

43
ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"**

**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DE
DOS PROFARMACOS DEL ALBENDAZOL CONTRA
Trichinella spiralis**

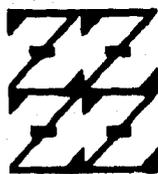
T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A
RAUL MORALES HURTADO**

**ASESOR DE TESIS:
DRA. LILIAN YEPEZ MULIA**

FES
ZARAGOZA



LO HUMANO ES JE
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

ESTE TRABAJO DE TESIS SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE PARASITOLOGIA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y PARASITARIAS DEL HOSPITAL DE PEDIATRIA DEL CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. LILIAN YEPEZ MULIA.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES.

DOY GRACIAS A DIOS POR HABERME PERMITIDO SER SU HIJO, YA QUE HAN SIDO, SON Y SERAN POR SIEMPRE EJEMPLO VIVO DE AMOR, UNION Y VOLUNTAD Y HAN SABIDO TRANSMITIRME CON SU EJEMPLO Y EXPERIENCIA, CONFIANZA Y SABIOS CONSEJOS.

A MIS HERMANOS.

Ma. TERESA, JUAN ANTONIO, ALFREDO, EDUARDO Y GREGORIO, YA QUE GRACIAS A SUS CONSEJOS Y ESTIMULOS, EN MI CREARON EL TEMPLE NECESARIO PARA AFRONTAR LAS ADVERSIDADES Y SALIR ADELANTE, ASI COMO A MIS CUÑADOS: VICTOR, ALEJANDRA, CARMEN Y MARIA EUGENIA.

AGRADECIMIENTOS

A LA DRA. en C. LILIAN YEPEZ MULIA.

POR HABERME BRINDADO LA OPORTUNIDAD DE PODER REALIZAR ESTA TESIS Y POR SU INVALUABLE APOYO, CONSEJOS, EXPERIENCIA Y GRAN PACIENCIA.

AL DR. ROBERTO MANUEL CEDILLO RIVERA

POR TODOS SUS ACERTADOS CONSEJOS QUE ME BRINDO, ASI COMO SU CONFIANZA, DISPOSICION E INTERES DURANTE LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

AL M. en C. FRANCISCO HERNANDEZ LUIS Y AL DR. en C. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA.

POR SUS SUGERENCIAS Y SU AMABLE AYUDA QUE HICIERON POSIBLE LA CULMINACION DE ESTE TRABAJO.

A NOEMI.

POR QUE GRACIAS A TU ALEGRIA QUE SIEMPRE TE CARACTERIZA FUISTE PARTE FUNDAMENTAL PARA PODER REALIZAR ESTE TRABAJO, A TU DISPOSICION Y GRAN PACIENCIA, POR TU RISA Y TRAVESURAS QUE ALEGAN LOS DIAS, TE QUIERO.

A MIS AMIGOS.

DEL LABORATORIO: AMPARO, BEATRIZ, NARCY, ROSARIO, FERNANDO Y OSCAR, Y A TODOS LOS DE LA UNIDAD, LOS DEL LABORATORIO DE PARASITOLOGIA Y BIOLOGIA MOLECULAR..

A MIS AMIGOS DE LA PREPARATORIA: ROSA, CARLOS, MARTIN, FERNANDO, JOEL, JUAN Y KARMINA .

A TODOS MIS AMIGOS DE LA FACULTAD Y EN ESPECIAL A ADELA, GUILLERMO, JOSE, JAVIER, ENRIQUE (RODRIGUEZ Y DE NOVA), NANCY, AVELINA, PABLO, EDUARDO, RITA, EDGAR, TERESA, ISABEL, Y A LOS TIBURONES.

Y A TODOS AQUELLOS QUE EN ESTE MOMENTO SE ME ESCAPAN SUS NOMBRES "MUCHAS GRACIAS" POR SU INVALUABLE Y DESINTERESADA AMISTAD.

INDICE

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.	iii
1. INTRODUCCION.	1
2. FUNDAMENTACION TEORICA.	5
2.1. <i>Trichinella spiralis</i> .	5
2.1.1. Morfología.	5
2.1.2. Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i> .	7
2.2. Triquinelosis.	9
2.2.1. Epidemiología.	9
2.2.2. Sintomatología.	11
2.2.3. Diagnóstico.	13
2.2.4. Tratamiento.	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	17
4. OBJETIVOS.	20
4.1. Objetivo general.	20
4.2. Objetivos particulares.	20
5. HIPOTESIS.	21
6. MATERIAL.	22
6.1. Material y equipo.	22
6.2. Reactivos.	22
6.3. Material biológico.	22
7. METODOLOGIA.	23
7.1. Evaluación de la biotransformación.	23

7.2. Obtención de las larvas musculares de <i>Trichinella spiralis</i> y mantenimiento del ciclo de vida.	23
7.3. Obtención de los adultos de <i>Trichinella spiralis</i> .	24
7.4. Efecto de los profármacos G2 , M3 y del albendazol sobre los organismos preadultos de <i>Trichinella spiralis</i> .	24
7.5. Efecto de los profármacos G2 , M3 y del albendazol sobre los organismos adultos y la fertilidad de la hembra de <i>Trichinella spiralis</i> .	25
7.6. Efecto de los profármacos G2 , M3 y del albendazol sobre las larvas musculares de <i>Trichinella spiralis</i> .	25
8. RESULTADOS.	27
9. DISCUSION.	34
10. CONCLUSIONES.	38
11. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES.	39
12. ANEXO.	40
13. BIBLIOGRAFIA.	41

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.	Transformación de los profármacos M3 y G2 a albendazol.	4
Figura 2.	Larvas musculares de <i>Trichinella spiralis</i> .	6
Figura 3.	Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i> .	7
Tabla 1.	Determinación de albendazol y sulfóxido de albendazol, en muestras de plasma obtenidas de ratas tratadas con los profármacos M3 , G2 y albendazol a una dosis de 10 mg/Kg de peso.	28
Tabla 2.	Efecto de los profármacos M3 , G2 y del albendazol a dosis única de 25 mg/Kg de peso sobre el organismo preadulto de <i>Trichinella spiralis</i> .	29
Tabla 3.	Efecto de los profármacos M3 , G2 y del albendazol sobre el adulto de <i>Trichinella spiralis</i> .	31
Tabla 4.	Efecto de los profármacos M3 , G2 y del albendazol sobre la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i> .	32
Tabla 5.	Efecto de los profármacos M3 , G2 y del albendazol sobre la infectividad de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i> .	33

I. INTRODUCCION

Muchos de los medicamentos, utilizados en la quimioterapia de diferentes parasitosis, se han derivado de el uso empírico y tradicional. La quimioterapia racional se basa en el trabajo del patólogo Paul Ehrlich en los años 1870's y 1880's. La aplicación por Ehrlich de la selectividad de los compuestos en el tratamiento de las infecciones por bacterias y protozoarios inició la quimioterapia moderna (Croft, 1994).

Por otro lado, como consecuencia del progreso sustancial ocurrido con el descubrimiento y el desarrollo de fármacos, particularmente en medicina veterinaria, el médico, en la actualidad dispone de agentes efectivos capaces de curar o controlar la mayoría de las infecciones humanas producidas por helmintos intestinales.

Los helmintos son organismos muy diferentes, que varían en su ciclo biológico, en la estructura de su organismo, en su fisiología, en su evolución, en el hábitat que ocupa dentro del huésped y en su susceptibilidad a los quimioterápicos. La gravedad de la infección, tanto en el hombre, como en otros hospederos, está dada por la intensidad de la exposición.

Los fármacos antihelmínticos que se emplean para eliminar los parásitos, actúan de forma local; eliminándolos del tracto gastrointestinal, o actuando de forma sistémica para eliminar los especímenes y formas inmaduras de los helmintos que invaden órganos y tejidos.

A través del tiempo se han empleado una gran cantidad de compuestos; dentro de los que más se han utilizado se encuentran: compuestos de antimonio (tartar emético); compuestos tricíclicos con cadenas de dialquilamino (lucetona e hicantona); dihidroisoquinolinas (praziquantel); hidrocarburos halogenados (CCl_4 , hexacloroetano); fenoles y bisfenoles halogenados (hexaclorofeno); salicilanilidas halogenadas (oxiclozanida); fenoxialcanos (dianfenetide); benzimidazoles (tiabendazol y albendazol) y piperazinas (dietilcarbamazina).

Para el tratamiento de las diferentes parasitosis tisulares, se requiere de productos que alcancen concentraciones plasmáticas adecuadas para erradicar la infección. Algunos medicamentos, tienen actividad biológica o farmacológica adecuada, pero por lo general tienen otras características no deseables, por ejemplo, alta toxicidad, insolubilidad o problemas para su metabolismo; persistiendo la imperiosa necesidad de disponer de fármacos adecuados para combatir distintos tipos de infecciones sistémicas como la equinococosis, la filariasis y la triquinellosis causadas por helmintos con localización tisular, las cuales requieren para su tratamiento de grandes dosis y tratamientos largos. Por lo que, se requiere diseñar nuevas estructuras, para minimizar o eliminar estas propiedades.

Dentro del diseño de nuevos fármacos, se han utilizado con éxito sistemas de liberación controlada, microencapsulación de fármacos, recubrimientos entéricos, el uso de liposomas; además se han probado sistemas y terapias de reemplazo enzimático; la utilización de la administración transdérmica, nasal y pulmonar; asimismo, tratamientos para infecciones oculares.

Otra estrategia en el diseño de fármacos ha sido la síntesis de profármacos. El término profármaco fue introducido por primera vez por Albert en 1971, el cual se refiere a un compuesto inactivo farmacológicamente que es convertido a un fármaco activo por una biotransformación metabólica (Silverman, 1992). Algunos profármacos pueden ser activados por un proceso no enzimático, como reacciones intramoleculares. Esta conversión de profármaco a fármaco puede ocurrir antes de la absorción, durante la absorción, o después de la absorción, o en un sitio específico del cuerpo. En un caso ideal un profármaco es convertido a fármaco en el sitio de acción para el que fue diseñado.

Los profármacos se utilizan por diferentes razones, entre estas; por problemas de solubilidad; de absorción y distribución; impedimento para llegar a un sitio específico; inestabilidad; toxicidad; pobre aceptabilidad del paciente y por problemas de formulación. En algunos casos los profármacos no han sido diseñados como tales; la biotransformación es fortuita, y en el análisis de los metabolitos se observa la activación (Martín, 1993).

Existen dos tipos de profármacos: los derivados bioreversibles y los bioprecursores (Martín, 1993):

1) Un derivado bioreversible es un compuesto que en su estructura presenta al fármaco unido a una porción estructural denominada progrupo. Por reacciones enzimáticas o químicas, el derivado bioreversible libera al fármaco para que sea este último el que ejerza el efecto terapéutico.

2) Un bioprecursores es un compuesto que en su estructura no presenta al fármaco, sino que lo va a formar cuando es metabolizado por reacciones de oxidación o reducción.

Walchshofer y cols. (1990) evaluaron la actividad de un profármaco de un nuevo bencimidazol contra *Echinococcus multilocularis*, el cual se ciclizaba al bencimidazol después de la reducción del grupo nitró por la microflora intestinal. Los autores encontraron por medio de microscopía de transmisión, daño significativo en el tegumento y los protoesqueletos del parásito, después de 18 días de tratamiento. Por otro lado, Dawson y Watson (1983) sintetizaron un profármaco del mebendazol, el cual se administró a ratas por vía oral, observándose una mejor biodisponibilidad en comparación con el mebendazol.

Dentro de los bencimidazoles 2-carbamatos, el albendazol es el de más amplio uso en el tratamiento de las helmintiasis. Sin embargo, su insolubilidad en agua dificulta su absorción a nivel intestinal, y por lo tanto, el alcanzar concentraciones plásmaticas adecuadas. Al igual que con otros fármacos, se han empleado diferentes estrategias para mejorar las propiedades fisicoquímicas del albendazol, dentro de las cuales se encuentra la producción de profármacos.

