

Nota Técnica

Efecto como desparasitante del metronidazol y tinidazol frente a *Trichomonas muris* en hamsters

Anabel Hernández^{1*}, Magaly Molina¹, Gustavo Morales¹, Julio Garmendia²
y Zoraida Nava²

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Sección de Sanidad Animal. Apartado Postal 70. Maracay 2101. Aragua. Venezuela. *E-mail: heranabel@gmail.com

² Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracay. Aragua. Venezuela.

RESUMEN

Esta investigación evaluó la eficacia del metronidazol y tinidazol utilizados para eliminar *Trichomonas muris* en hámsters infectados naturalmente provenientes de un bioterio convencional. Se seleccionaron 40 hámsters machos positivos a *Trichomonas muris*, diagnosticados por demostración del trofozoito en examen coprológico. Se les administraron los antiparasitarios a concentraciones crecientes de 2,5 5,0 6,25 y 7,5 mg/mL por vía oral en una sola toma diaria por 5 días. Posterior a estas aplicaciones se instauró un segundo tratamiento, cuya dosificación fue 7,5 mg/mL, con dos tomas diarias. Finalmente, al culminar dichos tratamientos se les practicó la necropsia. El resultado del primer tratamiento fue una desparasitación del 20% al 6,25 mg/mL con el uso de tinidazol, obteniendo igual resultado para metronidazol al 7,5 mg/mL. En adición, el tinidazol fue eficaz en 40% al 7,5 mg/mL. Con respecto al tratamiento 2 se logró el 50% de desparasitación con metronidazol al 7,5 mg/mL y el 100% con tinidazol a la misma concentración. Los datos expuestos de manera descriptiva sugieren una baja actividad de los fármacos utilizados y resistencia del parásito; sin embargo, se recomienda el uso del segundo tratamiento aplicado y el realizar estudios prospectivos *in vitro* e *in vivo* e incluir los derivados sintéticos del nitroimidazole para así obtener un esquema de administración eficiente en la eliminación del protozoario.

Palabras clave: Metronidazol, tinidazol, hámster, *Trichomonas muris*, protozoarios.

Metronidazole and tinidazole effects on *Trichomonas muris* in hamsters

ABSTRACT

The main purpose of this research was to evaluate and compare metronidazole and tinidazole efficacy against *Trichomonas muris* in hamsters naturally infected and raised under conventional bioterio conditions. There were selected 40 male hamsters based on positiveness to *T. muris* infection diagnosed for demonstration of the trophozoites on the direct coprological observation. For this purpose metronidazole and tinidazole were administered daily, initially given in one intake during five days at concentrations of 2.5, 5, 6.25, and 7.5 mg/mL by oral way during five days. Thereafter, a second treatment was imposed with two intakes at 7.5 mg/mL. In the first five days of treatment 1, it was obtained a 20% of parasite elimination using tinidazole at a 6.25 mg/mL concentration. A similar response at was obtained by metranidazole at a concentration of 7.5 mg/mL. Additionally, tinidazole efficacy was 40% at a concentration of 7.5 mg/mL. Regarding treatment 2, it was found 100% of effectiveness for tinidazole at 7.5 mg/mL, whereas effectiveness for metronidazole was 50%, with an effective eradication specter lower than the seven days period. It is evidence of a low efficacy of the drugs against tricomicide activity. It is recommended to realize *in vitro* studies in order to evidence parasite resistance to synthetic drugs derived from nitroimidazole and to stimulate the study and development of new alternative drugs able to proportionate experimental models useful for research.

Keywords: Metronidazole, tinidazole, hamster, *Trichomonas muris*, protozoa.

INTRODUCCIÓN

La experimentación con animales de laboratorio ha sido un factor importante en el avance y desarrollo en las ciencias biomédicas, por lo tanto, las patologías generadas por diversos microorganismos, en especial los de origen parasitario, interfieren de manera preponderante en la fiabilidad de los resultados de una investigación. Las enfermedades asintomáticas que pueden presentarse en estos sustratos vivos no deben pasar desapercibidas por parte del investigador, ya que dichas infecciones pueden estimular significativas alteraciones metabólicas y fenómenos adversos que conducirían a modificar sustancialmente los resultados obtenidos y a incrementar costos, duración del ensayo en el tiempo y recursos de toda índole aportados por la comunidad científica. Aunado a estos, se suman los gastos generados en sistemas de prevención y repoblación de colonias animales. Tales complicaciones se evitarían mediante la prevención y la erradicación selectiva de organismos patógenos en el animal proveniente de bioterio (Zúñiga *et al.*, 2001).

