

12 2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"CUAUTITLAN"



ESTUDIO DEL EFECTO DEL PRAZIQUANTEL Y/O
YATREN, SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HU-
MORAL DE RATONES NIH A ANTIGENOS
TIMODEPENDIENTES

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO
B I O L O G O
P R E S E N T A I
RICARDO R. CHAVEZ OSEKI

DIRECTOR:

M. SC. CARLOS RAMON BAUTISTA GARFIAS

ASESOR:

M. EN C. CARLOS RAMON GARCIA CONTRERAS



CUAUTITLAN, IZCALLI, EDO. DE MEX.

1990





UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Pag.
Abreviaturas	1
I.- Resumen	2
II.- Introducción	3
III.- Antecedentes	6
3.1. Cisticercosis	6
3.2. Ensayos Hemolíticos	10
3.3. Praziquantel	12
3.3.1. Propiedades Físicoquímicas	12
3.3.2. Propiedades Farmacocinéticas	15
3.3.2.1. Absorción	15
3.3.2.2. Distribución	16
3.3.2.3. Permeabilidad Placentaria	17
3.3.2.4. Permeabilidad de la Barrera Hemo- toencefálica	18
3.3.2.5. Distribución en Parásitos	18
3.3.2.6. Biotransformación	19
3.3.2.7. Excreción	20
3.3.3. Actividad Terapéutica	21
3.3.4. Toxicología	26
3.3.5. Mutagenicidad, Carcinogenicidad y Clasto- genicidad	28
3.3.6. Mecanismo de Acción	30
3.3.7. Inmunología	33
IV.- Objetivo	35
V.- Diseño Experimental	36
VI.- Material y Métodos	38
VII.- Resultados	43
VIII.- Discusión	52
IX.- Conclusiones	58
X.- Bibliografía	59
Apéndice	68

ABREVIATURAS

B-AG ^r	Ensayo de Resistencia a 8-azaguanina.
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin.
BSA	Albúmina Sérica Bovina.
DL ₅₀	Dosis Letal 50.
CFP	Células Formadoras de Placa.
EAC	Eritrocitos cubiertos de anticuerpo y complemento.
EB	Eritrocitos de Borrego.
FDA	Food and Drug Administration.
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
HBSS	Solución Salina Balanceada de Hanks'.
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias.
i.p.	Intraperitoneal.
i.v.	Intravenosa.
mg	Miligramos.
MIF	Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos.
ml	Mililitros.
MNNG	N-Metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina.
PBS	Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos.
p.o.	Vía oral.
PZQ	Praziquantel.
s.c.	Subcutánea.
SFB	Suero Fetal Bovino.
SNC	Sistema Nervioso Central.
SSA	Secretaría de Salubridad y Asistencia.
SSF	Solución Salina Fisiológica.
UFP	Unidades Formadoras de Colonias.
µg	Microgramos.
µl	Microlitros.

R E S U M E N

I.- R E S U M E N

El Praziquantel es un fármaco anti-helmíntico desarrollado recientemente por grupos farmacéuticos Alemanes, activo contra una amplia gama de céstodos y tremátodos. En este trabajo, se reporta el estudio del efecto sobre el Sistema Inmune de ratones normales no infectados, de la cepa NIH; del Praziquantel (PZQ), Bacilo de Calmette y Guerin (BCG), Yatrén-Caseín y combinaciones de ellos, al ser administrados intraperitonealmente, bajo un régimen recomendado contra formas larvarias de céstodos, alojadas en el Sistema Nervioso Central. Los resultados obtenidos, después de aplicar esta dosificación, indican que el PZQ al igual que BCG, no tienen efecto sobre la generación de respuesta inmune humoral contra un antígeno tímodependiente (eritrocitos de borrego); evaluada por la técnica de Células Formadoras de Placas (CFP), utilizando la variante de Cunningham. Sin embargo, el Yatrén-Caseín, indicado como inmunoestimulante, disminuye notablemente esta respuesta, independientemente de su combinación con PZQ ($p < 0.05$), reestableciéndose esta disminución únicamente al interaccionar con BCG. Concluyéndose que el PZQ solo y el Yatrén-Caseín con BCG, no alteran la capacidad del Sistema Inmune de ratones normales para generar respuesta humoral; mientras que Yatrén Caseín solo y combinado con PZQ sí la afectan, disminuyéndola.

INTRODUCCION

II.- INTRODUCCION

A pesar del desarrollo de una gran cantidad de nuevos fármacos como la Niclosamida, Bunamidina, Metrifonato Niridazol, Hycanthona y del Mebendazol, antihelmíntico de amplio espectro contra nemátodos de 27 géneros, pertenecientes a 8 familias y eficaz contra solitarias de 5 familias de céstodos (14, 32); muchas infecciones por céstodos, tremátodos y nemátodos permanecen en la Medicina Humana y Veterinaria con tratamientos quimioterapéuticos in satisfactorios o sin tratamiento, debido a que estas sustancias no pueden ser empleadas en programas de erradicación masiva porque no cumplen con los requisitos para este fin; los cuáles incluyen: eficacia contra todos los es tados y los diferentes géneros de parásitos, pocas dosis por tratamiento, baja toxicidad y estabilidad química. El principal inconveniente del uso de todos ellos es su elevada toxicidad, ya que se han reportado como mutágenos y carcinógenos directos (6, 7, 9, 65). Por otra parte, se ha estimado que aproximadamente 300 millones de personas en el mundo están infectadas por esquistosomas, 100 millones tienen infecciones intestinales por céstodos, 700 millones por ancilostomas y 1000 millones por Ascaris, ocasionando pérdidas económicas considerables debido al costo de tratamientos, ausentismo laboral, etc. (6, 48).

Particularmente en América Latina, según estudios epidemiológicos, en 1973 se presumía que existían 300 000 personas con neurocisticercosis (11); en México se calcula que el 2% de la población está afectada, ya que presenta anticuerpos frente a Cysticercus cellulosae; además casi el 100% de los humanos intervenidos quirúrgicamente, por cualquier causa, se les encuentra Cysticercus racemosus (1), estado larvario que algunos investigadores consideran como forma aberrante del cisticercos de Taenia so-

lium (11). Esto hace más apremiante el unir esfuerzos y establecer mecanismos de control lo suficientemente eficaces para evitar esta parasitosis.

Considerando lo anterior, recientemente muchas investigaciones se concentraron en desarrollar un fármaco con el cual fuese posible tratar todas las infecciones por céstodos y que al mismo tiempo fuese bien tolerado. Estos esfuerzos condujeron al estudio de nuevas pirazina isoquinoleínas heterocíclicas con alto efecto antiparasitario. El compuesto más importante surgido de esta investigación fue el Praziquantel, compuesto desarrollado por E. Merck, Darmstadt en colaboración con Bayer AG, Leverkusen, de Alemania. Este fármaco tiene características especiales que actualmente le hacen sujeto de amplios estudios, uno de ellos es su alta efectividad contra un amplio rango de céstodos y tramátodos; dentro de estos últimos, especialmente los esquistosomas, cuya importancia en salud humana es relevante (48).

Con el surgimiento del PZQ, usado en combinación con BCG o Yatren-Casefina propuesto por Chavarría (14), surge también la posibilidad de tratamiento de la neurocisticercosis humana, que hasta antes de este momento permanecía como una afección de mal pronóstico y cuyas únicas posibilidades de curación eran las quirúrgicas.

Por lo que respecta al BCG, éste es un inmunopotenciador inespecífico que desencadena básicamente una respuesta de tipo celular; sus aspectos moleculares han sido dilucidados y ampliamente estudiados por muchos investigadores, el detallar los hallazgos de éstos, sería tema suficiente para desarrollar otro trabajo de tesis, baste mencionar que se ha utilizado, incluso, en tratamientos de cáncer con resultados bastante alentadores (25, 30, 34, 38).

Por otro lado, el Yatren-Caseína, es una sustancia indicada por el fabricante como un inmunoestimulante no específico de uso veterinario, cuyos componentes incluyen: caseína purificada al 5% y ácido yodo-oxiquinolín-sulfónico (chiniofón).

No fue posible encontrar en la literatura ninguna información sobre estudios del efecto de este compuesto en el sistema inmune.

Resulta de interés investigar la posibilidad planteada por algunos autores de que el PZQ tiene alguna participación en la estimulación del sistema inmune en su fracción celular (14); buscando adicionalmente el efecto de su interacción con las sustancias propuestas para el tratamiento de cisticercosis cerebral en humanos; BCG y Yatren-Caseína, sugeridas para desencadenar respuestas inmunes generalizadas encaminadas a neutralizar las toxinas de cisticercos calcificados y eliminación de cisticercos muertos por terapia con Praziquantel.

ANTECEDENTES

III.- ANTECEDENTES

3.1. Cisticercosis.

La cisticercosis es una parasitosis producida por las formas larvarias de algunos céstodos y que afecta a varias especies animales (cuadro No. I). Esta parasitosis representa un problema importante de Salud Pública en varias regiones del llamado Tercer Mundo, como: América Central y del Sur, Africa meridional, sureste de Asia India y el Caribe, por su elevada frecuencia y a las manifestaciones extremadamente graves de la enfermedad, cuando afecta a seres humanos (22). Sin embargo, países industrializados como la Gran Bretaña y Estados Unidos reportan casos de neurocisticercosis en pacientes que denominan de "importación", los que se convierten en diseminadores potenciales de dicha parasitosis (11, 17, 49).

Otras consecuencias importantes de esta afección, es el impacto económico cuando afecta a los animales útiles al hombre, particularmente la ganadería porcina, ovina y bovina; ya que la presencia de ésta es causa de decomiso.

En México, la cisticercosis porcina es una de las más importantes y es a donde se han dirigido los esfuerzos para esclarecer su patogenia y posible control (23). En análisis económicos realizados en nuestro país durante los años 1980-81, se habla de 1.55% de cerdos afectados por cisticercosis, considerando que en ese periodo se sacrificaron 17, 825, 600 cerdos, esto significa que 276, 296 fueron decomisados y cuyas pérdidas, en ese momento, llegaron a ser de \$ 1, 934, 072, 000.00; cifra considerable que debió en parte ser dedicada a la investigación (1). A este respecto, datos más recientes no se encuentran disponibles.

Cuadro I.- Relaciones Huésped-Tenia. (22)

PARASITO	HUESPED PRINCIPAL	HUESPED SECUNDARIO
<u>Tania solium</u>	Humano	----
<u>Cysticercus cellulosae</u>	Cerdo	Humano, Perro
<u>Taenia saginata</u>	Humano	----
<u>Cysticercus bovis</u>	Res	----
<u>Taenia taeniaeformis</u>	Gato	Armiño, Lince, Zorro.
<u>Cysticercus fasciolaris</u>	Rata, Ratón	Conejo, Ardilla, Rata Almizclera
<u>Taenia pisiformis</u>	Perro, Zorro	Gato, Carnívoros salvajes.
<u>Cysticercus pisiformis</u>	Conejo, Liebre	Otros roedores
<u>Taenia ovis</u>	Perro, Zorro	----
<u>Cysticercus ovis</u>	Oveja	----
<u>Taenia hydatigena</u>	Perro	Algunos carnívoros salvajes.
<u>Cysticercus tenuicollis</u>	Oveja, Cabra	Ardilla, otros roedores.

Taenia: Estado adulto del parásito.

Cysticercus: Estado larvario del parásito.

La cisticercosis en cerdos, mencionada anteriormente, es la que afecta al ser humano y es causada por el establecimiento de la larva de Taenia solium, el Cysticercus cellulosae, y que en el medio público recibe diversas denominaciones como: zahuate, alfilerillo, tomate tomatillo, fresilla, grano, etc. Este cisticerco se localiza en el tejido muscular y nervioso de su huésped principal, que es el cerdo; fundamentalmente en lengua, músculos maseteros, del ojo, anóneos, intercostales, corazón y en ocasiones invadiendo todas las masas musculares, además del cerebro (1).

