



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN ANTIPARASITARIA DE NUEVE PRINCIPIOS DE
SÍNTESIS DERIVADOS DEL ÁCIDO CARBÁMICO UTILIZANDO
COMO MODELO EL CESTODO *Hymenolepis nana* var. *fraterna*
EN RATONES DE LA CEPA CD1 CON INFESTACIÓN INDUCIDA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:
AMÉRICA GUADALUPE BERNABE PÉREZ

ASESOR:
M.C. JUAN PABLO MARTÍNEZ LABAT

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

2007



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.

ÍNDICE GENERAL

| | Pág. |
|--|-----------|
| 1. RESUMEN..... | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 2.1 Tipos de parásitos..... | 6 |
| 2.2 Generalidades de los cestodos..... | 7 |
| 2.2.1 Clasificación de los cestodos..... | 8 |
| 2.2.2 Clase Cestoda..... | 9 |
| 2.3 Características generales: Familia <i>Hymenolepididae</i> | 20 |
| 2.3.1 Descripción general de <i>Hymenolepis spp.</i> | 20 |
| 2.3.2 Descripción del cestodo modelo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 21 |
| 2.3.3 Ciclo biológico de <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 23 |
| 2.4 El diseño de fármacos y el modelado molecular..... | 25 |
| 2.5 Quimioterapia antihelmíntica utilizada en este proyecto..... | 29 |
| 2.5.1 Praciquantel: Generalidades..... | 30 |
| 2.5.2 Los carbamatos, propiedades y características generales..... | 31 |
| 2.5.3 Los bencimidazoles: aspectos generales..... | 34 |
| 2.5.3.1 Importancia de la tubulina y los microtúbulos..... | 40 |
| 2.5.4 Resistencia a los antiparasitarios..... | 46 |
| 2.5.4.1 Características esenciales de resistencia a los fármacos..... | 48 |
| 2.5.4.2 Factores que influyen en la selección de parásitos resistentes a los fármacos..... | 49 |
| 2.5.4.3 Medidas de prevención y control para evitar el desarrollo de resistencia a los fármacos..... | 51 |
| 3. OBJETIVOS | |
| 3.1 Objetivo general..... | 53 |
| 3.2 Objetivo específico..... | 53 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS | |
| 4.1 Material biológico..... | 54 |
| 4.2 Animales experimentales..... | 55 |
| 4.3 Fármacos antiparasitarios..... | 56 |
| 4.3.1 Principios activos de nueva síntesis..... | 56 |
| 4.3.2 Praciquantel..... | 56 |
| 4.4 Integración de los grupos experimentales..... | 57 |
| 4.5 Revisión intestinal..... | 58 |
| 4.6 Análisis de resultados..... | 58 |
| 5. RESULTADOS..... | 59 |
| 6. DISCUSIÓN..... | 84 |
| 7. CONCLUSIONES..... | 92 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA..... | 94 |

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS

Pág.

FIGURAS

| | |
|---|----|
| Fig. 1 Esquema general de un cestodo..... | 10 |
| Fig. 2 Capas que conforman el tegumento de los cestodos..... | 12 |
| Fig. 3 Estructura del aparato excretor en los proglótidos de un cestodo..... | 15 |
| Fig. 3a Detalle de la localización de la célula flama (transversal) en el aparato excretor..... | 15 |
| Fig. 4 Esquema general del escolex que detalla la ubicación del sistema nervioso en los cestodos..... | 16 |
| Fig. 4a Esquema que muestra la ubicación de los troncos nerviosos en los proglótidos de un cestodo..... | 16 |
| Fig. 5 Disposición anatómica general de la ubicación de los aparatos reproductores en un proglótido maduro de cestodo..... | 17 |
| Fig. 6 Estructura general del aparato reproductor masculino y sus componentes..... | 18 |
| Fig. 7 Estructura general del aparato reproductor femenino y sus componentes..... | 19 |
| Fig. 8 Fotografía del escolex de <i>H. nana</i> obtenida por microscopía electrónica..... | 21 |
| Fig. 8a Esquema representativo del cisticercoide de <i>H. nana</i> | 21 |
| Fig. 8b Fotografía del huevo de <i>H. nana</i> , obtenida por microscopio óptico..... | 21 |
| Fig. 9 Ciclo biológico de <i>Hymenolepis nana</i> | 23 |
| Fig. 10 Estructura química del prazicuantel..... | 31 |
| Fig. 11 Mecanismo de liberación de la Acetilcolina..... | 34 |
| Fig. 12 Molécula α -D-ribofuranacil..... | 35 |
| Fig. 13 Estructura general de la molécula de los bencimidazoles..... | 36 |
| Fig. 14 Estructura de las moléculas que conforman los bencimidazol carbamatos..... | 38 |
| Fig. 15 Esquema representativo del acomodo de las subunidades de α y β tubulina..... | 41 |
| Fig. 15a Imagen tomada por microscopía electrónica de los microtúbulos celulares..... | 41 |
| Fig. 16 Representación esquemática de la participación de los microtúbulos en la división celular..... | 43 |
| Fig. 17 Rutas generales de metabolización y eliminación de los bencimidazol carbamatos..... | 45 |

TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1 Resultados después de suministrar el principio IRE1A a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 60 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Tabla 2 Resultados después de suministrar el principio IRE2A a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 62 |
| Tabla 3 Resultados después de suministrar el principio IRE2B a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 64 |
| Tabla 4 Resultados después de suministrar el principio IRE4A a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 66 |
| Tabla 5 Resultados después de suministrar el principio IRE5A a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 68 |
| Tabla 6 Resultados después de suministrar el principio IRE6A a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 70 |
| Tabla 7 Resultados después de suministrar el principio IRE6B a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 72 |
| Tabla 8 Resultados después de suministrar el principio IRE7B a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 74 |
| Tabla 9 Resultados después de suministrar el principio IRE8B a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 76 |
| Tabla 10 Mejores resultados obtenidos en orden descendiente (por cada lote de desafío) entre los principios activos derivados del ácido carbámico a prueba y el pracicuantel..... | 79 |
| Tabla 11 Resultados del primer ensayo después del suministro del pracicuantel ajustado a 10 y 20 veces más de la dosis recomendada a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 80 |
| Tabla 12 Resultados del segundo ensayo después del suministro del pracicuantel ajustado a 10 y 20 veces más de la dosis recomendada a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 82 |

GRÁFICAS

| | |
|--|----|
| Gráfica 1 Representación gráfica de la eficiencia antiparasitaria después de suministrar el principio IRE1A a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 61 |
| Gráfica 2 Representación gráfica de la eficiencia antiparasitaria después de suministrar el principio IRE2A a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 63 |
| Gráfica 3 Representación gráfica de la eficiencia antiparasitaria después de suministrar el principio IRE2B a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 65 |
| Gráfica 4 Representación gráfica de la eficiencia antiparasitaria después de suministrar el principio IRE4A a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 67 |
| Gráfica 5 Representación gráfica de la eficiencia antiparasitaria después de suministrar el principio IRE5A a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 69 |

| | |
|---|----|
| Gráfica 6 Representación gráfica de la eficiencia antiparasitaria después de suministrar el principio IRE6A a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 71 |
| Gráfica 7 Representación gráfica de la eficiencia antiparasitaria después de suministrar el principio IRE6B a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 73 |
| Gráfica 8 Representación gráfica de la eficiencia antiparasitaria después de suministrar el principio IRE7B a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 75 |
| Gráfica 9 Representación gráfica de la eficiencia antiparasitaria después de suministrar el principio IRE8B a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 77 |
| Gráfica 10 Representación gráfica de la eficiencia antiparasitaria del primer ensayo después del suministro del pracicuantel ajustado a 10 y 20 veces más de la dosis recomendada a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 81 |
| Gráfica 11 Representación gráfica de la eficiencia antiparasitaria del segundo ensayo después del suministro del pracicuantel ajustado a 10 y 20 veces más de la dosis recomendada a ratones infestados con la forma adulta del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> var. <i>fraterna</i> | 83 |

1. RESUMEN

La creación o mejora de productos antiparasitarios surge como una necesidad para los laboratorios farmacéuticos a partir, principalmente, de la aparición de problemas de resistencia parasitaria a los productos comerciales utilizados regularmente. Las investigaciones y mejoras realizadas, tienen como finalidad encontrar un fármaco que sea la mejor opción de tratamiento para las enfermedades parasitarias, y aportar un producto efectivo al arsenal quimioterápico de fármacos antiparasitarios eficaces.

Este trabajo fue desarrollado para evaluar la presencia de actividad antiparasitaria en nueve principios activos de síntesis orgánica, derivados del ácido carbámico (bencimidazol carbamatos), fármacos producidos por la FES Cuautitlán, usando cestodos como modelo biológico. Estudios realizados previamente, han demostrado que estos compuestos, pertenecientes a la misma familia, poseen propiedades anticestódicas semejantes a las del praziquantel.

Se utilizaron ratones machos singénicos de tres semanas de edad, a los cuales se les indujo una infestación con el cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*. Se realizó una comparación de eficacia antiparasitaria: praziquantel a dosis de 5 mg/kg y diferentes dosis de los nueve principios de nueva síntesis, que partían desde los 5, 10, 20, 50 y 100 mg/kg a dosis simples y de estas dos últimas dosis duplicadas. El producto comercial que contenía praziquantel obtuvo un 41% de eficacia antiparasitaria en general, siendo superior en un 18% respecto a los fármacos de nueva síntesis (tuvieron el 23% de eficacia en promedio). El principio activo a prueba que mejor funcionó, fue el denominado IRE2B con un 50% de eficacia antiparasitaria a dosis simple de 20mg/kg, sin mortalidad.

El cestodo modelo utilizado es difícil de eliminar, aún con bencimidazólicos conocidos como el albendazol y mebendazol. Es común que los esquemas de tratamiento con anticestódicos, consten de dosis repetidas para la eliminación del 100% de los parásitos, sería adecuada la repetición de las dosis de los productos a prueba (que mejores resultados obtuvieron) para lograr la eliminación total de

los cestodos. La solubilidad del producto tuvo una influencia definitiva en los resultados, ya que al ser fármacos prácticamente insolubles en agua, no fue fácil la administración de la suspensión por su difícil homogenización a partir de un producto con presentación en polvo.

2. INTRODUCCIÓN

Desde que se han ido presentando las enfermedades parasitarias, se les han dado diferentes tratamientos para su control y erradicación. Los parásitos que afectan a los humanos, fueron el primer foco de interés para generar productos antiparasitarios efectivos (*Bennet-Jenkins et al. 1996*). Actualmente, en la medicina veterinaria, las afecciones parasitarias son una causa importante de pérdidas debido a morbilidad y mortalidad de animales, reducción de niveles de producción y productividad, alteraciones reproductivas y los altos costos de control que esto implica, entre otros; dichas afecciones también están presentes en las especies que conviven continuamente con el humano, como mascotas o especies ornamentales (*FAO, 2003*). Las parasitosis diversas de las que hablamos, están originadas por la presencia de protozoos y metazoos parásitos, estos últimos organismos pluricelulares que incluyen grupos con diferente nivel evolutivo, entre los que se sitúan los helmintos (nematodos, cestodos, acantocéfalos) y los artrópodos, encontrando que algunos de ellos generan zoonosis y ocasionan serios problemas salud pública (*FAO, 2003*).

Los últimos 30 años se han caracterizado por la generación de muchas estrategias de control de endo y ectoparásitos que afectan a muchas especies, éstas tienen como principal objetivo eliminar o reducir ampliamente las poblaciones de parásitos con el uso de fármacos y/o productos químicos (*FAO, 2003; Minero, 1997*). Resulta fácil instaurar una estrategia de control cuando la economía de un país o región se encuentra en apogeo, los fármacos son eficaces y el productor se encuentra dispuesto a colaborar (*FAO, 2003*). La situación cambia radicalmente, cuando hay problemas de financiamiento y el productor debe afrontar otras prioridades dando origen a abusos en el uso de productos que se adquieren a un precio más económico o que se tienen al alcance de la mano, entonces; el uso indiscriminado, dosis inadecuadas y/o condiciones ambientales adversas, propician que las poblaciones parasitarias generen resistencia de diversas maneras. Ésta se define, ampliamente, como la habilidad de una

población de parásitos para tolerar dosis de productos tóxicos que serían letales para la mayoría de individuos en una población normal (susceptible) de la misma especie (FAO, 2003). El desarrollo constante de nuevos principios para control antiparasitario, tiene como fin encontrar estrategias que permitan el uso prudente de un principio activo con acciones conjuntas que faciliten el uso racional del mismo, para que éste tenga un funcionamiento eficaz con el mínimo de efectos indeseables tanto para el paciente como para el medio ambiente (Pereyra, 2004).

Como se citó anteriormente, las enfermedades parasitarias son un problema de salud pública de gran magnitud, y el problema es similar cuando de animales domésticos se trata (Köhler, 2001). En resumen, los helmintos en general, son la causa más marcada de serias pérdidas económicas, particularmente en áreas donde se practica el pastoreo extensivo. Las compañías farmacéuticas han mejorado la seguridad y ampliado el espectro de los antihelmínticos, con esto han ayudado a reducir la incidencia de gran número de enfermedades parasitarias (Köhler, 2001). Actualmente ha habido un sustancial progreso en la terapia antihelmíntica, se han desarrollado nuevos productos antiparasitarios y se han encontrado las dosis, el grado de eficacia y la seguridad en ellas, como en sus predecesores. Los antihelmínticos modernos son altamente eficaces, tanto en fases parasitarias maduras como inmaduras, así como en especies de helmintos gastrointestinales y en aquellos que son extraintestinales. Muchos de esos fármacos son bastante bien tolerados por el hospedero y en algunos casos los tratamientos solo requieren de dosis únicas, así como de pequeñas cantidades (Köhler, 2001). La mayoría de los nuevos productos desarrollados afectan bioquímica y fisiológicamente a sitios blanco de los parásitos como las proteínas estructurales, canales de iones, enzimas y transporte de moléculas (Köhler, 2001). Los blancos encontrados como “adecuados” en los helmintos, incluyen procesos como: actividad muscular y coordinación neuromuscular, procesos sensoriales, alimentación y la regulación de la presión celómica, por ejemplo. Hay algunos otros blancos quimioterapéuticos potenciales que incluyen metabolismo

energético, obtención de nutrientes, metabolismo de ácidos nucleicos y algunas rutas anabólicas (Geary et al. 1999).

Se ha mencionado el gran avance en el desarrollo de nuevos productos antiparasitarios, sin embargo, hay que tener en cuenta que la generación y propagación de resistencia ha desgastado la utilidad de los antihelmínticos disponibles (aún siendo de nueva generación), favoreciendo la reducción de opciones de tratamiento. Los productos nuevos que formarán parte del arsenal quimioterápico, que están todavía en investigación y desarrollo, deberán de ser diseñados o producidos de tal forma que disminuyan estos aspectos adversos para el combate eficaz de las parasitosis.

El cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*, es difícil de erradicar del hospedero (Andrews et al., 1979), pero no han habido reportes de resistencia como tal a los fármacos antiparasitarios utilizados para su control y eliminación. Se ha encontrado recientemente que otros cestodos, principalmente de perros y gatos, persisten en sus hospederos aún después de la desparasitación con fármacos utilizados para tratar las cestodosis (p.ej. pranicuante) a las dosis recomendadas (Balbuena et al., 2004), por lo cual, es importante generar nuevos principios activos que amplíen las opciones para el tratamiento de este tipo de parasitosis, y no solo se limite al uso de unos cuantos productos, ya que se estaría propiciando la resistencia de los parásitos a dichos fármacos.

2.1 Tipos de parásitos

Bajo la condición de parásitos existen una gran variedad de organismos en la naturaleza. La parasitología cubre grupos definidos entre los que se incluyen: los protozoarios, helmintos y artrópodos.

La distinción más general en la morfología, está dada por el número de células que los componen. Existen protozoos y metazoos parásitos. Los primeros constituidos por una célula, y los últimos pluricelulares que incluyen grupos con diferente nivel evolutivo entre los que se sitúan los helmintos (nematodos, cestodos, acantocéfalos) y los artrópodos. En estos últimos organismos se

considera una estructuración célula-tejido-aparato-sistema que integra al individuo, de diferente nivel evolutivo, con más o menos propiedades o componentes (Minero, 1997).

A continuación, se describe el grupo de los helmintos, por su importancia en este trabajo:

Los helmintos son animales invertebrados, de vida libre o parasitaria, conocidos como gusanos. El término helminto deriva de las palabras griegas *helmins* o *helmentos* y significa vermes, dicho término no tiene un significado zoológico claramente definido. Se utiliza para denominar popularmente a muchas variedades de pequeños animales invertebrados, carentes de extremidades, con cuerpo blando y alargado. El término helminto se restringe a los vermes parásitos, por lo tanto, éstos se definen como organismos que viven sobre o dentro de otros, a partir de los cuales obtienen parte o todos sus nutrientes orgánicos, éstos presentan habitualmente cierto grado de modificación estructural adaptativa y producen un daño real a su hospedador (Kassai, 1998).

Principalmente se distinguen los *Platyhelminthes* o gusanos aplanados, y los *Nematelminthes* o gusanos cilíndricos. La forma etimológica y correcta del nombre del phylum es *Platyhelminthes*, que deriva de dos voces griegas: *Platys*: plano y *helminthes*: gusano (Lamothe, 1983). Los *Platyhelminthes* incluyen a los trematodos y los cestodos, los platelmintos en general, se caracterizan por su aspecto aplanado o acintado, con simetría bilateral y sin cavidad celómica. Con excepción de algunas planarias, todos son parásitos. Los trematodos son platelmintos cuyas fases adultas son aplanadas dorsoventralmente y tienen un aspecto ovalado o foliáceo. Presentan una ventosa muscular peribucal y una ventosa ventral o acetábulo, casi todos son hermafroditas. Los cestodos son aplanados dorsoventralmente, semejan cintas y por ello se les denomina tenias; son de tamaño variable, pero de constitución anatómica semejante, en la cual se puede diferenciar el escolex, el cuello y el estróbilo. Los nematodos son

cilíndricos, alargados y aguzados en los extremos, de sección redonda con simetría bilateral, no segmentados y de tamaño variable (Minero, 1997).

Por ser el cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*, el organismo empleado como modelo en este trabajo, profundizaremos en la descripción del grupo a que pertenece.

2.2 Generalidades de los cestodos

Estos platelmintos son exclusivamente parásitos del intestino de vertebrados en estado adulto. No cuentan con una epidermis ciliada, pero sí con una cutícula especializada, órganos adhesivos en el extremo anterior, cuerpo segmentado, cada segmento o proglótido cuenta con un juego de órganos reproductores masculinos y femeninos, carecen de aparato digestivo, circulatorio y respiratorio, el excretor y nervioso apenas representados, el reproductor bien desarrollado, ciclos de vida complejos en los que intervienen dos o más hospederos. El huevo contiene un embrión hexacanto (6 ganchos). Se conocen aproximadamente 3,500 especies (Lamothe, 1983).

⇒ **2.2.1 Clasificación de los cestodos** (Lamothe, 1983).

- **Phylum: Platyhelminthes.** Organismos con cuerpo aplanado dorsoventralmente.
- **Clase: Cestoda.** Con cuerpo generalmente segmentado.
- **Subclase: Eucestoda.** Cuerpo con escolex, cuello y estróbilo, sin aparato digestivo.

Incluye éstos órdenes:

- 1. Protocephallidea**
- 2. Tetraphyllidea**
- 3. Lecanicephaloidea**
- 4. Pseudophyllidea**
- 5. Trypanorhyncha**
- 6. Cyclophyllidea**

- Familias:
 - **Mesocestoididae**
 - **Anoplocephalidae**
 - **Devaineidae**
 - **Dilepididae**
 - **Hymenolepididae**
 - *Hymenolepis nana*
 - *Hymenolepis diminuta*
 - *Hymenolepis microstoma*
 - **Taeniidae**
 - **Pseudophyllidae**
 - **Diphyllobotriidae**

7. Aporidea

8. Nippotaeniidea

9. Caryophyllidea

10. Spathebothridea

⇒ 2.2.2 **Clase: Cestoda** (*Lamothe, 1983*)

- *Características generales*

Los cestodos presentan un cuerpo acintado, aplanado en sentido dorsoventral, en el que se observan tres regiones bien definidas: el escolex, el cuello y el estróbilo o cuerpo. En la mayoría el estróbilo es segmentado (proglótidos) (*Lamothe, 1983; Kassai, 1998*). Las estructuras internas de los cestodos incluyen: pared del cuerpo, parénquima, musculatura, sistema osmorregulador, sistema nervioso, aparato reproductor masculino y femenino (*Quiroz, 2005*).

- *Localización:* Los adultos de la mayoría de las especies de cestodos se localizan en el intestino delgado, fijados a la mucosa por medio de su escolex (*Kassai, 1998*).
- *Tamaño:* Por lo general son pequeños, pero pueden medir desde 1mm hasta varios metros (*Lamothe, 1983*).
- *Color:* Por regla general son blancos o blanco amarillentos (*Lamothe, 1983*).

- *Escolex*: El escolex o región cefálica es un órgano de fijación característico de los cestodos está provisto de diferentes estructuras adhesivas como botrias, botridios, ventosas o ganchos (*Lamothe, 1983*). Las ventosas o acetábulos son característicos de los *Cyclophyllidea*, y se presentan como 4 depresiones musculosas. Con frecuencia presentan ganchos arreglados en una o dos hileras, llamadas rostelo (que puede estar armado por una o más coronas concéntricas de ganchos) cuyo número, forma y disposición son de importancia taxonómica (*Lamothe, 1983; Kassai, 1998*).
- *Cuello*: Esta porción situada inmediatamente abajo del escolex, no es segmentada, su función es generar el proceso de estrobilación para formar nuevos proglótidos (*Lamothe, 1983*) (Fig. 1).

