



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores
Iztacala

EVALUACIÓN “*IN VIVO*” DE LA ACTIVIDAD
BIOLÓGICA DEL 5-(2, 3- diclorofenoxi)-1-metil-2-
(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol EN COMPLEJO
CON LA 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina,
CONTRA
Trichinella spiralis

TESIS

Para obtener el título de

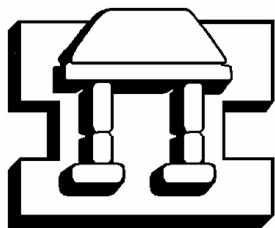
BIÓLOGA

Presenta

GABRIELA ANTONIO ANDRÉS

Asesor de Tesis

DRA. LILIÁN YÉPEZ MULIA



Tlalnepantla, MÉXICO

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU



El mundo está en las manos de aquellos que tienen el coraje de soñar y correr el riesgo de vivir sus sueños

Paulo Coelho

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Parasitología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, financiado por CONACYT Clave. V43462M, bajo la dirección de la Dra. Lilián Yépez Mulia.

Dedicatorias

Al ser que esta más allá de lo tangible, que me permitió dislumbrar un camino en medio de la oscuridad.

A mis padres

No cambiaría lo que son, ni lo que me han dado, pues su ejemplo de vida y amor son lo mejor que me pudo haber tocado.

A mis hermanos

La vida nos hizo estar juntos y lo agradezco, por cada uno es un ejemplo de valor y coraje, que merece mi admiración y respeto.

A mis tíos

A pesar de nuestras grandes diferencias, han sido un valioso ejemplo de vida, que la muerte ha dejado la esencia de lo que son: una furia de ímpetu.

A mis amigos

Solo ustedes saben que tan duro ha sido llegar hasta este momento y cuanto me ha costado, pero su compañía y su apoyo me dieron la fuerza necesaria.

A los que ahora ya no están conmigo, que por diferentes circunstancias de la vida nos hemos separado pero que han dejado huella y un gran ejemplo de fuerza y perseverancia.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme hecho parte de su fila estudiantil y apoyar mi proyecto de vida en el cobijo sus aulas.

A la Dra. Lilián Yépez Mulia, por abrirme las puertas del laboratorio de parasitología, por todo su apoyo y paciencia, pues sin su guía esto no hubiera sido posible.

Al técnico José de Jesús Azucena Arredondo, por ayudarme en el trabajo experimental, sin su apoyo no hubiera sido lo mismo, además de los ratos tan amenos que me hicieron más fácil el trabajo y mi permanencia en el laboratorio.

Al personal del laboratorio de parasitología: Rosita, Amparito, Joel, Luz María, Leti, Narci, Gabriel, Erika, Don Alfonso, Paquito, Linda, y todas aquellas personas del hospital de Peditría, por su ayuda en mis momentos de angustia y necesidad, pero sobre todo de su grata compañía, pues hicieron mi estancia más amena y agradable.

Al personal del Bióterio del Centro Médico Siglo XXI, por su apoyo brindado en la realización de este trabajo

Al Dr. Francisco Hernández Luis y colaboradores del departamento de farmacia de la Facultad de Química de la UNAM, por el material proporcionado y por su asesoría, mil gracias, éste también es el resultado de su trabajo.

A los miembros del jurado designado para la revisión del manuscrito de tesis, por su tiempo y sus valiosos comentarios.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico financiado.

INDICE

| | |
|-----------------------------------|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA | 3 |
| Triquinosis | 3 |
| Epidemiología | 3 |
| <i>Trichinella spiralis</i> | 6 |
| Morfología | 7 |
| Ciclo de vida | 8 |
| Fase enteral | 8 |
| Fase parenteral | 10 |
| Fase muscular | 10 |
| Sintomatología | 11 |
| Fase intestinal | 11 |
| Fase de invasión muscular | 12 |
| Fase Crónica | 12 |
| Diagnóstico | 13 |
| Tratamiento | 13 |
| Ciclodextrinas | 16 |
| Nuevos derivados bencimidazólicos | 22 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 25 |
| OBJETIVOS | 27 |
| Objetivo general | 27 |

| | |
|--|----|
| Objetivos particulares | 27 |
| HIPÓTESIS | 27 |
| DESARROLLO EXPERIMENTAL | 28 |
| Obtención de las larvas musculares de <i>Trichinella spiralis</i> y mantenimiento del ciclo de vida. | 29 |
| Obtención de adultos de <i>Trichinella spiralis</i> . | 30 |
| Evaluación de la actividad de GNV14 sólo, en complejo y/o mezcla física con la hidroxipropil- β -ciclodextrina contra el adulto de <i>Trichinella spiralis</i> | 30 |
| Evaluación de la actividad de GNV14 sólo, en complejo y/o mezcla física con la hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre LM de <i>Trichinella spiralis</i> | 31 |
| Evaluación de la infectividad de LM obtenidas de animales tratados | 32 |
| Análisis estadístico | 32 |
| RESULTADOS | 33 |
| DISCUSIÓN | 40 |
| CONCLUSIONES | 44 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|--|
| ABZ | Albendazol |
| ABZSO | Albendazol Sulfóxido |
| GNV14 | 5-(2, 3- diclorofenoxi)-1-metil-2-(trifluorometil) -1 <i>H</i> bencimidazol |
| GNV14/HP β CD) | GNV14 en complejo con la hidroxipropil- β -ciclodextrina |
| GNV14+HP β CD | Mezcla física de GNV14 con la hidroxipropil- β - ciclodextrina |
| HP β CD | Hidroxipropil- β -ciclodextrina |
| i g | Intra gástrica |
| LM | Larva muscular |
| LRN | Larvas recién nacidas |
| MBZ | Mebendazol |
| PBS | Buffer de fosfatos salino |
| p i | Post infección |

INTRODUCCIÓN

Las asociaciones biológicas entre los seres vivos se iniciaron con la aparición de la vida sobre el planeta Tierra, al competir los organismos por el espacio y ponerse en contacto íntimo. En la actualidad se sabe que hay más clases de organismos parásitos que no parásitos, ya que esta asociación es una de las más exitosas, siendo el hombre el huésped de cientos de éstos (Tay y cols., 1996).

Los parásitos intestinales son los agentes infecciosos más comunes en los humanos, sobre todo en países en vías de desarrollo. Debido a condiciones sociodemográficas y socioeconómicas, las infecciones por parásitos transmitidos por el suelo y la vía fecal-oral, son en su mayoría multiparasitosis, las que se ven agravadas por la coexistencia de desnutrición o deficiencias en micronutrientes (Lamothe y García, 1988).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que para el año 2000, alrededor de 3,500 millones de habitantes alrededor del mundo estarían parasitados y aproximadamente 450 millones padecerían de alguna enfermedad parasitaria. De ellos, la proporción mayor corresponde a la población infantil y 65,000 muertes anuales pueden ser atribuidas a infecciones por nematodos (Ximénez y cols., 2002).

Las parasitosis intestinales causadas por protozoarios y nematodos transmitidos por el suelo continúan estando en México dentro de las primeras 20 causas de enfermedad. La amibiasis, ascariasis, giardiasis y oxiuriasis son las enfermedades más frecuentes debidas a parásitos intestinales. En el caso de la amibiasis, en sus diferentes formas clínicas en el 2000, la tasa fué mayor a, 1,500 /100,000 habitantes, lo que representa un problema de salud pública, al igual que la ascariasis que presenta una tasa de 1000 casos/100, 000 habitantes, mientras que la infección por

oxiuros afectó principalmente a infantes con una tasa de 300 casos/100, 000 habitantes (Ximénez y cols., 2002).

La ausencia de vacunas para cualquier parásito hace que la prevención y tratamiento para todas y cada una de las enfermedades parasitarias esté basada en medidas ecológicas como el saneamiento ambiental o el control vectorial según sea el ciclo biológico, y en la utilización de fármacos antiparasitarios, aunque la mayoría de los fármacos que son utilizados en el tratamiento de las parasitosis se obtienen de moléculas genéricas más que del conocimiento de la bioquímica del parásito (Aparicio y cols., 2003).

Uno de los fármacos más utilizados para tratar helmintiosis es el Albendazol, el cual ha demostrado tener un amplio espectro de acción contra diferentes organismos parásitos, pero su limitada absorción y baja biodisponibilidad contra organismos tisulares (debido a múltiples factores, tanto físicos y químicos) ha limitado la acción de este fármaco. Como una alternativa, se ha administrado el Albendazol en conjunto con varios transportadores moleculares, entre los que se encuentran las ciclodextrinas, capaces de aumentar la absorción del Albendazol y así aumentar su concentración sistémica (García-Rodríguez y cols., 2001; Rigter y cols., 2004).

Sin embargo, una limitante al uso del Albendazol, es la presencia de nematodos parásitos resistentes a este fármaco. Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de contar con nuevos fármacos antiparasitarios.

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

Triquinosis

La triquinelosis o triquinosis es una infección parasitaria causada por el nematodo del género *Trichinella*, que se transmite por canibalismo entre animales domésticos y en algunas regiones del mundo entre animales salvajes. La principal fuente de infección para el hombre es la carne de cerdo, de caballo y de animales silvestres. Es importante mencionar la dificultad y baja incidencia de detección de la enfermedad, el ineficiente control sanitario en canal del cerdo contaminado y la práctica frecuente de matanza clandestina de animales de traspatio, con deficientes condiciones higiénicas que favorecen la permanencia de la Triquinosis (Alcantara y Correa, 1993).

La exposición de los cerdos domésticos a *T. spiralis* está limitada a pocos factores de riesgo, los cuales incluyen: la alimentación con desperdicios contaminados con el parásito, exposición y consumo de tejido muscular de roedores vivos o muertos o de algún animal de vida silvestre infectado.

Epidemiología

La triquinosis es una parasitosis cosmopolita y en algunas regiones del mundo la infección humana por *T. spiralis* es considerada un problema de salud pública (Fig 1). En países del sur del continente Americano como Argentina, Chile y Uruguay, en las Islas Bahamas y en México, la triquinosis es endémica y evoluciona con brotes epidémicos esporádicos. En México, estudios sistemáticos en necropsias han demostrado la existencia del parásito entre el 4 y el 15% de los casos; pero, desde el punto de vista clínico, la mayoría de los casos se presenta con sintomatología atenuada o son subclínicos (Ortega-Pierres y cols., 2000).

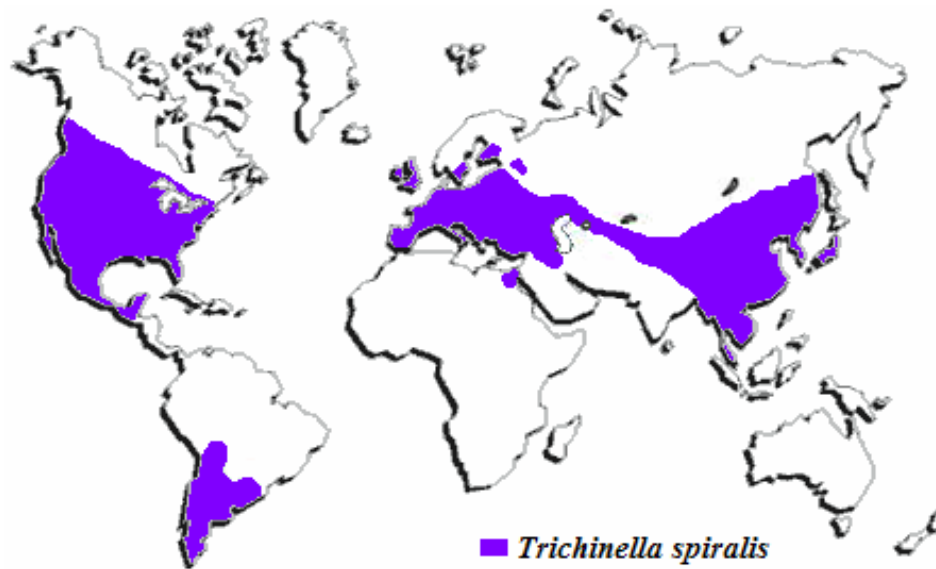


Figura 1. Regiones del mundo en donde se han reportado brotes de triquinosis (Tomado de Pozio y cols., 2001).