En el hombre, la localización del Cysticercus cellulosae es predominantemente en el cerebro, considerándose de la infección parasitaria más común del Sistema Nervioso Central, aunque en realidad puede encontrarse en cualquier tejido, órgano o víscera. La sintomatología desencadenada no siempre correlaciona clínicamente y puede aventurarse que ésta se condiciona, entre otros factores, y no siempre, al tejido u órgano parasitado.

En caso de afección del Sistema Nervioso Central, la sintomatología que se presenta es muy variada, tanto que sería prolijo detallarla, pero generalizándola pueden señalarse como la más frecuente: el dolor de cabeza las crisis convulsivas graves, hipertensión endocraneana y ocasionalmente la muerte (11, 67).

Estudios adicionales hechos por Romero (43) detectando anticuerpos contra Cysticercus cellulosae en cerdos, por inmunoelectroforesis, reporta 38.6% e Inclán (27) 30.4% de cerdos positivos sacrificados en rastro; datos que se contraponen con el 1.55% reportado anteriormente, por análisis de lenguas exclusivamente. Si esto ocurre ciertamente, la existencia y consumo de carne con cisticercos perpetúa el ciclo vital de Taenia

solium. Los individuos portadores de las solitarias, además de producir nuevos casos de cisticercosis en cerdos, también ocasionan cisticercosis en humanos, que como se mencionó anteriormente puede tener consecuencias fatales.

Con respecto a su ciclo biológico, por todos conocido, se inicia a partir de un individuo con T. solium, que elimina en las heces segmentos grávidos que contienen los huevos; los cuales, en contraste con el concepto aceptado actualmente de que por diversas maneras puede contaminar el agua o alimento que consume el cerdo o bien el hombre, como principales vehículos de transmisión, el aire y las moscas juegan un papel más importante como mecanismo de transmisión. En estos huéspedes se libera la oncosfera (larva en las primeras etapas de desarrollo) en el intestino y por vía sanguínea migra a los diferentes tejidos para desarrollar la fase infectante que es el C. cellulosae, donde permanece viable por tiempo variable. De esta manera el hombre (huésped definitivo) al consumir carne mal cocida con cisticercos se le desarrolla la T. solium en el intestino delgado para así cerrar el círculo de vida nuevamente (14).

En nuestro país, la frecuencia de la cisticercosis humana no se ha modificado en 40 años y se calcula que el 2% de la población se encuentra afectada (22); su detección se ve dificultada debido a que una alta proporción (aproximadamente el 50%) es asintomática (11, 14); razón por la cual se hace necesario incrementar el número de estudios encaminados a investigar nuevas posibilidades de diagnóstico y tratamiento con miras a lograr su erradicación.

3.2. Ensayos Hemolíticos.

El método de placas hemolíticas permite la visualización de muy pequeñas cantidades de anticuerpos líticos, (10^3 a 10^6 moléculas) liberados en el entorno de un solo linfocito, manifestándose éstos mediante el uso de un indicador, EB, con la adición extrínseca de complemento.

Originalmente este ensayo fue desarrollado utilizando cajas de Petri por Jerne y Nordin (28) y permitió el conteo, reconocimiento y estudio de células formadoras de anticuerpos de manera individual. Este método mide el número de células secretoras de anticuerpos IgM de alta eficiencia, asumiendo que solamente ésta fija eficientemente el complemento; teóricamente, una sola molécula de IgM es suficiente para iniciar el proceso lítico, denominamos a esta técnica como método directo.

Posteriormente se realizaron modificaciones para adecuar esta técnica para cuantificación de otros tipos de inmunoglobulinas (Igs.) menos eficientes en llevar a cabo el proceso lítico, principalmente IgG (16, 54) y surgieron los llamados métodos indirectos, que usan sueros anti-inmunoglobulinas que actúan como amplificadores. Estos antisueros se pegan a las moléculas de inmunoglobulinas que se fijaron al eritrocito durante un período de incubación previo; la presencia de los complejos inmunoglobulinas-antiinmunoglobulinas, facilita la hemólisis al tratamiento subsecuente con complemento.

El método en placas, descrito por Jerne y Nordin, tiene la desventaja de requerir grandes cantidades de reactivos, lo cual puede ser crítico; principalmente cuando se utiliza el método indirecto, donde la cantidad de antisuero anti-inmunoglobulinas es un factor limitan-

te o cuando la sensibilización de eritrocitos requiere de reactivos costosos.

Todas estas circunstancias, hacen que actualmente los laboratorios que necesiten utilizar esta técnica como herramienta de investigación en Inmunología, se inclinen por una variación desarrollada por Cunningham; quien propone colocar en una microcámara la mezcla de células linfoides y eritrocitos indicadores (35).

El método es simple, económico y sensible; generalmente calificado como el ensayo hemolítico más sensible y que puede ser adaptado para realizar estudios de micro manipulación.

3.3. PRAZQUANTEL.

El PZQ es un fármaco recientemente desarrollado, por grupos farmacéuticos alemanes, con una importante actividad antiparasitaria lo que le hace sujeto de amplios estudios al respecto, sus características fisicoquímicas más importantes, se resumen a continuación:

3.3.1. Propiedades Fisicoquímicas.

NOMBRE TRIVIAL : (58)

PRAZQUANTEL, EMBAY 8440

NOMBRE COMERCIAL : (8, 59)

DRONCIT, BILTRICIDE, CESOL

NOMBRE QUIMICO : (8)

2-(Ciclohexano-carbonil)-4-oxo-1,
2,3,6,7,11 b- hexahidro- 4 H pirazi-
no (2,1 - a) Isoquinolina.

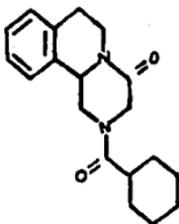
FORMULA CONDENSADA : (48)

$C_{19}H_{24}N_2O_2$.

PESO MOLECULAR : (48)

312.41 Daltones.

FORMULA DESARROLLADA : (15)



PUNTO DE FUSION : (48)

136-139 °C. con descomposición.

DESCRIPCION : (14)

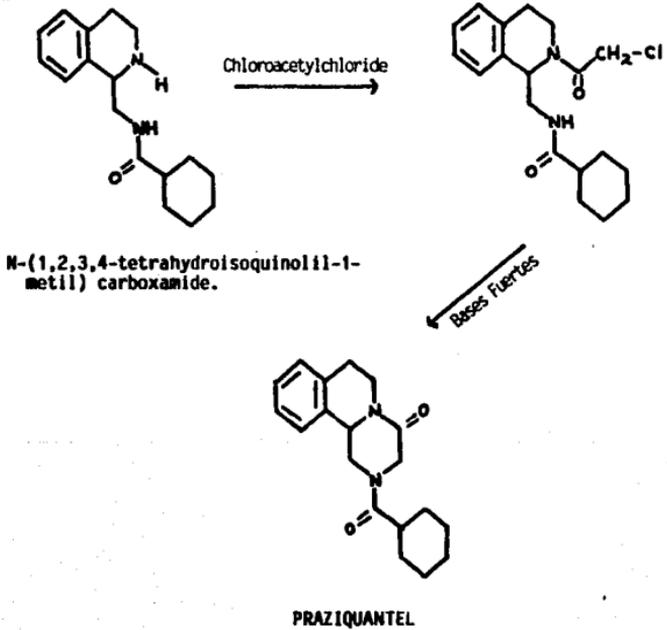
El PZQ es un sólido cristalino, de color blanco a amarillento, olor característico y posee sabor acre.

SOLUBILIDAD : (48)

La solubilidad del PZQ no es afectada por el pH. Es muy poco soluble en agua, 0.04 g/ml a 25 °C; es soluble en muchos disolventes orgánicos como: **ciclohexano**, 56.7 g/ 100 ml a 25 °C; **etanol**, 9.7 g/ 100 ml a la misma temperatura.

SINTESIS QUIMICA : (48)

La síntesis química del PZQ puede realizarse mediante las siguientes reacciones.



3.3.2. Propiedades farmacocinéticas.

Se ha evaluado el comportamiento farmacocinético del PZQ en varias especies animales, que incluyen: ratas Wistar, perros Beagle, mono Rhesus y ovejas, principalmente. Para efectuar estos estudios se dispuso de PZQ marcado ra dioactivamente, se emplearon las vías de administración oral e intravenosa con dosis de 10 mg/kg y 2 mg/kg, respectivamente y los métodos de evaluación fueron: cromatografía en capa delgada, espectrometría de centelleo en medio líquido y macroautorradiografía (15, 52, 53).

3.3.2.1. Absorción.

Utilizando la metodología mencionada anteriormente, se ha encontrado que la sustancia es captada por los tejidos dentro de los 5 minutos después de la administración intravenosa, identificándose 2 fases de permanencia de radioactividad en el suero de los animales investigados: una que dura hasta las 6 horas con un tiempo de vida media de 2-3 horas y la otra hasta las 24 horas, con una vida media de 6-8 horas; observándose que después de este tiempo no puede detectarse fármaco ni sus metabolitos, por lo cual se asume que fue completamente eliminado. En cuanto a la administración oral, el PZQ es rápidamente absorbido del tracto gastrointestinal y las concentraciones máximas en suero se detectan entre los 30 minutos y 60 minutos después de la administración, y, al igual que la vía intravenosa, después de 24 horas no se detecta en suero (52).

Investigando la participación de la mucosa estomacal en el proceso de absorción, se usaron ratas con el píloro ligado, concluyéndose que la absorción puede efectuarse por esta vía con una eficiencia hasta del 50% después de 6 horas (52).

El efecto acumulativo de dosis repetidas de PZQ fue evaluado en ratas observándose que la concentración alcanza un límite y permanece después de la tercera administración sin que la efectividad de la eliminación se afecte.

Investigando la presencia de PZQ en el suero de los animales tratados, se pudo detectar el fármaco sin cambio en muy baja concentración en comparación con la radioactividad total detectada, significando este hecho que el PZQ inalterado tiene una muy alta afinidad por los tejidos y que su tasa de biotransformación es grande (52).

La capacidad del PZQ para unirse a proteínas plasmáticas fue evaluado mediante la técnica de ultracentrifugación por 24 horas a 0 °C y posterior detección de radioactividad en el sobrenadante libre de proteínas, los resultados revelan que la porción del fármaco que no se une a proteínas es del 14 al 20% de la concentración total administrada (76% se une a proteínas) (52, 60).

3.3.2.2. Distribución.

Con el objeto de obtener información extensiva sobre la captación de PZQ en tejidos y órganos se diseñaron algunos métodos para evaluar la distribución, que incluyen: macroautorradiografía y espectrometría de centelleo; obteniéndose que 5 minutos después de utilizar la vía de administración intravenosa, la radioactividad tiende a localizarse principalmente en hígado y riñones; aunque también es detectable en mucosa gastrointestinal de manera muy escasa, probablemente al proceso secretorio que se lleva a cabo en este epitelio mucosal, descrito más adelante. Altas concentraciones también son detectadas en la pituitaria, médula ósea, adrenales y páncreas. Después de 60 minutos, la radioactividad se detecta solamente en hígado, riñón, médula ósea y pituitaria; 8 horas más tarde, el hígado y riñón son visibles

muy levemente y la radioactividad se detecta solamente en el tracto gastrointestinal. Finalmente, a las 24 horas de la administración no se detecta ninguna cantidad en los órganos mencionados, considerando que el PZQ ha sido completamente eliminado (53).

Cuando se utiliza la vía oral, a los 30 minutos la radioactividad se encuentra en riñones e hígado, principalmente, aunque adrenales, ovarios y útero se caracterizan con las más altas concentraciones que los demás órganos. A las 8 horas, el patrón de distribución sigue siendo el mismo y el intestino delgado y grueso presentan la mayor cantidad de radiación; 24 horas después, el fármaco es eliminado completamente del cuerpo (53).

