

## GLUCOGENO SINTASA EN HELMINTOS PARASITOS. INHIBICION POR BENZIMIDAZOLES

H. GOMEZ-BANQUERI, M. A. GARCIA RUIZ, M. MONTEOLIVA & M. SANCHEZ-MORENO

### RESUMEN

Se ha determinado el efecto inhibitor sobre la actividad Glucogeno sintetasa (E.C.2.4.1.11) por parte de cuatro antihelminticos: Albendazol, Mebendazol, Parbendazol y Tiabendazol. Observandose que en todos los casos, es el Parbendazol quien ha demostrado un mayor poder inhibitor sobre la glucógeno sintetasa de *Ascaris suum*, *Fasciola hepatica* y *Moniezia expansa*. El Tiabendazol es el antihelmintico que menor efecto inhibitor ha presentado sobre la enzima en los tres parásitos objeto de nuestro estudio.

Con el presente trabajo y otros previstos en la misma linea, se pretende aportar nuevos datos acerca del aún desconocido locus de acción de estos antihelminticos.

**UNITERMOS:** Glucógeno sintetasa — inhibicion; Parbendazol; Mebendazol; Albendazol; Tiabendazol; *Ascaris suum*; *Fasciola hepatica*; *Moniezia expansa*.

### INTRODUCCION

La función de la Glucógeno sintetasa (E.C.2.4.1.11) (GS) en parásitos es la misma que la realizada por este enzima en mamíferos, lo que le confiere una gran importancia en el metabolismo de los parásitos.

En helmintos parásitos se ha detectado actividad Glucógeno sintetasa: *Hymenolepis diminuta* (DEDINGER y ROBERTS, 1977), *Schistosoma mansoni* (ROTMANS, 1980), *Ascaris suum* (DONAHUE y col., 1981), aunque los resultados obtenidos no son muy satisfactorios, debido quizás a la inestabilidad que la caracteriza haciendo su estudio sumamente difícil.

Trabajos recientes han demostrado la eficacia quimioterapéutica de los antihelminticos de la serie de los benzimidazoles, al afectar directamente sobre el metabolismo glucídico de diferentes parásitos (CORNISH y BRYANT, 1976), al observarse una disminución en la captura de glucosa, caída de los niveles de

glucógeno almacenados, menor síntesis de compuestos fosforilados de alta energía (van den BOSSCHE y NOLLIN, 1973) en algunos Nematodos adultos. Efectos similares han sido probados en Cestodos y Trematodos (CORNISH y BRYANT, 1976).

Por lo expuesto anteriormente, hemos considerado interesante estudiar la inhibición selectiva de cuatro antihelminticos de la serie de los benzimidazoles: Parbendazol (PBZ), Thiabendazol (TBZ), Mebendazol (MBZ) y Albendazol (ABZ) sobre el enzima GS, purificada a partir de *Ascaris suum*, *Fasciola hepatica*, *Moniezia expansa*, correspondientes a los tres grupos taxonómicos de helmintos parásitos conocidos.

### MATERIAL Y METODOS

Las muestras utilizadas como fuente enzimática proceden de ejemplares adultos de

**Ascaris suum**, **Fasciola hepática** y **Moniezia expansa**, procedentes del matadero municipal de Granada y trasladados a nuestro laboratorio en solución Tyrode a 37°C.

El procedimiento de extracción, aislamiento y purificación de la GS, se realizó según la técnica de MIED y BUEDING (1979) y modificada por nosotros (GOMEZ-BANQUERI y col., 1986).

Los parásitos se homogenizaron en un tampón de glicina 0.09 M pH 7.4, conteniendo 2-mercapto etanol 8 mM y EDTA 1 mM, en una proporción de 1:2 (w/v) para *A. suum* y *M. expansa*, y 1:5 (w/v) para *F. hepática*.

El homogenado se centrifugó a 9.000 rpm durante 10 minutos, con objeto de sedimentar los orgánulos celulares. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 50.000 rpm durante 90 minutos. El precipitado se resuspendió en 1/10 del volumen del homogenado inicial con el mismo tampón empleado anteriormente. Esta suspensión se sometió, a continuación a un fraccionamiento en columna de DEAE celulosa DE-22 (dimensiones de la columna 25 cm de largo por 1 cm de diámetro interior). Como eluyente se usó, en primera instancia, 50 ml de solución  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  0.01 M pH 8.5 y posteriormente 50 ml de solución  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  0.02 M en  $\text{ClNa}$  0.2 M pH 4.46. Se recogen 20 fracciones, de 5 ml cada una con un ritmo de elución de 1 ml por minuto.