La triquinosis fue reportada en México por primera vez por Barragán en 1893, quien encontró la presencia del parásito en el 4% de cadáveres humanos. Martínez-Marañón (1974), encontró que de 1, 000 diafragmas humanos pertenecientes a una población no hospitalizada, 4.2 % fueron positivos para *T. spiralis*. Para 1975, en la Ciudad de México, se registró un brote de triquinosis, el cual involucró a 20 personas. Mientras que en el periodo de 1975 a 1979, en el estado de Zacatecas se registraron siete brotes los cuales afectaron a 79 personas (Martínez-Marañón, 1979).

En el municipio de Naucalpan, en el Estado de México, en 1978 se reportó un brote de triquinosis, que afectó a cuatro personas, las cuales consumieron chorizo mal cocido y al realizarse una revisión retrospectiva para el periodo de 1970 a 1990, se encontró que la incidencia de la enfermedad prevaleció en pacientes entre 5 y 14 años, de bajos recursos socioeconómicos, habiendo ingerido carne de cerdo mal cocida (Martínez -Marañón, 1979).

El brote epidémico más grande de triquinosis se registró en Ciudad Delicias, Chihuahua, en 1987, con 166 casos, de los cuales 59 fueron hospitalizados, y se determinó que el foco de infección fue carne de cerdo que se consumió en forma de chorizo mal cocido (Hernández y cols., 1992).

De 1993 a 1995, en México, 282 casos de triquinosis humana fueron reportados, en los cuales la fuente de infección principal fue el cerdo. En la actualidad se consideran como zonas endémicas en México, los estados de Chihuahua, Durango, Zacatecas, Jalisco, Michoacán, Estado de México y el Distrito Federal. Esto puede verse en la figura 2 (Ortega-Pierres y cols., 2000).



Figura 2. Estados de la República Mexicana en donde la triquinosis es endémica

A pesar de que clínicamente en los últimos años en México no se han reportado brotes de triquinosis en humanos, la revisión de carne para consumo humano tanto de cerdo como de caballo, es parte fundamental para el monitoreo y control epidemiológico de la triquinosis en nuestro país. Durante el año 2000, del análisis de 539 muestras de tejidos de cerdos de traspatio del área metropolitana de Toluca en el Estado de México, se detectó el 12.4 % de muestras positivas para *T. spiralis* (Monroy y cols., 2001).

Otro estudio de 170 muestras de caballos procedentes de dos tipos de mataderos, realizado por la técnica de ELISA, mostró una presencia de 17 % para muestras procedentes de matadero rural y el 7% en federal, mientras que por PCR, 15 y 2% respectivamente fueron positivas, para *T. spiralis*. Estos estudios demuestran la presencia del parásito en la carne de caballo para consumo humano, aunque esto no refleje brotes epidemiológicos (Viveros y cols., 2001).

Trichinella spiralis

A través de estudios moleculares y bioquímicos se han podido reconocer siete especies diferentes en el género *Trichinella* (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. murrelli*, *T. nelsoni* y *T. papuae*) y tres genotipos (T-6, T-8 y T-9) cuya identidad taxonómica permanece todavía incierta. De todos ellos, solamente *T. spiralis* se mantiene y es transmitido en animales domésticos, aunque puede estar presente en animales salvajes. El resto de los genotipos se conservan y transmiten en animales salvajes y pueden ocasionalmente ser identificados en animales domésticos (Pozio y cols., 1992, Murrel y cols., 2000; Pozio, 2000).

La clasificación taxonómica de este parásito se muestra a continuación (Tomado de Chester y cols., 1986):

| | |
|---------|-----------------------------|
| Reino | Animal |
| Phylum | Nematoda |
| Clase | Adenoforea |
| Orden | Enoplida |
| Familia | Trichinellidae |
| Género | <i>Trichinella</i> |
| Especie | <i>Trichinella spiralis</i> |

Morfología

Trichinella spiralis es el agente etiológico de la triquinosis o triquinelosis en el hombre y otros vertebrados. Este nematodo fue descubierto por necropsia como larva enquistada en los músculos de cadáveres humanos en Londres en 1828 por Peacock y posteriormente fue descrito por Richard Owen en 1835 (Campbell, 1979).

La fase adulta del parásito se caracteriza por tener un periodo de vida corto, de una semana el macho y de 3 a 4 semanas la hembra; en cambio como forma larvaria, su longevidad y viabilidad es de más de 2 años. Los adultos de *T. spiralis* son organismos muy pequeños que se identifican por tener una boca pequeña que presenta un estilete, un esófago glandular con células especializadas denominadas esticocitos (células de secreción y soporte) dispuestos en hileras. Los machos miden 1,5mm de longitud por 60 μ de diámetro y presentan mamelones copuladores en el extremo posterior del cuerpo (Fig. 3 A). Las hembras miden de 3-4 mm de longitud por 60 a 90 μ de diámetro, poseen un ovario único que se sitúa en la parte posterior del cuerpo con el oviducto, el receptáculo seminal, el útero y la vagina forman un canal casi recto hasta la vulva que se abre a nivel del extremo distal del esófago. Un esquema de la hembra de *T. spiralis* se observa en la figura 3B (Chester Beaver y cols., 1986, Atias y Neghme, 1988; Lamothe y García, 1988).

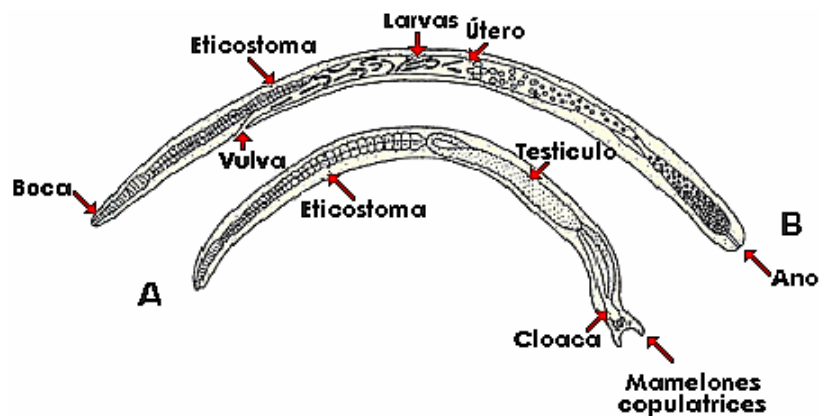


Figura 3. A) Macho de *T. spiralis* B) hembra de *T. spiralis*.

Tanto los machos como las hembras parasitan el intestino delgado. Una vez colonizado éste, las larvas se desarrollan en el útero de la hembra y miden aproximadamente 100 μ de longitud y 6 μ de diámetro en su estado móvil, mientras que en el estado de encapsulamiento la larva muscular (LM) mide 900 μ y permanece enrollada dentro de la célula nodriza, como puede verse en la figura 4 (Lamothe y García, 1988).



Figura 4. Larva de *T. spiralis*

Ciclo de vida

Trichinella spiralis se transmite por vía oral entre huéspedes, los cuales pueden ser muchos animales silvestres carnívoros, entre los que se encuentran osos, lobos, jabalíes, hienas, zorros, roedores, etc., y algunas aves depredadoras como la lechuza y el halcón rojo que participan en los ciclos predador-presa, y afectan incluso a animales domésticos como cerdos, caballos, perros, gatos, ratas, etc. (Carrada, 1992).

Fase Enteral

El ciclo inicia con la ingestión de carne ó derivados crudos o mal cocinados que contienen LM de *Trichinella* (Fig. 5). Las LM son liberadas por la digestión gástrica en el intestino delgado, penetran la mucosa intestinal y pasan por 3 mudas de

cutícula hasta convertirse en parásitos adultos que se diferencian en hembras y en machos adultos, unas 30 h después de la infección (Tay y cols., 1996).

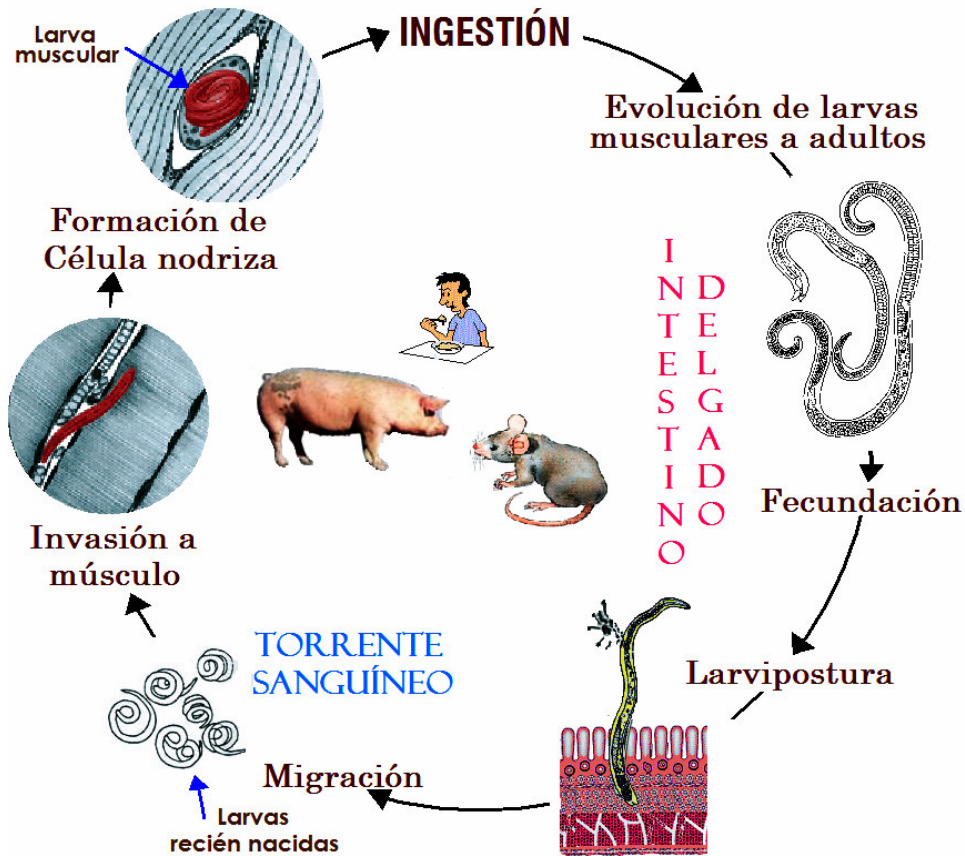


Figura 5. Ciclo biológico de *T. spiralis*

La fase intestinal dura de 7 a 10 días; los machos adultos copulan en el lumen intestinal, mueren y son expulsados del intestino con la materia fecal. Las hembras grávidas invaden la mucosa duodenal o yeyunal, y atraviesan el citoplasma de las células del epitelio para fijarse a la mucosa y penetrar las vellosidades de la misma. Las hembras son vivíparas y liberan alrededor de 1500 larvas recién nacidas (LRN), la producción continúa durante 4 a 6 semanas después de las cuales la hembra muere y es eliminada junto con la materia fecal (Alcántara y Correa, 1993; Palmieri, 2001).