Con la finalidad de aclarar el papel de acumulación órgano-específica del PZQ, éste fue administrado i.v. durante 3 días y p.o. por 4 días; no existe diferencia con los resultados reportados para administraciones individuales, encontrándose que los riñones y el hígado juegan los papeles fundamentales como órganos excretores y biotransformadores, respectivamente (53).

3.3.2.3. Permeabilidad Placentaria.

La evaluación de la transferencia placentaria fue evaluada en ratas Wistar, en el último tercio del embarazo, usando dosis administradas p.o. e i.v. (53).

Se observa que 5 minutos después de la administración i.v. un 2.6% del fármaco se localiza en útero y un total de 1.3% en el feto; después de 24 horas, estos valores son de 0.6% para útero y 0.3% para el feto (53).

La administración p.o., presenta un patrón muy similar: 30 minutos después de la administración, un promedio de 1.3% de la dosis se localiza en feto y 24 ho-

ras después 0.5% en útero y 0.4% en feto (53).

3.3.2.4. Permeabilidad de la Barrera Hematoencefálica.

Tan rápido como 5 minutos después de la administración i.v. del fármaco, en el cerebro se detecta radioactividad, pero este mismo órgano puede ser considerado libre del medicamento después de 30 minutos de una administración p.o. Probablemente el fármaco inalterado es la única forma capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, mientras que los metabolitos formados en el hígado después de la administración p.o., son ineficaces para llevar a cabo este proceso. La concentración detectada de PZQ en el líquido cerebroespinal es idéntica a la encontrada como fármaco no unido a proteínas en el suero (14, 53, 60).

3.3.2.5. Distribución de PZQ en Parásitos.

La distribución del PZQ estudiada en Schistosoma man-
soni e Hymenolepis nana, muestra que los parásitos captan al fármaco y se reparte uniformemente por todo su cuerpo y no se detecta acumulación selectiva (60).

La sospecha de que la pared de los quistes representa una barrera importante para la penetración del PZQ fue demostrada en experimentos llevados a cabo con formas larvarias de Taenia taeniformis, en donde quistes y estrobilocercos fueron incubados, separadamente con el fármaco, haciendo el seguimiento de éste por medio de técnicas de centelleo. Los resultados indican que los estrobilocercos captan realmente el PZQ marcado radioactivamente, no así los estrobilocercos enquistados, demostrando de esta manera que la pared quística evita notablemente la penetración del PZQ. La concentración del fármaco fue de 4 a 10 veces más alta en la pared del quiste que en el tejido larvario contenido en el quiste, probablemente este hecho

además de otros, justifique la necesidad de utilizar con concentraciones mayores para destruir los estados larvarios de varios céstodos (11, 59, 60).

3.3.2.6. Biotransformación.

La biotransformación del PZQ ha sido investigada exhaustivamente por Diekmann y Bühring (15) en varias especies de mamíferos y sus resultados indican que este fármaco experimenta una total absorción entérica, seguida de una completa biotransformación, ya que no ha sido posible detectar PZQ como tal, en orina, heces y bilis, después de una administración p.o. e i.v. La biotransformación se lleva a cabo de una manera muy rápida y es posible detectar una alta cantidad de metabolitos en suero tan sólo 15 minutos después de la administración del fármaco, (rata p.o. 98,5%, i.v. 54%; perro p.o. 84%, i.v. 59%; mono p.o. 99%, i.v. 50%).

El organismo no es capaz de excretar el fármaco sin biotransformarse; esta afirmación se hace con base en las observaciones donde se aprecia que cantidades importantes de éste están presentes en suero después de la inyección i.v.; sin embargo, no aparece en orina, similarmente el hígado contiene PZQ no biotransformado pero no aparece en bilis, lo que indica que para ser excretado, es necesaria una transformación metabólica (15).

Los metabolitos excretados de PZQ, son de una gran heterogeneidad, pero una buena fracción de ellos se presentan conjugados con ácido glucurónico y/o ácido sulfúrico; el patrón de metabolitos fecales y urinarios es similar y no depende del tiempo de recolección ni de la vía de administración (15).

La cantidad de PZQ no biotransformado en suero, depende principalmente de la vía de administración y se ob

serva que después de administración p.o. el fármaco sufre un efecto masivo de primera fase llevada a cabo en hígado y que varía de especie a especie; siendo muy prominente en rata y mono y menos en perro.

El patrón de metabolitos en suero sí depende de la vía de administración. Este efecto puede ser debido a que por vía oral, el fármaco está sujeto a una recirculación enterohepática y consecuentemente a una biotransformación más intensa, antes de entrar a la circulación general, lo que dá lugar a una gran proporción de metabolitos más polares. Estos metabolitos tienen diferentes tiempos de aclaramiento por el riñón y esto explicaría la diferencia en patrones observados en suero y orina (15).

No existe evidencia de que el PZQ sea biotransformado por tremátodos o céstodos, en contraste con mamíferos y el hombre (3, 60).

3.3.2.7. Excreción.

En todas las especies investigadas, la radioactividad fue recobrada principalmente en los productos de excreción (heces y orina), dentro de las 24 horas siguientes a la administración i.v., lográndose en la rata un 82% de recuperación, en perro 77%, mono 75% y oveja 66%. Siendo el riñón la principal vía de eliminación (52).

Cuando el fármaco se administra p.o., los riñones también predominan como vía de eliminación; siendo indicio de su rápida absorción el hecho que después de 8 horas, el porcentaje de eliminación por vía renal sea de: aproximadamente 45% en la rata, 40% en el perro, 66% en el mono y 38% en la oveja (52).

La eliminación por vía biliar y secreción a la mucosa gastrointestinal se ha investigado casi exclusivamen-

te en ratas, debido a los complicados procedimientos que esto involucra y se ha podido concluir que la bilis tiene una participación importante en la eliminación de este fármaco en las primeras 7 horas después de su administración; siendo, en promedio, de un 37% después de la administración i.v. y de un 15% por administración p.o. (52).

La secreción vía la mucosa gastrointestinal, es baja observándose los siguientes valores después de 1-2 horas de administración i.v. o p.o. : estómago, 0.7%; intestino delgado, 6.9% e intestino grueso, 2.7% (52).

3.3.3. Actividad Terapéutica.

Durante los últimos años ha sido demostrado por muchos investigadores que el PZQ es efectivo contra una gran variedad de tremátodos y céstodos; su espectro de actividad antihelmíntica se resume en el cuadro No II.

Como puede observarse, el Praziquantel se presenta como una opción interesante para el tratamiento de un sin número de infecciones parasitarias que afectan a una amplia gama de especies animales, incluyendo al hombre, muchas de estas infecciones se presentaban como problema sin solución medicamentosa antes de la aparición de este fármaco; una de ellas era la neurocisticercosis debida a Cysticercus cellulosae; y quisiera hacer mención especial de ésta; porque, es en México donde se reporta por primera vez la muerte de los cisticercos de Taenia solium, lo grada por Chavarría (14) en 1975, en tratamientos hechos con Mebendazol, utilizando como modelo de estudio al cerdo, en esta ocasión se pudo afectar solo a parásitos alojados fuera del SNC; sin embargo, con el advenimiento del PZQ corresponde de nuevo a México, en 1979, vía este destacado investigador, probar la efectividad de éste

Cuadro II.- Eficacia del Praziquantel contra adultos y formas juveniles de céstodos y tremátodos en varias especies animales.

PARASITO	HUESPED	DOSIS (mg/kg)	REF. BIBL.
<u>Cysticercus cellulosae</u>	HOMBRE	30-50	11,14,18,43 51,56.
<u>Taenia saginata</u>	"	5-10	11
<u>Taenia solium</u>	"	5-10	11
<u>Hymenolepis nana</u>	"	15-25	11
<u>Echinococcus granulosus</u>	"	93.6 g	26
<u>Paragonimus westermani</u>	"	75	42
<u>Paragonimus kellicotti</u>	"	75	42
<u>Diphyllobothrium latum</u>	"	25	29
<u>Fasciola hepatica</u>	"	75	46
<u>Schistosoma mansoni</u>	"	100	46,57
<u>Schistosoma japonica</u>	"	100	5
<u>Schistosoma haematobium</u>	"	100	46,57
<u>Cysticercus tenuicollis</u>	OVEJA	10-50	58,59,60
<u>Cysticercus ovis</u>	"	10-50	60
<u>Moniezia ssp.</u>	"	2.5	58
<u>Cysticercus cellulosae</u>	CERDO	25-50	14,60
<u>Cysticercus tenuicollis</u>	"	10-50	60
<u>Cysticercus bovis</u>	BOVINO	10-50	58,59,60

Cuadro II.- Cont...

PARASITO	HUESPED	DOSIS (mg/kg)	REF. BIBL.
<u>Hymenolepis microstoma</u>	RATON	1-10	58,62
<u>Hymenolepis nana</u>	"	1-50	59,62
<u>Cisticercoides de H. nana</u>	"	10-50	58,59,61
<u>Cysticercus fasciolaris</u>	"	10-250	58,60,61
<u>Tetratiridias de Mesocestoides corti</u>	"	250	61
<u>Schistosoma mansoni</u>	"	100-250	12,55,56
<u>Taenia pisiformis</u>	PERRO	.25-1.25	58,59
<u>Taenia hydatigena</u>	"	5	45
<u>Dipylidium caninum</u>	"	1-5	58,59
<u>Mesocestoides corti</u>	"	2.5-5	58,59,61
<u>Echinococcus granulosus</u>	"	5-8	2
<u>Echinococcus multilocularis</u>	"	1-5	45,58,59
<u>Diphyllobothrium dendriticum</u>	"	7.5	29
<u>Hymenolepis diminuta</u>	RATA	.25-10	58,59,62
<u>Cysticercus pisiformis</u>	CONEJO	25-50	58,59,61
<u>Taenia taeniformis</u>	GATO	.5-2.5	45,58,59
<u>Diphyllobothrium erinacei</u>	"	7.5	29

contra C. cellulosae, pero ahora alojado en el cerebro, lográndose afectar a esta forma larvaria en esa localización por primera vez y establecer una dosis mínima eficiente recomendándola para aplicación en humanos (14).

Es en México, en 1980, donde se presenta el primer caso de cisticercosis cerebral en humanos tratado médicamente con excelentes resultados en un niño de 6 años de edad que sufría este padecimiento y donde el pronóstico era fatal. Este mismo año, se trataron a 160 personas con cisticercosis cerebral utilizando el mismo protocolo pero ahora aprobado por la UNAM y la SSA (43).

Después de algunos años y venciendo una resistencia injustificada de muchos médicos, ahora ya se acepta en general la dosis recomendada en este trabajo, resultante de la investigación en los cisticercos de los cerdos y que fue de 50 mg/kg durante 15 días.

Nuestro país sigue generando información respecto al tratamiento de la neurocisticercosis con PZQ, recientemente aparecieron algunas indicaciones de los casos en los cuales su aplicación está recomendada (66).

Pese al número de pacientes que han sido tratados exitosamente con este fármaco, muchos investigadores se resisten a su uso; argumentando carencia de controles adecuados y que el único reporte donde se establece el valor del PZQ en cisticercosis cerebral evaluado con criterios objetivos (51), es defectuoso; que en realidad la neurocisticercosis parenquimatosa es un padecimiento usualmente autolimitante donde la resolución es espontánea y el único tratamiento debe ser de apoyo; es decir, aplicación de esteroides en casos de hipertensión endocraneana, anticonvulsivantes cuando existan crisis epilépticas y raramente intervención quirúrgica para resolver hidrocefalia y retirar quistes muy grandes (37, 39, 64).