Un ejemplo de lo anterior, es el Netobimin (Delatour y cols., 1986) el cual se administró por vía oral a ratas y a un borrego. Al analizarse por Cromatografía Líquida de Alta Resolución muestras de la orina y plasma de ratas y del fluido del rumen de borrego, se detectó la presencia de albendazol y de 4 de sus metabolitos. Asimismo, se demostró la participación de la flora intestinal en la reducción del profármaco a albendazol.

Basándose en el mecanismo metabólico del Netobimin, Martínez y cols. (1994) sintetizaron dos profármacos del albendazol con posible actividad antihelmíntica. Estas moléculas presentan diferencias en la posición del grupo nitro con respecto del grupo propiltio en el anillo del benceno. Los compuestos sintetizados son el N-Metoxicarbonil-N'-[(2-nitro-5-propiltio)fenil] tiourea (M3) y N-Metoxicarbonil N'-[(2-nitro-4-propiltio)fenil]tiourea (G2). Sin embargo, tanto la producción de albendazol a partir de M3 y G2 como la actividad antihelmíntica de estos profármacos no ha sido evaluada.

Los profármacos M3 y G2 son moléculas que necesitan sufrir una reacción de reducción de su grupo nitro para producir un grupo amino el cual se cicliza con el grupo tio para producir albendazol. Esta reducción se considera que la realiza la flora intestinal de los animales tratados (Walchschofer y cols. 1990; Delatour y cols. 1986) y es el paso limitante en la reacción de producción del albendazol, debido a que el siguiente paso de ciclización intramolecular ocurre en forma rápida (fig 1).

El estudio de la actividad antihelmíntica de diferentes fármacos se ve limitado debido a que no se cuenta con modelos experimentales adecuados. En este contexto, el estudio de *Trichinella spiralis* resulta de gran interés porque además de representar un problema de salud en muchas partes del mundo, permite establecer un modelo para el estudio de infecciones por helmintos, ya que su ciclo de vida, así como los síntomas asociados con la enfermedad pueden ser reproducidos en animales de experimentación incluyendo ratas y ratones. Asimismo, el parásito completa su ciclo de vida en un tiempo relativamente corto en un mismo huésped.

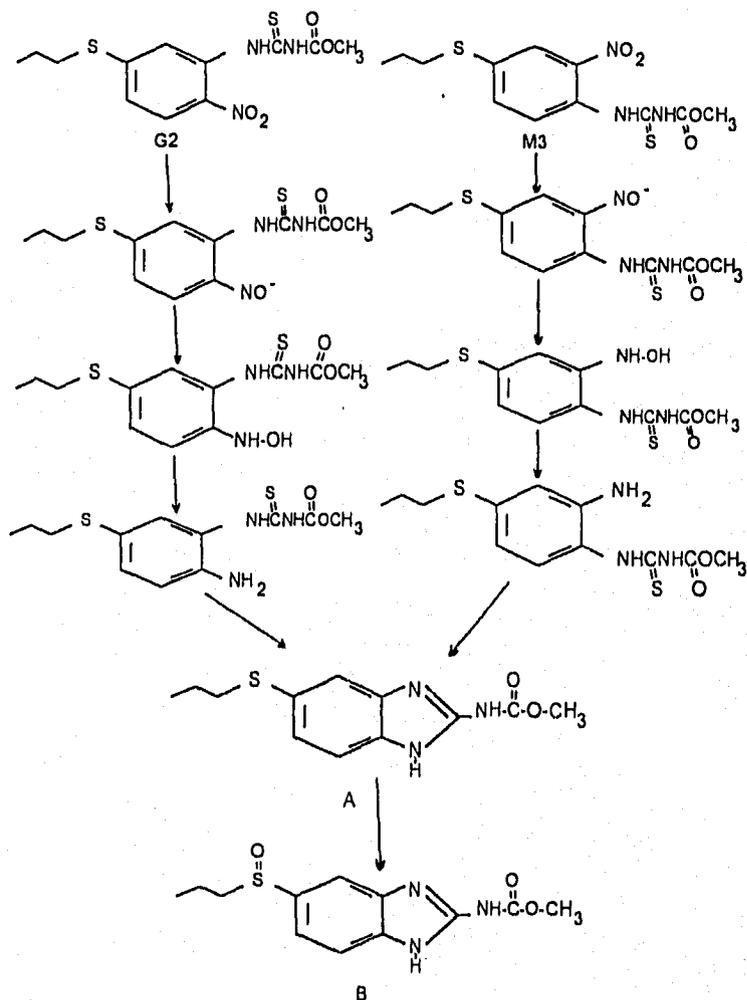


Fig 1. Transformación de los profármacos M3 y G2 a albendazol. La reducción del grupo nitro a un grupo amino y la posterior ciclización de M3 y G2 entre los grupos amino y tiol da como resultado la producción de albendazol (A). Esta reducción posiblemente se realice en el intestino de los animales tratados mediante la participación de la microflora. El producto A es absorbido y posteriormente oxidado para dar sulfóxido de albendazol (B).

2. FUNDAMENTACION TEORICA

2.1. *Trichinella spiralis*

GRUPO TAXONOMICO

Reino	<i>Animal</i>
Superphylum	<i>Aschelminthes</i>
Phylum	<i>Nematelm</i>
Clase	<i>Adenoforea</i>
Orden	<i>Enoplida</i>
Familia	<i>Trichinellidae</i>
Género	<i>Trichinella</i>
Especie	<i>spiralis</i>

2.1.1. MORFOLOGIA

Trichinella spiralis, es el agente etiológico de la triquinelosis, fue descubierta como larva enquistada en los músculos de cadáveres humanos autopsiados en 1828, en Londres por Peacock (Campbell, 1979).

Los gusanos adultos de *Trichinella spiralis* son diminutos y filiformes (fig. 2). Los machos miden aproximadamente de 1.2 a 1.58 mm de longitud por 60 µm de diámetro. La extremidad posterior lleva un par de papilas cónicas bien visibles, una a cada lado del orificio cloacal, la cloaca se evierte durante la copulación. Presenta un testículo simple situado a corta distancia del extremo posterior del cuerpo, se extiende hacia adelante hasta aproximadamente la mitad del cuerpo, donde se une al tubo genital.

La hembra mide de 1.54 a 3.35 mm de longitud, casi el doble que el macho, y tiene 1.5 veces más grosor. Un ovario único se sitúa en la parte posterior del cuerpo, junto con el oviducto, el receptáculo seminal, el útero y la vagina forman un canal casi recto hasta la vulva, que está situada en la cara ventral del cuerpo.

En ambos sexos, la parte anterior del cuerpo está ocupada en gran parte por el esticosoma, que es un cordón compacto de células glanduriformes dispuestas linealmente llamadas esticositos. En ambos sexos, la boca lleva un estilete que puede perforar el epitelio intestinal. Wrigth (1979) demostró por micrografía electrónica que, al moverse de un sitio a otro, los gusanos atraviesan las células del epitelio mucoso y pasan también entre ellas.

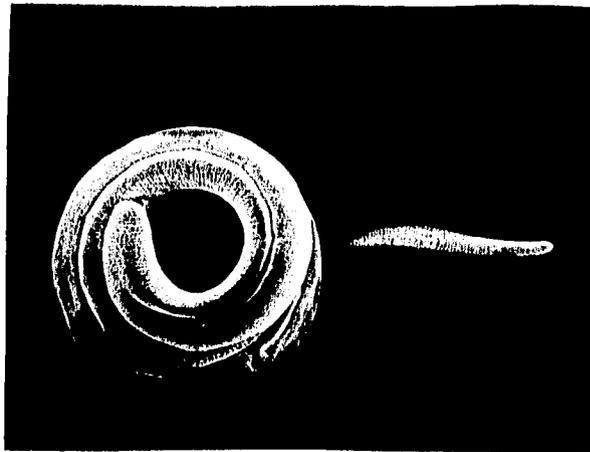


Fig 2. Larvas musculares de *Trichinella spiralis*. Tomadas con microscopía de barrido.

2.1.2. CICLO DE VIDA DE *Trichinella spiralis*

El ciclo de vida de *T. spiralis*, se desarrolla completamente en un huésped, inicia cuando se ingiere carne que contiene larvas infectivas viables del parásito (fig. 3). La larva es liberada de la carne por efecto del medio estomacal. Las larvas liberadas se desenquistan en el estómago o en el duodeno y yeyuno (Despommier y cols., 1978), pasan al intestino delgado en donde, invaden el epitelio mucoso y después de sufrir cuatro mudas (aproximadamente a las 30 hr), maduran a sus formas adultas (Kosek, 1971). Al alcanzar este estadio, los adultos se localizan en las cavidades del duodeno y yeyuno, que es el lugar donde se lleva a cabo la cópula, que puede producirse ya a las 30 horas de infección. Una vez llevada a cabo la cópula, las hembras comienzan a producir huevos que se desarrollan en el útero para dar lugar a larvas diminutas (Chester y Clifton, 1986).

En el quinto o sexto día de la infección comienzan a aparecer larvas móviles de aproximadamente 100 μm de longitud y 6 μm de anchura, las larvas recién nacidas se liberan y atraviesan la mucosa intestinal hasta llegar a vasos linfáticos intestinales y corriente sanguínea, desde donde se diseminan por todos los órganos. La larviposición continúa durante un período aproximado de 4 semanas y a veces alcanzan las 16 semanas. La fecundidad de la hembra varía de acuerdo a la especie del huésped y es probablemente una función de la habilidad del huésped de montar una respuesta inmune rápida en contra del parásito a nivel intestinal (Chester y Clifton, 1986).

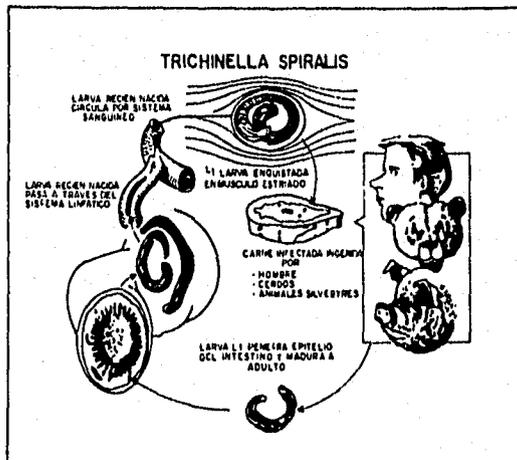


Fig 3. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*. Tomado de Murrell (1985).

El tiempo natural de vida de *T. spiralis* en el intestino suele ser aproximadamente de 1 mes o menos en el ratón, es probable que sea de duración similar en el ser humano. Durante este periodo pueden producirse aproximadamente hasta 500 larvas por hembra, esto depende de algún modo del número de parásitos presentes y de la existencia o no de infección previa, Chirasak (1971) y Kennedy (1979) encontraron, que la producción por hembra es menor en las infecciones intensas y en los huéspedes previamente infectados.

Las larvas recién nacidas que atraviesan el epitelio intestinal pueden alojarse en diversos puntos incluidos el corazón, cerebro, líquido cefalorraquídeo y cavidades corporales, desde donde vuelven a entrar en la circulación sanguínea y finalmente invaden las fibras musculares esqueléticas y llevan a cabo una destrucción parcial de estas fibras invadidas, constituyendo un material protelco extraño que desencadena un proceso toxicológico, que es en sí el responsable del cuadro clínico de la triquinosis, particularmente mialgia y la respuesta a la invasión del miocardio.

La mayor producción de larvas tiene lugar durante la segunda semana de la infección, y la invasión máxima se observa en músculos relativamente carentes de glucógeno, como el diafragma, los músculos de la laringe, la lengua, el abdomen, los espacios intercostales, los bíceps, los pectorales, los gemelos, el deltoides y otros músculos que mantienen una actividad constante.

