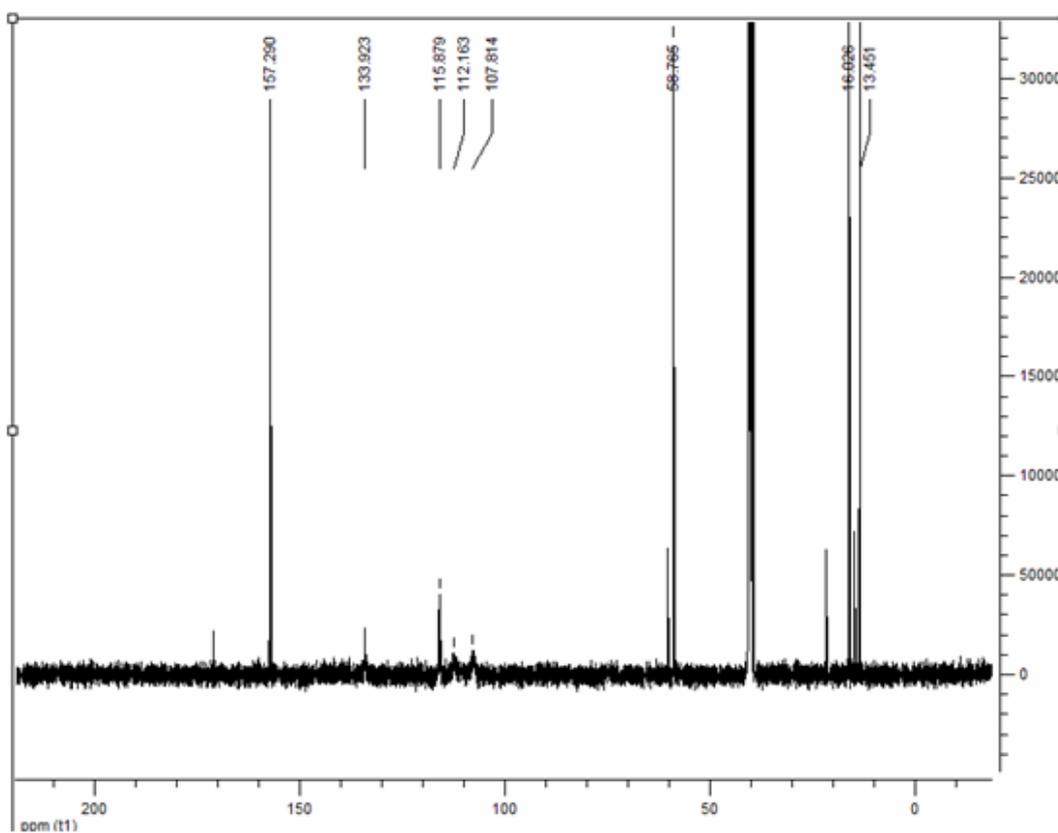
(10) C¹³ en DMSO



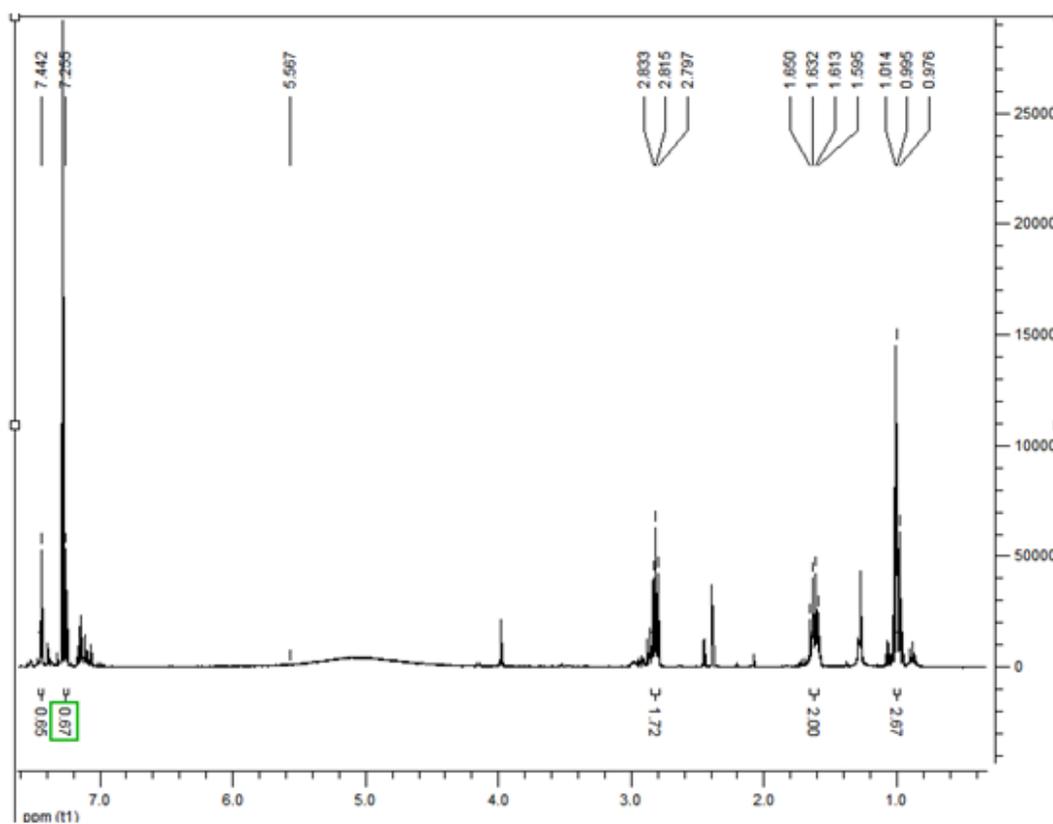
(5b) H¹ en DMSO



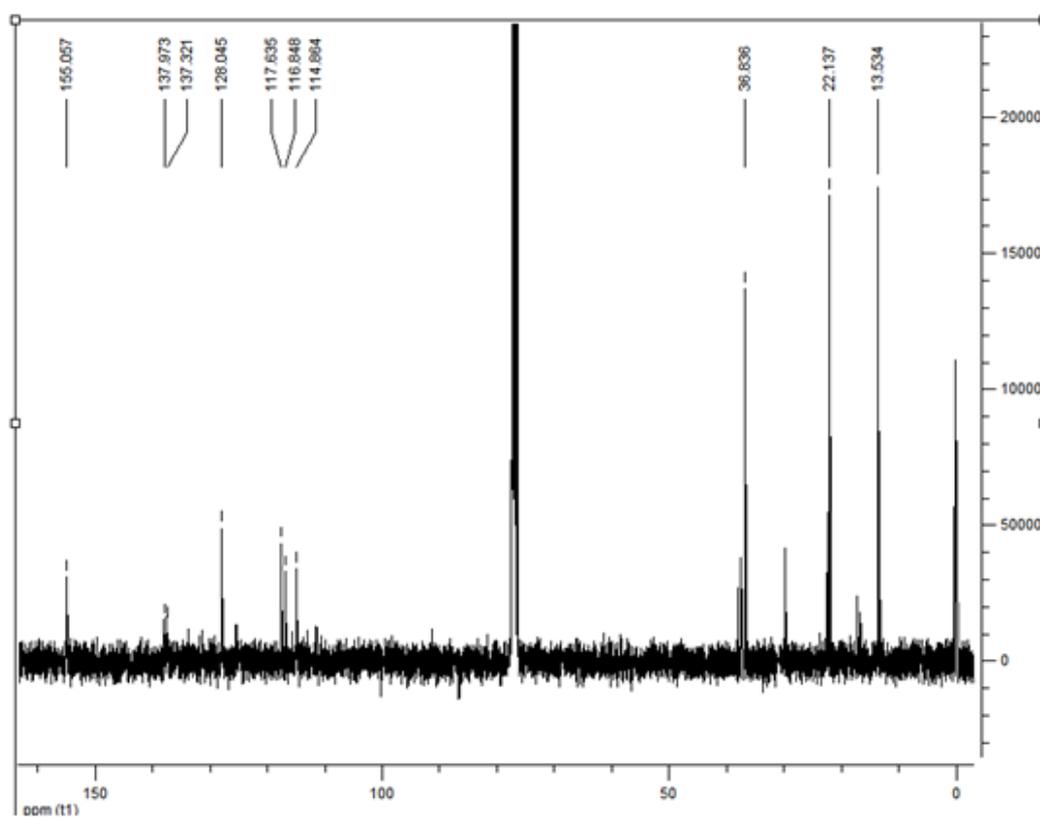
(5b) C¹³ en DMSO



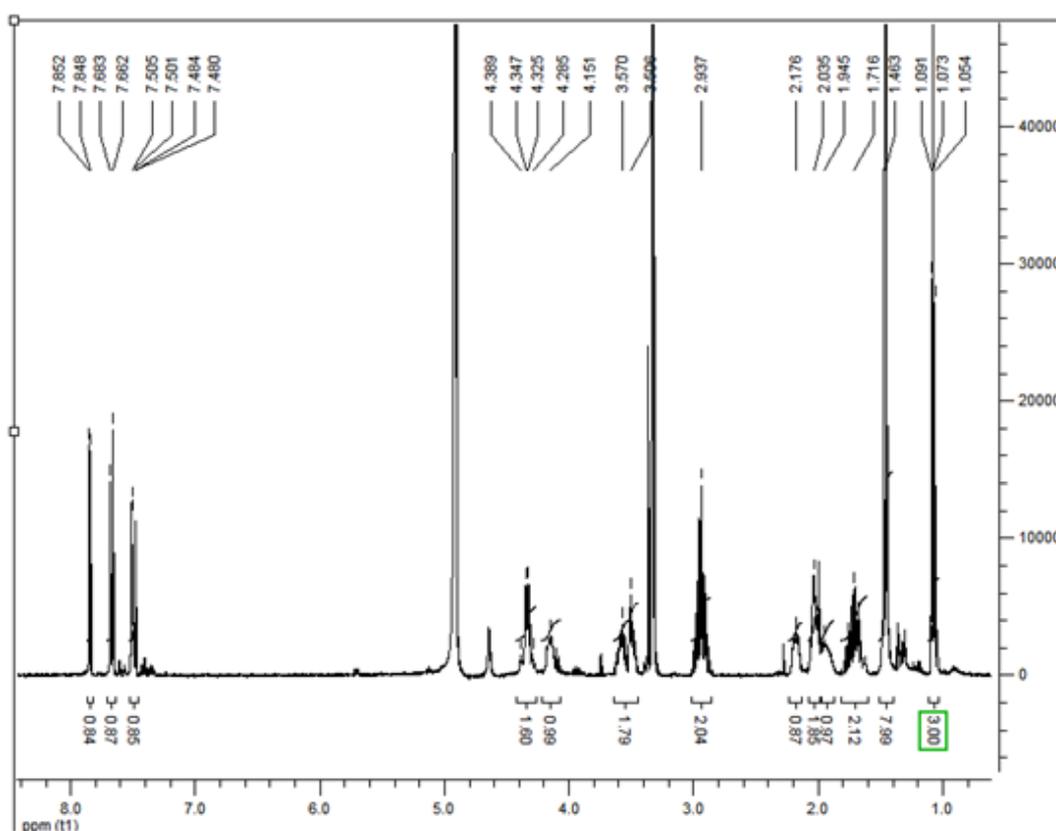
(5c) H¹ en CDCl₃



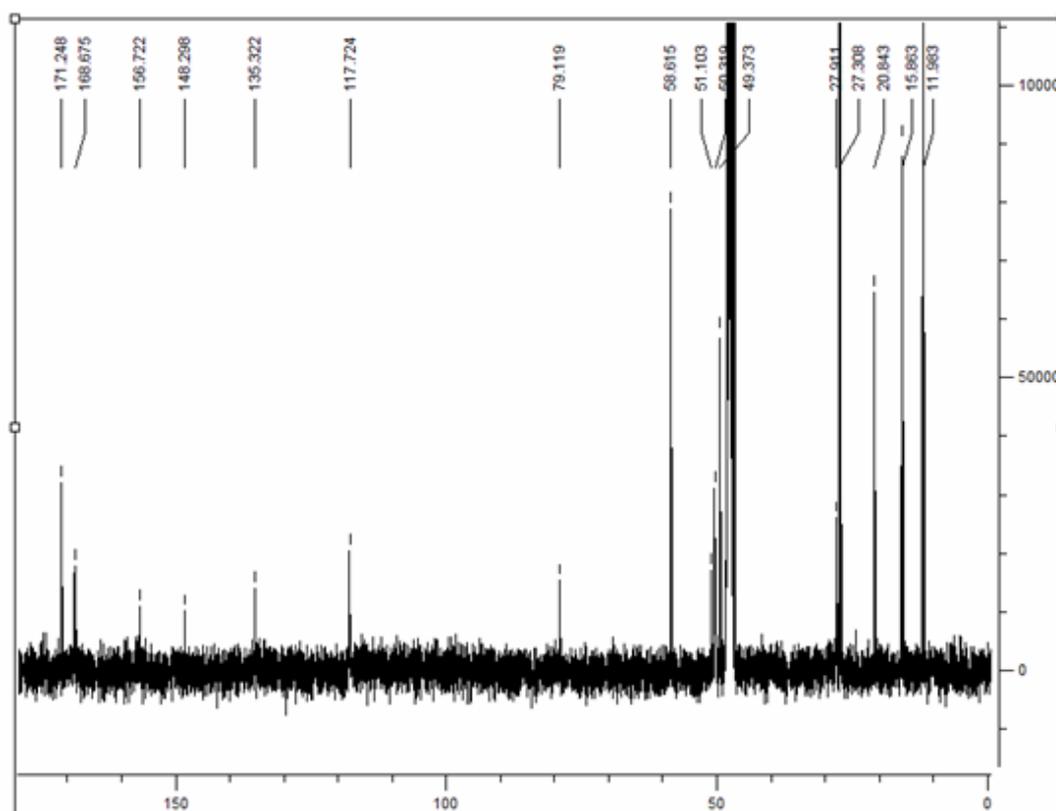
(5c) C¹³ en CDCl₃



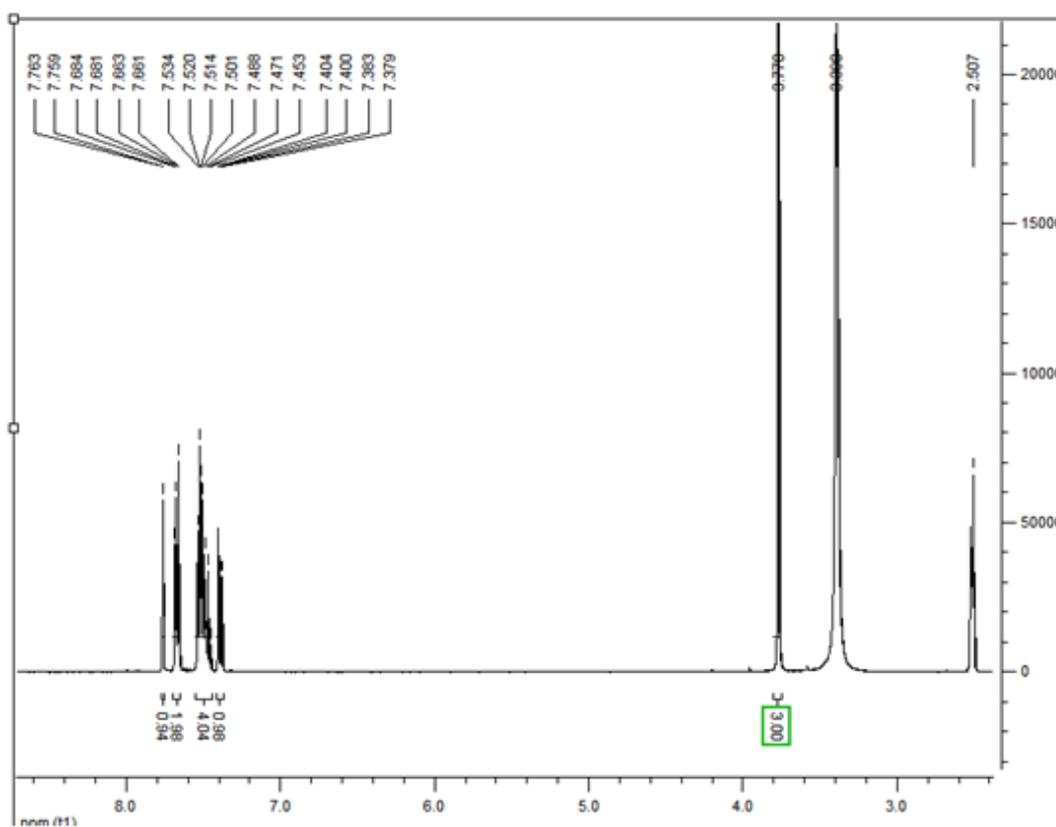
(11) H¹ en CD₃OD



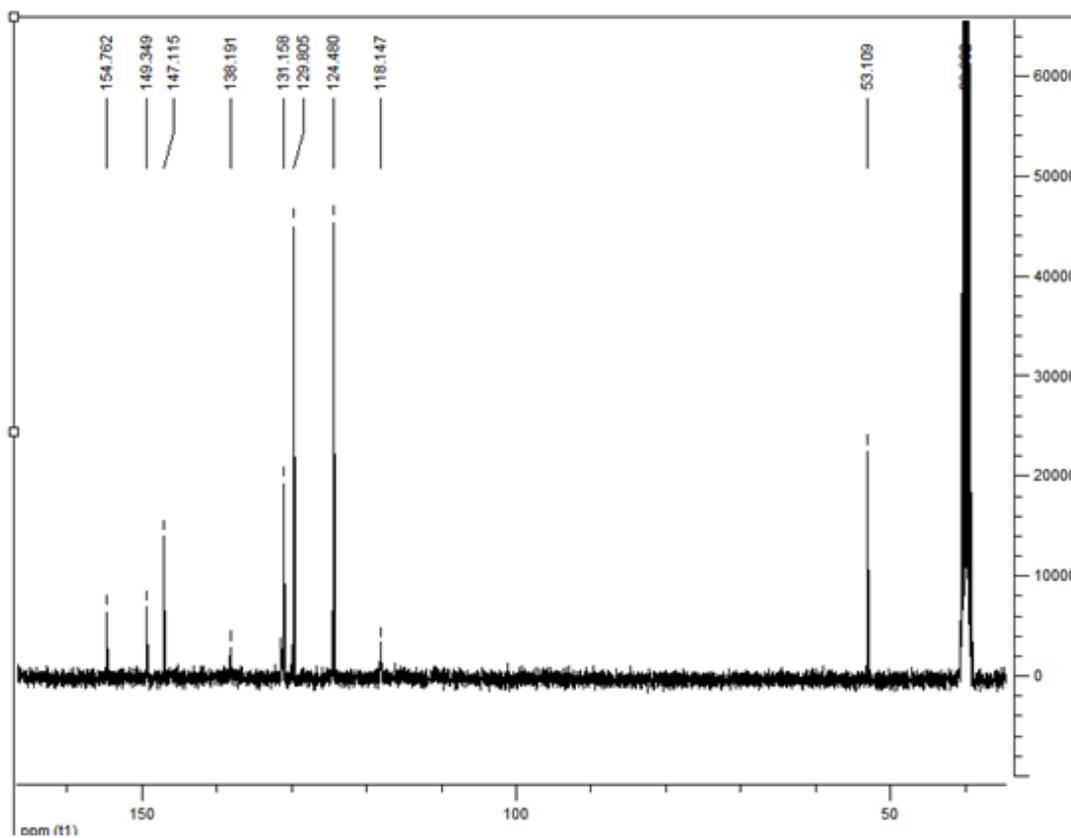
(11) C¹³ en CD₃OD



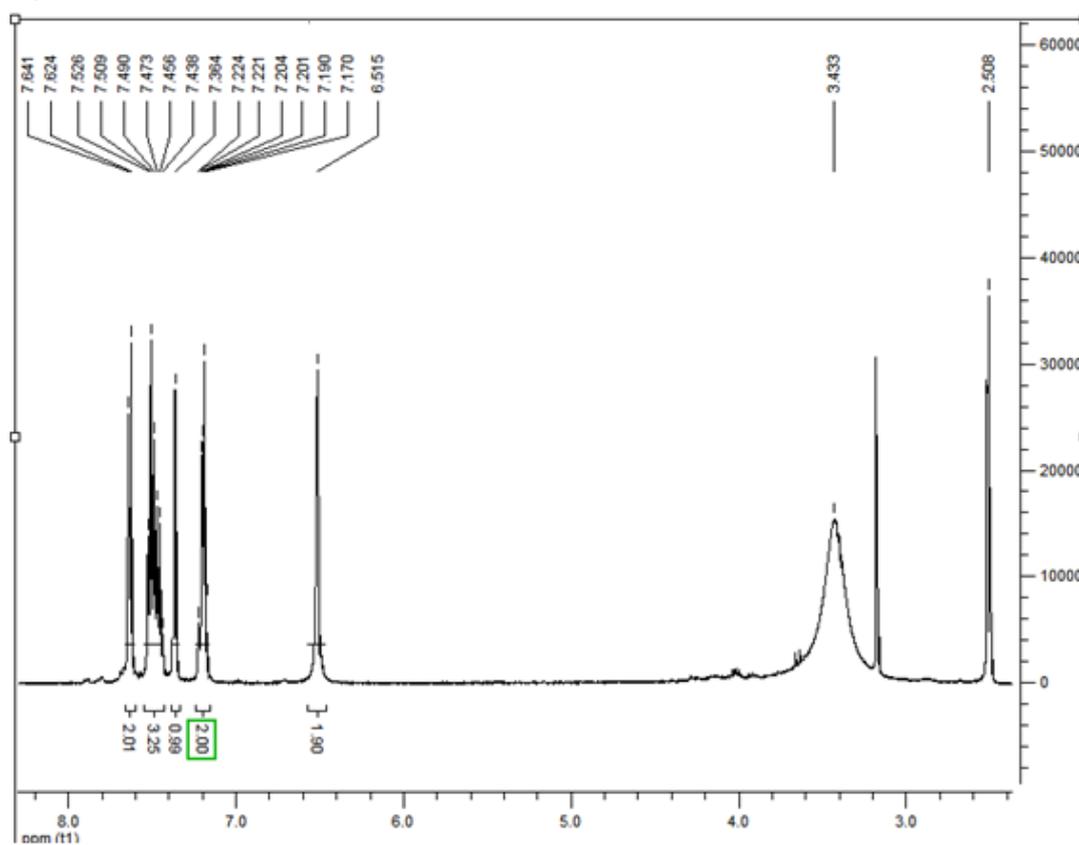
FEB SX H¹ en DMSO



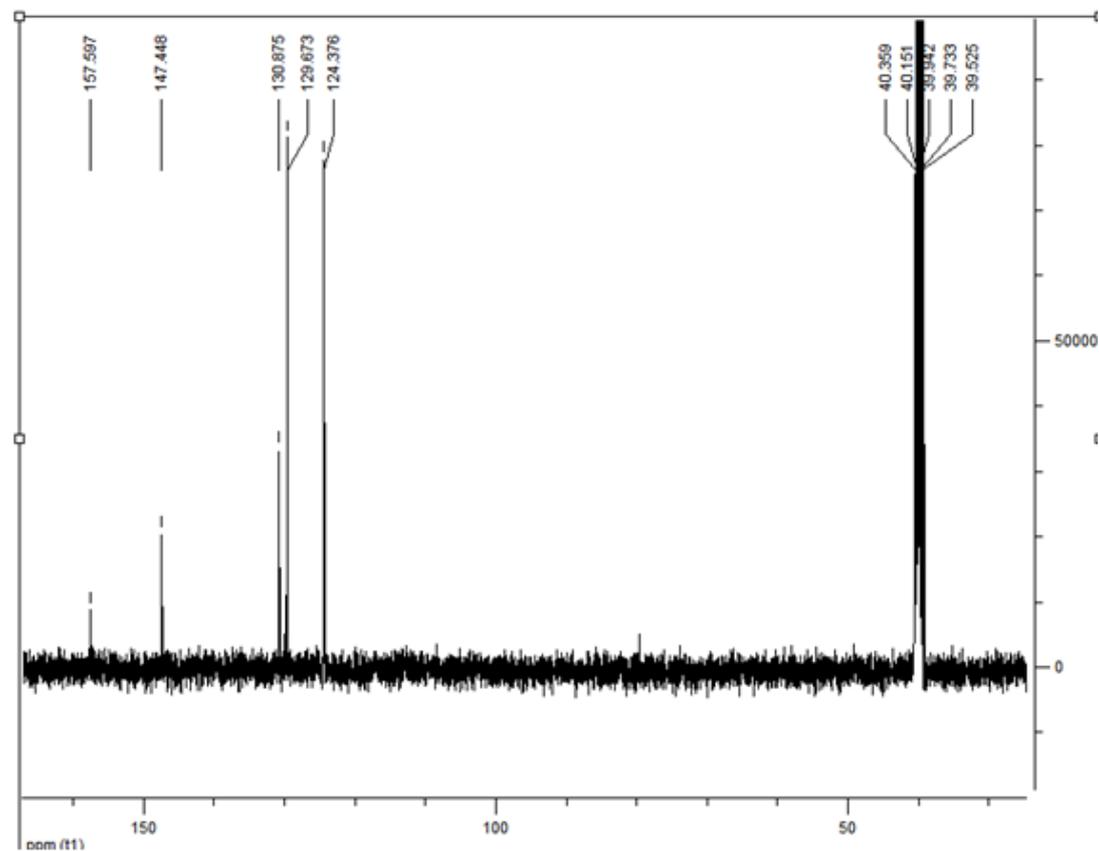
FEB SX C¹³ en DMSO



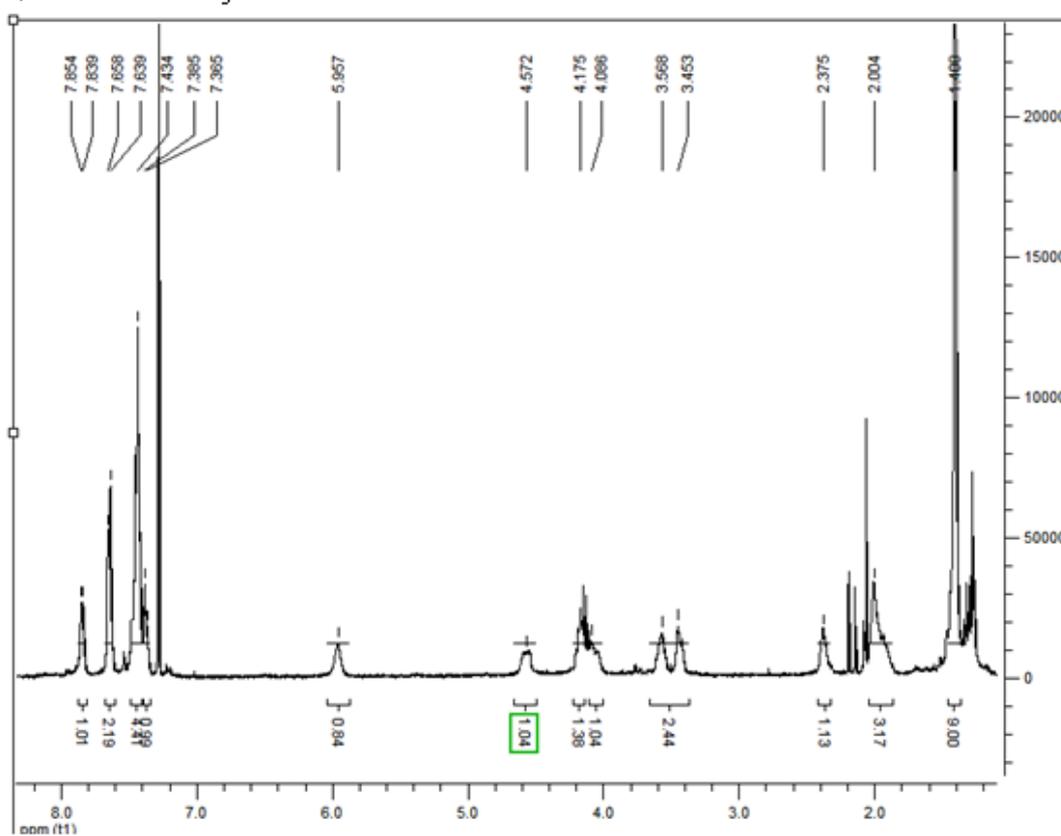
(7b) H¹ en DMSO



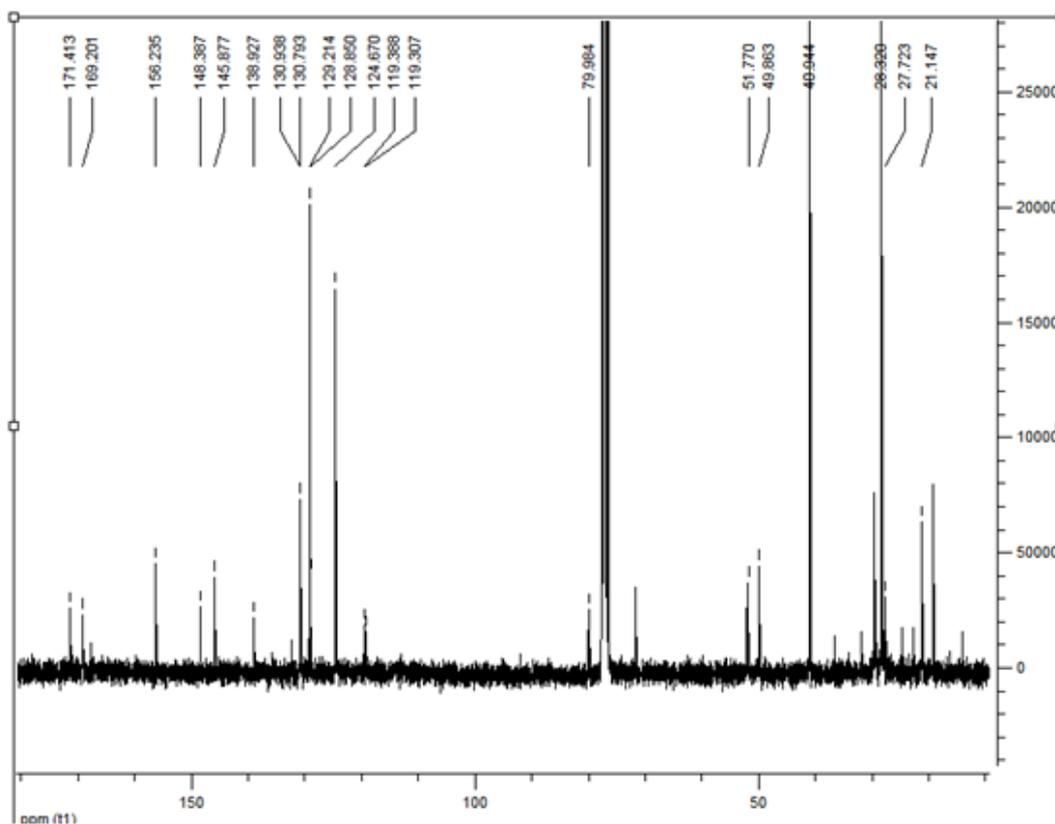
(7b) C¹³ en DMSO



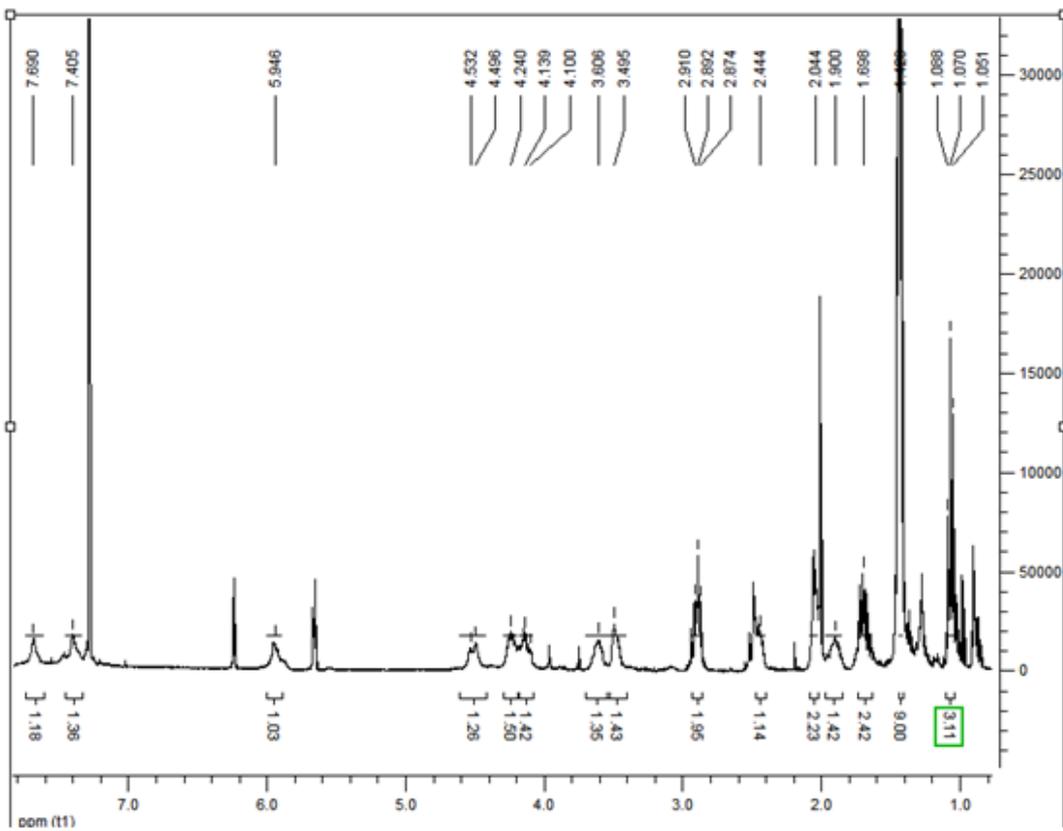
(12) H¹ en CDCl₃



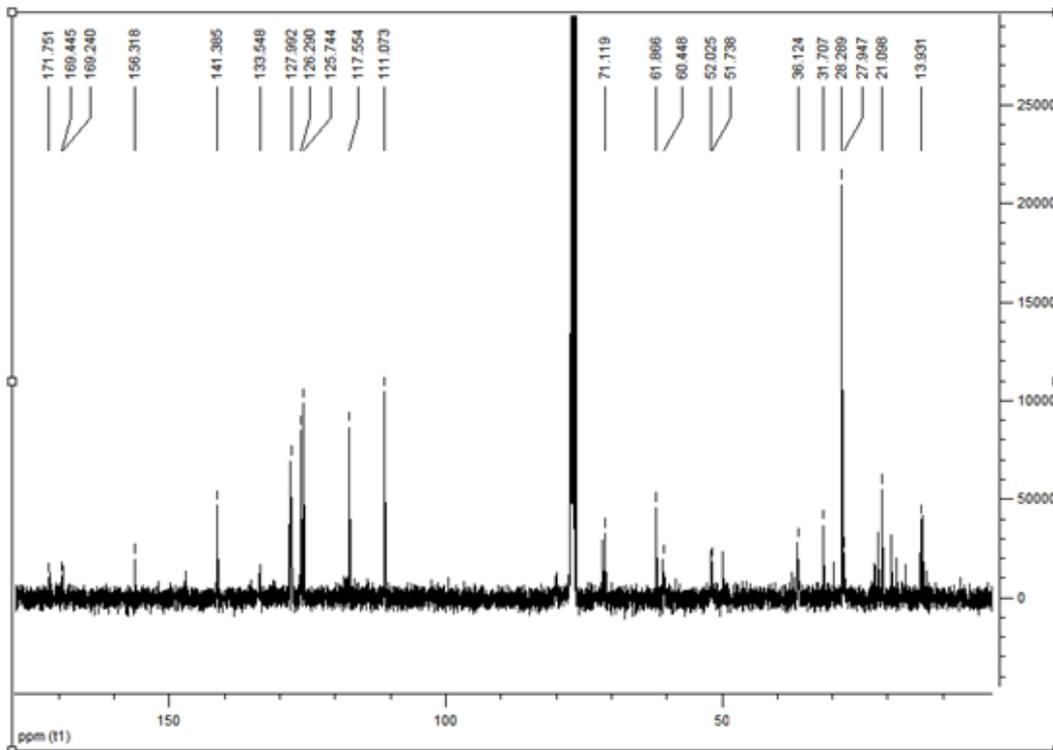
(12) C¹³ en CDCl₃



(13) H¹ en CDCl₃



(13) C¹³ en CDCl₃



CAPÍTULO 1

Síntesis de nuevos derivados híbridos valerolactama- benzimidazol

Introducción	pág. 45
Metodología y Resultados.	pág. 60
Discusión	pág. 69
Conclusiones	pág. 73
Bibliografía	pág. 74
Anexo Capítulo 1	pág. 79

INTRODUCCIÓN

Como se describió en el capítulo introductorio, sobre la estructura del compuesto 1 se realizó una farmacomodulación (Mendina, 2009), obteniéndose 2-amino-alkil, 2-acil-amino, N(6)-alkil y *bis*-derivados. Todos ellos demostraron una actividad antihelmíntica *in vitro* superior al patrón utilizado: ABZ. Dos de estos compuestos (1a y 1b) fueron evaluados respecto a su actividad antihelmíntica *in vivo* en ovinos, resultando con baja eficacia, buena biodisponibilidad y rápida eliminación. Con el fin de explorar si una lenta velocidad de difusión intraparasitaria pudiera ser la razón de la baja eficacia de los derivados δ -valerolactámicos, se realizaron estudios de difusión intraparasitaria *ex vivo* sobre *N. brasiliensis*, L4. En estos estudios se confirmó que éstos, a diferencia del patrón ABZ, no son capaces de ingresar al medio intraparasitario, a la concentración y tiempo de incubación ensayados, no pudiendo alcanzar, de este modo, su blanco molecular.

Usando estos antecedentes como base, se plantea el objetivo de lograr sintetizar compuestos estructuralmente análogos que mantengan la actividad antihelmíntica, pero que presenten una mayor lipofilia que la serie de origen. De esta manera, se pretende aumentar la capacidad de difusión intraparasitaria.

Para lograr este fin, se utilizó la **hibridación molecular: estrategia de diseño de nuevos ligandos o prototipos basado en la unión de dos o más estructuras bioactivas conocidas, cuya finalidad será el diseño de nuevos compuestos denominados híbridos, que mantienen las unidades farmacofóricas de sus derivados constituyentes** (Viegas-Junior *et al.* 2007) (figura 1.1, adaptación de Nepali *et al.*, 2014).

Las estrategias desarrolladas para obtener compuestos híbridos son varias. La elección de cuál utilizar dependerá de los objetivos que se pretenden alcanzar o qué propiedades biológicas y/o fisicoquímicas de los compuestos individuales se buscan mejorar.

Dentro de estas características se pueden citar, entre otras, la pérdida total o parcial de actividad como consecuencia de la aparición de fenómenos de resistencia, la necesidad de mejorar la potencia, sinergia de fármacos, así como otras vinculadas a la farmacocinética, metabolismo y toxicidad. De esta forma, el compuesto híbrido podrá corregir problemas farmacocinéticos de estabilidad metabólica o efectos secundarios provocados por uno de los componentes cuando se usa como molécula individual. (Walsh y Bell, 2009).

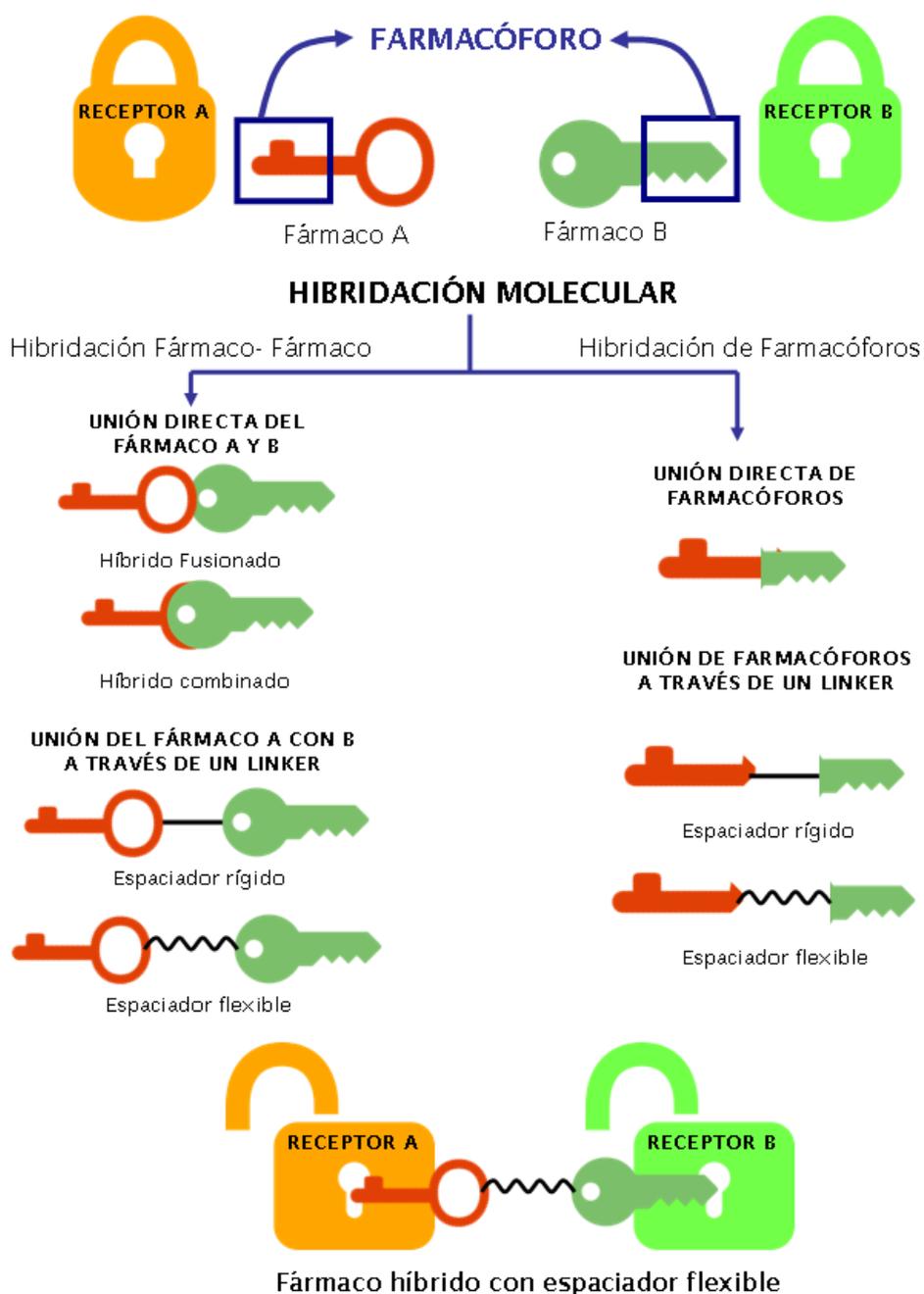


Figura 1.1. Estrategias de Hibridación Molecular (adaptado de Nepali *et al.*, 2014)

Para el tratamiento de numerosas enfermedades, dentro de las cuales se encuentran las infecciones por helmintos (helmintiasis), se utiliza terapia de combinación que consiste en la administración de fármacos con diferentes mecanismos de acción procurando un mayor efecto. La terapia de combinación consiste en la administración de múltiples fármacos, o de una sola entidad química (como es el caso de los fármacos híbridos), que sea capaz de actuar sobre diferentes blancos farmacológicos. Estos compuestos híbridos presentan algunas ventajas respecto a la terapia combinada: tener un perfil farmacocinético más predecible, evitar

problemas de solubilidad y estabilidad química que pueden ocurrir con mezclas de fármacos, ya sea en la formulación o en la administración.

Dentro de las patologías complejas donde se utiliza la terapia de combinación, se encuentran las enfermedades cardiovasculares. Uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento de hipertensión y angina es el bloqueante no selectivo de receptores β -adrenérgicos, propanolol. Así mismo, estas patologías se pueden tratar de forma alternativa con antagonistas de canales de calcio, como el análogo de verapamilo, la zatebradina. Se exploraron la estrategia de hibridación molecular para obtener nuevas moléculas híbridas cardioactivas (Bisi *et al.*, 2003), las cuales resultaron además en una mayor selectividad y afinidad por receptores adrenérgicos β_1 (figura 1.2, adaptada de Viegas- Junior *et al.*, 2007)

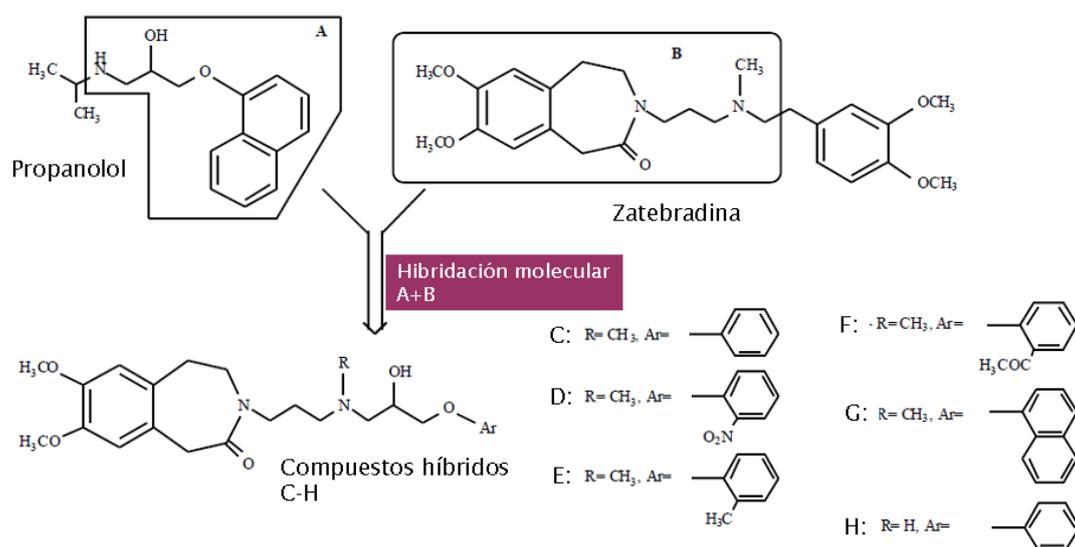


Figura 1.2. Compuestos híbridos cardioactivos, planificados a partir de propanolol y zatebradina (adaptada de Viegas- Junior *et al.*, 2007).

La estrategia de hibridación molecular también puede ser útil para combinar la acción de compuestos que actúan sobre el mismo blanco molecular pero en sitios diferentes. Un ejemplo de esta estrategia son las moléculas híbridas con acción antitumoral formadas a partir de la unión de Discodermolideo y Paclitaxel, siendo el blanco de ambos las tubulinas (figura 1.3). El Discodermolideo es un policétido de origen natural, aislado de extractos de la esponja marina *Discodermia dissolute*, cuyo blanco farmacológico son las tubulinas, estabilizando los microtúbulos. El Paclitaxel también un compuesto natural, aislado del árbol *Taxus brevifolia*, presenta el mismo mecanismo de acción que Discodermolideo.

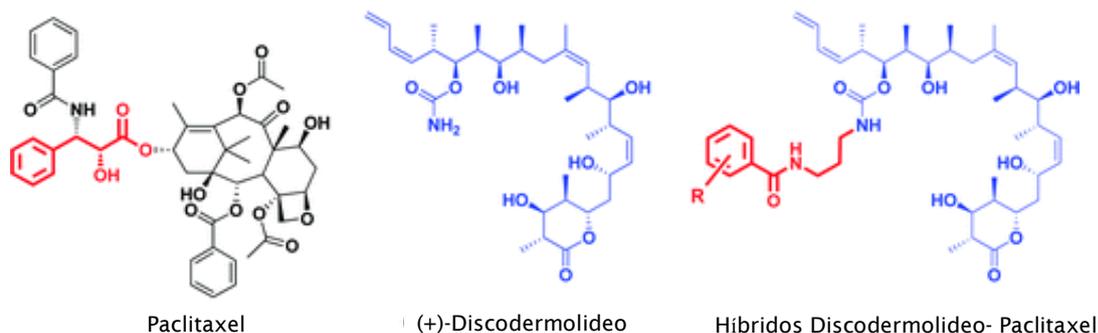


Figura 1.3- Híbridos Discodermolideo- Paclitaxel con actividad antitumoral.

Se conoce que ambos compuestos presentaron acción antitumoral sinérgica en diferentes líneas celulares, así como en modelo murino de cáncer de ovario (Klein *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006, y en Khrapunovich-Baine *et al.*, 2009). Se ha demostrado que dicha sinergia se debe a que Paclitaxel y Discodermolideo estabilizan los microtúbulos uniéndose a sitios diferentes. Mientras que el Paclitaxel ejerce su efecto estabilizador uniéndose a un bolsillo hidrofóbico en el monómero de β - tubulina, el Discodermolideo estabiliza los microtúbulos afectando los contactos interdímero, específicamente sobre la zona de unión a α - tubulina. Los nuevos compuestos híbridos entre estas dos entidades presentaron una actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares de cáncer de pulmón humano (A549) y de cáncer de mama (MCF-7), 2 a 8 veces mayor comparadas con los compuestos padre (Smith *et al.*, 2011)

Un ejemplo donde se utiliza la estrategia de hibridación molecular con el fin de mejorar las propiedades farmacocinéticas de uno de sus constituyentes es en el caso de los compuestos antimaláricos artemisina y quinina. La artemisina es un compuesto que posee una rápida acción, pero también una rápida eliminación, lo que lleva asociado un recrudecimiento en la infección cuando se la usa como monoterapia. Por lo tanto, hibridando la artemisina con el antimalárico de lenta acción y eliminación, quinina, se pretende mejorar el perfil farmacocinético de la primera. Los nuevos híbridos sintetizados (figura 1.4), presentaron una actividad *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*, que fue superior a los agentes artemisina o quinina por separado, e inclusive mayor a una mezcla 1:1 de ambos (Walsh *et al.*, 2007). Se propone como hipótesis que la actividad aumentada de estos híbridos respecto a sus componentes de partida, se debe a un aumento en la captación celular por parte del parásito.

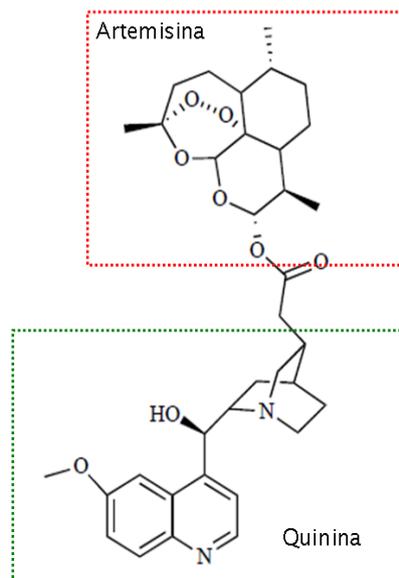


Figura 1.4. Híbrido de artemisina y quinidina, utilizado como antimalárico.

En vista de los ejemplos expuestos hasta el momento, se desprende que la estrategia de hibridación molecular puede ser utilizada con fines muy diversos. En el presente trabajo se utilizó ésta estrategia con el objetivo de lograr sintetizar compuestos derivados de δ -valerolactama capaces de mantener su actividad antihelmíntica, pero que presenten una mayor lipofilia que la serie de origen, a los efectos de aumentar su capacidad de difusión intraparasitaria.

Para alcanzar este objetivo, se acoplaron derivados de 2-amino- δ -valerolactama debidamente funcionalizados con 2-amino-benzimidazoles sustituidos en posición 5. Estos últimos, fueron sintetizados a partir benzimidazoles antihelmínticos comerciales (2-metilcarbamato-benzimidazoles). Se obtienen de esta manera los **compuestos híbridos valerolactama-benzimidazol** que se presentan en la figura 1.5.

2-amino- δ -valerolactama

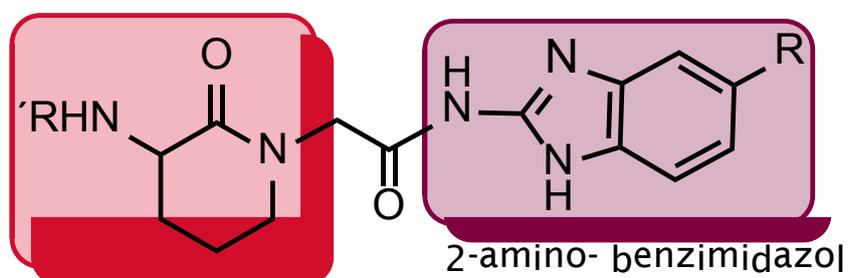


Figura 1.5. Estructura general de híbridos valerolactama- benzimidazol.

A través de los años, el grupo benzimidazol evolucionó como un importante heterociclo presente en diversos compuestos bioactivos, tales como antiparasitarios, anticonvulsivantes, analgésicos, antihistamínicos, antiulcerosos, antihipertensivos, antivirales, antineoplásicos, antifúngicos, antiinflamatorios y anticoagulantes. El núcleo de benzimidazol es considerado un centro importante en muchos compuestos, con blancos farmacológicos diferentes, ejerciendo variados efectos terapéuticos (figura 1.6, adaptada de Bansal y Silakari, 2012), entre los que se encuentra la actividad antihelmíntica. Ésta actividad hace del grupo benzimidazol un farmacóforo de interés para hibridar con los derivados valerolactámicos, también con actividad antihelmíntica. En la figura 1.6 los benzimidazoles antihelmínticos se encuentran representados por el albendazol.

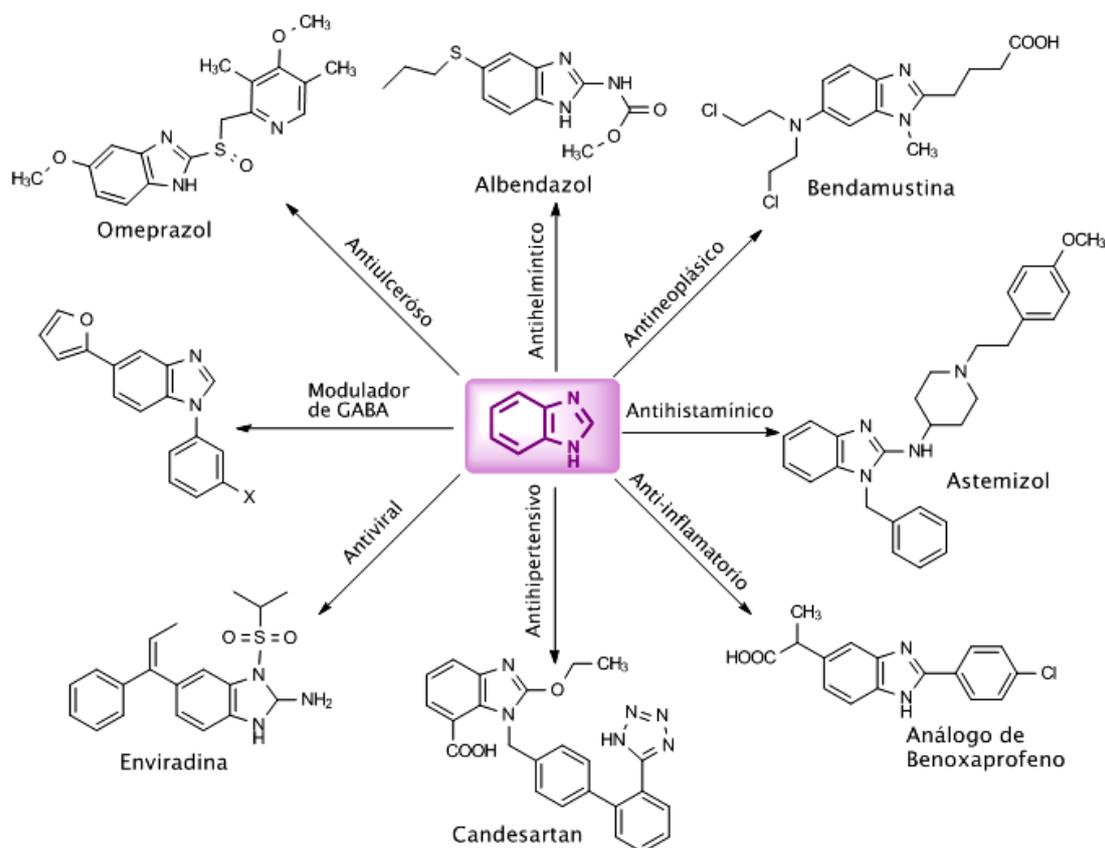
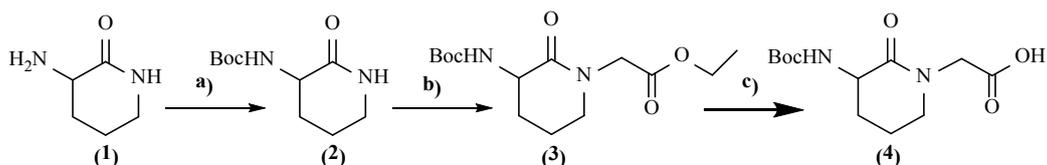


Figura 1.6. Grupo Benzimidazol, un núcleo versátil (adaptada de Bansal y Silakari, 2012).

Para la preparación de los compuestos híbridos utilizaremos una metodología sintética convergente, en la cual el resto ácido conteniendo el anillo valerolactámico es acoplado al amino-benzimidazol a través de una reacción de amidación. Se generan así los compuestos híbridos a través de un linker de dos átomos de carbono tal como aparecen en la figura 1.5 (Munguía *et al.*, 2013)

En el esquema 1.1 se presenta la ruta sintética empleada para obtener el bloque valerolactámico 4.



Esquema 1.1. Condiciones de reacción: a) $(\text{Boc})_2\text{O}$, TEA, dioxano, 24 hs (2, 100%); b) NaH, Bromoacetato de etilo, THF, 20 hs (3, 83%); c) K_2CO_3 , EtOH: H_2O (1:1), 22 hs (4, 88%).

El compuesto 1 fue obtenido a través de una reacción de ciclodeshidratación del aminoácido L-ornitina, previamente utilizada por nuestro grupo (Gordon *et al.*, 1997; Tesis doctoral del Dr. Pablo Mendina, 2009). Esta metodología desarrollada por Bladé y Font (Bladé y Font, 1980), utiliza alúmina básica como agente de ciclación deshidratante en tolueno a reflujo. Una trampa de Dean Stark es utilizada para desplazar el equilibrio hasta la finalización de la reacción.

Uno de los inconvenientes de esta reacción es la racemización del carbono 2, obteniéndose la mezcla de enantiómeros como producto final. A partir de este momento se continúa trabajando con dicha mezcla.

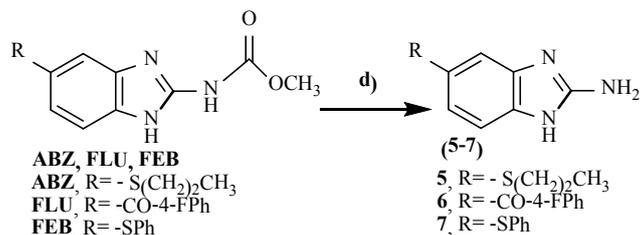
El producto 2 se obtuvo bajo condiciones habituales de protección de grupos amino con $(\text{BOC})_2\text{O}$.

Para la obtención del derivado alquilado en el nitrógeno 6, compuesto 3, se utilizó hidruro de sodio como base en tetrahidrofurano, dando lugar al anión correspondiente, alquilado por tratamiento con bromoacetato de etilo. Pequeñas proporciones de O-alquilación son observadas en esta reacción.

En una última etapa por hidrólisis básica del éster etílico, utilizando carbonato de potasio en etanol, se obtuvo el producto 4.

Para la obtención de los derivados 2-amino-benzimidazolicos, funcionalizados en posición 5, se partió de sus precursores benzimidazoles antihelmínticos comerciales Albendazol (ABZ), Febendazol (FEB) y Flubendazol (FLU), que fueron

sometidos a hidrólisis ácida del grupo metil carbamato. Se aplicó metodología descrita por Gyurik, *et al* 1981, el esquema 1.2 resume la misma.



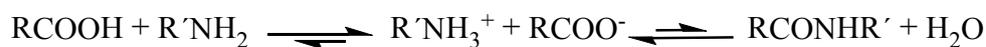
Esquema 1.2. Condiciones de reacción: d) Se calienta a reflujo en HBr 24%, 19 hs para los derivados amino benzimidazol 5-7 (5, 69%; 6, 65%; 7, 87%)

Una vez obtenidos los bloques precursores se trabajó en la puesta a punto de la metodología de síntesis para la obtención de híbridos valerolactama- benzimidazol, a través de una reacción de amidación.

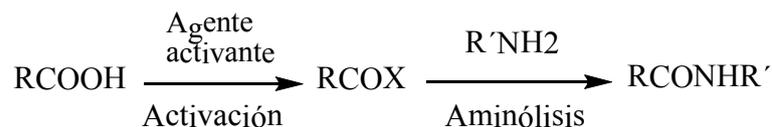
Estrategias para la obtención de enlace amida

La base de datos Comprehensive Medicinal Chemistry (CMC) revela que el grupo carboxamida aparece en más del 25% de los fármacos conocidos (Ghose, *et al* 1999). Esto es de esperarse ya que las carboxamidas son neutras, estables y tienen propiedades tanto aceptora como dadora de enlace de hidrógeno, estando este último generalmente involucrado en las interacciones ligando- target biológico (enzima, receptores, etc.)

La formación del enlace amida es formalmente una condensación entre un grupo ácido y una amina donde en el equilibrio de reacción, la reacción ácido -base ocurre primero para formar una sal estable:



Por lo tanto, en la formación de enlace amida, las condiciones termodinámicas son adversas, por lo que se hace necesario activar el grupo ácido.

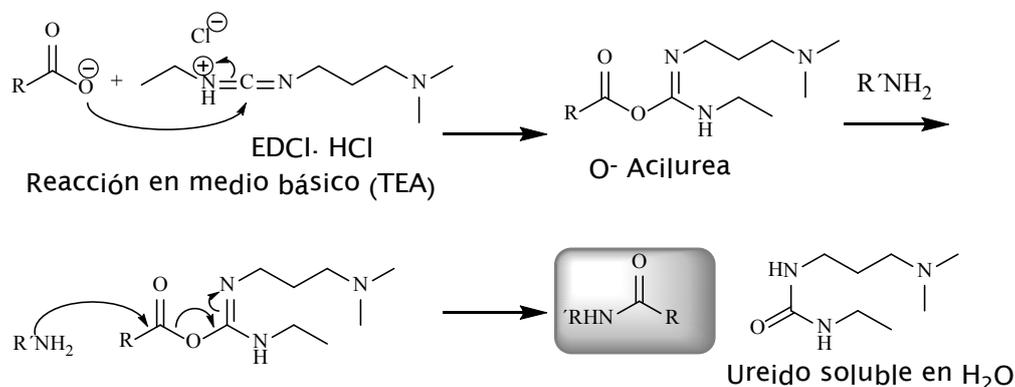


Las estrategias empleadas en éste trabajo para la formación de enlace amida fueron las siguientes:

- a) Formación de O-acilurea usando 1-etil-3-(3-dimetilamino)carbodiimida (EDCI, clorhidrato) como agente acoplante

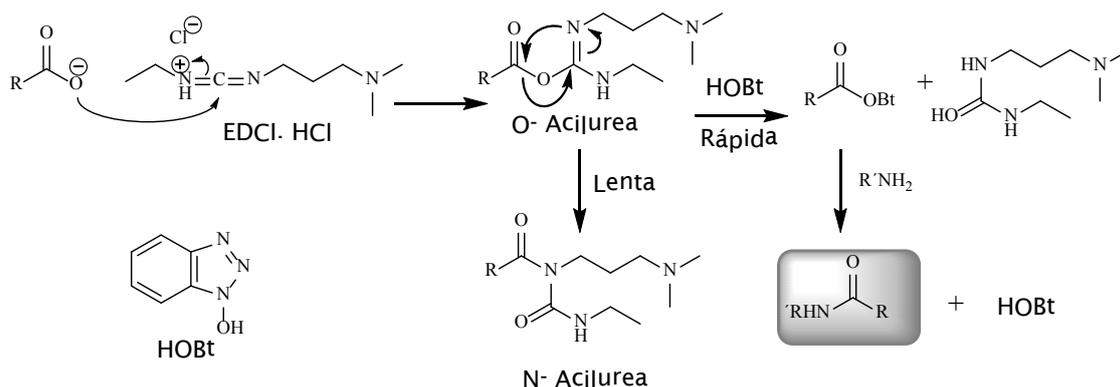
- b) Formación de éster activo, mediante el uso de la sal de uronio O- (Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU)
- c) Formación de un derivado anhídrido carbónico activado, usando cloroformiato de etilo o cloroformiato de tricloroetilo como agentes activantes.
- d) Formación de un éster activo usando el derivado de fosfonato 3-(dietoxifosforilo)-1,2,3 benzotriazin-4(3H)-ona (DEPBT) como agente acoplante

a) Uso de EDCI. HCl como agente acoplante. La EDCI es un agente activador del grupo ácido de la familia de las carboimidias. Ésta carboimida reacciona con el ácido carboxílico en su forma de carboxilato (medio básico, trietilamina, TEA) para formar una O- acilurea (Montalbetti y Falque, 2005). En el esquema 1.3 se describe el mecanismo por el cual se genera dicho intermediario:



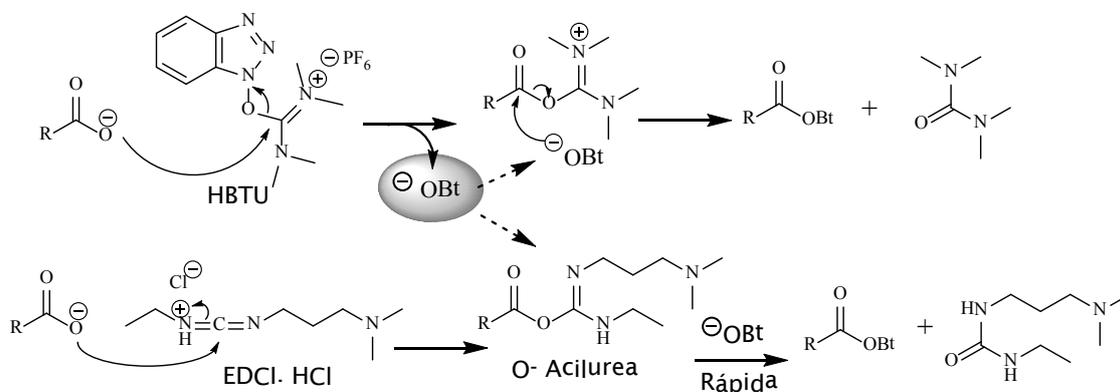
Esquema 1.3. Mecanismo involucrado en la formación de enlace amida, usando EDCI como acoplante

La O- acilurea reacciona directamente con la amina de interés para dar la amida junto con un producto secundario ureido. Este derivado ureido que se forma en el caso particular de la EDCI es soluble en agua, por lo que facilita su eliminación mediante extracción líquida-líquida. Durante ésta reacción de formación del intermediario O- acilurea puede ocurrir racemización, así como transferencia del acilo para dar un compuesto N- acilurea que no es reactivo. Esta reacción secundaria puede ser disminuida agregando un nucleófilo que reaccione más rápidamente con la O- acilurea, compitiendo con la transferencia del acilo que da la N- acilurea. En ella se genera un intermediario lo suficientemente reactivo como para que interaccione con la amina para dar la amida de interés. Los nucleófilos comúnmente usados son el HOBt (hidroxibenzotrazol) y DMAP (dimetilaminopiridina) (Montalbetti y Falque, 2005). En el esquema 1.4, se describe el mecanismo involucrado en la reacción antes mencionada:



Esquema 1.4. Uso de HOBT para desplazar reacción hacia la formación de éster activado, en lugar de la reacción secundaria para dar N- acilurea.

Ante la falta de provisión de HOBT, debido a que su producción ha sido discontinuada por parte de la mayoría de los proveedores de reactivos químicos, otro nucleófilo plausible de ser usado para disminuir la formación del producto secundario N- Acilurea es el HBTU. Esta sal de uronio al reaccionar con el carboxilato libera ^-OBt , que puede reaccionar con la O- acilurea para dar el éster RCOOBt. En el esquema 1.5 se muestra el mecanismo involucrado en ésta reacción. A continuación en el ítem b) se describe el uso de HBTU como agente acoplante per se.

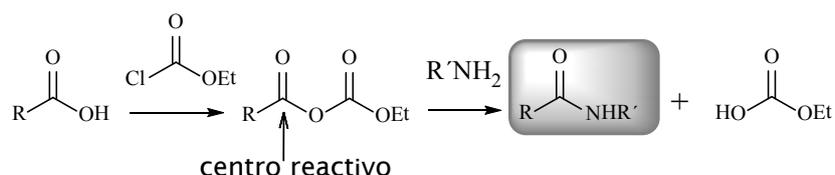


Esquema 1.5. Uso de HBTU para desplazar reacción hacia la formación de éster activado, en lugar de la reacción secundaria para dar N- acilurea

b) Uso de HBTU como agente acoplante. Los ésteres activados, como los ésteres aromáticos, son más fácilmente hidrolizables que los ésteres alquílicos, por lo que pueden reaccionar con un amplio rango de nucleófilos, Al igual que las aminas. La electrofilicidad aumentada del centro carbonílico, comparado con los ésteres alquílicos, se debe al carácter electrón- atrayente del alcohol aromático al que se une.

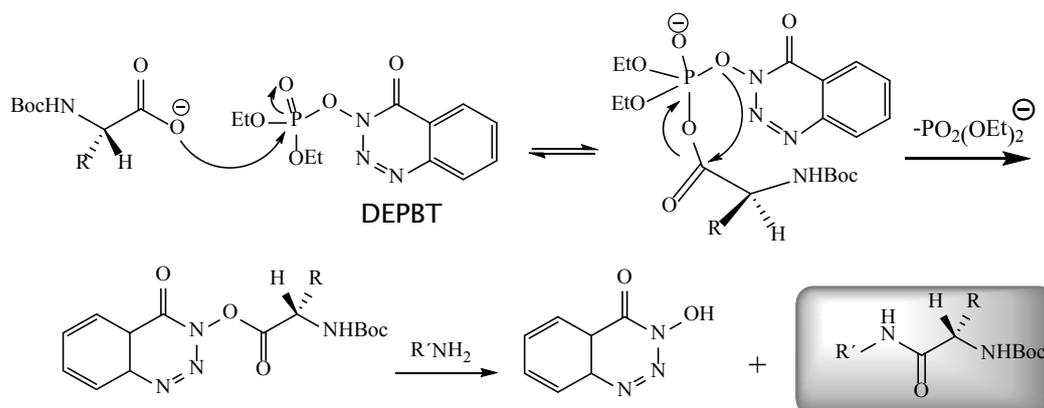
El HBTU reacciona con el carboxilato, como se muestra en el esquema 1.5, para dar una O- acilurea, que rápidamente es atacada por el alcoholato del hidroxibenzotriazol para dar el éster activado (RCOOBt). Éste éster es capaz de ser atacado por la amina formando así el enlace amida de interés.

c) Uso de cloroformiato de etilo como agente acoplante. El cloroformiato de etilo reacciona con el ácido carboxílico para formar un anhídrido carbónico mixto activo, etoxicarbonil anhídrido (esquema 1.6), donde el centro electrofílico del carbonato es más reactivo que el carboxílico. Esta reactividad aumentada se debe a que el centro carbonato está menos estabilizado por resonancia (Montalbetti y Falque, 2005)



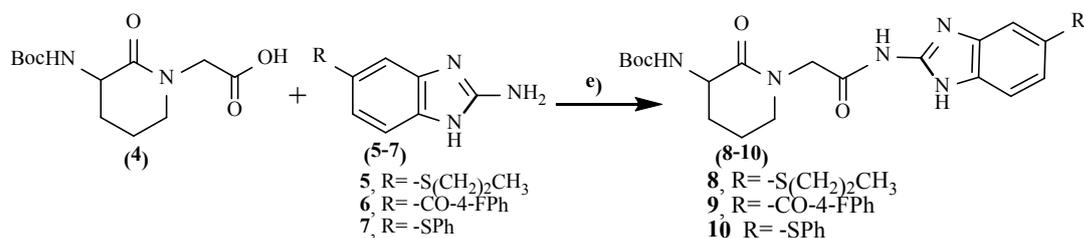
Esquema 1.6. Formación de enlace amida usando como agente activante cloroformiato de etilo

d) Uso de DEPBT como agente acoplante. El DEPBT es un agente que se caracteriza principalmente por mediar la formación del enlace amida con una importante resistencia a la racemización (Li *et al*, 1999). De la reacción entre el carboxilato (medio básico, diisopropiletilamina, DIPEA) y el DEPBT se genera un intermediario que rápidamente sufre un rearrreglo con pérdida de dietil fosfito, para formar finalmente el éster activado de HOObt (3- hidrox- 1,2,3- benzotriazin- 4 (3H)- ona). Este intermediario activado reacciona con la amina para formar el enlace amida. En el esquema 1.7 se describe dicho mecanismo de reacción.



Esquema 1.7. Mecanismo involucrado en la activación del ácido usando DEPBT como agente acoplante.

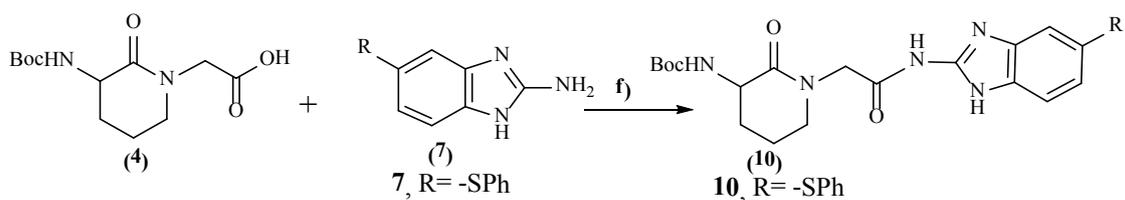
En el esquema 1.8 se resumen las condiciones de reacción en las que se logró obtener los híbridos 8 a 10.



Esquema 1.8. Condiciones de reacción: e) 8: EDCI, HOBT y TEA en CH_2Cl_2 , 19 hs (8, 90%). 9: EDCI, HBTU y TEA en DMF, 20 hs (9, 49%). 10: DEPBT y DIPEA en THF, 19 hs (10, 88%).

Como se indicó anteriormente, también se probaron como agentes acoplantes para obtener el híbrido 10: *HBTU*, siguiendo condiciones de reacción reportadas por Bürli, *et al.*, 2004, donde se trabajó con 1.5 equivalentes (eq) de *HBTU* y 3 eq de *DIPEA*, en DMF y calentando a 60°C , se dejó reaccionar por 1 hora, para luego agregar 1.2 eq de la amina 7; *cloroformiato de etilo*, se ensayó bajo condiciones de reacción reportadas por Chaudhary, *et al.*, 2003, donde se trabajó con 1.3 eq de cloroformiato y 2 eq de *DIPEA*, reaccionando con el ácido 4 a 0°C en DMF. Luego de 30 min de reacción se agregó la amina 7, 1.3 eq, dejándolo reaccionar a temp. amb.; *cloroformiato de tricloroetilo*, se hicieron reaccionar 3 eq de cloroformiato de tricloroetilo y 1.3 eq de *DIPEA* junto con el ácido 4 en THF, a 0°C , luego se agregaron 1.3 eq de la amina 7, se dejó reaccionar a temp. amb.

En el esquema 1.9 se resumen las condiciones de reacción utilizadas.



Esquema 1.9. Condiciones de reacción: f) *HBTU como acoplante*: *HBTU* y *DIPEA*, en DMF, calentando a 60°C , no se forma 10; *Cloroformiato de etilo como activante*: cloroformiato de etilo y *DIPEA* en DMF, a 0°C , no se forma el intermediario anhídrido reactivo; *Cloroformiato de tricloroetilo como activante*: Cloroformiato de tricloroetilo y *DIPEA* en THF, a 0°C . Se forma el anhídrido reactivo, no se forma híbrido 10.

Síntesis de los metabolitos sulfoxidados de FEB, ABZ y de los híbridos 8 y 10

En el capítulo introductorio se señalaron los diferentes mecanismos que pueden llevar al desarrollo de resistencia a los fármacos antihelmínticos, dentro de los cuales un aumento en la inactivación del fármaco (metabolismo) por parte del parásito puede llevar a una disminución de la concentración de fármaco activo en el medio intraparasitario reduciendo así el efecto.

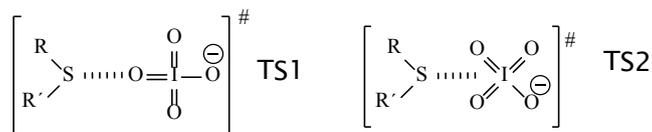
Atendiendo este mecanismo adicional de resistencia, se utilizaron los ensayos de difusión intraparasitaria *ex vivo* (en un modelo de céstodo y otro de nemátodo que se describirán en los capítulos 4 y 5 de la presente tesis), no solo para estudiar la capacidad de difusión parasitaria de los compuestos aquí sintetizados, sino también la posible formación de metabolitos por parte de los parásitos. Así mismo, en el modelo de difusión *ex vivo* de nemátodo se ensayaron dos cepas, una resistente y otra susceptible a benzimidazoles, en las que se comparan la capacidad metabolizadora oxidativa de una y otra durante las condiciones del ensayo de difusión *ex vivo*.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en los estudios computacionales realizados (ver capítulo 3), dónde se determinaron las zonas de las moléculas mas susceptibles a sufrir reacciones redox (mapeo de iso-superficies de HOMO y LUMO, ver capítulo 3), se obtuvo para ABZ, FEB y los híbridos 8 y 10, que el átomo de azufre del grupo tiopropilo o tiofenilo, respectivamente, preferirá donar electrones, sufriendo reacciones de oxidación, situación que se podía anticipar para ABZ y FEB. Por lo tanto, se sintetizaron los correspondientes análogos sulfoxidados para ABZ (ABZ SX), FEB (FEB SX), 8 (11) y 10 (12).

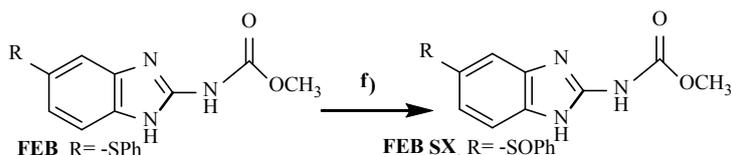
Para la obtención de Febendazol sulfóxido (FEB SX), se siguieron las condiciones de reacción de Soria- Arteché, *et al.*, 2005, con modificaciones mínimas. Para dicha reacción se utilizó el periodato de sodio (NaIO_4) como agente oxidante. El NaIO_4 es uno de los oxidantes más usados para la obtención de sulfóxidos a partir de sulfuros. Esta oxidación usualmente se lleva a cabo en cantidades equimoleculares del oxidante en agua y a bajas temperaturas, ya que un exceso de periodato o altas temperaturas pueden llevar a la sobreoxidación, dando la sulfona correspondiente (Kowalski *et al.*, 2005). Para sustratos insolubles en agua, se pueden usar solventes polares como metanol, acetonitrilo, acetona, etc.

Usando como base estudios cinéticos, Ruff y Kucsman, (1988) proponen el mecanismo por el cual se da dicha oxidación. El estado de transición (TS) en la oxidación de sulfuros dependiente de periodato puede ocurrir ya sea por el ataque del

sulfuro sobre un oxígeno del periodato (TS1), o por la adición de éste sobre el centro de iodo (TS2), seguido por la transferencia del oxígeno al azufre:



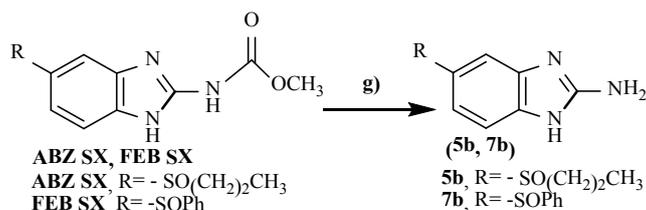
En el esquema 1.10 se indican las condiciones de reacción empleadas para la obtención del metabolito FEB SX



Esquema 1.10. Condiciones de reacción: f) FEB en $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1), NaIO_4 en $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (5:2) (FEB SX, 60%)

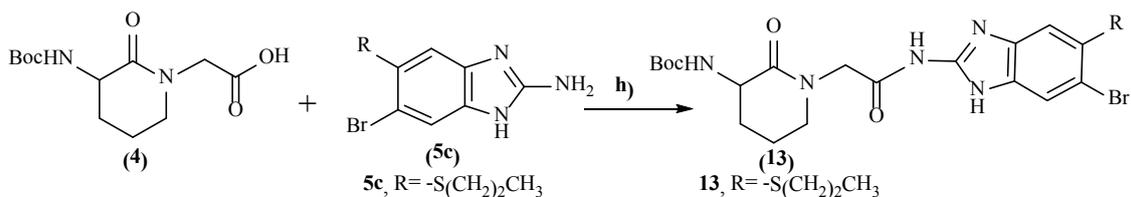
El Albendazol sulfóxido (ABZ SX), metabolito sulfoxidado del albendazol, fue provisto por el Laboratorio de Química Farmacéutica, Facultad de Química. Dicho producto fue sintetizado según Mahler, *et al.* 2008, donde el agente oxidante es el ácido peracético, formado *in situ* entre el peróxido de hidrógeno y el ácido acético.

Para la obtención de los 2-amino-benzimidazoles, 5b y 7b derivados de ABZ SX y FEB SX respectivamente, se realizó una hidrólisis básica en 1-propanol e hidróxido de sodio, calentando a reflujo (Gyurik *et al.*, 1981). En el esquema 1.11 se indican las condiciones de reacción.



Esquema 1.11. Condiciones de reacción: g) Se calienta a reflujo en 1-propanol 50% con NaOH, 19 hs (5b, 98%; 7b, 100%)

Para la obtención de 5b también se ensayaron condiciones de hidrólisis ácida, a reflujo con HBr al 24%, pero en su lugar se obtuvo el compuesto 6-bromo-5-(propiltio)-1H-benzimidazol-2-amina (5c). Dicho compuesto, a pesar de no ser el de interés, se acopló mediante enlace amida con el ácido valerolactama 4, usando como agente acoplante EDCI para dar el compuesto híbrido bromado 13 (esquema 1.12).

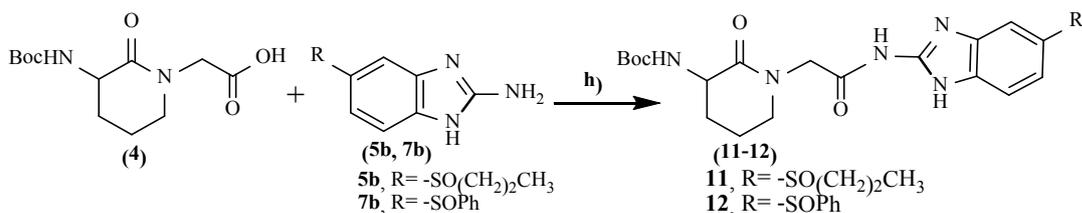


Esquema 1.12. Condiciones de reacción: h) 13: EDCI, HOBT y TEA en CH₂Cl₂, 48 hs (13, 22%).

Finalmente, para sintetizar los metabolitos sulfoxidados de los compuestos híbridos 8 y 10 se utilizaron dos estrategias:

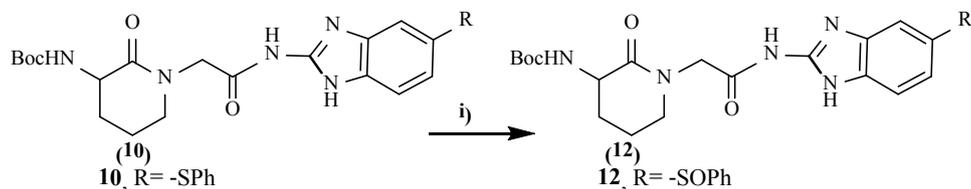
- Acoplamiento del ácido valerolactama 4 con los derivados 2-amino-benzimidazoles 5b y 7b.
- Oxidación directa con NaIO₄ del híbrido 10 para dar el producto sulfoxidado 12

En el esquema 1.13 se indican las condiciones de reacción para obtener mediante acoplamiento, usando el activador DEPBT, los híbridos 11 y 12



Esquema 1.13. Condiciones de reacción: h) 11 y 12: DEPBT y DIPEA en THF, 19 hs (11, 14%; 12, 5%).

En vista de los bajos rendimientos con los que se obtuvieron los híbridos sulfoxidados por acoplamiento con DEPBT, se ensayó la oxidación directa del sulfuro en el híbrido 10, para dar el correspondiente derivado sulfoxidado 12. En el esquema 1.14, se resumen las condiciones de reacción.



Esquema 1.14. Condiciones de reacción: i) 12: NaIO₄ en THF, 5 hs (12, 70%).

METODOLOGÍA GENERAL Y RESULTADOS

SÍNTESIS QUÍMICA

Metodología general

Los reactivos empleados se adquirieron a distintas firmas comerciales (Sigma-Aldrich, Fluka, Acros, JT Baker, etc.) siendo usados en forma comercial, salvo en aquellos casos en que se indica otra. Los solventes orgánicos anhidros, así como el bromoacetato de etilo, utilizado para la obtención del producto 3, se purificaron y secaron según los protocolos descritos en Perrin, D. y Armarego, W., 1988.

Los compuesto benzimidazoles antihelmínticos ABZ, FEB y FLU fueron suministrados por Laboratorio Uruguay S.A.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en solventes anhidros, bajo atmósfera inerte, a menos que se indiquen otras condiciones.

La purificación de los productos por columna cromatográfica se realizó usando Sílica Gel flash 60 (JT Baker, con un diámetro de partícula promedio de 40 mm).

Todas las reacciones y las separaciones cromatográficas se monitorearon por TLC, usando placas de sílica gel sobre plástico de 0.25 mm de espesor (Machery-Nagel, Poligram® SIL G/UV 254). Las placas se analizaron bajo luz UV a 254 nm o por desarrollo de color con ninhidrina.

Los rendimientos se reportan para los compuestos cromatográfica y espectroscópicamente puros.

Los espectros RMN (^1H y ^{13}C) se realizaron en un equipo Bruker Avance DPX-400. Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm) y son relativos al estándar interno TMS. Las constantes de acoplamiento (valores J) se informan en Hertz (Hz). Las siguientes abreviaciones se utilizan para indicar la multiplicidad de las señales del RMN: s, singulete; d, doblete; t, triplete; q, cuarteto; dd, doblete de doblete; m, multiplete; br, señal ancha.

Los espectros de masa de alta resolución (HRMS) se realizaron en un espectrómetro de masas con Q-TOF, Bruker Daltonics Esquire 6000, con ionización por electrospray (ESI) y fragmentación CID. Los de baja resolución (LRMS) se determinaron usando un equipo Shimadzu QP 1100-EX, por inyección directa.

La espectroscopia FTIR se llevó a cabo en un espectrofotómetro infrarrojo con Transformada de Fourier, IR- Prestige 21, Shimadzu; ya sea tanto colocando el producto en pastillas de KBr, o en solución en CH_2Cl_2 sobre pastilla de NaCl.

Los espectros Raman de los compuestos 7 y 10 se realizaron sobre KBr, a una concentración del 5%, usando un espectrómetro Raman DeltaNu Advance. El laser usado fue de 532 nm, con un tiempo de integración de 10 segundos (con 20 medidas promediadas) y un tiempo total de medida de 200 segundos. El coeficiente de línea de base usado para fluorescencia fue 150, y el coeficiente Savitsky-Golay fue de 20.

Síntesis de los productos

Etil 2-(2-((*tert*-Butoxicarbonil)amino)- δ -valerolactama-*N*-il)acetato (3)

Una solución del compuesto 2 (0.47 mmol) y de NaH (1.87 mmol, 60% dispersión en aceite) en THF (4 ml) se enfría a 0°C y se agita a esa temperatura por 30 min. Se agrega el bromoacetato de etilo (1.87 mmol) gota a gota, y luego se lleva a temperatura ambiente, dejándolo reaccionar por 20 hs. Se corta la reacción con una solución saturada de NaHCO_3 y se extrae con AcOEt (3 x 10 ml). Las capas orgánicas se combinan y se secan con Na_2SO_4 , el solvente se evapora a vacío. El producto se purifica por cromatografía flash (SiO_2 , AcOEt/n-hexano, 1:1), resultando el producto 3 como un aceite incoloro. Rendimiento: 83%; IR (ν_{max} , CH_2Cl_2 , NaCl) cm^{-1} : 3398.57 (N-H, estiramiento de amida secundaria), 2978.09 y 2873.94 (C-H, estiramiento asim/sim del metilo), 2939.52 (C-H, estiramiento asim/sim del metileno), 1747.51 (C=O, estiramiento del carbonilo en el grupo éster), 1712.79 (C=O, estiramiento del carbonilo en el grupo carbamato), 1658.78 (C=O, estiramiento del carbonilo en el anillo lactama), 1365.60 (C-H, torsión en el grupo trimetil), 1246.02 y 1199.72 (O=C-O, estiramiento en el enlace éster), 1168.86 (C-O, estiramiento en el carbamato de *tert*butilo), 1072.42, 1026.13 y 995.27 (vibraciones en los metilenos del anillo lactama). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.30 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.69 (m, 1H), 1.99 (m, 2H), 2.51 (m, 1H), 3.40 (m, 2H), 3.85 (brd, $J=17.2$ Hz, 1H), 4.13 (m, 1H), 4.20 (dd, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.22 (d, $J=17.9$, 1H), 5.44 (brs, 1H) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 14.5, 21.2, 28.3, 28.7, 49.1, 49.4, 52.2, 61.6, 79.9, 156.3, 169.1, 170.8 ppm; MS (LMRS), m/z $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}$ (MNa+) calculado: 323.3, encontrado 323.1; (M+Na-*t*-Butil) $^+$: 266.9; (M-*t*-Butil) $^+$: 244.9; (M+Na-Boc) $^+$: 222.9; (M-Boc) $^+$: 200.9.

Ác. 2-(2-*tert*-Butoxicarbonilamino- δ -valerolactama-*N*-il) acético (4).

Se prepara una solución del compuesto 3 (0.34 mmol) en una mezcla EtOH- H_2O (1:1) (6 ml). Se agrega K_2CO_3 hasta pH 12. La mezcla se agita a temperatura ambiente por 24 hs, se corta la reacción con una solución de Brine y se extrae con AcOEt (5 ml).

La fase acuosa se acidifica con HCl 5% hasta alcanzar pH 3 y se extrae con AcOEt (3 x 10 ml). Las capas orgánicas se combinan, se secan con Na₂SO₄ y se evapora el solvente a vacío; obteniéndose el producto 4 como un sólido blanco amorfo. El producto se usa sin subsiguiente purificación. Rendimiento: 86%; IR (ν_{\max} , CH₂Cl₂, NaCl) cm⁻¹: 3541.31(O-H, estiramiento del enlace O-H del grupo hidroxilo del ácido), 2978.09 y 2873.94 (C-H, estiramiento asim/sim del metilo), 1747.51 (C=O, estiramiento del carbonilo del grupo ácido carboxílico), 1712.79 (C=O, estiramiento del carbonilo en el grupo carbamato), 1639.35 (C=O, estiramiento del carbonilo en el anillo lactama), 1369.46 (C-H, torsión en el grupo trimetil), 1257.59 (O=C-O, estiramiento en el ácido carboxílico), 1157.29 (C-O, estiramiento en el *ter*butil carbamato), 1072.42, 1045.42, 1026.13 y 995.27 (vibraciones de los metilenos en el anillo lactama); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 1.46 (s, 9H), 1.76 (m, 1H), 1.99 (m, 2H), 2.40 (m, 1H), 3.39 (m, 1H), 3.46 (m, 1H), 3.89 (d, J=17.4 Hz, 1H), 4.16 (m, 1H), 4.28 (d, J=17.4 Hz, 1H), 5.64 (brs, 1H) ppm; ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 20.9, 27.8, 28.3, 49.1, 49.3, 51.6, 79.8, 156.2, 171.3, 172.0 ppm; MS (LRMS) m/z, C₁₂H₂₀N₂O₅ (M⁺) calculado: 272.3, encontrado 271.5; (M+2H-Boc)⁺: 196.9.

Procedimiento general para la síntesis de derivados 1*H*-benzimidazol-2-amina (5, 6 y 7)

Se calienta a reflujo por 19 hs una suspensión en HBr 24% (10 ml) del derivado metil 1*H*-benzimidazol-2-ilcarbamato (ABZ, FLU o FEB, 4.1 mmol para todos ellos). La reacción se corta con NaHCO₃ o NaOH, y se extrae con AcOEt (5 x 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se secan con Na₂SO₄ y el solvente se evapora a vacío.

6-(Propiltio)-1*H*-benzimidazol-2-amina (5). El producto se purifica por cromatografía flash con una mezcla AcOEt/ MeOH (10:1), obteniéndose el producto 5 como un sólido amorfo amarillo claro. Rendimiento: 69% ; IR (ν_{\max} , KBr) cm⁻¹: 3394.72 (estiramiento del N-H de la amina primaria aromática), 3140.11 y 3078.39 (estiramiento de C-H aromático), 2962.66 y 2870.08 (estiramiento asim/sim del C-H metílico), 2924.09 y 2758.21 (estiramiento asim/sim del C-H metilénico), 1666.50, 1643.35, 1566.20, 1531.48 y 1512.19 (C=C-C, estiramiento del anillo aromático), 1307.74 (estiramiento C-N de amina aromática terciaria, imidazol), 1292.31 (estiramiento C-N de amina aromática secundaria, imidazol), 1269.16 (estiramiento C-N de amina aromática primaria), 921.97, 852.54 and 810.10 (estiramiento C-H aromático fuera del plano); ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 0.92 (t, J=7.3 Hz, 3H), 1.50 (m, 2H), 2.77 (t, J=8.0 Hz, 2H), 6.35 (brs, 2H), 6.92 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.04 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.15 (d, J=1.5, 1H) ppm; ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆): δ 13.5, 22.6, 37.8, 156.4 ppm; MS (LRMS) m/z, C₁₀H₁₂N₃S (MH)⁺calculado: 208.3, encontrado 208.1; (M-Propyl)⁺:164.9; (M-Propyl-S)⁺: 133.0.

6-(4-Fluorobenzoil)-1H-benzimidazol-2-amina (6). El producto se obtiene como un sólido blanco amorfo, y se utiliza sin purificación posterior. Rendimiento: 65 %; IR (ν_{\max} , KBr) cm^{-1} : 3437.15 (estiramiento N-H de la amina aromática primaria), 3186.40 (estiramiento C-H aromático), 1670.35 (carbonilo conjugado con dos anillos aromáticos), 1643.35 (estiramiento C=C-C en anillo aromático, benzimidazol), 1600.92 y 1581.63 (estiramiento C=C-C de anillo aromático, fenilo 1,4 disustituído), 1554.63 (estiramiento C=C-C de anillo aromático, benzimidazol), 1323.17 (estiramiento C-N de amina aromática terciaria, imidazol), 1288.45 (estiramiento C-N de amina aromática secundaria, imidazol), 1238.30 (estiramiento C-N de amina aromática primaria), 848.68 (torsión fuera del plano C-H aromático, fenil 1,4 disustituído), 767.67 (torsión fuera del plano C-H aromático, benzimidazol); ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 6.70 (s, 2H), 7.19 (d, $J=8.2$, 1H), 7.34 (t, $J=8.9$ Hz, 2H), 7.38 (dd, $J=1.7$, 1H), 7.54 (d, $J=1.5$, 1H), 7.75 (dd, $J=5.6$, 2H) ppm; ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6): δ 112.3, 112.9, 115.6, 115.8, 123.8, 128.0, 132.4, 132.5, 135.9, 158.1, 163.2, 165.6, 194.5 ppm; MS (LRMS) m/z , $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{FO}$ (M) $^+$ calculado: 255.08, encontrado: 255.05; $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{FO}$ (MH) $^+$ calculado: 256.08, encontrado: 256.05; $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_3\text{O}^+$ calculado: 160.05, encontrado: 160.10; $\text{C}_7\text{H}_4\text{FO}^+$ calculado: 123.02, encontrado: 123.10; $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_3^+$ calculado: 133.06, encontrado: 133.10.

6-(Feniltio)-1H-benzimidazol-2-amina (7). El residuo se purifica por cromatografía flash con AcOEt, y luego con AcOEt/ MeOH (10:1), obteniéndose el producto 7 como un sólido blanco amorfo. Rendimiento: 87%; IR (ν_{\max} , KBr) cm^{-1} : 3406.29 y 3344.57 (estiramiento N-H, amina aromática primaria), 3074.53 y 3055.24 (estiramiento C-H aromático), 1674.21 y 1581.63 (estiramiento C=C-C anillo aromático, fenilo), 1643.35 y 1554.03 (estiramiento C=C-C anillo aromático, benzimidazol), 1273.02 (estiramiento CN, amina aromática primaria), 867.97 y 813.96 (torsión fuera del plano C-H aromático, benzimidazol), 736.81 y 690.52 (torsión fuera del plano C-H aromático, fenilo). Espectroscopia Raman (ν_{\max} , KBr al 5%) cm^{-1} : 577 (C-S-C torsión), 1134 (estiramiento C=C de anillo aromático o estiramiento C-S), 1189 (estiramiento C-N), 1635 (estiramiento C=C de anillo aromático); ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 6.39 (s, 2H), 7.02 (dd, $J=1.7$, 1H), 7.04 (dd, $J=1.2$ Hz, 2H), 7.10 (t, $J=7.4$, 1H), 7.15 (d, $J=8.0$, 1H), 7.23 (s, 1H) 7.23 (d, $J=8.3$, 2H) ppm; ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6): δ 125.8, 127.2, 129.5, 140.1, 156.9 ppm; MS (LRMS) m/z , $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{S}$ (M) $^+$ calculado: 241.07, encontrado: 241.05; $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{S}$ (MH) $^+$ calculado: 242.07, encontrado: 242.05; $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_3\text{S}^+$ calculado: 164.04, encontrado: 164.05.

2-(2-tert-Butoxicarbonilamino- δ -valerolactama-N-il)-N-(5-(propiltio)-3H-benzimidazol-2-il) acetamida (8). Se agita una solución del producto 4 (0.37 mmoles), EDCI.HCl (0.73 mmoles) y HOBT (0.44 mmoles) en 1 ml de CH_2Cl_2 por 30 min a temperatura ambiente. Luego, se agrega una solución del producto 5 (0.44 mmoles) y TEA (0.518 mmoles) en 1 ml de CH_2Cl_2 , dejándolo reaccionar por 19 hs. Se corta la reacción con 5 ml de HCl

5% y se extrae con AcOEt (3 x 10 ml). Las fases orgánicas combinadas se secan con Na_2SO_4 y el solvente se evapora a vacío. Se purifica por cromatografía flash con AcOEt/MeOH (20:1), obteniéndose el producto 8 como un sólido blanco amorfo. Rendimiento: 90%; IR (ν_{max} , KBr) cm^{-1} : 3292 (estiramiento N-H de amina secundaria heterocíclica aromática), 2966 (estiramiento asim/sim del C-H metílico), 2931 y 2871 (estiramiento asim/sim del C-H metilénico), 1702 (estiramiento C=O en carbonilo de grupo carbamato), 1638 (estiramiento C=O en carbonilo de anillo lactama o del enlace amida entre benzimidazol y valerolactama), 1571 (aromatic ring stretch C=C-C, benzimidazole), 1366 (tert butyl C-H asym/sym Bend), 1166 (estiramiento C-O en el grupo terbutil carbamato), 1029 and 923 (vibraciones metilénicas del anillo lactama); ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 0.94 (t, $J=7.3$ Hz, 3H), 1.38 (s, 9H), 1.52 (m, 2H), 1.75 (m, 1H), 1.91 (m, 2H), 1.99 (m, 1H), 2.85 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.40 (m, 2H), 4.01 (m, 1H), 4.11 (d, $J=16.7$ Hz, 2H), 6.96 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.46 (s, 1H) 9.13 ppm; ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6): δ 13.4, 21.2, 22.5, 28.1, 28.3, 37.2, 49.9, 51.8, 52.0, 79.8, 110.5, 114.1, 115.5, 125.1, 126.1, 127.9, 131.4, 146.3, 156.2, 169.3, 171.6 ppm; MS (HRMS) m/z , $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_4\text{SNa}$ (MNa) $^+$ calculado: 484.20, encontrado: 484.3; $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$ (MH) $^+$ calculado: 462.22, encontrado 462.40.

2-(2-tert-Butoxicarbonilamino- δ -valerolactama-N-il)-N-(5-(4-fluorobenzoil)-3H-

benzimidazol-2-il) acetamida (9). Una solución en 2 mL de DMF del producto 4 (0.33 mmoles), EDCI.HCl (0.50 mmoles) y HBTU (0.50 mmoles) se agita por 30 min a temperatura ambiente. Luego se agrega una solución del producto 6 (0.40 mmoles) y TEA (0.462 mmoles) en 2 ml de CH_2Cl_2 , dejándolos reaccionar por 20 hs. Se corta la reacción con 5 ml de una solución saturada de NaHCO_3 y se lleva a pH 5 con HCl 5%. Se extrae con éter etílico (3 x 10 mL) y finalmente con CHCl_3 (2 x 10 ml). Las fases orgánicas se combinan y se secan con Na_2SO_4 , evaporándose luego el solvente a sequedad. Se purifica por cromatografía flash primero con CH_2Cl_2 y luego con CH_2Cl_2 5 % MeOH, obteniéndose el producto 9 como un sólido blanco amorfo. Rendimiento: 49%; IR (ν_{max} , KBr) cm^{-1} : 3356.14 (estiramiento N-H de secundaria heterocíclica), 3043.67 (estiramiento C-H aromático), 2974.23 (estiramiento asim/sim del C-H metílico), 2931.80 (estiramiento asim/sim del C-H metilénico), 1716.65 (estiramiento C=O en grupo carbonilo de carbamato), 1639.49 (estiramiento C=O en grupo carbonilo de anillo lactama, o enlace amida entre valerolactama y anillo benzimidazol, o carbonilo conjugado con anillo aromático), 1612.49 (estiramiento C=C-C de anillo aromático benzimidazol), 1597.06 y 1566.20 (estiramiento C=C-C de anillo aromático, 1,4 disustituído), 1365.60 (torsión asim/sim C-H de terbutilo), 1303.88 (estiramiento C-N en amina aromática terciaria, imidazol), 1288.45 (estiramiento C-N en amina aromática secundaria, imidazol), 1165.00 (estiramiento C-O en grupo terbutil carbamato), 1072.42, 1045.72 y 1026.13 (vibraciones metilénicas del anillo lactama), 852.52 (torsión C-H fuera del plano, de anillo aromático 1,4 disustituído), 775.38

(torsión C-H fuera del plano, benzimidazol); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.38 (s, 9H), 1.77 (m, 1H), 1.90 (m, 2H), 1.97 (m, 1H), 3.42 (m, 2H), 4.01 (m, 1H), 4.14 (dd, $J=16.9$ Hz, 2H), 6.99 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.38 (t, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.56 (s, 2H), 7.81 (m, 2H) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): 21.5, 28.2, 28.7, 30.7, 49.4, 50.5, 51.1, 78.3, 79.6, 115.8, 116.0, 132.7, 155.9, 170.3 ppm; MS (HRMS) m/z , $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{FN}_5\text{O}_5\text{Na}$ (MNa) $^+$ calculado: 532.1972, encontrado: 532.1967; $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{FN}_5\text{O}_5$ (MH) $^+$ calculado: 510.2153, encontrado: 510.2147.

2-(2-*tert*-Butoxicarbonilamino- δ -valerolactama-*N*-il)-*N*-(5-(Feniltio)-3*H*-benzimidazol-2-il)acetamida (10). Una solución de 4 (0.51 mmoles) y DEPBT (1.03 mmoles) en 2 mL de THF se agita por 30 min a temperatura ambiente. Luego se agrega una solución del producto 7 (0.77 mmoles) y DIPEA (1.03 mmoles) en 2 ml de THF, dejándolo reaccionar por 19 hs. La reacción se corta con 10 ml de una solución saturada de NaHCO_3 . Se realiza una primera extracción con AcOEt (3x10 ml). La fase orgánica se extrae con una solución saturada de NaCl. Se combinan las fases orgánicas y se secan con Na_2SO_4 , el solvente se evapora a vacío. Se purifica por cromatografía flash con una mezcla CHCl_3 : Hexane (2:1) con 6% de metanol, obteniéndose el producto 10 como un sólido blanco amorfo. Rendimiento: 88%; IR (ν_{max} , KBr) cm^{-1} : 3221.12 (estiramiento N-H de amina secundaria heterocíclica), 3055.24 (estiramiento C-H aromático), 2974.23 (estiramiento asim/sim C-H metílico), 2931.80 y 2866.22 (estiramiento asim/sim C-H metilénico), 1708.93 (estiramiento C=O de carbonilo en grupo carbamato), 1678.07 (estiramiento C=O de grupo carbonilo de amida entre valerolactama y anillo benzimidazol), 1635.64 (estiramiento C=O en carbonilo de anillo lactama), 1581.63 y 1500.62 (estiramiento C=C-C de anillo aromático), 1365.60 (torsión asim/sim C-H de *tert*butilo), 1280.73 (estiramiento C-N de amina aromática secundaria, imidazol), 1165.00 (estiramiento C-O de grupo *tert*butilo del carbamato), 1072.42, 1049.28 y 1026.13 (vibraciones metilénicas del anillo lactama), 867.97 y 810.10 (torsión fuera del plano C-H aromático), 740.67 y 690.52 (torsión fuera del plano C-H aromático, anillo fenilo). Espectroscopia Raman (ν_{max} , KBr al 5%) cm^{-1} : 576 y 601 (torsión C-S-C), 1466 (estiramiento C-N), 1637 (estiramiento C=C de anillo aromático); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.38 (m, 9H), 1.79 (m, 1H), 1.91 (m, 2H), 1.96 (m, 1H), 3.41 (m, 2H), 4.01 (m, 1H), 4.13 (dd, $J=16.9$ Hz, 2H), 6.97 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.16 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.21 (dd, $J=1.7$ Hz, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.27 (t, $J=7.3$ Hz, 2H), 7.48 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.57 (s, 1H) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): 22.0, 28.2, 28.7, 49.3, 51.1, 78.3, 79.6, 126.3, 128.1, 129.7, 138.9, 170.2 ppm; MS (HRMS) m/z , $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_5\text{SNa}$ (MNa) $^+$ calculado: 518.1838, encontrado: 518.1832; $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}$ (MH) $^+$ calculado: 496.2019, encontrado: 496.2013.

6-(Propilsulfinil)-1*H*-benzimidazol-2-amina (5b). Se calienta a reflujo por 19 hs una suspensión de ABZ SX (1.4 mmol) en 1-propanol 50% (40 mL) y NaOH (13.0 mmol). La

reacción se extrae con AcOEt (5 x 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se secan con Na_2SO_4 y el solvente se evapora a vacío. Se purifica por cromatografía flash con una mezcla AcOEt: MeOH (10:1). Se obtiene un sólido blanco amorfo, con un rendimiento del 98%. ^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 0.92 (t, $J=7.4$ Hz, 3H), 1.46 (m, 2H), 2.74 (dd, $J=2.8$ Hz, $J=15.2$ Hz, 2H), 6.45 (s, 2H), 7.11 (dd, $J=1.7$ Hz, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J=1.4$ Hz, 1H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d_6): δ 13.5, 16.0, 58.8, 107.8, 112.2, 115.9, 134.0, 157.3 ppm. MS (LRMS) m/z , $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_3^+$ calculado: 133.06, encontrado: 133.05; $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_3\text{OS}^+$ calculado: 180.03, encontrado: 180.00; $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_3\text{OS}^+$ calculado: 181.03, encontrado: 181.00; $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{OS}^+$ calculado: 223.08, encontrado: 223.00

6-bromo-5-(propiltio)-1H-benzimidazol-2-amina (5c). En un balón de reacción se agrega ABZ SX (4.1 mmol) y HBr 24% (10 mL), se calienta a reflujo por 19 hs. La reacción se corta con NaHCO_3 y se extrae con AcOEt (5 x 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se secan con Na_2SO_4 y el solvente se evapora a vacío. El residuo se purifica por recristalización en EtOH:MeOH (1:1), quedando el producto de interés en las aguas madres, y el ABZ SX como sólido. Se evaporan a vacío las aguas madres, obteniéndose el producto 5c como sólido amorfo beige (63% rendimiento). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 0.98 (t, $J=7.4$ Hz, 3H), 1.60 (dd, $J=7.3$, 2H), 2.80 (t, $J=7.3$ Hz, 2H), 7.26 (s, 1H), 7.44 (s, 1H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 13.5, 22.1, 36.8, 114.9, 116.9, 117.6, 128.1, 137.3, 138.0, 155.1 ppm. MS (LRMS) m/z , $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{BrN}_3\text{S}$ calculado 284.99, 286.99, encontrado 285.05, 287.05; $\text{C}_7\text{H}_6\text{BrN}_3\text{S}$ calculado 242.95, 244.94, encontrado 242.95, 244.95.

2-(2-tert-Butoxicarbonilamino- δ -valerolactama-N-il)-N-(5-(propilsulfinil)-3H-benzimidazol-2-il) acetamida (11). Una solución de 4 (0.28 mmoles) y DEPBT (0.57 mmoles) en 2 mL de THF se agita por 30 min a temperatura ambiente. Luego se agrega una solución de 5b (0.43 mmoles) y DIPEA (0.57 mmoles) en 2 ml de THF, dejándolo reaccionar por 19 hs. La reacción se corta con 10 ml de una solución saturada de NaHCO_3 . Se realiza una primera extracción con AcOEt (3x10 ml). La fase orgánica se extrae con una solución saturada de NaCl. Se combinan las fases orgánicas y se secan con Na_2SO_4 , el solvente se evapora a vacío. Se purifica por cromatografía flash con una mezcla AcOEt: MeOH (10:3), obteniéndose el producto 1 como un sólido blanco amorfo. Rendimiento: 14%; ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 1.05 (t, $J=7.43$ Hz, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.72 (m, 2H), 1.95 (m, 1H), 2.04 (m, 2H), 2.18 (m, 1H), 2.94 (m, 2H), 3.51 (m, 2H), 4.15 (m, 1H), 4.29 (dd, $J=8.8$ Hz, $J=16.2$ Hz, 2H), 7.48 (dd, $J=1.7$ Hz, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J=1.3$ Hz, 1H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CD_3OD): δ 12.0, 15.9, 20.8, 27.3, 27.9, 49.4, 50.3, 51.1, 58.6, 79.1, 117.7, 135.3, 148.3, 156.7, 168.7, 171.3 ppm. MS (LRMS) m/z , $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}^+$ calculado: 114.08, encontrado: 114.10; $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}^+$ calculado: 115.08, encontrado: 115.10, $\text{C}_4\text{H}_9\text{O}^+$ calculado: 73.09, encontrado:

73.00; $C_7H_8N_3OS^+$ calculado: 180.03, encontrado: 180.00; $C_{10}H_{13}N_3OS^+$ calculado: 223.08, encontrado: 223.00.

FEB SX. Se agita una suspensión de FEB (1.7 mmoles) en una mezcla acetonitrilo (CH_3CN): ácido acético (HAc) (1:1) (13 mL), se agrega lentamente una solución de $NaIO_4$ (3.7 mmoles) en H_2O : HAc (5:2) (11 mL). Cuando comienza a detectarse la aparición de febendazol sulfona por TLC (fase móvil AcOEt), se corta la reacción agregando una solución saturada de K_2CO_3 y se extrae con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secan con Na_2SO_4 . Se purifica por cromatografía flash, usando como fase móvil AcOEt. Rendimiento: 60%. 1H RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 3.77 (s, 3H), 7.38 (dd, $J=1.7$ Hz, $J=8.2$ Hz 1H), 7.47 (d, $J=6.9$, 1H), 7.50 (d, $J=7.5$, 2H), 7.51 (d, $J=7.9$, 1H), 7.66 (dd, $J=1.5$, $J=8.2$, 2H), 7.76 (d, $J=1.5$, 1H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ 53.1, 111.1, 118.2, 124.5, 129.8, 131.2, 138.2, 147.1, 149.4, 154.8 ppm. MS (HRMS) m/z, $C_{15}H_{14}N_3O_3S$ (MH)⁺ calculado 316.0750, encontrado: 316.0750; $C_{15}H_{13}N_3O_3SNa$ (MNa)⁺ calculado: 338.0575, encontrado: 338.0570.

6-(Fenilsulfinil)-1H-benzimidazol-2-amina (7b). Se calienta a reflujo por 19 hs una suspensión de FEB SX (0.2 mmol) en 1-propanol 50% (8 mL) y NaOH (1.5 mmol). El crudo se extrae con AcOEt (5 x 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se secan con Na_2SO_4 y el solvente se evapora a vacío. Se obtiene un sólido amorfo blanco que se utiliza sin posterior purificación. Rendimiento: 100%. 1H RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 6.52 (s, 2H), 7.17 (d, $J=8.1$, 1H), 7.20 (dd, $J=1.1$ Hz, $J=8.2$ Hz 1H), 7.36(s, 1H), 7.47 (m, 3H), 7.62 (d, $J=7.0$, 2H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ 124.4, 129.7, 130.9, 147.5, 157.6 ppm.

2-(2-tert-Butoxicarbonilamino- δ -valerolactama-N-il)-N-(5-(Fenilsulfinil)-3H-benzimidazol-2-il) acetamida (12). A una solución del compuesto 10 (0.014 mmoles) en THF: H_2O (1:1) (1 mL) se le agrega lentamente una solución de $NaIO_4$ (0.017 mmoles) en H_2O . Se deja reaccionar por 5 horas a temperatura ambiente. El crudo de reacción se extrae con AcOEt (5 x 4 mL), las capas orgánicas se secan con $NaSO_4$, el solvente se evapora a vacío. La purificación se realiza por cromatografía flash utilizando como fase móvil AcOEt: $CHCl_3$ (1:1) con un 5% de MeOH. Se obtiene 12 como un sólido amorfo blanco. Rendimiento: 70%. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.41 (s, 9H), 2.00 (m, 3H), 2.38 (m, 1H), 3.45 (m, 1H), 3.57 (m, 1H), 4.09 (m, 1H), 4.18 (m, 1H), 4.57 (m, 1H), 5.96 (brs, 1H), 7.37 (d, $J=8.0$, 1H), 7.43 (m, 4H), 7.64 (d, $J=7.2$, 2H), 7.84 (d, $J=5.3$, 1H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$): δ 21.2, 27.7, 28.3, 41.0, 49.9, 51.8, 80.0, 119.3, 119.4, 124.7, 128.9, 129.2, 130.8, 130.9, 138.9, 145.9, 148.4, 156.2, 169.2, 171.4 ppm. MS (HRMS) m/z, $C_{25}H_{30}N_5O_5S$ (MH)⁺ calculado: 512.1968, encontrado: 512.1962; $C_{25}H_{29}N_5O_5SNa$ (MNa)⁺ calculado: 534.1787, encontrado: 534.1782.98

2-(2-tert-Butoxicarbonilamino- δ -valerolactama-N-il)-N-(5-bromo-6-(propiltio)-3H-benzimidazol-2-il) acetamida (13). Se agita una solución del producto 4 (0.37 mmoles), EDCI.HCl (0.92 mmoles) y HOBt (0.92 mmoles) en 1 ml de CH₂Cl₂ por 30 min a temperatura ambiente. Luego, se agrega una solución del producto 5c (0.44 mmoles) y TEA (0.55 mmoles) en 1 ml de CH₂Cl₂, dejándolo reaccionar por 48 hs. Se corta la reacción con 5 ml de HCl 5% y se extrae con AcOEt (3 x 10 ml). Las fases orgánicas combinadas se secan con Na₂SO₄ y el solvente se evapora a vacío. Se purifica por cromatografía flash con AcOEt las primeras fracciones (hasta eliminar el HOBt en exceso) y luego con AcOEt/ MeOH (20:1), obteniéndose el producto 13 como un sólido naranja amorfo. Rendimiento: 22%; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 1.05 (t, J=7.5 Hz, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.70 (m, 2H), 1.90 (m, 1H), 2.04 (m, 2H), 2.44 (m, 1H), 2.87 (t, J=7.3 Hz, 2H), 3.50 (m, 1H), 3.61 (m, 1H), 4.10 (d, J=17.1 Hz, 1H), 4.24 (m, 1H), 4.50 (d, J=17.0, 1H), 5.95 (brs, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.69 (s, 1H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 13.9, 21.1, 27.9, 28.2, 36.1, 49.9, 51.7, 52.0, 111.1, 117.6, 125.7, 128.0, 133.6, 141.4, 156.3, 169.2, 169.5 ppm.

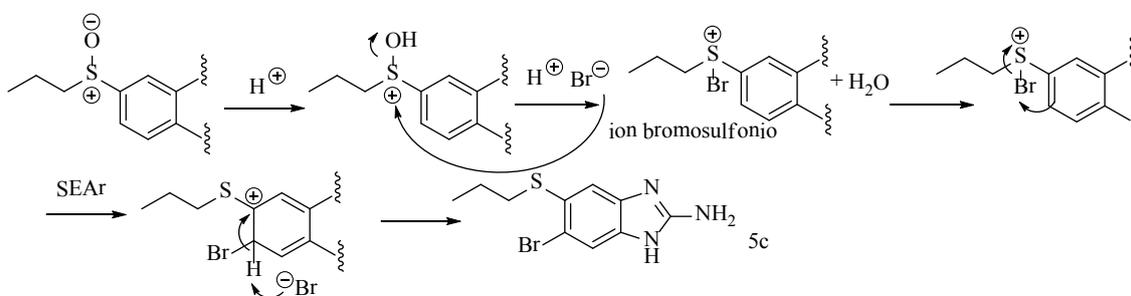
DISCUSIÓN

Todos los productos obtenidos fueron caracterizados satisfactoriamente por RMN y MS. En el caso de los productos 7 y 10, derivados de FEB, se utilizó a su vez espectroscopia Raman, ya que ésta técnica es particularmente útil para caracterizar enlaces C-S-C, los cuales presentan gran polarizabilidad y por ende generan señales bien definidas en los espectros Raman, a diferencia de lo que ocurre en el espectro IR para éste tipo de enlaces

Las condiciones de reacción y la caracterización de las valerolactamas 1 a 4 ya habían sido informadas por Gordon *et al*, 1997, así como en la Tesis doctoral del Dr. Pablo Mendina. Los datos espectroscópicos de estos compuestos resultaron concordantes con los informados en los trabajos citados anteriormente.

En lo que respecta a la síntesis de los 2-amino- benzimidazoles, derivados de los metilcarbamatos de benzimidazoles antihelmínticos, ABZ, FEB y FLU, estos fueron obtenidos con buenos rendimientos mediante hidrólisis ácida con ácido bromhídrico, e inclusive el producto 6 se puede usar en etapas posteriores sin purificación por cromatografía flash.

Sin embargo, cuando se intentó obtener el compuesto 5b utilizando hidrólisis ácida con HBr al 24% del ABZ SX, ocurrió una reacción de bromación reductiva, dando finalmente el compuesto 6-bromo-5-(propiltio)-1H-benzimidazol-2-amina (5c) (esquema 1.15). La reducción ocurre vía un anión halosulfonio, cuya reactividad depende del medio de reacción, del ion haluro y de la naturaleza de los grupos sustituyentes sobre el átomo de azufre (Madesclaire, 1988). Para el caso particular del ácido bromhídrico, se ha reportado la acción de dicho ácido sobre la 10-etil-fenotiazina-S-óxido (Gilman y Swayampti, 1955), donde se constató, entre otros, que la presencia de un grupo sulfona desactiva los anillos aromáticos, evitando así el ataque electrofílico y dando una reducción del grupo sulfóxido sin bromación.



Esquema 1.15. Mecanismo propuesto para la reacción de bromación reductiva que ocurre cuando se expone el ABZ SX a hidrólisis ácida del metil carbamato con HBr. Mediante la formación de un ion bromosulfonio ocurriría una sustitución electrofílica aromática (SEAr), llevando a una sustitución con bromo del anillo benzimidazol en la posición 6.

En la espectrometría de masas (LRMS) se constató la formación de dicho producto bromado donde se observan dos picos correspondientes a los iones M y M+2 de igual intensidad (49.62 y 49.73), correspondientes a los dos isótopos del bromo, ^{79}Br y ^{81}Br , de igual abundancia. En la figura 1.5 se muestra dicho espectro de masas.

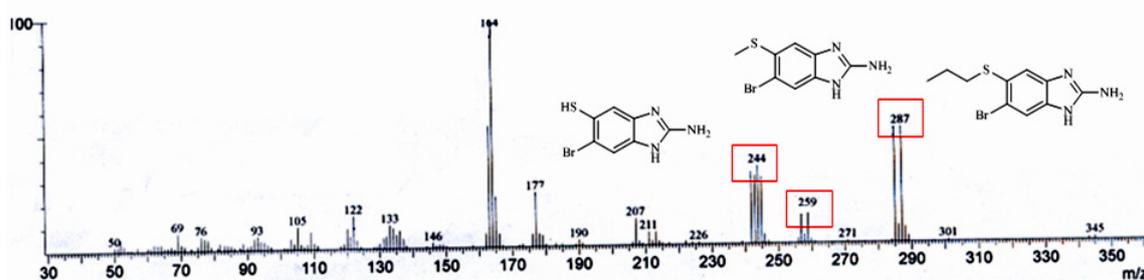


Figura 1.5. Espectro de masas (LRMS) del compuesto 5c bromado

Una vez estudiada esta reacción de hidrólisis ácida, en presencia del grupo funcional sulfóxido, es que se decide trabajar en condiciones básicas utilizando NaOH en 1-propanol a reflujo. Con estas condiciones de reacción se obtienen los 2-amino-benzimidazoles derivados de FEBX SX y ABZ SX (7b y 5b, respectivamente)

En las reacciones de acoplamiento para formar los híbridos valerolactama-benzimidazol, el uso de EDCI como agente activador del ácido carboxílico, junto con HOBt para evitar la formación de N-acilurea (ver esquema 1.4), fue exitoso para obtener los híbridos 8 y 9 con buenos rendimientos (90 y 49% respectivamente). Sin embargo, a la hora de obtener el compuesto 10 bajo estas condiciones (EDCI, HOBt y TEA, en DMF) no se alcanzó más de un 30 % de rendimiento.

En vista de estos resultados, se probaron otras estrategias para lograr obtener el compuesto 10 con mejores rendimientos. Dentro de las cuales se encuentran el uso de HBTU como acoplante, de cloroformiato de etilo y de cloroformiato de tricloroetilo como activantes del ácido. En ninguna de las condiciones de reacción ensayadas con los agentes antes mencionados se logró obtener el híbrido 10.

Finalmente, para sintetizar el compuesto 10 se utilizó como agente acoplante DEPBT, usando DIPEA como base en THF. Estas condiciones de reacción fueron exitosas para obtener el producto 10 con un buen rendimiento (88%).

Mediante cálculos *ab initio*, usando el código Gaussian09 (Frisch *et al.*, 2009), utilizando el funcional de correlación e intercambio B3LYP (Lee, C. *et al.*, 1988; Parr y Yang, 1995; Becke, 1993) y la base 6-311++G(3df,2pd) se optimizó la geometría en fase gaseosa, del derivado 4, para poder observar si la cadena en posición 6, que

soporta el carbono del carbonilo en el grupo ácido, se encuentra en posición axial o ecuatorial respecto al anillo valerolactama. Esta situación determinaría la accesibilidad para que el carbonilo pueda ser atacado por la amina benzimidazólica. En la figura 1.6 se muestra la conformación de mínima energía para dicho compuesto.

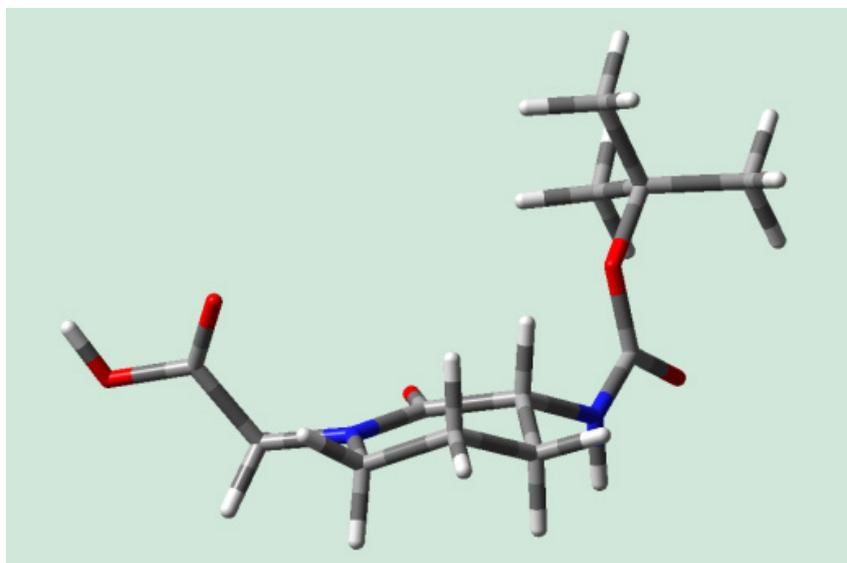
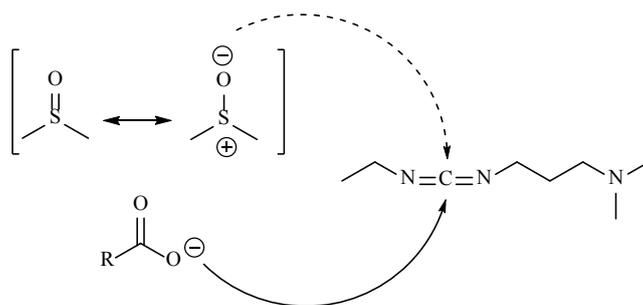


Figura 1.6. Estructura del derivado valerolactama ácido, 4, cuya geometría ha sido optimizada mediante cálculos *ab initio*. Se observa al sustituyente alquílico en N-6 del anillo valerolactama, en posición ecuatorial respecto al anillo.

Se puede ver que el sustituyente en posición 6 del anillo se encuentra en posición ecuatorial, lo que era de esperar para este grupo voluminoso, hecho que minimiza posibles interacciones con el sustituyente en posición 2 del anillo y genera que el carbono carbonílico del ácido sea accesible al ataque por la amina benzimidazólica.

Mediante la reacción de oxidación del FEB con NaIO_4 , se obtiene el producto FEB SX con un buen rendimiento (60%). Dicho rendimiento podría mejorarse trabajando a 0°C , de manera de evitar la sobreoxidación temprana de FEB SX, para dar el derivado sulfona.

Los rendimientos obtenidos para la producción de los híbridos 11 y 12, a partir del acoplamiento de 2-amino- benzimidazoles sulfoxidados con la valerolactama 4 fueron muy bajos, ya sea se use EDCI o DEPBT como agente acoplante. Este resultado puede ser explicado por la competencia entre los oxígenos cargados del grupo sulfóxido y del carboxilato (esquema 1.16), para atacar los centros con densidad de carga positiva ya sea el fósforo en el DEPBT, o el carbono de la carboiimida EDCI.



Esquema 1.16. Se muestra la competencia entre el oxígeno cargado del grupo sulfóxido y el oxígeno del carboxilato, para atacar los centros con densidad de carga positiva de los agentes acoplantes (EDCI en éste ejemplo).

En base a estos resultados se ensayó la oxidación directa con NaIO_4 del tiopropilo en el híbrido 10 para dar el compuesto 12. Aplicando esta estrategia se obtuvo con éxito el producto sulfoxidado de interés con buen rendimiento (70 % para el híbrido 12).

CONCLUSIONES

- Todos los nuevos derivados obtenidos fueron caracterizados satisfactoriamente por espectroscopia RMN, MS e IR, y en el caso de los productos 7 y 10, también por espectroscopia Raman.
- Los compuestos se obtuvieron en cantidades suficientes para determinar su actividad antihelmíntica *in vitro* en el nemátodo *N. brasiliensis*.
- Los amino benzimidazoles fueron obtenidos mediante hidrólisis ácida con HBr, salvo en el caso particular del producto de hidrólisis de ABZ SX, donde es necesario utilizar hidrólisis básica, dado que de lo contrario se forma el derivado bromado 5c.
- Los híbridos se obtuvieron satisfactoriamente, con buenos rendimientos.
- Para obtener los derivados sulfoxidados de los compuestos híbridos, los productos 11 y 12, se llega a la conclusión de que la oxidación del compuesto padre con NaIO₄ genera el compuesto deseado con mejores rendimientos que el acoplamiento del amino benzimidazol sulfoxidado con el derivado valerolactama 4.

BIBLIOGRAFÍA

Bisi, A., Rampa, A., Budriesi, R., Gobbi, S., Belluti, F., Ioan, P., Valoti, E., Chiarini, A., Valenti, P. Cardiovascular hybrid drugs: new benzazepinone derivatives as bradycardic agents endowed with selective β_1 -Non-competitive antagonism. *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, *11*, 1353- 1361.

Bansal, Y., Silakari, O. The therapeutic journey of benzimidazoles: a review. *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, *20*, 6208 -6236.

Becke, A., Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.*, **1993**, *98*, 5648-5652

Bladé-Font, A. Facile síntesis of γ -, δ -, and ϵ - lactams by cyclodehydration of ω - amino acids on alumina or silica gel. *Tetrahedron Lett.*, **1980**, *21*, 2443- 2446

Bürli, R., Jones, P., McMinn, D., Le, Q., Duan, J., Kaizerman, J., Difuntorum, S., Moser, H. DNA binding ligands targeting drug-resistant Gram-positive bacteria. Part 2: C-terminal benzimidazoles and derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 1259-1263.

Chaudhary, A., Girgis, M., Prashad, M., Hu, B., Har, D., Repič, O., Blacklock, T. Using mixed anhydrides from amino acids and isobutyl chloroformate in *N*-acylations: a case study on the elucidation of mechanism of urethane formation and starting amino acid liberation using carbon dioxide as the probe. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 5543-5546

Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J. A. Peralta, Jr., J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J. M., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, Ö., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J., and Fox, D. J., Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.

Ghose, A., Viswanadhan, V., Wendoloski, J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. *J. Comb. Chem.*, **1999**, *1*, 55-68.

Gilman, H., Swayampati, D. Studies in the Thianthrene System: Bromination and Reductive Bromination. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, *77*, 5944- 5948.

Gordon, S. Nuevos antihelmínticos derivados de la 2-amino- δ -valerolactama. Síntesis y evaluación biológica. Tesis doctoral, bajo la tutoría del Dr. Eduardo Manta. Facultad de Química, UdelaR, 1998.

Gordon, S., Costa, L., Incerti, M., Manta, E., Saldaña, J., Domínguez, L., Mariezcurrena, R., Suescun, L. Synthesis and *in vitro* anthelmintic activity against *Nippostrongylus brasiliensis* of new 2-amino-4-hydroxy- δ -valerolactam derivatives. *Il Farmaco*, **1997**, *52*, 603-608.

Gyurik, R., Chow, A., Zaber, B., Brunner, E., Miller, J., Villani, A., Petka, L., Parish, R. Metabolism of Albendazole in cattle, sheeps, rats and mice. *Drug Metab. Dispos.*, **1981**, *9*, 503- 508

G. S. Huang, L. Lopez-Barcons, R. Perez-Soler, B. S. Freeze, A. B. Smith, III, G. L. Goldberg, S. B. Horwitz, and H. McDaid. Potentiation of Taxol Efficacy by Discodermolide in Ovarian Carcinoma Xenograft-bearing Mice. *Clin. Cancer Res.*, **2006**, *12*, 298-304.

Khrapunovich-Baine, M., Menon, V., Verdier-Pinard, P., Smith, A., Angeletti, R., Fiser, A., Horwitz, S., Xiao, H. Distinct pose of discodermolide in taxol binding pocket drives a complementary mode of microtubule stabilization. *Biochemistry*, **2009**, *48*, 11664-11677.

Klein, L., Freeze, B., Smith, A., Horowitz, S. The microtubule stabilizing agent discodermolide is a potent inducer of accelerated senescence. *Cell Cycle*, **2005**, *4*, 501-507.

Kowalski, P., Mitka, K., Ossowska, K., Kolarska, Z. Oxidation of sulfides to sulfoxides. Part 1: Oxidation using halogen derivatives. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 1933-1953

Lee, C., Yang, W., Parr, R. Development of the Colle-Salvetti correlation energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, **1988**, *37*, 785-789

Li, H., Jiang, X., Ye, Y., Fan, C., Romoff, T., Goodman, M. 3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3- benzotriazin-4(3*H*)-one (DEPBT): A New Coupling Reagent with Remarkable Resistance to Racemization. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 91-94

Madesclaire, M. Reduction of sulfoxides to thioethers. *Tetrahedron*, **1988**, *44*, 6537-6580.

Mahler, G., Davyt, D., Gordon, S., Incerti, M., Núñez, I., Pezaroglo, H., Scarone, L., Serra, G., Silvera, M., Manta, E. Synthesis of Albendazole Metabolite: Characterization and HPLC Determination. *J. Chem. Educ.*, **2008**, *85*, 1652

Meunier, B. Hybrid molecules with a dual mode of action: dream or reality?. *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41*, 69-77

Mendina, P. Optimización de nuevos agentes antihelmínticos para su eventual uso en quimioterapia. Tesis Doctoral, bajo la tutoría de los Dres. Laura Domínguez y Eduardo Manta, Facultad de Química, UdelaR, **2009**.

Montalbetti, C., Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 10827- 10852.

Munguía, B., Mendina, P., Espinosa, R., Lanz, A., Saldaña, J., Andina, MJ., Ures, X., López, A., Manta, E., Domínguez, L. Synthesis and Anthelmintic Evaluation of Novel Valerolactam-Benzimidazole Hybrids. *Lett. Drug Des. Discov.*, **2013**, *10*, 1007-1014.

Nepali, K., Sharma, S., Sharma, M., Bedi, P, Dhar, K. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, *77*, 422- 487.

Parr, R., Yang, W. Density-functional theory of the electronic structure of molecules. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **1995**, *46*, 701-728

Perrin, D., Armarengo, W. Purification of Laboratory Chemicals. **1998**, 3ra Ed. Pergamon Press, Oxford

Ruff, F.; Kucsman, A. Electronic effect, steric hindrance, and anchimeric assistance in oxidation of sulphides. Neighbouring- group participation through sulphur-oxygen non-bonded interaction. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1988**, 1123- 1128.

Smith, A., Sugasawa, K., Atasoylu, O., Huang Yang, C., Band-Horwitz, S. Design and Synthesis of (+)-Discodermolide–Paclitaxel Hybrids Leading to Enhanced Biological Activity. *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 6319- 6327.

Soria-Arteche, O., Castillo, R., Hernandez-Campos, A., Hurtado-de la Pena, M., Navarrete-Vazquez, G., Medina-Franco, J.L., Gomez-Flores, K. Studies on the Selective S-oxidation of Albendazole, Fenbendazole, Triclabendazole, and Other Benzimidazole Sulfides. *J. Mex. Chem. Soc.*, **2005**, *49*, 353-358.

Viegas-Junior, C., Danuello, A., Da Silva, V., Barreiro, E., Manssour, C. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. *Curr. Med. Chem.*, **2007**, *14*, 1829-1852

Walsh, J., Bell, A. Hybrid Drugs for Malaria. *Curr. Pharm. Des.*, **2009**, *15*, 2970-2985

Walsh, J., Coughlan, D., Heneghan, N., Gaynora, C., Bell, A. A novel artemisinin–quinine hybrid with potent antimalarial activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 3599-3602.

CAPÍTULO 2

Evaluación de la actividad antihelmíntica y aproximación al mecanismo de acción

Introducción	pág. 99
Metodología	pág. 107
Resultados	pág. 111
Discusión	pág. 116
Conclusiones	pág. 119
Bibliografía	pág. 120

INTRODUCCIÓN

Evaluación de la actividad antihelmíntica in vitro, bioensayos physiology-based

Las infecciones con nemátodos en especies productivas son la principal causa de pérdidas económicas para el sector ganadero (Millar *et al.*, 2012). Como se anticipó en el capítulo introductorio, esta situación se agrava frente a la instalación del fenómeno de resistencia a todos los antihelmínticos disponibles.

Todos los fármacos antihelmínticos disponibles en el mercado fueron descubiertos a través del screening farmacológico de compuestos de síntesis o de origen natural. Estos ensayos pueden ser *in vitro*, en los que se utilizan especímenes enteros del helminto seleccionado en alguno de los estadios del ciclo de desarrollo (huevo, L3, L4, adulto) así como *in vivo* en los que se utilizan modelos de infección (natural o artificial) en animales. En los modelos *in vitro* ampliamente utilizados los helmintos son incubados en presencia del compuesto a estudiar, y la actividad se mide en función de parámetros fenotípicos del mismo como motilidad, viabilidad, crecimiento o muerte. Este tipo de ensayos se los conoce como ensayos *physiology-based* (“fisiología-guíaados”) (Woods y Williams, 2007).

La actividad antihelmíntica *in vitro* en los ensayos *physiology-based* para un compuesto depende básicamente de dos aspectos: de su afinidad por un receptor específico para desencadenar la respuesta (efecto) y de sus propiedades de transporte a través de la superficie externa del parásito, de forma de liberar concentraciones efectivas del compuesto y en suficiente tiempo al sitio de acción intraparasitario. La velocidad de difusión intraparasitaria de una molécula determina la cantidad que se encuentra disponible para un tiempo dado, mostrando así la *biodisponibilidad parasitaria*.

De este modo, un compuesto que resulta activo *in vitro* bajo las condiciones experimentales del ensayo *physiology-based* indica que puede sortear la barrera externa del parásito y alcanzar su blanco molecular desencadenando el efecto. Esta consideración resulta oportuna tenerla presente para el desarrollo de nuevos fármacos antihelmínticos, tanto en sus etapas de optimización, como para los estudios de eficacia en modelos de infección en animal (hospedador). Efectivamente, la eficacia de los compuestos antihelmínticos *in vivo* dependerá no sólo de la biodisponibilidad (fracción de dosis administrada disponible en el tejido blanco de interés donde se encuentra alojado el parásito) que presenten en el hospedador, sino también de la biodisponibilidad parasitaria que, como ya se mencionó, definirá la llegada del

compuesto en cantidad y tiempo suficiente al sitio de acción intraparasitario. Por estos motivos es que la estimación de la biodisponibilidad parasitaria de un compuesto es un aporte relevante en la búsqueda y desarrollo de nuevos antihelmínticos. A su vez, Esta propiedad puede cuantificarse a través de los *ensayos de difusión intraparasitaria ex vivo*. La utilidad y aplicación de los mismos se desarrollará en los capítulos 4 y 5 (ensayos de difusión intraparasitaria *ex vivo*).

Si bien los ensayos *physiology-based in vitro* presentan muchas ventajas (sencillez, rapidez, posible automatización, pequeña cantidad de muestra a ensayar, etc.), la principal desventaja consiste en desconocer el blanco molecular donde está actuando el potencial agente. Sin embargo, para la búsqueda de nuevos agentes y con posibles nuevos mecanismos de acción, este tipo de bioensayos son una herramienta fundamental. En este sentido, para la validación del bioensayo desarrollado por el grupo (Gordon *et al.*, 1997), que se utilizó para evaluar los compuestos sintetizados en el trabajo experimental de esta tesis (ver más adelante), se emplearon antihelmínticos nematocidas conocidos con diferentes mecanismos de acción (benzimidazoles, levamisol, closantel) así como antihelmínticos no nematocidas (control negativo con praziquantel), confirmando además, la robustez del bioensayo.

En el desarrollo reciente de nuevos antihelmínticos, y en consonancia con las nuevas tecnologías de *high throughput screening*, se han implementado bioensayos alternativos al uso de parásitos enteros. En ellos se evalúa la actividad antihelmíntica sobre un blanco molecular, y se denominan bioensayos *target-based* ("blanco molecular-guiados) (Rohwer *et al.*, 2012). Un ejemplo de este tipo de ensayos es la elección de las tubulinas como blanco molecular, y el estudio de la polimerización de tubulinas, uno de los blancos de acción antihelmíntica mejor conocidos, particularmente para los benzimidazoles (BZ) como ya se mencionara en el capítulo introductorio. En este sentido, en el método publicado por Shelanski *et al.*, 1973 se demostró que la dispersión de la luz por los microtúbulos es directamente proporcional a la concentración de dicho polímero, de este modo los compuestos que tiene la capacidad de inhibir la formación de microtúbulos, como es el caso de los BZ antihelmínticos, disminuirán la dispersión de la luz. (Prakasham *et al.*, 2012). Mediante un método espectrofotométrico es posible medir el grado de polimerización y afectación por compuestos como los BZ, resultando entonces el parámetro de lectura en este bioensayo *target-based*, asociado a este mecanismo de acción, tal cual se lo muestra en la figura 2.1.

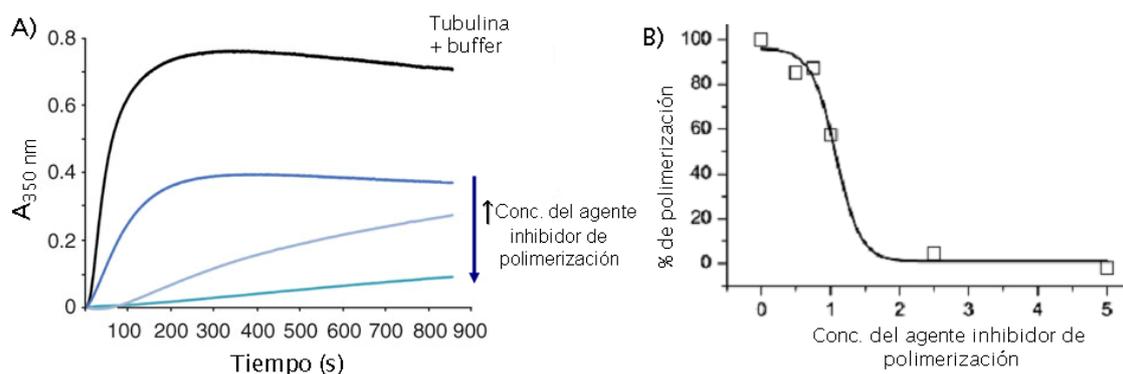


Figura 2.1. A) Ensayo de polimerización de microtúbulos en presencia de concentraciones crecientes de un agente inhibitorio de polimerización, se grafica la absorbancia a 340 nm ($A_{340\text{nm}}$) versus el tiempo de medida para cada concentración. B) A partir de las curvas de absorbancia versus tiempo, se calcula el grado de polimerización (absorbancia luego de 1h de medida, menos la absorbancia a tiempo 0h). Los valores obtenidos para los compuestos a ensayar se comparan contra una muestra control (100%, tubulina + buffer), determinándose así el porcentaje de polimerización (%).

Si bien los ensayos *target-based* presentan la ventaja de ser fácilmente automatizables, no han cubierto las expectativas en el desarrollo de nuevos antihelmínticos. Esto se debe a tres principales causas: (i) a que la información genómica es incompleta en la mayoría de los organismos parasitarios de interés, por lo que no hay suficiente información respecto al fenotipo asociado a un determinado gen/ proteína; (ii) los organismos modificados genéticamente, como por ejemplo parásitos knockout para una determinada proteína, no están fácilmente disponibles, por lo que es difícil conocer la relevancia de una determinada proteína para la supervivencia de dicho organismo; (iii) los compuestos optimizados en base a estudios de afinidad a un determinado blanco molecular suelen ser muy activos, pero pueden no ser biodisponibles, es decir, no ser capaces de atravesar la barrera externa del parásito para llegar a su blanco molecular, perdiendo su actividad luego en modelos de organismo entero, fisiología-basados (Rohwer *et al.*, 2012).

Por otra parte, nuevos blancos moleculares asociados a potenciales mecanismos de acción, no quedarían contemplados en este tipo de bioensayos *target-based*, contrariamente a lo discutido para los *physiology-based*.

En base a lo desarrollado anteriormente, lo ideal es combinar ambos métodos de screening en la búsqueda de nuevos antihelmínticos, los ensayos que involucran parásitos enteros, *physiology-based*, junto con aquellos donde se trabaja sobre un blanco molecular aislado, *target-based*.

El desarrollo de nuevos antihelmínticos puede ser facilitado por el uso de modelos animales para la caracterización farmacodinámica (eficacia) y farmacocinética de nuevos candidatos (ensayos *in vivo*). Los modelos de infección artificial en roedores se han descrito ampliamente tanto para nemátodos gastrointestinales como para céstodos. Estos presentan ventajas como requerir menores cantidades del compuesto a evaluar y menores costos (entre otras), comparado con los estudios de eficacia en la especie productiva de interés o en humanos (Fankhauser *et al.*, 2012)

Para la búsqueda de nuevos antihelmínticos, línea interdisciplinaria en la que se viene trabajando, y con énfasis en la utilidad para el control de helmintiasis de especies productivas, nuestro grupo de Farmacología, ha desarrollado un modelo para evaluar actividad antihelmíntica, *in vitro* (Gordon *et al.*, 1997, Saldaña, 1997) e *in vivo* (Domínguez *et al.*, 2000), usando el nematodo de rata *Nippostrongylus brasiliensis*. En estos ensayos *physiology-based*, se trabaja con el estadio parasitante L4 de *N. brasiliensis* obtenidas de intestino de ratas infectadas artificialmente, siendo la muerte parasitaria el parámetro de lectura del efecto a evaluar en el modelo *in vitro*. Análogamente, para el ensayo *in vivo* la eficacia se mide en base a la reducción de L4 recuperadas de intestino de ratas artificialmente infectadas y tratadas, 72 h post-infección, respecto a animales infectados no tratados (control).

El nematodo *N. brasiliensis* pertenece, dentro del filum nematodo, al orden strongylida y a la familia trichostrongyloidae, al igual que el nematodo de interés en especies productivas *Haemonchus contortus*. Esta cercanía filogenética, la cual se puede observar en la figura 2.2, hace del nemátodo *N. brasiliensis* un modelo interesante para el screening preliminar de nuevos compuestos con actividad antihelmíntica, en una buena aproximación hacia el parásito de interés en especies productivas como *H. contortus*.

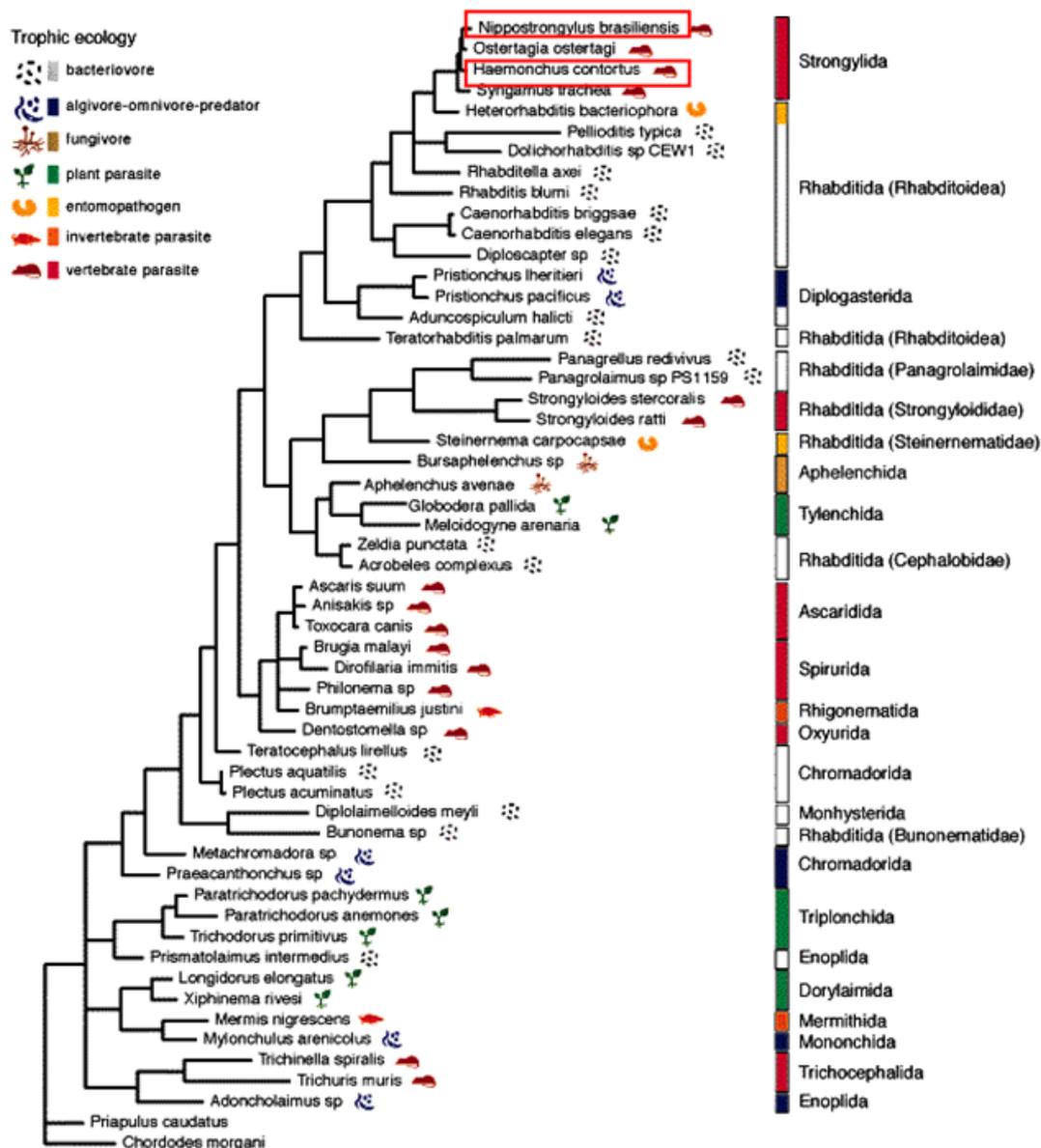


Figura 2.2. Árbol filogenético del filum nemátodo. Se recuadra en rojo al nematodo de rata *N. brasiliensis* y el nematodo de interés en especies productivas *H. contortus*, ambos pertenecientes al orden strongyloidea

Aproximación al mecanismo de acción de los derivados 2- amino- δ -valerolactamas, precursores de los compuestos híbridos valerolactama-benzimidazólicos.

Durante la Tesis de Doctorado del Dr. P. Mendina (2009), se estudió como una posible aproximación al mecanismo de acción del fragmento valerolactama, el cual compone los compuestos híbridos, su potencial intervención sobre la *vía de las poliaminas* en base a ciertas hipótesis que se retomaron. Aunque el rol de las poliaminas es controvertido en helmintos, constituye un blanco terapéutico útil y

explotado en otros organismos como protozoarios (Müller *et al.*, 2001) para lograr citotoxicidad, habiéndose incluso estudiado su potencial uso para la quimioterapia del cáncer (Casero y Marton, 2007).

Los derivados 2-amino- δ -valerolactama provienen del aminoácido L-ornitina (ver capítulo de síntesis química), y a su vez, dicho aminoácido es el principal precursor para la síntesis de poliaminas (figura 2.3).

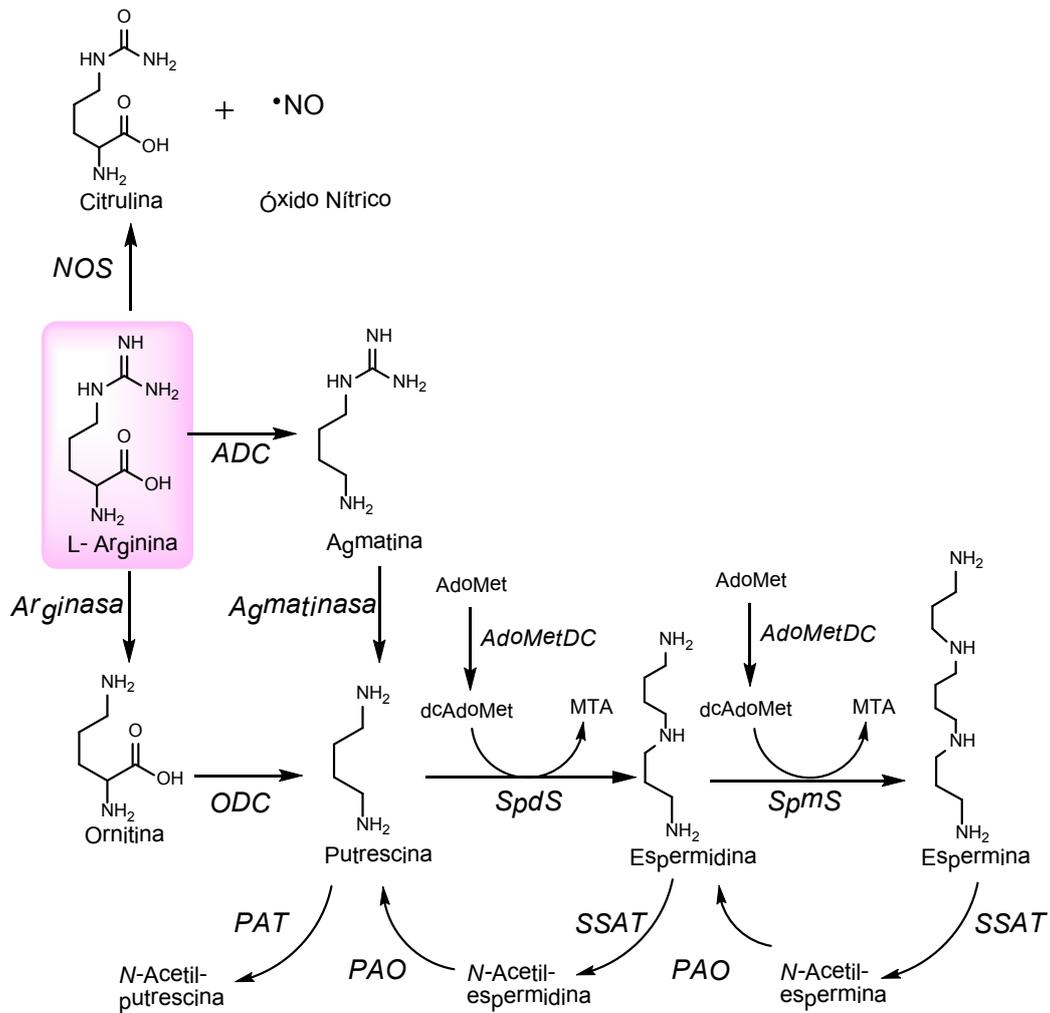


Figura 2.3. Vía de las poliaminas y de la síntesis de óxido nítrico. Las poliaminas se sintetizan a partir de los aminoácidos arginina u ornitina. Las enzimas involucradas en la síntesis de poliaminas son arginina descarboxilasa (ADC), agmatinasa, arginasa, ornitina descarboxilasa (ODC), espermidina sintasa (SpdS) y espermina sintasa (SpmS). Las dos últimas reacciones están acopladas a la S-adenosilmetionina descarboxilada (dcAdoMet), produciendo metil-tioadenosina (MTA). DcAdoMet se forma a partir de S-adenosilmetionina (AdoMet) y la acción de la enzima S-adenosilmetionina descarboxilasa (AdoMetDC). Las enzimas involucradas en la interconversión de poliaminas son espermidina/ espermina N-acetiltransferasa (SSAT), poliamina oxidasa (PAO), putrescina N-acetiltransferasa (PAT). La arginina a su vez puede ser metabolizada por la óxido nítrico sintasa (NOS), para dar óxido nítrico (NO) y citrulina.

Además, se evaluó y observó que el derivado valerolactama 1a (figura 2.4), presenta similitud estructural y el mismo orden de actividad antihelmíntica *in vitro* (modelo de *N. brasiliensis* L4), que el compuesto α -difluorometilornitina (DFMO, figura 2.4) (CE_{50} de 2.0E-4 y 11E-4 μ M para 1 y DFMO respectivamente), un inhibidor selectivo e irreversible de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) (Zou, *et al.*, 2002).

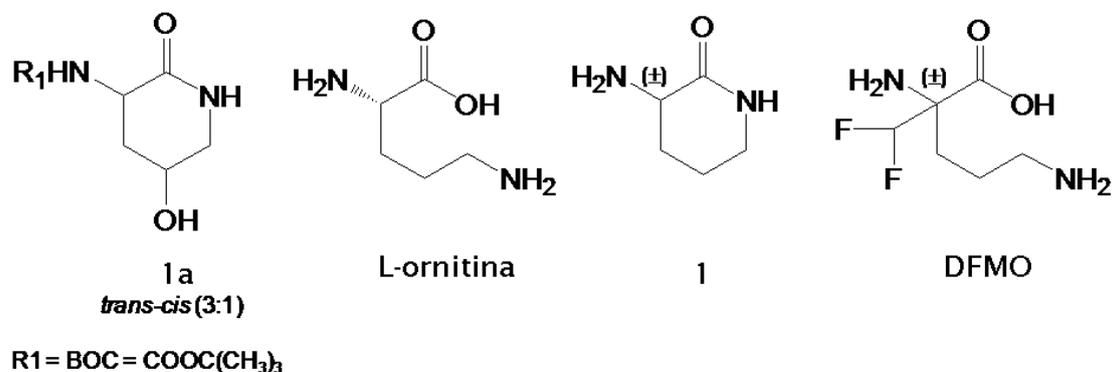


Figura 2.4. Estructuras químicas para las valerolactamas 1 y 1a, el aminoácido L-ornitina y el inhibidor de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), α -difluorometilornitina (DFMO).

Estas observaciones sentaron las hipótesis para estudiar la posible intervención de esta vía en el mecanismo de acción de la serie valerolactama.

En este sentido, se realizaron estudios comparativos (Mendina, 2009) del compuesto 1a y el inhibidor DFMO para conocer su influencia sobre los niveles de las poliaminas (espermidina y espermina) en *N. brasiliensis* L4. Mientras los niveles de estas poliaminas disminuyeron al incubar los parásitos con DFMO, se mantuvieron inalteradas (como el control sin tratar) al incubar con el compuesto 1a. *Estos resultados sugirieron que la actividad antihelmíntica de estas dos moléculas se debe a mecanismos de acción distintos.*

Sumado a ello, estudios previos (Sharma *et al.*, 1989) realizados en *N. brasiliensis* con un enfoque enzimático, demostraron la ausencia de ODC (o con actividad no relevante), y sugieren una "vía salvaje" para PA en este nematodo.

Continuando estos estudios y observando el rol del aminoácido L-arginina (figura 2.3) como puente o "switch" entre la vía de las poliaminas y la de la síntesis de óxido nítrico (NO), se decide explorar esta vía en el marco de trabajo de la presente Tesis, y su posible participación en el mecanismo de acción de la serie valerolactama. Este trabajo se realizó en colaboración con el Laboratorio de Físicoquímica Biológica de la Facultad de Ciencias a cargo de la Dra. Ana Denicola.

En mamíferos se han reportado tres isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), dos de tipo constitutivo, NOS neuronal (nNOS, o NOS I) y NOS endotelial (eNOS, o NOS III), involucradas en la neurotransmisión y mantenimiento de la homeostasis cardiovascular, respectivamente, y la tercer isoforma, presente en las células fagocíticas del sistema inmune, se induce su síntesis ante la presencia de patógenos (iNOS, o NOS II) (Stuehr, 1999).

Así como el hospedador mamífero produce NO por el sistema inmune en defensa contra una infección parasitaria (Liew *et al.*, 1997), los parásitos también pueden producir NO como mecanismo de defensa, a través de enzimas del tipo NOS, las cuales han sido descritas para *Hymenolepis diminuta* (Terenina *et al.*, 2000), *Ascaris suum* (Bascal *et al.*, 2001), *Fasciola hepatica* (Pfarr *et al.*, 2001), *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* (Long *et al.*, 2004; Kohn *et al.*, 2006), *Taenia solium* (Kim *et al.*, 2007), *Trichinella britovi* larvae (Masetti *et al.*, 2004), *H. contortus* y *Teladorsagia circumcincta* (Umair *et al.*, 2010). También se ha reportado la función del NO en la neurotransmisión de helmintos (Bowman *et al.*, 1995).

En nemátodos parásitos, se han reportado diferentes isoformas de NOS, que han mostrado inmunoreactividad a anticuerpos anti-NOS I de mamífero y presentaron diferentes pesos moleculares. Por ejemplo, *T. britovi* mostró cuatro polipéptidos de bajo peso molecular (38 - 50 kDa) comparado a la NOS I de mamífero (130 kDa) (Masetti *et al.*, 2004), y para *D. immitis*, *B. malayi*, y *Acanthocheilonema viteae* se detectaron polipéptidos de 63, 96 y uno mayor a 200 kDa (Colasanti y Venturini, 1998).

Se conoce que en algunos parásitos la vía de la arginasa puede activarse de forma de disminuir los niveles de arginina (sustrato de la óxido nítrico sintasa, NOS) y por ende los de NO, ya que éste último puede volverse tóxico para el parásito (Vincendeau *et al.*, 2003)

En este sentido, quien suscribe, llevó a cabo estudios preliminares para explorar la posible intervención de la serie valerolactama sobre la vía del óxido nítrico.

METODOLOGÍA

Actividad antihelmíntica in vitro en modelo de nematodo N. brasiliensis, larvas L4

La actividad antihelmíntica de los productos obtenidos se determinó empleando un modelo biológico *in vitro* con el parásito *N. brasiliensis* en su estadio larvario L4, desarrollado por nuestro grupo de investigación como ya se mencionara. Estos ensayos de actividad están a cargo de la Dra. Jenny Saldaña, en el Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) de Facultad de Química. La Institución se encuentra registrada en la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA), según Ley 18611, con n° de registro 014/11; y el protocolo que se describirá a continuación ha sido aprobado por el Comité de Ética en Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Química, con el n° 03-05-09, ante la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), CSIC-Udelar.

Brevemente se describe a continuación. Se infectaron Ratas Wistar de 60 días por vía subcutánea (s.c.) con 5000 larvas L3 de *N. brasiliensis* suspendidas en 0.3 mL de agua destilada estéril. A las 72 hs post infección (p.i.) las ratas se sacrificaron por dislocación cervical y se procedió a recuperar parásitos L4 de intestino delgado, utilizando el método de Baerman. Luego de la recuperación de las larvas, estas se lavaron con medio de lavado (Jenkins *et al.*, 1982, 1986) conteniendo antibióticos (penicilina y estreptomycin), y finalmente se contaron en microscopio invertido Nikon Eclipse TS100 (10x/0.25). Las mismas se suspendieron en medio de cultivo completo (medio de lavado que contiene suero bovino fetal descomplementado y eritrocitos), y luego se distribuyeron en placas de cultivo celular de 24 pozos, colocando 50 larvas por pozo aproximadamente. Se agregó medio de cultivo completo para tener un volumen final de 2 mL de medio por pozo. Los compuestos a evaluar se encuentran disueltos en DMSO, y a cada pozo se agregó 10 µL de la dilución correspondiente del compuesto a en estudio. Se ensayaron cuatro concentraciones de cada compuesto, con cuatro réplicas de cada una. En la misma placa se incubaron L4 con DMSO (blanco control sin tratar) así como un control positivo con el fármaco antihelmíntico Albendazol (ABZ). Las placas se incubaron a 37°C por 5 días. Al día 5 del experimento se contaron larvas vivas y muertas bajo microscopio invertido Nikon Eclipse TS100 (10x/0.25).

Se determinó la curva dosis- respuesta (Log concentración vs % de muerte) para cada producto, y el ajuste de las curvas se realiza utilizando el Software OriginPro 8.0 (OriginLab Co., Northampton, MA, USA) y se interpoló la concentración necesaria para causar el 50% de muerte parasitaria (CE_{50} : concentración efectiva 50).

Los productos evaluados con este modelo fueron los obtenidos y descritos en el capítulo 1.

Actividad antihelmíntica in vivo en modelo de ratas infectadas con el nematodo N. brasiliensis.

Para evaluar la eficacia antihelmíntica *in vivo* de compuestos de interés, se utilizó el modelo desarrollado por el grupo de infección artificial de *N. brasiliensis* en ratas ya mencionado, para un tratamiento en monodosis y por vía oral.

Brevemente, el estudio de actividad antihelmíntica se realizó en ratas Wistar macho (60 días de edad) infectadas por vía s.c. con 5000 L3, y 5 hs p.i. se trataron vía oral con la dosis correspondiente del fármaco a estudiar en microcápsulas de gelatina (Shinogui Qualicaps Company, Yamatokoriyama, Japón). Los animales se mantuvieron en caja metabólica con agua glucosada. A las 72 hs p.i. se sacrificaron los animales por dislocación cervical, se retiró el intestino delgado y se recuperaron los parásitos L4 de manera análoga a como se hizo para el modelo *in vitro* (método de Baerman). Cada producto se ensayó a la/s dosis correspondiente/s, en paralelo con un grupo control no tratado (n=4) y un grupo control positivo tratado con ABZ. La eficacia del tratamiento se expresa como porcentaje de reducción de L4 presentes en intestino respecto al grupo control.

Para realizar este ensayo se seleccionó el compuesto híbrido 10 (derivado de FEB), en base a los resultados obtenidos en los bioensayos *in vitro* (actividad antihelmíntica y difusión intraparasitaria *ex vivo*) (ver capítulos 4 y 5). Se administró una monodosis de 60 mg/kg.

Estudios preliminares del rol de los compuestos valerolactama sobre la vía del óxido nítrico en N. brasiliensis, L4.

SDS- PAGE y Western Blotting

En primer lugar, se estudió la presencia de la enzima NOS en *N. brasiliensis* L4 (no comunicado anteriormente) así como se realizaron estudios comparativos entre su sustrato arginina (Arg) o el producto 1a, en la influencia sobre la expresión de esta enzima.

Para ello, las larvas L4 de *N. brasiliensis* se mantuvieron en placas de 24 pocillos con 2 mL de buffer Hanks, se colocan 30 L4 por pocillo, en presencia de: Arg (1.02 μ M) + L-NAME (3.9 μ M); Producto 1a (1.03 μ M) + L-NAME (3.9 μ M); Arg (1.02 μ M);

Producto 1a (1.03 μM). Todos los pocillos tienen incuados Glu (1.08 μM , equimolecular con Arg y 1a). También se hicieron controles con Glu solo dicha concentración.

Luego de incubar por 12 hs, los parásitos se homogenizan a 0°C en H₂O en presencia de inhibidores de proteasas. Las muestras de homogenato se prepararon con SDS 1%, β -mercaptoetanol 2.5 % y glicerol 6% y se resolvieron electroforéticamente en geles al 8% de SDS-PAGE. Cada carril contenía 15 μg de proteínas. Luego de la electroforesis, los geles de poliacrilamida se equilibraron en buffer de transferencia frío y se colocaron sobre membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane, GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK) y se transfieren por transferencia húmeda (Towbin, et al. 1979). La membrana transferida se mantiene en buffer de bloqueo (leche descremada al 5% en PBS) toda la noche a 4° C. Las proteínas transferidas a la membrana de nitrocelulosa se incubaron con una dilución de los anticuerpos policlonales de conejo anti-NOS I (NOS neuronal) 1:8000 o con anti-NOS III (NOS endotelial) 1:2000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), y como control de carga se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -actina (1:5000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). La membrana se lavó y luego se incubó por 1 h con una dilución 1:5000 de los anticuerpos secundarios de cabra IRDye 800CW anti-conejo y con IRDye 680LT anti-conejo (LI-COR, GmbH, Germany). Las bandas de proteína reactivas a los anticuerpos se visualizaron usando el equipo Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Las imágenes obtenidas se procesaron con el software LI-COR, determinándose la intensidad de la banda de NOS en los diferentes experimentos realizados (western cuantitativo).

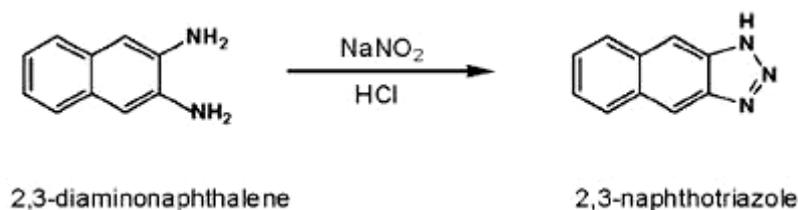
Actividad antihelmíntica de arginina (Arg) y producto 1a en presencia del inhibidor de NOS, L-NAME (estudios de reversión de la toxicidad)

Mediante la utilización de la misma metodología que se emplea para determinar la actividad antihelmíntica *in vitro* en *N. brasiliensis* L4, se incuban estos parásitos con Arg o el producto 1a a una concentración final igual a su CE₅₀ (7.6 nM y 0.2 nM respectivamente). Así mismo, cada molécula se ensaya a su CE₅₀ más L-NAME (*N-Nitro-L-Arginina metil éster*) en una relación 1:4 respectivamente. L-NAME se ensaya solo, en las mismas concentraciones que se utilizó para las combinaciones con Arg y 1a. Se determina el porcentaje de muerte para cada uno de los experimentos.

Ensayo de fluorescencia para determinar la formación de NO (ensayo de diaminonaftaleno, DAN)

La producción de NO por *N. brasiliensis* L4 se determina a través de la medida de los niveles de nitrito (NO₂⁻) en el medio de cultivo, luego de incubar con diferentes

agentes, como Arg y Arg + L-NAME, usando un método de detección por fluorescencia (DAN), a través de la siguiente reacción en medio ácido:



En presencia de nitritos en medio ácido, el DAN pasa a 2,3-naftotriazol, un compuesto fluorescente.

Se realizaron los siguientes estudios: 2000 L4 de *N. brasiliensis* L4 fueron incubadas en 1 mL de buffer Hanks (sin glucosa) conteniendo Arg (1 mM), con y sin L-NAME (4 mM). La activación de NOS glutamato-dependiente también fue evaluada, agregando en ambos experimentos Glu 1 mM. También se realizaron controles con Glu solo (1 mM).

Se incubó por 15 hs a 37°C, y luego el material parasitario es homogeneizado por ultrasonido a 0°C y en presencia de inhibidores de proteasas (pepstatina 10 µM, PMSF 0.5 mM, EDTA 5 mM). Las muestras fueron filtradas a través de un centricon de 10 kDa (10.000 rpm, 10 min, 4°C), y los nitritos se miden en el sobrenadante usando el método de DAN (Miles, *et al.*, 1996).

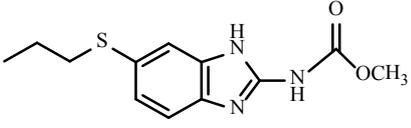
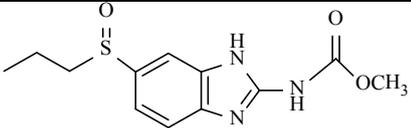
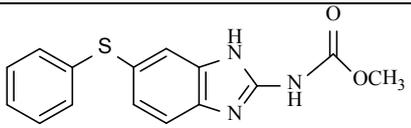
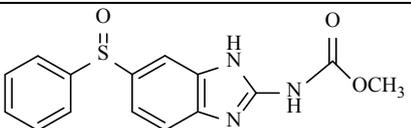
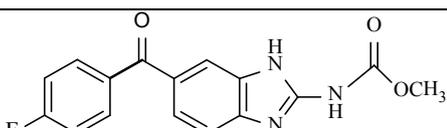
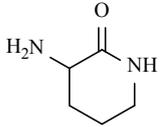
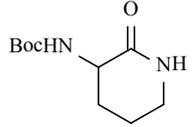
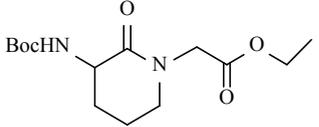
Brevemente, una alícuota de 20 µL de cada sobrenadante se coloca en placas negras de 96 pocillos, se agregan 20 µl de DAN (300 µM en 2 M HCl) más 160 µl de H₂O. Las placas se incuban por 30 min en la oscuridad y la reacción se termina por la adición de 100 µl de NaOH 3M, seguidos de incubación en la oscuridad por 10 min. Se mide la fluorescencia en un equipo Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific) a una λ_{exc} 381 nm y λ_{emi} 405 nm.

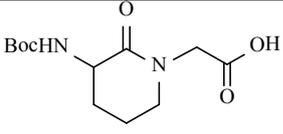
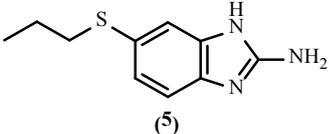
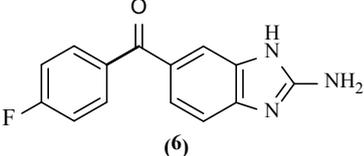
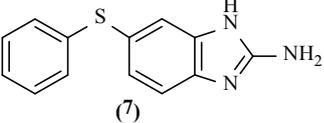
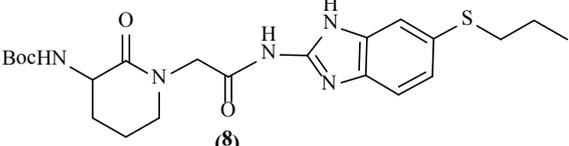
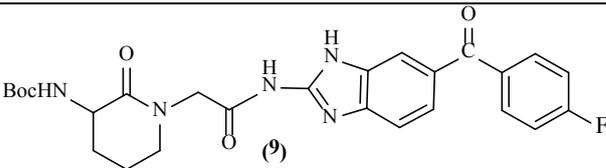
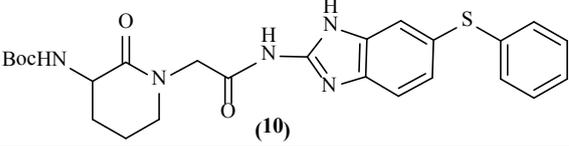
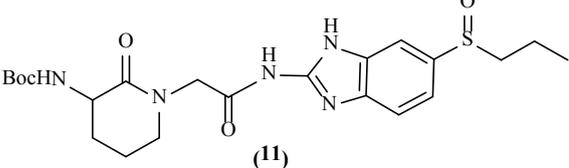
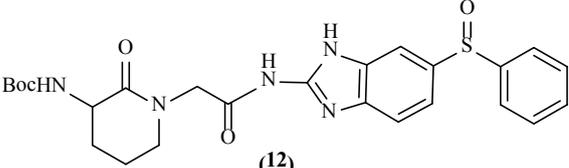
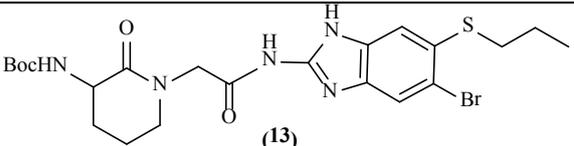
Para cuantificar se realizaron curvas de calibración usando soluciones de nitrito de sodio (20 a 200 nM) y se les aplicó el mismo protocolo que a las muestras.

RESULTADOS

En la Tabla 2.1, se presentan los resultados de actividad antihelmíntica *in vitro* en el modelo de *N. brasiliensis* L4, para los compuestos obtenidos en capítulo 1. Así mismo, en la tabla se agregan algunos resultados ya comunicados por el grupo, por resultar vinculantes y aclaratorios para el trabajo de esta tesis.

Tabla 2.1. Actividad antihelmíntica *in vitro* (CE_{50}) en *N. brasiliensis*, L4.

Producto	$CE_{50} \pm S.E.M.$ (nM) ^a
 ABZ	$(3.40 \pm 0.80) E+02$
 ABZ SX	4.4 E+03
 FEB	$(1.20 \pm 0.20) E+02$
 FEB SX	$(1.64 \pm 0.08) E+01$
 FLU	$(1.00 \pm 0.10) E+02$
 (1)	2.00 E-01 ^b
 (2)	2.20 E-01 ^b
 (3)	$(5.00 \pm 1.66) E-03$

 <p>(4)</p>	(2.50 ± 0.80) E+02
 <p>(5)</p>	(1.72 ± 0.48) E+02
 <p>(6)</p>	(3.88 ± 0.14) E+02
 <p>(7)</p>	(3.89 ± 0.82) E+01
 <p>(8)</p>	(6.08 ± 1.55) E-04
 <p>(9)</p>	(5.76 ± 2.18) E-01
 <p>(10)</p>	(3.87 ± 0.37) E-06
 <p>(11)</p>	(8.56 ± 1.76) E-02
 <p>(12)</p>	(1.81 ± 0.61) E-04
 <p>(13)</p>	(8.67 ± 4.95) E+03

^a Valor promedio de cinco réplicas para la Concentración Efectiva 50 (CE₅₀); S.E.M.: Standard Error of the Mean; ^b Reportado previamente en Gordon, *et al.*, 1997. Nota: parte de los resultados de actividad antihelmíntica *in vitro* en *N. brasiliensis* presentados en la tabla 1 fueron publicados en Munguía, *et al.*, 2013.

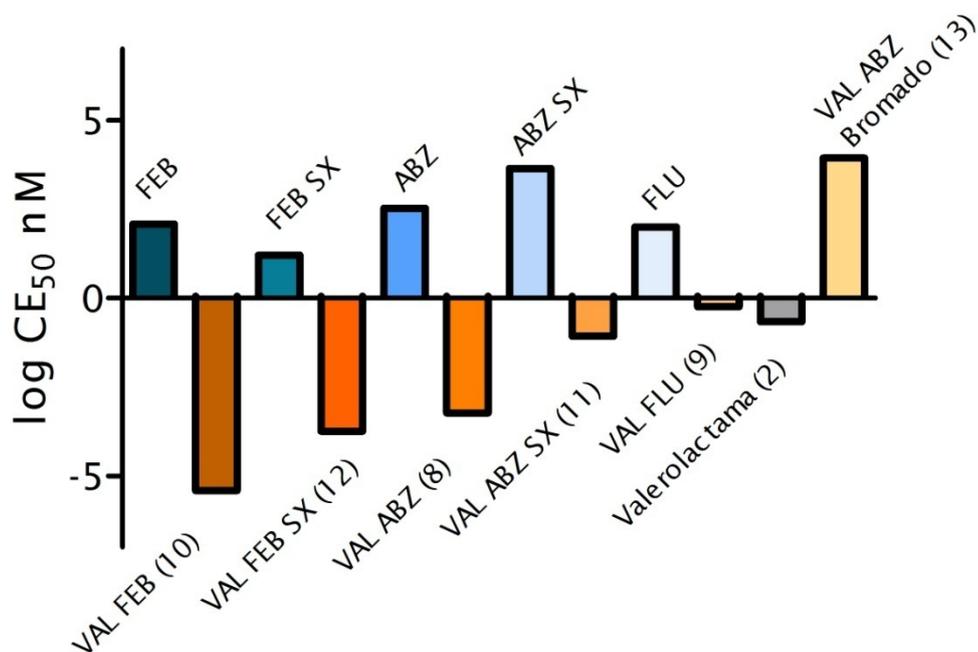


Figura 2.5. Actividad antihelmíntica (log CE₅₀) de los compuestos ensayados en *N. brasiliensis*, estadio L4

En el estudio preliminar de actividad antihelmíntica *in vivo* en modelo de ratas infectadas con el nematodo *N. brasiliensis*, el compuesto híbrido 10, derivado de FEB, produjo un 60 % de muerte para un tratamiento oral monodosis de 60 mg/kg, respecto al grupo control sin tratar. En el caso del tratamiento con FEB, éste a una dosis de 50 mg/kg produce un 89% de muerte respecto a su grupo control sin tratar (Domínguez *et al.*, 2000). En la figura 2.6 se presentan los gráficos del número de L4 de *N. brasiliensis* recuperadas postratamiento.



Figura 2.6. Resultado de ensayo de actividad antihelmíntica *in vivo* en ratas infectadas con *N. brasiliensis*. Se presenta el número de L4 vivas recuperadas luego del tratamiento oral con FEB (50 mg/kg) o el producto 10 (60 mg/kg), versus sus respectivos grupos control sin tratar.

Respecto a los estudios preliminares del rol de los compuestos valerolactama sobre la vía del óxido nítrico en *N. brasiliensis*, L4, en la figura 2.7 se muestran los resultados obtenidos del western blot cuantitativo, donde se estudió la presencia de la enzima NOS en *N. brasiliensis* L4 (no comunicado anteriormente) así como la influencia sobre la expresión de esta enzima por parte de Arg y el producto 1a. Se observó una banda intensa cercana a 100 kDa, la cual fue detectada usando el anticuerpo anti-NOS I, sin embargo no se vio inmunoreactividad usando el anticuerpo anti-NOS III (no mostrado). Se puede distinguir en la figura 2.7 A) que la intensidad de la banda a 100 kDa difiere según el compuesto con el que se desafiaron los parásitos.

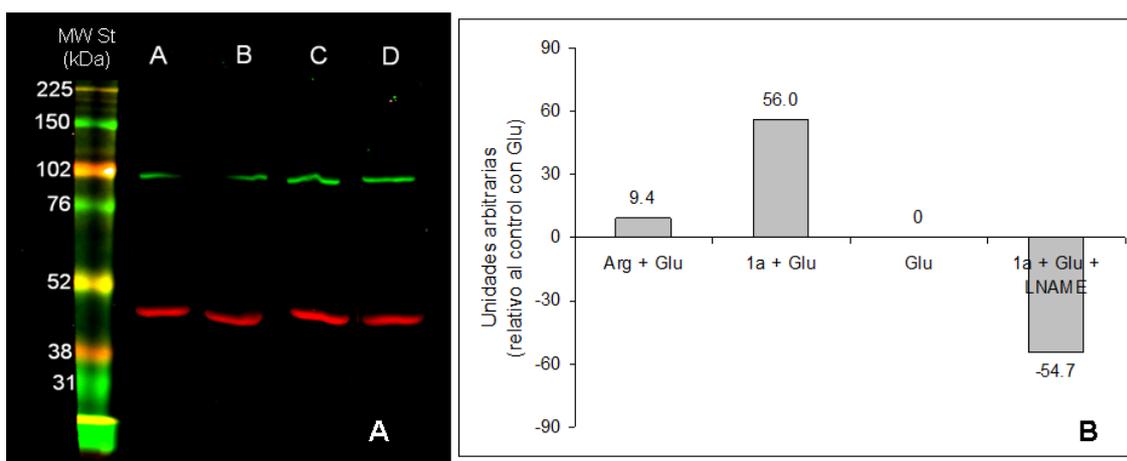


Figura 2.7. A) Análisis del estudio de western blot de los homogeinatos de *N. brasiliensis* L4 incubados con A: Arg+ L-NAME+ Glu; B: 1a + L-NAME+ Glu; C: Arg+ Glu; D: 1a + Glu (membranas incubadas con los anticuerpos anti-NOS I, banda verde, y anti- β - actina como control de carga, banda roja). B) El procesamiento digital de la imagen muestra que la expresión de NOS I en *N. brasiliensis* L4 no cambia prácticamente en presencia de Arg, mientras que el producto 1a aumenta la intensidad de la banda de NOS en un 56% y que dicho efecto es revertido por L-NAME (referidos al ensayo control con glutamato solo).

Los resultados del estudio de reversión de toxicidad por L-NAME en *N. brasiliensis* L4 de arginina y 1a se muestran en la figura 2.8.

En la tabla 2.2 se informa la producción de NO por *N. brasiliensis* L4, expresado como nitrito acumulado en el medio de cultivo, luego de incubar con diferentes agentes, usando el método de detección por fluorescencia con DAN.

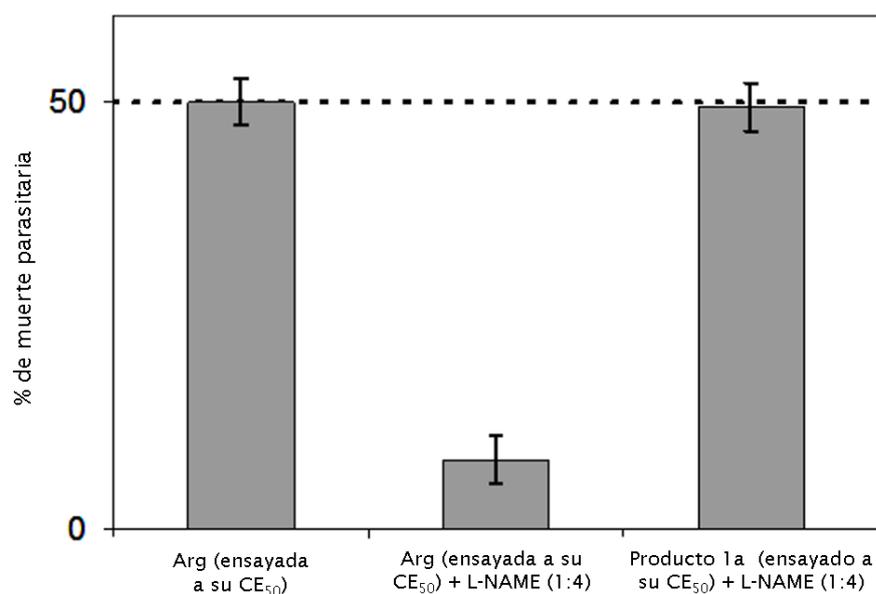


Figura 2.8. Reversión de la toxicidad en *N. brasiliensis* L4 de arginina y 1a por L-NAME. Cada compuesto se ensayó a su CE₅₀, y se adicionó L-NAME en una relación 1:4 (producto de interés: inhibidor). El L-NAME se estudió solo a las mismas concentraciones que se usaron en las combinaciones con Arg y 1a, no resultando tóxico.

Tabla 2.2- Producción de óxido nítrico por *N. brasiliensis* L4, utilizando la determinación fluorimétrica de DAN *

Experimento	Producción de NO ₂ ⁻ (pmol/mg de proteínas) (SD)
Arg + Glu	31.40 (1.42)
Arg + Glu + L-NAME	7.08 (4.14)
Glu	71.87 (24.01)
No tratado	104.10 (46.05)

* La producción de NO₂⁻ se mide como la acumulación de NO₂⁻ luego de 15 hs de incubación con Arginina (Arg, 1 mM), Glutamato (Glu, 1 mM) y L-NAME, 4 mM. Se muestra el promedio y su desviación estándar (SD)

DISCUSIÓN

Mediante el bioensayo *physiology-based in vitro* de *N. brasiliensis* L4, se comprobó que todos los compuestos híbridos presentaron una mayor actividad antihelmíntica respecto a los benzimidazoles antihelmínticos de partida, salvo el caso particular del compuesto 13 (figura 2.5).

Así mismo, cabe observar que los compuestos sulfóxidos (derivado oxidado del tioéter precursor) tuvieron menor actividad antihelmíntica *in vitro* que sus análogos sulfuros, tanto en los compuestos híbridos como para los benzimidazoles antihelmínticos comerciales (con la excepción de FEB SX, cuya actividad es mayor que la de FEB). El interés de haber realizado la síntesis y estudios de actividad de estos derivados sulfóxidos se debe a que resultan del patrón de biotransformación (fase I, oxidativo) no sólo en mamíferos, sino también en helmintos como se informa y discute en los capítulos a continuación.

La actividad de los híbridos, resultó en todos los casos igual o superior respecto al derivado valerolactama compuesto 2.

Para el caso particular del compuesto 13, sorprendió la baja actividad que presentó respecto al resto de los híbridos. Analizando los estudios de la geometría en fase gaseosa realizados y que serán descritos en el capítulo 3, este compuesto presentó la particularidad de un ángulo diedro entre el sustituyente en el carbono 5 y el anillo benzimidazólico cercano a 180° (ver figura 3.3), a diferencia de lo que ocurre con ABZ o su análogo 8 donde éste ángulo es cercano a 90° (ver figura 3.2). Estos resultados están en concordancia con los publicados por McCracken y Lipkowitz (1990 a y b), donde se informó que para benzimidazoles antihelmínticos con el sustituyente en posición 5 ortogonal al anillo benzimidazólico, la actividad antihelmíntica es mayor que para aquellos en los que dicho sustituyente permanece en el plano. Esta misma razón podría entonces justificar la pérdida de actividad encontrada para el compuesto 13.

Los benzimidazoles antihelmínticos se unen a las β - tubulinas, como se describió anteriormente (capítulo introductorio), en un sitio localizado en la zona amino terminal, El bolsillo de unión (figura 2.9 B) consiste en varios residuos hidrofóbicos altamente conservados (posiciones 240, 250, 253 y 266) con algunos residuos hidrofílicos, en los cuales las posiciones 165, 167, 198 y 200 son los de mayor relevancia en lo que hace a la interacción benzimidazol- tubulina (Aguayo *et al.*, 2013).

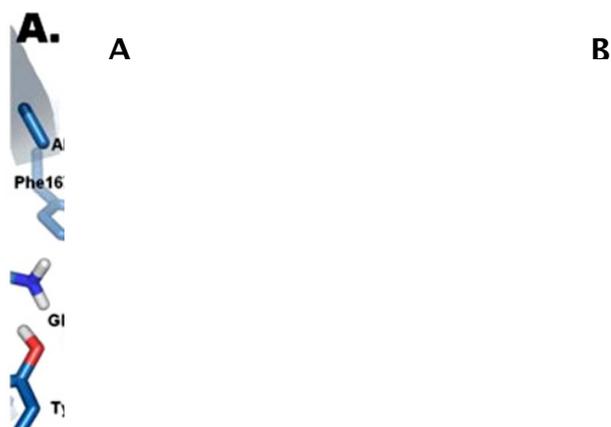


Figura 2.9. Tomada de Aguayo *et al.*, 2013. A) Predicción del modo de unión de diferentes benzimidazoles en el sitio de unión en β tubulina de *H. contortus*. Las líneas punteadas rojas representan los enlaces de hidrógeno. B) representación de los principales aminoácidos constituyentes del sitio de unión en β tubulina de *H. contortus* para benzimidazoles.

En dicho sitio, los átomos de hidrógeno del enlace carbamato y del anillo benzimidazol se encuentran en conformación *cis*, lo que permite que interactúen con el residuo Glu198 formando enlaces de hidrógeno (figura 2.9 A). Así mismo, benzimidazoles como ABZ y ABZ SX, entre otros, que presentan un aceptor de enlace de hidrógeno en posición 5 del núcleo benzimidazol, permiten la formación de enlace de hidrógeno con el residuo de cisteína 239 (Aguayo *et al.*, 2013).

En tal sentido, una interesante contribución para explorar, de manera de confirmar o descartar este blanco molecular en el mecanismo de acción de los nuevos compuestos híbridos sería la realización de estudios de binding en tubulinas extraídas de *H. contortus* (etapa en curso, ver perspectivas).

Respecto a los resultados obtenidos en los estudios preliminares para evaluar la influencia del derivado valerolactama 1a sobre la vía del NO, en primer lugar se demostró la presencia de la enzima NOS en *N. brasiliensis*, L4 (figura 2.7), no descrita hasta el momento, así como la producción de NO por parte del parásito cuando se lo incubaba con Arg, siendo inhibida dicha producción ante la presencia de L-NAME (tabla 2.2). En los experimentos donde estudia la influencia de diferentes agentes sobre la expresión de la enzima NOS en *N. brasiliensis*, estos sugieren que el derivado valerolactama 1a promueve la expresión de la enzima NOS I, y que dicho efecto es revertido por L-NAME (figura 2.7 B).

Complementariamente, se utilizó el modelo *in vitro* de *N. brasiliensis* L4 para estudios de actividad antihelmíntica del producto 1a, en presencia del inhibidor de NOS, L-NAME. Estos ensayos mostraron que al asociar el inhibidor L-NAME con Arg o el producto 1a, solamente se revirtió la toxicidad provocada por Arg.

El conjunto de los resultados de estos estudios preliminares sugieren que el derivado valerolactama 1a podría regular positivamente la expresión de NOS I, pero no actuaría directamente sobre la enzima.

Si bien estos resultados preliminares alientan a continuar y profundizar este estudio, aspectos experimentales concretamente de diseño (ej. número y variedad de experimentos, cantidad de réplicas, etc.), resultan dependientes de la cantidad de material parasitario (L4 de *N. brasiliensis*) disponible, y por tanto incompatibles con este modelo de parásito (ver sección experimental anexo). Por otra parte, el abordaje de tales vías metabólicas presenta un importante nivel de complejidad, sumado a lo ya comentado de escasa, controvertida, y no muy reciente información al respecto en helmintos.

Esta es una razón más por las que recientemente se ha importado una cepa farmacológicamente susceptible de *H. contortus* (Kirby), e instalado la infección artificial en ovinos (ver capítulo 5).

Se pretende trabajar con el nemátodo de interés productivo *H. contortus*, en su estadio adulto, y trasladar la metodología y experiencia desarrollada con *N. brasiliensis* L4 (ver perspectivas).

Este modelo de infección con *H. contortus*, además de ser un nemátodo de importancia en animales de producción, permite disponer de cantidad de material parasitario de origen conocido para retomar los estudios antes mencionados e incorporar otros. Entre éstos, determinación de inducción enzimática y producción de óxido nítrico, algunos de cuyos resultados en *N. brasiliensis* se mencionaron previamente.

CONCLUSIONES

Se obtuvo una nueva serie de compuestos híbridos valerolactama- benzimidazol con actividad antihelmíntica *in vitro* muy superior a los benzimidazoles antihelmínticos comerciales ensayados (ABZ, FLU y FEB) y del mismo orden o mayor al de la serie valerolactama, siendo el compuesto 10 el de mayor actividad.

Así mismo se identifica un compuesto análogo al híbrido 8, derivado de ABZ, el cual presenta una sustitución por bromo en el anillo benzimidazol en posición 6, resultando de dicha sustitución una disminución importante de la actividad antihelmíntica. Esto daría un indicio de que el anillo benzimidazol pueda estar participando en la actividad de los compuestos híbridos.

El compuesto híbrido valerolactama-benzimidazólico 10 resultó activo a la dosis ensayada en el modelo de infección artificial de *N. brasiliensis* en rata, contrariamente a la serie valerolactama confirmando el acierto de la estrategia de hibridación.

BIBLIOGRAFÍA

Aguayo-Ortiz, R., Méndez-Lucio, O., Romo- Mancillas, A., Castillo, R., Yépez- Mulia, L., Medina- Franco, J., Hernández- Campos, A. Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel beta- tubulin binding site model. *J. Mol. Graph. Model.*, **2013**, *45*, 26- 37.

Bascal, Z., Cunningham, J., Holden-Dye, L., O'Shea, M., Walker, R. Characterization of a putative nitric oxide synthase in the neuromuscular system of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *Parasitol.*, **2001**, *122*, 219-231.

Bowman, J.W., Winterrowd, C.A., Friedman, A.R., Thompson, D.P., Klein, R.D., Davis, J.P., Maule, A.G., Blair, K.L., Geary, T.G. Nitric oxide mediates the inhibitory effects of SDPNFLRFamide, a nematode FMRFamide-related peptide, in *Ascaris suum*. *J. Neurophysiol.*, **1995**, *74*, 1880-1888.

Casero R., Marton L. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat. Rev. Drug Discover.*, **2007**, *6*, 373-390.

Colasanti, M., Venturini, G. Nitric oxide in invertebrates. *Mol. Neurobiol.*, **1998**, *17*, 157-174.

Domínguez, L., Saldaña, J., Chernin, J. Use of L4 larvae of *Nippostrongylus brasiliensis* for the in vivo screening of anthelmintic drugs. *Canad. J. Vet. Res.*, **2000**, 160- 163.

Fankhauser, R., Cozzie, L., Nare, B., Powell, K., Sluder, A., Hammerland, L. "Use of rodent models in the discovery of novel anthelmintics" en *Parasitic helminthes, targets, screens, drugs and vaccines* (ed. Caffrey, C.), Wiley-VCH Verlag GMBH, Weinheim, **2012**, pp 181-199

Gordon, S., Costa, L., Incerti, M., Manta, E., Saldaña, J., Domínguez, L., Mariezcurrena, R., Suescun, L. Synthesis and *in vitro* anthelmintic activity against *Nippostrongylus brasiliensis* of new 2-amino-4-hydroxy- δ -valerolactam derivatives. *Il Farmaco*, **1997**, *52*, 603-608.

Jenkins, D., Carrington, T. An in vitro screen for anthelmintics employing *Nippostrongylus brasiliensis* in a defined medium. *Vet. Parasitol.*, **1982**, *11*, 223- 230.

Jenkins, D., Rapson, E., Topley, P. The aggregation response of *Trichostrongylus colubriformis*: a basis for the rapid interpretation of in vitro anthelmintic screens. *Parasitology*, **1986**, *93*, 531- 537.

Kim, S.H., Chung, J.Y., Bae, Y.A., Cai, G.B., Na, B.K., Kim, N.J., Kwack, H.S., Kim, T.S., Kong, Y. Functional identification of a protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase of *Taenia solium* metacestode. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **2007**, *151*, 41-51.

Kohn, A., Lea, J., Moroz, L., Greenberg, R. *Schistosoma mansoni*: use of a fluorescent indicator to detect nitric oxide and related species in living parasites. *Exp. Parasitol.*, **2006**, *113*, 130-133.

Liew, F.J., Wei, X.-Q., Proudfool, L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*, **1997**, *352*, 1311-1315.

Long, X., Bahgat, M., Chlichlia, K., Ruppel, A., Li, Y. Detection of inducible nitric oxide synthase in *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni*. *J. Helminthol.*, **2004**, *78*, 47-50.

Masetti, M., Locci, T., Cecchetti A., Lucchesi, P., Magi, M., Malvaldi G., Bruschi, F. Nitric oxide synthase immunoreactivity in the nematode *Trichinella britovi*. Evidence for nitric oxide production by the parasite. *Int. J. Parasitol.*, **2004**, *34*, 715-721.

McCracken, R., Lipkowitz, K. Experimental and theoretical studies of albendazole, oxibendazole and tioxidazole. *J. Parasitol.*, **1990 a**, *76*, 2, 180-185.

McCracken, R., Lipkowitz, K. Structure- activity relationship of benzothiazole and benzimidazole anthelmintics: a molecular modeling approach to in vivo drug efficacy. *J. Parasitol.*, **1990 b**, *76*, 6, 853-864

Mendina, P. Optimización de nuevos agentes antihelmínticos para su eventual uso en quimioterapia. Tesis Doctoral, bajo la tutoría de los Dres. Laura Domínguez y Eduardo Manta, Facultad de Química, UdelaR, **2009**

Miles, M.A, Wink, D.A, Cook, J.C, Grisham, M.B. Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy. *Methods Enzymol.*, **1996**, *268*, 105-120.

Millar, C., Waghorn, T., Leathwick, D., Candy, P., Oliver, A., Watson, T. The production cost of anthelmintic resistance in lambs. *Vet. Parasitol*, **2012**, *186*, 376- 381.

Müller, S., Coombs, G., Walter, R. Targeting polyamines of parasitic protozoa in chemotherapy. *Trends. Parasitol.*, **2001**, *17*, 242-249.

Pfarr, K.M., Qazi, S., Fuhrman, J. A. Nitric Oxide Synthase in Filariae: Demonstration of Nitric Oxide Production by Embryos in *Brugia malayi* and *Acanthocheilonema viteae*. *Exp. Parasitol.*, **2001**, *97*, 205-214.

Prakasham, A., Saxena, A., Luqman, S., Chanda, D., Kaur, T., Gupta, A., Yadav, D., Chanotiya, C., Shanker, K., Khan, F., Negi, A. Synthesis and anticancer activity of 2-benzylidene indanones through inhibiting tubulin polymerization. *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, *20*, 3049-3057.

Rohwer, A., Lutz, J., Chassaing, C., Uphoff, M., Hecheroth, A., Selzer, P. "Identification and profiling of nematicidal compounds in veterinary parasitology", en *Parasitic helminthes, targets, screens, drugs and vaccines* (ed. Caffrey, C.), Wiley-VCH Verlag GMBH, Weinheim, **2012**, pp 135-157.

Saldaña, J. "Optimización y desarrollo de modelos biológicos para el diseño racional de nuevas sustancias con actividad antihelmíntica". Tesis de Maestría, bajo la tutoría de la Dra. Laura Domínguez, Facultad de Química, UdelaR, **1997**.

Sharma, V., Visen, P., Kativar, J., Wittich, R., Walter, R., Ghatak, S. Polyamine metabolism in *Ancylostoma ceylanicum* and *Nippostrongylus brasiliensis*. *Int. J. Parasitol.*, **1989**, *19*, 191-198.

Shelanski, M.L., Gaskin, F., Cantor, C.R. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1973**, *70*, 765-768.

Stuehr, D. Mammalian nitric oxide synthases. *BBA- Bioenergetics*, **1999**, *1411*, 217-230.

Terenina, N.B., Onufriev, M.V., Gulyaeva, N.V., Lindholm, A.M., Gustafsson, M.K.S. A radiometric analysis of nitric oxide synthase activity in *Hymenolepis diminuta*. *Parasitol.*, **2000**, *120*, 91-95.

Towbin, H., Staehelin, J., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1979**, *76*, 4350-4354.

Umair, S., Patchett, M.L., Bland, R.J., Simpson, H.V. Arginine metabolism in the sheep abomasal nematode parasites *Haemonchus contortus* and *Teladorsagia circumcincta*. *Exp. Parasitol.*, **2010**, *127*, 506-514.

Vincendeau, P., Gobert, A., Daulouede, S., Moynet, D., Mossalayi, M. Arginases in parasitic diseases. *Trends Parasitol.*, **2003**, *19*, 10-12.

Woods, D., Williams, T. The challenges of developing novel antiparasitic drugs" *Invert. Neurosci.*, **2007**, *7*, 245- 250.

Zou, C., Vlastos, A., Yang, L., Wang, J., Nishioka, K., Follen, M. Effects of Difluoromethylornithine on grow inhibition and apoptosis in human cervical epithelial and cancerous cell lines. *Gynecol. Oncol.*, **2002**, *85*, 266- 273.

ANEXO CAPÍTULO 3

Teoremas de Kohn y Hohenberg

Existen dos teoremas fundamentales matemáticos desarrollados por Kohn y Hohenberg, en conjunto con un conjunto de ecuaciones desarrolladas por Kohn y Sham, en los que se basa toda la teoría DFT.

Primer teorema de Hohenberg y Kohn:

La función de onda correspondiente al estado basal obtenida mediante la ecuación de Schrödinger es un funcional único de la densidad electrónica.

Esto significa que existe una correspondencia biunívoca entre la función de onda del estado basal y la densidad electrónica del estado basal. Por lo tanto la energía del estado basal, E_0 , puede expresarse como $E_0[\rho_0]$, donde ρ_0 es la densidad electrónica del estado fundamental.

Aunque este primer teorema dice que existe un funcional de la densidad electrónica que puede utilizarse para resolver la ecuación de Schrödinger, este teorema no dice nada de cómo es este funcional.

Segundo teorema de Hohenberg y Kohn:

La densidad electrónica que minimiza la energía del funcional total es la densidad electrónica real correspondiente a la solución completa de de la ecuación de Schrödinger.

Por lo anterior, si la forma del funcional fuera conocida, se podría variar la densidad electrónica hasta minimizar la energía del funcional. Este *principio variacional* es utilizado en la práctica pero con formas aproximadas del funcional.

Kohn y Sham propusieron una partición del funcional total de densidad electrónica de la forma siguiente:

$$E[\rho] = E_T[\rho] + E_V[\rho] + E_J[\rho] + E_{xc}[\rho]$$

donde se contempla la energía cinética de los electrones ($E_T[\rho]$), las interacciones de Coulomb entre los electrones y núcleos ($E_V[\rho]$), interacciones de Coulomb entre pares de electrones ($E_J[\rho]$). Por otro lado, $E_{xc}[\rho]$, se denomina *funcional*

de correlación e intercambio e incluye todo los efectos mecano cuánticos no incluidos en los términos anteriores, donde se incluye el movimiento de los electrones.

Este último término de intercambio y correlación no es definido en la ecuación de Kohn- Sham, por lo que es necesario introducir aproximaciones de modo de obtener una expresión para dicho funcional.

El modo más sencillo consiste en considerar que los efectos de intercambio y correlación son locales y sólo dependen del valor de la densidad electrónica en cada punto, lo que da lugar a la aproximación LDA (*Local Density Approximation*), donde el término de intercambio y correlación se expresa como $E_{xc}[\rho(r)] = E_x[\rho(r)] + E_c[\rho(r)]$.

LDA es una buena aproximación para sistemas en los que la densidad varía poco en el espacio, y permite obtener densidades de carga aceptables, excepto en las regiones cercanas al núcleo.

Sistemas reales como átomos, moléculas y sólidos distan de ser uniformes u homogéneos, por lo que muchas veces el modelo LDA no es capaz de proporcionar por sí mismo la exactitud requerida para describir aplicaciones químicas. Por ello es razonable introducir correcciones que consideren explícitamente la variación espacial de la densidad. Una función adecuada resulta ser el gradiente de la densidad electrónica, ya que si el sistema fuera realmente homogéneo el gradiente sería nulo en todos los puntos. Esta formulación conduce a lo que se conoce como aproximación GGA (*Generalized Gradient Approximation*), en la cual los efectos de intercambio y correlación se expresan en función de la densidad electrónica y su gradiente, $E_{xc}[\rho(r), \nabla\rho(r)]$, por lo que es necesario conocer la densidad y su variación en el espacio. Esta aproximación proporciona mejores geometrías, frecuencias y densidades de carga respecto a las dadas por LDA.

CAPÍTULO 3

Optimización de la geometría molecular y determinación de descriptores fisicoquímicos y electrónicos

Introducción	pág. 127
Metodología	pág. 133
Resultados	pág. 134
Discusión	pág. 140
Conclusiones	pág. 144
Bibliografía	pág. 145
Anexo Capítulo 3	pág. 149

INTRODUCCIÓN

El diseño de un nuevo fármaco es un proceso iterativo, el cual comienza por un compuesto que demuestra un perfil de actividad biológica interesante y termina cuando tanto su perfil de actividad como su síntesis química han sido optimizados. Este proceso es iniciado cuando se idea una hipótesis la cual relaciona las características químicas de la molécula (o una serie de ellas) con la respuesta biológica. Cuando no se conoce el mecanismo de acción de los compuestos bioactivos, la hipótesis generalmente es refinada examinando las características estructurales de los compuestos que resultan activos y de aquellos inactivos.

Una forma de realizar esta optimización y guiar la síntesis de nuevos derivados es a través de una Relación estructura-actividad cuantitativa (*Quantitative Structure Activity Relationship, QSAR*), donde a partir de una ecuación matemática se relaciona la respuesta biológica con descriptores fisicoquímicos, electrónicos y estructurales. Estos descriptores pueden ser determinados de forma empírica o por métodos computacionales. Las metodologías de QSAR tienen dentro de sus objetivos el poder predecir la actividad biológica de compuestos estructuralmente relacionados, estudiar mecanismos de acción, estableciendo qué propiedades físicas y químicas comunes a compuestos estructuralmente diferentes son responsables de un efecto biológico idéntico a través de un mecanismo común o diferente (Avendaño y Claramunt, 2001).

Siguiendo estos conceptos, y sin llegar a desarrollar un análisis QSAR propiamente dicho, se determinaron descriptores fisicoquímicos (lipofilia, volumen molecular) y electrónicos (momento dipolar y energías de HOMO-LUMO) para los compuestos estudiados (ver capítulo 1) buscando posibles niveles de correlación. En particular, se seleccionó la capacidad de difusión intraparasitaria *ex vivo*, como parámetro biológico para relacionar con los descriptores, ya que los compuestos híbridos se sintetizaron con el fin de optimizar la misma respecto a la serie valerolactama de origen.

La capacidad de ingresar al medio intraparasitario de los compuestos, está determinada por las propiedades fisicoquímicas de los mismos (lipofilia, volumen molecular, pKa, etc.), y las características de la superficie externa del helminto. Estos conceptos serán profundizados en los capítulo donde se describen los ensayos de difusión *ex vivo* (ver capítulos 4 y 5).

En este sentido, para el céstodo *Moniezia benedeni* (Mottier *et al.*, 2003), se encontró correlación entre la capacidad de difusión para los benzimidazoles

antihelmínticos y el descriptor fisicoquímico lipofilia ($\log K$). Esta observación resultaba esperable considerando las características del tegumento del céstodo, el cual presenta una fuerte componente lipídica (ver capítulo 4). Sin embargo, en el caso de los nemátodos como *Brugia pahangi* y *Dipetalonema viteae*, no fue posible usar la lipofilia como único parámetro para describir la absorción a través de la cutícula para una serie diversa de compuestos (Court *et al.*, 1988). Efectivamente, las propiedades biofísicas de la cutícula del nemátodo *A. suum* fueron estudiadas con anterioridad (Ho *et al.*, 1990), proponiéndose la existencia de poros acuosos en la matriz de colágeno, los cuales son el primer tamiz discriminatorio, pudiendo pasar las moléculas en función de su tamaño. Además, y sumado a dicha restricción, la carga negativa de la matriz colagénica afectará el transporte de las moléculas en función de su carga, existiendo también, zonas lipófilas, conocidas como poros lipófilos.

Por lo expuesto, además de determinarse la lipofilia, se decidió determinar los descriptores: volumen molecular y momento dipolar, para los todos los compuestos, ya que tales parámetros pueden influir en la capacidad de permeación a través de los poros acuosos y lipófilos.

Como ya se mencionó, los descriptores fisicoquímicos o electrónicos pueden ser determinados de forma empírica o computacional. En caso de que sean obtenidos de forma computacional, para aquellos descriptores como momento dipolar y volumen molecular que dependen directamente de la geometría de la molécula, se deberá por tanto optimizar la geometría y determinar aquella de menor energía.

A partir de una geometría molecular inicial se determina la estructura de menor energía, o sea la más estable desde el punto de vista energético. Dicha energía puede obtenerse a través de cálculos de mecánica molecular o de la función de onda (método cuántico).

El método de *mecánica molecular* es un formalismo relativamente sencillo para obtener la energía relativa de una determinada geometría molecular. Dicho formalismo consiste en calcular la energía potencial de la molécula (V), suponiendo que los núcleos están sometidos a un campo de fuerza (*force field*), que se compone de la suma de una serie de términos que modelizan las tensiones de enlaces (V_{enlaces}), de sus ángulos ($V_{\text{ángulos}}$), sus torsiones (V_{diedros}), las interacciones de van der Waals (V_{vdW}), las electrostáticas (V_{electr}) y las de los puentes de hidrógeno (V_{H}):

$$V = V_{\text{enlaces}} + V_{\text{ángulos}} + V_{\text{diedros}} + V_{\text{vdW}} + V_{\text{electr}} + V_{\text{H}}$$

La perfección del formalismo de mecánica molecular es limitada, y los resultados obtenidos de su aplicación deben ser usados con prudencia, especialmente cuando la estructura molecular presenta sistemas conjugados de electrones π (Avendaño y Claramunt, 2001). Aparte de su limitada exactitud, los métodos de mecánica molecular presentan el inconveniente del elevadísimo número de constantes o parámetros que se deben conocer para proceder al cálculo de la energía de una molécula. En contraposición, la principal ventaja que ofrecen los métodos de mecánica molecular es la rapidez de los cálculos.

Una forma más compleja, pero también mucho más exacta, para encontrar la energía asociada a una determinada geometría de una molécula se obtiene a partir de la resolución de la ecuación de Schrödinger, es decir, a través de los postulados de la *mecánica cuántica*. Mediante dicha resolución se obtiene no solo la energía del sistema, sino también una descripción de su estructura electrónica, ya que la función de onda nos permite obtener una descripción de la densidad electrónica en cada uno de los puntos del entorno molecular. La resolución de la ecuación de Schrödinger tiene una gran complejidad y de hecho, sólo se ha podido resolver exactamente para el átomo de hidrógeno, es decir, para un sistema compuesto por un protón y un electrón. En el resto de los sistemas moleculares se debe introducir un conjunto de aproximaciones que condicionan la calidad de los resultados obtenidos. Para moléculas poliatómicas y polieletrónicas, las aproximaciones que se acostumbran introducir son las siguientes:

- aproximación de Born- Oppenheimer, como cada protón o neutrón en un núcleo tiene una masa 1800 veces mayor que la de un electrón, para calcular la energía de una molécula, puede resolverse la ecuación que describe el movimiento de los electrones considerando a los núcleos en posiciones fijas. Entonces, se puede calcular la configuración de mínima energía (estado basal) para un conjunto dado de electrones que se mueven en un campo asociado a un conjunto dado de núcleos.
- La aproximación de orbitales atómicos y moleculares, según la cual la función de onda de cualquier sistema polieletrónico se aproxima mediante un producto de funciones de onda monoeléctricas:

$$\phi = \chi_1 \cdot \chi_2 \cdot \chi_3 \cdot \dots \cdot \chi_n$$

La parte espacial de cada orbital atómico se representa mediante una función matemática de Slater (Slater Type Orbitals, STO), que a su vez se aproxima mediante una combinación lineal de funciones de Gauss (Gaussian Type Orbitals, GTO).

En cuanto a los orbitales moleculares, tienen una expresión análoga del tipo:

$$\psi = \varphi_1 \cdot \varphi_2 \cdot \varphi_3 \cdot \dots \cdot \varphi_n$$

- Otra aproximación que se acostumbra introducir es la LCAO (Linear Combination of Atomic Orbitals), según la cual los orbitales moleculares monoeléctricos φ_i se obtienen mediante una combinación lineal de los orbitales atómicos de los átomos que componen la molécula:

$$\varphi_i = \sum_j^{\text{OA}} c_{ij} \cdot \chi_j$$

La calidad de la función de onda molecular resultante dependerá, entre otros factores, de la calidad y cantidad de conjuntos de orbitales atómicos, que recibe el nombre de *base*. Bajo estas aproximaciones, calcular una función de onda consiste en determinar el conjunto de coeficientes c_{ij} que hace mínima la energía de la molécula. Dado que cada electrón se encuentra bajo el campo eléctrico del resto, cada orbital molecular monoeléctrico φ_i dependerá de los demás, y la búsqueda del mejor conjunto de coeficientes deberá ser iterativa. Para lograr esta iteración, estos métodos adoptan un procedimiento denominado campo autoconsistente (*selfconsistent field*, *SCF*), en el cual se refina sucesivamente una suposición inicial acerca de la composición de las combinaciones lineales de los orbitales atómicos hasta que la solución permanece sin cambios en un ciclo de cálculo.

Según el tratamiento matemático aplicado al resolver la ecuación de Schrödinger, los métodos basados en la mecánica cuántica pueden ser de naturaleza semiempírica, así como de *Primeros Principios* (*ab initio*).

Los métodos *ab initio* son aquellos métodos en los que se calcula la estructura electrónica directamente a partir de principios físicos fundamentales, sin la inclusión de datos experimentales, para lo cual sólo se usan los números atómicos de los átomos presentes y su arreglo general en el espacio. Un enfoque de esta naturaleza es intrínsecamente más confiable que un procedimiento semiempírico, pero requiere grandes grupos de bases de orbitales atómicos y resulta mucho más demandante en lo que respecta a recursos computacionales.

Dentro de los métodos *ab initio*, el formalismo de *Hartree-Fock* es un método cuya calidad de los resultados depende básicamente de la dimensión de la base utilizada para representar cada uno de los átomos de la molécula, teniendo en cuenta que el tiempo de cálculo se disparará al aumentar el número de funciones de base que se utilizan para describir cada átomo.

En la actualidad, dentro de los métodos *ab initio*, una alternativa al formalismo de *Hartree-Fock*, es el uso de la teoría del funcional de la densidad (*Density Functional Theory*, *DFT*), en la cual la *energía total de una molécula se expresa en términos de la*

densidad electrónica total en lugar de la función de onda por sí misma (Höhenberg y Kohn, 1964). La ecuación de Schrödinger se convierte entonces en un conjunto de ecuaciones llamado ecuaciones de Kohn- Sham (Kohn y Sham, 1965), que se resuelve de manera iterativa a partir de una estimación inicial hasta que se vuelva autoconsistente. Existen dos teoremas fundamentales matemáticos desarrollados por Kohn y Hohenberg, junto a ecuaciones desarrolladas por Kohn y Sham, en los que se basa toda la teoría DFT. En el anexo a este capítulo, se describen dichos teoremas.

La enorme ventaja de los métodos DFT es que pueden aplicarse a sistemas de tamaño intermedio ya que requieren menores tiempos de cómputo que los procedimientos *Hartree-Fock* más rigurosos, y en algunos casos (como por ejemplo en los complejos de los metales de transición) el acuerdo con los valores experimentales es mejor que el obtenido con otros métodos. En las últimas tres décadas la teoría DFT ha sido usada de manera extensa para estudiar la reactividad química de las moléculas (Arjunan *et al.*, 2014; Karnan *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2013).

En este trabajo, la herramienta de DFT se utilizó para optimizar la geometría de los compuestos sintetizados, para posteriormente calcular los descriptores volumen molecular, momento dipolar y energías de HOMO-LUMO, las que se describen a continuación.

De acuerdo con la teoría de orbitales moleculares de frontera, la energía del orbital molecular más alto ocupado (highest occupied molecular orbital, HOMO) y la energía del orbital molecular más bajo libre (lowest unoccupied molecular orbital, LUMO) son índices importantes en química cuántica, para poder predecir la reactividad de una molécula o especie química (Pearson, 1985).

La energía de HOMO (equivalente al potencial de ionización) es una medida de la nucleofilicidad de una molécula, por lo tanto, moléculas con energía de HOMO elevada serán más propensas a reaccionar con compuestos electrófilos (capacidad donora de electrones). En el caso de la energía de LUMO (equivalente a afinidad electrónica), es una medida de la electrofilicidad, por lo tanto, moléculas con baja energía de LUMO son más ávidas a reaccionar con nucleófilos (aceptando electrones). La energía de GAP, es la diferencia entre la energía de HOMO y LUMO, y es un indicador de la estabilidad de una molécula. Una molécula con un sistema electrónico con valores de GAP altos representan una menor reactividad de la molécula. Por ende, en moléculas con valores de GAP pequeños, es más fácil que los electrones del HOMO sean excitados, llevando a que la molécula sea más reactiva (Pearson, 1985).

En la teoría de orbitales de frontera, las áreas ricas en electrones de la molécula serán más susceptibles al ataque electrofílico o a sufrir reacciones de oxidación, y por lo tanto, esta zona de ataque electrofílico estará situada en la posición de mayor densidad electrónica en el HOMO. Por otro lado, el ataque nucleofílico o las reacciones de reducción, se esperarán donde el LUMO tiene la mayor densidad electrónica (Rokhina y Suri, 2012).

Como se expresó anteriormente, los descriptores fisicoquímicos o electrónicos pueden ser determinados de forma empírica o computacional. Los descriptores volumen, momento dipolar, y energías de HOMO-LUMO, se determinaron computacionalmente, mientras que el descriptor de lipofilia fue determinado de forma experimental.

La evaluación experimental de la lipofilia se realiza a través de la determinación del factor de capacidad φ_0 usándolo como parámetro cuantitativo (Valkö *et al*, 1993). El factor φ_0 es una medida de la lipofilia de los compuestos en sistemas HPLC de fase reversa. El parámetro φ_0 se define como la concentración de fase orgánica (acetonitrilo o metanol) en la fase móvil necesaria para obtener valores de $\log k'$ iguales a cero (k' es la diferencia entre el tiempo de retención de nuestro analito y el tiempo de retención del frente de solvente). El valor de φ_0 va desde 0 a 100%, y cuanto mayor sea éste, más lipófilo será el analito. El índice φ_0 se puede expresar como $-\log k'_w / S$, siendo $\log k'_w$ la ordenada en el origen de la curva $\log k$ vs % fase orgánica, y S la pendiente de dicha curva (Figura 3.1).

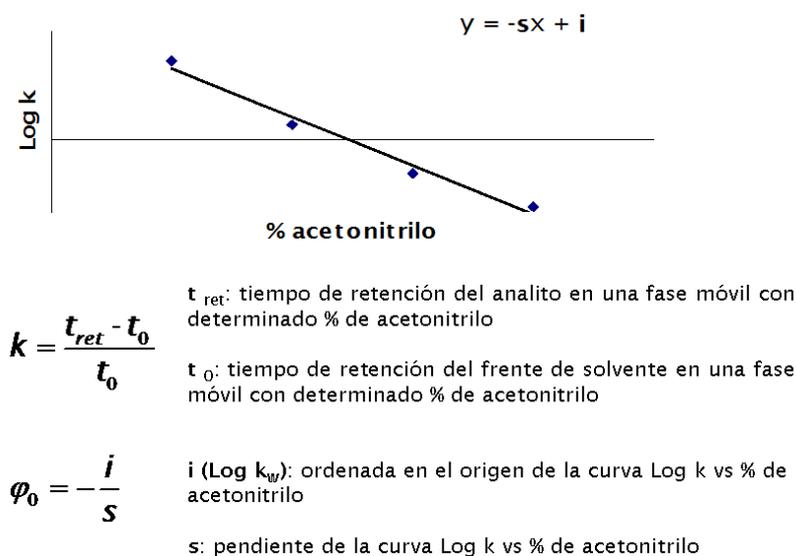


Figura 3.1. Se muestra ejemplo de curva $\log k$ vs % de acetonitrilo que se obtendría para un determinado compuesto, así como la determinación del índice de hidrofobicidad φ_0 a partir de dicha curva.

METODOLOGÍA

Optimización de la geometría

La geometría molecular de los compuestos fue optimizada en fase gaseosa a través de cálculos *ab initio*, usando el código Gaussian09 (Frisch *et al.*, 2009), utilizando el funcional de correlación e intercambio B3LYP (Lee *et al.*, 1988; Parr y Yang, 1995; Becke, 1993) y la base 6-311++G(3df,2pd).

Luego de la optimización de la geometría, se calculan los ángulos diedros formados entre el sustituyente sobre el carbono 5 y el anillo benzimidazol (ángulo diedro A) y el formado por el anillo benzimidazol y el enlace amida o carbamato (ángulo diedro B), con el fin de estudios comparativos entre los compuestos benzimidazoles de origen y los compuestos híbridos valerolactama- benzimidazol.

Determinación de los descriptores fisicoquímicos (volumen, lipofilia) y electrónicos (momento dipolar, energías de HOMO- LUMO)

Una vez realizada la optimización de la geometría, se determinaron de forma computacional los descriptores volumen, momento dipolar y energía de HOMO-LUMO, obteniéndose a su vez las superficies para las funciones de onda de HOMO y LUMO para tales compuestos.

Por otra parte, la lipofilia se determinó de forma experimental, mediante el factor de capacidad φ_0 según se describe a continuación. Los productos a estudiar, se ensayan a una concentración de 200 μM , disueltos en metanol. La determinación de φ_0 se realiza por HPLC utilizando una columna fase reversa marca Agilent Zorbax C18 de dimensiones 150x46 mm y tamaño de partícula 5 μm . Las condiciones operativas son las siguientes: λ de medida es 290 nm y el flujo es de 1 mL/min. La fase móvil se va variando, disminuyendo la fase acuosa (agua) y aumentando la orgánica (acetonitrilo), y en cada composición de fase móvil se analizan los productos. Finalmente se grafica el porcentaje de acetonitrilo vs Log k, y se calcula φ_0 a partir de la pendiente y la ordenada en el origen de dicha curva, como fuera ya descrito.

RESULTADOS

Los resultados de la optimización de la geometría mostraron que las nuevas moléculas híbridas (ver capítulo 1) presentan una conformación espacial similar a la de los benzimidazoles antihelmínticos de partida (figuras 3.2 y 3.3).

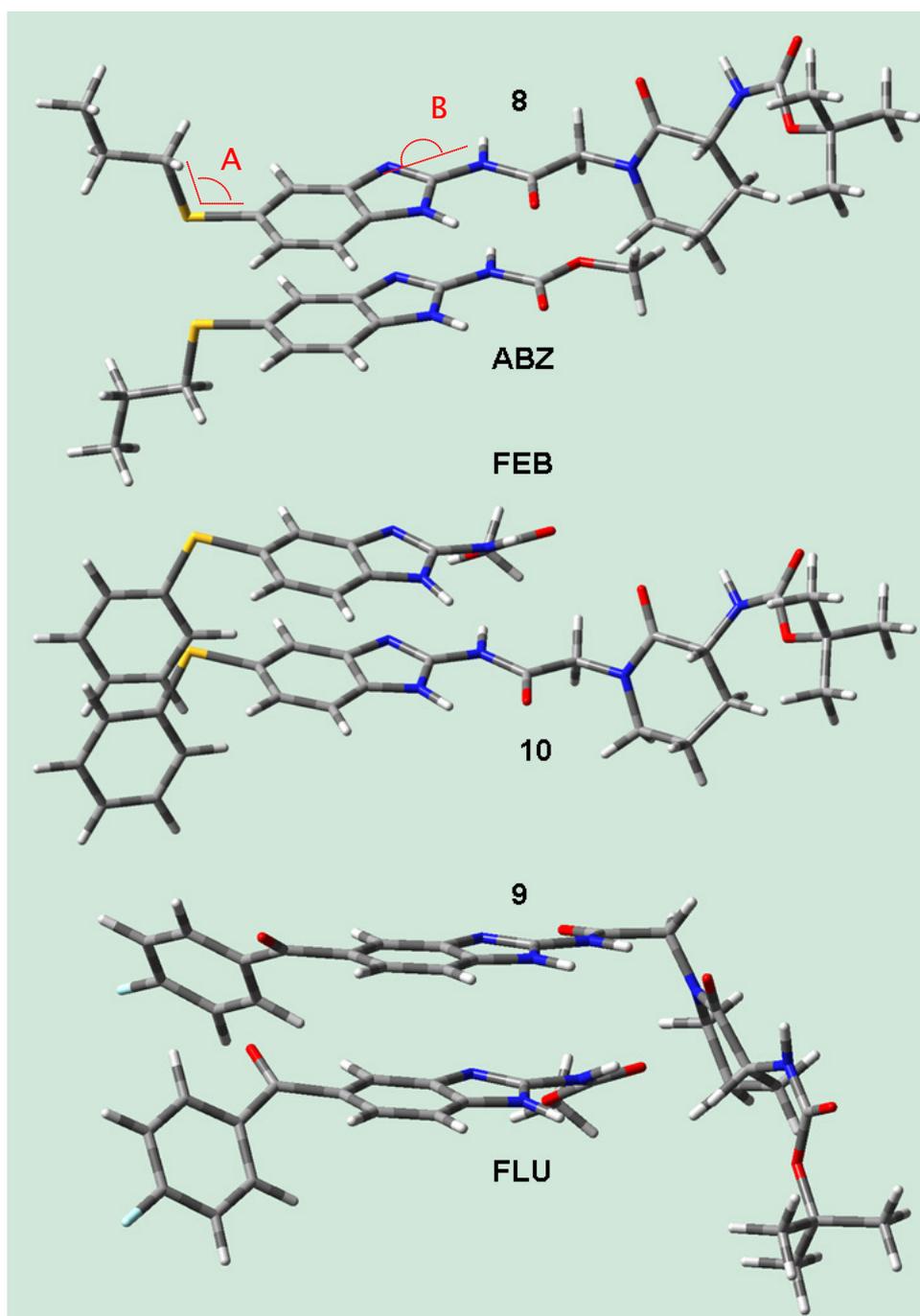


Figura 3.2. Conformación espacial para los compuestos híbridos sintetizados y sus precursores benzimidazólicos. Geometría optimizada en fase gaseosa, calculado con DFT a un nivel de teoría B3LYP/6-311++G(3df,2pd). Ángulo A: ángulo diedro formado por el sustituyente sobre el C5 y el anillo benzimidazol; Ángulo B: ángulo diedro formado por el anillo benzimidazol y el enlace amida o carbamato.

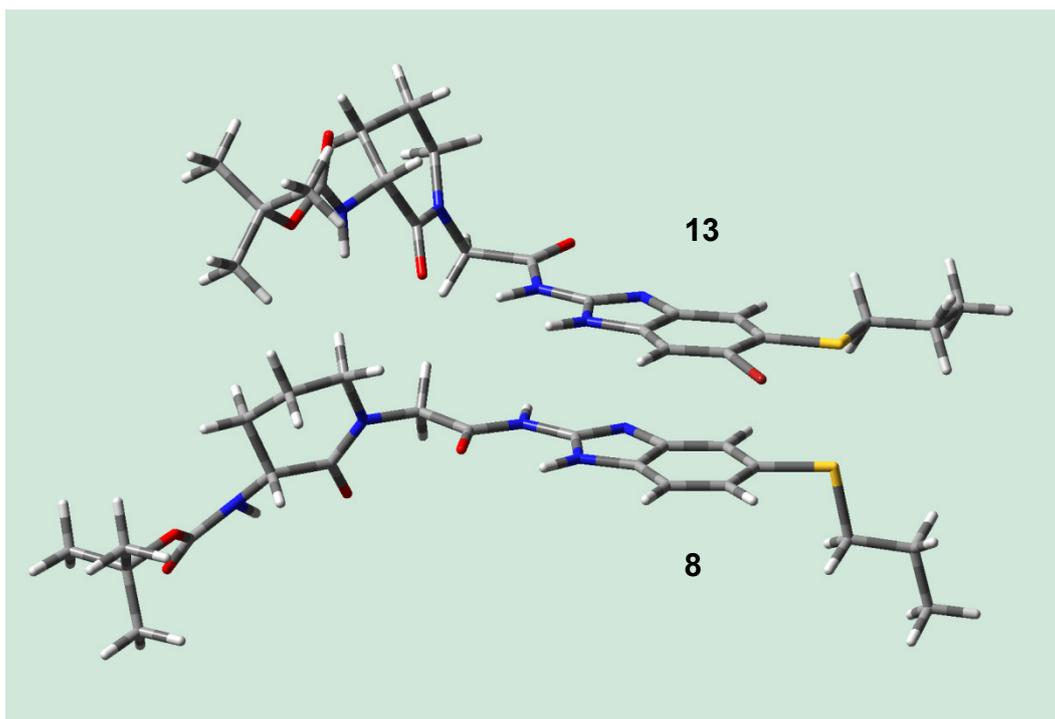


Figura 3.3. Conformación espacial para los compuestos híbridos 8 y su análogo 13, el cual se encuentra bromado en posición 6 del anillo benzimidazol. Geometría optimizada en fase gaseosa, calculado con DFT a un nivel de teoría B3LYP/6-311++G(3df,2pd).

En efecto, el ángulo diedro entre el anillo benzimidazol y el enlace amida o carbamato (para el compuesto híbrido y el benzimidazol antihelmíntico comercial, respectivamente, ángulo diedro B) es de 180° aproximadamente en el caso del ABZ y los híbridos 8, 10 y 13, demostrando así su coplanaridad. Por otro lado, para FLU, FEB y el híbrido 9, dicho ángulo se encuentra en el rango de 8° a 32° , mostrando una leve torsión respecto al plano del anillo benzimidazol (tabla 3.1). En lo que respecta al ángulo diedro formado por el sustituyente en el carbono 5 y el anillo benzimidazólico (ángulo diedro A), para el ABZ, FEB y sus respectivos compuestos híbridos, 8 y 10, éste sustituyente se encuentra ortogonal al plano del anillo benzimidazol, en un rango que va de los 93° a 115° (tabla 3.1). Para el caso del derivado bromado en posición 6 del anillo benzimidazol, el compuesto 13, este ángulo A es cercano a 180° , a diferencia de lo que ocurre con ABZ o su análogo 8 donde este ángulo es cercano a 90° (figura 3.3).

Para el FLU y su híbrido 9, el sustituyente en C-5, no presenta posicionamiento ortogonal respecto al plano del anillo benzimidazol, sino que resultaron ser de 153° y 28° , para FLU y 9, respectivamente.

Tabla 3.1. Descriptores fisicoquímicos (lipofilia y volumen) y descriptores electrónicos (momento dipolar, energías de HOMO-LUMO), determinados para derivados valerolactama, benzimidazoles comerciales antihelmínticos y los compuestos híbridos resultantes de la unión de ambos.

Prod.	Factor de Lipofilia ϕ_0 ^(a)	Momento dipolar (Debye) ^(b)	Volumen molecular (Å^3) ^(c)	Ángulos diedros ($^\circ$)		HOMO (eV)	LUMO (eV)	GAP (eV)
				A	B			
2	30.8	5.7594	682.75	---	---	-6.88	-0.66	6.22
3	51.2	5.5990	924.30	---	---	-6.87	-0.57	6.30
4	---	5.0982	808.55	---	---	-6.95	-0.65	6.30
ABZ SX	27.3	6.6059	809.62	103.03	179.81	---	---	---
ABZ	58.0	4.7831	794.11	92.53	179.85	-6.00	-0.90	5.10
8	58.8	4.9439	1329.15	93.21	178.97	-6.08	-1.33	4.75
FLU	50.6	5.0531	851.32	152.53	24.06	-6.53	-1.95	4.58
9	56.2	8.8355	1381.50	27.5	8.27	-5.88	-1.40	4.47
FEB	62.5	3.7625	850.28	103.82	32.08	-5.83	-1.18	4.65
10	67.1	6.9678	1383.94	114.79	179.32	-5.52	-1.04	4.48
13	---	6.6299	1382.82	-179.79	-176.61	---	---	---

^(a) Determinado experimentalmente por HPLC de fase reversa, de acuerdo con Valko *et al.*, 1993

^{(b) (c)} El Momento Dipolar y el volumen molecular se calculan, luego de la optimización de la geometría, usando Gaussian09 a un nivel de teoría B3LYP/6-311++G(3df,2pd)

Ángulo diedro A: ángulo diedro formado por el sustituyente sobre el C5 y el anillo benzimidazol
 Ángulo diedro B: ángulo diedro formado por el anillo benzimidazol y el enlace amida o carbamato.

En la tabla 3.1 se informan los resultados obtenidos de lipofilia (determinada experimentalmente y expresada a través del factor de lipofilia ϕ_0), así como los resultados para los descriptores calculados *ab initio*, momento dipolar, volumen molecular, energías de HOMO y LUMO y energía GAP_{HOMO-LUMO}.

Las iso-superficies de HOMO y LUMO obtenidas se muestran en las figuras 3.4 a 3.6. El HOMO se encuentra localizado sobre el átomo de azufre de los grupos funcionales tiopropilo y tiofenilo del ABZ y 8 o FEB y 10, respectivamente. En el caso de FLU y 9, el HOMO se localiza sobre el anillo benzimidazol.

Por otro lado, el LUMO está ubicado sobre el anillo benzimidazol para ABZ, FEB, 8 y 10, y además para estos híbridos también hay zonas de LUMO sobre el enlace amida que une el anillo benzimidazol y el anillo valerolactama. Sin embargo, para el FLU y el híbrido 9, el LUMO está localizado sobre el grupo carbonilo unido al C-5 del anillo benzimidazol.

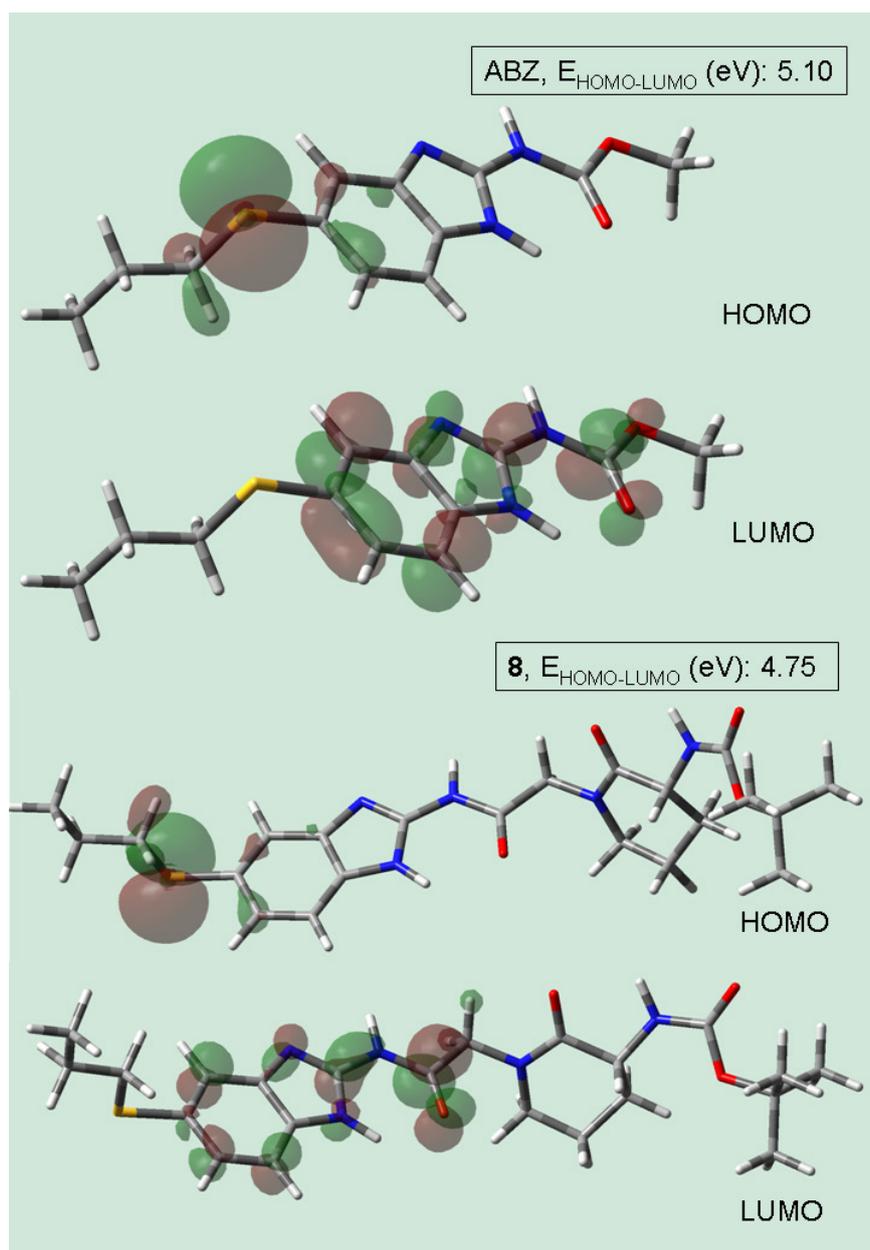


Figura 3.4. Superficies de HOMO y LUMO para el ABZ y su derivado 8. Las mismas se calculan usando un valor de corte de 0.05.

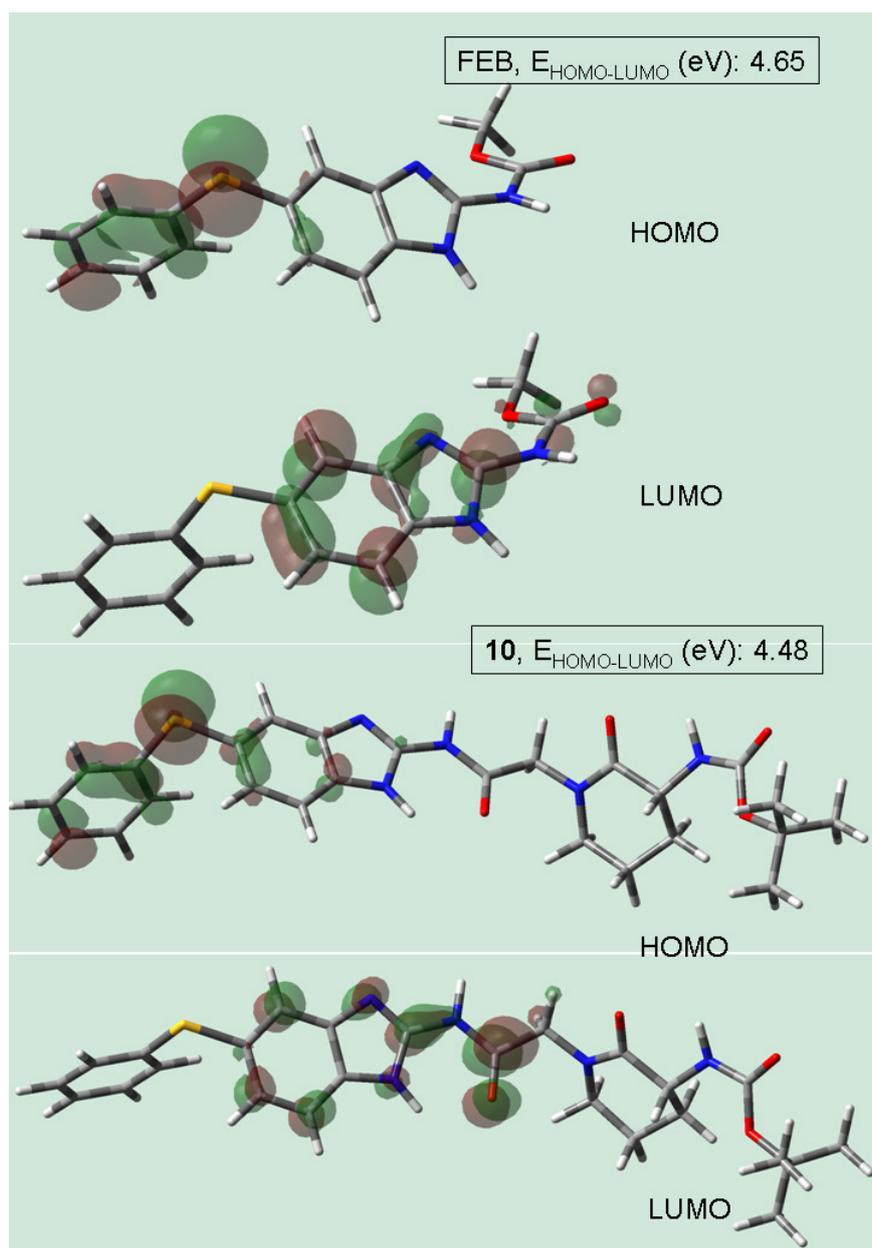


Figura 3.5. Superficies de HOMO y LUMO para el FEB y su derivado 10. Las mismas se calculan usando un valor de corte de 0.05.

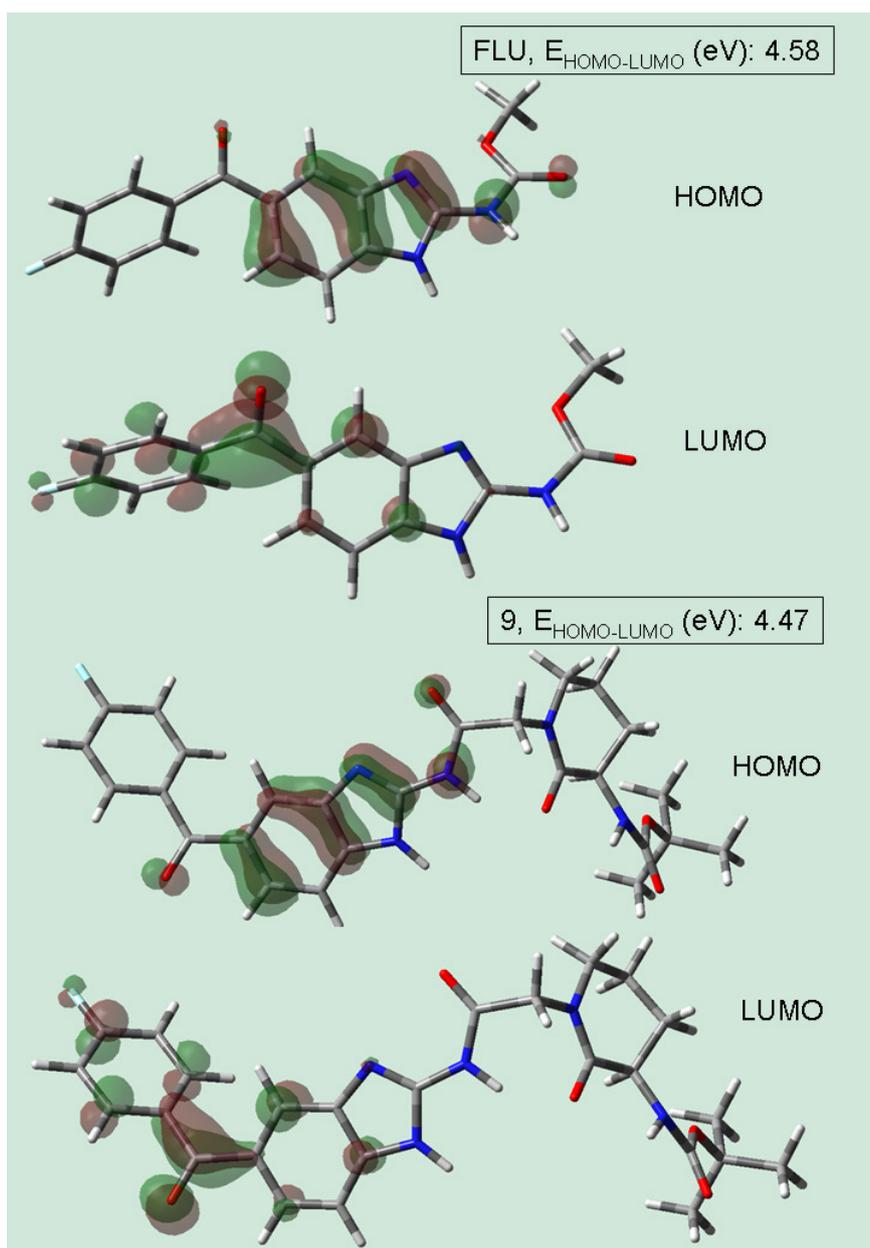


Figura 3.6. Superficies de HOMO y LUMO para el FLU y su derivado 9. Las mismas se calculan usando un valor de corte de 0.05.

DISCUSIÓN

Analizando la conformación espacial obtenida para los compuestos híbridos y los benzimidazoles antihelmínticos, el ángulo diedro formado por el sustituyente en el carbono 5 y el anillo benzimidazólico (ángulo diedro A), para el ABZ, FEB y sus respectivos compuestos híbridos, 8 y 10, se encuentra que dicho sustituyente en posición C-5 está ortogonal al plano del anillo benzimidazol, en un rango que va de los 93° a 115° (tabla 3.1). Esto se encuentra en acuerdo con la hibridación sp^3 para el enlace tioéter. En el caso del compuesto 13, análogo del híbrido 8 pero bromado en posición 6 del anillo benzimidazol, el ángulo diedro A es próximo a 180°, por lo que el sustituyente en C-5 permanece en el plano del anillo benzimidazol.

En este sentido, los autores McCracken y Lipkowitz (1990 a y b), informan como resultado de sus estudios de relación estructura-actividad de benzotiazoles y benzimidazoles antihelmínticos, una mayor actividad para aquellos benzimidazoles que presentaron el sustituyente en posición 5 ortogonal al anillo benzimidazol, con respecto a aquellos en los que dicho sustituyente permanece en el plano. En acuerdo con ello, se podría explicar la menor actividad antihelmíntica observada para el compuesto bromado 13 (8.67 E+03 nM), respecto al análogo híbrido 8 (6.08 E-04 nM) (ver capítulo 2).

Para el FLU y su híbrido 9, el sustituyente en C-5 respecto al plano del anillo benzimidazol presentó un ángulo de 153° y 28°, respectivamente. Para el compuesto 9, se observó una menor actividad antihelmíntica *in vitro* (5.76 E-01 nM) respecto a los derivados híbridos 8 y 10, lo que sugiere, como para el híbrido 13, que la pérdida de ortogonalidad entre el sustituyente en el C-5 respecto al plano benzimidazol puede estar influyendo negativamente sobre la actividad.

Por otra parte, y como ya se comentó, los cálculos de las energías de HOMO-LUMO, así como de las superficies para las funciones de onda de HOMO y LUMO, fueron realizados para predecir la reactividad de los productos estudiados. El estimar dicha reactividad permitió, entre otras, prever los posibles metabolitos que pueden producirse por biotransformación, tanto en el hospedador como en el helminto. Por lo tanto, y como resultado de tales estudios, se realizó la síntesis de algunos derivados sulfóxidos (ver capítulo 1) de utilidad para los estudios farmacocinéticos o de difusión intraparasitaria *ex vivo*, como se verá en los capítulos 4 y 5.

Del análisis de los resultados de las funciones de onda obtenidas para HOMO y LUMO, y el mapeo de las iso-superficies, se pudo observar que el HOMO está

localizado sobre el átomo de azufre, tanto en el grupo funcional tiopropilo como tiofenilo, en ABZ y 8 así como FEB y 10, respectivamente (figuras 3.3 y 3.4). Esto sugiere al átomo de azufre como donador de electrones, siendo por tanto oxidado. De hecho, los principales metabolitos encontrados en plasma de ovejas tratadas con ABZ o FEB que se describen en literatura son el albendazol sulfóxido (ABZ SX, Hennessy *et al.*, 1993) y febendazol sulfóxido (FEB SX, Bull y Shume, 1987), lo que se encuentra en acuerdo con los resultados de localización de HOMO.

En tal sentido, en los ensayos de difusión intraparasitaria *ex vivo* realizados en el presente trabajo (ver capítulos 4 y 5), tanto en el modelo de céstodo como de nemátodo, el perfil de biotransformación (fase I) para ABZ, 8 o FEB reveló la presencia de los metabolitos sulfoxidados correspondientes, los que fueron analizados. Interesantemente, el compuesto híbrido 10 no presentó oxidación bajo las mismas condiciones experimentales (ver capítulos 4 y 5).

De los resultados de las energías de HOMO, informadas en la tabla 3.1, se observa que los valores de las mismas para los compuestos híbridos no difieren demasiado respecto a las obtenidas para los benzimidazoles de partida. Sin embargo, se pudo observar una tendencia diferente en las energías de GAP, siendo para los híbridos levemente menores que para el benzimidazol de origen. Esto podría indicar una mayor reactividad o susceptibilidad para sufrir reacciones redox de los derivados híbridos respecto a los benzimidazoles. Sin embargo, desde el punto de vista experimental, cuando se estudió el perfil de biotransformación en el modelo de nemátodo (capítulo 5) no existieron diferencias significativas en el grado de oxidación de ABZ y su análogo híbrido 8. No obstante, en dicho modelo, para el caso de FEB y su híbrido 10, solo se determinó sulfoxidación para FEB. En el mismo sentido, en el modelo de difusión en céstodo (capítulo 4), solo sufrieron oxidación ABZ y FEB, y no sus análogos híbridos.

Por otra parte, los valores de GAP que presentaron los derivados valerolactama fueron superiores respecto a los derivados híbridos (1.4 veces mayores) y a los benzimidazoles comerciales (1.3 veces mayores), señalando una menor reactividad. Estos resultados conciben con lo observado en estudios de eficacia en ratas y ovinos realizados para el derivado valerolactama 1^a, el cual, como ya se mencionara (capítulo introductorio), se recuperó incambiado en orina luego de una administración oral del mismo.

Analizando ahora los resultados de iso-superficie de LUMO, se observó que la misma se ubica sobre el anillo benzimidazol y el enlace carbamato o amida para ABZ y

FEB, o 8 y 10, respectivamente (figuras 3.4 y 3.5); mientras que el LUMO se localizó sobre el grupo carbonilo del sustituyente en posición 5 del anillo benzimidazol, para FLU y el híbrido 9 (figura 3.6). Estos resultados también concuerdan con observaciones comunicadas previamente, en las que para ovejas tratadas con FLU, el principal metabolito resultó de la reducción del grupo carbonilo en posición 5, dando el correspondiente alcohol derivado (Nobilis *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2004). La reducción de FLU no solo se ha observado en el huésped, para el nemátodo *H. contortus* se ha estudiado la biotransformación de FLU tanto *in vitro* (fracciones subcelulares de homogeinatos) como *ex vivo*. Los resultados de dichos estudios mostraron que existen enzimas citosólicas dependientes de NADPH capaces de reducir el grupo carbonilo de FLU, mientras que en los ensayos *ex vivo* se detectó el metabolito reducido cuando se incubaba por 12 hs o más, mientras que a tiempos de incubación menores no fue posible detectarlo (Cvilink *et al.*, 2008). En efecto, en los experimentos de difusión *ex vivo* que se realizaron en el modelo de nemátodo (ver capítulo 5), donde se incubó con FLU por 30 minutos, no se detectó FLU reducido.

Como se describió en la introducción del presente capítulo, la capacidad de ingresar al medio intraparasitario de los compuestos, está determinada por las propiedades fisicoquímicas de los mismos (lipofilia, volumen molecular, pKa, etc.), y de las características de la superficie externa del helminto.

Los factores de lipofilidad φ_0 para los compuestos híbridos resultaron del orden de los obtenidos para los benzimidazoles comerciales, siendo a su vez 1.7 veces mayores que los presentados por los derivados valerolactama (previamente determinados en el grupo; valor promedio de φ_0 es de 35.8, Tesis de Doctorado del Dr. Pablo Mendina, 2009). A su vez, los valores de volumen molecular para los compuestos híbridos fueron superiores a los de los derivados valerolactama y benzimidazoles comerciales de origen (aprox. en 1.7 y 1.6 veces, respectivamente). Estos resultados van en concordancia con la hipótesis planteada en el capítulo de síntesis química, donde se propone recurrir a la técnica de hibridación molecular para obtener moléculas de mayor lipofilia y volumen, de manera de mejorar su capacidad de difusión parasitaria.

Respecto a los valores de momento dipolar obtenidos, los compuestos híbridos presentaron todos un momento dipolar mayor a sus análogos benzimidazoles antihelmínticos, destacando el híbrido 9 con el mayor valor. Así mismo FLU presentó el mayor valor de momento dipolar dentro de los compuestos benzimidazoles comerciales. Los valores de momento dipolar para los derivados valerolactama fueron intermedios a los de los derivados híbridos y los benzimidazoles antihelmínticos.

En los capítulos de difusión *ex vivo* en *M. vogae* y *H. contortus*, se analiza cómo estos descriptores fisicoquímicos podrían influenciar la capacidad de difusión intraparasitaria en los modelos de céstodo y nemátodo.

CONCLUSIONES

Se logró optimizar la geometría de los nuevos compuestos híbridos valerolactama- benzimidazol, los cuales presentaron una conformación espacial similar a la de los benzimidazoles antihelmínticos de partida. Así mismo, se pudo ver cómo afecta la posición del sustituyente en el C-5 del anillo benzimidazol sobre la actividad antihelmíntica *in vitro*, obteniéndose una mayor actividad en aquellos compuestos híbridos cuyo sustituyente en C-5 se encuentra ortogonal al plano del anillo benzimidazol.

Las iso-superficies de HOMO mostraron para ABZ, FEB y los híbridos 8 y 10, que el átomo de azufre del grupo tiopropilo o tioenilo, respectivamente, preferirá donar electrones, sufriendo reacciones de oxidación. Esto se pudo comprobar durante los ensayos de difusión intraparasitaria *ex vivo*, para ABZ, FEB y el híbrido 8 en el modelo de nemátodo, mientras que en el modelo de cestodo solo se observó sulfoxidación para los benzimidazoles ABZ y FEB. En ninguno de los dos modelos se detectó oxidación del híbrido 10 (ver capítulos de los ensayos de difusión *ex vivo*)

Las iso-superficies de LUMO mostraron para FLU y 9, que el grupo carbonilo en posición 5 del anillo benzimidazol, preferirá aceptar electrones, sufriendo reacciones de reducción. Estos resultados son concordantes con lo reportado, donde tanto en estudios de farmacocinética en ovinos tratados con FLU, como en estudios de difusión *ex vivo* en *H. contortus* y FLU, el principal metabolito de fase I producido es el flubendazol reducido en posición 5.

Se obtuvieron compuestos híbridos con una lipofilia y volumen molecular superior a los derivados valerolactama de origen, cumpliendo entonces con una de los objetivos de la estrategia de hibridación molecular. Estos descriptores serán analizados respecto a la capacidad de difusión *ex vivo* que presentaron los híbridos y benzimidazoles análogos en los modelos de nematodo y cestodo desarrollados (capítulos 4 y 5).

BIBLIOGRAFÍA

Arjunan, V., Arushma, R., Ravindram, P., Mohan, S. Structure-activity relations of 2-(methylthio)benzimidazole by FTIR, FT-Raman, NMR, DFT and conceptual DFT methods. *Spectrochim. Acta A.*, **2014**, *118*, 951- 965.

Avendaño, C., Claramunt, R. Optimización de un prototipo: Correlaciones estructura química- actividad biológica cuantitativas. En "Introducción a la Química Farmacéutica", ed. Avendaño, C. McGraw- Hill Interamericana, 2ª Ed., 2001.

Becke, A., Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.*, **1993**, *98*, 5648-5652.

Bodor, N., Gabanyi, Z., Wong, C. A new method for the estimation of partition coefficient. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 3783-3786

Bull, M., Shume, R. Simultaneous determination of fenbendazole, its sulphoxide and sulphone metabolites with the corresponding metabolites of triclabendazole in the plasma of sheep and cattle by high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1987**, *5*, 501-508.

Court, J., Murgatroyd, R., Livingstone, D., Rahr, E. Physicochemical characteristics of non-electrolytes and their uptake by *Brugia pahangi* and *Dipetalonema viteae*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **1988**, *27*, 101-108.

Cvilink, V., Kubíček, V., Nobilis, M., Křížová, V., Szotáková, B., Lamka, J., Várady, M., Kuběnová, M., Novotná, R., Gavelová, M., Skálova, L. Biotransformation of flubendazole and selected model xenobiotics in *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.*, **2008**, *151*, 242-248.

Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J. A. Peralta, Jr., J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J. M., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R.,

Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, Ö., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J., and Fox, D. J., Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.

Hennessy, M., Sangster, N., Steel, J., Collins, G. Comparative pharmacokinetic behavior of albendazole in sheep and goats. *Int. J. Parasitol.*, **1993**, *23*, 321-325

Ho, N., Geary, T., Raub, T., Barsuhn, C., Thompson, D. Biophysical transport properties of the cuticle of *Ascaris suum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **1990**, *41*, 153- 166

Höhenberg, P., Kohn, W. Inhomogeneous electron gas. *Phys. Rev. B.*, **1964**, *136*, 864-871.

Karnan, M., Balachandran, V., Murugan, M., Murali, M. Quantum chemical vibrational study, molecular property, FTIR, FT-Raman spectra, NBO, HOMO-LUMO energies and thermodynamic properties of 1-methyl-2-phenyl benzimidazole. *Spectrochim. Acta A.*, **2014**, *130*, 143-151

Kohn, W., Sham, L. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys. Rev. A.*, **1965**, *140*, 1133- 1138.

Lee, C., Yang, W., Parr, R. Development of the Colle-Salvetti correlation energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, **1988**, *37*, 785-789.

McCracken, R., Lipkowitz, K. Experimental and theoretical studies of albendazole, oxibendazole and tioxidazole. *J. Parasitol.*, **1990 a**, *76*, 2, 180-185.

McCracken, R., Lipkowitz, K. Structure- activity relationship of benzothiazole and benzimidazole anthelmintics: a molecular modeling approach to in vivo drug efficacy. *J. Parasitol.*, **1990 b**, *76*, 6, 853-864.

Mendina, P. Optimización de nuevos agentes antihelmínticos para su eventual uso en quimioterapia. Tesis Doctoral, bajo la tutoría de los Dres. Laura Domínguez y Eduardo Manta, Facultad de Química, UdelaR, **2009**

Moreno, L., Alvarez, L., Mottier, L., Virkel, G., Sánchez Bruni, S., Lanusse, C. Integrated pharmacological assessment of flubendazole potential for use in sheep: disposition kinetics, liver metabolism and parasite diffusion. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, **2004**, *27*, 299-308.

Mottier, M., Álvarez, L., Pis, M., Lanusse, C. Transtegumental diffusion of benzimidazole antehelminthics into *Moniezia benedeni*: correlation with their octanol-water partition coefficients. *Exp. Parasitol.*, **2003**, *103*, 1-7.

Nobilis, M., Vybíralová, Z., Křížová, V., Kubiček, V., Soukupová, M., Lamka, J., Szotáková, B., Skálová, L. Sensitive chiral high-performance liquid chromatographic determination of anthelmintic flubendazole and its phase I metabolites in blood plasma using UV photodiode-array and fluorescence detection. Application to pharmacokinetic studies in sheep. *J. Chrom. B.*, **2008**, *876*, 89-96

Parr, R., Yang, W. Density-functional theory of the electronic structure of molecules. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **1995**, *46*, 701-728.

Pearson, R. Absolute electronegativity and absolute hardness of Lewis acids and bases. *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 6801-6806.

Rokhina, E., Suri, R. Application of density functional theory (DFT) to study the properties and degradation of natural estrogen hormones with chemical oxidizers. *Sci. Total Environ.*, **2012**, *417*, 280-290.

Valkö, K., Slégel, P. New chromatographic hydrophobicity index (φ_0) based on the slope and the intercept of the $\log k'$ versus *organic* phase concentration plot. *J. Chromatogr. A*, **1993**, *63*, 49-61.

Zheng, Y., Zheng, M., Ling, X., Liu, Y., Xue, Y., An, L., Gu, N., Ji, M. Design, synthesis, quantum chemical studies and biological activity evaluation of pyrazole-benzimidazole derivatives as potent Aurora A/B kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 3523- 3530.

CAPÍTULO 4

**Desarrollo de modelo de
difusión *ex vivo* en el céstodo
Mesocestoides vogae (larva
tetrathyridia)**

Introducción	pág. 153
Metodología	pág. 159
Resultados	pág. 164
Discusión	pág. 170
Conclusiones	pág. 172
Bibliografía	pág. 173

INTRODUCCIÓN

La actividad de un fármaco antihelmíntico no solo depende de su capacidad de unión al blanco molecular (aspecto farmacodinámico, PD), sino también de su habilidad para lograr concentraciones adecuadas en tiempo suficiente para alcanzar el sitio donde se encuentra alojado el parásito y, de este modo, poder llegar al sitio blanco dentro de este (aspectos farmacocinéticos, PK). Además, una vez que el fármaco se enfrenta al parásito e ingresa a él (sorteando la cutícula o tegumento), puede sufrir biotransformación intraparasitaria, así como puede ser devuelto al medio extraparasitario por acción de proteínas de eflujo tipo P-gP.

Por lo tanto, como ya fue mencionado en el capítulo introductorio, el parásito también puede, mediante mecanismos farmacocinéticos-mediados, afectar las concentraciones intraparasitarias de fármaco activo, lo que redundará en el efecto antihelmíntico alcanzado. En la figura 4.1 se esquematiza la interrelación fármaco-parásito-hospedador comentada anteriormente, donde se muestra que el efecto antihelmíntico dependerá, además de la actividad intrínseca del fármaco, de aspectos farmacocinéticos (PK) del hospedador así como también del parásito.

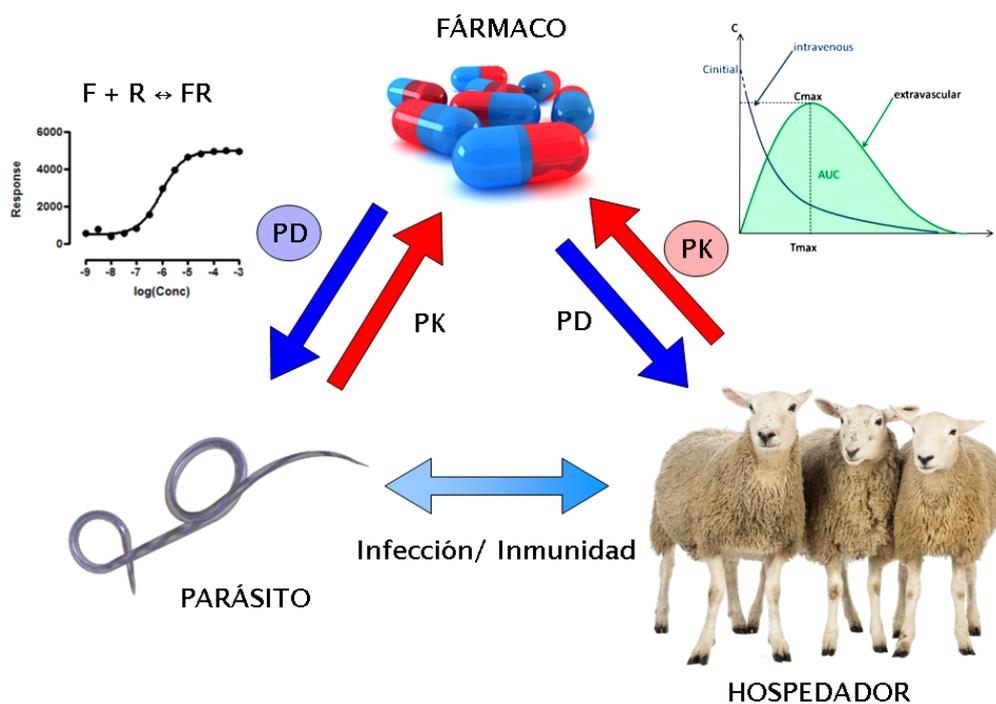


Figura 4.1. Se muestra en esta figura la interrelación entre el fármaco antihelmíntico, el parásito y el hospedador, quedando en evidencia que la interacción del fármaco con su blanco (farmacodinamia, PD), dependerá no solo de aspectos farmacocinéticos (PK) del hospedador, sino también del parásito.

El fármaco antihelmíntico necesitará entonces atravesar varias barreras para finalmente alcanzar su blanco farmacológico dentro del parásito (figura 4.2). Las etapas del proceso farmacocinético en el hospedador, que incluye los pasos de disolución, absorción, distribución, son cruciales para permitir que el fármaco llegue a los tejidos donde se encuentra alojado el parásito, en concentraciones suficientes para ejercer su efecto antihelmíntico. Finalmente, el acceso del fármaco al sitio de acción intracelular dependerá de su capacidad para penetrar la barrera externa del parásito, ya sea cutícula (nemátodo) o el tegumento (céstodo). El pasaje del fármaco a través de dicha barrera externa estará sujeto tanto a las propiedades fisicoquímicas intrínsecas de la molécula como ser lipofilia, pKa, volumen, así como a las características fisicoquímicas de la barrera, ya sea cutícula o tegumento.

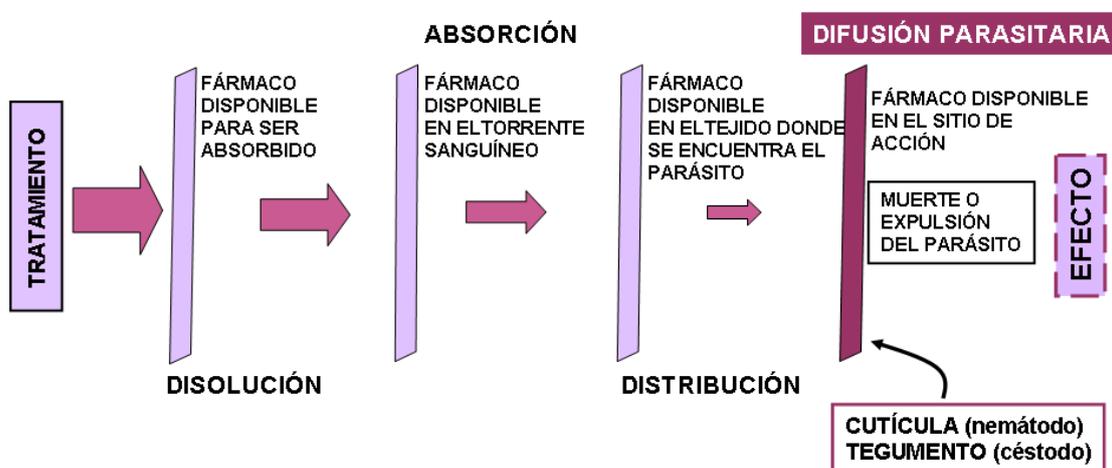


Figura 4.2. Esquema representando las diferentes barreras que debe sortear un fármaco antihelmíntico para alcanzar su blanco farmacológico intraparasitario (extraído de Álvarez *et al.*, 2007).

El proceso de transferencia del fármaco antihelmíntico desde el medio extracelular al interior del parásito se puede estudiar usando diferentes estrategias, como ser *in vitro* o *ex vivo*.

En los estudios *in vitro* se utiliza, por ejemplo, la cutícula aislada de nemátodo, las cuales se colocan en cámaras de difusión en un medio y temperatura adecuado (Ho *et al.*, 1990). Por otra parte, los estudios de difusión *ex vivo* son realizados sobre parásitos vivos intactos, **donde se incuban en un medio adecuado y se enfrentan al compuesto que se quiere estudiar**, a concentración y tiempos definidos (Álvarez *et al.*, 2001). La determinación de la cantidad de fármaco intraparasitario a los tiempos determinados permite, entre otras cosas, estimar el área bajo la curva y, con ello, la cantidad de fármaco disponible dentro del parásito para alcanzar su blanco molecular.

Los experimentos de difusión *ex vivo* permiten además, en el caso de que se use un modelo de nemátodo o tremátodo (organismo que cuenta con boca y tubo digestivo), estudiar la contribución relativa del pasaje transcuticular o transtegumentario del compuesto versus la vía oral al medio intraparasitario, aunque existe evidencia de que la vía transcuticular es la ruta de acceso predominante para la entrada de sustancias que no son nutrientes ni electrolitos en el nemátodo (Thompson y Geary, 1995). **En base a ésta última afirmación, los estudios de difusión ex vivo podrían ser utilizados para optimizar la capacidad de permeación intraparasitaria de potenciales agentes antihelmínticos, en función de modificaciones químicas y fisicoquímicas.**

En nuestro grupo se ha investigado la utilidad del céstodo *Mesocestoides vogae* como modelo para realizar screening de nuevos compuestos con potencial acción cestocida, resultando dicho parásito un organismo interesante y conveniente con el cual se desarrolló tanto un modelo de actividad *in vitro* como un modelo *in vivo* en ratones infectados con *M. vogae* (Saldaña *et al.*, 2001; Saldaña *et al.*, 2003)

El céstodo *M. vogae* (*syn M. corti*; *Cestoda, Cyclophyllidea*) fue aislado por primera vez por Specht y Vogé (1965) de lagartos. Este parásito en su ciclo posee dos hospedadores intermediarios y uno definitivo. Su ciclo de vida se inicia en un artrópodo coprófago (1º hospedador intermediario) que ingiere los huevos. El segundo hospedador intermediario (anfibios, reptiles, aves, roedores) ingiere el artrópodo infectado y desarrolla la larva tetrathyridia en la cavidad peritoneal. Esta forma larvaria, se multiplica de forma asexual. En el hospedador definitivo (carnívoros de la familia *Canidae* y *Mustelidae*) se encuentra el gusano adulto en el intestino delgado. Los gusanos adultos poseen como característica única la capacidad de dividirse de forma sexuada y asexuada, por fisión del escolex o gemación, al igual que la larva tetrathyridea. Esta larva, descrita por Etges, 1991, se mantiene en el laboratorio en ratones (segundo hospedador intermediario), multiplicándose de forma asexuada en la cavidad peritoneal e hígado

En base a lo expuesto, y aprovechando uno de los modelos murinos que dispone el grupo, utilizando el céstodo *M. vogae*, se estudió la capacidad de entrada en dicha matriz parasitaria de los compuestos híbridos valerolactama-benzimidazol sintetizados. Así mismo, el uso de esta herramienta permitirá dirigir la optimización de tales compuestos por modificaciones químicas, con el objetivo de maximizar la difusión intraparasitaria bajo las condiciones experimentales definidas.

Más aún, es de importancia notar que los antihelmínticos benzimidazoles metilcarbamato son de amplio espectro, por lo que presentan tanto acción nematocida como cestocida. Por consiguiente, resulta de interés explorar en ambos helmintos la capacidad de difusión intraparasitaria de los compuestos en estudio.

Sumado a ello, las características de las superficies externas que deben sortear los fármacos antihelmínticos en céstodos o nemátodos, presentan diferencias en aspectos morfológicos, funcionales y fisicoquímicos, que merecen ser tenidos en cuenta para la interpretación de los resultados de difusión intraparasitaria.

En tal sentido, el tegumento del cestodo incluye una superficie con funciones absorbivas, digestivas y de protección, que comparte varias características morfológicas y bioquímicas con, por ejemplo, la mucosa intestinal en mamíferos (Lumsden, 1975).

Los céstodos carecen de tubo digestivo, por lo que utilizan su tegumento para el intercambio químico con el huésped o el medio circundante. Cuentan con un sistema en la superficie externa que está evaginada formando estructuras denominadas microtricas (similares en su función a las microvellosidades intestinales en mamíferos) las que aumentan entre 10 y 50 veces la superficie de intercambio (figura 4.3).

El tegumento del céstodo contiene una variedad de glicolípidos y fosfolípidos, comprendiendo cerca del 40% de la membrana tegumental (incluyendo las microtricas), donde los componentes mayoritarios son colesterol, cardiolipinas y fosfatidiletanolamina. Esto indica que la absorción en cestodos está influenciada mayormente por la componente lipídica del tegumento. En éstas microvellosidades además se encuentran transportadores para el intercambio de nutrientes (transportadores de aminoácidos, glucosa, pirimidinas, purinas, ácidos grasos de cadena corta y larga) (Thompson y Geary, 1995) así como enzimas digestivas (fosfatasas alcalinas y ácidas, esterases, disacaridasas, etc) (Lumsden, 1975).

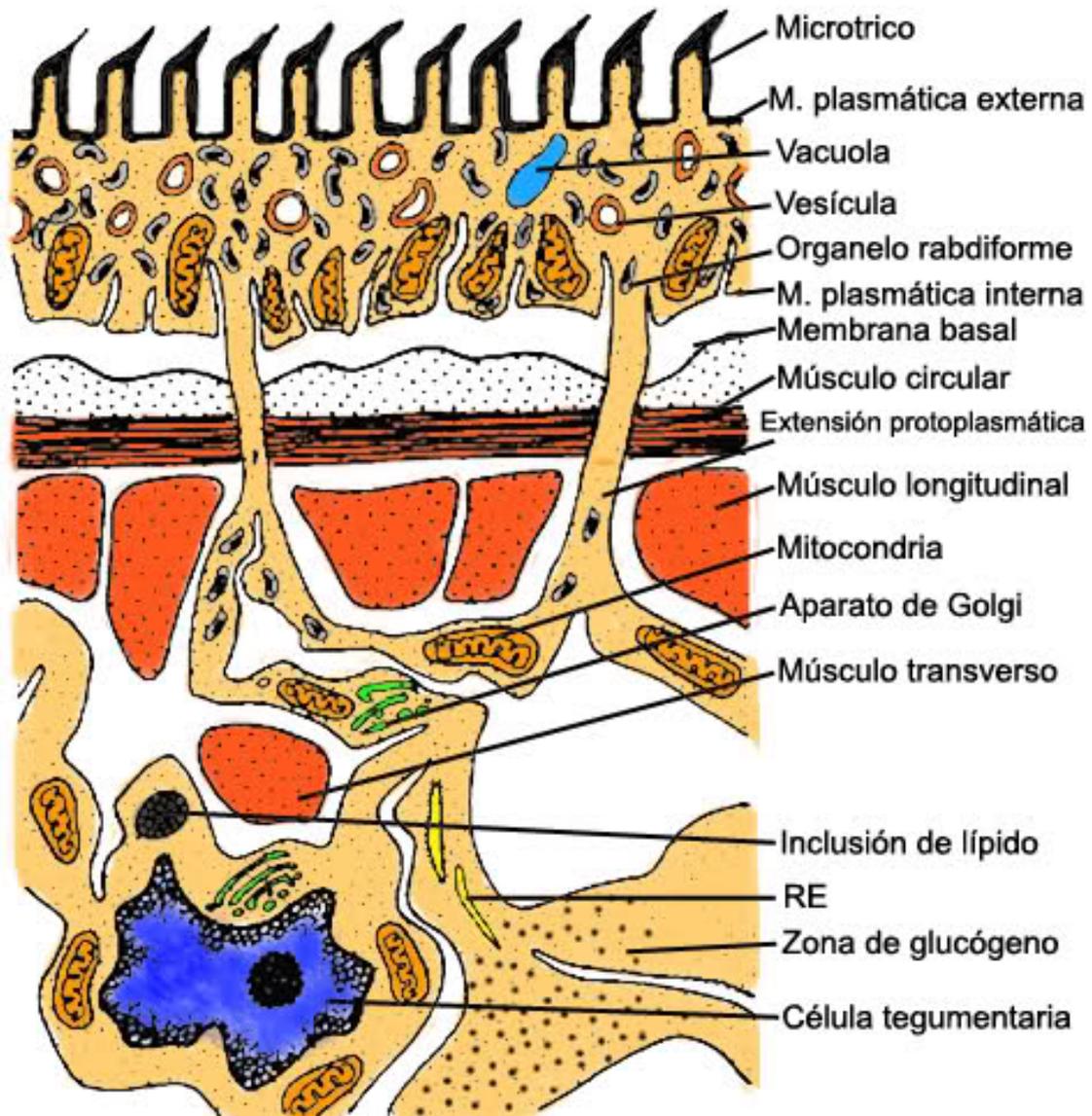


Figura 4.3. Esquema del tejido de tegumento en céstodos. RE: retículo endoplásmico.

En un estudio del relacionamiento filogenético en el orden Cyclophyllidea de los céstodos usando como marcador filogenético a ITS2 (Internal transcribed spacer 2), se concluye que la familia *Mesocestoididae* (ej. *M. vogae*) se encuentra cercana a las familias *Taeniidae* y *Anoplocephalidae* (figura 4.4), dentro de las cuales se encuentran incluidos, los céstodos de interés zoonótico o productivo, *Echinococcus granulosus* y *Moniezia spp.*, respectivamente (Tandon *et al.*, 2011). Por lo tanto, *M. vogae* tetrathyridia constituye un muy buen modelo de céstodo para estudios farmacológicos de potenciales antihelmínticos cestocidas, como ha sido demostrado por nuestro grupo (actividad *in vitro* e *in vivo*) (Saldaña *et al.*, 2001; Saldaña *et al.*, 2003).

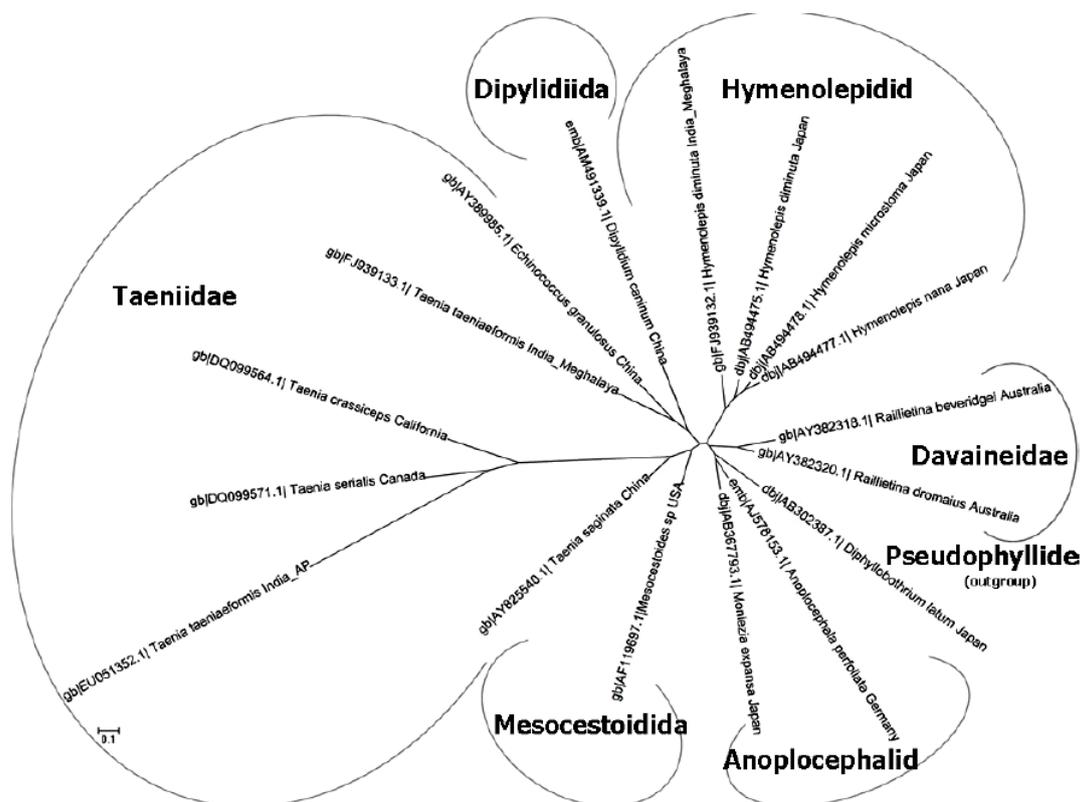


Figura 4.4. Representación de “vecindad” de las seis familias de cyclophyllidea, de la cual se destaca la cercanía entre la familia Mesocestoidida con las familias Taeniidae y Anoplocephalide (adaptación de Tandon *et al.*, 2011).

METODOLOGÍA

Materiales

Las sales utilizadas para preparar el buffer PBS fueron de calidad ppa y los solventes utilizados (acetonitrilo, metanol, acetato de etilo, acetona) para la preparación de muestras (extracción y clareo), así como para el análisis HPLC fueron calidad HPLC (J.T. Baker, Xalostoc, Mexico).

Para la determinación de la concentración de proteínas de los extractos parasitarios se empleó kit comercial de ácido bicinónico (BCA) (Thermo Scientific Pierce).

Los benzimidazoles antihelmínticos ABZ, FLU y FEB fueron suministrados por Laboratorio Uruguay S.A. El resto de los compuestos ensayados fueron sintetizados como se describió en el capítulo 1 de la presente tesis.

Puesta a punto de metodología de clareo de matriz y extracción de analitos de M. vogae tetrathyridea.

Obtención del material parasitario

Las larvas tetrathyridia (TT) de *M. vogae* se recuperaron de la cavidad intraperitoneal de ratones infectados, de acuerdo a Saldaña, *et al.*, 2001. Dicha infección se realizó vía intraperitoneal en ratones CD1 machos, de dos meses de edad, con larvas de *M. vogae* TT en solución salina (0.1 mL conteniendo 200 TT). Luego de dos meses los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y los parásitos recuperados de la cavidad intraperitoneal, lavados dos veces con buffer PBS pH 7.4 y mantenidos por una hora a 37° C y 5% CO₂, hasta sus utilización. El protocolo de experimentación se encuentra regulado por la Ley n° 18611 (<http://www.presidencia.gub.uy/web/leyes/2009/EC1395.pdf>), siendo el número del mismo 02-05-10. Éste protocolo se encuentra aprobado por el CEUA de Facultad de Química - UdelaR.

Preparación de muestras

Se prepararon soluciones stock en metanol para los híbridos valerolactama-benzimidazol (8, 9 y 10), los derivados sulfoxidados de 9 y 10 (11 y 12 respectivamente), benzimidazoles antihelmínticos de partida (ABZ, FEB y FLU), los

benzimidazoles antihelmínticos sulfoxidados (ABZ SX y FEB SX) y el derivado valerolactama 2, así como para el estándar interno (SI) Fenacetina.

A una alícuota de 0.4 mL de *M. vogae* TT se le agregaron 0.3 mL de agua destilada (filtrada por 0.45 µm). Los parásitos suspendidos se homogeneizaron por ultrasonido (Cole Parmer CPX 600, Mernon Hills, Illinois, USA) a 0°C y 23% de amplitud (3 ciclos de 1 minuto cada uno). Se obtuvo un homogenato, del cual se tomaron dos alícuotas de 10 µL para determinación de proteínas por método de BCA (Smith et al, 1985), ya que los resultados de concentración intraparasitaria se expresarán luego como nmoles/ 100 mg de proteínas. Se adicionó una solución de SI y de productos a estudiar para alcanzar una concentración en el homogenato de 22 nmoles/mL y en el rango de 1.0 a 11.0 nmol/mL respectivamente.

Clareo y extracción de analitos de la matriz parasitaria

Para evaluar las etapas de clareo y extracción se ensayaron metodologías de extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida.

Para la extracción en fase líquida se probaron las siguientes condiciones, agregándose al homogenato:

- *Método A*: 5 mL de acetato de etilo
- *Método B*: 1 mL de acetona y 5 mL de acetato de etilo
- *Método C*: 1 mL de acetonitrilo y 5 mL de acetato de etilo

En todos los casos se agitó en vortex por 2 minutos, se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos (Thermo Scientific, CL 10), se tomó sobrenadante y se evaporó a sequedad. Se retomó el residuo resultante en 100 µL de metanol para luego ser analizado por HPLC.

En el caso de extracción en fase sólida se procedió de la siguiente manera:

- *Método D*: Se agregaron 3 mL de acetonitrilo y se agitó en vortex 2 minutos. Se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos, se tomó el sobrenadante y se evaporó a sequedad. El residuo se retomó en 1 mL de una mezcla agua:metanol (80:20). La extracción en fase sólida se realizó con cartuchos Sep-Pak C18 (Waters, Sep-Pak C 18 Cartidges, Massachusetts, USA) previamente activados con metanol(10 mL) y agua (10 mL). Se siembra la muestra, se lava con 10 mL de agua, y se eluye con 3.5 mL de metanol (descartando los primeros 0.5 mL). Se evapora a vacío el eluato hasta sequedad y se analiza por HPLC.

Para el estudio del producto 2 (derivado valerolactama), se adaptó la metodología de extracción líquido-líquido ya desarrollada por el grupo para los

derivados valerolactama (Tesis de Doctorado, Dr. Pablo Mendina, 2009), usando acetonitrilo y acetato de etilo (método C). Se evaporó a sequedad la fase orgánica luego de la extracción quedando lista la muestra para análisis HPLC.

Para estimar los porcentajes de recuperación del método, se analizaron mediante HPLC soluciones en metanol (consideradas como el 100% de recuperación), en el mismo rango de concentración que las muestras a ensayar. Cada concentración se evaluó por quintuplicado para cada uno de los métodos ensayados.

Se construyeron curvas de calibración para los productos evaluados, y los parámetros de regresión lineal se obtuvieron con el programa OriginPro 8 (Northampton, MA, USA)

Ensayos de difusión ex vivo en *M. vogae* TT

El material parasitario se colocó en botellas de cultivo celular y se le agregó 3 mL de buffer PBS pH 7.4 previamente filtrado (0.45 μ m) y termostaticado a 37°C. Se agregó una solución en DMSO del producto a evaluar, de forma de alcanzar una concentración en el medio de incubación de 5 nmoles/mL. Se eligió ésta concentración para trabajar ya que es la concentración que se alcanza en abomaso de ovinos luego de la administración de benzimidazoles antihelmínticos a dosis habituales de 5 mg/ kg (Hennesy *et al* 1993; Sánchez *et al* 1997). Se incubó a 37° C y 5% CO₂ por 30 minutos. Transcurrido este tiempo se enjuagaron las larvas con agua destilada y se guardaron en freezer a -20°C hasta su procesamiento y análisis.

Para la extracción y clareo de muestras se eligió el método D (extracción en fase sólida), exceptuando para muestras donde se ensayó el producto 2, donde se empleó el método C. Los resultados de concentración intraparasitaria se expresan como nmol/ 100 mg de proteínas.

Método de análisis por HPLC

Los análisis por HPLC se realizaron en un equipo Waters con bombas binarias y detector de arreglo de diodos (Waters 1525 Binary HPLC pump, Waters 2996 photodiode array detector), con una columna fase reversa C18, 4.6x150 mm, 5 μ m tamaño de partícula (Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse XBD, USA) a una longitud de onda de 290 nm, y flujo de 1 mL/min en todos los casos, a excepción del compuesto 2, el cual se midió a una longitud de onda de 210 nm.

Para ABZ y sus metabolitos (ABZ SX y ABZ SN) se usó la fase móvil de composición ácido acético (HAc) 1%: metanol (MeOH): acetonitrilo (AcCN) (60:20:20). En estas condiciones los tiempos de retención resultaron de: 3.1, 4.5 y 16.0 min, para ABZ SX, ABZ SN y ABZ, respectivamente, y 5.1 min para el SI.

Para FLU y 9 se utilizó un programa de gradiente para una fase móvil compuesta por HAc 1%: AcCN : MeOH (60:20:20) los primeros 5 min y llegando a una composición (46,2 : 61,6 : 15,4) a los 6 min. En estas condiciones se obtuvieron tiempos de retención de 4,5 min para SI, 8,7 min para FLU y 12,7 min para 9.

Para FEB y su metabolito (FEB SX) se utilizó un programa de gradiente para una fase móvil compuesta por HAc 1%: AcCN : MeOH (70:15:15) los primeros 10 min y llegando a una composición (42:49:9) a los 15 min. En éstas condiciones los tiempos de retención para el SI, FEB SX y FEB fueron 7.8, 8.7 y 17.4 min respectivamente.

Para 8 y su metabolito (11) se empleó un programa de gradiente para una fase móvil compuesta por acetato de amonio (NH_4Ac) 2g/L: MeOH: AcCN, (50:25:25) por 5 min, y llegando a una composición de (40:20:40) a los 8 min. En estas condiciones, los tiempos de retención que fueron de 12.2 min para 8, 5.2 min para 11 y 3,0 min para SI.

Para 10 y su metabolito (12) se utilizó un programa de gradiente para una fase móvil compuesta por NH_4Ac (2g/L): MeOH: AcCN, (50:25:25) por 5 min, alcanzando una composición de (32,5 : 16,25 : 51,25) a los 8 min. En estas condiciones los tiempos de retención obtenidos son: 3,0 min para SI, 6.5 min para 12 y 10,6 min para 10.

Para 2 en condiciones isocráticas se utilizó fase móvil de H_2O :AcCN (80:20), siendo los tiempos de retención 5.69 y 10.84 min, para 2 y el SI respectivamente.

Estudios de correlación entre la capacidad de difusión ex vivo en M. vogae con los descriptores fisicoquímicos (lipofilia y volumen) y electrónicos (momento dipolar) de los compuesto ensayados.

Siguiendo los conceptos del análisis QSAR, se determinaron descriptores fisicoquímicos (lipofilia, volumen molecular) y electrónicos (momento dipolar y energías de HOMO-LUMO) para los compuestos estudiados, buscando posibles niveles de correlación de estas moléculas con la capacidad de difusión intraparasitaria *ex vivo* (ver capítulo 3). Se eligió dicho parámetro biológico para correlacionar ya que los

compuestos híbridos se sintetizaron con el fin de optimizar la difusión parasitaria respecto a la serie valerolactama de origen.

En el capítulo 3 se presentaron los resultados de los descriptores fisicoquímicos lipofilia (factor φ_0 determinado experimentalmente) y volumen (determinado computacionalmente) y del descriptor electrónico, momento dipolar (determinado computacionalmente) para los benzimidazoles antihelmínticos comerciales y sus análogos híbridos valerolactama- benzimidazol.

En el presente capítulo, se analizará la incidencia de dichos descriptores sobre la concentración intraparasitaria alcanzada por los productos en estudio y bajo las condiciones experimentales descritas en los ensayos de difusión *ex vivo*.

Así mismo, el metabolito sulfoxidado de ABZ, el ABZ SX, fue incluido dentro de los compuestos a ensayar su difusión intraparasitaria *ex vivo*. El ABZ SX, como ya se mencionó en el capítulo introductorio, se utiliza en terapéutica como fármaco antihelmíntico y presenta características desde el punto de vista fisicoquímico (lipofilia y momento dipolar) que lo diferencian de la serie de benzimidazoles antihelmínticos originales (como ABZ, FEB, FLU, MBZ), siendo marcadamente más hidrofílico que estos.

Análisis estadístico

Se compararon los resultados obtenidos para los diferentes compuestos ensayados en los experimentos de difusión *ex vivo*, aplicando un test de comparación múltiple, test de Tukey, con un 95 % de confianza (GraphPad Prism 5.00, La Jolla, CA, USA), y se estimaron diferencias significativas entre ellos.

RESULTADOS

Puesta a punto de metodología de extracción y clareo

En la figura 4.5 se comparan los porcentajes de recuperación para ABZ, su metabolito ABZ SX y su análogo híbrido 8, así como para el estándar interno fenacetina (SI), aplicando metodología de extracción en fase líquida. En la misma gráfica se muestran los resultados obtenidos para estos analitos aplicando la metodología de extracción en fase sólida

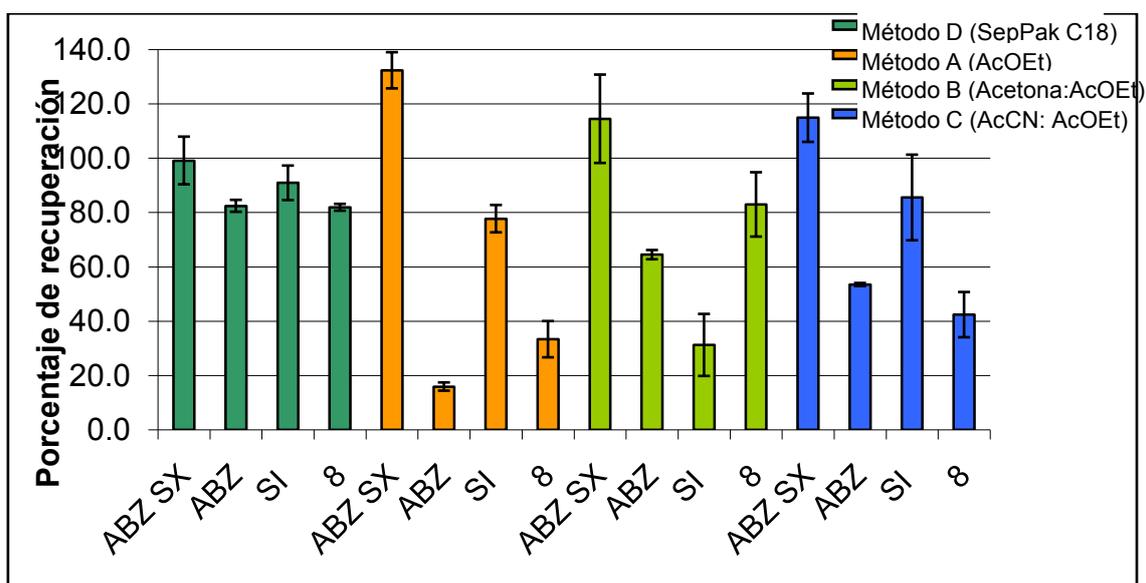


Figura 4.5. Porcentajes de recuperación para ABZ, ABZ SX, estándar interno (SI) y compuesto 8 comparando metodologías de extracción en fase líquida y en fase sólida.

En vista de los variables y bajos porcentajes de recuperación obtenidos con las metodologías de extracción en fase líquida, **se decidió aplicar extracción en fase sólida** para la determinación de los porcentajes de recuperación de los benzimidazoles antihelmínticos (ABZ, ABZ SX, FEB y FLU) y los derivados híbridos (8, 9 y 10).

Esta metodología de extracción fue validada, y los resultados de la validación se muestran en la tabla 4.1. Allí se describen los parámetros de regresión lineal para los diferentes compuestos, así como su porcentaje de recuperación para la metodología de clareo y extracción aplicada. Para el compuesto valerolactama 2, las muestras parasitarias derivadas fueron procesadas utilizando el método de extracción líquido-líquido C, con acetonitrilo y acetato de etilo.

Tabla 4.1. Parámetros de regresión lineal, recuperación y precisión del método D para antihelmínticos benzimidazólicos presentes en *M. vogae* TT.

Producto	Conc. nmol/mL (rango)	Pendiente ± 95 % IC	Intercepto ± 95% IC	r ²	% Recuperación (rango)	%CV
ABZ	1.01 - 11.94	0.272 ± 0.020	-0.082 ± 0.130	0.99	80.5 - 86.2	< 11.6
ABZ SX	0.99 - 11.61	0.618 ± 0.040	-0.136 ± 0.236	0.99	92.1 - 111.9	<9.5
FLU	2.16 - 11.80	0.306 ± 0.050	0.015 ± 0.342	0.98	63.3 - 86.6	<11.8
FEB	2.12 - 12.90	0.323 ± 0.020	0.053 ± 0.144	0.99	79.0 - 91.8	<12.2
8	1.61 - 6.32	0.184 ± 0.008	-0.044 ± 0.034	0.99	80.2 - 83.2	<7.0
9	0.95 - 2.81	0.149 ± 0.050	0.170 ± 0.100	0.95	64.9 - 110.8	<8.2
10	0.76 - 4.97	0.381 ± 0.026	-0.058 ± 0.074	0.99	77.7 - 93.9	<7.0
2 ^(a)	3.31 - 6.62	---	---	---	95.9 - 117.5	<9.8

(a): los parámetros obtenidos para 2 corresponden al método C (extracción líquido- líquido).

%CV: Coeficiente de variación; 95% IC: Intervalo de confianza con 95% de confianza

Ensayos de difusión ex vivo en *M. vogae*

En la tabla 4.2 se informan los resultados de difusión intraparasitaria *ex vivo*, bajo las condiciones experimentales descritas, de los diferentes compuestos de interés. Sólo se observó sulfoxidación parasitaria durante el ensayo *ex vivo* para los experimentos de ABZ y FEB, dando ABZ SX y FEB SX, respectivamente. Los valores de concentración intraparasitaria que se informa para ABZ y FEB en la tabla 4.2, así como en los gráficos de las figuras 4.2 y 4.3, corresponden al valor de concentración intraparasitaria total de ABZ y FEB que difunde, incluyendo lo que se forma de ABZ SX y FEB SX.

Tabla 4.2. Resultados de los ensayos de difusión parasitaria *ex vivo en M. vogae*. La concentración intraparasitaria se expresa como nmoles/ 100 mg de proteínas de extracto parasitario.

Producto	Concentración Intraparasitaria <i>ex vivo</i> en <i>M. vogae</i> (nmoles/ 100 mg de proteínas) ($\bar{X} \pm S.D.$)
ABZ	52.41 ± 3.64
VAL-ABZ (8)	35.51 ± 3.63
FEB	75.36 ± 9.41
VAL-FEB (10)	32.41 ± 3.89
FLU	34.26 ± 6.89
VAL-FLU (9)	6.14 ± 1.50
ABZ SX	2.67 ± 0.28
Valerolactama (2)	2.90 ± 0.48

\bar{X} : promedio de cinco réplicas; S.D.: desviación estándar

En las figuras 4.6 y 4.7, se muestran gráficos de concentración intraparasitaria luego del ensayo *ex vivo*, comparando los compuestos híbridos con el derivado valerolactama 2 (figura 4.6) y con los benzimidazoles antihelmínticos de partida (figura 4.7).

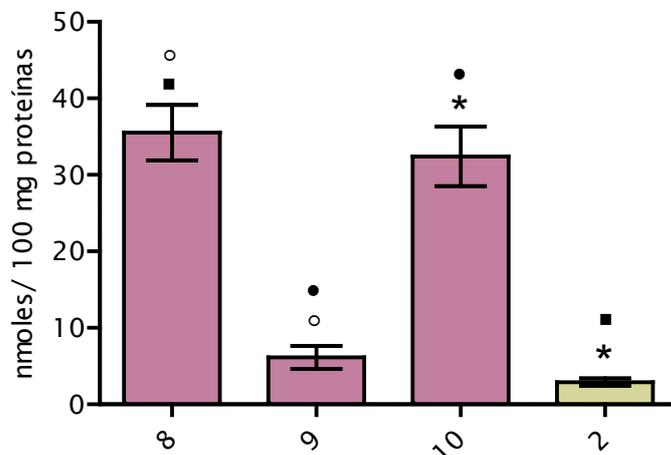


Figura 4.6- Difusión intraparasitaria *ex vivo* en *M. vogae*, para compuestos híbridos 8, 9 y 10 vs derivado valerolactama 2. Test de comparación múltiple (Tukey, 95 % de confianza), (*), (o), (■), (●) presentan diferencias significativas.

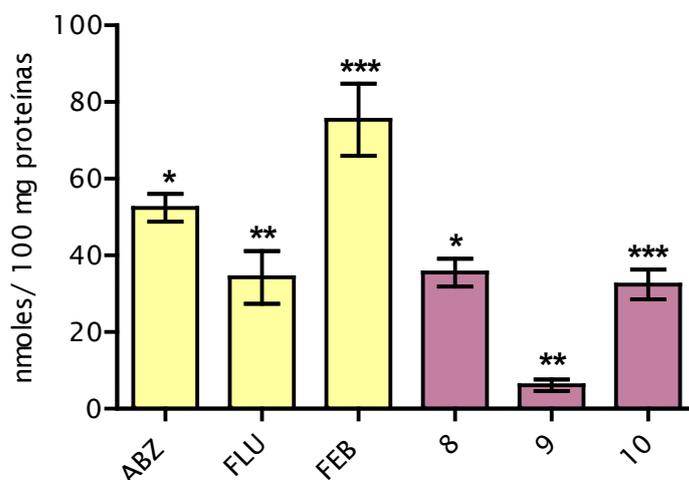


Figura 4.7. Difusión intraparasitaria *ex vivo* en *M. vogae*, para compuestos híbridos 8, 9 y 10 vs benzimidazoles antihelmínticos. Test de comparación múltiple (Tukey, 95 % de confianza), (*, **, ***) presentan diferencias significativas.

Como se observa en la figura 4.6, los compuestos híbridos 8 y 10 presentaron una capacidad de difusión intraparasitaria significativamente mayor que el derivado valerolactama 2. Así mismo, en la figura 4.7 se muestra que todos los benzimidazoles comerciales presentaron una capacidad de difusión intraparasitaria significativamente mayor que los derivados híbridos valerolactama- benzimidazol.

También resultó interesante la observación de que en los experimentos donde se incuban las larvas TT con ABZ o FEB por 30 minutos, se verificó y cuantificó por HPLC la presencia de los metabolitos sulfoxidados ABZ SX y FEB SX (figura 4.8). Para el caso del ABZ se cuantificaron 4.34 ± 1.11 nmoles de ABZ SX/ 100 mg de proteínas y para la incubación con FEB se cuantifican 11.08 ± 3.58 nmoles de FEB SX/ 100 mg de proteínas; los que corresponden con un porcentaje de oxidación de un 8.2% y un 14.5 % para ABZ y FEB respectivamente. Estos resultados muestran la capacidad metabolizadora, en particular sulfoxidativa del tegumento del céstodo.

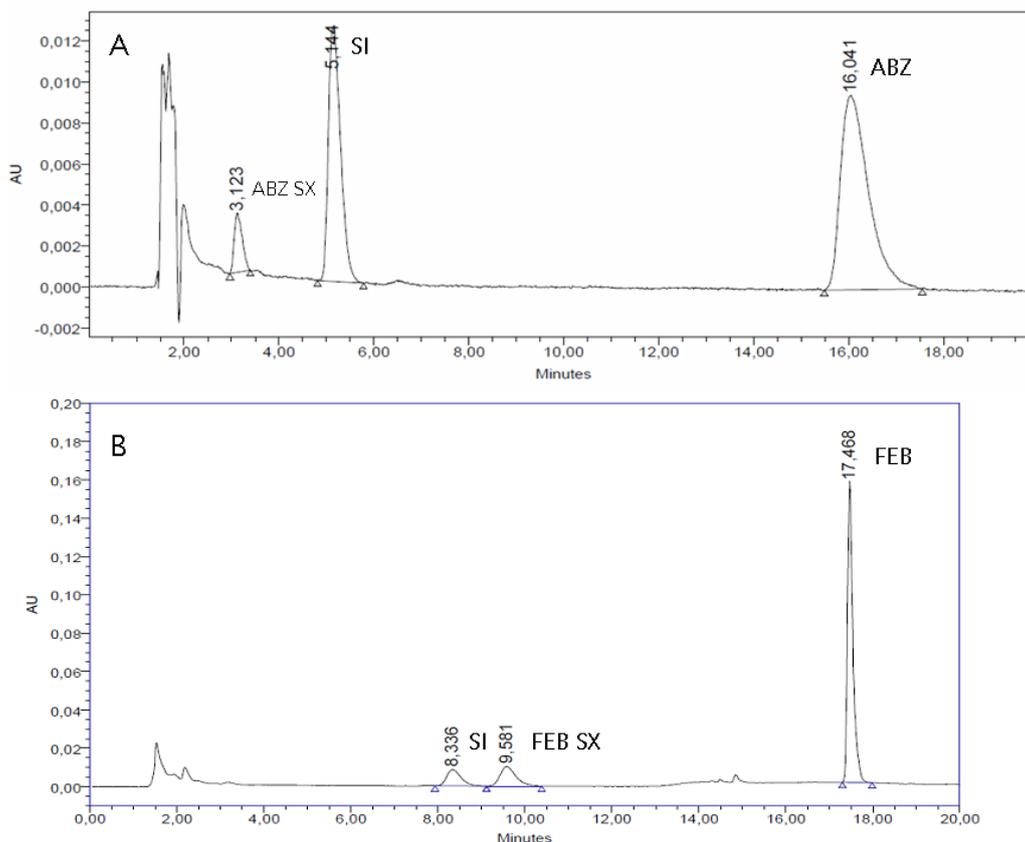


Figura 4.8. Cromatogramas obtenidos para los ensayos de difusión *ex vivo* en *M. vogae* de ABZ (A) y FEB (B), dónde se observó, bajo las condiciones experimentales descritas, la formación de los metabolitos ABZ SX y FEB SX, respectivamente.

Correlación de capacidad de difusión *ex vivo* en *M. vogae* con parámetros fisicoquímicos.

En la tabla 4.3 se resumen los resultados obtenidos para los descriptores y la concentración intraparasitaria alcanzada por los diferentes compuestos evaluados.

Tabla 4.3. Descriptores lipofilia (factor ϕ_0), momento dipolar y volumen para los compuestos ensayados en el modelo de difusión intraparasitaria *ex vivo* en *M. vogae*.

Prod.	Factor de Lipofilia ϕ_0 ^(a)	Momento dipolar (Debye) ^(b)	Volumen molecular (Å^3) ^(c)	Concentración Intraparasitaria en <i>M. vogae</i> (nmoles/ 100 mg de proteínas) ($\bar{X} \pm S.D.$)
2	30.8	5.7594	682.75	2.90 \pm 0.48
ABZ SX	27.3	6.6059	809.62	2.67 \pm 0.28
ABZ	58.0	4.7831	794.11	52.41 \pm 3.64
8	58.8	4.9439	1329.15	35.51 \pm 3.63
FLU	50.6	5.0531	851.32	34.26 \pm 6.89
9	56.2	8.8355	1381.50	6.14 \pm 1.50
FEB	62.5	3.7625	850.28	75.36 \pm 9.41
10	67.1	6.9678	1383.94	32.41 \pm 3.89

^(a) Determinado experimentalmente por HPLC de fase reversa, de acuerdo con Valko *et al.*, 1993

^{(b) (c)} El momento dipolar y el volumen molecular se calcula luego de la optimización de la geometría, usando Gaussian09 a un nivel de teoría B3LYP/6-311++G(3df,2pd)

Para los benzimidazoles antihelmínticos ABZ, FEB, FLU y ABZ SX, se encontró una correlación lineal entre la lipofilia y la concentración intraparasitaria alcanzada luego del ensayo de difusión *ex vivo* (figura 4.9). Además se incluye en dicha correlación al compuesto valerolactama 2, que presenta lipofilia y concentración intraparasitaria en *M. vogae* comparable a la de ABZ SX.

Para la serie de compuesto híbridos no se obtuvo buena correlación entre la lipofilia y la concentración intraparasitaria.

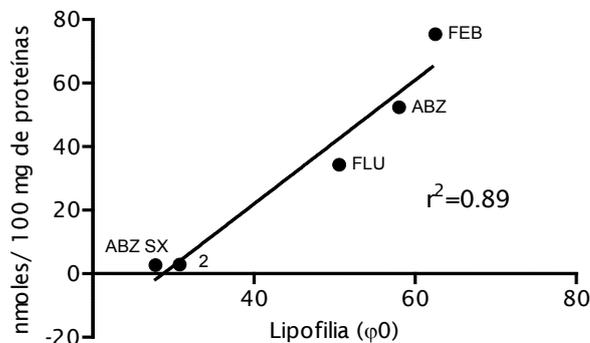


Figura 4.9. Correlación entre la concentración intraparasitaria (nmoles/ 100 mg de proteínas) alcanzada luego del ensayo de difusión *ex vivo* en *M. vogae* para los benzimidazoles antihelmínticos y la lipofilia de los mismos (expresada como el factor de lipofilicidad ϕ_0).

También se estudió la incidencia de otro parámetro fisicoquímico, como el momento dipolar, sobre la capacidad de ingreso de los compuestos al medio intraparasitario. Se encontró una correlación lineal para la serie de benzimidazoles, donde se incluye al derivado valerolactama 2 ($r^2= 0.91$), y para los compuestos híbridos ($r^2= 0.81$), siendo inversamente proporcionales, es decir, el aumento en el momento dipolar de la molécula afectó negativamente la capacidad de ingreso al parásito (figura 4.10).

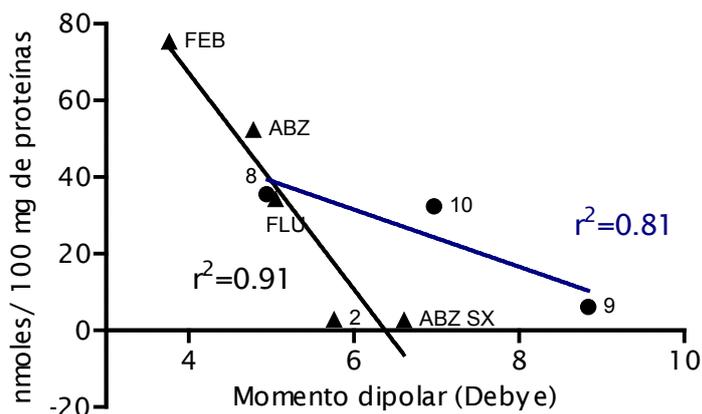


Figura 4.10- Correlación entre la concentración intraparasitaria (nmoles/ 100 mg de proteínas) alcanzada luego del ensayo de difusión *ex vivo* en *M. vogae* para los benzimidazoles antihelmínticos y derivados híbridos y el momento dipolar de los mismos.

Respecto al volumen, se vio que para compuestos con volúmenes similares (serie benzimidazol por ejemplo), la capacidad de entrada a *M. vogae* fue muy variada. Ahora, si se comparan compuestos con valores de lipofilia similares, pero volúmenes diferentes, como por ejemplo ABZ y el derivado híbrido 8, el compuesto con mayor volumen (8), presentó una menor concentración intraparasitaria. Lo mismo aconteció al comparar FEB y 10 o FLU y 9.

DISCUSIÓN

Se logró poner a punto metodología de extracción y clareo para la matriz parasitaria de *M. vogae*, donde se validó el método D, que implicó una desprotección primaria con acetonitrilo seguido de extracción en fase sólida por SepPak C18.

En los estudios de difusión *ex vivo*, se obtuvo para los compuestos híbridos 8 y 10 una concentración intraparasitaria significativamente mayor que para el derivado valerolactama 2. Estos resultados muestran que se cumple uno de los objetivos planteados al aplicar la estrategia de hibridación molecular, donde se pretendía obtener compuestos con una mayor lipofilia que los derivados valerolactama de manera de optimizar la capacidad de difusión intraparasitaria (Munguía *et al.*, 2015).

Se observó que los benzimidazoles antihelmínticos ABZ, FEB, FLU y ABZ SX, presentan una relación lineal entre la lipofilia y la concentración intraparasitaria alcanzada luego del ensayo de difusión *ex vivo* ($r^2=0.89$, figura 4.9). Este resultado se encuentra en concordancia con lo reportado (Mottier *et al.* 2003), para estudios de difusión *ex vivo* en el céstodo *Moniezia benedeni*, y se compara la capacidad de difusión parasitaria de benzimidazoles antihelmínticos (como área bajo la curva de 0 a 210 minutos) con su lipofilidad (expresada como coeficiente de partición octanol-agua). Igualmente, en dicho trabajo se informa un comportamiento lineal ($r^2= 0.76$) entre la lipofilia y la capacidad de difusión intraparasitaria para los benzimidazoles antihelmínticos estudiados.

Por otra parte, para los compuestos híbridos, si bien no se encuentra este nivel de correlación, sí se observa que el producto 9, que presentó la menor lipofilia de la serie, fue el que alcanzó una menor concentración intraparasitaria bajo las condiciones ensayadas. Para los compuestos 10 y 8 no hubo diferencias significativas en la difusión intraparasitaria, aunque la lipofilia de 10 fue mayor a la de 8.

En vista de estos resultados, se exploraron otros parámetros fisicoquímicos que puedan explicar de mejor forma la capacidad de difusión intraparasitaria, principalmente para los compuestos híbridos, como por ejemplo el momento dipolar y el volumen.

El momento dipolar presentó correlaciones lineales inversamente proporcionales a la concentración intraparasitaria en *M. vogae*, tanto para la serie benzimidazol, como para los compuestos híbridos. Por consiguiente, el aumento en el

momento dipolar de la molécula afectó negativamente la capacidad de ingreso al parásito (figura 4.10). Efectivamente, esto podría explicar que para los compuestos 10 y 8, se observó una menor difusión intraparasitaria para la molécula de mayor momento dipolar (10).

Al estudiarse el parámetro de volumen, no se vio una correlación con la concentración intraparasitaria. Analizando la serie de benzimidazoles comerciales, el rango de concentraciones intraparasitarias alcanzadas resultó amplio (desde 34 a 75 nmoles/ 100 mg de proteínas), por lo que este parámetro parecería no influir en ésta serie, en la que sus componentes presentan volúmenes similares.

Por otro lado, al comparar compuestos con valores de lipofilia y momentos dipolares similares, pero volúmenes diferentes, como es el caso de ABZ y el derivado híbrido 8, el compuesto con mayor volumen (8) presentó una concentración intraparasitaria significativamente menor que ABZ. De la misma forma, al comparar los pares FEB y 10 o FLU y 9, los híbridos 10 y 9, que presentan mayores volúmenes y momentos dipolares que sus análogos benzimidazoles, mostraron menor capacidad de difusión intraparasitaria en *M. vogae*.

Los perfiles de mayor difusión intraparasitaria asociados a compuestos con mayor lipofilia y menor momento dipolar, se pueden explicar tomando en consideración la composición de la barrera externa del céstodo. El tegumento contiene una variedad de glicolípidos y fosfolípidos que comprenden cerca del 40% de la membrana tegumental, siendo por lo tanto, una barrera mayormente lipídica.

Una observación interesante para éste modelo de difusión *ex vivo* fue que se evidenció la capacidad sulfoxidativa del tegumento del céstodo *M. vogae*, en los experimentos donde se ensayó ABZ y FEB, formándose ABZ SX y FEB SX, resultando los porcentajes de oxidación de un 8.2% y un 14.5 % para ABZ y FEB respectivamente. Por otra parte, no se observó sulforeducción de ABZ SX a ABZ durante el experimento donde se incubó con ABZ SX (Munguía *et al.*, 2015)

Se ha reportado para el céstodo *Moniezia expansa*, filogenéticamente cercano a *M. vogae* (ver figura 4.4), su capacidad para formar ABZ SX a partir de ABZ, en las fracciones microsomales y citosólicas. Pero además, éste céstodo presentó la capacidad de reducir ABZ SX a ABZ, de modo muy superior al nemátodo *A. suum* o el tremátodo *Fasciola hepatica* (Solana *et al.*, 2001). En el mismo sentido, en estudios de difusión *ex vivo* para ABZ y FEB en *M. benedeni*, se logró cuantificar ABZ SX (5- 30%) y FEB SX (5%) respectivamente (Mottier *et al.*, 2003).

CONCLUSIONES

Se logró poner a punto y validar metodología de extracción y clareo para la matriz parasitaria de *M. vogae*.

El desarrollo del modelo de difusión *ex vivo* en *M. vogae* permitió comprobar que la estrategia de hibridación molecular fue útil para aumentar la capacidad de difusión parasitaria de los derivados valerolactama, resultando ser significativamente mayores las concentraciones intraparasitarias alcanzadas para los compuestos híbridos 10 y 8 respecto al derivado valerolactama 2.

Así mismo, se demuestra la utilidad del modelo de difusión intraparasitaria en *M. vogae* TT para fármaco-modular compuestos con potencial actividad antihelmíntica, en función de su capacidad de ingreso al medio intraparasitario, siendo una de las ventajas de dicho modelo que el material parasitario se puede mantener de forma sencilla en un modelo murino.

Al mismo tiempo, estudiando la relación entre los parámetros fisicoquímicos lipofilia y momento dipolar, se pudo establecer que la lipofilia correlaciona favorablemente con la capacidad de ingreso al medio intraparasitario, contrariamente al momento dipolar, siendo estos resultados congruentes respecto a las propiedades fisicoquímicas del tegumento.

Finalmente, fue posible evidenciar la facultad del tegumento de *M. vogae*, para biotransformar ABZ y FEB dando los metabolitos oxidados ABZ SX y FEB SX respectivamente, mientras que no se detectaron metabolitos de los compuestos híbridos en este modelo de difusión.

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez, L., Mottier, L., Lanusse, C. Drug transfer into target helminth parasites. *Trends Parasitol.*, **2007**, *23*, 97- 104.

Álvarez, L., Mottier, M., Sánchez, S., Lanusse, C. *Ex vivo* diffusion of albendazole and its sulfoxide metabolite into *Ascaris suum* and *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.*, **2001**, *87*, 929- 934.

Etges, F. The proliferative tetrathyridium of *Mesocestoides vogae* sp. N. (cestoda). *J. Helminthol. Soc. Wash.*, **1991**, *58*, 181- 185.

Hennessy, D., Sangster, N., Steel, J., Collins, G. Comparative pharmacokinetics behaviour of albendazole in sheep and goats. *Int. J. Parasitol.*, **1993**, *23*, 321-325.

Ho, N., Geary, T., Raub, T., Barsuhn, C., Thompson, D. Biophysical transport properties of the cuticle of *Ascaris suum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **1990**, *41*, 153- 166.

Lumsden, R., "Surface Ultrastructure and Cytochemistry of Parasitic Helminths". *Exp. Parasitol.*, **1975**, *37*, 267-339.

Mendina, P. Optimización de nuevos agentes antihelmínticos para su eventual uso en quimioterapia. Tesis Doctoral, bajo la tutoría de los Dres. Laura Domínguez y Eduardo Manta, Facultad de Química, UdelaR, **2009**

Mottier, M., Álvarez, L., Pis, M., Lanusse, C. Transtegumental diffusion of benzimidazole antehlmintics into *Moniezia benedeni* : correlation with their octanol-water partition coefficients. *Exp. Parasitol.*, **2003**, *103*, 1-7.

Munguía, B., Michelena, M., Melian, E., Saldaña, J., Ures, X., Manta, E., Domínguez, L. Development of novel valerolactam- benzimidazole hybrids anthelmintic derivatives: Diffusion and biotransformation studies in helminth parasites. *Exp. Parasitol.*, **2015**, *153*, 75 -80

Saldaña J., Casaravilla C., Marín M., Fernández C., Domínguez L. The toxicity of praziquantel against *Mesocestoides vogae* (syn. Corti) tetrathyridia can be assessed using a novel in vitro system. *Parasitol. Res.*, **2003**, *89*, 467-472.

Saldaña, J., Marín, M., Fernández, C., Domínguez, L. *In vitro* taurocholate- induced segmentation and clustering of *Mesocestoides vogae* (syn. Corti) tetrathyridea (Cestoda) - inhibition by cestocidal drugs. *Parasitol. Res.*, **2001**, *87*, 281 - 286.

Sánchez, S., Álvarez, L., Lanusse, C. Fasting induced changes on the pharmacokinetic behaviour of albendazole and its metabolite in cattle. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, **1997**, *20*, 38-47

Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., Klenk, D. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **1985**, *150*, 76-85.

Solana, H., Rodríguez, H., Lanusse, C. Comparative metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by different helminth parasites. *Parasitol. Res.*, **2001**, *87*, 275-280.

Specht, D., Voge, M. Asexual multiplication of *Mesocestoides* tetrathyridia in laboratory animals. *J. Parasitol.*, **1965**, *51*, 268-272.

Tandon, V., Kumar Visvual, D., Kumar Prasad, P., Malsawmtluangi, C., Reconstructing the Phylogenetic Relationships of the *Cyclophyllidean Cestodes*: A Case Study Using ITS2 rDNA and Sequence-Structure Alignment. En *Biomedical Engineering Systems and Technologies Communications in Computer and Information Science* (Ed. Fred, A., Filipe, J., Gamboa, H.), **2011**, *127*, 309-321.

Thompson, D., Geary, T. The structure and function of helminth surfaces. En *Biochemistry and Molecular Biology of parasites* (Marr, J y Müller, M., editores), **1995**, 203-232, Academic Press Ltd.

CAPÍTULO 5

**Desarrollo de modelo de
difusión *ex vivo* en el
nemátodo *Haemonchus
contortus* (estadio adulto)**

Introducción	pág. 177
Metodología	pág. 179
Resultados	pág. 186
Discusión	pág. 196
Conclusiones	pág. 202
Bibliografía	pág. 203

INTRODUCCIÓN

Como ya se mencionó en el capítulo introductorio, las infecciones por nemátodos gastrointestinales constituyen una amenaza importante para la salud del ganado de pastoreo, siendo los nemátodos *Teladorsagia circumcincta*, *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* y *Nematodirus battus*, los más importantes para la producción ganadera. Estos parásitos limitan la productividad de los animales infectados, ya sea por efectos directos al competir por nutrientes o favorecer la remoción de los mismos una vez ingeridos, así como por efectos indirectos, debilitando mecanismos de defensa inmunológicos, afectando la capacidad de absorción gastrointestinal e, incluso, generando anemias (como es el caso del nemátodo hematófago *H. contortus*) (Sargison, 2012).

Además, como se comentó y justificó en el capítulo 4, existen evidencias de que en nemátodos la vía transcuticular es la ruta de acceso predominante para la entrada de xenobióticos como son los fármacos. Es por ello que también es de interés explorar la difusión intraparasitaria de los compuestos en un modelo de nemátodo como *H. contortus*, helminto de alta prevalencia e interés en especies productivas.

Así mismo, como se mencionó en el capítulo introductorio, los antihelmínticos benzimidazoles metilcarbamato son de amplio espectro de acción, presentando tanto efecto cestocida como nematocida. Por consiguiente, y dado que los estudios comparativos entre los benzimidazoles comercializados y sus compuestos híbridos análogos resulta una de las estrategias de diseño experimental utilizadas a lo largo de este trabajo, surge el interés de realizar estudios de difusión intraparasitaria en este nemátodo.

En los nemátodos, no sólo las características de su superficie externa (cutícula) difieren considerablemente del tegumento de los céstodos, sino que además cuentan con boca y tubo digestivo. La superficie más externa de la cutícula (epicutícula) está compuesta principalmente por carbohidratos, incluyendo azúcares cargados negativamente (por ejemplo sulfatados) así como por proteínas hidrofílicas. La penetración transepicuticular de compuestos polares es una evidencia de que la epicutícula no es una bicapa lipídica ininterrumpida, pero si cuenta con componentes involucrados en translocación de nutrientes (transportadores de glucosa, aminoácidos, etc.). La mayoría del tejido por debajo de la epicutícula (cutícula) consiste en colágeno o proteínas del tipo colágeno, así como por proteínas estructurales insolubles llamadas cuticulinas. En la cutícula también están presentes condroitin sulfato y mucopolisacáridos sulfatados, los que confieren carga negativa a la cutícula. Éste

tejido es un sitio importante de absorción de antihelmínticos y otras moléculas orgánicas pequeñas (Thompson y Geary, 1995).

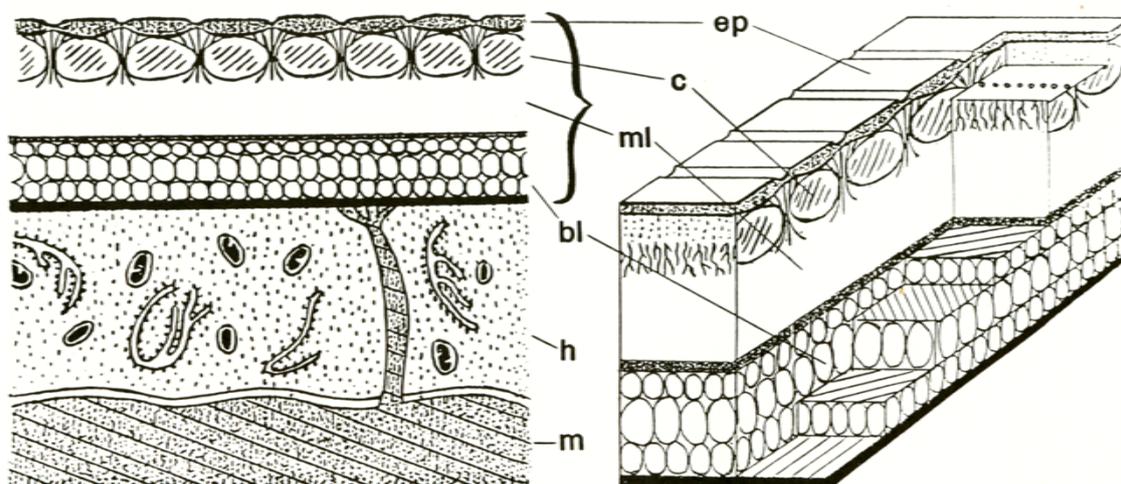


Figura 5.1. Esquema de la cutícula y estructuras subyacentes del nemátodo *A. summ.* ep: epicutícula; c: cortex; ml: medial layer (capa media); bl: basal lamellum (lamelo basal); h: hipodermis; m: músculo (adaptación de Thompson y Geary, 1995).

A su vez, el aumento del metabolismo de los fármacos antihelmínticos, así como del eflujo al medio extraparasitario, pueden ser mecanismos complementarios de resistencia del parásito (ver capítulo introductorio, figura 4).

Por lo expuesto, en este trabajo se estudió, mediante ensayos de difusión intraparasitaria *ex vivo*, el perfil de difusión y de biotransformación de los compuestos benzimidazoles antihelmínticos y los híbridos valerolactama-benzimidazol derivados. Estos estudios se realizaron utilizando gusanos adultos de una cepa de *H. contortus* farmacológicamente susceptible (cepa Kirby), así como especímenes adultos de *H. contortus* recuperados de abomasos de ovinos provenientes de frigorífico.

Con respecto a la susceptibilidad farmacológica del material parasitario proveniente del frigorífico, en el capítulo introductorio se comentó un estudio realizado en el año 2005 en establecimientos productores de ovinos en Uruguay, por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) (Mederos *et al*, 2005). El resultado del estudio reveló que el 97.7% de dichos establecimientos presentaron resistencia a benzimidazoles (no se caracterizó la abundancia relativa del genotipo responsable de dicha resistencia), siendo los géneros involucrados *Haemonchus* y *Trichostrongylus*. **Estos antecedentes hacen que los gusanos provenientes de abomasos de ovinos de frigorífico se presuman resistentes a benzimidazoles antihelmínticos.**

METODOLOGÍA

Materiales

Las sales utilizadas para preparar el buffer PBS fueron de calidad ppa y los solventes utilizados (acetonitrilo, metanol, acetato de etilo, acetona) para la preparación de muestras (extracción y clareo), así como para el análisis HPLC fueron calidad HPLC (J.T. Baker, Xalostoc, Mexico).

Para la determinación de la concentración de proteínas de los extractos parasitarios se empleó kit comercial de ácido bicinconínico (BCA) (Thermo Scientific Pierce).

Los benzimidazoles antihelmínticos ABZ, FLU y FEB fueron suministrados por Laboratorio Uruguay S.A. El resto de los compuestos ensayados fueron sintetizados como se describió en el capítulo 1 de la presente tesis.

Puesta a punto de metodología de clareo de matriz y extracción de analitos de *H. contortus*, adultos

Obtención del material parasitario

Se trabajó con gusanos adultos de *H. contortus*, recuperados manualmente de la mucosa y contenido abomasal de abomasos de ovejas con infección natural, provenientes de frigorífico (Frigorífico “Las Moras”, Chiadel S.A., La Paz, Canelones, Uruguay). Los parásitos se lavaron con buffer PBS pH 7.4 a 37°C, y fueron mantenidos en dicho buffer a 37°C y 5 % de CO₂ por una hora antes de realizar los experimentos de difusión *ex vivo*. En adelante se hará referencia a éste material parasitario como *Hc RB*, ya que, por lo expuesto en la introducción del presente capítulo, se presume sean resistentes a benzimidazoles antihelmínticos.

Por otra parte, se cuenta también con la cepa Kirby de *H. contortus*, farmacológicamente susceptible (particularmente a benzimidazoles). La misma (inóculo de larvas infectantes L3) fue importada y provista por el Dr. M. Knox, CSIRO-Armidale, Australia. Dicha cepa se utilizó para instalar una infección artificial en ovinos, mantenidos y estabulados en el Campo Experimental del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina (trabajo interdisciplinario en curso, bajo la supervisión del Dr. Pablo Alonzo). Para ello, se infectaron ovejas (previamente desparasitadas con Monepantel) vía oral con *H. contortus* estadio L3. Las mismas se mantuvieron

estabuladas y alimentadas con alfalfa peleteada. El protocolo de experimentación correspondiente a este modelo de infección artificial fue aprobado por el CEUA de Facultad de Medicina (protocolo nº exp: 071140-001021-11).

Por otra parte, este modelo ha permitido obtener, concretamente para este trabajo, parásitos adultos de abomaso de los ovinos infectados.

El material parasitario Kirby (adultos), se obtuvo a través de la recuperación manual de la mucosa y contenido abomasal de ovinos infectados y acondicionados de igual manera que para los gusanos provenientes de frigorífico. Este material susceptible a benzimidazoles se nombrará en adelante como *Hc SB*

a) Clareo con agua y acetonitrilo. Extracción en fase sólida

El material parasitario (50 gusanos en 0.7 mL de agua destilada) fue homogenizado por ultrasonido (Sonics Vibra Cell VCX130, Newtown, Connecticut, USA) a 0°C y 45% de amplitud (ciclos de 30 segundos de homogenización con 30 segundos de reposo). Se tomaron dos alícuotas del homogeinato de 10 µL cada una, para hacer determinación de proteínas (método BCA, Smith et al., 1985). Luego se agregaron 40 µL del estándar interno (SI: fenacetina) disuelto en metanol (concentración final en el homogeinato de 19 nmol/mL), y 50 µL de una solución pool de benzimidazoles (ABZ SX, FLU, ABZ, FEB) y de híbridos (8 y 10), alcanzándose una concentración final de éstos en el homogeinato de 2.5 nmoles/mL. Se agitó en vortex por 1 minuto.

Clareo con acetonitrilo: al homogeinato se agregaron 3 mL de acetonitrilo, se agitó 2 minutos en vortex. Una vez precipitadas las proteínas, se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos, se tomó el sobrenadante y se evaporó a sequedad.

Extracción en fase sólida: el residuo sólido obtenido se retomó en 1 mL de una mezcla agua: metanol (80:20). Dicha solución se cargó en un cartucho SepPak C18 pretratado (10 mL de metanol y luego 100mL de agua), lavándose primero con 10 mL de agua y luego se eluyó con 3.5 mL de metanol (descartándose los primeros 0.5 mL). El eluato se evaporó a sequedad y se retomó con 100 µL de metanol para ser analizado por HPLC.

b) Clareo con buffer fosfato pH 7.8 y acetonitrilo. Extracción en fase sólida

El material parasitario (50 gusanos) se suspendió en 0.7 mL de buffer fosfato pH 7.8, en lugar de agua. Luego se procedió igual que en a) para la homogenización y agregado de los analitos en la muestra.

Clareo con acetonitrilo: al homogenizado se agregaron 3 mL de acetonitrilo, se agitó 2 minutos en vortex. Una vez precipitadas las proteínas, se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos, se tomó el sobrenadante y se evaporó a sequedad.

Extracción en fase sólida: el residuo se retomó con 1 mL de una mezcla buffer fosfato pH 7.8: metanol (80:20), y se cargó en un cartucho SepPak C18 pretratado (10 mL de metanol y luego 10 mL de buffer fosfato pH 7.8). Se lavó con 10 mL de buffer fosfato pH 7.8 y luego se eluyó con 4 mL de metanol (descartándose los primeros 0.5 mL). El eluato se evaporó a sequedad y se retomó en 100 μ L de metanol para ser analizado por HPLC.

c) Clareo con buffer fosfato pH 7.8, desproteización previa al agregado de analitos y acetonitrilo. Extracción en fase sólida.

En éste método se incorpora un paso previo al agregado de los analitos en la matriz parasitaria. El material parasitario se homogeneizó por ultrasonido como en b) y luego se agregaron 1.4 mL de acetonitrilo (para desproteizar), previo al agregado de analitos, y se agitó 15 segundos. Se procedió a agregar 40 μ L del estándar interno (fenacetina), disuelto en metanol (concentración final en el homogenizado de 19 nmol/mL), y 50 μ L de una solución pool de benzimidazoles (FLU, ABZ, FEB) y de híbridos (8 y 10), alcanzándose una concentración final de éstos en el homogenizado de 2.5 nmoles/mL. Se agitó en vortex por 1 minuto y luego las etapas de clareo y extracción en fase sólida se realizaron como en b).

Para estimar los porcentajes de recuperación de cada método, se analizaron por HPLC soluciones en metanol (consideradas como el 100% de recuperación), en la misma concentración que las muestras a ensayar (2.5 nmoles/mL)

En el caso particular de los compuestos ABZ y 8 se constató sulfoxidación de los mismos (formación de ABZ SX y del compuesto 11, respectivamente) durante el procesamiento y preparación de muestras previo a realizar los estudios de difusión intraparasitaria, por lo que se investigó la oxidación de tales compuestos en particular.

Evaluación de la oxidación de ABZ y 8 durante el procesamiento (método c), en ausencia y presencia de la matriz parasitaria de *H. contortus* (cepas susceptible y resistente a benzimidazoles).

Primeramente se estudió el procesamiento y preparación de muestra en ausencia de matriz parasitaria. Para esto, a 0.7 mL de buffer fosfato (en lugar del homogeinato parasitario) se agregó una solución metanólica de ABZ, producto 8 o FEB (a los efectos de confirmar la observación de que no sufre sulfoxidación), para alcanzar una concentración final de 0.9 nmoles/mL. Las muestras se procesaron por el método c), y se determinó el porcentaje de recuperación, así como el porcentaje de oxidación, calculándose éste último a través de la ecuación 5.1. Los resultados de estos experimentos se informan como oxidación por proceso químico.

$$\% \text{ de oxidación en ausencia de matriz} = \frac{\text{nmoles de SX}_{\text{formados}}}{\text{nmoles de SX}_{\text{formados}} + \text{nmoles de ABZ o 8}_{\text{recuperados}}} \times 100 \quad \text{Ec.5.1}$$

Finalmente, se comparó el grado de oxidación provocado por el material parasitario de *H. contortus*, tanto *Hc RB* como *Hc SB*, durante el procesamiento de muestra (efecto matriz).

Para ambas cepas, se trabajó con 50 gusanos adultos de *H. contortus*, los que se procesaron por el método c), cargándoles además del estándar interno, una solución de ABZ o el híbrido 8 para alcanzar una concentración final de 0.9 nmoles/mL en el homogeinato. Cada compuesto se ensayó por quintuplicado y los resultados de estos experimentos se informan como oxidación por matriz parasitaria.

Los resultados de oxidación por matriz parasitaria que se informan son los obtenidos a partir de descontar a dichos valores, la oxidación que acontece por el proceso químico, es decir, en ausencia de material parasitario.

Validación de metodología de extracción y clareo, método c).

En base a los resultados preliminares obtenidos para los diferentes métodos, se decidió validar el método c), ya que permitió obtener los mayores porcentajes de recuperación para varios de los analitos ensayados.

Se construyeron curvas de calibración para los benzimidazoles antihelmínticos, compuestos híbridos y el derivado valerolactama 2, cargando concentraciones conocidas (por quintuplicado) de los diferentes compuestos sobre matrices de *H. contortus*. Los parámetros de regresión lineal se calcularon usando el software

GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, USA), por ajuste de mínimos cuadrados. Los porcentajes de recuperación se estimaron comparando las áreas obtenidas para las diferentes concentraciones de analitos sobre matriz parasitaria con aquellas obtenidas para soluciones en metanol en las mismas concentraciones. En los porcentajes de recuperación informados para ABZ y 8 se incluye lo que se formó por sulfoxidación (ABZ SX, y el híbrido 11) durante el procesamiento de las muestras con matriz parasitaria. La precisión del método se evaluó a través del coeficiente de variación (CV) para las diferentes concentraciones ensayadas sobre matriz parasitaria.

Ensayos de difusión ex vivo en *H. contortus*, estadio adulto (cepa Kirby y en parásitos provenientes de Frigorífico).

Se tomaron 50 gusanos adultos de *H. contortus*, recuperados de abomasos, ya sea de ovejas de frigorífico infectadas naturalmente (gusanos *Hc RB*) o de ovejas infectadas artificialmente con cepa Kirby (gusanos *Hc SB*). El material parasitario se trató como se describe en el ítem "Obtención de material parasitario".

Los parásitos se colocaron en botellas de cultivo celular conteniendo 5 mL de buffer PBS pH 7.4, a 37°C y 5% de CO₂. Se agregó solución en DMSO del producto a ensayar, de forma de alcanzar una concentración en el medio de incubación de 5 nmoles/mL (concentración de DMSO en el medio fue de 0.5%). Se eligió ésta concentración para trabajar ya que es la concentración que se alcanza en abomaso de ovinos luego de la administración de benzimidazoles antihelmínticos a dosis habituales de 5 mg/ kg (Hennesy et al., 1993; Sánchez et al., 1997). Se incubó por 30 minutos y una vez transcurrido el tiempo de incubación, el material se lavó con PBS y se transfirió a tubos de 15 mL de polipropileno, almacenándose a -20°C hasta su procesamiento (método c) y análisis por HPLC.

Metodología de análisis por HPLC

El análisis HPLC se realizó en un equipo Waters, con bomba binaria (Waters 1525) y detector de arreglo de diodos (Waters 2996), con un loop de inyección de 20 µL (Rheodyne 1727). Se utilizó una columna de fase reversa C18 (Zorbax Eclipse XBD, Agilent, 4.6 mm x 150 mm, 5 µm), una longitud de onda de detección de 290 nm para todos los analitos, con excepción del derivado valerolactama 2, para el que se usó una longitud de onda de 210 nm.

La fase móvil consistió en una mezcla ternaria de acetonitrilo (AcCN), metanol (MeOH) y acetato de amonio (NH₄Ac) 2 g/L (pH 6.8), según, bombas A: AcCN y B: AcCN:

MeOH: NH₄Ac (20:20:60). Se trabajó a flujo de 1 mL/min y con un programa de gradiente el cual se describe en la tabla 5.1 (en la que se informan además, los tiempos de retención para los analitos ensayados, con excepción de los que se comentan a continuación).

Para FEB, FEB SX y sus híbridos 10 y 12 respectivamente, se utilizó un programa de gradiente para una fase móvil compuesta por HAc 1%: AcCN : MeOH (70:15:15) los primeros 10 min y llegando a una composición (42:49:9) a los 15 min. En estas condiciones los tiempos de retención para el SI, FEB SX, 12, FEB y 10 fueron 7.8, 8.7, 15.8, 17.4 y 20.3 min respectivamente.

Para el compuesto 2, se trabajó en modo isocrático y con la fase móvil AcCN: H₂O (20:80), a flujo 1 mL/ min. Los tiempos de retención para 2 y el estándar interno (SI, fenacetina) fueron de 6.06 y 10.84 minutos respectivamente.

Los cromatogramas y el procesamiento de los mismos se llevó a cabo usando el software Empower System II (Waters Corporation, 2002).

Tabla 5.1. Programa de gradiente utilizado en el análisis por HPLC.

Tiempo (min)	Composición de fase móvil		Producto	Tiempo de retención (min)
	% A*	% B**		
0	0	100	ABZ SX	3,34
5	0	100	SI (Fenacetina)	4,79
8	30	70	11	7,87
12	30	70	FLU	8,78
15	35	65	ABZ	10,01
18	35	65	9	11,24
20	30	70	8	13,40
22	0	100		

*A: Acetonitrilo

**B: Acetato de amonio 2 g/L: Metanol: Acetonitrilo (60:20:20)

Estudios de correlación entre la capacidad de difusión ex vivo en H. contortus con los descriptores fisicoquímicos (lipofilia y volumen) y electrónicos (momento dipolar) de los compuesto ensayados.

En el capítulo 3 se presentaron los resultados de los descriptores de lipofilia (factor ϕ_0 determinado experimentalmente), momento dipolar y volumen (valores determinados computacionalmente) para los benzimidazoles antihelmínticos comerciales y sus análogos híbridos valerolactama- benzimidazol.

Análogamente a lo descrito para el modelo de céstodo (capítulo 4), se analizó la influencia de estos descriptores sobre la concentración intraparasitaria en los ensayos de difusión *ex vivo* de nemátodo.

Análisis estadístico

Se compararon los resultados obtenidos para los diferentes compuestos ensayados en los experimentos de difusión *ex vivo* aplicando un test de comparación múltiple, test de Tukey, con un 95 % de confianza (GraphPad Prism 5.00, La Jolla, CA, USA), y se estimaron diferencias significativas entre los mismos.

RESULTADOS

En la figura 5.2 se muestran los resultados de los porcentajes de recuperación obtenidos para los productos ABZ, 8, FEB, 10 y FLU, aplicando los diferentes métodos de clareo ensayados. El método c) presentó los mejores porcentajes de recuperación para FEB, 10 y FLU.

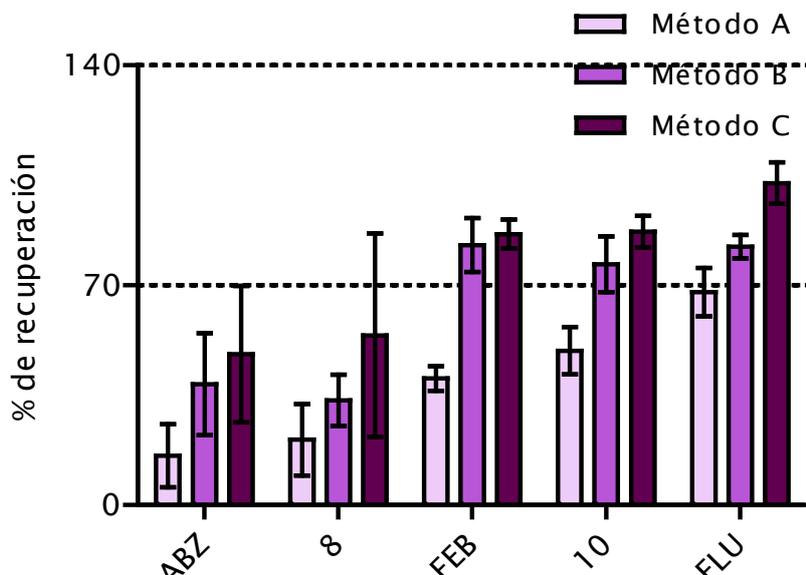


Figura 5.2. Porcentajes de recuperación de los diferentes métodos de clareo aplicados. Método A: muestra parasitaria en agua, clareo con acetonitrilo y extracción en fase sólida; Método B: muestra parasitaria en buffer fosfato pH 7.8, clareo con acetonitrilo y extracción en fase sólida; Método C: muestra parasitaria en buffer fosfato pH 7.8, con desproteínización previa al agregado de analitos, clareo con acetonitrilo y extracción en fase sólida.

Para los productos ABZ y 8, los porcentajes de recuperación fueron notablemente menores, e interesantemente, se observó la presencia de los metabolitos ABZ SX y 11, respectivamente, cuantificándose los mismos. Esto podría explicar los bajos porcentajes de recuperación para los compuestos de origen, ABZ y 8.

Los porcentajes de recuperación de los compuestos antes mencionados fueron determinados para muestras cargadas en pool, es decir, al material parasitario se agrega una solución en metanol que contiene los cinco compuestos. Por lo tanto, para el caso de ABZ y 8, el grado de oxidación por parte de la matriz parasitaria podría ser diferente en caso de que ambos compuestos se encuentran en la muestra (competencia de las moléculas por la maquinaria enzimática) o se ensayen por separado.

Por este motivo, se decidió estudiar la oxidación de ABZ y 8 de manera independiente, durante el procesamiento (método c), en ausencia y presencia de la matriz parasitaria de *H. contortus*.

En este sentido, en ausencia de material parasitario, se observó un importante grado de oxidación para ABZ, en menor grado para 8, y no se observó oxidación para FEB. En la tabla 5.2 se informan los resultados correspondientes.

Tabla 5.2- Resultados de los estudios de oxidación en ausencia de matriz parasitaria, durante el procesamiento por método c) de muestras conteniendo ABZ, FEB u 8, a una concentración de 0.9 nmoles/mL.

Producto	% de recuperación ($\bar{X} \pm S.D.$)	% de oxidación en ausencia de matriz ($\bar{X} \pm S.D.$)	% de recuperación de ABZ y 8 TOTAL (se incluye el sulfóxido) ($\bar{X} \pm S.D.$)
ABZ	56.9 \pm 14.2	47.1 \pm 1	102.8 \pm 16.4
8	65.3 \pm 9.9	13.9 \pm 3.7	75.6 \pm 9.3
FEB	92.2 \pm 8.1	N.D.	---

\bar{X} : Promedio de cinco experimentos; S.D.: desviación estándar; N.D.: no detectado.

Además, para ABZ (concentración 0.9 nmol/ mL), se repitió dicho experimento bajo diferentes condiciones (pH, ausencia de oxígeno), que permitieran estimar cómo afectan la oxidación química observada durante el procesamiento de muestras en ausencia de material parasitario. Se utilizó en todos los casos para el tratamiento de muestra el método c) descrito, y se obtuvieron para las condiciones estudiadas, los siguientes resultados:

- en lugar de buffer fosfato pH 7.8, se usó agua destilada (0.7 mL, pH 5.7), obteniéndose un porcentaje de sufoxidación de ABZ de un 11.4%.
- se utilizó buffer fosfato pH 7.8 (0.7 mL) y acetonitrilo previamente desgaseados por ultrasonido y bajo corriente de nitrógeno (atmósfera inerte) obteniéndose un porcentaje de oxidación de ABZ de un 13.8 %.

Por otra parte, se estudió el grado de oxidación que acontece durante el procesamiento de muestras en presencia de la matriz parasitaria de *H. contortus*, para muestras conteniendo los productos ABZ y 8 (procesadas por método c). Los resultados de dichos experimentos se informan en la tabla 5.3. Los mismos fueron corregidos por la oxidación producida durante el procesamiento en ausencia de matriz parasitaria (oxidación química), en consecuencia, estos resultados corresponden a la oxidación por matriz parasitaria, exclusivamente.

La corrección realizada consistió en descontar a los nmoles de SX medidos (total), los nmoles de SX producidos en los experimentos en ausencia de material parasitario (nmoles SX por oxidación química sin parásitos) resultando así los nmoles de SX producidos exclusivamente por oxidación parasitaria (nmoles SX oxid. parasitaria).

Por lo tanto, los nmoles de SX producidos en los experimentos en ausencia de material parasitario se calcularon a través de la ecuación 5.2.

$$\text{nmoles SX}_{\text{oxid. sin parásitos}} = \frac{\text{nmoles SX}_{\text{medidos (Total)}} \times \% \text{ oxid. en ausencia de matriz}}{100} \quad \text{Ec. 5.2}$$

Dónde el valor del % de oxidación en ausencia de matriz fue calculado a partir de la ecuación 5.1 (ver ítem metodología).

Los nmoles de SX producidos por oxidación parasitaria exclusivamente (nmoles SX oxid. parasitaria), durante el procesamiento, se calculan entonces por medio de la ecuación 5.3

$$\text{nmoles SX}_{\text{oxid. parasitaria}} = \text{nmoles SX}_{\text{medidos (Total)}} - \text{nmoles SX}_{\text{oxid. sin parásitos}} \quad \text{Ec. 5.3}$$

La ecuación 5.4, permite entonces calcular el porcentaje de oxidación por la matriz parasitaria según:

$$\% \text{ de oxid. parasit.} = \frac{\text{nmoles SX}_{\text{oxid. parasitaria}}}{\text{nmoles ABZ}_{\text{medidos}} + \underbrace{\text{nmoles SX}_{\text{oxid. sin parásitos}} + \text{nmoles SX}_{\text{oxid. parasitaria}}}_{\text{nmoles SX}_{\text{medidos (Total)}}}} \times 100 \quad \text{Ec. 5.4}$$

Tabla 5.3. Resultados del efecto matriz (oxidación) *H. contortus* durante el procesamiento.

Producto	% de oxidación por matriz parasitaria ($\bar{X} \pm S.D.$)	
	<i>Hc RB</i>	<i>Hc SB</i>
ABZ	46.0 ± 4.2	37.7 ± 8.2
8	62.0 ± 3.3	67.3 ± 2.8

\bar{X} : promedio de cinco experimentos ; S.D.: desviación estándar; *Hc RB*: gusanos adultos provenientes de abomaso de ovinos de Frigorífico; *Hc SB*: cepa Kirby susceptible.

El análisis estadístico de los resultados expuestos en la tabla 5.3, mostraron que no existen diferencias significativas en el porcentaje de oxidación durante el procesamiento, para el mismo compuesto analizado, entre el material parasitario *Hc RB* y *Hc SB*.

Se validó el procedimiento de extracción y clareo (método c), para benzimidazoles antihelmínticos, compuestos híbridos y el derivado valerolactama 2. Se determinó el porcentaje de recuperación del método para cada analito, y se construyeron sus curvas de calibración. Los parámetros de la validación se presentan en la tabla 5.4. Para el caso particular de ABZ y el híbrido 8, los porcentajes de recuperación informados incluyen la fracción oxidada que se produce (ABZ SX y el compuesto 11), durante el procesamiento de la muestras.

Tabla 5.4. Validación del método analítico. Parámetros de regresión lineal, recuperaciones analíticas y precisión para benzimidazoles antihelmínticos, híbridos y el derivado valerolactama 2, en matriz parasitaria *H. contortus* adulto.

Producto	Conc. nmol/mL (rango)	Pendiente ± IC (95%)	Intercepto ± IC (95%)	r ²	% Recuperación (rango)	%CV
ABZ SX	0.60 - 2.50	0.640 ± 0.013	-0.087 ± 0.021	0.99	93.8 - 106.6	<10
*ABZ	0.54 - 2.71	0.340 ± 0.006	-0.012 ± 0.011	0.99	75.8 - 94.4	<17
FLU	0.62 - 2.10	0.276 ± 0.016	0.010 ± 0.022	0.96	64.3 - 72.7	<13
FEB	0.60 - 2.50	0.425 ± 0.020	-0.030 ± 0.033	0.97	70.1 - 82.1	<13
*8	0.55 - 2.74	0.307 ± 0.007	-0.011 ± 0.011	0.99	81.8 - 94.5	<11
9	0.37 - 1.60	0.322 ± 0.010	0.018 ± 0.010	0.99	94.8 - 102.4	<15
10	0.59 - 2.50	0.557 ± 0.020	-0.071 ± 0.033	0.98	80.4 - 92.8	<9
11	0.60 - 2.50	0.499 ± 0.014	0.002 ± 0.023	0.99	90.9 - 99.7	<14
2	0.5	---	---	---	89.0	<20

IC: Intervalo de confianza, con un 95% de confianza; CV: coeficiente de variación; cada concentración se ensaya por quintuplicado

* Se incluye en los porcentajes de recuperación de ABZ y 8, lo que se formó de ABZ SX y 11

Los resultados de los experimentos de difusión intraparasitaria *ex vivo* en especímenes adultos de *H. contortus* provenientes de abomasos de ovinos de frigorífico (*Hc RB*) se presentan en la tabla 5.5 y figura 5.3.

Tabla 5.5 Resultados de los ensayos de difusión intraparasitaria *ex vivo* en *H. contortus*. La concentración intraparasitaria se expresa como nmoles/ 100 mg de proteínas de extracto parasitario

Producto	Concentración intraparasitaria en <i>H. contortus</i> (<i>Hc RB</i>) (nmoles/ 100 mg de proteínas) ($\bar{X} \pm S.D.$)
ABZ	3.49 ± 1.35
VAL-ABZ (8)	3.12 ± 0.79
FEB	6.15 ± 1.97
VAL-FEB (10)	4.36 ± 1.44
FLU	4.00 ± 0.80
VAL-FLU (9)	1.71 ± 0.24
Valerolactama (2)	N.D.

\bar{X} : promedio de cinco réplicas; S.D.: desviación estándar; *Hc RB*: parásitos adultos provenientes de abomaso de ovinos de Frigorífico; N.D.: no detectado

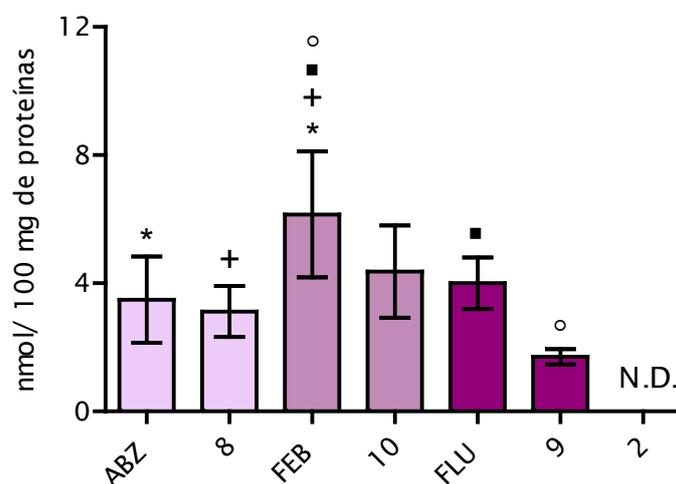


Figura 5.3. Resultados de difusión *ex vivo* en *H. contortus* proveniente de abomaso de ovinos de frigorífico (*Hc RB*). Los símbolos (*), (+), (■), (○), representan diferencias significativas con un 95% de confianza.

En los estudios de difusión de ABZ, FEB y 8 se observó la oxidación de los mismos a sus metabolitos ABZ SX, FEB SX y 11, respectivamente. Los metabolitos fueron cuantificados y su concentración se sumó a las concentraciones intraparasitarias obtenidas del compuesto de origen, por lo que los valores informados en la tabla 5.5 y figura 5.3, corresponden a las concentraciones totales de los compuestos de origen que ingresaron al medio intraparasitario.

El análisis estadístico de resultados indica que la concentración intraparasitaria alcanzada por los compuestos híbridos no presentó diferencias significativas respecto al benzimidazol precursor. El derivado valerolactama 2 no ingresó (no detectado) al medio intraparasitario en el tiempo de difusión *ex vivo* ensayado.

En la figura 5.4 se presentan cromatogramas tipo, obtenidos en los ensayos de difusión intraparasitaria para los compuestos ABZ, FEB y 8. En los mismos se observa la presencia de sus metabolitos sulfoxidados (ABZ SX, FEB SX y 11, respectivamente).

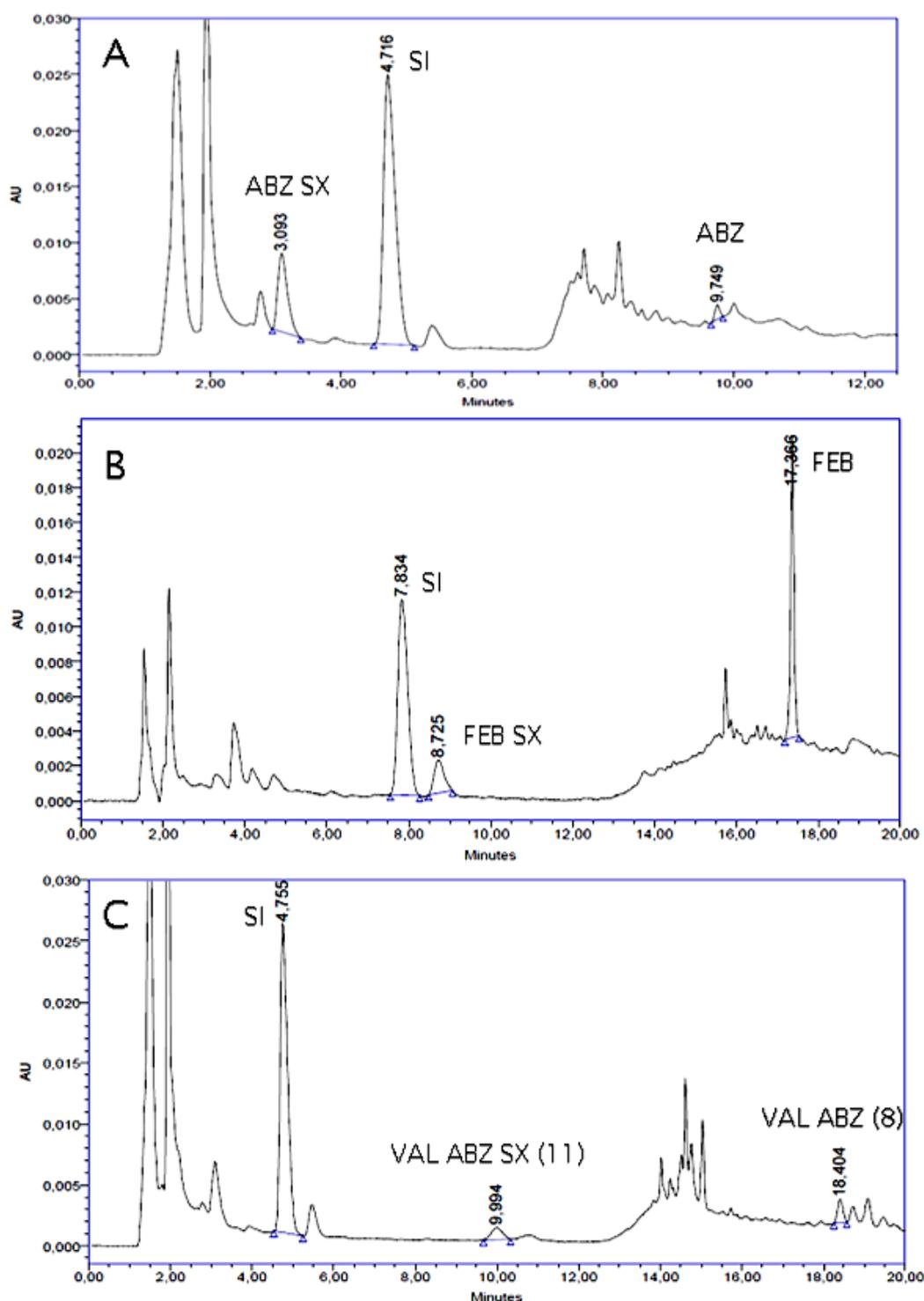


Figura 5.4. Cromatogramas de ensayos de difusión intraparasitaria en *H. contortus* (*Hc RB*), donde se incubó con ABZ (A), FEB (B) o 8 (C), en las condiciones experimentales descritas en sección metodología.

Los resultados de difusión *ex vivo* comparativos de los compuestos ABZ, 8, FEB, en gusanos adultos de *H. contortus* susceptibles *Hc SB* y provenientes de abomasos de ovinos de frigorífico, *Hc RB*, se presentan en la figura 5.5. El análisis estadístico de los resultados no revela diferencias significativas en la capacidad de difusión intraparasitaria en *Hc RB* y *Hc SB*, para los analitos ensayados, en las condiciones experimentales descritas.

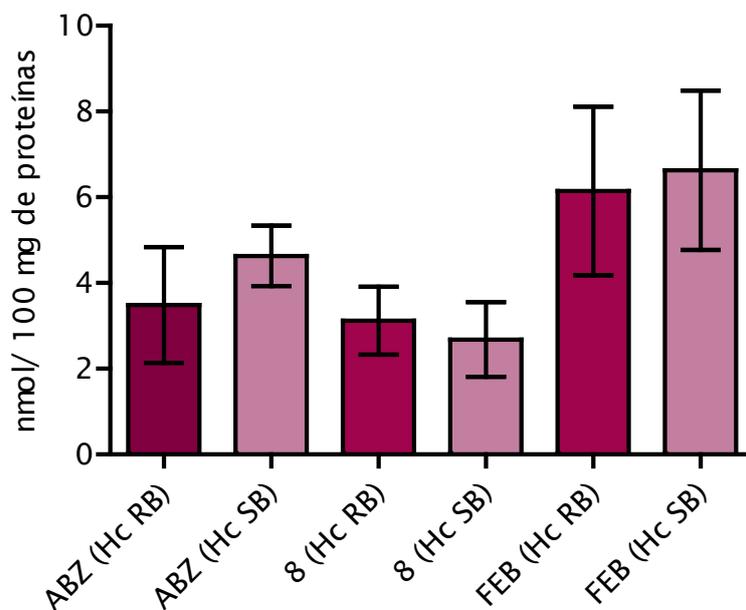


Figura 5.5 Resultados de difusión *ex vivo* en especímenes adultos de *H. contortus*, cepa susceptible (*Hc SB*) y proveniente de abomasos de ovinos de frigorífico (*Hc RB*).

Los resultados de los porcentajes de oxidación alcanzados durante los experimentos de difusión intraparasitaria *ex vivo*, para ABZ, 8 y FEB, tanto en *Hc RB* como en *Hc SB*, se muestran en la figura 5.6.

Para el resto de los compuestos ensayados, en las condiciones experimentales de difusión, así como de análisis HPLC, no se detectaron metabolitos.

El análisis estadístico de los resultados demuestra que el porcentaje de oxidación para los compuestos 8 y FEB cuando se ensayaron en *H. contortus* RB fue significativamente mayor (54.1 y 25.5 %, respectivamente) que para *H. contortus* SB (38.2 y 8.8%, respectivamente). Para el caso de ABZ no existen diferencias significativas en los porcentajes de oxidación entre las dos cepas de *H. contortus*, bajo las condiciones experimentales descritas.

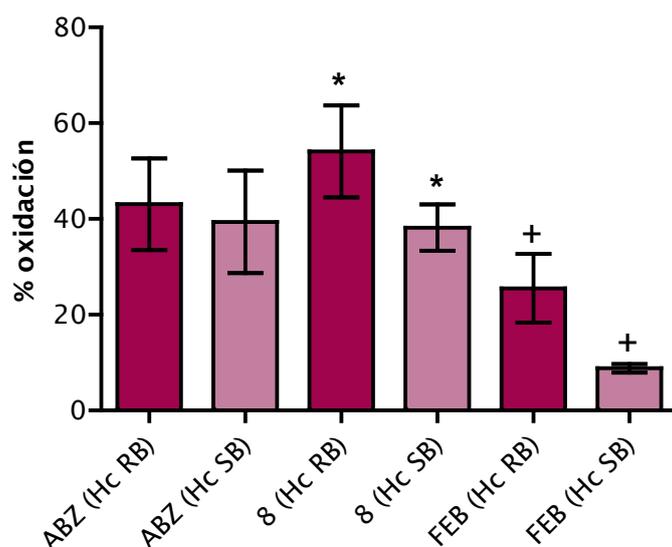


Figura 5.6. Porcentajes de oxidación alcanzados durante los ensayos de difusión *ex vivo* de los productos ABZ, 8, y FEB, en *H. contortus* susceptible (*Hc SB*) y gusanos provenientes de abomasos de ovinos de frigorífico (*Hc RB*). (*) y (+) presentan diferencias significativas (95% de confianza).

Por otra parte, en la figura 5.7 se comparan los resultados de concentraciones intraparasitarias alcanzadas en el modelo de céstodo *M. vogae* (discutido en el capítulo 4) y en el modelo de nemátodo *H. contortus RB*. En las condiciones experimentales ensayadas, todos los compuestos (exceptuando el híbrido 9), alcanzaron una concentración intraparasitaria significativamente mayor en el modelo de céstodo que en el modelo de nemátodo.

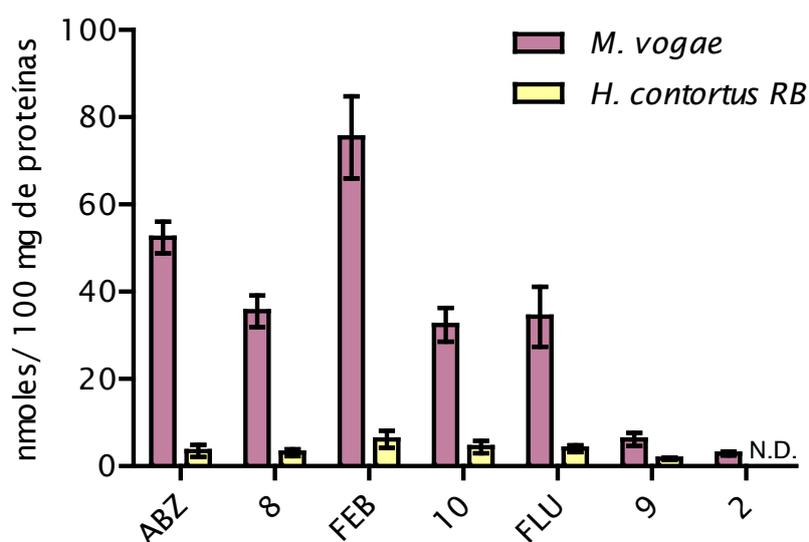


Figura 5.7. Comparación de capacidad de difusión intraparasitaria *ex vivo* entre el modelo de céstodo *M. vogae* y el modelo de nemátodo *H. contortus RB* (proveniente de abomaso de ovinos de frigorífico) (N.D.: no detectado). La capacidad de difusión intraparasitaria fue significativamente mayor en el modelo de céstodo para todos los compuestos, salvo el producto 9.

Finalmente, en la figura 5.8 se compara la capacidad sulfoxidativa en los dos modelos para los compuestos ABZ, 8 y FEB. El análisis estadístico de resultados mostró para ABZ una oxidación significativamente mayor en el modelo de nemátodo que en el de céstodo, mientras que no se detectó oxidación para el híbrido 8 en los ensayos de difusión *ex vivo* en *M. vogae*.

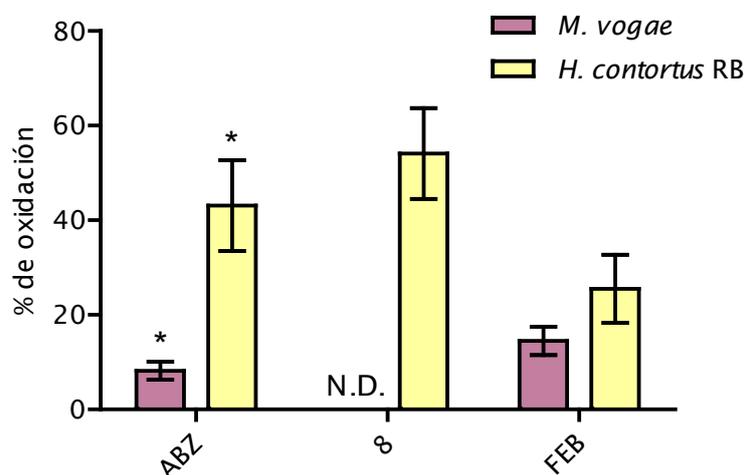


Figura 5.8. Comparación de capacidad oxidativa de *M. vogae* vs *H. contortus* RB (proveniente de abomasos de ovinos de frigorífico), durante los ensayos de difusión *ex vivo*. (N.D.: no detectado). (*) Diferencias significativas, con un 95% de confianza.

En la tabla 5.6 se presentan los resultados del análisis y búsqueda de nivel de correlación entre los descriptores fisicoquímicos (determinados en el capítulo 3) y la concentración intraparasitaria alcanzada en los ensayos de difusión *ex vivo* para los compuestos analizados.

Tabla 5.6. Resultados de los descriptores fisicoquímicos (lipofilia y volumen) y electrónico (momento dipolar) para los compuestos ensayados y sus concentraciones intraparasitarias alcanzadas en el modelo de difusión *ex vivo* en *H. contortus* RB.

Producto	Factor de Lipofilia φ_0 ^(a)	Momento dipolar (Debye) ^(b)	Volumen molecular (Å^3) ^(c)	Concentración intraparasitaria en <i>H. contortus</i> RB (nmoles/ 100 mg de proteínas) ($\bar{X} \pm S.D.$)
2	30.8	5.7594	682.75	N.D.
ABZ	58.0	4.7831	794.11	3.49 \pm 1.35
8	58.8	4.9439	1329.15	3.12 \pm 0.79
FLU	50.6	5.0531	851.32	4.00 \pm 0.80
9	56.2	8.8355	1381.50	1.71 \pm 0.24
FEB	62.5	3.7625	850.28	6.15 \pm 1.97
10	67.1	6.9678	1383.94	4.36 \pm 1.44

^(a) Determinado experimentalmente por HPLC, fase reversa, de acuerdo con Valko *et al.*, 1993; ^(b)

^(c) El momento dipolar y el volumen molecular se calcularon, luego de la optimización de la geometría, usando Gaussian09 a un nivel de teoría B3LYP/6-311++G(3df,2pd); N.D.: no detectado.

Para la serie de compuestos híbridos 8, 9 y 10, se encontró una correlación lineal, directamente proporcional, entre la lipofilia y la concentración intraparasitaria ($r^2= 0.89$) alcanzada luego del ensayo de difusión *ex vivo*. No obstante, a diferencia de lo que ocurre en el modelo de *M. vogae* (ver capítulo 4), no fue posible correlacionar el parámetro de lipofilia con la capacidad de difusión para la serie de benzimidazoles antihelmínticos comerciales.

Con respecto al momento dipolar, se encontró una cierta correlación lineal ($r^2= 0.51$) e inversamente proporcional, entre ambos parámetros, indicando que el aumento en el momento dipolar de la molécula desfavorecería la capacidad de ingreso al parásito (figura 5.9). Además se puede observar que compuestos con valores de momento dipolar comparables, como es el caso de FLU, ABZ y 8, alcanzaron concentraciones intraparasitarias que no presentan diferencias significativas entre ellas.

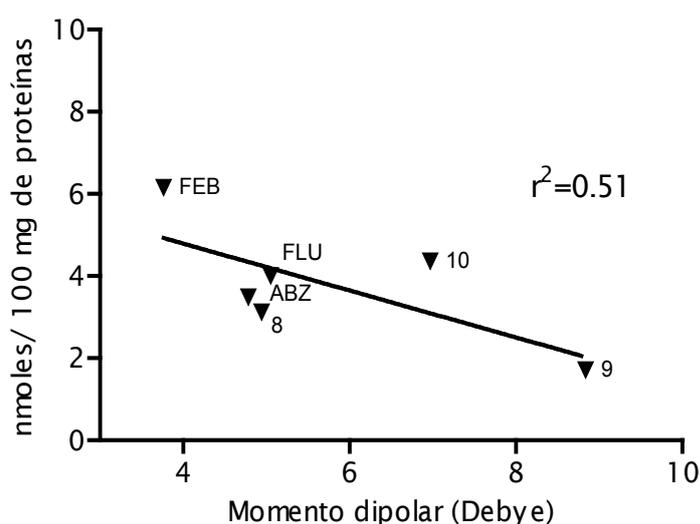


Figura 5.9. Estudio de correlación entre la concentración intraparasitaria (nmoles/ 100 mg de proteínas) alcanzada luego del ensayo de difusión *ex vivo* en *H. contortus* para los benzimidazoles antihelmínticos y derivados híbridos y el momento dipolar de los mismos.

En cuanto al volumen molecular, se vio que para compuestos con volúmenes similares (serie benzimidazol por ejemplo), la capacidad de entrada a *H. contortus* no correlaciona con éste parámetro. Al comparar la concentración intraparasitaria de los compuestos con valores de lipofilia y momento dipolar similares, pero volúmenes muy diferentes, como es el caso de ABZ y el derivado híbrido 8, el compuesto con mayor volumen (8) no presenta diferencias significativas en la capacidad de difusión intraparasitaria respecto a ABZ. Lo mismo acontece al comparar los pares FEB y 10 o FLU y 9.

DISCUSIÓN

Se logró poner a punto metodología de extracción y clareo para la matriz parasitaria de *H. contortus* y los compuestos ensayados. La metodología fue validada determinando las curvas de calibración de las moléculas en estudio, sus porcentajes de recuperación y coeficientes de variación para el método seleccionado (el cual constó en una desproteización primaria con acetonitrilo seguido de extracción en fase sólida por SepPak C18) (Munguía *et al.*, 2015)

Cómo se describió en el apartado de metodología, para la suspensión del material parasitario se utilizó buffer fosfato pH 7.8 en lugar de agua destilada, como se procedió con *M. vogae*, con el fin de mejorar los porcentajes de recuperación. Se elige trabajar a pH 7.8 ya que los benzimidazoles antihelmínticos se encuentran en estado no ionizado en un rango de pH que va de 7 a 11 aproximadamente (Danaher *et al.*, 2007). Si bien mejoró la recuperación de la mayoría de los compuestos evaluados, se observó un importante efecto sulfoxidativo de ABZ y su análogo híbrido 8 durante el método de procesamiento utilizado. Se prepararon muestras sin material parasitario, conteniendo ABZ, 8 y FEB en buffer fosfato pH 7.8 y se las procesó de la misma forma que las muestras, conteniendo material parasitario. Como resultado se vio una importante oxidación química, no enzimática, durante el procesamiento para ABZ y en menor grado para 8. FEB no sufrió oxidación durante el método de procesamiento. A su vez, para ABZ se ensayaron diferentes condiciones para el tratamiento de muestra, donde el desgaseado previo de los solventes (acetonitrilo y buffer fosfato pH 7.8), así como la sustitución del buffer por agua destilada (pH 5.7), disminuyen los porcentajes de oxidación de ABZ (13.8 y 11.4 % respectivamente), significativamente menores que los observados en las condiciones del método c) (47.1% de oxidación de ABZ).

La susceptibilidad a sufrir reacciones redox de los benzimidazoles y sus híbridos fue predicha y descrita en el capítulo 3 a partir de los cálculos de sus propiedades electrónicas (energías de HOMO y LUMO, $GAP_{HOMO-LUMO}$). De ellos se desprende que los compuestos híbridos serían más propensos a sufrir reacciones redox que sus análogos benzimidazoles ya que sus energías de GAP son menores. Sin embargo, en los experimentos de oxidación no enzimática (en ausencia de material parasitario), el ABZ presentó una mayor susceptibilidad a la oxidación que su derivado híbrido 8. Se requiere una mayor profundización en estudios de la reactividad de estas moléculas para una mejor interpretación de estas observaciones.

Las concentraciones obtenidas de los metabolitos sulfoxidados de ABZ y 8 en ausencia de parásito (no enzimática) se utilizaron para corregir la oxidación que se

produce en presencia del material parasitario (oxidación enzimática). Aún realizando esta corrección, el porcentaje de oxidación de ABZ y 8 por efecto matriz (tanto *H. contortus* RB o SB) durante la preparación de las muestras, resultó ser muy importante. Por el contrario, para FEB o su híbrido 10, no se observó efecto matriz durante el procesamiento de muestras.

Del análisis de los resultados de los ensayos de difusión *ex vivo* propiamente dichos, FEB fue el compuesto que alcanzó una mayor concentración intraparasitaria, seguido de su híbrido derivado 10, mientras que en el otro extremo, el derivado valerolactama 2 no permeó la barrera parasitaria en las condiciones ensayadas. Este resultado para el derivado 2 es congruente con lo comunicado anteriormente (Munguía *et al.*, 2013), donde se pudo demostrar que el motivo por el cual los derivados valerolactama presentaban una baja o nula actividad *in vivo*, a pesar de su muy buena actividad *in vitro*, era su baja velocidad para sortear la barrera externa del parásito (nemátodo *N. brasiliensis*, L4).

Una vez más, los resultados de difusión intraparasitaria ahora en *H. contortus*, confirman el acierto de haber utilizado la estrategia de hibridación molecular para optimizar la permeación de esta serie de potenciales antihelmínticos en este nemátodo de interés productivo (Munguía *et al.*, 2015)

Como ya fuera mencionado en la introducción del presente capítulo, en la cutícula de los nemátodos, inmersos en la matriz colagénica existen poros lipídicos, por los cuales podrán difundir xenobióticos como los antihelmínticos. Por esta razón, el carácter lipófilo de las moléculas influirá en su posibilidad para ingresar al medio intraparasitario.

Al analizar los resultados de las concentraciones intraparasitarias respecto al carácter lipófilo de las moléculas ensayadas, se vio que para los compuestos híbridos existe una relación lineal ($r^2=0.89$), siendo directamente proporcionales. Por el contrario, no se encontró este nivel de correlación para la serie de benzimidazoles, si bien FEB, el compuesto más lipófilo de la serie alcanzó las mayores concentraciones intraparasitarias observadas.

A diferencia de lo que se ha descrito en estudios de difusión para compuestos diversos en el trematodo *Schistosoma mansoni* (Bocasch *et al.*, 1981) o para benzimidazoles antihelmínticos en el céstodo *M. benedeni* (Mottier *et al.*, 2003), donde se encontró correlación entre la capacidad de difusión intraparasitaria y la lipofilia (log K) para los compuestos estudiados, no fue así en estudios de difusión en nemátodos.

Por este motivo, se investigó la influencia de otros parámetros, como el momento dipolar y el volumen molecular. Se seleccionaron estos descriptores teniendo en cuenta antecedentes (Ho, *et al.*, 1990), donde se estudiaron las propiedades biofísicas de la cutícula de *A. suum* y se concluye que existen poros acuosos (radio aproximado de 15 Å) en la matriz de colágeno que cumplen un rol de primer tamiz discriminatorio, permitiendo el pasaje de las moléculas en función de su tamaño molecular. A los efectos solamente orientativos de relación de tamaños, un antihelmíntico voluminoso como ivermectina presenta un radio de 6 Å (Ho *et al.*, 1990). Seguidos a los poros acuosos, se encuentran los poros lipídicos, como se mencionara anteriormente. Por lo tanto, sumado a la restricción impuesta por el tamaño molecular, el momento dipolar podría influir en la habilidad de estas moléculas para ingresar y atravesar tanto los poros acuosos como los poros lipófilos.

En tal sentido, la correlación estudiada entre la concentración intraparasitaria y momento dipolar ($r^2= 0.51$), mostró ser inversamente proporcional, tanto en el caso de la serie benzimidazólica, como la serie de compuestos híbridos. Esta observación podría sugerir que la etapa determinante para el ingreso al medio intraparasitario de un compuesto estaría dada por el pasaje a través de los poros lipófilos (y no por los poros acuosos), justificando entonces la relación inversa entre el momento dipolar y la difusión intraparasitaria en el entorno hidrofóbico.

Con respecto al estudio de correlación entre difusión intraparasitaria y volumen molecular, al igual que lo descrito para el céstodo *M. vogae* (capítulo 4), no se observó correlación.

Como ya se señaló, la cutícula del nemátodo está compuesta por glicoproteínas cargadas, carbohidratos y una matriz colagénica, por lo que la parte lipídica no presenta la predominancia como en el tegumento del céstodo (capítulo 4). En éste sentido, las concentraciones intraparasitarias alcanzadas en el modelo de *M. vogae* en comparación con *H. contortus* son mucho mayores para cualquiera de los compuestos estudiados (un promedio de nueve veces más en el modelo de céstodo). Estos resultados se encuentran en acuerdo con lo publicado previamente (Mottier *et al.*, 2006) donde los estudios de difusión de FEB en el modelo de *nemátodo A. suum* alcanzaron concentraciones intraparasitarias mucho menores que en el céstodo *M. benedeni*, inclusive a un tiempo de incubación mayor (90 min).

Por otra parte, se demostró que el metabolismo oxidativo en *H. contortus* de ABZ, 8 y FEB (para dar ABZ SX, 11 y FEB SX) fue mayor que lo observado en el céstodo

M. vogae (5.3 y 1.8 veces mayor para ABZ y FEB respectivamente), en tanto el compuesto 8, solo sufrió oxidación en el modelo de nemátodo (Munguía *et al.*, 2015). Estos resultados muestran ciertas similitudes con lo informado en literatura (Solana *et al.*, 2001), donde se estudió la biotransformación de ABZ en fracciones microsomales y citosólica de los helmintos *M. expansa* (cestodo), *A. suum* (nemátodo) y *F. hepática* (tremátodo). En dichos experimentos, la sulfoxidación de ABZ por la fracción microsomal, en presencia de NADPH, no presentó diferencias significativas entre el céstodo y el nemátodo. Sin embargo, en la fracción citosólica de *A. suum*, en presencia de NADPH, la sulfoxidación fue significativamente mayor que para el caso de *M. expansa*.

Como se mencionó en el capítulo introductorio, los mecanismos de resistencia a antihelmínticos se pueden discriminar en mecanismos farmacodinámicos-mediados (cambios en el blanco terapéutico) o farmacocinéticos-mediados. En éstos últimos se incluyen procesos como el aumento del eflujo de fármaco (aumento de la expresión de P-gp, por ejemplo) del medio intraparasitario y el aumento en la inactivación del fármaco (metabolismo aumentando), llevando ambos procesos a una disminución de la concentración de fármaco activo en el medio intraparasitario reduciendo así el efecto.

En este trabajo se demostró, bajo las condiciones experimentales definidas, que no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones intraparitarias alcanzadas por los diferentes compuestos en *H. contortus* provenientes de frigorífico (probablemente resistentes a benzimidazoles antihelmínticos, *Hc RB*) y los susceptibles (kirby, *Hc SB*).

Para los benzimidazoles antihelmínticos, la información disponible respecto al rol de la P-gp en el desarrollo de resistencia a los mismos, resulta escasa. Se ha estudiado el rol de los transportadores MDR en el transporte del marcador fluorescente rodamina 123 en huevos de *H. contortus* resistentes a tiabendazol y albendazol, observándose una disminución en la acumulación del marcador en los huevos de las cepas resistentes a benzimidazoles, sugiriendo indirectamente un aumento en la actividad P-gp en las cepas resistentes (Beugnet *et al.*, 1997). Así mismo, se informó también para benzimidazoles, cambios en la frecuencia de alelos en un gen que codifica para P-gp, comparando cepas de *H. contortus* resistente y susceptible a cambendazol (Blackhall *et al.*, 2008). Ninguno de estos trabajos es concluyente respecto a la implicancia de los transportadores ABC y el desarrollo de resistencia a benzimidazoles antihelmínticos.

Sin embargo, sí se observó diferencia entre la capacidad oxidativa de las cepas de *H. contortus*, *Hc SB* y *Hc RB*. El porcentaje de oxidación de FEB y del compuesto híbrido 8, fueron significativamente mayores para los gusanos *Hc RB* (25.5 y 54.1 % respectivamente) que en la cepa susceptible *Hc SB* (8.8 y 32.2 % respectivamente).

Resulta destacable como resultado, el no haber observado oxidación del compuesto híbrido 10 en los ensayos *ex vivo* con *Hc RB* ni con *Hc SB*, lo que sugiere fuertemente que el mecanismo de biotransformación para este compuesto híbrido no es utilizado por el parásito como forma de defensa

Con respecto a la biotransformación de FLU (reducción), no se observó en los estudios de difusión con *H. contortus*, en las condiciones ensayadas, lo que condice con lo reportado (Cvilink *et al.*, 2008), habiendo observado la formación del metabolito reducido de FLU después de 12 horas de incubación, y no antes.

La información a la fecha de las vías oxidativas involucradas en la detoxificación de xenobióticos por parte de parásitos helmintos, no es del todo clara (Kotze *et al.*, 2006; Cvilink *et al.*, 2009) y menos aún, su papel en el desarrollo de resistencia a antihelmínticos.

Uno de los pocos ejemplos donde se describe el papel del aumento del metabolismo oxidativo vinculado al posible desarrollo de resistencia, lo constituye el caso del benzimidazol triclabendazol. Efectivamente, para el mismo se observó una oxidación más importante y rápida, tanto para el propio triclabendazol (para dar el sulfóxido, activo), como para su metabolito activo triclabendazol sulfóxido (para dar la sulfona, inactiva) en la cepa resistente de *F. hepática* (comparado con la cepa susceptible, Álvarez *et al.*, 2005).

En la misma línea, se han desarrollado algunos estudios donde se comparó la biotransformación de ABZ en cepas de *H. contortus* susceptibles y resistentes a antihelmínticos. En ese sentido, no se observaron diferencias relevantes en las enzimas estudiadas con rol oxidativo (peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa), así como se comprobó ausencia de actividad CYP 450 en las diferentes cepas ensayadas. Recientemente, en la misma comunicación, se describe por primera vez actividad de la enzima de fase II UDP-glucosil transferasa en *H. contortus*, la que además resultó mayor en las cepas resistentes (Vokřál *et al.*, 2013).

Finalmente, una observación destacable ya señalada, resulta para el compuesto híbrido 10 el no haber sufrido metabolización durante los ensayos de difusión *ex vivo*,

tanto en el modelo de nemátodo como en el de céstodo. Si además se considera que este compuesto presentó la mayor actividad antihelmíntica *in vitro* en *N. brasiliensis* (ver capítulo 2, tabla 2.1), mostrando además una muy buena capacidad de difusión *ex vivo* en *H. contortus* y *M. vogae*, resulta auspicioso con este conjunto de resultados, el considerar además que los helmintos no utilicen este mecanismo de detoxificación oxidativa como defensa contra este potencial antihelmíntico.

CONCLUSIONES

Se puso a punto y validó la metodología para el clareo y extracción de analitos de interés de la matriz parasitaria *H. contortus*, estadio adulto.

Durante la optimización de la metodología para el tratamiento de muestra, se observó oxidación de ABZ y su derivado híbrido 8, tanto en ausencia como presencia de matriz parasitaria. Se vio que dicha oxidación es dependiente del pH, favorecido por un pH levemente básico (como 7.8), y la presencia de oxígeno en los solventes utilizados (acetonitrilo y buffer fosfato pH 7.8). Así mismo, este patrón de oxidación, así como el efecto matriz, es exclusivo para ABZ y 8, no afectando el resto de los compuestos ensayados.

De los estudios de difusión *ex vivo* en *H. contortus*, los compuestos híbridos no presentaron diferencias significativas con sus análogos benzimidazoles antihelmínticos en las concentraciones intraparasitarias alcanzadas. Por otro lado, el derivado valerolactama 2, no fue detectado en las condiciones ensayadas, comprobando nuevamente el acierto de la estrategia de hibridación molecular para aumentar la capacidad de difusión parasitaria de la serie valerolactama (muy buena actividad antihelmíntica *in vitro* pero inactivos *in vivo*).

Los estudios de correlación para los parámetros fisicoquímicos seleccionados, lipofilia y momento dipolar, demostraron que la lipofilia favorece la capacidad de ingreso al medio intraparasitario, mientras que el momento dipolar va en decremento de la misma.

Se demostró que existen diferencias significativas en el metabolismo oxidativo de los especímenes de *H. contortus* provenientes de abomasos de ovinos de frigorífico (que como se describiera en la introducción, serían presumiblemente resistentes a benzimidazoles antihelmínticos) y susceptibles a antihelmínticos, siendo mayor en los primeros. Si bien se requiere profundizar en estudios de aproximación a las enzimas responsables involucradas en dicha biotransformación, resulta una nueva contribución a evidencias que sugieren la implicancia del metabolismo oxidativo aumentado como mecanismo complementario de resistencia a benzimidazoles antihelmínticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, L., Solana, H., Mottier, L., Virkel, G., Fairweather, I., Lanusse, C. Altered drug influx/ efflux and enhanced metabolic activity in triclabendazole-resistant liver flukes. *Parasitology*, **2005**, *131*, 501- 510.
- Beugnet, F., Gauthey, M., Kerboeuf, D. Partial in vitro reversal of benzimidazole resistance by the free-living stages of *Haemonchus contortus* with verapamil. *Vet. Rec.*, **1997**, *141*, 575-576.
- Blackhall, W., Prichard, R., Beech, R. P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. *Vet. Parasitol.*, **2008**, *152*, 101-107.
- Bocasch, W., Cornford, E., Oldendorf, W. Schistosoma mansoni: correlation between lipid partition coefficient and transintestinal uptake of non-electrolytes. *Exp. Parasitol.*, **1981**, *52*, 396-403.
- Cvlink, V., Lamka, J., Skálová, L. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug Metab. Rev.*, **2009**, *41*, 8-26.
- Cvlink, V., Kubíček, V., Nobilis, M., Křížová, V., Szotáková, B., Lamka, J., Várady, M., Kuběňová, M., Novotná, R., Gavelová, M., Skálová, L. Biotransformation of flubendazole and selected model xenobiotics in *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.*, **2008**, *151*, 242-248.
- Danaher, M., De Ruyck, H., Crooks, S., Dowling, G., O'Keeffe, M. Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *J. Chromatogr. B.*, **2007**, *845*, 1-37.
- Hennessey, D., Sangster, N., Steel, J., Collins, G. Comparative pharmacokinetics behaviour of albendazole in sheep and goats. *Int. J. Parasitol.*, **1993**, *23*, 321-325.
- Ho, N., Geary, T., Raub, T., Barsuhn, C., Thompson, D. Biophysical transport properties of the cuticle of *Ascaris suum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **1990**, *41*, 153- 166.
- Kotze, A.C., Dobson, R.J., Chandler, D. Synergism of rotenone by piperonyl butoxide in *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in vitro: potential for drug-synergism through inhibition of nematode oxidative detoxification pathways. *Vet. Parasitol.*, **2006**, *136*, 275-282.

Lespine, A., Menez, C., Bourguinat, C., Prichard, R. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintic prospects for reversing transport- dependent anthelmintic resistance. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.*, **2012**, *2*, 58-75.

Mottier, L., Álvarez, L., Ceballos, L., Lanusse, C. Drug transport mechanism in helminth parasites: passive diffusion of benzimidazole anthelmintics. *Exp. Parasitol.*, **2006**, *113*, 49- 57.

Mottier, M., Álvarez, L., Pis, M., Lanusse, C. Transtegumental diffusion of benzimidazole antehlmintics into *Moniezia benedeni* : correlation with their octanol-water partition coefficients. *Exp. Parasitol.*, **2003**, *103*, 1-7.

Munguía, B., Michelena, M., Melian, E., Saldaña, J., Ures, X., Manta, E., Domínguez, L. Development of novel valerolactam- benzimidazole hybrids anthelmintic derivatives: Diffusion and biotransformation studies in helminth parasites. *Exp. Parasitol.*, **2015**, *153*, 75 -80

Munguía, B., Mendina, P., Espinosa, R., Lanz, A., Saldaña, J., Andina, MJ., Ures, X., López, A., Manta, E., Domínguez, L. Synthesis and Anthelmintic Evaluation of Novel Valerolactam-Benzimidazole Hybrids. *Lett. Drug Des. Discov.*, **2013**, *10*, 1007-1014.

Sánchez, S., Álvarez, L., Lanusse, C. Fasting induced changes on the pharmacokinetic behaviour of albendazole and its metabolite in cattle. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, **1997**, *20*, 38-47.

Sargison, N. Pharmaceutical treatments of gastrointestinal nematodo infections of sheep- Future of anthelmintic drugs. *Vet. Parasitol.*, **2012**, *189*, 79- 84.

Solana, H., Rodríguez, H., Lanusse, C. Comparative metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by different helminth parasites. *Parasitol. Res.*, **2001**, *87*, 275-280.

Thompson, D., Geary, T. The structure and function of helminth surfaces, en *Biochemistry and Molecular Biology of parasites* (Marr, J y Müller, M., editores), 1995, 203-232, Academic Press Ltd.

Vokřál, I., Jirásko, R., Stuchlíková, L., Bártíková, H., Szotáková, B., Lamka, J., Várady, M., Skálová, L. Biotransformation of albendazole and activities of selected

detoxification enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Vet. Parasitol.*, **2013**, *196*, 373-381.

Anexo Capítulo 6- Trabajos publicados en el marco de la presente tesis doctoral

CAPÍTULO 6

Conclusiones generales y perspectivas

Conclusiones generales .pág.	209
Perspectivas	pág. 212
Anexo Capítulo 6	pág. 215

CONCLUSIONES GENERALES

- La estrategia de hibridación molecular llevó a la síntesis de una serie de compuestos híbridos valerolactama- benzimidazol, que presentaron por un lado, actividad antihelmíntica *in vitro* en el modelo de nemátodo *N. brasiliensis*, muy superior a los benzimidazoles antihelmínticos comerciales precursores (ABZ, FEB y FLU), y del mismo orden o mayor a la serie valerolactama. El compuesto híbrido 10 fue quien presentó la mayor actividad. Por otro lado, la estrategia resultó exitosa, para resolver la escasa-nula difusión intraparasitaria constatada para la serie valerolactama, causante de la falta de eficacia de los mismos *in vivo*. Estos resultados se recogen en una patente de invención (Mendina, P., Munguía, B., Espinosa, R., Saldaña, J., Domínguez, L., Manta, E. Derivados de la 2-amino- δ -valerolactama y benzimidazoles que presentan actividad antiparasitaria y en particular antihelmíntica de amplio espectro. Patente de Invención ante la DNPI, título n° 14424, aprobada el 17 de junio de 2014, Montevideo, Uruguay), así como en una publicación (Munguía, B., Mendina, P., Espinosa, R., Lanz, A., Saldaña, J., Andina, M.J., Ures, X., López, A., Manta, E., Domínguez, L. Synthesis and Anthelmintic Evaluation of Novel Valerolactam-Benzimidazole Hybrids. *Lett. Drug Des. Discov.*, **2013**, *10*, 1007-1014).
- El uso de métodos computacionales *ab initio* (DFT) permitió optimizar la geometría de los nuevos compuestos híbridos valerolactama- benzimidazol. Al estudiar la incidencia del sustituyente en el C-5 del anillo benzimidazol sobre la actividad antihelmíntica *in vitro*, se comprobó mayor actividad, cuando dicho sustituyente se encuentra ortogonal al plano del anillo benzimidazol. Esta observación sugiere la participación del anillo benzimidazólico en la unión al sitio blanco.
- Los compuestos híbridos obtenidos presentaron una lipofilia y volumen molecular superior a los derivados valerolactama de origen, cumpliendo entonces con una de los objetivos de la estrategia de hibridación molecular.
- Se estudiaron las iso-superficies de HOMO y LUMO para los benzimidazoles antihelmínticos y sus híbridos, identificando las zonas de la molécula más susceptibles a sufrir reacciones redox. Para ABZ, FEB y los híbridos 8 y 10, se predice la formación de metabolitos sulfoxidados, oxidándose el átomo de azufre del grupo tiopropilo o tiofenilo; mientras que para FLU y 9, el grupo carbonilo en posición 5 del anillo benzimidazol sería más afín a aceptar electrones, sufriendo reducción.

- Se estudiaron los perfiles de difusión y la biotransformación intraparasitaria de los nuevos híbridos valerolactama- benzimidazol y sus análogos benzimidazoles antihelmínticos. Para ello, se desarrollaron dos modelos de difusión intraparasitaria *ex vivo*, utilizando el céstodo *M. vogae* (tetrathyridia) y el nemátodo *H. contortus* (adulto). Se puso a punto y validó metodología de extracción y clareo para ambas matrices parasitaria, consistiendo en una desproteínización primaria con acetónitrilo, seguida de extracción en fase sólida.
- Los estudios de difusión *ex vivo* en *M. vogae* confirmaron la utilidad de la estrategia de hibridación molecular para aumentar la capacidad de difusión de los derivados valerolactama, siendo significativamente mayor para los compuestos híbridos 8 y 10 respecto al derivado valerolactama 2.
- Por otra parte, se pudo comprobar la capacidad del tegumento de *M. vogae* para biotransformar ABZ y FEB dando los metabolitos oxidados ABZ SX y FEB SX (porcentajes de oxidación 8.2 y 14.5 % respectivamente). Interesantemente, no se detectaron metabolitos de los compuestos híbridos en las condiciones ensayadas.
- Los resultados de los ensayos de difusión *ex vivo* en *H. contortus* mostraron que las concentraciones intraparasitarias alcanzadas por los compuestos híbridos no presentaron diferencias significativas respecto a las de sus análogos benzimidazoles antihelmínticos. Por otro lado, el producto valerolactama 2, no fue detectado en las condiciones ensayadas. Nuevamente, se comprueba el acierto del uso de la hibridación molecular para aumentar la capacidad de difusión intraparasitaria de la serie valerolactama, ahora en un modelo de nemátodo de interés para especies productivas..
- Se demostró que existen diferencias significativas en el metabolismo oxidativo entre parásitos adultos farmacológicamente susceptibles a antihelmínticos (*Hc SB*) y aquellos provenientes de abomasos de ovinos de frigorífico (presuntamente resistentes a benzimidazoles antihelmínticos, *Hc RB*). Efectivamente, el porcentaje de oxidación para FEB y el híbrido 8 (25.5 y 54.1 %, respectivamente) fue mayor en *Hc RB* que en *Hc SB* (8.8 y 38.2 %, respectivamente).
- Este resultado resulta una evidencia más, a la hipótesis de considerar el metabolismo oxidativo aumentado de los parásitos, como un mecanismo complementario de resistencia contra ciertos antihelmínticos.
- Por lo expuesto, resulta altamente destacable, el haber demostrado bajo las condiciones ensayadas, que el compuesto híbrido 10 no fue metabolizado durante los ensayos de difusión *ex vivo* tanto por el céstodo *M. vogae*, como por el

nemátodo *H. contortus* (Hc RB). Este resultado sugiere que los helmintos estudiados no usarían su metabolismo oxidativo (fase I) como mecanismo de defensa contra esta nueva molécula.

- El estudio de correlación entre descriptores fisicoquímicos y la concentración intraparasitaria alcanzada por los compuestos estudiados, mostró que el aumento de la lipofilia es favorable para sortear las barreras parasitarias, contrariamente al aumento de momento dipolar. Estas observaciones sugieren la importancia determinante de la componente lipídica del tegumento o los poros lipófilos de la cutícula, para el ingreso al medio intraparasitario de los compuestos estudiados. Estos resultados se presentan en una publicación (Munguía, B., Michelena, M., Melian, E., Saldaña, J., Ures, X., Manta, E., Domínguez, L. Development of novel valerolactam- benzimidazole hybrids anthelmintic derivatives: diffusion and biotransformation studies in helminth parasites. *Exp. Parasitol.*, **2015**, *153*, 75-80).

PERSPECTIVAS

El trabajo desarrollado en la presente tesis doctoral se enmarcó en una línea interdisciplinaria del grupo de búsqueda y desarrollo de nuevos antihelmínticos.

En ese marco se sintetizaron nuevos derivados híbridos valerolactama-benzimidazol que presentaron, como ya se comunicó, una importante actividad antihelmíntica *in vitro* en *N. brasiliensis*. El desarrollo de los modelos de difusión en los helmintos *M. vogae* y *H. contortus* permitieron: evaluar la capacidad de difusión intraparasitaria de los nuevos compuestos; entender cómo ciertas propiedades fisicoquímicas afectan la difusión intraparasitaria; estudiar a biotransformación de los compuestos por parte del parásito en las condiciones ensayadas y aportar una evidencia más de un metabolismo oxidativo aumentado como mecanismo complementario de resistencia a antihelmínticos, particularmente en *H. contortus*.

Actualmente el grupo se encuentra trabajando en el desarrollo de bioensayos en diferentes estadios de *H. contortus* (huevos, L3 y adultos, ensayos *physiology-based*), tanto susceptibles como resistentes a antihelmínticos, para el screening de nuevas moléculas con potencial actividad antihelmíntica. Estos ensayos permitirán confirmar la utilidad potencial de los nuevos compuestos híbridos (particularmente el compuesto 10, el cual resultó ser el más promisorio según las conclusiones obtenidas y ya descritas), en el nemátodo de interés productivo.

De esta manera, del análisis integrado de los resultados obtenidos en los ensayos de difusión intraparasitaria ya descritos, junto a los de actividad antihelmíntica en *H. contortus*, se seleccionará el mejor candidato para etapas de escalado de la síntesis química (a cargo del Dr. Eduardo Manta), de manera de contar con cantidad de principio activo para realizar los estudios de eficacia y farmacocinéticos en ovinos. Por otro lado, el grupo ha iniciado una nueva línea interdisciplinaria con el grupo del Dr. Santiago Palma (UNC, Argentina), a los efectos de aplicar tecnología farmacéutica innovadora para los compuestos que resulten seleccionados para el escalado y estudio de eficacia.

El desarrollo de estos trabajos se encuentra en el marco de un proyecto en curso y financiado por la ANII, proyecto FSA_1_2013_1_12443, siendo la responsable del mismo la Dra. Laura Domínguez.

En base a las conclusiones descritas, y en el marco actual de trabajo del grupo, se plantean las siguientes perspectivas de trabajo por parte de quien suscribe:

- *Aproximación al mecanismo de acción de los nuevos compuestos híbridos valerolactama- benzimidazol.*
 - Por un lado, se estudiará la implicancia del núcleo benzimidazol sobre la actividad antihelmíntica, utilizando como blanco farmacológico las tubulinas de *H. contortus*.

Según los resultados de optimización de la geometría y su relación con la actividad antihelmíntica *in vitro*, se plantea la hipótesis de que el anillo benzimidazol en los compuesto híbridos pueda también estar participando en la unión al sitio blanco. En tal sentido, se pretende explorar si el mecanismo de acción de los nuevos compuestos híbridos involucra a las tubulinas, como resulta para los benzimidazoles comerciales.

Para esto se desarrollará un bioensayo *target-based* sobre las tubulinas aisladas de *H. contortus*, donde se medirá la inhibición de la polimerización de tubulinas mediante un método espectrofotométrico (ya descrito en bibliografía, ver capítulo 2, figura 2.1).

Es de destacar, que estos ensayos *target-based* sobre tubulinas, podrán aplicarse tanto a material parasitario susceptible como resistente a benzimidazoles. Estos ensayos permitirán complementar los resultados de actividad que se obtengan en los bioensayos *physiology-based* que se están desarrollando en diferentes estadios de *H. contortus*, los que ya fueran mencionados.

- Por otra parte, como ya se comentó (ver capítulo 2), los resultados preliminares de aproximación al blanco molecular implicado en el mecanismo de acción de los derivados valerolactama, sugirieron fuertemente la participación de la vía del óxido nítrico. Se pretende trasladar la metodología y experiencia desarrollada con *N. brasiliensis* trabajando ahora con el nemátodo de interés productivo, *H. contortus*, en su estadio adulto. Este trabajo se realizará en colaboración con el Laboratorio de Físicoquímica Biológica de la Facultad de Ciencias, a cargo de la Dra. Ana Denicola.

Como fuera comentado oportunamente (capítulo 2) entre las principales limitaciones que presentó trabajar con el modelo de *N. brasiliensis* resultó la escasa cantidad de material parasitario disponible. El contar actualmente con un modelo de infección artificial en ovinos con *H. contortus* farmacológicamente susceptible (Kirby), permitirá disponer de la cantidad de material parasitario necesario para retomar los estudios antes mencionados e incorporar otros, como ser determinación de inducción enzimática y producción de óxido nítrico.

- *Desarrollo de metodología para detectar SNPs en el gen codificante para el isotipo 1 de β tubulinas responsables de la resistencia a benzimidazoles*

Se pretende desarrollar un método de screening para caracterizar el carácter sensible o resistente a benzimidazoles de *H. contortus*. Como ya fuera descrito (capítulo introductorio), es posible distinguir los polimorfos genéticos mutantes que corresponden a Phe197Tyr, Phe200Tyr y Glu198Ala, asociados con la resistencia antihelmíntica antes mencionada.

Mediante técnicas de PCR y secuenciación directa, se determinará la abundancia relativa de genotipos resistentes a benzimidazoles en muestras de *H. contortus* de diferentes establecimientos nacionales.

Parte de las perspectivas de trabajo descritas (desarrollo del bioensayo *target-based* en tubulinas y caracterización de mutaciones en gen de β -tubulinas) se contemplan en el marco de un proyecto recientemente aprobado (financiado por la ANII, titulado “Aplicación de herramientas moleculares para diagnóstico de resistencia antihelmíntica y bioensayos target-basados para la búsqueda de nuevos agentes”, FCE_3_2013_1_100408) siendo la responsable del proyecto quien suscribe, bajo la orientación de la Dra. Laura Domínguez. Este trabajo se realizará en conjunto con el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias a cargo de la Dra. Mónica Marín.

Durante la formación de posgrado, quien suscribe a realizado cursos relacionados a la temática que se plantea en las perspectivas de trabajo a desarrollar (Biología Parasitaria; Físicoquímica Biológica; Enzimología; Producción, purificación y caracterización estructural de proteínas recombinantes), con el fin de profundizar y actualizar la formación y poder desempeñar dichas tareas, en conjunto con los grupos antes mencionados.