Dentro del espectro de actividad del PZQ podemos ver que es eficaz contra el género Echinococcus, la más pequeña de todas las tenias, pero la más peligrosa en los animales y causantes de la hidatidosis en humanos; tenias que habían sido tan difícil de combatir y cuyos daños en el hombre y animales domésticos son tan importantes que las autoridades, en varios países, se han visto obligadas a ordenar una serie de medidas de erradicación y la reglamentación de la posesión de perros (2, 45, 58, 59).

Cuando Echinococcus afecta al hombre, los síntomas clínicos no son característicos; lo que dificulta su diagnóstico, semejándose solo en un estadio avanzado a los de cirrosis hepática o a los de un carcinoma hepático. El cuadro patológico, generalmente entonces inoperable da lugar a un pronóstico desfavorable (26). Además del hígado, los cisticercos de equinococos pueden ocasionar invasión pulmonar, llegar a circulación arterial y alojarse en todos los órganos del cuerpo incluyendo cerebro (45).

La indicación inicial de PZQ fue como un potente esquistosomático y hasta la fecha, se ha reportado el alivio de más de 25,000 pacientes humanos afectados por estos tremátodos, lo que conduce a que en la actualidad sea el fármaco de elección para esta parasitosis (5,46,57).

Como otra de las bondades del PZQ se menciona que ha sido posible afectar a los cisticercoides, las formas larvarias que crecen en las papilas intestinales, tratamiento que antes nunca se había logrado (14, 58, 59, 61).

La literatura revisada indica que no tiene efecto sobre los nemátodos como: Toxocara canis, T. leonina y Heterakis spumosa, la razón es presumiblemente la cutícula impermeable de éstos; la cuál, es muy diferente del tegumento sincitial de los tremátodos y céstodos, que llevan a cabo funciones de absorción (2, 3).

Sin embargo, algunos trabajos reportando la capacidad de Mebendazol contra muchos nemátodos, deja abierta la posibilidad de intentar evaluar al PZQ contra estos parásitos; ya que su mecanismo de acción parece compartir puntos en común (14, 32, 33).

Toda la evidencia indica que el PZQ es por sí mismo el principio activo antihelmíntico y que los metabolitos formados tienen escasa o ninguna actividad (60).

3.3.4. Toxicología.

La toxicidad subaguda del PZQ fue evaluada administrando durante 4 semanas el fármaco en perros a dosis de 20, 60 y 180 mg/kg/día. El fármaco demostró ser bien tolerado y los análisis hematológicos, químicos y de orina; así como la disección y los análisis histopatológicos no mostraron alteraciones que pudieran considerarse como efectos específicos de la sustancia. Como signo de un probable proceso de adaptación se encontró aumentada la fosfatasa alcalina en los animales tratados con la dosis más alta (40).

Los ensayos de toxicidad aguda no pudieron averiguar se debido a efectos secundarios dependientes del producto en forma de vómitos, ligeras vacilaciones y depresión; observados en perros y gatos tras el empleo oral a partir de una sobredosificación de 40 veces la dosis normal (200 mg/kg) (43).

Para las ratas y ratones la DL_{50} , oscila entre 2000 y 3000 mg/kg, administrado p.o. y aún mayor utilizando la vía de administración s.c. (43).

La tolerancia del PZQ, en la aplicación oral para el hombre se llevó a cabo en un estudio doble ciego con-

tra placebo. Todas las posologías (10-50 mg/kg) se toleraron sin hallazgos neurológicos y en ninguno de los parámetros químicos, hematológicos y fisiológicos evaluados pudieron demostrarse alteraciones condicionadas por el fármaco. Se observó un empeoramiento pasajero del estado general (cansancio, vértigo, sensación depresiva) aunque evaluado éste, más por cuestiones subjetivas que objetivamente (40).

Los ensayos del efecto alergizante en el cobayo y el hombre, se efectuaron después de varias aplicaciones intracutáneas en los primeros y epicutáneas en humanos siguiendo el protocolo recomendado por la FDA, no encontrándose, en ningún caso manifestación que pudiera interpretarse como sensibilizante. Así mismo, el estudio de los efectos secundarios en el personal, debidos a absorción dérmica ocasionados por manejo de aplicaciones masivas; resultando negativos, al igual que los ensayos de irritación en membranas mucosas evaluados en ojos de conejos (40).

Las investigaciones encaminadas específicamente a evaluar embriotoxicidad y teratogenicidad en ratas y conejos gestantes, no reportaron ningún indicio de estos efectos (40, 43). Por otro lado, se ha reportado que el PZQ puede agravar las crisis epilépticas, por lo cuál se recomienda especial atención a las personas que vayan a ser sometidas a tratamientos con este fármaco y que en su historial médico tengan antecedentes de pequeño y gran mal (5).

La excelente tolerancia, observada en todos los casos descritos anteriormente y en un gran número de experimentos adicionales, puede ser debida a su facilidad de biotransformación y excreción. (15).

3.3.5. Mutagenicidad, Carcinogenicidad y Clastogenicidad.

Los métodos utilizados para definir la capacidad mutagénica de agentes químicos, son básicamente, ensayos bacterianos, el principal de ellos; desarrollado por Ames y colaboradores (7), utiliza un cierto número de cepas de Salmonella typhimurium que son permeables a una gran cantidad de sustancias químicas y también son parcialmente deficientes en mecanismos de reparación de DNA. Estas dos características se ha demostrado que son indispensables para evaluar capacidad mutagénica (7).

Sin embargo, el procedimiento anterior posee muchos inconvenientes que no han sido superados por lo cual, el desarrollo de técnicas más eficaces fue necesario, surgiendo un nuevo ensayo para evaluar el potencial mutagénico denominado Resistencia a la 8-azaguanina, el cual combina las características fisiológicas de las cepas de Ames, con sistemas simples de selección para mutaciones precoces. La selección está basada en la capacidad de mutantes para formar colonias en presencia de 8-azaguanina ya que estas bacterias son incapaces de convertir enzimáticamente el fármaco a un metabolito tóxico (50).

La resistencia en S. typhimurium está aparentemente relacionada con la actividad de la enzima Xantina Fosforribosil transferasa (5-fosfo- -D-1-difosfato: Xantina Fosforribosil Transferasa, EC 2.4.2.22) la cuál transporta y fosforribosila la 8-azaguanina a la membrana celular. El nucleótido producido por esta actividad enzimática es metabolizado e incorporado a los ácidos nucleicos ejerciendo su acción tóxica a este nivel (50).

Este último método es el más aceptado por la comunidad científica internacional y es el criterio utilizado para definir la mutagenicidad del PZQ en bacterias. Los

sistemas usados para definir este fenómeno en células de mamíferos, además del ensayo anterior, son: intercambio de cromátides hermanas, formación de micronúcleos, prueba de resistencia a Ouabaina y transformación de células embrionarias (4, 6, 7, 9, 19, 47, 50).

Los primeros estudios reportados sobre mutagenicidad del PZQ, indican que en los ensayos In vitro de corta duración no existe actividad genética detectable en bacterias, levaduras e insectos, utilizando como organismos indicadores: Salmonella typhimurium, Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces cerevisiae y Drosophila melanogaster (6), ni en células de mamíferos como las células V79 de hamster Chino y no induce la transformación oncogénica de células de embrión de ratón de la cepa C3H/10T1/2 (6,9). Sin embargo, experimentos hechos utilizando dosis altas de PZQ (mayores de 150 ug/ml) se reporta como mutagénico en ensayos de 8-AG^r, usando como organismo de prueba S. typhimurium cepa TA-100, la actividad mutagénica se presenta como dosis dependiente, aumentándose hasta 5 veces la presencia de células mutantes a dosis de 400 µg/ml en comparación con los experimentos control (47).

El efecto del PZQ fue analizado también mediante sistemas In vivo, mostrándose que la orina de ratones tratados con el fármaco a dosis tan altas como 600 mg/kg, es consistentemente mutagénico en ensayos utilizando S. typhimurium cepas TA-100 y TA-98 (7).

Investigaciones adicionales muestran el potencial co-mutágeno del PZQ, se ha encontrado que aumenta la actividad mutagénica de mutágenos y carcinógenos conocidos como: MNNG, 9-aminoacridina, hycanthona, metronidazol, nifurtimox y benzo-(a)-pireno; en ensayos de S. typhimurium a dosis que van de 30 a 150 µg/ml (19, 47).

Paralelamente, se ha encontrado que el PZQ puede au

mentar el efecto mutagénico de MNNG en células V79 de hamster Chino a dosis de 10-50 µg/ml (9).

La información plasmada hasta este momento sobre la actividad co-mutagénica y co-carcinogénica sugieren que el Praziquantel puede tener repercusiones importantes sobre la salud humana, ya que su interacción con agentes químicos contaminantes del medio ambiente como el benceno ocasionan aumento en daño cromosómico, principalmente clastogenicidad, como se ha demostrado en ratones (4).

3.3.5. Mecanismo de Acción.

Las observaciones del efecto del PZQ sobre diversos tremátodos y céstodos, en experimentos In vitro e In vivo muestran que existe uniformidad en cuanto al resultado final del tratamiento con este fármaco, lo cual hace sospechar que se afecta un sistema común a todos ellos; diferenciando básicamente en algunos eventos primarios y dependiendo esencialmente del estado de maduración del parásito; ya que cuando las larvas de algunos céstodos como: Cysticercus fasciolaris, C. bovis, C. tenuicollis y C. pisiformis se exponen a PZQ, responden con evaginación y se extienden tornándose rígidos e inmóviles. In vivo, estas reacciones continúan con una fuerte maceración iniciada en el escolex y extendiéndose a todo el parásito; al final de este proceso la larva consiste en una masa sólida, homogénea, color verde amarillento y la pared quística se engruesa y pierde su transparencia (58, 59, 60, 61).

Contrariamente a lo que sucede en las larvas, los parásitos adultos responden con una parálisis espástica instantánea de la musculatura del parásito y posteriormente un daño estructural del tegumento sincitial, este

efecto se visualiza aún In vivo observando que los parásitos están fuertemente contraídos y desconectados del tejido (59).

Los primeros intentos por caracterizar el modo de acción del PZQ, se concentraron en el metabolismo de carbohidratos del parásito. Se pudo demostrar en algunos cestodos (Hymenolepis diminuta), una marcada disminución en la captación de glucosa y un aumento de la excreción de lactato, presumiblemente formado a partir de carbohidratos endógenos muy probablemente producto de degradación de glucógeno, esto último difícil de comprobar debido a carencia de técnicas adecuadas para medir este fenómeno en parásitos (59).

Como un efecto adicional e interesante del PZQ sobre los céstodos, se observó que el tegumento se vuelve permeable a la glucosa, esta pérdida desde el parásito hacia el medio es un efecto específico de este compuesto ya que parásitos sin tratar y muertos por calentamiento no presentan esta característica (58, 59).

Un efecto inesperado del PZQ, es la reversibilidad de la acción In vitro, ya que al transferir los parásitos tratados a medios de mantenimiento en ausencia del fármaco se observa una restitución de la impermeabilidad del tegumento a la glucosa hasta su total recuperación, la aparente falla de este proceso In vivo puede deberse a que el tegumento del parásito es prontamente atacado por enzimas proteolíticas dañando de manera irreparable y se parándolo del tejido antes de que el efecto del PZQ desaparezca (58).

Estudios adicionales que intentan explicar el comportamiento contráctil de parásitos adultos, se dirigen hacia la perturbación de mecanismos mediados por calcio

(ión descrito como importante en fenómenos de contracción muscular) y reportan que la contracción de esquistosomas inducida por PZQ depende de la presencia de este ión, ya que al quitar el calcio externo o adicionar un exceso de magnesio evita este fenómeno (21).