González y cols. (1988) encontraron, al investigar la distribución de las larvas de *T. spiralis*, en diferentes grupos musculares de ratas AXC inoculadas por vía bucal, que el parásito se distribuye en forma desigual en los diferentes grupos de músculos examinados y encontraron la mayor cantidad de larvas en el músculo del diafragma en todos los animales infectados, coincidiendo con lo reportado por Stewart y Charniga (1980).

Las larvas que alcanzan las fibras musculares estriadas, penetran activamente a su interior, crecen, maduran e inducen un fenómeno de adaptación con su célula huésped. El parásito induce modificaciones dentro de la célula muscular y llega a producir lo que se conoce como "célula nodriza", que es una unidad morfofisiológicamente independiente y altamente especializada. La célula nodriza desarrolla un fino plexo de vénulas periquísticas que facilita el intercambio metabólico con el huésped y la larva. En el interior de la célula el parásito no permanece inmóvil, sino realiza movimientos anteroposteriores y su extremidad anterior oscila constantemente como explorando el microambiente que lo rodea (Chirasak, 1971).

2.2. TRIQUINELLOSIS

La triquinelosis se define como una infección parasitaria producida por nemátodos del género *Trichinella*. Se transmite por canibalismo entre animales domésticos y en algunas regiones del mundo, entre animales silvestres.

2.2.1. EPIDEMIOLOGIA

El hombre se infecta principalmente, al comer carne de cerdo mal cocida o cruda, que contiene larvas musculares de *T. spiralis*. En ocasiones, suele infectarse por la ingestión de carnes infectadas de otros animales como oso, caballo, foca, jabali, etc. (Ramisz y Balicka, 1994).

El cerdo se infecta, por la ingestión de ratas infectadas, principalmente, cuando es criado en malas condiciones higiénicas o, cuando al vivir en forma silvestre, tiene que buscar su propio alimento en sitios sucios o en basureros. Las ratas, debido a sus hábitos alimenticios, son las que mantienen y propagan la infección en la naturaleza (Leiby y cols., 1990).

El problema de la triquinelosis en América Latina ha sido conocido desde el siglo pasado (Schenone, 1984). En México, la triquinelosis fué descubierta por primera vez en 1891 por el doctor Manuel Toussaint, en un trozo de tejido muscular que le llevó el Dr. Miguel Zuñiga, preparador de la clase de anatomía, a quién en varias ocasiones había llamado la atención el puntilleo blanquizco que presentaban los músculos en algunos cadáveres humanos (Barragán, 1893). El mismo Toussaint encontró un número no precisado de casos en cadáveres en el extinto hospital de San Andrés, de la Ciudad de México (Mazzotti, 1953).

No hay datos de otra investigación similar, sino hasta 43 años después, en la Ciudad de México en 1939, cuando Perrin examinó 200 diafragmas, encontrando 25 cadáveres con *T. spiralis*. Cuatro años más tarde Mazzotti y Chavira (1943), utilizando técnicas de compresión y digestión del músculo, encontraron 30 casos de triquinelosis, en 600 diafragmas examinados.

Asimismo, Mazzotti y Pastrana (1943), demostraron que el método de digestión artificial de los músculos esqueléticos mediante pepsina-HCl al 1% no tiene la eficacia que se le ha atribuido, ya que una gran parte de los quistes con larvas muertas desaparecen por la acción digestiva. Por tal motivo Mazzotti (1944), decidió realizar su investigación comprimiendo 10 g de músculo, de esa forma de 400 muestras de diafragmas se encontraron 46 con *T. spiralis*.

En 1975 hubo una epidemia de triquinellosis en la Ciudad de México, que involucró a 20 personas, probablemente originada por cecinas adquiridas en Yauhtepec, Morelos (Martínez Marañón, 1979 a). En el período de 1975 a 1979, 7 epidemias que afectaron a 79 personas ocurrieron en Zacatecas. Uno de estos brotes fue causado por el consumo de carne de un cerdo, afectando a 18 miembros de un grupo familiar rural, en este caso murieron 6 personas. Se realizaron biopsias musculares en 40 personas del total de 79, demostraron en 20 la presencia de larvas de *T. spiralis*, en tanto en otras 20 se observó evidencia de miosistis (Martínez Marañón, 1979 b; Fragoso, 1981).

En el municipio de Naucalpan, Estado de México, a mediados de 1978, hubo un brote, que afectó a 4 de 7 miembros de una familia, los cuales consumieron chorizo crudo procedente del estado de Durango. En la biopsia muscular practicada a uno de los pacientes se encontraron larvas de *T. spiralis*, así como en un trozo de chorizo que había sobrado del material que originó el brote (Martínez Marañón, 1979 a).

Martínez Marañón (1985) indica que a partir de 1974 los casos de triquinellosis en México han aumentado, más de 200 casos se han diagnosticado con razonable seguridad, debido a que muchos médicos han aprendido a reconocer las manifestaciones de la enfermedad.

En 1986, Martínez y cols. presentan un caso de triquinellosis aguda en un paciente masculino de 15 años, el cual presentó severidad en las manifestaciones clínicas, la enfermedad se diagnosticó por biopsia de músculo y compresión.

Rojas y cols. (1989) estudiaron las características clínicas y de laboratorio en 13 casos de triquinellosis aguda, del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", que se presentaron en el período de 1977 a 1986. Un año más tarde, Zamora y cols. reportaron 4 casos de triquinellosis en una familia de Iztapalapa, que consumió chorizo crudo procedente de Villanueva, Zacatecas.

En 1992, Álvarez y cols. realizaron una revisión retrospectiva de los expedientes de 8 pacientes con triquinellosis, comparándolos con 16 casos de fiebre filibidea, durante el período de 1970 a 1990, encontrando que la incidencia de triquinellosis prevaleció en pacientes entre 5 y 14 años, de bajos estratos socioeconómicos y que habían ingerido carne de cerdo insuficientemente cocida.

Uno de los últimos reportes (Hernández y cols., 1992) indican que durante el último trimestre de 1987, 166 casos de triquinellosis aguda se detectaron en Ciudad Delicias, Chihuahua causado por el consumo de carne de cerdo. El diagnóstico de la enfermedad se llevó a cabo mediante una innovación al procedimiento normal de compresión, utilizando colorantes de uso común en el laboratorio de anatomía

patológica. La mitad de los pacientes se trataron con mebendazol y albendazol, la mitad restante se trató con tiabendazol. Sólo uno de los paciente falleció.

2.2.2. SINTOMATOLOGIA

Tanto en el hombre, como en los animales de experimentación, el curso de la enfermedad depende de la cantidad e intensidad de la infección.

En el transcurso de la enfermedad se distinguen tres etapas sucesivas: 1. fase intestinal; 2. fase de invasión muscular y 3. fase de convalecencia (Chester y Clifton, 1986).

1. Fase intestinal.

La inflamación de la mucosa intestinal producida por la penetración y desarrollo de los organismos adultos, puede producir síntomas de malestar como dolor abdominal, diarrea y nauseas. Este cuadro sintomatológico puede confundirse como intoxicación alimentaria aguda. En una pequeña proporción de pacientes aparece vómitos. En algunos casos se produce estreñimiento, en vez de diarrea. Por lo general no suele haber fiebre.

2. Fase de invasión muscular.

La presencia de fiebre, edema facial, dolor, hinchazón y debilidad de los músculos afectados y eosinofilia periférica. La fiebre suele aparecer al comienzo de la invasión muscular, alcanza un nivel máximo en unos días o una semana y persiste, por lo general, durante un período de otros 2 a 7 días con menor intensidad. La intensidad de la fiebre es proporcional a la gravedad de la infección y supera los 40°C en los casos fatales. Otros síntomas menos frecuentes son cefalea, enrojecimiento súbito de la cara, conjuntivitis, prurito, diaforesis, anorexia y sed.

Los ganglios linfáticos están con frecuencia aumentados de tamaño e hipersensibles a la palpación. La lesión de los músculos puede provocar dificultad para el movimiento de ojos, la respiración, la masticación, la deglución, la emisión de palabras o el uso de las extremidades.

La eosinofilia en sangre periférica aparece de modo característico durante la segunda semana de infección o al final de ella, alcanza un nivel máximo en la tercera o cuartas semanas y disminuye de forma gradual en un período de meses. La eosinofilia relativa suele ser al menos del 20% y por lo general excede del 50% y puede llegar incluso al 90%.

La manifestación más grave de la enfermedad es la miocarditis, que a veces aparece ya en la segunda semana de evolución, aunque lo más común es observarla después de la tercera. La muerte por miocarditis suele producirse entre la cuarta y la octava semanas de evolución. El paciente puede sufrir también de encefalitis, meningitis y trastornos neurológicos (Chester y Clifton, 1986).

3. Fase de convalecencia.

La encapsulación comienza a producirse hacia el final de la tercera semana. La fiebre suele desaparecer, los síntomas musculares comienzan a remitir y, si el edema ha sido intenso, puede haber diuresis. Finalmente, el paciente recupera el apetito y su estado general mejora. A veces persiste la miocarditis, y el ejercicio físico puede precipitar una situación de insuficiencia cardíaca congestiva. Puede presentarse bronconeumonía, trombosis vascular y encefalitis. Con el tiempo, todos los síntomas desaparecen, y la pared quística, y la larva, terminan por calcificarse (Chester y Clifton, 1986).

En México no se le ha dado una real importancia a la enfermedad, ya que ha pesar de ser conocida desde hace tiempo, los estudios clínicos que se han hecho son insuficientes para poner de manifiesto la gravedad. Esto se debe a que su sintomatología es fácilmente confundible con la de otros padecimientos; Valenzuela (1981), hace mención de que la sintomatología de la enfermedad coincide con aproximadamente 50 padecimientos diferentes.

Sin embargo, Martínez Marañón (1983), considera que los casos típicos de esta parasitosis no son difíciles de diagnosticar, indica que se caracterizan por:

a) Fiebre de tipo e intensidad muy variable, pero que casi nunca falta; suele alcanzar 39 ó 40°C por algunos días y persistir de una o tres semanas.

b) Dolores musculares, frecuentemente intensos y generalizados. Subrayando que los mismos pacientes insisten en que el dolor es muscular y no articular, óseo o indefinible como suele ser el "quebrantamiento general" común en tantas otras enfermedades infecciosas.

c) Cefálea frontal y con menos frecuencia generalizada, que puede ser muy molesta.

d) Un síntoma mucho más común y que ha constituido la clave para sospechar el padecimiento en los casos, es el edema bilateral intenso de los párpados, a veces de toda la cara y menos frecuentemente generalizado, acompañado de congestión conjuntival. Este es un signo que rara vez falta y que nunca debe dejarse pasar desapercibido, aunque frecuentemente es fugaz y desaparece espontáneamente en 3 ó 4 días. Cuando se observe que existió al principio un proceso febril agudo, debe

hacerse una biometría hemática y un examen general de orina. Si la biometría muestra, con o sin leucocitos, eosinofilia de más de 10% o si ésta aumenta rápidamente al repetir los exámenes, la sospecha de triquinellosis se convierte casi en certidumbre.

e) Con mucha frecuencia, existen odiofagia y disfagia, con o sin congestión faríngea, que puede desviar el diagnóstico hacia la faringitis.

f) Los síntomas gastrointestinales, diarrea, dolor abdominal, náusea o vómitos son en realidad más inconsistentes y transitorios de lo que se cree.

2.2.3. DIAGNOSTICO

Es muy raro el poder aislar los gusanos adultos y larvas de las heces durante la fase diarreica de la enfermedad; en la sangre, líquido cefalorraquídeo o la leche durante el período de migración. Tras la llegada de las larvas al músculo esquelético, puede establecerse específicamente el diagnóstico mediante la demostración de organismos libres o encapsulados en pequeñas muestras comprimidas de los músculos deltoides, bíceps, gemelos o pectorales, obtenidas por biopsia (triquinoscopia). Este método tiene limitaciones, ya que el tamaño de muestra es pequeño y restringe la detección de las larvas en el músculo de individuos aún con cargas parasitarias altas; y pueden pasar desapercibidas infecciones con cargas parasitarias bajas.