Fase Parenteral

Las LRN atraviesan la lámina propia de las vellosidades intestinales, penetran los capilares y/o los vasos linfáticos, y alcanzan la circulación sanguínea por la vena porta hepática o la vía linfática por el canal torácico. Posteriormente las larvas son distribuidas por los capilares y llegan a los músculos para su localización definitiva, donde evolucionan a LM; algunas no invaden músculo y vuelven a circular nuevamente en los vasos linfáticos y la sangre venosa. En este proceso, que dura alrededor de 24 h, algunas larvas quedan retenidas en el hígado, pulmones, cerebro o corazón (Kociecka, 2000).

Las LRN invaden los músculos mejor irrigados y pobres en glucógeno, como son diafragma, maseteros, músculos de la lengua, intercostales, bíceps o tríceps. A diferencia de la mayoría de los parásitos intracelulares las larvas de *T. spiralis* no matan a la célula hospedante, sino que inducen importantes modificaciones para producir una unidad anatómicamente independiente y muy especializada llamada *célula nodriza* (Tay y cols., 2002; Ribicich y cols., 2004).

Fase Muscular

La transformación de la célula muscular en una célula nodriza implica el reemplazo de los componentes musculares específicos –filamentos de actina y miosina– el agregado de mitocondrias parcialmente disfuncionales, el alargamiento del núcleo y desarrollo del nucleolo, la hipertrofia del glicocáliz –que es una cubierta de mucopolisacáridos que protege la membrana celular–, y la formación de una nueva red vascular en torno de dicha cubierta (Sacchi y cols., 2001).

El crecimiento de la LM dentro de la célula nodriza produce una degeneración de fibras musculares adyacentes, engrosamiento y alteración del sarcolema con hipertrofia e hiperplasia, fragmentación de fibras y acumulación de una membrana capsular interna, seguidas de la formación a partir del endomesio de una cápsula

fibrosa externa infiltrada con capilares sanguíneos (Fig. 6). Toda la cubierta de colágeno es el resultado de los tejidos de huésped, la cual es permeable a los sustratos y productos metabólicos (Sacchi y cols., 2001; Vignau, 2004).

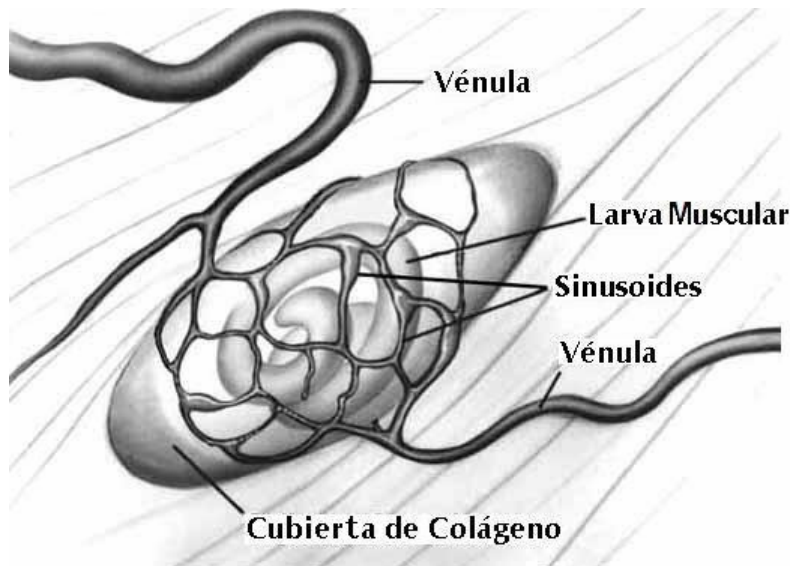


Figura 6. Célula nodriza

El proceso se completa en aproximadamente 20-28 días; las LM viven enrolladas en el interior de la célula nodriza, realizando movimientos lentos de atrás hacia adelante en la región central del citoplasma (Vignau, 2004).

Sintomatología

La triquinosis puede manifestarse clínicamente en tres fases o periodos de la infección cuya severidad dependerá del número de parásitos ingeridos.

Fase Intestinal

Se inicia después de las 24 h de la infección y es causada por la penetración del epitelio intestinal por las hembras y el movimiento de las LRN en la mucosa intestinal, originando dolor abdominal de tipo cólico localizado, náusea, vómito,

cefalea, diaforesis y malestar general, cuadro que semeja el de una intoxicación alimentaria aguda (Kociecka, 2000).

Fase de Invasión Muscular

La migración de las LRN a los músculos causa la ruptura de vasos, la reacción inflamatoria que se presenta en torno a los parásitos, se caracteriza por la presencia de edema (que es más notable en cara y párpados), fiebre, fotofobia, conjuntivitis, dolor muscular (que se exagera con el ejercicio impidiendo en ocasiones la movilidad de la región afectada) e infarto ganglionar doloroso, en ocasiones, pueden presentarse miocarditis y alteraciones de tipo meníngeo y cerebral, cefalea, insomnio, irritabilidad, convulsiones, vértigo, decaimiento generalizado y pérdida de peso (Kociecka, 2000; Ribicich y cols., 2004).

Fase Crónica

Se presenta cuando las LM ya se han establecido en el músculo y se ha formado la célula nodriza, el síntoma dominante es el dolor que se exagera con el ejercicio. Se acentúa o aparece fiebre de magnitud variable, al igual que los síntomas oculopalpebrales. Además, aparecen mialgias, desencadenadas especialmente con los movimientos (respiración, masticación, deglución, deambulación, etc.) y más de la mitad de los enfermos tiene síntomas gastrointestinales tales como dolor abdominal, estado nauseoso y vómitos, constipación y/o diarrea (Capo y Despommier, 1996; Kociecka, 2000).

La miocarditis y la encefalitis son cuadros infrecuentes, que se explican por un grave proceso inmune y no por la acción directa de la *T. spiralis* sobre esos órganos, ya que el parásito no se aloja ni en el miocardio ni en el sistema nervioso (Capo y Despommier, 1996).

Diagnóstico

Para el diagnóstico clínico de la triquinosis es muy importante el antecedente de ingestión de carne de cerdo o de otros carnívoros relacionada con la sintomatología digestiva, o las alteraciones dolorosas que se exacerban con el movimiento de las regiones o músculos afectados.

Los métodos de detección directos son empleados para identificar infecciones causadas por *T. spiralis*, donde encontramos: la Compresión, la cual consiste en la observación al microscopio de un trozo de carne (biopsia) o bien del producto de la carne, sometida a Digestión Artificial para evidenciar la presencia de LM, encontramos también técnicas basadas en Biología Molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ya que detecta el DNA del parásito (Viveros y cols., 2001; Dupouy-Camet y cols., 2002).

Las pruebas de detección indirectas más utilizadas son la hemoaglutinación indirecta; el ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés), por medio de las cuales se determina la presencia en el suero u otros fluidos corporales de anticuerpos específicos contra el parásito; el Dot Blot y la Inmunolectrotransferencia (IET), que son altamente sensibles pues detectan anticuerpos específicos a partir de la segunda semana de infección. También se han usado las pruebas de fijación al complemento y la contrainmunolectroforesis (Yepez-Mulia, 1996; Kocienka, 2000).

Tratamiento

El control químico continúa siendo una herramienta fundamental en la lucha contra la triquinosis, que está basada principalmente en el empleo de compuestos bencimidazólicos, como son el Albendazol (ABZ), Mebendazol (MBZ), y metabolitos como el sulfóxido de albendazol (ABZSO). Estos fármacos se desarrollaron en un principio para uso veterinario, comprobándose después su eficacia en medicina

humana. Estas moléculas se unen selectivamente a la subunidad de la β tubulina de las células del parásito pero no a la del hospedero, inhibiendo su polimerización y la formación de los microtúbulos, responsables del movimiento de cromosomas durante la división celular, del soporte estructural de la célula, la motilidad, el movimiento de partículas intracelulares como metabolitos energéticos, la absorción de nutrientes, la exocitosis y la comunicación célula-célula (Silvestre y Humbert, 2002).

El Tiabendazol es el más antiguo de los bencimidazoles utilizados en el tratamiento de la triquinosis, se administra en dosis de 25 a 50 mg / Kg / día (dosis máxima 3 g por día), es muy activo frente a una gran variedad de nematodos gastrointestinales, se absorbe rápidamente después de su administración oral, alcanzando sus valores máximos en plasma una hora después de su administración, pero sólo un pequeño porcentaje llega a la circulación sanguínea debido a su rápido metabolismo, además ocasiona una gran incidencia de reacciones alérgicas (Webster, 1991).

El MBZ es administrado a una dosis de 25 mg / Kg/ día, tiene un efecto letal sobre los adultos y LRN de *T. spiralis* en ratones y en ratas, además de ser efectivo frente a ascariasis, enterobiasis y trichuriasis. El MBZ y el ABZ producen la desaparición selectiva de los microtúbulos citoplasmáticos de las células tegumentarias e intestinales de los parásitos, así como la acumulación de sustancias secretoras (Chung y cols., 2001; Pozio y cols., 2001).

En el hombre, el ABZ es utilizado para erradicar tanto las formas larvales como adultas de *T. spiralis*, sin embargo, se absorbe poco (<5%) tras su administración oral, ocasionando una baja disponibilidad. El fármaco sufre rápidamente un metabolismo de primer paso en hígado. El ABZSO es el metabolito primario del ABZ, se considera la fracción activa en la eficacia frente a las infecciones tisulares sistémicas. Después de una administración oral única de 400 mg de ABZ, tomado en el desayuno, el ABZSO alcanza concentraciones plasmáticas desde 1,6 a 6,0 mmol/L. El efecto farmacológico sistémico de ABZ aumenta si la dosis se administra con una

comida rica en grasas, aumentando aproximadamente 5 veces su absorción (López y cols., 1997; Aparicio y cols., 2003).

Recientemente se ha prescrito la utilización de la Nitazoxanida (derivado del 5-nitrotiazol), que ha demostrado tener un amplio espectro de acción frente a protozoarios, nematodos, y cestodos, pero ha demostrado tener efectos secundarios como náuseas, anorexia, y dolor leve (Dubrevil y cols., 1996, Davila-Gutiérrez y cols., 2002; Belkind-Valdovinos y cols., 2004).

Además de los antihelmínticos se prescriben analgésicos y antipiréticos para el control sintomático de los dolores musculares y de la fiebre que se presentan en la triquinosis. En formas graves se utilizan los corticosteroides, para impedir las reacciones de hipersensibilidad (Dupouy-Camet y cols., 2002).

A pesar de que el ABZ y otros bencimidazoles tienen una potente actividad antihelmíntica y un amplio espectro de acción contra diferentes parásitos, presentan una limitada absorción a nivel intestinal, lo que ha reducido su acción farmacológica, siendo más efectivos a nivel enteral. Por lo que existe la búsqueda de estrategias que aseguren la llegada de estos fármacos a nivel parenteral, para el tratamiento de parasitosis con estados tisulares (Mottier y Lanusse, 2001).

Algunas de las estrategias utilizadas para aumentar la biodisponibilidad del ABZ en animales de experimentación, ha sido la utilización de cosolventes como el Transcutol (monoetileter), que en ratones aumentó hasta 1.8 veces su solubilidad. Una formulación de dispersión sólida incrementó al triple la biodisponibilidad del ABZ en conejos, mientras que la incorporación en liposomas, administrado en ratas, aumentó más de dos veces su biodisponibilidad. Para los seres humanos se ha utilizado el consumo de comidas ricas en grasa cuando se le administra, para aumentar su biodisponibilidad, dando como resultado un aumento en la concentración de ABZSO en el suero de 4.5 a 9 veces. Cuando el ABZ fué

administrado junto a jugo de pomelo, aumentó 3.2 veces la biodisponibilidad del metabolito, probablemente debido a la inhibición de la degradación intraluminal del ABZ. Por otra parte, un estudio con emulsión de aceite de soja demostró un aumento de 1.6 veces en la biodisponibilidad del ABZ, en comparación a las tabletas comerciales (Alvarez y cols., 2004; Rigter y cols., 2004).