La evidencia presentada, hace sospechar que el PZQ ejerce su acción mediante un cambio de permeabilidad del parásito de manera no específica, ya que induce la elevación en los niveles de calcio, sodio y potasio; este último, también involucrado en fenómenos de contracción, ya que, aplicado en exceso a músculos viscerales o esqueléticos de vertebrados o a músculos de invertebrados produce contracciones similares a las inducidas por PZQ, aunque éstas pueden estar mediadas por entrada externa de calcio o liberación de pozas internas de este ión, debido a los mecanismos de despolarización de membranas inducidas por éste (21).

Otro efecto observado del PZQ es una disminución en la actividad de ATPasa, esta observación ha sido explicada por la perturbación del ambiente tegumentario y no por inhibición directa (21).

Las bases moleculares de la acción del PZQ permanecen aún en fase de estudio, aunque alguna evidencia encamina a especular que este fármaco ejerce su efecto por interacción con fosfolípidos del tegumento parasitario y que los estadios con reducido recambio de fosfolípidos son los más susceptibles de ser destruidos. La caracterización de los fosfolípidos con los que actúa no ha sido posible ya que la composición de superficie de membranas tegumentarias de parásitos es desconocida (58, 59).

El daño provocado por PZQ a tremátodos y céstodos adultos consiste en una enorme vacuolización que provoca finalmente la muerte. Céstodos y tremátodos difieren en

los sitios de reacción. En esquistosomas y otros tremátodos, la vacuolización se lleva a cabo en diversos lugares sobre toda la superficie del parásito y difieren únicamente en intensidad. En céstodos, el daño se circunscribe a la región del cuello, la cual se sabe que tiene un metabolismo particularmente intenso; mientras que el escolex y el tegumento de los proglótidos maduros permanecen completamente inafectados por el fármaco (8, 60).

Los cambios morfológicos observados en el tegumento de céstodos causados por PZQ, también han sido descritos por otros fármacos; como el Mebendazol, sin embargo, estos efectos fueron obtenidos después de largos períodos de incubación, hasta de 8 horas, comparados con 5 minutos con Praziquantel (31, 32, 59).

3.3.7. Inmunología del Praziquantel.

En el momento de redactar el presente trabajo, sólo pudieron localizarse en la literatura dos estudios donde se reporta que el PZQ tiene efectos directos sobre ciertas capacidades del Sistema Inmune.

Uno de ellos, indica que proporcionando PZQ a una dosis de 250 mg/kg/día; durante 3 días, administrando éste un día antes de la inyección intravenosa de huevos de Schistosoma mansoni, el fármaco suprime algunas funciones mediadas por células inmunocompetentes como es: tamaño del granuloma pulmonar formado en las lesiones producidas por localización de huevos de S. mansoni y pruebas cutáneas inmediatas y tardías llevadas a cabo en el cojinete plantar de ratones, usando 10 µg de antígeno soluble de huevos del parásito; mientras que el porcentaje de linfocitos formadores de rosetas-EAC y la medición del MIF permanecen sin cambio aparente; comparando estos efectos con

tra tartrato de antimonio y potasio (Tartar-Emetic) sus
tancia reportada como inmunosupresora. Concluyendo que el
PZQ afecta al Sistema Inmune, probablemente dañando a cé-
lulas T y afectando consecuentemente la regulación en la
función de células B (12).

El otro experimento, establece el efecto de este fármaco sobre las funciones de la respuesta inmune en ratones normales (no infectados) y reporta un regimen quimioterapéutico de 3 dosis de 100 mg/kg; en un día, dadas con intervalo de 4 horas, administradas al mismo tiempo de inmunizar a los ratones con EB y BSA soluble. Los parámetros evaluados fueron: cuenta de leucocitos de sangre periférica y esplénicos, pruebas de hipersensibilidad retardada y respuesta de células productoras de anticuerpos (CFP); con los cuáles encuentran que con este régimen de dosificación no alteran la capacidad de los ratones para generar respuestas inmunes humorales y celulares (57).

Algunos otros trabajos que involucran al sistema inmune se avocan principalmente, a evaluar respuestas inmunes locales generadas contra algunos parásitos después del tratamiento con PZQ (18) y al efecto de la integridad de este sistema sobre la efectividad del tratamiento con este fármaco (13).

En vista de que actualmente el Praziquantel es el medicamento de elección para el tratamiento de la cisticercosis cerebral humana y su aspecto inmunológico no está bien estudiado, al igual que sus interacciones con sus tancias propuestas para este tratamiento; se desarrolló el presente trabajo.

OBJETIVO

IV.- O B J E T I V O

- DETERMINAR SI EL TRATAMIENTO CON PRAZIQUANTEL, YATREN CASEIN, BCG O LA COMBINACION DE ESTOS; TIENE EFECTO POTENCIADOR SOBRE EL SISTEMA INMUNE DE RATONES SANOS NORMALES NIH, MEDIANTE LA EVALUACION DE CELULAS FORMA DORAS DE PLACA CONTRA ERITROCITOS DE BORREGO.

DISERIO EXPERIMENTAL

V.- DISEÑO EXPERIMENTAL

GRUPO	TRATAMIENTO
1	YATREN
2	YATREN-PZQ
3	BCG-YATREN-PZQ
4	BCG
5	PZQ
6	BCG-YATREN
7	BCG-PZQ
8	PBS (testigo)

Tratamientos.- Todos los compuestos fueron administrados intraperitonealmente, bajo el siguiente régimen de dosificación: PZQ, 50 mg/kg/día durante 15 días; Yatrén-Caseín, 0.2 ml de una dilución 1:1000, dos administraciones con un intervalo de 7 días; BCG, una aplicación de 0.1 ml de una suspensión de bacterias

ajustada a 10^7 UFC/ml y PBS, pH 7.2 estéril, 0.2 ml durante 15 días. En los grupos donde se administraron combinaciones de sustancias se dejó un intervalo de 4 días antes de proporcionar el siguiente com puesto.

MATERIAL Y METODOS

VI.- MATERIAL Y METODOS

Animales.- Se utilizaron ratones hembra de 21 días de edad, de la cepa NIH, proporcionados por el bioterio del INIFAP de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Los animales fueron estandarizados a 15-18 gramos de peso y asignados a 8 grupos de 9 ratones cada uno; se mantuvieron con raciones de alimento compactado comercial y recibieron agua ad libitum.

Microorganismos.- El BCG, fue de la cepa utilizada en México para vacunación en humanos; lote No. 058 - 04, proporcionada amablemente por el Instituto Nacional de Higiene, se ajustó a 10^6 UFC/ml y se inocularon 0.1 ml a cada ratón del grupo correspondiente por vía i.p. (63).

Sustancias Químicas.- El PZQ fue proporcionado por el Dr. Manuel Chavarría Ch. de la FMVZ de la UNAM, proveniente de Miles Laboratories, lote No. 238036, bajo el nombre comercial de "Droncit". El Yatren-Casein, se obtuvo de Bayer de México, S.A.; lote No. V-103.

Todas las demás sustancias químicas usadas en la elaboración de soluciones, fueron de grado analítico.

Inmunización con Eritrocitos de Borrego.- Este procedimiento se llevó a cabo administrando por vía i.p.,

0.2 ml de una suspensión al 20% de eritrocitos de borrego almacenados a 4°C y lavados 3 veces antes de resuspender a la concentración deseada en PBS, pH 7.2 estéril. En cada experimento se dispuso de EB frescos, mantenidos en solución de Alsever por no más de una semana, cuidando además que la fuente de éstos fuese siempre la misma.

Los animales fueron sacrificados 4 días después de la inmunización y los bazos fueron extraídos para los ensayos hemolíticos en placa (36).

Los animales fueron inmunizados después de las 18:00 horas y sacrificados entre las 8:00 y 9:00 horas (20).

Obtención de Células Esplénicas.- Los animales fueron sacrificados por fractura cervical; mediante una incisión en el abdomen y utilizando unas pinzas quirúrgicas se localizó el bazo, se extrajo y se colocó en HBSS. Posteriormente fue pasado por una malla utilizando un émbolo de jeringa, las células obtenidas fueron lavadas exhaustivamente con PBS, pH 7.2 estéril, centrifugando a 2500xg, durante 8 minutos. Los eritrocitos contaminantes fueron eliminados resuspendiendo el paquete celular en agua destilada estéril seguido de una agitación vigorosa por 15 segundos, las células resultantes fueron colectadas por centrifugación (24).

Conteo de Células y Determinación de Viabilidad.-

La viabilidad de las células aisladas, fue determinada por el método del colorante de exclusión usando azul de tripán, según Black y Berenbaum (10), en el cual una suspensión de esplenocitos resuspendidos en HBSS suplementado con 5% de SFB descomplementado (56 °C, 30 minutos) y adsorbido, son mezclados con un volumen igual de azul de tripán al 0.2% en SSF. La mezcla fue incubada por 10 minutos a temperatura ambiente y el número de células fueron contadas mediante la técnica del hemocitómetro (41).

En todos los experimentos descritos, la viabilidad obtenida excedió del 96%, calculada de la sig. manera:

$$\% \text{ Células Viabiles} = \frac{\text{No. de Células Viabiles}}{\text{No. Total de Células}} \times 100$$

La concentración de la suspensión celular fue ajustada a 10^6 células viables/ml.

Ensayos Hemolíticos.- Los ensayos hemolíticos en placa fueron realizados mezclando 0.2 ml de los esplenocitos obtenidos de los animales inmunizados con EB, ajustada su concentración a 10^6 células viables/ml en HBSS adicionado con SFB al 5%, con 0.2 ml de una suspensión de células indicadoras, de la siguiente manera: 0.55 ml de EB al 10% en PBS, pH 7.2; 2.0 ml de HBSS suplementado con 5% de SFB y 0.3 ml de suero de cobayo como fuente de complemento. Esta mezcla se agitó vigorosamente y posterior

mente se colocaron, con una micropipeta, 60 μ l en unas microcámaras formadas por la sobreposición de 2 porta-objetos entre los cuáles se habían colocado 3 tiras de cinta con adhesivo en sus dos caras, cuidando que la posición de éstas fuera adecuada (extremos y parte central) para amntener razonablemente constante el volumen entre ellas. El proceso de llenado debe hacerse con sumo cuidado, ya que pueden formarse burbujas que dificulten la lectura; esto puede evitarse haciendo que la temperatura de la mezcla celular y la temperatura de las microcámaras sea la misma, colocándolas unos minutos en una estufa a 37 °C.

Una vez llenas las microcámaras, fueron sellados sus extremos con una mezcla fundida de vaselina-parafina en una relación 1:1, el uso de la primera es importante ya que reblandece a la parafina evitando fracturas que pueden ocasionar evaporación del medio en el interior de éstas; se dejó solidificar y se colocaron perfectamente horizontales, en una estufa a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5% y 90% de humedad, durante 60 - 90 minutos. Transcurrido este tiempo, se contó el número de placas formadas utilizando un microscopio para verificar que en el centro de la placa lítica se encontrara un linfocito.

Análisis Estadístico.- Para establecer la existen-

cia de diferencia entre los resultados de los diversos grupos, se realizó un Análisis de Varianza y para determinar entre que tratamientos era esta diferencia se aplicó la prueba de Student-Newman-Kuels.

RESULTADOS

VII.- R E S U L T A D O S

Los resultados mostrados en la tabla I, indican el efecto de los diferentes tratamientos sobre la respuesta de anticuerpos, determinada como CFP, en los esplenocitos de los ratones inmunizados con EB.

En la tabla II, se muestra el análisis estadístico de los resultados, tomando como variable de respuesta las $CFP/3 \times 10^4$ células esplénicas. Se realizó un análisis de varianza en clasificación simple con 9 replicaciones y 3 submuestras por replicación en cada grupo o tratamiento. Posteriormente, al encontrar diferencias altamente significativas entre tratamientos; se aplicó la prueba de Student-Newman-Kuels, para hacer las comparaciones entre las medias de éstos y establecer entre qué tratamientos existían diferencias significativas, los resultados de esto último se muestra en la tabla III.