Las infecciones parasitarias por protozoos presentes en las colonias de hámster de laboratorio, representan un problema difícil de controlar y deben ser solventados con el uso y administración de los quimioterápicos más apropiados. El metronidazol posee un espectro extraordinariamente amplio de actividad antiprotozoica y antimicrobiana y ha sido muy utilizado en los seres humanos y en animales, siendo activa contra diversos protozoos parásitos anaerobios y bacterias anaerobias. El mecanismo de acción de los nitroimidazoles se refleja en la toxicidad selectiva que poseen contra microorganismos anaerobios o microaerófilos y por células anóxicas e hipóxicas (Brunton *et al.*, 2006). Después de la administración oral, el metronidazol es rápidamente absorbido, al menos un 80% en menos de una hora. La biodisponibilidad oral es del 100% y no se modifica por la ingestión de alimentos. Las concentraciones plasmáticas obtenidas, tanto con la administración oral como parenteral, son proporcionales a las dosis administradas y dan lugar a curvas de concentración en función del tiempo, muy similares. También es buena la absorción por vía rectal (Fernández, 2002).

Con respecto al tinidazol, al igual que el metronidazol, es un derivado del nitroimidazole (Fernández, 2002). Puede administrarse en infecciones

producidas por tricomonas, giardiasis y amibiasis, infecciones por organismos estrictamente anaerobios y más allá de esta aplicación, también se administra en las inflamaciones de la encía (Ferreiro *et al.*, 2001). El tinidazol es un antiparasitario y antimicrobiano. Comparte con el metronidazol el mismo espectro de acción y efectividad, pero los diferencia el tiempo de vida media útil, siendo para el tinidazol mayor que para metronidazol. Este 5-nitroimidazólico reducido produce pérdida de la estructura helicoidal del ADN del parásito con ruptura de sus cadenas (Ferreiro *et al.*, 2001). El nitrato del tinidazol inhibe la biosíntesis del ergosterol y otros esteroides, impidiendo la desmetilación del lanosterol. Daña la pared y altera la permeabilidad de la membrana celular y como resultado, se produce pérdida de elementos intracelulares necesarios para la vida del microorganismo. También inhibe la biosíntesis de los triglicéridos y fosfolípidos y la actividad de las enzimas oxidativas y peroxidativas acumulándose concentraciones tóxicas del peróxido de hidrógeno en los organelos.

En animales de laboratorio las tricomonas pueden infectar una gran variedad de huéspedes, siendo las especies más frecuentemente identificadas la *T. minuta* que afecta rata y ratón, *T. microti* y *T. criceti* hámster, *T. caviae* cobayo y *T. muris* rata, ratón y hámster (Cuba, 1982). Las infecciones por *T. muris* pueden ser diagnosticadas por los signos clínicos, tales como enteritis y caquexia, en hámster infectados y por demostración del trofozoito en el contenido fresco proveniente del ciego o colon, emitiendo estos movimientos abruptos o tambaleantes muy característicos. En las muestras histopatológicas preparadas con hematoxilina y eosina, provenientes del ciego o colon de los hospedadores, se pueden observar estructuras teñidas, tal como el núcleo o la pared celular pobremente teñida del parásito, apareciendo esta última plegada sobre sí misma (Lipman *et al.*, 1999).

A nivel mundial, se han realizado investigaciones sobre la acción de los antiparasitarios sobre el género *Trichomonas*, entre los que se destaca el efectuado en Canadá donde se emplearon metronidazol, tinidazol y dimetronidazol para estudiar la eliminación de *Trichomonas* en ratones de laboratorio. Los resultados obtenidos mostraron resistencia al tratamiento con dimetronidazol a concentraciones crecientes de la droga y lograron eliminación de la *trichomonas* al usar

2,5 mg/mL de metronidazol o tinidazol suministrado de la misma manera logrando el 100% de efectividad (Roach *et al.*, 1988).

En este ensayo se describen los resultados obtenidos al evaluar el efecto de metronidazol y tinidazol en la desparasitación de hámsters infectados naturalmente con *Trichomonas muris*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La población inicial de la cual se seleccionó la muestra para el presente estudio fue de 680 hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*) criados en el bioterio de Sanidad Animal del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, en Maracay, Aragua, Venezuela.

La muestra de la población resultó ser de 30 hámsters machos positivos a *Trichomonas muris* y 10 negativos, con 2 meses de edad y peso promedio de 100 g, mantenidos individualmente durante toda la experimentación en jaulas de acero inoxidable conteniendo como cama cáscara de arroz estéril, alimentación *ad libitum* a base de alimento concentrado (Ratarina®) y agua filtrada. Se practicaron medidas higiénicas tales como: esterilización de jaulas, bebederos y cama, se realizaron cambios una vez a la semana de la cama de los animales.