El empleo de transportadores moleculares del tipo de las ciclodextrinas ha incrementado la solubilidad y absorción del ABZ. Estudios en donde se utilizó la hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) en comparación con la carboximetilcelulosa como excipientes para aumentar la solubilidad del ABZ, demostraron que el fármaco en complejo con la HP β CD presenta una mayor actividad contra la fase intestinal de *T. spiralis*, teniendo una reducción de más del 90% de la carga parasitaria a una concentración de 10 mg/Kg, y en el caso de la fase muscular de *T. spiralis*, se reduce más del 90% a una concentración de 100 mg /Kg (García-Rodríguez y cols., 2001; García y cols., 2003).

Ciclodextrinas

A pesar del desarrollo de numerosas moléculas con capacidad farmacológica, sigue existiendo una gran limitante para muchos de estos fármacos y es que aunque sean administrados, no garantizan su llegada al sitio donde se es requerido, sobre todo si es a nivel sistémico, debido a múltiples factores físicos, químicos y biológicos, que limitan la acción del fármaco. Como una alternativa, se han desarrollado diversos materiales transportadores de fármacos a nivel molecular con la finalidad de superar las características fisicoquímicas indeseables de éstos. Entre estos transportadores se encuentran las ciclodextrinas, candidatas potenciales debido a su capacidad de alterar las características químicas y biológicas de las moléculas con la formación de complejos de inclusión, colocándose a partir de 1953 como excipientes

farmacéuticos debido a su estructura y características fisicoquímicas (Loftsson y Brewster, 1996; D'Souza y Lipkowitz, 1998).

Las ciclodextrinas, descritas por Villiers en 1891, están compuestas por oligosacáridos de D-glucopiranososa, elaboradas a partir de la síntesis del almidón, teniendo una cavidad central hidrofóbica y una superficie hidrofílica que le confiere la capacidad de actuar como envases moleculares de forma conoidal (Fig. 7). La digestión enzimática del almidón por la ciclodextrina glicosiltransferasa (CGTasa) produce una mezcla de ciclodextrinas, que abarcan de 6, 7 y 8 unidades de glucosa (α , β y γ ciclodextrina, respectivamente) (Loftsson y cols., 2004).

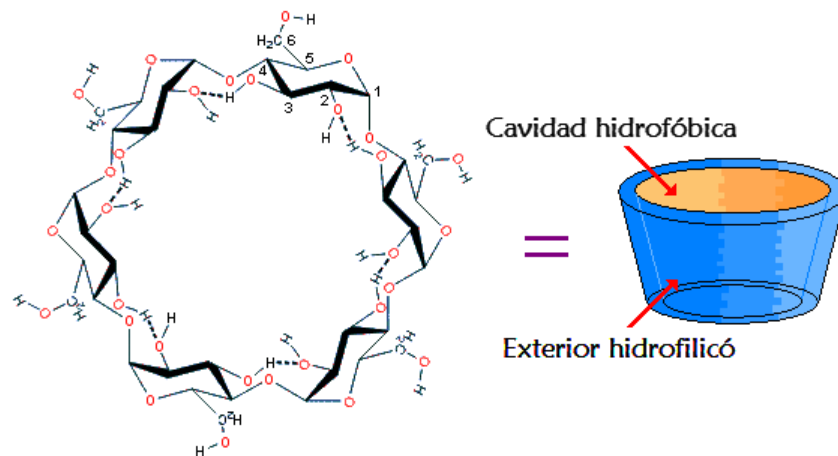


Figura 7. Disposición de las unidades de glucosa en la ciclodextrina y su conformación tridimensional.

La capacidad de una ciclodextrina para formar un complejo de inclusión con una molécula, depende de dos factores principalmente. El primero es estérico y depende del tamaño relativo de la ciclodextrina y el tamaño de la molécula o de ciertos grupos funcionales dominantes de ésta, si la molécula es de gran tamaño con respecto a la ciclodextrina, ésta no cabrá correctamente en la cavidad. Mientras que la altura de la cavidad es igual para los tres tipos (Fig. 8), pues el número de unidades de glucosa determina el diámetro interno de la cavidad y de su volumen (Challa y cols., 2005).

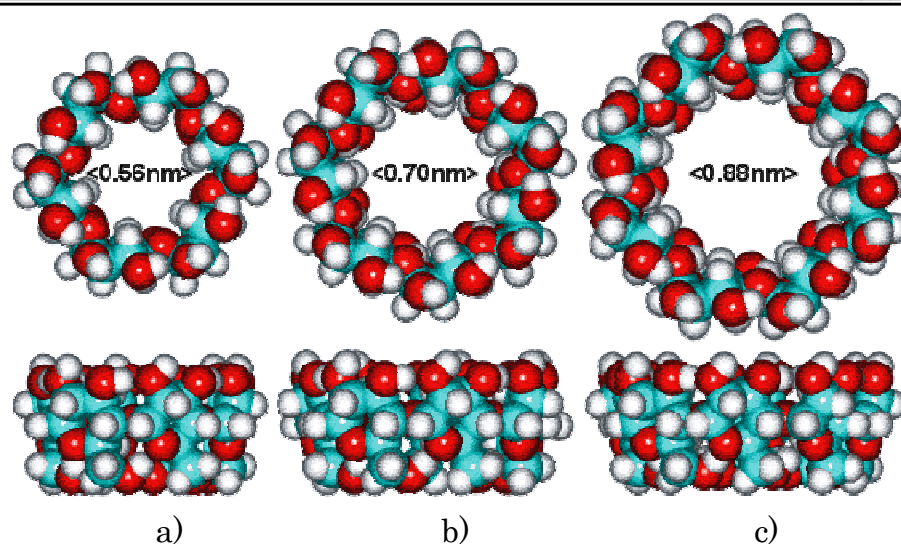


Figura 8. a) α -ciclodextrina, b) β -ciclodextrina; c) γ -ciclodextrina

De acuerdo con estas dimensiones, la α -ciclodextrina puede formar complejos con compuestos de cadenas alifáticas laterales, la β -ciclodextrina con compuestos aromáticos y heterocíclicos y la γ -ciclodextrina puede acomodar en su interior grandes moléculas, como macrocíclicas y esteroides (Loftsson y cols., 2004).

El segundo factor significativo para formar un complejo, son las interacciones termodinámicas entre los diversos componentes del sistema (ciclodextrina, molécula, solvente), esto es que, para que se forme un complejo, debe de haber una fuerza impulsora de energía neta favorable, que empuje a la molécula en la ciclodextrina. La estructura funcional más estable de las ciclodextrinas es un cono truncado, que en las aberturas más grandes presenta grupos oxhidrilo al ambiente externo y sobre todo a la funcionalidad hidrofóbica que alinean el interior de la cavidad, confiriéndole la fuerza termodinámica impulsora, necesaria para formar complejos con moléculas que presentan grupos funcionales apolares (Loftsson y Brewster, 1996).

Los complejos se pueden formar por una variedad de técnicas que dependen de las características de los compuestos, la cinética, los otros ingredientes de la

formulación y sus procesos, así como la forma de dosificación final deseada. Sin embargo, cada uno de estos procesos depende de una cantidad pequeña de agua para ayudar en la termodinámica del complejo. Entre los métodos más usados para formar los complejos está el mezclarse en seco simple, mezclarse en las soluciones y las suspensiones seguidas por una separación conveniente, la preparación de gomas y varias técnicas termomecánicas (Challa y cols., 2005).

La disociación del complejo de inclusión es un proceso relativamente rápido conducido generalmente por un aumento en el número de moléculas de agua en el ambiente circundante, y para que la molécula se degrade sólo se necesita la exposición al oxígeno, al agua, la radiación o el calor, permitiendo ser un excipiente para transportar fármacos con un medio acuoso a la superficie lipofílica en la zona de absorción gastrointestinal, aumentando así la concentración sistémica del fármaco (Szejtli, 1998; Loftsson y cols., 2004).

Como resultado de su capacidad única de formar complejos de inclusión, las ciclodextrinas proporcionan un número de ventajas en formulaciones farmacéuticas, pues tienen las siguientes características:

- Poseen alta solubilidad acuosa
- Forman complejos de inclusión con moléculas apolares insolubles en agua
- Permiten encapsular fármacos de diferentes tamaños moleculares
- Pueden encapsular compuestos volátiles
- Conservan alta estabilidad térmica, con una temperatura de degradación de 300°C
- Son muy estables en soluciones alcalinas ($\text{pH}<14$) así como en soluciones ácidas ($\text{pH}>3$)
- Resisten la hidrólisis por ácidos orgánicos, así como la fermentación por levaduras
- Previenen la cristalización de ingredientes activos

- Evitan interacciones fármaco-fármaco, o fármaco-añadido
- Aumentan la concentración sistémica y biodisponibilidad de los fármacos
- Poseen toxicidad y actividad farmacológica baja
- Reducen la irritación estomacal, cutánea u ocular
- Enmascaran olores o sabores desagradables

Su mecanismo de acción se explica por la interacción con las membranas celulares y su capacidad para abrir ensambles estrechos. En los últimos años se han desarrollado derivados de ciclodextrinas, las cuales disminuyen su posible actividad farmacológica siendo las más utilizadas la dimetil- β -ciclodextrina, la hidroxipropil- β -ciclodextrina y la 2- hidroxipropil- β -ciclodextrina, debido a que son más activas a concentraciones bajas de 2 y 5 % (Tabla 1) (Szejtli, 1991; Loftsson y Brewster, 1996; Szejtli, 1998).

Tabla 1. Algunos fármacos que se han administrado con ciclodextrinas (Tomado de Loftsson y cols., (2004) y Challa y cols., (2005))

| Compuesto | Ciclodextrina | Formulación | Especies |
|------------------|---------------------------------------|--------------------|-----------------|
| Albendazol | Hidroxipropil- β -ciclodextrina | Solución oral | Rata y oveja |
| Ciclosporina A | Dimetil- β -ciclodextrina | Suspensión oral | Rata |
| Cloranfenicol | Hidroxipropil- β -ciclodextrina | Polvo oral | Perro |

| | | | |
|-----------------------|--|---|--------------------------|
| Danazol | Sulfobutileter- β - ciclodextrina e Hidroxiopropil- β - ciclodextrina | Tableta y cápsula con contenido en polvo | Perro y rata |
| Difenidramida | Dimetil- β - ciclodextrina e Hidroxiopropil- β - ciclodextrina | Solución | Rata |
| 17 β -estradiol | 2-Hidroxiopropil- β - ciclodextrina | Tableta y preparación sublingual | Humano |
| Clomipramina | Hidroxiopropil- β - ciclodextrina | Sublingual | Rata |
| Miconazol | 2-Hidroxiopropil- β - ciclodextrina | Suspensión | Rata |
| Naproxeno | β -ciclodextrina | Cápsula con contenido en polvo | Humano |
| Piroxicam | β -ciclodextrina | Tableta, cápsula y suspensión oral | Humano, rata y conejo |
| Testosterona | Hidroxiopropil- β - ciclodextrina | Tableta y preparación sublingual | Humano |

En lo que se refiere a la utilización de moléculas transportadoras, ensayos realizados con voluntarios para ver la utilidad del ABZ en una formulación con la hidroxipropil-

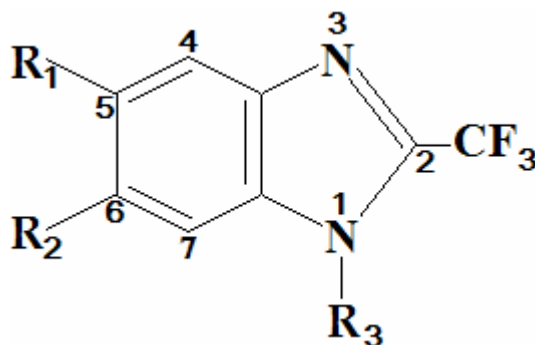
β -ciclodextrina como excipiente, dió como resultado un aumento en la biodisponibilidad de este fármaco en comparación con su forma comercial de tableta (Rigter y cols., 2004).

Nuevos derivados bencimidazólicos

Existe la búsqueda de nuevas moléculas antiparasitarias, debido a que además de que los bencimidazoles presentan una baja solubilidad, diversos estudios han demostrado la presencia de parásitos resistentes a la acción farmacológica de estos compuestos, que en condiciones normales y a una concentración determinada causan la inhibición de su crecimiento o muerte (Torres-Acosta y cols., 2003).

Con la finalidad de contribuir en el desarrollo de nuevos compuestos de utilidad terapéutica, el grupo de trabajo del Dr. Rafael Castillo Bocanegra del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM, realizó en el año 2000 diversas modificaciones estructurales al anillo bencenoide del 2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol, dando lugar a 21 nuevos derivados bencimidazólicos, cuya actividad antihelmíntica *in vitro*, fue evaluada contra la LM de *T. spiralis* mediante un método colorimétrico basado en la reducción de la sal de tetrazolio (MTT) a formazán (Tabla 2).

Tabla 2. Derivados del 2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol diseñados por Navarrete, (2004)



| Serie | Compuesto | R ₁ | R ₂ | R ₃ | Actividad anti <i>T. spiralis</i> (Reducción metabólica)* |
|---------------------|-----------|--------------------------|-------------------|-----------------------|---|
| 2,5(6)-disustituido | 1 | Propiltio | H | H | 38.3 |
| | 2 | Propisulfinilo | H | H | 45.6 |
| | 3 | Feniltio | H | H | 35.5 |
| | 4 | Fenilsulfinilo | H | H | 53.3 |
| | 5 | Benzoílo | H | H | 45.8 |
| | 6 | CF ₃ | H | H | 46.4 |
| | 7 | 2,3-Diclorofenoxi | H | H | 28.9 |
| 1,2,5-trisustituido | 8 | Propiltio | H | CH ₃ | 48.0 |
| | 9 | Propisulfinilo | H | CH ₃ | 42.6 |
| | 10 | Feniltio | H | CH ₃ | 49.3 |
| | 11 | Fenilsulfinilo | H | CH ₃ | 32.9 |
| | 12 | Benzoílo | H | CH ₃ | 36.7 |
| | 13 | CF ₃ | H | CH ₃ | 39.8 |
| | 14 | 2,3-Diclorofenoxi | H | CH₃ | 80.3 |
| 1,2,6-trisustituido | 15 | H | Propiltio | CH ₃ | 56.0 |
| | 16 | H | Propisulfinilo | CH ₃ | 32.6 |
| | 17 | H | Feniltio | CH ₃ | 60.3 |
| | 18 | H | Fenilsulfinilo | CH ₃ | 50.3 |
| | 19 | H | Benzoílo | CH ₃ | 31.8 |
| | 20 | H | CF ₃ | CH ₃ | 37.3 |
| | 21 | H | 2,3-Diclorofenoxi | CH ₃ | 66.8 |
| ABZ | | | | | 67.6 |

* Porcentaje de reducción de la capacidad metabólica del helminto *T. spiralis* a una concentración de 1. 88 µM.

De los resultados obtenidos, resalta la actividad antihelmíntica que el compuesto 14 presentó contra la LM de *T. spiralis*, reduciendo el 80% la actividad metabólica del parásito a una concentración de 1.88 μM , siendo ésta mayor que la presentada por el ABZ (67 %).

Al evaluarse la toxicidad del compuesto 14 en ratones, se determinó una dosis letal mayor a 500 mg/Kg, y se observó una baja toxicidad aguda caracterizada por sedación, disminución de peso corporal, estreñimiento y pilo erección (Navarrete, 2004).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar del desarrollo de nuevas estrategias para combatir a las helmintiasis, la quimioterapia sigue siendo la herramienta principal en el control de éstas, basada principalmente en el empleo de bencimidazoles. Sin embargo, una limitante en sus usos es, el desarrollo de resistencia de diferentes géneros de helmintos a la acción de estos fármacos. Además debido a su baja solubilidad y biodisponibilidad los compuestos bencimidazólicos tienen una baja eficacia a nivel sistémico.

Una alternativa es contar con alternativas en el tratamiento de estas parasitosis, por lo que es de importancia el diseño, síntesis y evaluación de nuevos compuestos con actividad antiparasitaria.

Con este interés, Navarrete (2004) sintetizó el derivado bencimidazólico, 5-(2, 3-diclorofenoxi)-1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (GNV14), que se muestra en la figura 9. Este compuesto redujo “in vitro” 80% la actividad metabólica de la LM de *T. spiralis*, en comparación con el ABZ que redujo 67%. (Navarrete, 2004).

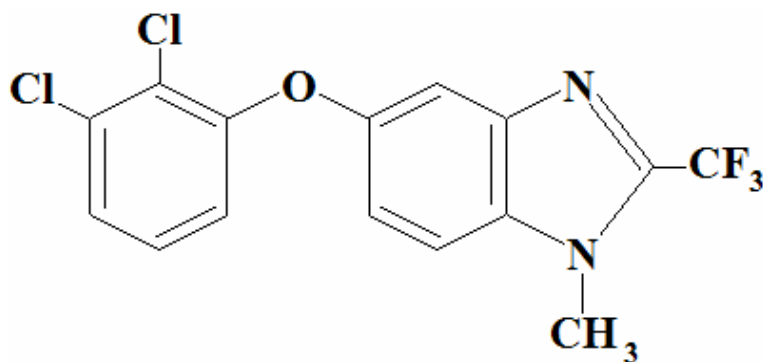


Figura 9. Fórmula estructural del GNV14

Debido a que el ciclo de vida del nematodo *T. spiralis* comprende tanto la fase enteral como parenteral, además de que puede mantenerse en animales de experimentación, este parásito provee de un modelo apropiado para la evaluación *in vivo* de la actividad antihelmíntica de nuevos compuestos.

Por lo anterior, se procedió a la evaluación *in vivo* de la actividad antihelmíntica del compuesto GNV14 empleando un modelo de triquinosis murina. En estudios preliminares, se obtuvo que el GNV14 tenía una baja actividad contra el parásito a nivel sistémico (LM). En estos estudios se observó que el GNV14 tenía poca solubilidad en la formulación empleada de carboximetil celulosa. La baja actividad de GNV14 puede deberse a una baja absorción y biodisponibilidad de éste, ocasionado principalmente por una pobre solubilidad del compuesto.

Para contrarrestar la limitante de solubilidad del GNV14, en este estudio, se determinará si el empleo de transportadores de fármacos como las ciclodextrinas, aumenta la absorción y la biodisponibilidad del GNV14, redituando en una mayor actividad de éste a nivel sistémico.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar *in vivo* el efecto de la hidroxipropil- β -ciclodextrina en la actividad biológica del 5-(2, 3- diclorofenoxi)-1-metil-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol en un modelo murino de triquinosis.

Objetivos particulares

1. Evaluar *in vivo* la actividad de GNV14 sólo, en complejo y/ó en mezcla física con la hidroxipropil- β -ciclodextrina, contra organismos adultos de *Trichinella spiralis* en ratones BALB/c infectados con el parásito.
2. Evaluar *in vivo* el efecto biológico de GNV14 sólo, en complejo y/ó en mezcla física con la hidroxipropil- β -ciclodextrina, contra la larva muscular de *Trichinella spiralis* en ratones BALB/c infectados con el parásito.

HIPÓTESIS

La actividad de GNV14 en complejo y/ó en mezcla física con la hidroxipropil- β -ciclodextrina contra *T. spiralis* se verá aumentada en comparación con el GNV14 sólo.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para la realización de cada uno de los ensayos se utilizó el siguiente material biológico:

➤ *Trichinella spiralis* cepa MSUS/MEX/91/CM-91, cuyo ciclo de vida se mantuvo en ratas Sprague Dawley de 250 g de peso.

➤ Animales: Para la evaluación del efecto biológico se utilizaron 420 ratones machos de la cepa BALB/c, de 20-25g de peso.

➤ Fármacos

El GNV14, el complejo GNV14/HP β CD y la mezcla física de GNV14+ HP β CD fueron proporcionados por el Dr. Francisco Hernández Luis del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM.

La mezcla física se obtuvo macerando ambos sólidos hasta obtener un polvo homogéneo.

El complejo de inclusión se preparó mediante el método de cosolvencia: A una solución acuosa de ciclodextrina se le adicionó una solución metanólica de GNV14. La suspensión se agitó durante 5 días en ausencia de luz, se separó por filtración y se evaporaron los disolventes de la mezcla, para obtener el complejo de inclusión (Bustamante, 2006).

Obtención de las larvas musculares de *Trichinella spiralis* y mantenimiento del ciclo de vida

El procedimiento para la obtención de LM se siguió de acuerdo a lo reportado por Denis y cols. (1970). Ratas de la cepa Sprague Dawley y/o ratones BALB/c infectados con *T. spiralis*, se sacrificaron a los 28 días p. i., bajo anestesia con cloruro de etilo; se les quitó la piel, se cortaron la cabeza y las extremidades, y se extrajeron las vísceras, cuidando de no romper el diafragma.

El tejido óseo y el tejido muscular se trituraron en una picadora Moulinex: el material así obtenido, se incubó en una solución de Pepsina-HCl al 1% por 3 h 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 LM se sedimentaran por 20 min.

Posteriormente, las LM se recuperaron del fondo de tubo y se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos salino pH 7.2, y se centrifugó a 2500 rpm por 2 min, en una centrífuga clínica.

Con la finalidad de determinar el número de LM obtenidas, éstas se resuspendieron en bactoagar al 0.2 %, se tomaron 5 alícuotas de 10 µl y se contaron en forma directa mediante un microscopio óptico, se obtuvo el promedio y se calculó el número de larvas totales, extrapolando el número del LM que hay en 10 µl de bactoagar, a 1000 µl de solución total.

El ciclo de vida de *T. spiralis* se mantuvo en ratas Sprague Dawley, las cuales se infectaron con 5000 LM, resuspendidas en bactoagar al 0.2% por vía intragástrica.

Obtención de adultos de *Trichinella spiralis*

Para obtener los adultos de *T. spiralis* se siguió la metodología descrita por Dennis y cols. (1970). Ratones infectados con *T. spiralis*, se sacrificaron a los 6 días post infección empleando cloruro de etilo. Se les 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, que contenía PBS y una capa de doble gasa y se dejó incubando a 37°C por 3h.

Los adultos se recuperaron del fondo del tubo y se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en bactoagar al 0.2%. Se tomaron 5 alícuotas de 10 µl y se contaron los adultos, hasta que la diferencia de los conteos fue de máximo 5 adultos, se obtuvo el promedio y se calculó el número total de adultos obtenidos, extrapolando el número de los adultos que hay en 10 µl de bactoagar, a 1000 µl de solución total.