Para visualizar de mejor manera los grupos entre los que se presentan las diferencias, se construye la tabla IV.

El resultado del análisis realizado, muestra que las diferencias se presentan básicamente en los grupos dónde está presente el Yatrén-Caseín, disminuyendo el número de CFP, independientemente de su interacción con PZQ (Grupos 1 y 2); sin embargo, esta disminución se ve restaurada cuando se combina con BCG (Grupo 6), llevándola a niveles normales o al menos a valores en los cuáles no hay di

ferencia estadística con el grupo testigo (Grupo 8).

En la figura I, se representa gráficamente el efecto del PZQ en la interacción del Yatrén-Caseín y BCG; observando que el Yatrén disminuye notablemente el número de Células Formadoras de Placas y que la presencia de PZQ, aunque no afecta la acción del Yatrén, parece separar los efectos observados de las combinaciones de BCG y Yatrén; pero los resultados estadísticos indican que no tiene actividad sobre estas interacciones.

La figura II, muestra, nuevamente, el efecto depresor del Yatrén y que el BCG es el único capaz de abolir este fenómeno.

Finalmente, en la figura III se plasma el efecto del BCG sobre la interacción de Yatrén y PZQ, observando que éste eleva sensiblemente el número de CFP, hasta valores donde no existe diferencias estadísticas significativas, independientemente de la presencia de Yatrén.

Tabla I.- Respuesta de Células Formadoras de Placa (CFP), contra eritrocitos de borrego en esplenocitos de ratones NIH, después de diversos tratamientos.

GRUPO	TRATAMIENTO	CFP/ 3×10^4 Cél. Esplénicas*
1	YATREN	20.911
2	YATREN-PZQ	21.422
3	BCG-YATREN-PZQ	33.333
4	BCG	45.040
5	PZQ	51.666
6	BCG-YATREN	61.889
7	BCG-PZQ	65.100
8	PBS (TESTIGO)	72.033

* Expresadas como media de determinaciones por triplicado de 9 ratones.

Tabla II.- Análisis de la variación con los datos de la Tabla I, por la técnica de Análisis de Varianza. Clasificación simple.

CAUSA DE VARIACION	GL*	SC**	CM ¹	F _C	TABLAS	
					F. _{.05}	F. _{.01}
TRATAMIENTOS (entre)	7	24,485.01	3497.85	4.02	2.17	2.95
ERROR (dentro)	64	55,544.46	867.88			
TOTAL	71	80,029.47				

* Grados de Libertad.

** Suma de Cuadrados.

1. El cuadrado medio (CM) o varianza para cada causa de variación se calcula:

$$\text{Varianza} = \text{CM} = \frac{\text{Suma de los cuadrados}}{\text{Grados de Libertad}} = \frac{\text{SC}}{\text{GL}}$$

Para calcular el valor de F:

$$F = \frac{\text{Varianza entre Tratamientos}}{\text{Varianza del Error}} = \frac{3497.85}{867.88}$$

$F_C = 4.02$; como este valor es mayor que la $F_{.01}$ de tablas (2.95), se concluye que hay diferencias altamente significativas, al menos entre dos tratamientos.

Tabla III.- Prueba de Student-Newman-Kuels; para establecer diferencias entre tratamientos.

COMPARACION	DIFERENCIA	LS*	RESULTADO
G ₈ - G ₁	51.220	43.60	G ₈ > G ₁
G ₈ - G ₂	50.611	42.32	G ₈ > G ₂
G ₈ - G ₃	38.703	40.85	ns
G ₈ - G ₄	26.993	39.08	ns
G ₈ - G ₅	20.367	36.72	ns
G ₈ - G ₆	10.144	33.38	ns
G ₈ - G ₇	6.933	27.79	ns
G ₇ - G ₆	3.211	27.79	ns
G ₇ - G ₅	13.434	33.38	ns
G ₇ - G ₄	20.060	36.72	ns
G ₇ - G ₃	31.770	39.08	ns
G ₇ - G ₂	43.678	40.85	G ₇ > G ₂
G ₇ - G ₁	44.189	42.32	G ₇ > G ₁
G ₆ - G ₅	10.223	43.60	ns
G ₆ - G ₄	16.849	33.38	ns
G ₆ - G ₃	28.559	36.72	ns
G ₆ - G ₂	40.467	39.08	G ₆ > G ₂
G ₆ - G ₁	40.978	40.85	G ₆ > G ₁
G ₅ - G ₄	6.626	27.79	ns
G ₅ - G ₃	18.336	33.38	ns
G ₅ - G ₂	30.244	36.72	ns
G ₅ - G ₁	30.755	39.08	ns
G ₄ - G ₃	11.710	27.79	ns
G ₄ - G ₂	23.618	33.38	ns
G ₄ - G ₁	24.129	36.72	ns
G ₃ - G ₂	11.908	27.79	ns
G ₃ - G ₁	12.419	33.38	ns
G ₂ - G ₁	00.511	27.79	ns

* Límite de Significancia a $p \geq 0.95$.

ns: No significativo.

Tabla IV.- Diferencia entre medias con significancia por la técnica de Student-Newman-Kuels.

ORDEN CRECIENTE \bar{x}		ORDEN DECRECIENTE							
		8	7	6	5	4	3	2	1
1.-	20.911	51.122*	44.189*	40.978*	30.755	24.129	12.419	0.511	0
2.-	21.422	50.611*	43.678*	40.467*	30.244	23.618	11.908	0	0
3.-	33.333	38.703	31.770	28.559	18.336	11.710	0	0	0
4.-	45.04	26.993	20.060	16.849	6.626	0	0	0	0
5.-	51.666	20.367	13.434	10.223	0	0	0	0	0
6.-	61.889	10.144	3.211	0	0	0	0	0	0
7.-	65.100	6.933	0	0	0	0	0	0	0
8.-	72.033	0	0	0	0	0	0	0	0

$\alpha = 0.05$

* Diferencias significativas.

Las diferencias arriba de la línea gruesa y/o con asterisco son significativas, en tanto que las diferencias abajo de dicha línea y sin asterisco no son significativas.

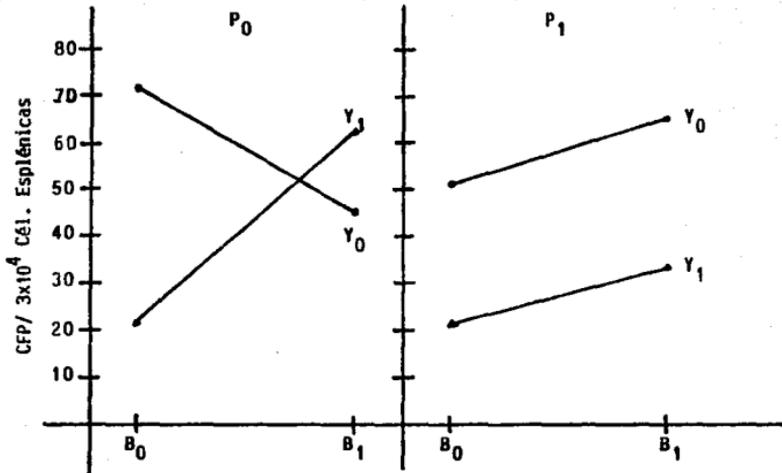


Figura I.- Efecto del PZQ, en la interacción de BCG y Yatrén, sobre el número de CFP contra eritrocitos de borrego en ratones NIH. P₀= sin PZQ, P₁= con PZQ; B₀= sin BCG, B₁= con BCG; Y₀= sin Yatrén, Y₁= con Yatrén.

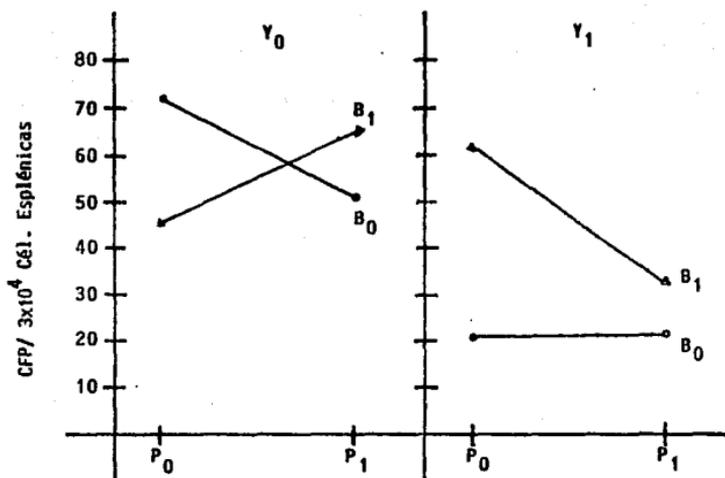


Figura II.- Efecto del Yatrén, sobre la interacción de PZQ y BCG, sobre el número de CFP contra eritrocitos de borrego en ratones NIH. P_0 = sin PZQ, P_1 = con PZQ; B_0 =sin BCG, B_1 = con BCG; Y_0 = sin Yatrén, Y_1 = con Yatrén.

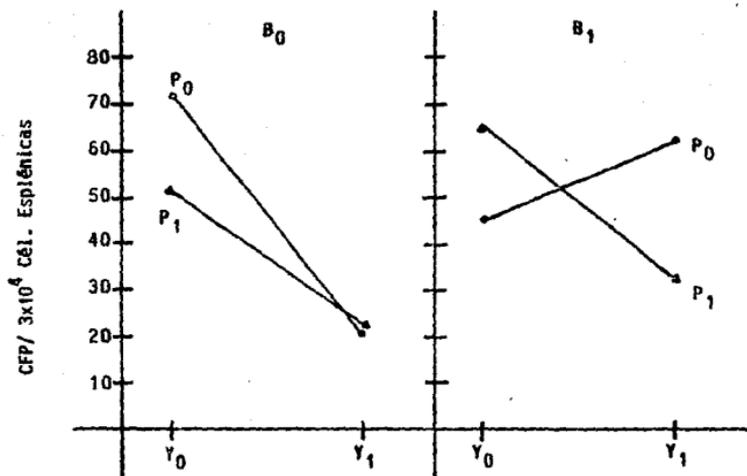


Figura III.- Efecto del BCG, sobre la interacción de PZQ y Yatrén, sobre el número de CFP contra eritrocitos de borrego en ratones NIH. P_0 = sin PZQ, P_1 = con PZQ; B_0 = sin BCG, B_1 = con BCG; Y_0 = sin Yatrén, Y_1 = con Yatrén.

DISCUSSION

VIII.-D I S C U S I O N

Los resultados obtenidos en los diferentes grupos de experimentación, fueron comparados con los de un grupo en el cuál los ratones estuvieron sujetos a tratamiento con PBS, pH 7.2, durante 15 días, con la finalidad de evaluar su comportamiento ante este manejo; ya que, el PZQ y Yatreⁿ se administran en dosis múltiples y esta circunstancia puede afectar su capacidad de respuesta.

Como demuestra el análisis estadístico, el PZQ se comportó como una sustancia que no tiene efecto sobre la respuesta inmune de los ratones (tablas 3 y 4); aunque el parámetro evaluado, CFP, indica solamente producción de anticuerpos, se puede inferir adicionalmente que este fármaco no tiene efecto sobre la respuesta celular; ya que al utilizar eritrocitos de borrego (antígeno timodependiente), nos dá una idea de cómo está funcionando esta fracción del Sistema Inmune, puesto que existe una gran dependencia entre producción de anticuerpos y actividad de células T. Aunque hubiese sido conveniente realizar estudios encaminados a probar específicamente este hecho; no se llevaron a cabo, por la carencia en el laboratorio de una técnica adecuadamente estandarizada para evaluar este parámetro en las unidades experimentales. A pesar de esto, los resultados obtenidos coinciden con algunos reportes encontrados en la literatura (57), donde evalúan inmunidad humoral y celular, aunque las vías de administración

y los regímenes de dosificación fueron diferentes. Por otro lado, los resultados del presente trabajo discrepan con los de otro estudio (12), en el que la evaluación de la actividad de PZQ sobre la respuesta inmune se hizo con animales infectados con S. mansoni y la disminución en algunas capacidades del sistema inmune, que reporta, pueden ser atribuibles al efecto de la infección o a la liberación de fracciones inmunosupresoras como consecuencia de la destrucción del parásito y no a un efecto debido al fármaco.