La evaluación de identificación de protozoos en animales para establecer el estado fisiológico, tanto al inicio como durante el protocolo de investigación, se logró a través de la realización de necropsias; se toma muestras del ciego e intestino delgado para efectuarles el examen microscópico con solución salina y detectar la presencia de *T. muris*, tomando como referencia lo descrito por Lipman *et al.* (1999).

Se procedió a la aplicación de los tratamientos con metronidazol y tinidazol. El protocolo de trabajo a la dosis terapéutica y administración de las drogas fue el utilizado en los estudios de Roach *et al.* (1988). Para cada uno de los 4 grupos se seleccionaron al azar 10 hamsters, asignados de la siguiente manera de acuerdo a la dosificación: grupo 1. No infectados y sin administración de fármacos (control positivo), grupo 2. Infectados y sin droga (control negativo), grupo 3. Infectado y con dosificación con metronidazol y grupo 4. Infectado y con tinidazol. Las concentraciones de cada uno de los antiparasitarios fueron de 2,5 3,75

5,0 6,25 y 7,5 mg/mL. Se evaluaron con respecto a su actividad contra *T. muris*. Las dosis de cada fármaco fueron preparadas inmediatamente antes de su administración por vía oral en una sola toma diaria por 5 días consecutivos. Luego, cada fármaco, a una dosis de 7,5 mg/mL, se administro en dos tomas al día, una en la mañana y la otra en la tarde, utilizando una inyectadora de 1 mL. El Cuadro 1 presenta un esquema de la aplicación de los dos tratamientos y su duración usados para erradicar el parásito. Luego de iniciado el tratamiento de cada una de las diferentes concentraciones para los cuatro grupos, al 8^{vo} día de cada tratamiento se efectuó el sacrificio de un hamster por inhalación con formaldehído. Se tomó una muestra de ciego e intestino delgado para realizar el examen coprológico y detectar la presencia de *T. muris*.

Examen parasitológico

Inicialmente, se realizó el examen microscópico para determinar infección y realizar la selección de los animales positivos a *Trichomonas muris*. En un porta objeto se colocó separadamente una gota de solución salina al 0,85% y se cubrió con un porta objeto de 22 x 22 mm y se observó al microscopio con objetivo 10X y luego 40X. El diagnóstico se realizó mediante la demostración de los trofozoitos que permitieron observar la movilidad característica del microorganismo y la forma quística indicativa de resistencia.

Para determinar el porcentaje de desparasitación se utilizó una relación semicuantitativa entre el grupo tratado con metronidazol y el tratado con tinidazol para determinar el porcentaje de eliminación parasitaria producida por los medicamentos. Para tal fin, se dividió el campo visual del microscopio en 4 cuadrantes, se contó la cantidad de parásitos presentes en uno de los cuadrantes y se multiplicó por cuatro. Se realizó el conteo de trichomonas para determinar el porcentaje de desparasitación y comparar los resultados obtenidos en los grupos III con metronidazol y IV con tinidazol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prueba se inicio con la administración de una dosis terapéutica de 2,5 mg/mL de metronidazol y tinidazol a los grupos III y IV, respectivamente, tal

Cuadro 1. Representación esquemática de los tratamientos utilizados para la erradicación de *Trichomonas muris*.

Días	Grupo III	Grupo IV
1		
2		
3	Metronidazol (2,5 mg/mL)	Tinidazol (2,5 mg/mL)
4	1 toma diaria	1 toma diaria
5		
6-7		
8		Evaluación
9		
10		
11	Metronidazol (3,75 mg/mL)	Tinidazol (3,75 mg/mL)
12	1 toma diaria	1 toma diaria
13		
14		
15-16		
17		Evaluación
18		
19		
20	Metronidazol (5,0 mg/mL)	Tinidazol (5,0 mg/mL)
21	1 toma diaria	1 toma diaria
22		
23		
24-25		
26		Evaluación
27		
28		
29	Metronidazol (6,25 mg/mL)	Tinidazol (6,25 mg/mL)
30	1 toma diaria	1 toma diaria
31		
32		
33-34		
35		Evaluación
36		
37		
38	Metronidazol (7,5 mg/mL)	Tinidazol (7,5 mg/mL)
39	1 toma diaria	1 toma diaria
40		
41		
42-43		
44		Evaluación
45		
46		
47	Metronidazol (7,5 mg/mL)	Tinidazol (7,5 mg/mL)
48	2 tomas diarias	2 tomas diarias
49		
50		
51-52		
53		Evaluación Final

como se muestra en el Cuadro 2. Los datos obtenidos luego de esta dosificación permiten definir que no hubo disminución de la carga parasitaria en ninguno de los tratamientos utilizados. Tal resultado, contrasta con lo referido por Roach *et al.* (1988), quienes demostraron que el uso del metronidazol y tinidazol administrado en el agua de bebida, a una concentración de 2.5 mg/mL fue eficiente en la eliminación de *T. muris* en los ratones de laboratorio.

En vista de esto, se procedió a la aplicación del segundo tratamiento con una dosis mayor del medicamento. Se repitió el protocolo variando la concentración de los medicamentos de 2,5 a 3,75 mg/mL. Los resultados fueron similares ya que no se observó disminución de la carga parasitaria a dicha concentración. Nuevamente, se repitió el protocolo de trabajo incrementando la concentración a 5,0 mg/mL, observándose movimientos lentos y atenuados de los parásitos, pero sin eliminación de estos para los animales que fueron dosificados con metronidazol. Por su parte, en los hámsters que recibieron tinidazol, se evidenció un estado de latencia e inamovilidad del trofozoito del parásito, pero sin eliminación del mismo. Una vez más se repitió el protocolo de trabajo con incremento de la concentración de los dos medicamentos a 6,25 mg/mL. Hubo una disminución de la parasitosis en 20% con el tinidazol. Sin embargo, para el metronidazol no se evidenció disminución ni eliminación de la parasitosis.

Continuando el ensayo y buscando la dosis para la eliminación de *T. muris* se modificó la concentración de los dos medicamentos a 7,5 mg/mL y se aplicó la administración de una toma diaria y otro ensayo con la misma concentración de 7.5 mg/mL, pero con dos tomas al día, una en la mañana

Cuadro 2. Efecto antiparasitario de desparasitación frente a *T. muris* del metronidazol y tinidazol a distintas concentraciones.

Dosis mg/mL	Metronidazol ----- % -----	Tinidazol ----- % -----
2,5	0	0
3,75	0	0
5,0	0	0
6,25	0	20
7,5	50	100

y otra en la tarde. El porcentaje de desparasitación fue el siguiente: En la evaluación de forma clásica se observó una eliminación de la parasitosis en una 40% para los hámster tratados con tinidazol y un 20% de eliminación para los tratados con metronidazol, así como se muestra en la Figura 1. Sin embargo, en los animales con 2 tomas diarias de los medicamentos, se evidenció la eliminación total del parásito para los que recibieron tinidazol y solo una desparasitación del 50% para el grupo que recibió metronidazol.

La resistencia al metronidazol se ha estudiado ampliamente en trichomonas en cepas aisladas en laboratorio. En Canadá, Cudmore *et al.* (2004) realizaron un estudio sobre el tratamiento de las infecciones causadas por *Trichomonas vaginalis* resistentes a metronidazol. En cuanto al tratamiento, la administración por vía oral o intravenosa les resultó

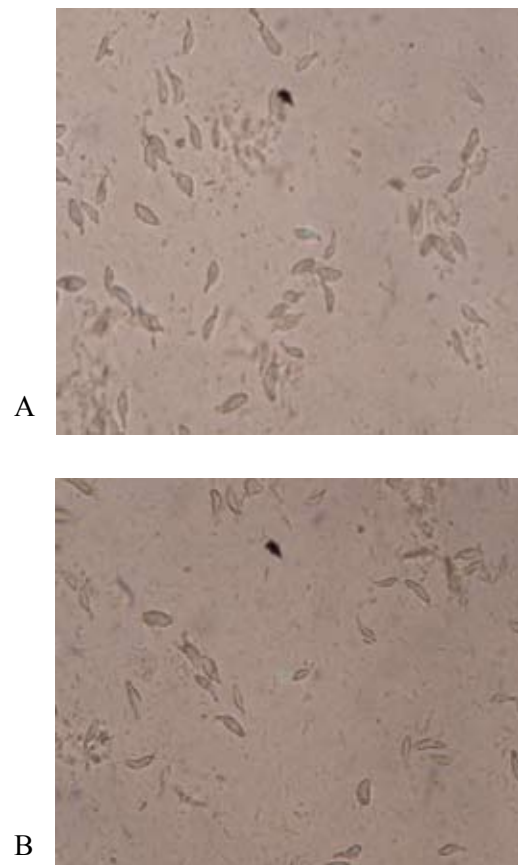


Figura 1. Examen directo del contenido intestinal del ciego e intestino delgado de hamsters tratados con tinidazol y metronidazol en (A) una sola toma a la concentración de 7,5 mg/mL con metronidazol, 20% de desparasitación y (B) tinidazol, 40% de desparasitación.

eficaz en un 85 a 95%. La reinfección y otros factores deben considerarse cuando el tratamiento falla. Estos autores también refieren que el 5% de los casos resultan consecuencia de cepas trichomona resistentes a metronidazol. El grado de resistencia a la droga puede ser útil al estimar la dosificación que puede ser eficaz aumentando la dosis o combinando varios fármacos. La información limitada sobre el efecto de estas drogas hace cuestionable si estos tratamientos son curativos o no. Meri *et al.* (2000) realizaron una investigación sobre la resistencia de trichomonas al metronidazol y describen cepas resistentes. Se han hallado mecanismos metabólicos de resistencia al cultivar estas trichomonas tanto en aerobiosis como en anaerobiosis.

La resistencia anaerobia al metronidazol se observa solo en estudios de laboratorio en cepas de *T. vaginalis* y *T. foetus* expuestas a concentraciones crecientes del fármaco en el cultivo. A diferencia de estas, existen cepas que muestran un tipo de resistencia al metronidazol cuando estas son aisladas y cultivadas en aeróbiosis.

Dichas cepas resistentes al medicamento contienen valores más bajos de ferredoxina, proteína que cataliza la reducción del metronidazol en dichos microorganismos. El hecho de que disminuyan los valores de ferredoxina, pero sin que desaparezcan del todo, quizás explica porque las infecciones con las cepas mencionadas suelen reaccionar a mayores y más prolongadas dosis de metronidazol (Brunton *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La utilización del metronidazol como antiparasitario de elección para la eliminación de las trichomonas en hámster no resultó ser efectiva, al obtener solo una disminución del 50% de los parásitos a la concentración de 7,5 mg/mL, administrándolo 2 veces al día por 5 días.

Se recomienda un tratamiento alternativo de elección con la utilización del tinidazol por un periodo menor a 7 días a la concentración de 7,5 mg/mL, administrándolo 2 veces al día por cinco días.

La no determinación de una dosis 100% efectiva en este modelo experimental para eliminar esta parasitosis *in vivo* permite recomendar estos ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* con la finalidad de

determinar presencia o ausencia de resistencia frente a *Trichomonas muris* bajo la acción de las azomicinas (2-nitroimidazol).

Se sugiere continuar con el establecimiento de una línea de investigación basada en actividades destinadas a la determinación de un esquema de administración antiparasitaria frente a *Trichomonas muris* que sea adecuado y eficiente, en función de incluir y comparar en dichos trabajos, a saber: especie animal, dosis terapéutica, vía de administración y tiempo de dosificación.

LITERATURA CITADA

- Botero D. y M. Restrepo. 1998. Parasitosis Humana. 3^{ra} ed. CIB. Medellín, Colombia.
- Cuba A. 1982. Manual de Patología de Animales de Laboratorio. Ed. Panamericana de Salud.
- Cudmore S., K. Delgaty, Sh. Hayward-McClelland, D. Petrin y E. Gary. 2004. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. Rev. Clin. Microbiol., 17(4): 783-793.
- Fernández I. 2002. Metronidazol. Universidad Nacional del Uruguay. Disponible en: <http://www.infecto.edu.uy/terapeutica/atbfa/metro/METRONIDAZOL.htm>
- Ferreiro G., L. Badias, E. González y J. Aguirre. 2001. Tinidazol: una droga antimicrobiana con actividad genotóxica. Rev. Cub. Inv. Biomed., 20(1): 54-58.
- Brunton L.L., J.S. Lazo y K.L. Parker. 2006. Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10^{na} ed. Interamericana, México.
- Lipman N.S., N. Lampen y H.T. Nguyen. 1999. Identification of pseudocysts of *Tritrichomonas muris* in Armenian hamsters and their transmission to mice. Lab. Anim. Sci., 49(3): 313-315
- Meri T., T.S. Jokiranta, L. Suhonen y S. Meri. 2000. Resistance of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole: Report of the first three cases from Finland and optimization of in vitro susceptibility testing under various oxygen concentrations. J. Clin. Microbiol., 38(2). 763-767

Roach P.D., P.M. Wallis y M.E. Olson. 1988. The use of metronidazole, tinidazole and dimetridazole in eliminating trichomonads from laboratory mice. *Lab. Anim.*, 22(4): 361-364.

Zúñiga M., J. Turmari, S. Milocco y R. Piñeiro. 2001. *Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal*. McGraw-Hill/Interamericana de España. Madrid, España.