Para la determinación de la actividad enzimática se siguió la técnica descrita por LELOIR y GOLDEMBERG (1959), en la que se mide la cantidad de UDP formado en la reacción de síntesis del glucógeno. El UDP formado se hace reaccionar, posteriormente, con una solución de Piruvato kinasa, que cataliza la reacción de transferencia de fosfato del fosfoenol piruvato al UDP. El piruvato formado se determina colorimetricamente. Las lecturas se realizaron a 520 nm en un espectrofotómetro Beckman DB-G.

La concentración de proteínas se determinó por el método de LOWRY y col. (1951), usando albúmina de suero bovino como patrón.

Se han ensayado los efectos de cuatro antihelmínticos de la serie de los benzimidazo-

les: Albendazol, Parbendazol, Thiabendazol y Mebendazol a diferentes concentraciones (0.05, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.3 mg de cada antihelmíntico respectivamente).

La muestra purificada se incubaba durante 30 min a 37°C con las diferentes dosis de antihelmínticos, procediéndose a continuación a la determinación de la actividad GS. Paralelamente se realizan pruebas controles (sin antihelmíntico) para determinar la actividad GS en las mismas condiciones que en presencia de los fármacos.

## RESULTADOS

Se ha determinado la actividad en cada una de las fracciones obtenidas en el proceso de aislamiento y purificación de la GS en los tres vermes, según aparece en la tabla 1. Es importante reseñar que en todas las experiencias, se han obtenido valores que fluctúan bastante. Hechos atribuibles a la gran dificultad de detección de la actividad GS por su extrema labilidad.

Se ha observado una mayor actividad GS en *M. expansa*, con respecto a *A. suum* y *F. hepática*. A medida que se avanza en el proceso de aislamiento, se observa un incremento en la fluctuación de los valores de la actividad motivado por la paulatina eliminación del glucógeno, que ejerce un efecto estabilizador sobre el enzima. Tras la cromatografía en DEAE celulosa DE-22, se ha detectado un pico de máxima actividad para *F. hepática* y *M. expansa* y dos picos para *A. suum*. El grado de purificación obtenido es de 159, 206 y 99 veces para *A. suum*, *F. hepática* y *M. expansa* respectivamente.

De los cuatro benzimidazoles, cuando la fuente de GS es *A. suum* debe resaltarse el mayor efecto inhibitor del albendazol sobre los demás fármacos, en tanto que ya a una concentración de 0.15 mg se obtiene una inhibición de alrededor del 50%, y a la dosis de 0.3 mg se supera el 70% de inhibición. Por el contrario, el PBZ y el MBZ alcanzan el 50% de inhibición a las dosis finales de 0.3 mg. Finalmente, TBZ produce la menor inhibición de los antihelmínticos ensayados sobre *A. suum*, y por mucho que se aumente la dosis de fármaco, no se consigue un incremento en

T A B L A I  
Determinacion de la actividad glucogeno sintetasa

	Volumen <sup>1</sup>	Act. total <sup>2</sup>	Prot. totales <sup>3</sup>	Act. esp ± SD <sup>4</sup>	Purf.
<b>ASCARIS SUUM</b>					
Homogenado	12	6,697	353,700	0,019 ± 0,004	1
Sob. 9.000	11	4,781	107,432	0,041 ± 0,015	2
Pp. 50.000	1,5	1,224	12,650	0,097 ± 0,048	5
Pico 1	5	0,591	0,275	2,150 ± 0,212	114
Pico 2	5	0,925	0,308	3,000 ± 0,125	159
<b>FASCIOLA HEPATICA</b>					
Homogenado	12	4,078	287,513	0,014 ± 0,006	1
Sob. 9.000	11	3,221	117,547	0,027 ± 0,015	2
Pp. 50.000	1,5	1,107	21,339	0,052 ± 0,022	4
Pico 1	5	0,797	0,275	2,899 ± 0,101	206
Pico 2	—	—	—	—	—
<b>MONIEZIA EXPANSA</b>					
Homogenado	12	12,255	374,940	0,032 ± 0,002	1
Sob. 9.000	11	7,493	204,879	0,036 ± 0,002	1
Pp. 50.000	1,5	1,761	16,822	0,105 ± 0,024	4
Pico 1	5	1,692	0,530	3,193 ± 0,203	99
Pico 2	—	—	—	—	—

Todos los valores son las medias correspondientes a 10 experiencias, de 3 réplicas cada una.

<sup>1</sup>ml. — <sup>2</sup>umol/min./ml. — <sup>3</sup>mg. — <sup>4</sup>umol/min./mg proteínas.

su poder inhibidor sobre la actividad GS. No alcanzando más allá del 25% en ningún momento.

Al tratar los extractos purificados de GS de *M. expansa* el resultado obtenido es como sigue: El PBZ y el ABZ superan el 50% de inhibición, mientras que el TBZ, al igual que en el caso descrito para *A. suum*, no llega al 30% de inhibición.

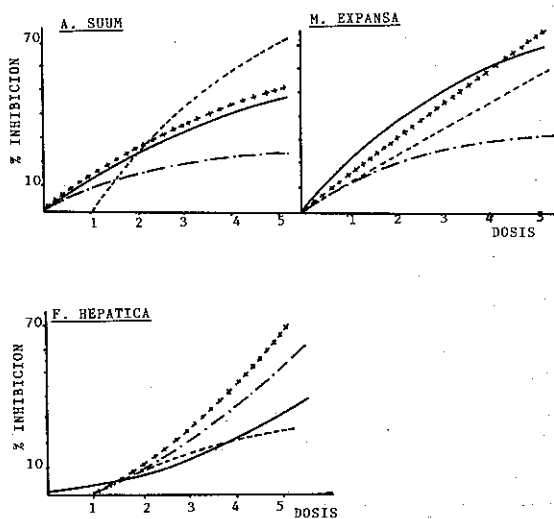
Con *F. hepatica* se obtuvieron resultados semejantes a los de *M. expansa*, en tanto que es el PBZ quien induce una inhibición superior al 70%. Así mismo hemos podido comprobar, a la vista de los resultados de nuestras experiencias, que el efecto del MBZ y del ABZ son practicamente insignificantes en comparación con el elevado poder inhibidor del PBZ.

Los resultados aparecen expuestos anteriormente, vienen reflejados en la grafica 1.

### DISCUSSION

El glucógeno tiene un importante papel en el metabolismo energético de los helmintos, a pesar de esta importancia no existen apenas estudios a nivel de la inhibición de la GS, enzima que cataliza el proceso biosintético, ello puede ser debido a que el enzima es sumamente inestable, y por lo tanto, difícil de trabajar, hecho comprobado por trabajos an-

Gráfico 1



PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA GLUCOGENO SINTETASA POR  
MEBENDAZOL (—), ALBENDAZOL (---)  
PARBENDAZOL (+++++) Y THIABENDAZOL (-.-.-)

teriores y confirmado por otros autores (ROTMANS, 1980; KOMUNIECKI y SAZ, 1982).

La actividad GS varía según la fuente enzimática empleada, hecho apuntado por CZOK y col. (1975) en dos especies de *Schistosoma*, al observar que tenía distinta actividad GS, y comprobado por nosotros al determinar la actividad en los tres helmintos estudiados. Conviene recalcar que la poca estabilidad del

enzima dificulta la comparación de las actividades específicas entre las tres fuentes enzimáticas empleadas, puesto que presentan distintos grados de pérdida de actividad (ROMANS, 1980). A pesar de esto, el hecho de que exista una mayor actividad GS en *M. expansa* que en *A. suum* y *F. hepatica*, sugiere que el glucógeno es almacenado en mayor cantidad en Cestodes que en Nematodos y Trematodos, hecho ya comprobado por CHAPPELL (1980). A la vista de nuestros resultados, podemos confirmar que el glucógeno juega un papel importante en el metabolismo energético de estos tres parásitos, tal y como apuntaban otros autores.

Con la aparición de los antihelmínticos de la serie de los benzimidazoles, de amplio espectro antiparasitario, se ha podido controlar numerosas parasitosis (KLEIN y col., 1981), pero aún no se sabe el mecanismo de actuación de estas drogas, aunque existen datos que sugieren que el MBZ y el TBZ inhiben enzimas del metabolismo glucídico de Nematodos (PRICHARD, 1973; CORNISH y BRYANT, 1976). EVANS y col. (1980) reportaron el mismo efecto inhibitorio por parte del ABZ, MBZ y TBZ sobre los cestodos.

A la vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos confirmar el efecto inhibitorio de los antihelmínticos ABZ, MBZ y TBZ, resaltando sobre todos ellos el efecto del PBZ, al inhibir más notablemente la GS a las dosis empleadas, lo que confirmaría los efectos reportados por otros autores, por alguno de estos antihelmínticos que causan caída en las reservas de glucógeno en *F. hepatica* (KELLY y col., 1975) y en algunos Nematodos (VAN DEN BOSSCHE y NOLLIN, 1973).

Diversos autores han apuntado que el posible locus de acción del TBZ en *H. contortus* es a nivel de la fumarato reductasa (PRICHARD, 1970). Estos hechos nos confirmarían los resultados obtenidos por nosotros, de que sea el TBZ el antihelmíntico que menor inhibición nos produce.