Aunque algunos autores (40) reportan que el PZQ no tiene efecto alergizante, administrado i.p., durante el desarrollo del experimento se observaron algunas manifestaciones que hacen sospechar este hecho, como son: tos, erizado de cabellos y perturbaciones respiratorias; inclusive desde las primeras dosis administradas y esta circunstancia se presentó exclusivamente en los grupos donde estaba presente esta sustancia; asimismo, se registraron algunas muertes, aunque no pueden atribuirse a PZQ. La elección de la vía i.p. como vía de administración para este fármaco, se hizo para verificar que el responsable de la respuesta observada fuese realmente el PZQ, ya que como mencionan algunos investigadores (15, 52, 53), su biotransformación es rápida y extensiva y el utilizar otra vía podría favorecer la evaluación de la acción de metabolitos y no de la sustancia inalterada.

Respecto a las actividades co-mutagénica y co-carci-

nogénica atribuible a PZQ por muchos autores (6, 7, 9, 65), éstas han sido evaluadas con dosis demasiado elevadas; ya que las dosis terapéuticas usadas alcanzan un máximo de 75 mg/kg, mientras que las experimentadas para demostrar estas actividades, van de 150-800 mg/kg. Sería conveniente hacer estudios más cuidadosos para establecer perfectamente estos efectos de interacción con PZQ; ya que si esto resulta cierto, había que valorar su capacidad terapéutica y de seguridad antes de indicar su amplia utilización en el combate de tremátodos y céstodos. Particularmente en México, donde su población está sujeta a tratamientos masivos con sustancias potencialmente carcinogénicas como el metronidazol (7, 9) y expuesta a potentes compuestos mutagénicos como las aflatoxinas. Por otra parte, en el apartado asignado a mecanismo de acción de PZQ, se menciona que éste afecta la permeabilidad de la membrana celular y este efecto puede ocasionar un aumento en la cantidad de sustancias carcinogénicas y mutágenas que pasan al interior de la célula y ser ésto la causa del daño cromosómico; ya que existe evidencia que su actividad terapéutica y co-mutagénica parecen no estar relacionadas.

Por otro lado, el Yatren-Caseín se presenta, en todos los casos, como un inmunosupresor de manera consistente e independientemente de algunas interacciones (tabla 4). Este hecho resulta de particular interés, ya que precisamente su indicación es como un estimulante del siste-

ma inmune y se utiliza ampliamente en la Medicina Veterinaria con esta aplicación. El definir los niveles de la respuesta inmune sobre los que actúa sería una cuestión interesante; parece ser que el presente estudio es el primero y único que se ha hecho con este compuesto en relación con el sistema inmune. Por otro lado, el efecto inmunosupresor observado pudiera ser benéfico en tratamientos de cisticercosis cerebral en humanos con PZQ, ya que frecuentemente se reportan exacerbación de síntomas (90-92%) en personas tratadas con esta sustancia; esto es debido a la lisis y necrosis del parásito ocasionadas por el tratamiento, produciendo un gran estímulo antigénico del sistema inmune con la consecuente presencia de anticuerpos y células de este sistema causando inflamación del parénquima cerebral (18, 39, 51). Bajo esta circunstancia, el Yatren podría actuar como un moderador de este estado y prescindir de algunas sustancias comúnmente usadas con este propósito y de efectos colaterales indeseables como son los corticosteroides; aunque adicionalmente sería conveniente realizar estudios más completos para establecer perfectamente su seguridad para usarlo con esta indicación. Para lo cual, se sugiere su utilización por vía i.p. en animales para tratar algunas patologías de origen autoinmune y evaluar su eficacia en estos padecimientos , además de establecer su inocuidad.

El efecto poco notable de BCG, administrado i.p. por una sola ocasión, sobre el número de CFP contra eritrociti-

tos de borrego, puede ser debido al tiempo transcurrido entre su administración y la evaluación del efecto, mismo que ha sido descrito por algunos autores (38, 62).

Nosotros esperabamos un efecto potenciador notable, como ha sido previamente informado (25, 34). El no encontrar una diferencia significativa en el tratamiento con BCG (tabla III) puede ser atribuible a que el grupo tratado con este microorganismo recibió una sola inyección y el grupo contra el que comparamos, recibió 15 administraciones de PBS, y el resultado de stress provocado pudo alterar la respuesta esperada; aunque ésta debió ser de disminución. Un hecho interesante cuando se compara el efecto de BCG-Yatren contra el efecto de Yatren solo, es que el BCG parece restablecer la supresión causada por el Yatren; comportándose entonces como un inmunomodulador, un aspecto sobre el cuál sería de mucho interés ahondar, ya que la indicación de uso reportada en la literatura es exclusivamente como inmunopotenciador.

Finalmente, parece ser que la sugerencia hecha para tratamientos de cisticercosis cerebral, combinando PZQ con BCG y Yatren (14), no es necesaria; ya que la indicación del uso de estos 2 últimos, es para potenciar el sistema inmune y eliminar los cisticercos muertos por el tratamiento con PZQ, no parece funcionar adecuadamente en el modelo animal y en las condiciones estudiadas. Por otro

lado; recientemente, se han reportado complicaciones importantes en humanos por el uso de BCG con fines terapéuticos diferentes a los de vacunación, situación que parece depender de la composición genética del individuo, por lo cual debería evaluarse de mejor manera su participación antes de indicarlo como agente terapéutico.

CONCLUSIONES

IX.- CONCLUSIONES

- EL PRAZIQUANTEL, ADMINISTRADO POR VIA INTRAPERITONEAL, NO TIENE EFECTO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL DE RATONES NIH CONTRA ERITROCITOS DE BORREGO, EVALUADO POR LA TECNICA DE CELULAS FORMADORAS DE PLACA (CFP).

- EL TRATAMIENTO INTRAPERITONEAL CON YATREN-CASEIN DISMINUYE LAS CFP CONTRA ERITROCITOS DE BORREGO EN RATONES NIH, INDEPENDIEMENTE DE LA PRESENCIA DEL PRAZIQUANTEL.

- UN SOLO TRATAMIENTO INTRAPERITONEAL CON BCG EN RATONES, NO TIENE EFECTO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL CONTRA ERITROCITOS DE BORREGO.

BIBLIOGRAFIA

X.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Acevedo-Hernández, A. Epidemiología y Control de la Cisticercosis Porcina en México. En: A. Morilla, P. Correa y A. Stephano (Eds.). Avances en Enfermedades del Cerdo, 1985. AMVEC, México, 1985. pp. 521-528.
- 2.- Andersen, F.L., Conder, G.A. and Marsland, W.P., 1978. Efficacy of Injectable and Tablet Formulations of Praziquantel Against Mature Echinococcus granulosus. Am. J. Vet. Res., 39 (11): 1861-1862.
- 3.- Andrews, P., Thomas, H. and Weber, H., 1980. The In vi tro Uptake of ¹⁴C-Praziquantel by Cestodes, Trematodes and a Nematode. J. Parasitol., 66 (6): 920-925.
- 4.- Anwar, W.A., Au, W.W., Sadagopa Ramanujam, V.M. and Legator, M.S., 1989. Enhancement of Benzene Clastogenicity by Praziquantel in Mice (MTR 01385). Mutation Res., 222 (3): 283-289.
- 5.- Bada, J.L., Treviño, B. and Cabezos, J., 1988. Convulsive Seizures After Treatment with Praziquantel. British Med. Jorunal, 296 (6622): 646.
- 6.- Bartsch, H., Kuroki, T., Malaveille, C., Loprieno, N. Barale, R., Abbondandolo, A., Bonnatti, S., Rainaldi, G., Vogel, E. and Davis, A., 1978. Absence of Mutagenicity of Praziquantel, a New Effective anti-Schistosomal Drug, in Bacteria, Yeast, Insects and Mammalian Cells. Mutation Res., 58: 133-142.
- 7.- Batzinger, R.P., Ou S-Y, L. and Bueding, E., 1978. Antimutagenic Effects of 2(3)-Tert-Butyl-4-Hydroxianisole and Antimicrobial Agents. Cancer Res., 38: 4478-85

- 8.- Becker, B., Melhorn, H., Andrews, P. and Thomas, H., 1981. Ultrastructural Investigations on the Effect of Praziquantel on the Tegument of Five Species of Cestodes. *Z. Parasitenkd.*, 64: 257-269.
- 9.- Billings, P.C. and Heidelberger, Ch., 1982. Effects of Praziquantel, a New Antischistosomal Drug, on the Mutation and Transformation of Mammalian Cells. *Cancer Res.*, 42: 2692-2696.
- 10.- Black, L. and Berembaum, M.C., 1964. Factors Affecting the Dye Exclusion Test for Cell Viability. *Exp. Cell. Res.*, 35: 9-13.
- 11.- Botero, D. and Castaño, S., 1982. Treatment of Cysticercosis with Praziquantel in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31 (4): 811-821.
- 12.- Botros, S.S., Metwally, A.A. and Khayyal, M.T., 1984. The Immunological Aspects of Praziquantel in Unsensitized Mice with Experimentally Induced Schistosome Pulmonary Granuloma. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 78: 569-572.
- 13.- Brindley, P.J. and Sher, A., 1987. The Chemotherapeutic Effect of Praziquantel Against Schistosoma mansoni is Dependent on Host Antibody Response. *J. Immunol.* 139 (1): 215-220.
- 14.- Chavarría, Ch. M., Avances en el Tratamiento Médico de la Cisticercosis en Humanos y en Porcinos (I. solium). En: A. Morilla, P. Correa y A. Stephano (Eds) *Avances en Enfermedades del Cerdo*, 1985. A.M.V.E.C., México, 1985. pp. 529-549.

- 15.- Diekman, H.W. and Bühring, K.U., 1976. The Fate of Praziquantel in the Organism. III. Metabolism in Rat, Beagle Dog and Rhesus Monkey. *Europ. J. Drug Metabol. Pharmacokinet.*, 2: 107-112.
- 16.- Dresser, D.W. and Wortis, H.H., 1965. Use of an Antiglobulin Serum to Detect Cells Producing Antibody With Low Haemolytic Efficiency. *Nature*, 208 (5013): 859-861.
- 17.- Earnest, M.P., Barth Reeler, L., Filley, C.M. and Grek, A.J., 1987. Neurocysticercosis in the United States: 35 Cases and a Review. *Rev. Infect. Dis.*, 9:961-979.
- 18.- Estañol, B., Juárez, H., Irigoyen, M. del C., González Barranco, D. and Corona, T., 1989. Humoral Immune Response in Patients With Cerebral Parenchymal Cysticercosis Treated With Praziquantel. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 52 (2): 254-257.
- 19.- Feng, Z. and Seed, J.L., 1981. Co-Carcinogen and Praziquantel Enhance the Mutagenic Activity of Direct-Acting Carcinogens and Mutagens in 8-Azaguanine Resistance Assay in Salmonella typhimurium. *Environ. Mutagen.*, 3: 390.
- 20.- Fernández, G., Halberg, F., Yunis, E.J. and Good, R.A. 1976. Circadian Rhythmic Plaque Forming Cell Response of Spleens From Mice Immunized With SRBC. *J. Immunol.*, 117 (3): 962-966.
- 21.- Fetterer, R.H., Pax, R.A. and Bennett, J.L., 1980. Praziquantel, Potassium and 2,4-Dinitrophenol: Analysis of Their Action on the Musculature of Schistosoma mansoni. *Europ. J. Pharmacol.*, 64: 31-38.