Evaluación de la actividad de GNV14 sólo, en complejo y/o en mezcla física con la hidroxipropil-β-ciclodextrina contra el Adulto de *Trichinella spiralis*

Ratones de la cepa BALB/c se infectaron con 500 LM de *T. spiralis*. Al día 3 p. i. se dividieron en cinco grupos de 10 ratones c/u, al primer grupo se le administró GNV14 sólo; al segundo grupo se le aplicó GNV14 en complejo con la hidroxipropil-β-ciclodextrina (GNV14/HPβCD), al tercer grupo se le aplicó GNV14 en mezcla física con la hidroxipropil-β-ciclodextrina (GNV14+HPβCD). El cuarto grupo fue usado como control positivo, al que se le aplicó ABZ, mientras que el quinto grupo fue usado como control negativo al que se sólo se le aplicó la formulación. Los compuestos se aplicaron a una dosis única de 75 mg/Kg/peso en la formulación 1 (la cual contenía 10% de cremofor, 10% de alcohol etílico y 80% de agua).

Los animales se sacrificaron 6 días p. i. y los adultos se obtuvieron como se describió previamente.

Los adultos se contaron en cada grupo y se calculó el porcentaje de reducción de la carga parasitaria de cada uno de los grupos evaluados con respecto al control negativo.

De la misma forma se evaluó la actividad de los compuestos contra el adulto de *T. spiralis*, ahora empleando una dosis equimolar de 15 mg/Kg de peso.

Evaluación de la actividad de GNV14 sólo, en complejo y/ó en mezcla física con la hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre la LM de *Trichinella spiralis*

Ratones de la cepa BALB/c se infectaron con 500 LM de *T. spiralis*. A los 28 días p. i. se formaron 5 grupos de 10 ratones c/u, al primer grupo se le administró GNV14 sólo; al segundo grupo se le aplicó GNV14/HP β CD, al tercer grupo se le aplicó GNV14+HP β CD. El cuarto grupo fué usado como control positivo al que se le aplicó ABZ, mientras que el quinto grupo fué usado como control negativo al que se sólo se le aplicó la formulación. Los compuestos se aplicaron por vía intra gástrica a una dosis de 75 mg/Kg/peso en la formulación 1 y 2 (la cual contenía 5% de cremofor, 5% de alcohol etílico y 90% de agua) por siete día consecutivos.

Los animales fueron sacrificados a los siete días después de la última aplicación de los compuestos y las LM se obtuvieron como se describió previamente.

Las LM se contaron en cada grupo y se calculó el porcentaje de reducción de la carga parasitaria de cada uno de los grupos evaluados con respecto al control negativo.

De la misma forma se evaluó la actividad de los compuestos contra la LM de *T. spiralis*, ahora empleando una dosis equimolar de 15 mg/Kg de peso en la formulación 1.

Evaluación de la infectividad de LM obtenidas de animales tratados

Ratones de la cepa BALB/c fueron infectados con 300 LM de *T. spiralis* obtenidas de animales tratados previamente con los diferentes compuestos. El primer grupo se inoculó con LM tratadas con GNV14, al segundo grupo con las LM tratadas con GNV14/HP β CD, al tercer grupo se le inoculó con LM tratadas con el ABZ y el cuarto grupo fue usado como control al que se le inoculó LM tratadas sólo con formulación, cada grupo constituido de 10 animales. En este experimento el compuesto GNV14 solo y el ABZ se evaluaron a una dosis equimolar de 75 mg/Kg de peso. EL GNV14/HP β CD se evaluó a una dosis de 75 mg/Kg de peso (la cantidad real de GNV14 en el complejo fue de 15 mg).

Los animales fueron sacrificados a los 28 días p. i., las LM se obtuvieron como se describió previamente.

Las LM obtenidas de cada grupo se contaron y se calculó el número de LM de cada uno de los grupos evaluados con respecto al control.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los ensayos se analizaron aplicando la prueba estadística de Duncan, que permite determinar diferencias significativas entre los tratamientos, haciendo una comparación de medias de cada grupo, reduciendo el margen de error.

RESULTADOS

Solubilidad de los compuestos en formulación 1 y 2

Los compuestos evaluados se resuspendieron en dos diferentes formulaciones, la primera contenía cremofor al 10%, alcohol etílico al 10 % y un 80% de agua (Formulación 1) y la segunda incluía 5% de cremofor, 5% de alcohol etílico y un 90% de agua (Formulación 2). La solubilidad de los compuestos en las dos diferentes formulaciones se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 3.- Solubilidad de los compuestos en dos diferentes formulaciones

| | FORMULACIÓN 1 | FORMULACIÓN 2 |
|----------------------------------|---------------|---------------|
| GNV14 | ++ | + |
| GNV14/HP β CD [^] | ++++ | +++ |
| GNV14+HP β CD [*] | ++ | + |
| Albendazol | +++ | ++ |

++++ Muy soluble

+++ Soluble

++ Poco soluble

+ Muy poco soluble

[^]GNV14/HP β CD= GNV14 en complejo con la hidroxipropil- β -ciclodextrina

^{*}GNV14+HP β CD= GNV14 en mezcla física con la hidroxipropil- β -ciclodextrina

Los compuestos tuvieron una mejor solubilidad en la formulación 1, y el GNV14/HP β CD presenta la mayor solubilidad.

Evaluación de la actividad de GNV14 sólo, en complejo y/o en mezcla física con la hidroxipropil-β-ciclodextrina contra el Adulto de *Trichinella spiralis*

Al determinarse la actividad biológica de GNV14 sólo, en complejo y en mezcla física con la HPβCD sobre el organismo adulto de *T. spiralis*, se observó que el GNV14 sólo y en mezcla física con la ciclodextrina tuvieron una eficacia del 58 y 55 % respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas entre sí, mientras que GNV14/HPβCD tuvo un porcentaje de eficacia del 87%, siendo estadísticamente diferente con respecto al control y a los otros compuestos ($p < 0.05$) (Tabla 4). Debido a que el GNV14+HPβCD mostró una actividad similar al GNV14 solo, en los subsiguientes ensayos, no fue incluido.

Tabla 4.-Actividad de GNV14 solo, en complejo y en mezcla física con la hidroxipropil-β-ciclodextrina a una dosis de 75 mg/Kg/peso contra el Adulto de *Trichinella spiralis*

| | Nº de adultos /ratón±SD* | Reducción de la carga parasitaria (%) |
|---------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| Control | 117 ± 6.4 | 0 |
| GNV14 | 50 ± 2.5 | 58 ^{ab} |
| GNV14/HPβCD | 15 ± 4.2 | 87 ^{ac} |
| GNV14 +HPβCD | 53 ± 2.1 | 55 ^{ab} |
| Albendazol | 38 ± 2.8 | 66 ^{ab} |

Ratones de la cepa BALB/c se infectaron con 500 LM de *T. spiralis* y al día 3 p.i. se les administró una dosis única de 75 mg/Kg/peso de cada uno de los compuestos emulsificados en formulación 1. Los ratones se sacrificaron al sexto día p.i., se contaron los organismos adultos y se calculó el porcentaje de reducción de la carga parasitaria con respecto al control. Se realizaron dos experimentos independientes.

*Desviación estandar

^a Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$)

^b Sin diferencias estadísticamente significativas entre sí, ($p \geq 0.05$)

^c Diferencias estadísticamente significativas con respecto al ABZ ($p > 0.05$)

Evaluación de la actividad de GNV14 sólo, en complejo con la hidroxipropil- β -ciclodextrina contra el Adulto de *Trichinella spiralis* a una dosis equimolar de 15 mg/Kg/peso

En los ensayos anteriores se empleó una dosis de 75 mg/Kg/peso, sin embargo, al determinar la cantidad real de GNV14 en el complejo con la HP β CD, ésta fue de 15 mg, por lo que se realizó otro experimento en el que se determinó la eficacia de GNV14 solo y el ABZ a una concentración equimolar de 15 mg/Kg/peso, contra el adulto de *T. spiralis*. Los resultados muestran que a esta dosis el ABZ y el GNV14 reducen la carga parasitaria en 44% y 31% respectivamente, mientras que la eficacia del GNV14/HP β CD fue del 87% (Tabla 5), siendo mayor a lo mostrado por el ABZ.

Tabla 5. Actividad del GNV14 solo, GNV14/HP β CD y del Albendazol contra el Adulto de *Trichinella spiralis*, a una dosis equimolar de 15 mg/Kg/peso

| | N°de adultos/ratón | Reducción de la carga parasitaria (%) |
|---------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Control | 134 | 0 |
| GNV14 | 92 | 31 |
| GNV14/HP β CD | 15 | 87 |
| Albendazol | 48 | 44 |

Ratones de la cepa BALB/c se infectaron con 500 LM de *T. spiralis* y al día 3 p.i. se les administró una dosis única de GNV14 solo, en complejo y albendazol a una concentración equimolar de 15 mg/Kg/peso. Los ratones se sacrificaron al sexto día p.i. y se calculó el porcentaje de reducción de la carga parasitaria con respecto al control.

Evaluación de la actividad de GNV14 sólo, en complejo y/ó en mezcla física con la hidroxipropil-β-ciclodextrina sobre la larva muscular de *Trichinella spiralis*

Por otro lado, a la dosis de 75 mg/Kg/peso, el GNV14/HPβCD presentó la mayor actividad contra la LM de *T. spiralis*, reduciendo 84% la carga parasitaria. Esta reducción fue estadísticamente diferente (<0.05) con respecto a la obtenida con el ABZ (63%), GNV14 solo (46%) y GNV14+HPβCD (44%) (Tabla 6). Debido que la actividad el GNV14+HPβCD es similar al GNV14 solo, no se incluyó en estudios subsiguientes.

Tabla 6.-Actividad del GNV14 solo, en complejo y /ó en mezcla física con la hidroxipropil-β-ciclodextrina contra la larva muscular de *Trichinella spiralis*

| | N° de LM/Ratón±SD* | Reducción de carga parasitaria (%) |
|---------------------|--------------------|------------------------------------|
| Control | 24 766 ± 1682 | 0 |
| GNV14 | 13 030 ± 1562 | 46 ^{ab} |
| GNV14/HPβCD | 3 984 ± 3087 | 84 ^{bc} |
| GNV14 +HPβCD | 13 528 ± 1948 | 44 ^{ab} |
| Albendazol | 9 488 ± 116 | 63 ^a |

Ratones de la cepa BALB/c se infectaron con 500 LM de *T. spiralis* y al día 28 p.i. se les administraron los fármacos a una dosis de 75 mg/Kg/peso, emulsificados en la formulación 1, durante siete días consecutivos. Los ratones se sacrificaron a los 7 días después de la última aplicación y se obtuvieron las LM. El porcentaje de reducción de la carga parasitaria se calculó con respecto al control. Se realizaron dos experimentos independientes.

*Desviación estandar

^a Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (p< 0.05)

^b Sin diferencias estadísticamente significativas entre sí (p≥ 0.05)

^c Diferencias estadísticamente significativas con respecto al ABZ (p< 0.05)

Evaluación de la actividad de GNV14 sólo, en complejo con la hidroxipropil- β -ciclodextrina contra larva muscular de *Trichinella spiralis* a una dosis equimolar de 15 mg/Kg/peso

La concentración real del GNV14 en el complejo con la hidroxipropil- β - ciclodextrina fue de 15 mg, por lo que se procedió a determinar la eficacia del GNV14 solo y del ABZ contra la LM de *T. spiralis* a una concentración equimolar de 15 mg/Kg/peso (Tabla 7). Bajo estas condiciones el ABZ redujo el 28% de la carga parasitaria y el GNV14 un 31%, siendo estos resultados inferiores a los mostrados por el GNV14/HP β CD (87%). La actividad mostrada por el GNV14/HP β CD fue mayor a la del ABZ.

Tabla 7.-Actividad del GNV14 solo, GNV14/HP β CD y Albendazol a una dosis equimolar de 15mg/Kg/peso contra la larva muscular de *Trichinella spiralis*

| | N°de larvas musculares/ratón | Reducción de carga parasitaria (%) |
|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| Control | 25 000 | 0 |
| GNV14 | 18 125 | 28 |
| GNV14/HPβCD | 3 984 | 84 |
| Albendazol | 15 500 | 31 |

Ratones de la cepa BALB/c se infectaron con 500 LM de *T. spiralis* y al día 28 p.i. se les administró por siete días consecutivos GNV14 solo y albendazol a una dosis equimolar de 15 mg/Kg/peso. Los ratones se sacrificaron a los siete días después de la última aplicación de los fármacos para obtener las LM. El porcentaje de reducción de la carga parasitaria se calculó con respecto al control.

Evaluación de la actividad de GNV14 sólo, en complejo con la hidroxipropil- β -ciclodextrina contra larva muscular de *Trichinella spiralis* a una dosis de 75 mg/Kg/peso en formulación 2

Por otro lado, para evaluar si el tipo de formulación empleada para la solubilización de los compuestos afectaba la actividad del GNV14 contra la LM de *T. spiralis*, se realizó un ensayo con la formulación 2 (5% de cremofor, 5% de alcohol etílico y 90% de agua) a una dosis de 75 mg/Kg/peso. Los resultados obtenidos (Tabla 8) muestran que la actividad de GNV14/HP β CD se vio afectada con el uso de la formulación 2, obteniéndose 48% de reducción de la carga parasitaria, en comparación con 87% obtenido cuando se utilizó la formulación 1. Así mismo la actividad del GNV14 solo en la formulación 2, también se vio disminuída (35%) en comparación con la obtenida con la formulación 1 (58%).

Tabla 8.-Actividad del GNV14 sólo, en complejo con la hidroxipropil- β -ciclodextrina contra las larvas musculares de *T. spiralis* de a una dosis de 75 mg/Kg/peso en formulación 2

| | N° de LM /ratón | Reducción de la carga parasitaria (%) |
|------------------------------------|-----------------|---------------------------------------|
| Control | 28 600 | 0 |
| GNV14 | 18 018 | 35 |
| GNV14/HβCD | 14 872 | 48 |

Ratones de la cepa BALB/c se infectaron con 500 LM de *T. spiralis* y al día 28 p.i. se les administraron los fármacos una dosis de 75 mg/Kg/peso en formulación 2 durante siete días consecutivos. Los ratones se sacrificaron a los siete días después de la última aplicación de los fármacos para obtener las LM. El porcentaje de reducción de la carga parasitaria se calculó con respecto al control.

Evaluación de la infectividad de LM obtenidas de animales tratados

Se evaluó la infectividad de las LM obtenidas de ratones tratados con los compuestos GNV14 solo y el GNV14/HP β CD, a una dosis de 75 mg/Kg/peso en la formulación 2, y de LM obtenidas de ratones tratados con ABZ a una dosis equimolar a 75 mg/Kg/peso de GNV14. Las LM obtenidas se inocularon a otros ratones. La reducción de la infectividad de las LM se muestra en la Tabla 9. Los resultados muestran que el GNV14 solo y el ABZ redujeron la infectividad en un 28% y 54% respectivamente. En el caso del GNV14/HP β CD, éste redujo la infectividad de las LM en un 46%. Cabe mencionar que la cantidad real de GNV14 en complejo con la HP β CD que se aplicó fué de 15 mg.

Tabla 9.- Infectividad de larvas musculares de *T. spiralis* obtenidas de ratones previamente tratados con los derivados bencimidazólicos

| | N° de LM /ratón | Reducción de infectividad (%) |
|-------------------------------------|-----------------|-------------------------------|
| Control | 1 151 | 0 |
| GNV14 | 826 | 28 |
| GNV14/HPβCD | 623 | 46 |
| Albendazol | 535 | 54 |

Ratones de la cepa BALB/c se infectaron con 300 LM de *T. spiralis* obtenidas de animales tratados. Los ratones se sacrificaron a los 28 días p.i. y se obtuvieron las LM. El porcentaje de reducción de la carga parasitaria se calculó con respecto al control.

DISCUSIÓN

La baja absorción intestinal del ABZ (menor al 5%) debida a su baja solubilidad acuosa, es una determinante importante para su acción farmacológica en parasitosis sistémicas. Lo anterior ha llevado a tratar de incrementar la biodisponibilidad del ABZ con el uso de cosolventes, surfactantes o mediante su incorporación en partículas para aumentar su solubilidad en agua, que han dado como resultado un aumento en la concentración del ABZSO (forma activa del ABZ) hasta 9 veces en el plasma (Rigter y cols., 2004). De manera importante, la formación de complejos de inclusión ABZ/HP β CD, ha aumentado su actividad antiparasitaria contra el organismo adulto de *T. spiralis*, reduciendo alrededor del 90% de la carga parasitaria a una concentración de 10 mg/Kg/peso, y en el caso de la fase muscular de *T. spiralis*, hay una reducción del 80% a una concentración de 100 mg /Kg/peso (García-Rodríguez y cols., 2001; García y cols., 2003). Sin embargo, a pesar de que estas alternativas incrementan la solubilidad del ABZ, existen evidencias de la presencia de nematodos resistentes a la acción de este fármaco (García-Rodríguez y cols., 2001; García y cols., 2003; Torres-Acosta y cols., 2003; Rigter y cols., 2004).

Actualmente una alternativa en el tratamiento de las helmintiasis es un derivado del nitrotiazol, la Nitazoxanida. Sin embargo, se ha demostrado experimentalmente que este fármaco tiene una actividad reducida contra *Heligmosomoides polygyrus* y *T. spiralis* (López-Ramírez, 1999; Fonseca-Salamanca y cols., 2003). Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de contar con nuevos antiparasitarios.

Así, en la búsqueda de nuevos compuestos con potencial actividad antiparasitaria, se ha sintetizado el compuesto GNV14, el cual ha demostrado una buena actividad antihelmíntica “in vitro”. GNV14 redujo al 80% la capacidad metabólica de la LM de *T. spiralis* a la concentración de 1.88 μ M, siendo su actividad superior a la del ABZ (67% de reducción) (Navarrete, 2004).

Estudios preliminares del GNV14, en un modelo murino de triquinosis, mostraron que éste es poco soluble y por consiguiente tuvo una baja actividad a nivel sistémico. En la búsqueda de estrategias para aumentar su biodisponibilidad, se implementaron formulaciones que contenían aceite de castor o Cremofor, sin haber observado una mayor actividad del GNV14. Recientemente, se exploró la incorporación del GNV14 en la HP β CD, con la finalidad de aumentar la solubilidad del compuesto y por ende una mayor acción antiparasitaria a nivel sistémico. Debido a su particular estructura química, la hidroxipropil- β -ciclodextrina puede formar complejos de inclusión gracias a su cavidad hidrofóbica y superficie hidrofílica que facilita la solubilización de los fármacos, por lo tanto, aumentan algunas de sus propiedades como la velocidad de disolución y la absorción. HP β CD sirve como un agente transportador que en el caso del GNV14, lo llevaría a través de un medio acuoso hasta los sitios de absorción en el tracto gastrointestinal. Basados en el comportamiento que tienen las ciclodextrinas, el complejo GNV14/HP β CD se disocia hasta que se establece un equilibrio dinámico entre el GNV14 libre y el GNV14 en complejo, el cual es metabolizado hasta GNV14 libre. Por lo tanto, el complejo se disocia a nivel intestinal y sólo el GNV14 libre es absorbido.

El complejo de inclusión del GNV14/HP β CD, es un complejo hidrofílico, que mostró un alto perfil de disolución en la formulación 1, que contenía Cremofor al 10%, agente emulsificante farmacéutico usado en la preparación de sustancias hidrofóbicas (BASF, 1997). Sin embargo, su disolución disminuyó cuando se utilizó la formulación 2, que contenía Cremofor al 5%. Las otras preparaciones del GNV14 y el ABZ tuvieron características de disolución menores, con una sedimentación más rápida.

El GNV14/HP β CD mostró una mayor actividad que el GNV14 solo ó en mezcla física con la HP β CD (GNV14+HP β CD) en contra del adulto (87%) y de la LM (81%) de *T. spiralis*. Estos resultados indican que efectivamente el complejo con la HP β CD contribuyó de manera importante a incrementar la solubilidad y biodisponibilidad

del GNV14, evidenciándose en una mayor actividad contra la fase sistémica del parásito. Por otro lado, el GNV14/HP β CD fue más activo que el ABZ, que a una dosis de 75mg/Kg/peso redujo 66 y 63% la carga parasitaria del adulto y de la LM respectivamente. La actividad antihelmíntica del ABZ y del GNV14 solo, fue similar tanto a nivel enteral como sistémico.

En este trabajo no se evaluó la actividad anti-*T. spiralis* del ABZ en complejo con la HP β CD, por lo que este compuesto puede estar en desventaja en relación con el GNV14/ HP β CD. Sin embargo existen estudios de la actividad antiparasitaria del complejo ABZ/HP β CD. Gómez-Morales y cols. (2004), evaluaron la actividad del complejo ABZ/HP β CD contra la LM de *T. spiralis* a una dosis de 20 mg/Kg/peso, obteniendo una pobre reducción de la carga parasitaria (19. 5%). Por otro lado, García-Rodríguez y cols. (2001) al utilizar el complejo ABZ/HP β CD a una dosis de 100/mg/Kg/peso, obtuvieron 80% de reducción de la carga parasitaria de la LM. Ambos estudios se realizaron con ratones infectados con 300 LM de *T. spiralis*. En este trabajo de tesis, los ratones fueron infectados con 500 LM del parásito, obteniéndose con el GNV14/HP β CD un porcentaje de reducción de la LM de 84%, a una dosis de 75 mg/Kg/peso, siendo éste similar al obtenido por García-Rodríguez y cols. (2001), con el ABZ/HP β CD evaluado a una concentración mayor. Estos resultados sugieren que efectivamente el GNV14/HP β CD es un compuesto antiparasitario con una mejor actividad que la del ABZ/HP β CD.

Por otro lado, se observó un decremento de la actividad anti-*T: spiralis* cuando el GNV14/HP β CD se formuló con Cremofor al 5% (formulación 2). Sin embargo es de interés hacer notar que a pesar de que la carga parasitaria se redujo solo un 48%, el GNV14/HP β CD tuvo un efecto importante sobre la infectividad de la LM obtenida de los animales tratados (46%). La reducción en la infectividad de la LM, es un aspecto importante, que afecta la transmisión de la infección, contribuyendo a su control.

Con respecto a su estructura, el GNV14 éste tiene un sustituyente CH_3 en posición 1, un CF_3 en posición 2 y un diclorofenoxi en posición 5. Estudios de la relación estructura actividad (SAR), indican que los sutituyentes electrodonadores del tipo del diclofenoxi, aumentan la actividad de la molécula si en posición 1 está sustituida con un grupo metilo (Navarrete, 2004). Se considera que el hidrógeno en posición 1 y el carbamato de metilo en posición 2 del ABZ, participan en la unión a la β tubulina de los parásitos helmintos y se sabe que la resistencia a compuestos bencimidazólicos se debe a cambios en la secuencia de la β tubulina (Silvestre y Humbert, 2002). En el caso del GNV14, como se mencionó anteriormente, tiene CH_3 y CF_3 en posiciones 1 y 2 respectivamente, lo que sugiere que su mecanismo de acción es diferente al del ABZ. A este respecto, estudios de microscopia electrónica de transmisión realizados con el protozoario *Giardia lamblia* tratado con el GNV14, revelan que éste no interfiere con la polimerización de la β tubulina, presente en grandes cantidades en el disco ventral del parásito. Por otro lado, cabe mencionar que el GNV14 tiene actividad *in vitro* contra *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* y *C. elegans* (Navarrete, 2004).