En México, desde 1942, se ha utilizado el método de compresión entre laminillas de muestras de músculo fresco (Mazzotti, 1943), el método de digestión de la muestra muscular con jugo gástrico artificial (Mazzotti y Pastrana, 1943), y la prueba intraeutánea de Bachman (Mazzotti y Lozano, 1944) aplicando 0.01 c.c. de antígeno diluido 1:10,000, y realizando la lectura a los 30 minutos posteriores a la aplicación, midiendo el tamaño de la pápula. Con respecto a los resultados obtenidos con esta prueba, es recomendable tener cuidado con su interpretación, ya que en individuos aparentemente sanos, con la prueba pueden ser positivos, mientras que para otros ésta puede ser negativa.

En la actualidad, el diagnóstico de la triquinellosis se realiza, utilizando métodos serológicos, que aún con la ausencia de síntomas clínicos característicos, puede identificar las infecciones con el parásito. Estos métodos se basan en la presencia en el suero u otros fluidos corporales, de anticuerpos específicos contra *T. spiralis*. Entre los métodos más empleados se encuentran: ELISA, la detección de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la detección de antígenos por ensayo inmunoradiométrico. El ELISA ha resultado ser un método sumamente sensible y de fácil realización. En este ensayo se han empleado diferentes preparaciones antigénicas de la larva muscular del parásito como son: extracto total, antígenos de superficie y productos de secreción-excreción. La utilización de estos últimos

componentes permiten un diagnóstico además de sensible, específico de la triquinelosis (Yépez y Ortega, 1994).

2.2.4. TRATAMIENTO

El tratamiento de la triquinelosis consiste de dos partes: Primero, parar la producción de larvas por los adultos en el intestino y en segundo lugar matar a las larvas que migran a los músculos y se enquistan.

Aunque se ha demostrado que algunos compuestos son capaces de destruir a *T. spiralis* o de obstaculizar su oviposición, no se ha establecido un tratamiento específico para la triquinelosis.

El tiabendazol es el más antiguo de los fármacos utilizados en el tratamiento de la triquinelosis. Este fármaco es muy activo contra una gran variedad de nemátodos que infestan el tracto gastrointestinal de animales domésticos; tiene actividad larvicida y ovicida "in vitro" en concentraciones muy bajas (Brown y cols., 1961). Aunque su mecanismo de acción primario se desconoce, se cree que inhibe el sistema fumarato reductasa específico de las mitocondrias de los helmintos, posiblemente por interacción con una quinona endógena. Kean y Hoskins (1964) demostraron que el tiabendazol destruye al parásito cuando se administra a ratones o cerdos, 24 horas después de la inoculación. El tiabendazol a dosis de 50 mg/kg de peso corporal/día, puede evitar la aparición de síntomas adversos si se administra a partir del segundo día de la ingestión de carne infectada, o mitiga la enfermedad, si se da entre el quinto y el noveno día tras la infección. El tiabendazol se absorbe rápidamente después de su administración oral, las concentraciones máximas en plasma se alcanzan 1 hora después de su administración, pero sólo un pequeño porcentaje, cerca del 2% de la dosis administrada, llega a circulación sanguínea. La mayor parte de ésta, se excreta dentro de las 24 horas, por la orina, como 5-hidroxitiabendazol conjugado como glucurónido o como sulfato. Aunado a lo anterior Kean y Hoskins (1964) y Webster (1991) encontraron una gran incidencia de reacciones alérgicas graves hacia este producto.

Por otro lado, el mebendazol ha presentado un efecto letal sobre las fases invasivas y encapsuladas de *T. spiralis* en ratones y ratas. El mebendazol es muy utilizado, particularmente contra nemátodos gastrointestinales donde su acción es independiente de su concentración sistémica. Este fármaco es muy efectivo en ascariasis, capilariasis intestinal, enterobiasis, trichuriasis y anquilostomiasis, ya sean infecciones simples o mixtas. El fármaco es activo tanto en los estadios larvarios, como en los adultos de los nemátodos que producen estas infecciones y es ovicida para *Ascaris* y *Trichuris* (Keystone y Murdoch, 1979). La inmovilización y la muerte de parásitos susceptibles se produce lentamente y su eliminación del tracto gastrointestinal puede no completarse

hasta varios días después del tratamiento con este fármaco. El fármaco produce la desaparición selectiva de los microtúbulos citoplasmáticos de las células tegumentarias e intestinales de los parásitos afectados, así como la alteración de las sustancias secretorias acumuladas en el aparato de Golgi, la secreción de acetilcolinesterasa, el consumo de glucosa y el agotamiento del glucógeno (Watts y col., 1982; Bughio y col., 1994). Boczon y cols. (1984) encontraron que esta acción se debe a que afecta al complejo succinato deshidrogenasa-fumarato reductasa y afecta a la cadena del transporte de electrones entre una quinona y la NADH deshidrogenasa.

Sin embargo, el mebendazol se absorbe en forma deficiente y errática y las concentraciones del fármaco en el plasma son bajas y no reflejan la dosis ingerida (Witassek y cols., 1981 y Levin 1983). El mebendazol tiene un metabolismo de primer paso rápido, originándose principalmente dos metabolitos el 5-(α -hidroxibencil)-1H-benzimidazol-2-il-carbamato de metilo y 2-amino-5-benzoil-1-benzimidazol.

Otro fármaco antihelmíntico de amplio espectro, que se utiliza tanto en el tratamiento de la triquinelosis (Fourestié y cols., 1988; Andrews y cols., 1994), como en el tratamiento de infecciones producidas por tremátodos, céstodos y nemátodos, en ganado vacuno, ovino, caballar y porcino es el albendazol. Se ha observado que este fármaco es eficaz en el tratamiento de parasitosis del tipo de: Ascariasis (*Ascaris lumbricoides*), Tricocefalosis (*Trichuris trichuria*), Enterobiasis (*Enterobius vermicularis*), Uncinariasis (*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*), Solitarias (*Hymenolepis nana* y *Taenia spp.*), Strongiloidosis (*Strongyloides stercoraria*).

El albendazol forma parte de un gran número de derivados benzimidazoles-2- carbamato, que como el mebendazol y el flubendazol fueron desarrollados como antihelmínticos de amplio espectro para uso animal y humano. Este fármaco ha mostrado una mayor eficacia en el tratamiento de las helmintiasis comparándolo con otros benzimidazoles, como el flubendazol, mebendazol, etc. (McCracken y Lipkowitz, 1990; Katiyar y cols., 1994). Además, Saimont y cols. (1983), demostraron que el albendazol es muy bien tolerado por los pacientes.

El albendazol ejerce su efecto antihelmíntico, en forma similar al mebendazol, inhibiendo la polimerización de la tubulina, produce la desaparición selectiva de los microtúbulos citoplasmáticos de las células tegumentarias e intestinales de los parásitos así como la alteración de las sustancias secretorias acumuladas en el aparato de Golgi, la secreción de acetilcolinesterasa y el consumo de glucosa y el agotamiento de las reservas de glucógeno, baja los niveles energéticos hasta que éstos llegan a ser insuficientes para la sobrevivencia de los parásitos (Ramalingam y cols., 1983).

Después de la administración oral del albendazol, éste se absorbe en forma rápida, alcanzando aproximadamente entre las dos y cuatro horas concentraciones plásmaticas máximas, sin embargo sólo el 5% de la dosis administrada se absorbe a nivel gastrointestinal.

El albendazol tiene un extenso metabolismo de primer paso, por lo que es difícil detectarlo en plasma u orina, como tal. Sus principales metabolitos son el sulfóxido de albendazol, que presenta una gran actividad antihelmíntica y una vida media en plasma de aproximadamente 8.5 horas; se encuentran también la sulfona de albendazol, el 2-amino-5-propilsulfonil-1H-benzimidazol y el 2-amino-5-propilsulfonil-1H-benzimidazol.

El sulfóxido de albendazol alcanza su máxima concentración entre las 2 y las 4 horas en el humano (Penicaut y cols., 1981; Marriner y cols., 1986), se liga a proteínas plasmáticas en forma variable, aunque se ha observado que lo hace en un 70%. Existe una gran variabilidad en los niveles plasmáticos máximos alcanzados en individuos tratados, al igual que las áreas bajo la curva, se ha considerado al sulfóxido de albendazol como el responsable en realidad de la acción del albendazol; debido principalmente a que el albendazol no se encuentra como tal en el plasma (McCracken y Lipkowitz, 1990).

Aunque existen muy pocos estudios acerca de la farmacocinética del albendazol, en estos se reporta, que los tiempos de vida media plasmática, fueron entre 14 a 20 horas; y los tiempos medio de absorción aproximadamente entre 10 a 15 horas (Jung y cols., 1992).

Fourestié y cols. (1988) demostraron que el albendazol es más eficaz en el tratamiento de la triquinelosis, que el tiabendazol-flubendazol, presentándose con estos últimos, efectos adversos a nivel digestivo, síntomas y signos atribuibles a la toxicidad propia del fármaco.

Recientemente, Andrews y cols. (1994) describieron un caso de triquinelosis diferente a los casos clásicos, descubriendo larvas móviles no encapsuladas, identificadas como larvas de *T. pseudospiralis*, el paciente fue tratado exitosamente con albendazol acompañado de prednisona, para evitar la posibilidad de anafilaxis por la muerte de los parásitos, recuperándose a las 3 semanas de iniciado el tratamiento.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El albendazol es un fármaco antihelmíntico de amplio espectro, útil en el tratamiento de parasitosis a nivel gastrointestinal y tisulares. Del grupo de los bencimidazoles, el albendazol, es el que más se absorbe, alcanzando concentraciones plasmáticas (sulfóxido de albendazol) de 15 a 40 veces más alta que el mebendazol, sin embargo al igual que los demás bencimidazoles, su solubilidad es baja, ocasionando que sea escasamente absorbido en la luz intestinal.

Lo anterior es un problema en el planteamiento de una terapia adecuada para el tratamiento de las parasitosis con el albendazol, además sus parámetros farmacocinéticos tan variables entre individuos ha ocasionado, el que no se tenga una dosis óptima, ni se establezca la duración del tratamiento.

Para tratar de optimizar las propiedades fisicoquímicas de principios activos, los cuales hacen difícil su aplicación en la terapéutica, debido a su baja solubilidad y por lo tanto baja absorción intestinal; se han diseñado profármacos de estos activos que permiten implementar terapias adecuadas para su aplicación. Los profármacos son moléculas muy similares a los principios activos, a las cuales les falta; ya sea un paso en su reacción hacia el activo (bioprecursor), o contienen alguna porción estructural adicional (derivado bioreversible), las cuales al entrar en contacto con el organismo, en un sitio específico, mediante una transformación tienden a dar el activo diseñado. Algunos profármacos utilizan la maquinaria biológica del organismo para dar lugar al fármaco, por ejemplo, utilizan las reacciones que ocurren en la flora intestinal, como oxidaciones, reducciones, etc.

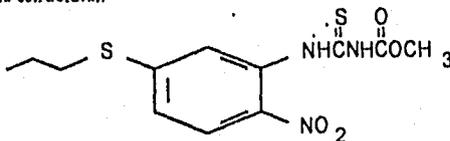
En el caso del albendazol, el grupo de investigación del Dr. Castillo en la Facultad de Química de la UNAM (Martínez y cols., 1994) ha diseñado dos profármacos de éste:

El primero de estos profármacos, se denominó M3:

Nombre químico:

N-Metoxicarbonil-N'-[(2-nitro-5-propiltio)fenil] tiourea

Formula estructural:



Solubilidad:

Soluble en etanol, metanol, dimetilformamida y DMSO(dimetilsulfóxido).