- 30.- Kupperman, O., Yashphe, D.J., Sharf, S., Benefraim, S. and Weiss, D.W., 1972. Nonspecific Stimulation of Cellular Immunological Responsiveness by a Mycobacterial Fraction. *Cell. Immunol.*, 3: 277-282.
- 31.- Laclette, J.P., Guerra, G. and Zetina, C., 1980. Inhibition of Tubulin Polymerization by Mebendazole. *Biochem. Biophys. Res. Communic.*, 92 (2): 417-423.
- 32.- Laclette, J.P., Merchant, M.T., Willms, K. and Cañedo, L., 1981. Paracrystalline Bundles of Large Tubules Induced in vitro by Mebendazole in Cysticercus cellulosae. *Parasitology*, 83: 513-518.
- 33.- Levin, M.L., 1983. Treatment of Trichinosis with Mebendazole. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32 (5): 980-983.
- 34.- Mackaness, G.B., Auclair, D.J. and Lagrange, P.H., 1973. Immunopotentiality With BCG. I. Immune Response to Different Strains and Preparations. *J. Natl. Cancer Inst.*, 51 (5): 1655-1664.
- 35.- Marbrook, J. Haemolytic Plaque Assays. Liquid Matrix (Slide Method). En: B.B. Mishell and S.M. Shigi (Eds.). *Selected Methods in Cellular Immunology*. 1980. W.H. Freeman and Co., San Fco., USA. pp. 86-89.
- 36.- Meza, M.F. Estudio de los Extractos de Organos (Biógenos) Sobre el Incremento de Peso y la Respuesta Inmune Humoral de Ratones. Tesis de Químico Farmacéutico Biólogo, FES-Cuautitlán, UNAM, México, 1987.
- 37.- Miller, B., Grinell, V., Goldberg, M.A. and Heiner, D., 1983. Spontaneous Radiographic Disappearance of Cerebral Cysticercosis: Three Cases. *Neurology*, 33:1377-1379.

- 38.- Miller, T.E., Mackaness, G.B. and Lagrange, P.H.,1973. Immunopotential With BCG. II. Modulation of the Response to Sheep Red Blood Cells. J. Natl. Cancer Inst., 51 (5): 1669-1676.
- 39.- Moodley, M. and Moosa, A.,1989. Treatment of Neurocysticercosis: is a Praziquantel the New Hope?. The Lancet, 1 (8632): 262.
- 40.- Murmann, P.,1976. Notes on the Tolerance of Droncit. Vet. Med. Rev., 2: 142-153.
- 41.- Nowotny, A. Basic Exercises in Immunochemistry, A Laboratory manual. 1979. Springer-Verlag, New York, USA. pp. 272-274.
- 42.- Pachucki, C.T., Levandowski, R.A., Brown, V.A., Sonnenkalb, B.H. and Vruno, M.J.,1984. American Paragonimiasis Treated With Praziquantel. N. Engl. J. Med. 311 (9): 582-583.
- 43.- Robles, C. y Chavarría, M.,1980. Un Caso de Cisticercosis Cerebral Curado Médicamente. Gac. Med. Méx. 116: 65-71.
- 44.- Romero-Callejas, E. Frecuencia de Anticuerpos Séricos Anti-Cysticercus cellulosae por Inmunolectroforesis en Cerdos Sacrificados en el Rastro Municipal de Ecatepec. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista, UNAM, México, 1980.
- 45.- Rommel, V.M., Grell, H. and Hörchner, F.,1976. Zur Wirksamkeit Von Praziquantel Gegen Bandwürmer in Experimentell Infizierten Hunden und Katzen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 89: 255-257.

- 22.- Flisser, A., 1983. Inmunología de la Cisticercosis Humana. Bol. Estud. Méd. Biol. Mex. Supl., 32: 143-176.
- 23.- Flisser, A. Cisticercosis Porcina. En: A. Morilla, P. Correa y A. Stephano (Eds.). Avances en Enfermedades del Cerdo, 1985. AMVEC, México, 1985. pp. 517-519.
- 24.- Garvey, J.S., Cremer, N.E. and Sussdorf, U.H. Methods in Immunology. 1977. W.A. Benjamin, Inc., Reading, Massachusetts. pp. 411-428.
- 25.- Hawrylko, E. and Mackness, G.B., 1973. Immunopotentialization With BCG. III. Modulation of the Response to a Tumor-Specific Antigen. J. Natl. Cancer Inst., 51 (5): 1677-1681.
- 26.- Henriksen, T-H., Klungsoyr, P. and Zerihun, D., 1989. Treatment of Disseminated Peritoneal Hydatid Disease With Praziquantel. The Lancet, 1 (8632): 272.
- 27.- Inclán, C. Comparación de la Técnica de Inspección Sanitaria e Inmunolectroforesis en el Diagnóstico de la Cisticercosis Porcina. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista, U.N.A.M., México, 1981.
- 28.- Jerne, N.K. and Nordin, A.A., 1963. Plaque Formation in Agar by Single Antibody-Producing Cells. Science, 140: 405.
- 29.- Kirkpatrick, C.E., Knochenhauer, A.W. and Jacobson, S.I., 1987. Use of Praziquantel for Treatment of Diphyllbothrium sp. Infection in a Dog. J. Am. Vet. Med. Assoc., 190 (5): 557-558.

- 46.- Schiappacasse, R.H., Mohammadi, D. and Christie, A.J. 1985. Successful Treatment of Severe Infection With Fasciola hepatica With Praziquantel. J. Infect. Dis., 152 (6): 1339-1340.
- 47.- Seed, J.L.Feng, Z. and Bueding, E.,1981. Mutagenic and Co-mutagenic Activity of the Anti-Schistosomal Drug, Praziquantel, in Salmonella typhimurium. Fed. Proc., 40: 668.
- 48.- Seubert, J., Pohlke, R. and Loebich, F.,1977. Synthesis and Properties of Praziquantel, a Novel Broad Spectrum Anthelmintic With Excellent Activity Against Schistosomes and Cestodes. Experientia, 33(8): 1036-1037.
- 49.- Shultz, T.S. and Ascherl, G.F.,1978. Cerebral Cysticercosis: Occurrence in the Immigrant Population. Neu rosurgery, 3 (1): 164-169.
- 50.- Skopek, T.R., Liber, H.L., Krolewski, J.J. and Thilly W.G.,1978. Quantitative Forward Mutation Assay in Salmonella typhimurium Using 8-Azaguanine Resistance as a Genetic Marker. Proc. Natl. Acad. Sci., 75 (1): 410-414.
- 51.- Sotelo, J., Escobedo, F., Rodriguez-Carbajal, J., Torres, B. and Rubio-Donnadieu, F.,1984. Therapy of Parenchymal Brain Cysticercosis With Praziquantel. N. Engl. J. Med., 310: 1001-1007.
- 52.- Steiner, K., Garbe, A., Diekmann, H.W. and Nowak, H. 1976. The Fate of Praziquantel in the Organism. I. Pharmacokinetics in Animals. Europ. J. Drug Metabol. Pharmacokinet., 2: 85-95.

- 53.- Steiner, K. and Garbe, A.,1976. The Fate of Praziquantel in the Organism. II. Distribution in Rats. *Europ. J. Drug Metabol. Pharmacokinet.*, 2: 97-106.
- 54.- Sterzl, J. and Riha, I.,1965. A Localized Haemolysis in Gel Method For the Detection of Cells Producing 7S Antibody. *Nature*, 208 (5013): 858-859.
- 55.- Tawfik, A.F., Carter, C.E. and Colley, D.G., 1986. Effects of Anti-Schistosomal Chemotherapy on Immune Responses, Protection and Immunity. I. Changes in Cellular and Humoral Responses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35 (1): 100-109.
- 56.- Tawfik, A.F. and Colley, D.G.,1986. Effects of Anti-Schistosomal Chemotherapy on Immune Responses, Protection and Immunity. II. Concomitant Immunity and Immunization With Irradiated Cercariae. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 35 (1): 110-117.
- 57.- Tawfik, A.F. and Colley, D.G.,1986. Effects of Anti-Schistosomal Chemotherapy on Immune Responses, Protection and Immunity. III. An Effective Regimen of Praziquantel Does Not Alter Immune Capabilities. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 35 (1): 118-123.
- 58.- Thomas, H.,1977. Resultados Experimentales con Praziquantel (EMBAY 8440) en Cestodiasis y Cisticercosis. *Bol. Chil. Parasitol.*, 32: 2-6.
- 59.- Thomas, H. and Andrews, P., 1977. Praziquantel. A New Cestocide. *Pestic. Sci.*, 8: 556-560.
- 60.- Thomas, H., Andrews, P. and Mehlhorn, H., 1982. New

- Results on the Effect of Praziquantel in Experimental Cysticercosis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 31(4): 803-810.
- 61.- Thomas, H. and Gönner, R., 1978. Zur Wirksamkeit Von Praziquantel Bei Der Experimentellen Cysticercose Und Hydatidose. Z. Parasitenkd., 55: 165-179.
- 62.- Thomas, H. and Gönner, R., 1977. The Efficacy of Praziquantel Against Cestodes in Animals. Z. Parasitenkd. 52: 117-128.
- 63.- Thompson, R.C.A. and Howell, M.J., 1979. Effect of BCG on the Resistance of Rats to Infection With Fasciola hepatica. Z. Parasitenkd., 61: 93-98.
- 64.- Thomson, A.J., De Vellers, J.C., Moosa, A. and Van Dellen, J.R., 1984. Cerebral Cysticercosis in Children in South Africa. Ann. Trop. Pediatr., 44 (1): 67-77.
- 65.- Torre, R.A. de la, Rúa Barceló, R de la, Hernández, G. Espinoza, J.J. and Cortinas de Nava, C., 1989. Genotoxic Effects of Niclosamide in Aspergillus nidulans. Mutation Res., 222 (4): 337-341.
- 66.- Vasconcelos, D., Cruz-Segura, H., Mateos Gómez, H. and Zenteno-Alanis, G., 1987. Selective Indications for the Use of Praziquantel in the Treatment of Brain Cysticercosis. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 50(4): 383-388.
- 67.- Zenteno-Alanis, G.H., 1968. Sintomatología de la Cisticercosis Humana. Rev. Fac. Med. Mex., XI(4):41-45.

A P E N D I C E

Preparación de soluciones.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS) pH 7.2.

- Na_2HPO_4 anhidro	8.094 gramos.
- KH_2PO_4 anhidro	2.448 gramos.
- NaCl	4.400 gramos.

Aforar a 1000 ml con agua destilada.

SOLUCION SALINA BALANCEADA DE HANKS' (HBSS).

- NaCl	8000 mg
- KCl	400 mg
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	60 mg
- KH_2PO_4	60 mg
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100 mg
- CaCl_2 anhidro	140 mg
- Glucosa	1000 mg
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100 mg
- NaHCO_3	350 mg
- Rojo de Fenol	2.5 mg

Disolver el NaCl, KCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y el CaCl_2 en 500 ml de agua destilada. Aparte disolver la Glucosa, los Fosfatos y el Rojo de Fenol; en 400 ml de agua destilada. Esterilizar por filtración a través de filtros Millipore de 0.22 micras de poro.

Disolver el NaHCO_3 en 100 ml de agua destilada y esterilizar en autoclave. En el momento de uso, añadirlo a la mezcla anterior.

SOLUCION DE ALSEVER'S.

- Dextrosa 2000 mg
- Citrato de Sodio dihidratado 800 mg
- Acido Cítrico 55 mg
- Cloruro de Sodio 420 mg

Aforar a 100 ml con agua destilada, esterilizar por filtración utilizando membranas Millipore de 0.22 micras de poro o autoclavar a 10 libras de presión durante 10 minutos; almacenar a 4 °C hasta su uso.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA