

Ensayo de la actividad antihelmíntica de productos de nueva síntesis derivados del 2-iminotiazol y del 2-iminotiadiazol. III. Actividad anguilulicida

PUMAROLA, D.; ALONSO, M.T.; BERENGUER, F.J.; GALLEGU, J.

Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias.
Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. Barcelona.

Summary

The anguilulicide activity of some new derivatives of 2-iminothiazol and 2-iminothiadiazol is tested. The anguilulicide activity is determined against *Strongyloides ratti* in white CD1 mice experimentally infected, using Levamisole as reference drug. The new products are given per os in a single dose of 200 mg/Kg of animal weight. The anthelmintic activity is evaluated as percentage of desparasitated animals (DI). The obtained results show an interesting activity of 85% DI for one of these products, while the others are completely without any activity. The Levamisole itself shows a 100% DI at 100 mg/Kg.

Key Words: Chemotherapy, Animal Strongyloidosis, *Strongyloides ratti*, mouse, Anguilulicide activity, 2-iminothiazol, 2-iminothiadiazol, Levamisole.

Resumen

Se ha llevado a cabo un estudio sobre la actividad anguilulicida de nuevos productos derivados del 2-iminotiazol y del 2-iminotiadiazol. Esta actividad ha sido determinada en el ratón albino CD1 experimentalmente infestado por *Strongyloides ratti*. Se ha utilizado Levamisol como fármaco de referencia. La actividad antihelmíntica se ha evaluado como el porcentaje de animales totalmente desparasitados (ID). Los resultados obtenidos muestran que sólo uno de los productos ensayados presenta una interesante actividad anguilulicida (85% ID), mientras que todos los demás productos carecen de actividad. El Levamisol presenta un ID del 100% a la dosis de 100 mg/Kg.

Palabras Clave: Quimioterapia, Strongiloidosis animal, *Strongyloides ratti*, Ratón, Actividad anguilulicida, 2-iminotiazol, 2-iminotiadiazol, Levamisol.

Introducción

En trabajos precedentes Alonso y col.^{1,2} estudiaron in vivo la posible actividad oxiuricida (en el ratón albino naturalmente infestado por sus oxiuros *Aspicularis tetraaptera* y *Syphacia obvelata*) y cestocida (en ratones experimentalmente infestados por *Hymenolepis nana*) de 14 productos de nueva síntesis derivados del 2-iminotiazol y del 2-iminotiadiazol, utilizando como fármacos de referencia respectivamente Mebendazol y Niclosamida. Siguiendo esta línea de investigación sobre terapia antiparasitaria, el presente trabajo se propone estudiar la posible actividad anguilulicida de estos mismos com-

puestos sobre el ratón albino experimentalmente infestado por *Strongyloides ratti*; como patrón de referencia se utiliza en este caso el Levamisol, nematocida de amplio espectro, con gran similitud estructural con los nuevos productos en estudio y cuya actividad frente a este parásito había sido ya contrastada en ensayos previos.

Material y Métodos

A) PRODUCTOS A ENSAYAR.

Derivados azapentalénicos de nueva síntesis que responden a los compuestos siguientes (para fórmulas estructurales, ver Alonso y col.¹):

1. Derivados del metil carbamato del 2-iminotiazol:

- A) 2-metoxycarbonilimino-4-tiazolidinona.
- B) 2,4-dimetoxycarbonilaminotiazol.
- C) Hidrocloruro de N-(2-iminotiazolin-3-ilacetil) carbamato de metilo.
- D) N-(imidazo [2,1-b] tiazol-6-il) carbamato de metilo.
- E) Hidrocloruro de N-(2-imino-4-metiltiazolin-3-ilacetil) carbamato de metilo.
- F) N-(3-metilimidazo [2,1-b] tiazol-6-il) carbamato de metilo.
- G) N-(imidazo [2,1-a] piridin-2-il) carbamato de metilo (incluido en este grupo porque, a pesar de carecer del heterociclo tiazólico, su estructura está estrechamente emparentada con el producto H, y es similar a la estructura del Mebendazol).
- H) N-(imidazo [2,1-b] benzotiazol-2-il) carbamato de metilo.

2. Derivados del metil-carbamato del 2-iminotiazol:

- I) Hidrocloruro de N-(2-imino-1,3,4-tiadiazolin-3-ilacetil) carbamato de metilo.
- J) N-(imidazo [2,1-b] 1,3,4-tiazol-6-il) carbamato de metilo.
- K) Hidrocloruro de N-(2-imino-5-metil-1,3,4-tiazolin-3-ilacetil) carbamato de metilo.
- L) N-(2-metilimidazo [2,1-b] 1,3,4-tiadiazol-6-il) carbamato de metilo.
- M) Hidrocloruro de N-(5-etil-2-imino-1,3,4-tiazolin-3-ilacetil) carbamato de metilo.
- N) N-(2-etilimidazo [2,1-b] 1,3,4-tiadiazol-6-il) carbamato de metilo.

B) ACTIVIDAD ANGUILULICIDA

1. Material

A) Ratón albino de la cepa CD1; machos, de cuatro semanas de edad, previamente infestados de forma experimental con larvas filariformes de *S. ratti*.

B) Rata albina de la raza Sprague-Dawley (SD); machos, de cuatro a seis semanas de edad.

C) La cepa del parásito *S. ratti* utilizada en el presente trabajo fue aislada de ratas de alcantarilla capturadas en Barcelona en octubre de 1984. La infestación se estable-

ció en rata albina de laboratorio, en la que se ha mantenido por sucesivos pases.

2. Método

A) Mantenimiento de la cepa: Ratas albinas se infestan por inoculación subcutánea de 3000-5000 larvas filariformes de *S. ratti*. A partir del 6º día, se recogen sus heces y se confeccionan los correspondientes coprocultivos según la técnica descrita por Gállego y Berenguer⁶ utilizando, como fungicida, Nistatina a la concentración de 500 U/g heces. Las larvas aparecen en el coprocultivo a las 48-72 h. Cada dos semanas se procede a la inoculación de nuevas ratas, que mantienen el ciclo del parásito.

B) Ensayo de la actividad anguilulicida: Se emplean ratones machos de unas tres-cuatro semanas de edad. Con objeto de disminuir sus mecanismos de resistencia inespecífica y facilitar así la implantación del parásito (Grove y Dawkins⁹), 24 h. antes de la infestación se adiciona a su agua de bebida Dexametasona-21-fosfato disódico (50 mg/l). A cada animal se le inoculan, por vía subcutánea y en la región cervical, unas 400 larvas filariformes de *S. ratti*. El ciclo del parásito se completa, en los ratones, a los cinco días (Dawkins y Grove⁴), al cabo de los cuales se separan en lotes de 8-10 animales cada uno, a los que se administra los productos en estudio, por vía oral (sonda gástrica), y a la dosis de 200 mg/Kg., empleando siempre un lote control intubado con excipiente y un segundo lote intubado con Levamisol, fármaco de referencia, a la dosis de 100 mg/Kg. Para la evaluación de resultados, se realiza en primer lugar el cálculo del índice de desparasitación (ID) o porcentaje de animales totalmente desparasitados por acción del producto, en relación a los animales parasitados del lote control, cuya fórmula, corregida según Thompson y Reinerston¹⁰ para el caso de encontrar animales desparasitados en el lote control, es la siguiente:

$$I.D. = \frac{A - B}{A} \cdot 100$$

A = Porcentaje de ratones parasitados en el lote control.
B = Porcentaje de ratones parasitados en el lote problema.

Con objeto de realizar una estimación, aunque subjetiva, del probable índice de eliminación de parásitos (porcentaje de helmintos eliminados en el lote tratado, en relación a la población helmíntica del lote control), se ha realizado al mismo tiempo una estimación subjetiva del nivel de infestación de cada uno de los animales en todos los lotes; para ello se ha dado a cada animal la calificación de 1, 2 ó 3, según que su nivel de infestación por *S. ratti*, después del tratamiento con el producto en estudio, fuese leve (menos de 50 helmintos), medio (entre 50-100 helmintos), o alto (más de 100 helmintos). A partir de la calificación dada a cada ratón, se ha calculado en cada caso la calificación media correspondiente a todo el lote, cifra que representa, por tanto, el nivel medio estimado de parasitación de cada lote. Como índice de eliminación se toma el valor:

$$I.E. est. = \frac{C - D}{C} \cdot 100$$

C = Nivel medio de parasitación en el lote control.
D = Nivel medio de parasitación en el lote tratado.

Resultados

En el Cuadro 1 se da el índice de desparasitación medio correspondiente a cada producto ensayado (mínimo dos ensayos por producto).

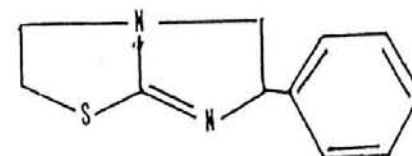
En el Cuadro 2 se da el nivel medio estimado de parasitación hallado para cada producto, así como el índice de eliminación medio estimado correspondiente a cada producto ensayado (mínimo dos ensayos por producto).

Discusión

El ciclo de autoinfestación interna que presentan las distintas especies de Rhabdítidos que parasitan al hombre y a sus animales domésticos hace de la anguilulosis una parasitosis recidivante y de difícil tratamiento. En la estrongiloidosis murina no se ha demostrado la existencia de este ciclo de autoinfestación, lo que la hace especial-

mente sensible a los distintos productos anguilulicidas. Chaia y Da Cunha³ observaron la eficacia del Mebendazol en la estrongiloidosis murina per os, a la dosis de 4 mg/Kg; mientras que una dosis de 200 mg, dos veces al día, durante 4 días, fue ineficaz en los sujetos humanos estudiados. A pesar de ello creemos que el modelo biológico formado por *S. ratti* en el ratón albino proporciona un sistema adecuado para la evaluación "in vivo" y en el laboratorio de la actividad anguilulicida.

1. El Levamisol, que se ha utilizado como fármaco de referencia, demuestra una intensa actividad anguilulicida con unos índices de desparasitación, a la dosis de 100 mg/Kg, del 100% en todos los lotes tratados. No hemos encontrado referencias acerca de la actividad del Levamisol sobre este modelo biológico. En clínica humana, Gatti y col.⁷ trataron a 30 sujetos naturalmente infestados con una sola dosis de Levamisol, de 2,5 mg/Kg., obteniendo un índice de curaciones del 54%; pero si la dosis se repetía semanalmente durante 3 semanas, el índice de curaciones se incrementaba hasta el 89%. Esto parece indicar que posiblemente el Levamisol actúe únicamente sobre las formas adultas, mientras que sería ineficaz frente a las formas larvares en fase migratoria. Esta hipótesis parece confirmarse al conseguirse con el Levamisol la total desparasitación de los ratones a la dosis ensayada, pues en el momento de realizar la experiencia en los animales hospedadores sólo hay vermes adultos.



Levamisol

2. Por lo que se refiere a los nuevos productos ensayados (a una dosis tan elevada como 200 mg/Kg) se han mostrado todos ellos, con excepción de un solo producto (el producto G), totalmente carentes de actividad o con una actividad anguiluli-

Cuadro 1

Actividad anguilulicida: Índice de desparasitación

PRODUCTO	N.º total de ensayos	N.º total de animales	N.º total de animales desparasitados	I.D. medio (%)
LEVAMISOL	14	126	126	100
A	2	20	1	5
B	2	19	0	0
C	2	17	0	0
D	2	20	0	0
E	2	19	0	0
F	2	19	0	0
G	2	20	17	85
H	2	18	0	0
I	2	20	0	0
J	2	15	0	0
K	2	20	0	0
L	2	19	0	0
M	2	18	0	0
N	2	19	1	5

Dosis: Levamisol : 100 mg/Kg.
Productos A-N : 200 mg/Kg.

Cuadro 2

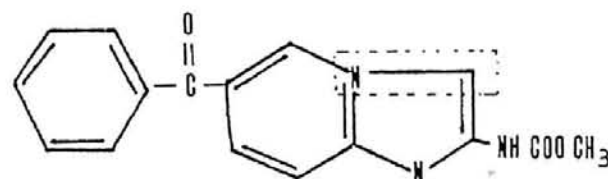
Actividad anguilulicida: Índice de eliminación estimado.

PRODUCTO	N.º total de ensayos	Parasitación nivel medio estimado lote control	Parasitación nivel medio estimado lote tratado	I.E. estimado (%)
LEVAMISOL	14	2.90	0.00	100
A	2	2.70	2.20	20
B	2	2.90	2.90	0
C	2	3.00	3.00	0
D	2	2.75	2.65	7
E	2	2.90	3.00	0
F	2	3.00	2.85	5
G	2	3.00	0.15	95
H	2	2.90	2.80	3
I	2	3.00	2.65	11
J	2	2.75	2.75	0
K	2	3.00	2.95	1
L	2	3.00	2.75	8
M	2	3.00	2.80	6
N	2	3.00	2.45	18

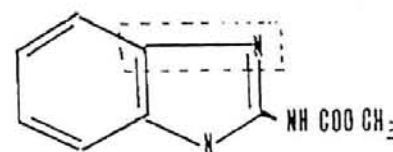
Dosis: Levamisol : 100 mg/Kg.
Productos A-N : 200 mg/Kg.

cida muy débil, con unos índices de desparasitación que varían desde el 0% hasta un 5%, y unos índices de eliminación estimados variables desde un 0% hasta un 20%. En consecuencia, y a pesar de su relación isostérica y estructural con el Levamisol, estos nuevos derivados han perdido totalmente la actividad anguilulicida que presenta este producto.

3. Únicamente el producto G, con una estructura muy similar a la del Mebendazol, ha evidenciado una apreciable actividad anguilulicida; a la dosis única de 200 mg/Kg presenta un índice de desparasitación del 85% (85% de animales totalmente desparasitados) y un índice de eliminación estimado del 95% (95% de reducción de su población vermiciana).



Mebendazol



Producto G

Draper⁵, trabajando en el ratón experimentalmente infestado por *S. ratti*, comprobó que el Mebendazol por vía oral presentaba una intensa actividad anguilulicida "in vivo" (100% de desparasitación a la dosis de 100 y 200 mg/Kg). Grove⁸, a la dosis de 50 mg/Kg, también consigue la total desparasitación de los animales. El producto G presenta, por tanto y según los resultados de nuestros ensayos, una cierta actividad anguilulicida inferior sin duda a la que presentan Levamisol y Mebendazol. Si se toma en cuenta su toxicidad (aunque no determi-

nada, sí inferior a la del Levamisol, ya que éste resulta letal para una elevada proporción de ratones si se administra a la dosis de 200 mg/Kg), el producto G podría presentar un índice terapéutico tal vez más favorable que el del Levamisol pero nunca mejor que el del Mebendazol. En consecuencia, el producto G, aún poseyendo una clara acción anguilulicida, no puede representar ninguna alternativa interesante al uso del Mebendazol.

Referencias

1. Alonso, M.T.; Berenguer, F.J.; Pujol, M.T.; Gallego, J.—Ensayo de la actividad antihelmíntica de productos de nueva síntesis derivados del 2-iminotiazol y del 2-iminotiazol. I. Actividad Oxiuricida. *Rev. Ibér. Parasitol.*, 45, 1985, 359-367.
2. Alonso, M.T.; Berenguer, F.J.; Pujol, M.T.; Gallego, J.—Ensayo de la actividad antihelmíntica de productos de nueva síntesis derivados del 2-iminotiazol y del 2-iminotiazol. II. Actividad cestocida. *Rev. Ibér. Parasitol.*, 46, 1986, 195-197.
3. Chaia, G.; Da Cunha, A.S.—Therapeutic action of Mebendazole (R-17.635) against human helminthiasis. *A Folha Médica*, 63, 1971, 67-76.
4. Dawkins, H.J.S.; Grove, D.I.—Kinetics of primary and secondary infections with *Strongyloides ratti* in mice. *Int. J. Parasitol.*, 11, 1981, 89-96.
5. Draper, M.—Ensayo experimental "in vivo" de la posible actividad cestocida, oxiuricida y anguilulicida de nuevos productos análogos al Praziquantel. Tesina, Facultad de Farmacia, Universidad Barcelona, 1986.
6. Gállego, J.; Berenguer, F.J.—Estudios sobre antihelmínticos. IV. Estudio y desarrollo de un procedimiento práctico para la determinación experimental de la actividad estrongilicida. *Rev. Ibér. Parasitol.*, 31, 1971, 259-281.

7. Gatti, F.; Krubwa, F.; Vandepitte, J.; Thienpoint, D.—Control of intestinal nematodes in African school children by the trimestrial administration of Levamisol. *Ann. Soc. Belges Méd. Trop.*, 52, 1972, 19-31.
8. Grove, D.I.—*Strongyloides ratti* and *S. Stercoralis*: the effects of Tiabendazol, Mebendazole, and Cambendazole in infected mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31, 1982, 469-476.
9. Grove, D.I.; Dawkins, H.J.S.—Effects of prednisolone on murine strongyloidiasis. *Parasitology*, 83, 1981, 401-409.
10. Thompson, P.E.; Reinertson, J.W.—Chemotherapeutic studies of natural pinworms infections in mice. *Exp. Parasitol.*, 1, 1952, 384-391.

(Recibido el 20 de abril de 1987; aceptado el 23 de junio de 1987).