La baja toxicidad del GNV14 demostrada en ratones (Navarrete-Vázquez, 2004), aunada a su actividad en complejo con la HP β CD contra el adulto y la LM de *T. spiralis* y a las características de su estructura química, indican que este nuevo derivado bencimidazólico, posee un gran potencial para ser usado como antihelmíntico. Sin embargo, se requieren estudios farmacocinéticos del GNV14 para su posterior evaluación clínica. Por eso es de interés:

- ✓ Comparar la actividad antihelmíntica de GNV14 y albendazol, ambos en complejo con la hidroxipropil- β -ciclodextrina, con la finalidad de evaluar la potencia de ambos compuestos

- ✓ Analizar los metabolitos de la ruta metabólica que sigue el GNV14

✓ Realizar estudios farmacocinéticos del GNV14 en complejo con la hidroxipropil- β -ciclodextrina.

CONCLUSIONES

1. La inclusión del GNV14/HP β CD aumenta la solubilidad del compuesto en comparación con GNV14 solo y en mezcla física con la hidroxipropil- β -ciclodextrina.
2. La actividad de GNV14 contra las fases enteral y sistémica de *T. spiralis*, se ve aumentada de manera significativa cuando forma el complejo de inclusión con la hidroxipropil- β -ciclodextrina.
3. El GNV14/HP β CD mostró una mayor actividad contra *T. spiralis* en comparación con el Albendazol, a una concentración equimolar de 15 mg/Kg/peso.
4. El GNV14/HP β CD redujo al infectividad de la LM de *T. spiralis*.
5. El GNV14/HP β CD posee un gran potencial como antihelmíntico.

REFERENCIAS

Alcantara P, Correa D. 1993. Triquinosis: Una parasitosis fuera de serie. INDRE.1-11.

Alvarez L. I., Mottier M. L.; Lanusse C. E. 2004. Comparative assessment of the access of albendazole, febendazole and tricabendazole to *Fasciola hepatica*: effect of bile in the incubation medium. Parasitology: 128: 73-81.

Aparicio P., Rodríguez E., Gárate T., Molina R., Soto A.; Alvar J. 2003. Terapéutica antiparasitaria, Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 21 (10): 579-94.

Atías A., Neghme A. 1988. Parasitología Clínica, 2ed, Publicaciones Técnicas Mediterráneo, Chile. pp: 276-282.

BASF. 1997. Cremophor El. Technical Leaflet. Julio.

Belkind-Valdovinos U., Belkind-Gerson J., Sánchez-Francia D., Espinoza-Ruíz M. M.; Lazcano-Ponce E. 2004. Evaluación de la nitazoxanida en dosis unica por tres días en parasitos intestinales. Sal. Pub. Mex. 46(3): 333-340.

Bustamante G. O. C. 2006. Formación de complejos de inclusión del antiparasitario experimental 5 -(2, 3 -diclorofenoxi)- 1- metil-2-(trifluorometil)-1H- bencimidazol con ciclodextrinas para mejor solubilidad. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. pp: 24-46.

Campell W. C. 1979. History of Trichinosis: Paget, Owen and the discovery of *Trichinella spiralis*. Bull. Hist. Med. 53: 520-552.

Capo V., Despommier D. 1996. Clinical aspects of infection with *Trichinella spp.* Clin. Microbiol. Rev. 9 (1): 47-54.

Carrada T. 1992. Las parasitosis del hombre en la República Mexicana: Avances recientes y Perspectivas. Infectología. 12(8): 497-517.

Challa R., Ahuja A., Ali J.; Khar R. K. 2005. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. AAPS Pharm. Sci. Tech.; 6 (2): E329-E357.

Chester Beaver P., Clifton Jong R.; Wayne Cupp C. 1986. Parasitología Clínica. 2^{da} ed. Salvat Editores. pp.: 251-276.

Chung M. S., Joo K. H., Quan F. S., Kwon H. S; Cho S. W. 2001. Efficacy of Flubendazole and Albendazole against *Trichinella spiralis* in mice. Parasite 8: S195-S198.

Davila-Gutierrez C. E., Velasquez C., Trujillo-Hernandez B.; Huerta M. 2002. Nitazoxanide compared with quinifamide and Mebendazole in the treatment of helminthic infections and intestinal protozoa in children. Am. Trop. Med. Hyg. 66(3): 251-254.

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

Dubrevil L., Mouton Y.; Russignol J. F. 1996. In vitro evaluation of activities of nitazoxanide and tiazoxanide against anaerobes and aerobic organisms. Antimicrob. Agents. Chemother. 40(10): 2266-2270.

Dupouy-Camet J., Kociecka W., Bruschi F., Bolas-Fernandez F.; Pozio E. 2002. Opinion on the diagnosis and treatment of human *trichinellosis*. *Expert. Opin. Pharmacother.* 3(8): 1117-1130.

D'Souza V. T., Lipkowitz K. B. 1998. Cyclodextrins introduction. *Chem. Rev.* 98(5): 1741-1742.

Fonsenca-Salamanca F., Martínez-Greiro M. M.; Martínez- Fernández A. R.. 2003. Nematocidal activity of nitazoxanide in laboratory models. *Parasitol. Rev.* 91(4): 321-324.

García-Rodríguez J. J., Torrado J.; Bolas F. 2001. Improving bioavailability and anthelmintic activity of Albendazole-cyclodextrin complexes. *Parasite*, 8: S188-S190.

García J. J., Bolás F., Torrado J. J. 2003. Bioavailability and efficacy characteristics of two different oral liquid formulations of albendazole. *Int. J. Pharm.* 250, 351-358.

Gómez-Morales M. A., Casulli A.; Pozio E. 2004. Improvement of the Albendazole efficacy against encapsulated larve of *Trichinella spiralis* in murine model using a hidroxypropyl- β -cyclodextrin liquid formulation. ABSTRACT. XIth International Conference on Trichinellosis.

Hernández M, Ramos E., Casco E. J., Morales J. M; Pérez E. M. 1992. Triquinosis aguda. Epidemia de 166 casos en Ciudad Delicias, Chihuahua. Diagnóstico por compresión tisular y tinción. *Gac. Méd. Méx.* 128(1): 45-50.

Kociecka W. 2000. Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. *Vet Parasitol.* 93: 365-383.

Lamothe A. R., García P. L.. 1988. Helmintos del hombre en México tratamiento y profilaxis. AGT editor, México. pp: 3-6, 74-77.

Loftsson T., Brewster M. E.. 1996. Pharmaceutical application of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. J. Pharm. Sci. 85: 1017-1025.

Loftsson T., Brewster M. E.; Másson M. 2004. Role of cyclodextrins in improving oral drug delivery. Am. J. Drug. Deliv. 2 (4): 261-275.

López- García M. L, Torrado- Duran S., Torrado- Duran J., Martínez- Fernández A. R., Bolas- Fernández F. 1997. Albendazole versus ricobendazole (Albendazole-sulphoxide) against enteral and parenteral stages of *Trichinella spiralis* in mice. J. Parasitol. 27: 781-785.

López-Rámirez N. Y. 1999. Evaluación de la actividad de derivados del 1-metilbencimidazol sobre *Trichinella spiralis*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. pp: 41-53.

Martínez- Marañón, R. 1974. Triquinosis en México. Sal. Publ. Méx. 21: 161-165.

Martínez- Marañón, R. 1979. Un pequeño brote familiar de triquinosis en Naucalpan, Méx. Sal. Publ. Méx. 21: 161-165.

Monroy H., Flores-Trujillo M., Benitez E.; Arriaga C. 2001. Swine trichinellosis in slaughterhouses of the metropolitan area of Toluca. Parasite, 8: S249-S251.

Mottier L.; Lanusse C. 2001. Bases moleculares de la resistencia a fármacos antihelmínticos. Med. Vet. 82 (2): 74-85.

Murrel, K. D., Lichtenfels R., Zarlenga D., Pozio, E. 2000. The systematics of *Trichinella* with a key to the species. *Vet. Parasitol.* 93: 293-307.

Navarrete V. J. G. 2004. Diseño, síntesis y actividad antiparasitaria de derivados de 2-(trifluorometil) bencimidazol. Tesis doctoral. Facultad de Química, UNAM. pp: 3-98.

Ortega-Pierres, Arriaga C.; Yépez-Mulia L.. 2000. Epidemiology of Trichinellosis in Mexico, Central and South America. *Vet. Parasitol.* 93(3-4):201-25.

Palmieri O. J. 2001. Enfermedades Infecciosas. Mc Graw Hill. pp.: 475-481.

Pozio E., La Rosa G., Murrell K.D.; Lichtenfels J.R. 1992. Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. *J. Parasitol.* 78(4): 654-659.

Pozio, E. 2000. Factors affecting the flow among domestic, synanthropic and sylvatic cycles of *Trichinella*. *Vet. Parasitol.* 93: 241-262.

Pozio E., Sacchini D., Sacchi L., Tamburrini A.; Alberici F. 2001. Failure of Mebendazole in the treatment of Humans with *Trichinella spiralis* Infection at the Stage of Encapsulating. *Clin. Infect. Dis.* 32: 638-642.

Ribicich M., Chavez M., Carfagnin J., Basso N., Rosa A.; Francisco A. 2004. Estudio de alteraciones histopatológicas en cerdos infectados experimentalmente con *Trichinella spiralis*. In. *Vet.* 6(1): 61-69.

Rigter I. M., Schipper H. G., Koopmans R. P., Van Kan H. J. M., Frijlink H. W, Kager P A.; Guchelaar H. J. 2004. Relative bioavailability of three newly developed Albendazole formulations: a randomized crossover study with healthy volunteers. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48(3): 1051-1054.

Sacchi L., Corona S., Gajadhar A. A.; Pozio E. 2001. Ultrastructural characteristics of nurse cell-larva complex of four species of *Trichinella* in several hosts. *Parasite*. 8: S54-S58.

Silvestre A., Humbert J. F.. 2002. Diversity of benzimidazole- resistance alleles in populations of small ruminant parasites. *J. Parasitol.* 32: 921-928.

Szejtli J. 1991. Cyclodextrin in drug formulations: Part I. *Pharm technol Int.* 3: 15-23.

Szejtli J. 1998. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* 98(5): 1743 – 1754.

Tay Z. J., Lara A. R., Velasco C. O.; Gutierrez Q. M. 1996. *Parasitología Médica*. 6ta edición. Méndez Editores. pp: 3-44, 351-357.

Tay Z. J., Sánchez V. J. T., Ruiz S. D. 2002. Helmintiasis y cisticercosis, *Fac Med UNAM Vol.45 No.3*, Mayo-Junio.

Torres-Acosta J. F., Villarroel-Alvarez M. S., Rodríguez-Arévalo F., Gutiérrez-Segura I.; Alonzo-Díaz M. A. 2003. Diagnóstico de nematodos gastrointestinales resistentes a bencimidazoles e imidazoles en un rebaño caprino de Yucatán, México. *Rev. Biomed.* 14: 75-81.

Vignau M. L. 2004. Triquinosis, Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, UN La Plata. Volumen 14 - N° 82.

Viveros N., Arriaga C., Banda V., Ortega-Pierres M. G.; Yépez-Mulia L. 2001. Detection on *Trichinella* infection in slaughter horses by artificial digestion, ELISA and PCR. *Parasite*: 8, S257-S259.

Webster, L. T. 1991. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8ª ed. Editorial Médica Panamericana; México. pp: 934-953.

Ximénez G. C., Gómez A., Melendro E. I., Rangel F., Ramiro M., Ramos F., Morán P. 2002. Las parasitosis intestinales en México, Cuadernos FUNSALUD, Número 36, Primera edición. Fundación Mexicana para la Salud. pp.:13-35.

Yépez –Mulia L., 1996 Nuevas herramientas en el diagnóstico y en la identificación de parásitos del género *Trichinella*. Gac. Méd. Méx; Volumen 132 (5): 513-517.