Peso molecular:

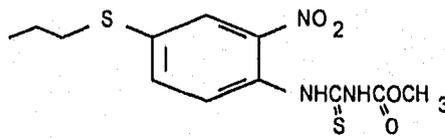
329.39 g/mol

El segundo de estos profármacos se denominó G2:

Nombre químico:

N-Metoxicarbonil N'-[(2-nitro-4-propiltio)fenil]tiourea

Formula estructural:



Solubilidad:

Soluble en etanol, metanol y dimetilformamida y DMSO(dimetilsulfóxido).

Peso molecular:

329.39 g/mol

Estos profármacos, presentan mejores características de solubilidad en disolventes polares en comparación con el albendazol (40 mg de cualquiera de los profármacos se disuelve en 2 ml de etanol caliente, mientras que el albendazol forma una suspensión). Considerando el diseño de las moléculas; G2 debe reducir más fácilmente su grupo nitro y por lo tanto la generación de albendazol debe ser mejor, esto es debido a la posición para, que presenta el grupo nitro con respecto al grupo propiltio en

el anillo del benceno; en contraste, en el profármaco M3 el grupo nitro está en posición meta, lo cual dificulta la producción de albendazol mediante una reacción de reducción del grupo nitro y ciclización de la molécula (ver fig 1). En base a lo anterior se espera una mejor producción de albendazol a partir de G2, así como una mayor capacidad de ser absorbido a nivel gastrointestinal. Por las características de solubilidad, de este tipo de profármacos se podrá realizar una terapéutica más adecuada para el tratamiento de la triquinelosis, sin tanta variabilidad en los parámetros farmacocinéticos.

Asimismo, la formación lenta del albendazol a partir de M3 y G2 por parte de la flora intestinal y posterior ciclización molecular, permitirá que el albendazol pueda tener una mejor absorción y por lo tanto mejor biodisponibilidad.

La actividad antihelmíntica de M3 y G2, así como su biotransformación a albendazol no ha sido demostrada, por lo que resultó de interés evaluar su efecto sobre el nemátodo *T. spiralis*, ya que además de representar la triquinelosis un problema de salud pública en México, ya que ocupa el 5º lugar de importancia en cuanto a las enfermedades transmisibles por alimentos reportadas al Instituto Nacional de Referencias Epidemiológicas (INDRE), provee de un buen modelo para el estudio de infecciones helmínticas, en general. El ciclo de vida de *T. spiralis* se completa en un tiempo relativamente corto, observándose diferentes estadios del parásito en un solo huésped: el adulto a nivel intestinal, la larva recién nacida circula en la sangre y la larva muscular que permanece en tejido muscular, las cuales pueden ser obtenidas fácilmente pudiéndose determinar el efecto de diferentes fármacos sobre el parásito.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la biotransformación de los profármacos M3 y G2 a albendazol y su efecto biológico sobre *Trichinella spiralis* en ratones infectados experimentalmente con el parásito.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar por Cromatografía Líquida de Alta Resolución albendazol y/o sulfóxido de albendazol en el plasma de ratas tratadas con los profármacos M3 y G2 después de la biotransformación de éstos.
2. Evaluar "in vivo" el efecto biológico de M3, G2 y albendazol sobre el organismo preadulto de *Trichinella spiralis* en ratones BALB/c infectados con el parásito.
3. Evaluar "in vivo" el efecto biológico de M3, G2 y del albendazol sobre los adultos de *Trichinella spiralis* en ratones BALB/c infectados con el parásito.
4. Evaluar "in vivo" el efecto biológico de M3, G2 y albendazol sobre la fertilidad de las hembras de *Trichinella spiralis* en ratones BALB/c infectados con el parásito.
5. Evaluar "in vivo" el efecto biológico de M3, G2 y albendazol sobre las larvas musculares de *Trichinella spiralis* en ratones BALB/c infectados con el parásito.
6. Evaluar "in vivo" el efecto biológico de M3, G2 y albendazol sobre la infectividad de las larvas musculares de *Trichinella spiralis* en ratones BALB/c infectados con el parásito.

5. HIPOTESIS

Las mejores características de solubilidad de los profármacos M3 y G2, así como su bio-reducción y ciclización en forma lenta a albendazol, permitirá una mayor biodisponibilidad en comparación con la administración directa del albendazol, y por lo tanto una reducción más efectiva de la carga parasitaria de los diferentes estadios de *Trichinella spiralis* en animales infectados experimentalmente.

6. MATERIAL

6.1. MATERIAL Y EQUIPO

- Equipo de disección
- Picadora de carne Moulinex
- Centrifuga clínica Sorvall RT 6000D (Ohio, USA)
- Aparato modificado de Bearman
- Tubos Falcon de 15 ml (Costar)
- Micropipetas (Gilson) de 20, 200 y 1000 µl
- Centrifuga de tubos eppendorf 5415C Brinkmann Instruments
- Microscopio biocular Nikon 119
- Canulas y jeringas
- Incubadora Water Jacketed, IR Autoflow Automatic CO₂ Incubator NU 2500E Nuair (Alemania)
- Agitador Gerhardt R05 (Gerhardt Bonn, Alemania)

6.2. REACTIVOS

- HCl fumante 37% (Merck, Alemania)
- Pepsina (Sigma de México)
- Alcohol Etilico absoluto (Merck, Alemania)
- Agar (Welcoll)
- Cloroformo (Sigma de México)
- Tween 80 (Sigma)
- Heparina 1000 (INHEPAR)
- Albendazol (Emelak, Farmacéuticos Lakeside)

6.3. MATERIAL BIOLÓGICO

Animales:

Ratones de la cepa BALB/c, de 7 a 9 semanas de nacidos se utilizaron para mantener el ciclo de vida del parásito, así como en todos los experimentos de evaluación del efecto biológico de M3, G2 y albendazol.

Ratas de la cepa Sprague Dowley, de dos meses de edad se utilizaron para determinar la biotransformación de los profármacos, a albendazol.

7. METODOLOGIA

7.1. EVALUACION DE LA BIOTRANSFORMACION

Se utilizaron 36 ratas de la cepa Sprague Dowley de 2 meses de edad y un peso aproximado de 300 g. Estos animales se dividieron en 3 grupos de 12 animales cada uno.

Al primer grupo de 12 animales se le aplicó una suspensión comercial de albendazol a una dosis de 10 mg /kg de peso. A los dos grupos restantes se les aplicó una solución de los profármacos M3 y G2 a la misma dosis, respectivamente.

Se tomaron de cada grupo muestras de 2 ml de sangre, mediante degollamiento del animal, a las 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas, sacrificando a dos animales en cada tiempo utilizando heparina (200 µl) como anticoagulante. El plasma obtenido de estas muestras se conservó a -20°C. El análisis para albendazol y sulfóxido de albendazol se realizó en la Facultad de Química de la UNAM, siguiendo la metodología de Cromatografía Líquida de Alta Resolución descrita por Hurtado y cols. (1989). Como controles negativos se incluyeron muestras de plasma obtenidas de ratas no tratadas con los fármacos.

7.2. OBTENCION DE LAS LARVAS MUSCULARES DE *Trichinella spiralis* Y MANTENIMIENTO DEL CICLO DE VIDA

Ratones de la cepa BALB/c infectados con 800 larvas musculares de *T. spiralis* por vía intragástrica, se sacrificaron a los 28 días post-infección (p.i.) empleando cloroformo; se les quitó la piel, se cortaron la cabeza y las extremidades, se extrajeron las vísceras, cuidando de no romper el diafragma, que es uno de los sitios de predilección del parásito.

Las larvas musculares se obtuvieron de acuerdo a la siguiente metodología descrita por Dennis y cols. (1970):

El tejido óseo y el tejido muscular se trituraron en una picadora Moulinex. El material así obtenido, se dejó incubando, en una solución de pepsina-HCl al 1% por 3 hr a 37°C en agitación constante a 150 rpm, en un agitador Gerhardt RO5. El material digerido se pasó a través de un tamiz,

depositándolo en el aparato modificado de Bearman y se dejó que las larvas musculares se sedimentaran por 20 minutos. Posteriormente las larvas se recuperaron del fondo del tubo y se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos salino pH 7.2 (PBS), centrifugando a 2500 rpm por 2 min, utilizando una centrifuga clinica.

Con la finalidad de determinar el número de larvas obtenidas, estas se resuspendieron en agar al 0.2%, se tomaron 5 alicuotas de 10 µl y se contaron en forma directa, mediante un microscopio óptico las larvas contenidas en la alicuota, hasta que la diferencia entre los conteos fuera de máximo 5 larvas musculares y se calculó el promedio con respecto al control.

Con las larvas así obtenidas se mantuvo el ciclo de vida de *T. spiralis* en ratones BALB/c, los cuales se infectaron con 800 larvas musculares, resuspendidas en agar al 0.2% por vía intragástrica.

7.3. OBTENCION DE LOS ADULTOS DE *Trichinella spiralis*

Para obtener a los adultos de *T. spiralis* se siguió la metodología descrita por Dennis y cols. (1970): Ratones infectados con 800 larvas musculares de *T. spiralis*, se sacrificaron a los 6 días p.i. empleando cloroformo. Se extrajo el intestino delgado, el cual se abrió longitudinalmente y se cortó en segmentos de aproximadamente 2 cm de largo. Los segmentos se colocaron en el aparato de Bearman, conteniendo PBS y una capa de doble gasa.

El aparato de Bearman se dejó incubando a 37°C por 4 hr. Los adultos se recuperaron del fondo del tubo y se lavaron tres veces con PBS. Se determinó el número de adultos obtenidos, resuspendidos en agar al 0.2%. Se tomaron 5 alicuotas de 10 µl y se contaron los adultos contenidos en la alicuota, hasta que la diferencia entre los conteos fuera de máximo 5 adultos y se calculó el promedio.

7.4. EFECTO DE LOS PROFARMACOS G2, M3 Y DEL ALBENDAZOL SOBRE LOS ORGANISMOS PREADULTOS DE *Trichinella spiralis*

Se infectaron 144 ratones BALB/c con 740 larvas musculares de *T. spiralis*, los cuales se dividieron en 4 grupos de 36 animales cada uno. Al primer grupo se le aplicó la solución para disolver los profármacos, Etanol-Tween-Agua (50-25-25). A los grupos 2, 3 y 4 se les aplicó una solución comercial de albendazol, G2 y M3 a una dosis de 25 mg/kg de peso respectivamente.

Cada grupo se subdividió en 6 subgrupos de 6 animales cada uno, aplicándose los fármacos a las 2, 8, 16, 24, 36 y 48 hr p.i. a cada grupo. Los animales se sacrificaron al sexto día p.i. empleando cloroformo y los adultos se obtuvieron como se describió anteriormente.

7.5. EFECTO DE LOS PROFARMACOS G2, M3 Y DEL ALBENDAZOL SOBRE LOS ORGANISMOS ADULTOS Y FERTILIDAD DE LA HEMBRA DE *Trichinella spiralis*

Se infectaron 100 ratones de la cepa BALB/c con 800 larvas de *T. spiralis* y se separaron en 10 grupos de 10 ratones cada uno. Al día 3 p.i. los grupos fueron tratados de la siguiente manera: al primer grupo se le aplicó la solución para disolver el profármaco (grupo control), a los grupos 2, 3 y 4 se les aplicó una suspensión comercial de albendazol, a dosis de 5, 25 y 50 mg/kg de peso respectivamente. A los grupos 5, 6 y 7 se les aplicó la solución del profármaco G2 a dosis de 5, 25 y 50 mg/kg de peso respectivamente. El profármaco M3 se aplicó a los grupos 8, 9 y 10 a una dosis de 5, 25 y 50 mg/kg de peso respectivamente. Los fármacos se aplicaron en dosis única, por vía intragástrica. Los animales se sacrificaron al sexto día p.i. empleando cloroformo y los adultos se obtuvieron como se describió anteriormente. Para analizar el efecto de los profármacos M3, G2 y del albendazol sobre la fertilidad de las hembras de *T. spiralis*, los adultos obtenidos se lavaron dos veces con PBS y una tercera vez con medio RPMI complementado (descrito en el Anexo), se quitó el sobrenadante y los adultos se colocaron en un tubo de cultivo conteniendo medio de RPMI complementado.