Se puede concluir que los antihelmínticos de la serie de los benzimidazoles son capaces de ejercer un número de efectos, que en conjunto, tienen una gran eficacia contra los parásitos, aunque es preciso continuar trabajando sobre este tema, a la vista de los resulta-

dos obtenidos, para esclarecer la incógnita del locus de acción de estos fármacos y así contribuir a un mejor control de las parasitosis.

## SUMMARY

### The inhibitor effect of Benzimidazoles in the glycogen synthetase of helminthics parasites

The inhibitor effect on the Glycogen synthetase (E.C.2.4.1.11) activity by four anthelmintics: Mebendazole, Parbendazole, Albendazole and Thiabendazole was determined. The most inhibitor effect of Parbendazole on *A. suum*, *F. hepatica* and *M. expansa*, was observed. The lowest inhibitor effect of Thiabendazole, on all cases, was also observed.

The aim of our study, and further studies on the same line, are to provide new reports about the unknown locus of actuation of these anthelmintics.

## REFERENCES

1. CHAPPELL, L. H. — In: Physiology of Parasites. Glasgow, Blackie, 1980.
2. CORNISH, R. A. & BRYANT, C. — Changes in energy metabolism due to anthelmintics in *Fasciola hepatica* maintained "in vitro". Int. J. Parasit., 6: 393-398, 1976.
3. CZOK, R.; CZIFER, S. & JELINIC, B. — Glykogen metabolismes in *Schistosoma mansoni*. Wien. tierärztl. Mschr., 62: 249-254, 1975.
4. DEDINGER, J. E. & ROBERTS, L. S. — Glycogen synthetase in the rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta*. I. Enzyme activity during development and with crowding. Comp. Biochem. Physiol., 58B: 215-219, 1977.
5. DONAHUE, M. S.; YACOB, N. J.; KAEINI, M. R. & HARRIS, B. G. — Activity of enzyme regulating glycogen metabolism in perfused muscle-cuticle sections of *Ascaris suum* (Nematoda). J. Parasit., 67: 362-367, 1981.
6. EVANS, W. S.; HARDY, M. & NOVAK, M. — A comparison of the effect of albendazole, cambendazole and thiabendazole on the larval development of three hymenolepidid cestodes. J. Parasit., 66: 935-940, 1980.
7. GOMEZ-BANQUERI, H.; SANCHEZ-MORENO, M.; TEJADA, P. & MONTEOLIVA, M. — Aislamiento y purificación de la Glucógeno Sintetasa en *Ascaris suum* (Nematode), *Fasciola hepatica* (Trematode) y *Moniezia expansa*. (En prensa, 1985).
8. KELLY, J. D.; CHEVIS, R. A. F. & WHITLOCK, H. V. — The anthelmintic efficacy of mebendazole against adult *Fasciola hepatica* and a concurrent mixed nematode infection in sheep. N. Z. vet. J., 23: 81-84, 1975.

9. KLEIN, J.; ZKHARENKO, D. F.; DOLGINA, L. E.; BRAGINETZ, W. R. & LINKO, I. A. In: KIM, C. W.; RUITEMBERG, E. J. & TEPPEMA, J. S. — Trichinellosis. Surrey, Reedbooks, 1981. p. 291-296.
10. KOMUNIECKI, P. R. & SAZ, H. J. — The effect of levamisole on Glycogen synthase and the metabolism of *Litosomoides carinii*. J. Parasit. 68: 221-227, 1982.
11. LELOIR, L. F. & GOLDEMBERG, S. A. — Glycogen synthase from rat liver. Meth. Enzymol., 5: 145, 1962.
12. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
13. MIED, P. A. & BUEDING, E. — Glycogen synthase of *Hymenolepis diminuta*. I. Allosteric activation and inhibition. J. Parasit., 65: 14-24, 1979.
14. PRICHARD, R. K. — Mode of action of the anthelmintic Thiabendazole in *Haemonchus contortus*. Nature, 228: 684-685, 1970.
15. PRICHARD, R. K. — The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics. Int. J. Parasit., 3: 409-417, 1973.
16. ROTMANS, J. P. — Glycogen synthase of *Schistosoma mansoni*: a preliminary report. Acta Leidensia, 48: 29-36, 1980.
17. VAN DEN BOSSCHE, H. & DE NOLLIN, S. — Effects of mebendazole on the absorption of low molecular weight nutrients by *Ascaris suum*. Int. J. Parasit., 3: 401-407, 1973.

Recebido para publicação em 20/8/85.