Los adultos se incubaron por 18 hr a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% en una incubadora Nuair modelo NU 2500E. Una vez realizada la incubación las larvas recién nacidas se separaron de los adultos por centrifugación diferencial a baja velocidad (2000 rpm durante 30 segundos) en una centrifuga clinica. Las larvas recién nacidas se lavaron con PBS y se contaron. Por otro lado, las hembras contenidas en el tubo, también se contaron para calcular cuantas larvas nacieron por hembra durante el periodo de incubación.

7.6. EFECTO DE LOS PROFARMACOS G2, M3 Y DEL ALBENDAZOL SOBRE LAS LARVAS MUSCULARES DE *Trichinella spiralis*

Se infectaron 84 ratones de la cepa BALB/c con 800 larvas musculares de *T. spiralis*. Los ratones se dividieron en 7 grupos de 12 animales cada uno. Al primer grupo se le aplicó una solución de Etanol-Tween-Agua (50-25-25), utilizada para disolver los profármacos (grupo control). A los grupos 2 y 3 se les aplicó una suspensión comercial de albendazol, a dosis de 25 y 50 mg/kg de peso respectivamente. A los grupos 4 y 5 se les aplicó el profármaco G2, a dosis de 25 y 50 mg/kg de peso respectivamente. A los grupos 6 y 7 se les aplicó una dosis de 25 y 50 mg/kg de peso respectivamente del profármaco M3.

Los profármacos y el albendazol, así como la solución para disolver el profármacos se administraron al día 28 p.i. por 7 días en dosis única, por vía intragástrica. Los animales fueron

sacrificados con cloroformo a los 7 días después del último día de aplicación y las larvas musculares se obtuvieron como se describió previamente (Dennis y cols., 1970).

Para evaluar la capacidad infectiva de las larvas musculares obtenidas de los grupos tratados con **G2**, **M3** y albendazol a una dosis de 25 mg/kg de peso, 800 larvas musculares obtenidas de cada uno de estos grupos se inocularon a ratones de la cepa BALB/c. Los animales se sacrificaron a los 35 días p.i. y las larvas musculares se obtuvieron como se describió anteriormente.

8. RESULTADOS

En este estudio, la biotransformación de G2 y M3 a albendazol y sulfóxido de albendazol se demostró por Cromatografía Líquida de Alta Resolución al analizarse muestras de plasma obtenidas de ratas tratadas con 10 mg/kg de peso de los profármacos (Tabla 1) y obtenerse albendazol y sulfóxido de albendazol siguiendo la metodología descrita por Hurtado y cols. (1989). El límite de cuantificación del método utilizado es de 10 ng/ml y en el caso de detectarse concentraciones menores de albendazol y/o sulfóxido de albendazol se consideran como detectables no siendo posible cuantificar. En el caso de G2 y albendazol desde las dos horas post-aplicación (p.a.) se detectó en plasma albendazol y su metabolito, observándose en la mayoría de las muestras en forma muy semejante entre estos dos fármacos, cuantificándose en ambos principalmente sulfóxido de albendazol. En relación a M3 la detección de sulfóxido de albendazol se realizó hasta las cuatro hr p.a. en una sola de las muestras. Sin embargo, un aspecto interesante consistió en la detección de albendazol a las 6 y 8 hr p.a., alcanzando concentraciones mucho más altas que las detectadas con el albendazol mismo y G2. Asimismo, con M3 fue posible detectar y cuantificar sulfóxido de albendazol a las 10 y 12 hr p.a.

Con respecto a la actividad biológica de estos profármacos sobre el organismo preadulto de *T. spiralis*, se observó que M3 tiene un porcentaje de eficacia, obtenido con respecto al control, mayor al 70% aún hasta las 48 hr post-infección (p.i.). Sin embargo, G2 tuvo una baja eficacia en el tratamiento, variando entre un 7 y 37%, observándose que a partir de las 36 hr p.i. no tiene efecto antihelmíntico. Con el albendazol se observó que éste pierde eficacia conforme transcurre el tiempo de la infección, obteniéndose a las 48 hr p.i. una eficacia del 58% (Tabla 2).

Tabla 1. Determinación de albendazol y sulfóxido de albendazol, en muestras de plasma obtenidas de ratas tratadas con los profármacos M3, G2 y con albendazol a una dosis de 10 mg/kg de peso.

Tiempo (hrs)	Albendazol		M3		G2	
	Sulfóxido de alb (µg/ml)	Albendazol (µg/ml)	Sulfóxido de alb (µg/ml)	Albendazol (µg/ml)	Sulfóxido de alb (µg/ml)	Albendazol (µg/ml)
2	0,593	0,0555	ND	ND	0,1802	D
2	0,245	D	ND	ND	0,1088	D
4	0,3084	D	0,096	ND	0,0927	ND
4	0,1935	D	ND	ND	0,0958	ND
6	0,2875	D	ND	0,15	ND	D
6	0,4081	D	ND	0,7545	0,1633	ND
8	0,2803	D	D	0,0792	ND	D
8	0,1113	D	ND	ND	ND	D
10	0,2696	D	ND	D	ND	D
10	0,1297	D	0,0889	D	ND	D
12	3,4802	0,0988	0,1622	ND	0,02704	D
12	0,5919	D	ND	ND	0,2789	ND

*Se obtuvieron muestras de plasma de dos animales a diferentes tiempos. Como control se incluyeron muestras de plasma de ratas sin tratamiento. ND= No detectable. D= Detectable < 10 µg/ml

Tabla 2. Efecto de los profármacos M3, G2 y del albendazol a dosis única de 25 mg/kg de peso sobre el organismo preadulto de *Trichinella spiralis*

Tiempo p.i. (hr)	Reducción (%)		
	Albendazol	M3	G2
2	77	87	12
8	100	80	15
16	99	89	31
24	91	54	37
36	95	88	1
48	58	71	7

*Ratones de la cepa BALB/c se infectaron con 800 larvas musculares de *T. spiralis* y a diferentes tiempos post-infección (p.i.) se les aplicaron los fármacos. Los animales se sacrificaron al día 6 p.i. Como control se incluyeron ratones tratados sólo con la solución con la que se disolvieron los profármacos. El porcentaje de reducción se calculó con respecto al control.

Al evaluar el efecto sobre el organismo adulto (fase intestinal), se obtuvo que **M3** tiene un efecto el cual está relacionado con la dosis aplicada, es decir al aumentar la dosis aumenta la eficacia del tratamiento. Asimismo, a la dosis de 50 mg/kg de peso la eficacia observada fue mayor a la del albendazol (Tabla 3). Con respecto a **G2**, no se observó un aumento importante en la eficacia al incrementar la dosis de 5 a 25 mg/kg de peso, además al aplicar una dosis de 50 mg/kg de peso no aumentó su eficacia. Con el albendazol se observa una disminución en la eficacia del tratamiento al aumentar la dosis de 5 a 25 mg/kg de peso, pero al aumentar la dosis a 50 mg se observa un aumento en la eficacia, pero este es similar al obtenido con 5 mg/kg de peso. Cabe mencionar que en los cuatro experimentos realizados para determinar la actividad de los profármacos, se observó al igual que con el albendazol variabilidad en cuanto a su eficacia.

Además, es evidente que tanto los profármacos como el albendazol tienen un efecto importante sobre la fertilidad de la hembra, existiendo correlación entre aumento de la dosis aplicada y aumento en la eficacia del tratamiento. Asimismo, se observó que a una dosis de 50 mg/kg de peso la eficacia obtenida es similar entre los profármacos y el albendazol, sin embargo, a dosis menores el albendazol es más eficaz que **G2** y **M3** (Tabla 3). Al igual que con el adulto, se observó una variabilidad de la eficacia de los fármacos sobre la fertilidad entre experimentos, sin embargo ésta fue menor para **M3**.

Al evaluarse el efecto de los profármacos sobre la fase muscular de *T. spiralis*, se observó que **M3** a una dosis de 25 mg/kg de peso, tuvo mejor eficacia que **G2**, pero menor que el albendazol. Por otro lado, al aumentar la dosis de los profármacos se ve una disminución en la eficacia del tratamiento, no siendo así para el albendazol (Tabla 4). Entre experimentos (3) se observó variabilidad en la eficacia del tratamiento.

Tabla 3. Efecto de los profármacos M3, G2 y del albendazol sobre el adulto de *Trichinella spiralis*.

Dosis	Reducción (%)* Adultos			Reducción (%)* Fertilidad		
	Albendazol	M3	G2	Albendazol	M3	G2
5 mg/Kg de peso	59 ± 35	11 ± 11	38 ± 20	67 ± 26	28 ± 29	25 ± 42
25 mg/Kg de peso	15 ± 17	14 ± 27	42 ± 39	87 ± 14	69 ± 18	45 ± 39
50 mg/Kg de peso	50 ± 29	60 ± 33	15 ± 14	82 ± 21	85 ± 12	88 ± 9

Ratones de la cepa BALB/c se infectaron con 800 larvas musculares de *T. spiralis* se aplicaron los fármacos a los 3 días post-infección(p.i.). Los animales se sacrificaron a los 6 días p.i. Como control se utilizaron ratones tratados sólo con la solución utilizada para disolver los profármacos. El porcentaje de reducción se calculó con respecto al control.

*Promedio de reducción obtenido de 4 experimentos.

Tabla 4. Efecto de los profármacos M3, G2 y del albendazol sobre la larva muscular de *Trichinella spiralis*.

Dosis	Reducción (%)*		
	Albendazol	M3	G2
25 mg/kg	54 ± 21	34 ± 4	17 ± 15
50 mg/kg	69 ± 39	1 ± 1	0

Ratones de la cepa BALB/c se infectaron con 800 Larvas musculares (LM) de *T. spiralis*, se aplicaron los fármacos a los 28 días post-infección (p. i.) por 7 días consecutivos. Los animales se sacrificaron a los 7 días post-aplicación. Como control se incluyeron ratones tratados sólo con la solución para disolver los profármacos.

*Promedio de reducción obtenido de 3 experimentos

Con la finalidad de evaluar la capacidad infectiva de las larvas musculares obtenidas de ratones tratados con **G2**, **M3** y albendazol, éstas se inocularon nuevamente en ratones y transcurridos 35 días p.i. se procedió a obtener las larvas musculares de cada grupo. En este ensayo se observó una reducción en la infectividad de la larva muscular, al disminuir el número de larvas musculares recuperadas con respecto al control, del 75% para el albendazol y de 66 y 35% para **G2** y **M3** respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de los profármacos M3, G2 y del albendazol sobre la infectividad de la larva muscular de *Trichinella spiralis*.

Fármaco	Reducción de la infectividad (%)
Albendazol	75
M3	35
G2	66

*Ratones de la cepa BALB/c se infectaron con 800 Larvas musculares (LM) de *T. spiralis* recuperadas de animales tratados con los fármacos a una dosis de 25 mg/kg de peso. Los animales se sacrificaron a los 35 días post-infección y las LM de cada grupo se obtuvieron de acuerdo a lo descrito en la metodología.

9. DISCUSION

El albendazol es un carbamato-bencimidazol, que se ha utilizado como fármaco antihelmíntico de amplio espectro, útil en el tratamiento de parasitosis a nivel gastrointestinal y tisular. Sin embargo, al igual que los demás bencimidazoles, su solubilidad en agua es baja, lo que ocasiona una escasa absorción en la luz intestinal. De los bencimidazoles, el albendazol, es el que más se absorbe, ya que después de la administración oral de 15 mg/kg, se alcanzan en plasma los valores máximos del fármaco entre las 2 hr p.a. y las 6 hr p.a. Las concentraciones máximas varían de 0.453 a 2.967 µg/ml (Jung y cols., 1992; Marriner y cols., 1986). Esta variabilidad en los parámetros farmacocinéticos entre individuos, impide que se tenga una dosis óptima y se establezca la duración del tratamiento.

Dentro de las alternativas para mejorar la biodisponibilidad del albendazol, recientemente se sintetizaron dos bioprecusores del albendazol, los cuales tienen mayor solubilidad y permiten, mediante su reducción por la flora intestinal, que el albendazol se produzca de manera eficiente pero lenta, ayudando así a su mejor absorción a nivel intestinal.

Los profármacos del albendazol se diseñaron de tal forma que en la molécula de **G2** fuera más fácil de reducirse el grupo nitró, debido esto a su posición para con respecto al grupo tio, lo cual favorece electrónicamente la reacción. Por otro lado, en **M3** la posición del grupo nitró está en posición meta, lo cual dificulta la reacción de reducción. Esta reacción de reducción del grupo nitró en las moléculas de **G2** y **M3** es el paso limitante en la producción del albendazol, ya que la ciclización a albendazol, que es el paso siguiente se produce en forma rápida.

Esta hipótesis en el diseño de **G2** y **M3** se confirmó con el análisis de las muestras de plasma por Cromatografía Líquida de Alta Resolución. En éste, con **G2** se detectó en forma general una mayor cantidad de sulfóxido de albendazol y albendazol, en comparación con **M3**. Al comparar la concentración de albendazol y sulfóxido de albendazol alcanzada en plasma de ratas tratadas se observó al igual que con el albendazol, variabilidad en las concentraciones de albendazol y/o su metabolito, como

se observa en la tabla 1. Esto es similar a lo reportado por otros autores, en los que se reporta gran variabilidad en las cantidades de albendazol y sulfóxido de albendazol cuantificadas en plasma de pacientes tratados (Hurtado y cols., 1989; Jung y cols., 1992 y Marriner y cols., 1986).

En relación a la evaluación del efecto de los profármacos contra el preadulto de *T. spiralis*, cuyos resultados se presentan en la tabla 2, se puso de manifiesto que M3 es casi tan eficaz como el albendazol y además mantiene su eficacia en un 70% hasta las 48 hr p.i., a diferencia del albendazol cuya eficacia disminuye hasta un 54%. Con G2 no se observó un efecto importante sobre esta fase de desarrollo de *T. spiralis*. Es evidente que entre mayor tiempo transcurre entre la infección del huésped y el tiempo de inicio de la terapia, menor es la eficacia del tratamiento tanto con el albendazol como con M3. Este resultado concuerda con lo demostrado por McCracken (1978), quien reportó que el albendazol a una dosis de 6.25 mg/kg da una eficacia del 95% a las 2 hr p.i. la cual disminuye al aumentar el tiempo de infección y el parásito madura a su estado adulto, sin embargo, a las 36 hr p.i. el fármaco no tiene efecto. La diferencia encontrada en este trabajo, en cuanto al tiempo post-infección en el cual todavía es efectivo el albendazol puede deberse a la diferencia en la dosis aplicada, ya que en éste se aplicó en una dosis mayor (25 mg/kg de peso). Por otro lado, el efecto observado con M3 hasta las 48 hr p.i. podría indicar que éste se reduce y produce albendazol en forma lenta, lo cual puede aumentar el tiempo de duración del efecto.

El profármaco M3 también fue más efectivo que G2 contra el adulto y la larva muscular de *T. spiralis*. En este aspecto, fue interesante observar que G2 tuvo menor efecto (15 y 0%), tanto contra la fase intestinal como muscular de *T. spiralis* cuando se empleó una dosis de 50 mg/kg de peso (tabla 3 y 4), que cuando se empleó a menor dosis. Esto fue contrario a lo esperado, considerando el diseño de las moléculas, ya que como se mencionó anteriormente G2 es más fácilmente reducido, por lo que la producción de albendazol es más rápida y mejor, y de hecho, esto se pudo comprobar con la determinación plasmática tanto de albendazol como de sulfóxido de albendazol. Una posible explicación a esto, es que, primeramente las moléculas sufran una reacción de oxidación en el grupo azufre, en este

caso la reducción del grupo nitro se verá favorecida en la molécula de **M3** e impedida en la molécula de **G2**, dando como resultado una mejor producción de albendazol a partir de **M3**. A este respecto, existen reportes que indican que en las microvelocidades del intestino ocurren reacciones de oxidación, así como, la evidencia sobre moléculas que inducen su propia oxidación (Fargetton y cols., 1986 y Villaverde y cols., 1995). Es posible que esto último suceda en el caso de los profármacos a nivel intestinal a una dosis de 50 mg/kg de peso, resultando en una mejor eficacia en el tratamiento con **M3**.

En relación a la variabilidad observada entre los diferentes experimentos realizados para evaluar la actividad antihelmíntica del albendazol y de los profármacos, existen reportes acerca de la variabilidad en la farmacocinética del albendazol (Hurtado y cols., 1989; Jung y cols., 1992 y Marriner y cols., 1986), lo cual aparentemente podría explicar la variabilidad en la eficacia del tratamiento obtenida en este trabajo. Asimismo, es importante mencionar que de los profármacos, **G2** se comporta de manera similar al albendazol, sin embargo, **M3** presenta una menor variabilidad. Lo anterior pudiera deberse a que **M3** como se mencionó anteriormente es fácilmente oxidado y en consecuencia reducido en forma lenta a albendazol, permitiendo mayor biodisponibilidad del fármaco, lo cual a su vez explicaría el que **M3** sea más efectivo que **G2**.

Por otro lado, es posible que el propio profármaco **M3** tenga actividad contra *T. spiralis*, sin embargo, dado que en el análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución no se cuantificó en plasma ni a **G2** ni a **M3**, no tenemos evidencia de su presencia en plasma, por lo que sería conveniente en un estudio posterior la inclusión en la determinación de albendazol y sulfóxido de albendazol, también la determinación de **M3** y **G2**.

Asimismo, en este estudio se observó que con **M3** y **G2** empleados a una dosis de 25 mg/kg de peso se obtiene una reducción de la capacidad infectiva de la larva muscular comparada con el control del 35 y 66 % respectivamente (tabla 5). Sin embargo, a esta dosis, con **G2** sólo se obtuvo una reducción del 17% sobre de la carga parasitaria de larvas musculares (tabla 4). Una posible explicación a esto, sería el que las larvas musculares no se mueran, pero que queden dañadas en su organización

interna, con lo cual en una posterior infección, el parásito no infecta al huésped con la misma intensidad que las larvas sin tratamiento.

Finalmente, en este estudio se demostró la conveniencia de utilizar al parásito nemátodo *Trichinella spiralis* en la evaluación del efecto antihelmíntico de los dos profármacos del albendazol, debido a que el ciclo de vida del parásito, permite evaluar esta actividad tanto a nivel intestinal como sistémica, permitiendo probar rápida y efectivamente fármacos que actúen a estos dos niveles, empleando un modelo murino.

10. CONCLUSIONES

1) Los profármacos **M3** y **G2** fueron biotransformados a albendazol y/o sulfóxido de albendazol, aunque no se alcanzan concentraciones en plasma similares a las obtenidas con el albendazol mismo, por lo que los profármacos podrían no tener una mejor biodisponibilidad que el albendazol.

2) La actividad de los profármacos está principalmente dirigida contra el preadulto y la fertilidad de la hembra de *T. spiralis*.

3) **M3** mostró experimentalmente tener mayor actividad antihelmíntica contra *T. spiralis*, en relación a la molécula de **G2**, la cual se diseñó para favorecer su reducción a albendazol.

4) El empleo del parásito nemátodo *T. spiralis* en un modelo murino permitió la evaluación de la actividad antihelmíntica de **G2** y **M3**, tanto a nivel intestinal como sistémico.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

11. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES

A pesar de los avances logrados en los últimos años en medicina veterinaria y humana, con la obtención de nuevos productos y el diseño de nuevas estrategias terapéuticas, sigue existiendo la necesidad de buscar productos más eficaces y seguros en el tratamiento de diferentes enfermedades infecciosas. El diseño y síntesis de profármacos como metodología para la obtención de medicamentos seguros y confiables, es un paso importante para lograrlo.

Los profármacos sintetizados utilizados en este trabajo, no presentaron una mejor eficacia con respecto al albendazol, sin embargo, son un paso importante en el diseño de nuevas moléculas con mejor eficacia. Es importante resaltar que al diseñar estos profármacos, se buscó mejorar las propiedades farmacológicas del albendazol. Para esto, se diseñaron dos moléculas con diferencias en la posición del grupo nitro, considerando a nivel teórico que la molécula llamada G2 tuviera mejores propiedades farmacológicas que la molécula M3; sin embargo, los resultados no concordaron con el diseño originalmente pensado, esto permitirá el rediseñar moléculas pensando en estos resultados obtenidos en un sistema "in vivo".

El diseño de futuros bioprecusores de los bencimidazoles 2-carbamato deberán corresponder a la distribución estructural del M3, siempre y cuando tengan en la posición para al grupo nitro, una entidad química capaz de sufrir oxidación. Además los nuevos bioprecusores deberán presentar mejor solubilidad acuosa. En la actualidad ya se encuentran en proceso de preparación este tipo de bioprecusores, así como de derivados bioreversibles del albendazol. Los resultados obtenidos en este trabajo sentaron las bases para lograr un mejor diseño de profármacos de otros compuestos antiparasitarios del tipo del bencimidazol 2-carbamato.

Además, es necesario contar con modelos experimentales que permitan evaluar la actividad biológica y farmacológica de nuevas moléculas, estos modelos deben ser sencillos, fáciles de realizar en poco tiempo y a bajo costo. En este contexto, el parásito *Trichinella spiralis* representa un buen modelo experimental, para evaluar nuevas moléculas con posible actividad antihelmíntica, no sólo contra *T. spiralis* sino contra parásitos helmintos en general. Este parásito permite evaluar en un modelo murino, de fácil manejo y mantenimiento, a nuevas moléculas y como se demostró en este trabajo de tesis, se pueden evaluar diferentes fases de desarrollo del parásito, en diferentes localidades dentro de un mismo huésped.

12. ANEXO

A continuación se describen los contenidos del PBS 1X y del medio RPMI empleados en la metodología:

- Buffer de fosfatos salino (PBS 1X)

NaCl	8.76 g
Na ₂ HPO ₄	2.20 g
NaH ₂ PO ₄	0.55 g
KCl	0.20 g

Disolver en 600 ml de agua destilada, esterilizada ajustar el pH a 7.3. Aforar a 1 litro, filtrar y esterilizar.

- Medio de cultivo RPMI 1640 GIBCO BRL

a) Medio incompleto.

Se disuelven 10.4 g de polvo en 900 ml de agua bidestilada y desionizada. Se adiciona 6.7 ml o 7.5 g de NaHCO₃ y se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N. Se afora a 1 litro con agua bidestilada y desionizada y se esteriliza por filtración con filtro millipore 0.22 µm.

b) Medio completo

RPMI incompleto	87 ml
L-Glutamina 200 mM	1 ml
Estreptomicina 1500 U/ml	1 ml
Penicilina 2000 u/ml	1 ml
Suero fetal bovino	10 ml

Homogenizar y filtrar con filtro millipore 0.22 µm y dejar en prueba de esterilidad por 1 día.

13. BIBLIOGRAFIA

- Alvarez, Ch. R., Riega, C. R., Garcia, R. J., Cob, S. C. y Wong, C. M. (1992) Triquinosis en el niño. Informe de 8 casos. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 49(5): 286-290.
- Andrews, J. R. H., Ainsworth, R. and Abernethy, D. (1994) *Trichinella pseudospiralis* in humans: description of a case and its treatment. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 88: 200-203.
- Barragán, J. (1893) Breves consideraciones sobre la triquina en México. Tesis de la Facultad Nacional de Medicina, México, D. F.
- Boczon, K., Olba, W. and Olaszek, M. (1984) The influence of some anthelmintics on the bioenergetic metabolism of *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis*. Biochem. Pharmacol. 33(15): 2523-2525.
- Bughio, N. I., Faubert, G. M. and Pichard, R. K. (1994) Interaction of mebendazole with tubulin from body wall muscle, intestine, and reproductive system of *Ascaris suum*. J. Parasitol. 80(1): 126-132.
- Brown, H. D., Matzuk, A. R., Ilves, I. R., Peterson, L. M., Harris, S. A., Sarett, L. H., Igerton, J. R., Yakstis J. J., Campbell, W. C. and Cuckler, A. C. (1961) Antiparasitic drugs. IV. 2-(4'-thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. J. Am. Chem. Soc. 83: 1764-1765.
- Campbell, W. C. (1979) History of Trichinosis: Paget, Owen and the discovery of *Trichinella spiralis*. Bull. Hist. Med. 53: 520-552.
- Croft, S. L. (1994) A rationale for antiparasite drug discovery. Parasitology Today. 10(10): 385-386.
- Chester, B. P. y Clifton J. R. Capítulo 18: Nematodos afasmideos. En: Parasitología clínica 2a. edición, Salvat editores (1986), Barcelona (España): 251-260
- Chirasak, K. (1971) Output of larvae and life span of *Trichinella spiralis* in relation to worm burden and super infection in the mouse. J. Parasitol. 57(2): 289-297.
- Dawson, M. and Watson, T. R. (1983) Mebendazole prodrugs. Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet. 8: 329-337.

Delatour, P., Cure, M. C., Benort, F. and Garnier, F. (1986) Netobimin (Totabin-SCH): Preliminary investigations on metabolism and pharmacology. *J. Vet. Pharmacol.* 9: 230-234.

Dennis, D. T., Despommier, D. D. and Davis, N. (1970) Infectivity of the newborn larve of *Trichinella spiralis* in the rat. *J. Parasitol.* 56(5): 974-977.

Despommier, D. D., Sukhdeo, M. and Meerovitch, E. (1978) *Trichinella spiralis*, site selection by the larva during the enteral phase of infection in mice. *Exp. Parasitol.* 44: 209-215.

Fargetton, X., Gallier, P. and Delatour, P. (1986) Sulfoxidation on albendazole by a cytochrome P450-independent monooxygenase from rat liver microsomes. *Vet. Res. Commun.* 10: 317-324.

Fourestié, V., Bounoux, M. E., Ancelle, T., Liance, M., Roudot-Thoraval, F., Naga, H., Paireon-Pennachioni, M., Rauss, A. and Lejone, J. L. (1988) Randomized trial of albendazole versus tiabendazole plus flubendazole during an outbreak of human trichinellosis. *Parasitol. Res.* 75: 36-41.

Fragoso, V. R. (1981) Un brote de triquinosis en Villanueva, Zacatecas. *Sal. Publ. Mex.* 23: 25-41.

González, P. O., Arancibia, M. E., Rojas, A., González, J. O., Mac-Adoo, C., López, R., Contreras, M. y Schenone, H. (1988) Infección experimental en ratas AxC con dosis crecientes de inóculo de larvas de *Trichinella spiralis* y distribución de las larvas resultantes en diferentes grupos musculares. *Bol. Chile. Parasitol.* 43: 74-75.

Hernández, M., Ramos, M. E., Casco, S. E. J., Morales, G. J. y Perez, M. E. (1992) Triquinosis aguda. Epidemia de 166 casos en Ciudad Delicias, Chih. Diagnostico por compresión tisular y tinción. *Gac. Med. Mex.* 128: 45-50.

Hurtado, M., Medina, M. T., Sotelo, J. and Jung, H. (1989) Sensitive high performance liquid chromatographic assay for albendazol and its main metabolite albendazol sulphoxide in plasma and cerebrospinal fluid. *J. Chromatogr.* 494: 403-407.

Jung, H., Hurtado, M., Sánchez, M., Medina, M. T. and Sotelo, J. (1992) Clinical pharmacokinetics of albendazol in patients with brain cysticercosis. *J. Clin. Pharmacol.* 32: 28-31.

Katiyar, S. K., Gordon, V. R., McLaughlin, G. L. and Edlind, T. D. (1994) Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with β -tubulin sequence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38(9): 2086-2090

Kean, B. H. and Hoskins, D. W. (1964) Treatment of trichinosis with thiabendazole. A preliminary report. *J. A. M. A.* 190: 852-853.

Kennedy, M. W. (1979) Effects of the host immune response on longevity, fecundity and position in the intestine of *Trichinella spiralis* in mice. *Parasitol.* 80: 49-60.

Keystone, J. S. and Murdoch, J. K. (1979) Mebendazole. *Ann. Inter. Med.* 91: 582-586.

Kosek, J. W. (1971) The molting pattern in *Trichinella spiralis*. I. A light microscope study. *J. Parasitol.* 57: 1015-1028.

Kosek, J. W. (1971) The molting pattern in *Trichinella spiralis*. II. An electron microscope study. *J. Parasitol.* 57: 1029-1038.

Leiby, D. A., Duffy, Ch. H., Darwin, M. K. and Schad, G. A. (1990) *Trichinella spiralis* in an agricultural ecosystem: Transmission in the rat population. *J. Parasitol.* 76(3): 360-364.

Levin, M. L. (1983) Treatment of trichinosis with mebendazole. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32(5): 980-983.

Marriner, S. E., Morris, D. L., Dickson, B. and Bogan, J. A. (1986) Pharmacokinetics of albendazole in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 30: 705-708.

Martin, A. Capitulo 19: Drug product design. En: *Physical pharmacy* 4a edición, Editorial Lea & Febiger, (1993) Philadelphia (USA): 512-529.

Martínez, V. J. G., Hernández, L. F. y Castillo, R. (1994) Síntesis de dos bioprecusores potenciales del albendazol. *Rev. Mex. Ciencias Farm.* 25(4): 86

Martínez-Marañón, R. (1979 a) Un pequeño brote familiar de triquinosis en Naucalpan, Méx. *Sal. publ. Mex.* 21: 161-165.

Martínez-Marañón, R. (1979 b) Triquinosis en Zacatecas, Zac. *Prensa Med. Mex.* 44: 278-287.

Martínez-Marañón, R. (1983) Cuatro nuevos casos de triquinosis aguda en Naucalpan. Consideraciones sobre la frecuencia real de la enfermedad en México. *Sal. Publ. Mex.* 25: 574-578.

Martínez-Marañón, R. (1985) ¿Está aumentando la triquinosis en México? ¿Podría esto ser una consecuencia inesperada de nuestro "desarrollo"? *Sal. Publ. Mex.* 27: 40-51.

Martínez, P. O., Viguera, R. A., Carvajal, G. A., Flores, P. A. y Abraham, J. A. (1986) Triquinosis. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 43(3): 181-183.

Mazzotti, L. (1944) Examen de 400 diafragmas humanos en la Ciudad de México para investigar triquinosis. *Rev. Inst. Salub. Enf. Trop.* 5(2): 157-161.

Mazzotti, L. (1953) Triquinosis en México. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 418-420.

Mazzotti, L. y Chavira, C. (1943) Investigación de triquina en 600 diafragmas humanos de la Ciudad de México. *Rev. Inst. Salub. Enf. Trop.* 4(4): 343-351.

Mazzotti, L. y Lozano, H. E. (1944) La prueba intracutánea de Bachman para el diagnóstico de la triquinosis en 1000 personas sanas de la Ciudad de México. *Rev. Inst. Salub. Enf. Trop.* 5: 31-35.

Mazzotti, L. y Pastrana, A. (1943) La investigación de triquinosis en tejidos musculares por el método de digestión. *Rev. Inst. Salub. Enf. Trop.* 4(4): 337-342.

McCracken, R. O. (1978) Efficacy of mebendazole and albendazole against *Trichinella spiralis* in mice. *J. Parasitol.* 64(2): 214-219.

McCracken, R. O. and Lipkowitz, K. B. (1990) Structure-activity relationships of benzothiazole and benzimidazole anthelmintics: A molecular modeling approach to in vivo drug efficacy. *J. Parasitol.* 76(6): 853-864.

Murell, K. D. (1985) Strategies for the control of human trichinosis transmitted by pork. *Food Tech.* 39(3): 65-8, 110-1.

Penicaut, B., Beeck, C., Maugein, Ph., Parish, R., Randolph, W., Di Cuollo, C. J. y Rossignol, J. F. (1981) Albendazol. Perfil farmacocinético. *Compendium Inv. Clin. Latino.* 1(suplemento 1): 61-66.

Ramalingam, S., Sinniah, B. and Krishnan, U. (1983) Albendazole, an effective single dose, broad spectrum anthelmintic drug. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32(5):984-989.

Ramisz, A. and Balicka, A. (1994) Remarks on horse trichinellosis in Poland. Wiad. Parazytol. 40(4): 381-384.

Rojas, O. S., Reyes, G. E. y Ponce de León, R. S. (1989) Triquinosis esporádica. Sal. Publ. Mex. 31: 658-663.

Saimont, A. G., Meulemans, A., Cremieux, A. C., Giovanangeli, M. D., Hay, J. M., Delaitre, B. and Coulaud, J. P. (1983) Albendazole as a potential treatment for human hydatidosis. Lancet. ii: 652-656.

Schenone, H. (1984) El problema de la triquinosis humana y animal en América Latina. Bol. Chile. Parasitol. 39: 47-53.

Silverman, R. B. Capítulo 8: Prodrugs and drug delivery systems. En: The organic chemistry of drug design and drug action, Academic Press, (1992) Philadelphia (USA): 352-407.

Stewart, G. L. and Charniga, L. M. (1980) Distribution of *Trichinella spiralis* in muscles of the mouse. J. Parasitol. 66(4): 688-689.

Valenzuela, R. M. (1981) Epidemiología de la triquinosis. En: Chan, R. M. Ciencia Veterinaria. UNAM.

Villaverde, C., Alvarez, A. I., Redondo, P., Voces, J., Del Estal, J. L. and Prieto, J. G. (1995) Small intestinal sulphoxidation of Albendazol. Xenobiotica. 25(5): 433-441.

Walchschofer, N., Delabre-Defayolle, I., Paris, J., and Francoisce, P. A. (1990) In vivo morphological damage induced by a new benzimidazole prodrug in *Echinococcus multilocularis* metacystodes. J. Pharma. Sci. 79(7): 606-608.

Watts, S. D. M., Rapson, E. B., Atkins, A. M. and Lee, D. L. (1982) Inhibition of acetylcholinesterase secretion from *Nippostrongylus brasillensis* by benzimidazole anthelmintics. Biochem. Pharmacol. 31(19): 3035-3040.

Webster, L. T. Fármacos usados en la quimioterapia de las helmintiasis. En: Gilman, A. G., Goodman, A. S. (1991) Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8ª ed. Editorial Médica Panamericana; México, D. F. pp. 934-953.

Witassek, F., Burkhardt, B., Eckert, J. and Bircher, J. (1981) Chemotherapy of alveolar echinococcosis comparison of plasma mebendazole concentrations in animals and man. Eur. J. Clin. Pharmacol. 20: 427-433.

Wright, K. A. (1979) *Trichinella spiralis*: An intracellular parasite in the intestinal phase. J. Parasitol. 65(3): 441-445.

Yépez-Mulía, L. y Ortega-Pierres, G. (1994) Aspectos actuales sobre el diagnóstico de la triquinosis. Rev. Lat.-Amer. Microbiol. 36(2): 127-138.

Zamora, C. A., De la O-Cavazos, M. E., Bernar, R. R. M., Berrones, E. D. y Vázquez, A. C. (1992) Triquinosis aguda en niños. Brote epidémico intrafamiliar en la Ciudad de México. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 47(6): 395-400.

Zimmerman, W. J. (1958) Studies on fecal transmission of *Trichinella spiralis*. J. Parasitol. 44 (sec. 2): 34.