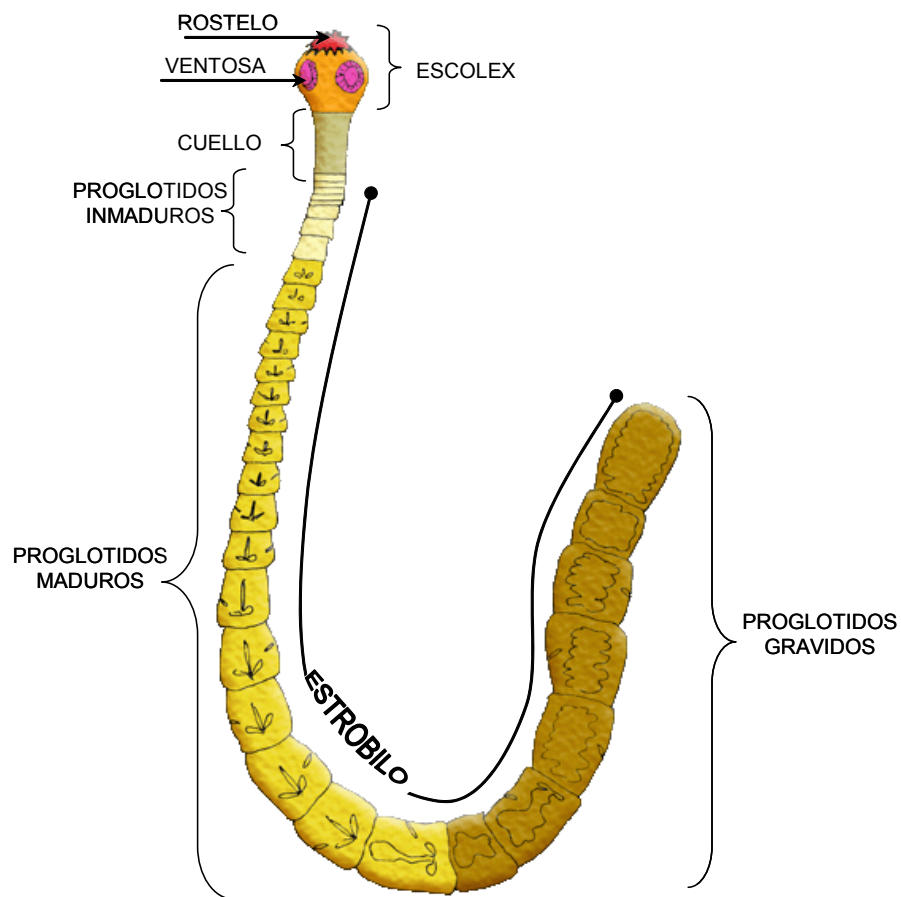
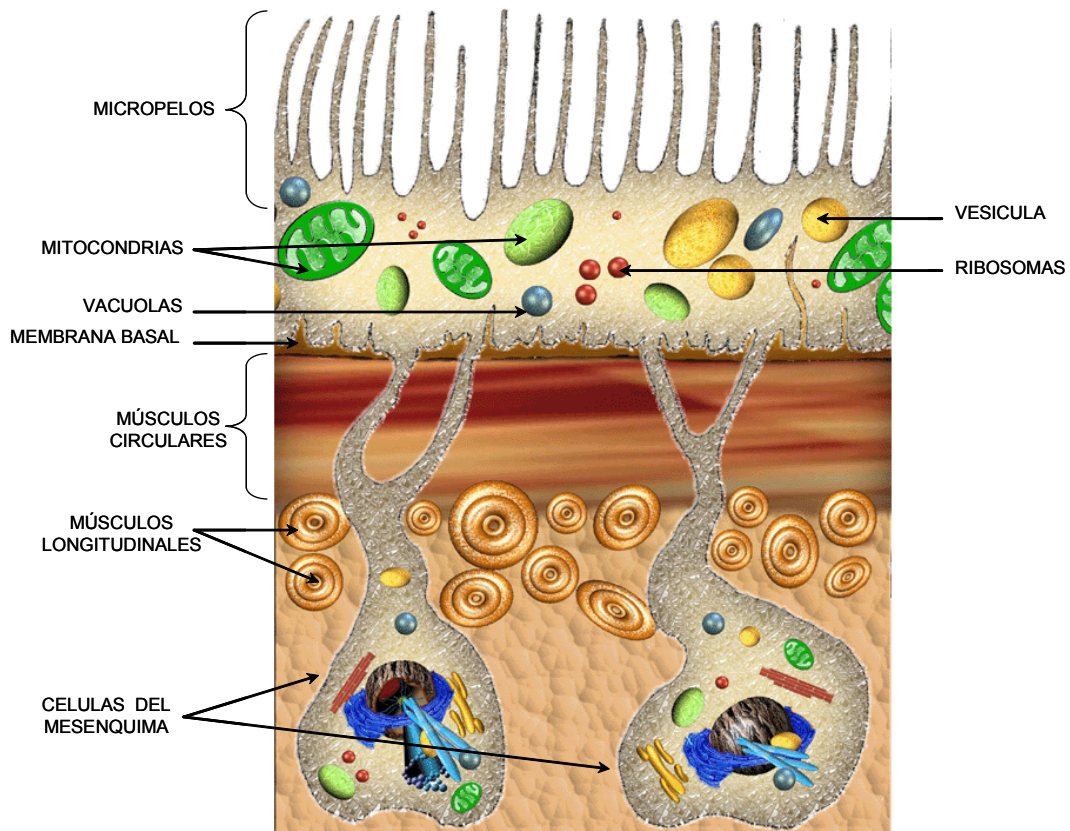


Fig. 1. Esquema general de un cestodo (*A.G.B.P., 2007*).

- *Estróbilo:* El estróbilo o cuerpo propiamente dicho, está constituido, generalmente, por una especie de segmentos o proglótidos que varían según la edad y la especie, se pueden distinguir tres zonas. La primera, cercana al cuello, que presenta segmentos inmaduros; la media, en donde los segmentos son maduros, es decir, se observan los órganos reproductores; y la posterior, en donde se observan proglótidos grávidos, éstos de mayor tamaño, en donde el útero se encuentra hipertrofiado por estar lleno de huevos. (*Lamothe, 1983*). Los proglótidos maduran a medida que avanzan por el estróbilo (*Kassai, 1998*). Cada segmento maduro es una unidad hermafrodita compleja que contiene una o dos dotaciones de órganos femeninos y varios masculinos (*Kassai, 1998; Quiroz, 2005*). Los proglótidos grávidos o seniles, ocupan la porción posterior del parásito, la mayoría de los órganos genitales se atrofian por la presión que ejerce el útero lleno de huevos o las cápsulas ovígeras que llegan a ocupar gran parte del proglótido grávido (*Quiroz, 2005*). Los proglótidos pueden contener huevos aislados, fragmentos del útero (fragmentos parauterinos) con los huevos o paquetes de huevos o cápsulas ovígeras (*Kassai, 1998*). Estos proglótidos se desintegran o se desprenden para ser eliminados en las heces (*Quiroz, 2005*). En algunos cestodos el estróbilo está formado por un proglótido de cada tipo; entonces se le llama monozoico, otras veces tienen docenas o cientos de proglótidos de cada tipo y entonces se les denomina polizoicos (*Quiroz, 2005*).
- *Tegumento* (Fig. 2): Los cestodos dependen únicamente de su tegumento para la adquisición de alimento (*Halton, 1997*), éste es su principal órgano digestivo y de absorción (*Jones, 1998*). Como enteroparásitos, estos viven en ambientes que son generalmente ricos en nutrientes de bajo peso molecular, siempre abundantes por la forma de nutrición del hospedero. Esto ha sido una ventaja para dichos parásitos, ya que explotan la superficie de su cuerpo como un “sistema” para obtener alimento, porque al carecer de intestino desarrollaron un mecanismo interno para la

obtención de nutrientes (*Halton, 1997*). La pared del cuerpo está formada por varias capas; una externa llamada cutícula, de la que es parte el tegumento, y que tiene uno o más estratos, de aspecto transparente sin poros (*Quiroz, 2005*). Haciendo una comparación, el tegumento de un parásito plano tiene funciones de absorción similares a las de la mucosa intestinal de los mamíferos, pero tienen funciones más complejas (*Jones, 1998*). Este tegumento posee un borde de micropelos el cual es análogo a las microvellosidades intestinales, estos micropelos son únicos en los cestodos (*Jones, 1998*). La membrana plasmática que delimita estas estructuras mueve moléculas que son fáciles de transportar como azúcares, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos (*Halton, 1997*). El parénquima de los cestodos es un tejido sólido que contiene células, principalmente miocitos, alrededor de una extensa matriz extracelular (*Jones, 1998*). El amplia área de superficie de los parásitos aplanados y la corta distancia de difusión, favorecen la absorción de nutrientes a través de la superficie (*Kearn, 1998*). La superficie de absorción puede incrementarse hasta diez veces debido a que los micropelos, y otras modificaciones morfológicas y bioquímicas, han evolucionado para facilitar el transporte eficiente dentro del parásito y cubrir sus necesidades nutricionales (*Halton, 1997*).



Fig

. 2. Capas que conforman el tegumento de los cestodos (A.G.B.P., 2007).

La capa citoplasmática, de la cual los microvellos derivan, es un sincitio con dos niveles: uno externo con numerosos organelos como mitocondrias, ribosomas, vacuolas y gránulos etc., y uno interno comunicado por puentes al exterior, consistiendo principalmente de citones con citoplasma perinuclear, ambos divididos por una lámina basal, debajo de la cual se encuentra la musculatura, constituida por una capa externa de músculos circulares y una interna de músculos longitudinales (Lamothe, 1983). Una delgada capa de células neuromusculares está debajo de la anterior, que continúa por una capa subcuticular compuesta de células bipolares, alargadas o epidérmicas situadas a varias profundidades (Quiroz, 2005).

El parénquima es el espacio que encierra el cuerpo independientemente de las estructuras osmorreguladoras, fibras musculares, sistema nervioso y

reproductor. Las células parenquimatosas sirven de reserva de glicógeno y entre ellas hay abundante fluido (*Lamothe, 1983; Quiroz, 2005*).

- **Nutrición:** La absorción se realiza a través de los tegumentos donde intervienen de una manera directa los micropelos. Las reservas de glicógeno representan un 60% de su cuerpo (*Lamothe, 1983*). Existen evidencias de estudios realizados *in vitro* que sugieren una compleja relación nutricional entre hospedero y cestodo. Hay que considerar dos aspectos: primero, los cestodos como las plantas y algunos protozoarios, son capaces de fijar el CO₂, dando como consecuencia una eficiente utilización de material de la mucosa intestinal del hospedero; es conocida la alta actividad metabólica que tienen las células de la mucosa, asociadas sin duda al alto nivel de CO₂ intestinal. El segundo aspecto observado es que los cestodos son capaces de tomar el material nutritivo por contacto directo con la mucosa intestinal. Tanto el escolex como el estróbilo tienen capacidad para absorber nutrientes de la mucosa intestinal. Este proceso se conoce parcialmente, aunque se considera que el tegumento del parásito solamente ingiere partículas de moco o detritus celulares por pinocitosis (*Quiroz, 2005*). Otra alternativa que se considera es que el escolex secreta enzimas proteolíticas u otras enzimas, que atacan la mucosa intestinal y las células degeneradas o las secreciones de moco, incluyendo en algunos casos la digestión de la membrana. Los cestodos utilizan su estróbilo para obtener nutrientes del medio en donde viven, o sea material semilíquido y semidigerido, el cual es absorbido por difusión, transporte activo y posiblemente pinocitosis por medio del tegumento. Posteriormente los materiales nutritivos disponibles en el intestino son suplementados con carbono y oxígeno obtenidos del CO₂ y materiales relacionados con la interfase hospedero - parásito (*Quiroz, 2005*).
- **Metabolismo respiratorio:** Carecen de un aparato respiratorio diferenciado; la respiración es anaerobia, y utilizan el glicógeno como fuente de energía (*Lamothe, 1983*)

- *Carecen de aparato circulatorio (Lamothe, 1983).*
- *Aparato excretor (Fig. 3 y 3a): Es de tipo protonefridial o en células flama (llamadas así por su movimiento). Está constituido por 4 vasos colectores longitudinales principales, 2 ventrolaterales y 2 dorsolaterales, los primeros se unen entre sí, por medio de un canal transversal, en la parte inferior de cada proglótido (Lamothe, 1983). El líquido colectado por las células flama, entre ellos agua y excreciones, es lanzado a los tubos de mayor calibre para llegar al exterior del último proglótido y ser eliminado al exterior del parásito (Quiroz, 2005).*

Fig. 3. Estructura del aparato excretor en los proglótidos de un cestodo (A.G.B.P., 2007).

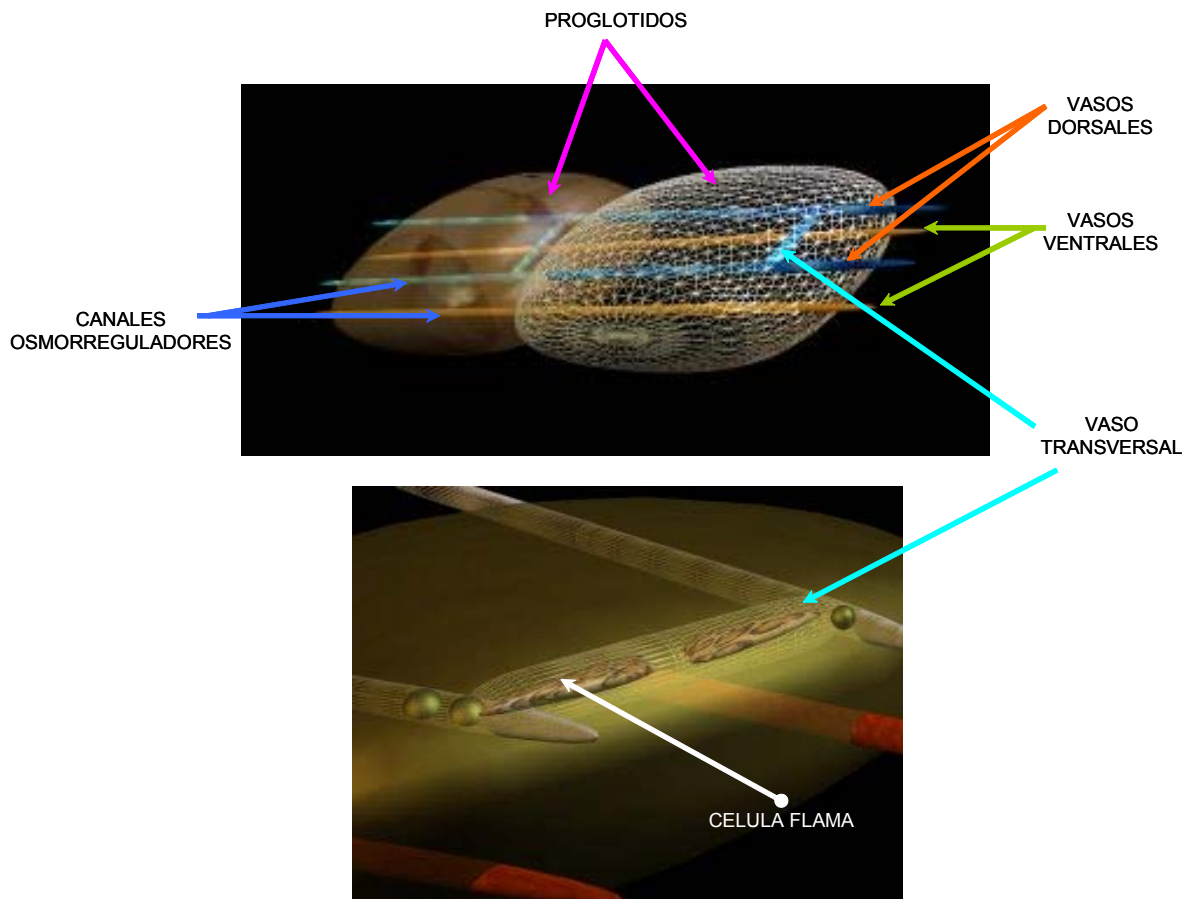


Fig. 3a. Detalle de la localización de la célula flama (transversal) en el aparato excretor (A.G.B.P., 2007).

Sistema nervioso (Fig. 4 y 4a): Considerando que carecen de coordinación, el sistema nervioso de los cestodos consiste, básicamente, en un ganglio cerebroide (denominado así por que regula las funciones vitales del organismo con células semejantes a neuronas) y está situado en el escolex, de forma más o menos rectangular, del que parten 4 troncos nerviosos longitudinales, 2 ventrolaterales y 2 dorsolaterales más delgados, unidos entre sí por comisuras transversales a nivel de cada proglótido. Los nervios que salen del ganglio cerebroide inervan los músculos, tegumentos y órganos reproductores. Recientemente se ha demostrado que existen terminaciones nerviosas sensoriales, morfológicamente semejantes a las de otros invertebrados, aunque su exacto mecanismo funcional es aún desconocido (Lamothe, 1983).

Fig. 4. Esquema general del escolex que detalla la ubicación del sistema nervioso en los cestodos (A.G.B.P., 2007).

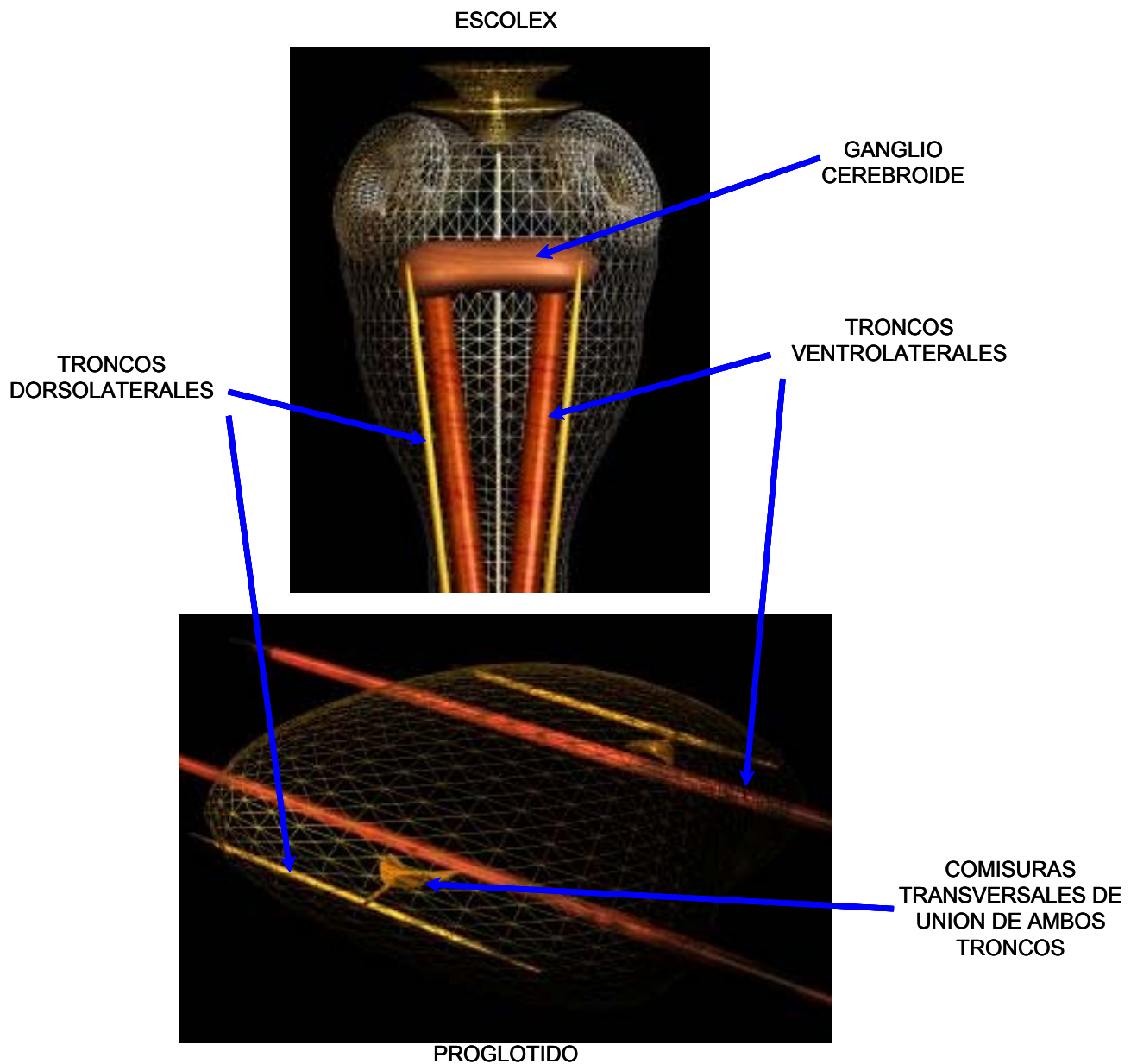


Fig. 4a. Esquema que muestra la ubicación de los troncos nerviosos en los proglótidos de un cestodo (A.G.B.P., 2007).

- *Aparatos reproductores* (Fig. 5): Los cestodos son reproductores altamente prolíficos, y este enorme potencial reproductivo en muchas especies origina, asimismo, la capacidad de replicar su sistema reproductivo. Muchos cestodos copian uno o más veces su sistema reproductivo en muchos de sus segmentos somáticos. Este proceso puede ser repetido con gran velocidad, generando muchos cientos o miles de segmentos,

frecuentemente con una pequeña variación entre éstos, excepto por desviaciones en la localización de los poros (senos) genitales, así como el número y lugar de algunas gónadas (Jones, 1998).

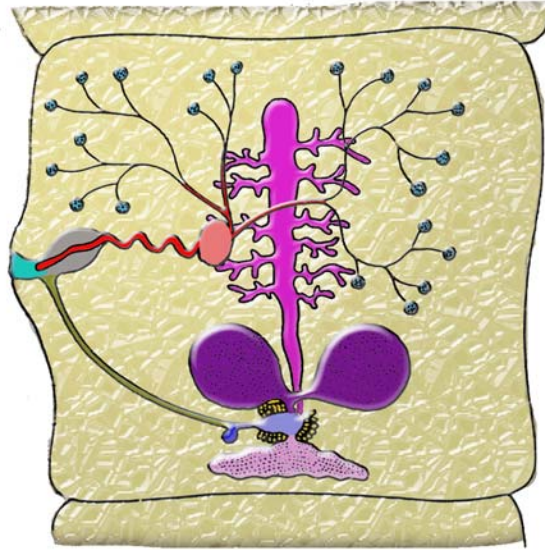


Fig. 5. Disposición anatómica general de la ubicación de los aparatos reproductores en un proglótido maduro de cestodo (A.G.B.P., 2007).

- *Aparato reproductor masculino* (Fig. 6): Este consiste de uno, dos o numerosos testículos. En la mayoría de los cestodos, están situados en el parénquima medular, de cada testículo sale un conducto eferente, este se ensancha para constituir una vesícula seminal que entra, por regla general, a un cirro junto con las glándulas prostáticas. En algunas especies puede existir una vesícula seminal externa, además de una interna, la bolsa del cirro desemboca a un atrio genital y éste al poro genital que se encuentra localizado, casi siempre lateralmente en el proglótido (Lamothe, 1983).

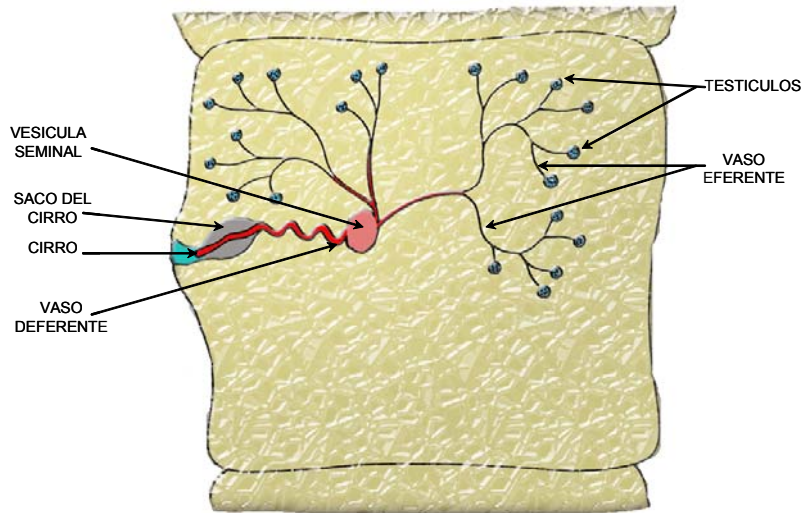


Fig. 6. Estructura general del aparato reproductor masculino y sus componentes (A.G.B.P., 2007).

- Aparato reproductor femenino* (Fig. 7): Consiste por lo general, de un solo ovario, lobulado o no, del cual parte un oviducto que llega al ootipo, que se encuentra rodeado por unas glándulas unicelulares llamadas de Mehlis, dichas glándulas secretan una membrana muy delgada alrededor del cigoto y están asociadas a las glándulas vitelinas o vitelógenas. La formación de la cutícula o cascarón del huevo es completada en el interior de las glándulas vitelinas (Schmid, 2000). El ootipo recibe la desembocadura del viteloducto, que resulta de la unión de varios conductos que vienen en las glándulas vitelógenas, cuya situación varía según las especies. La vagina llega al ootipo, ésta se ensancha y constituye un receptáculo seminal. Del ootipo sale el útero, que, por regla general es ciego; la vagina se inicia en el poro genital común. Durante la cópula, el cirro de un proglótido se introduce en la vagina de otro proglótido del mismo gusano, o de otro, cuando existen varios individuos en un hospedero (Lamothe, 1983).

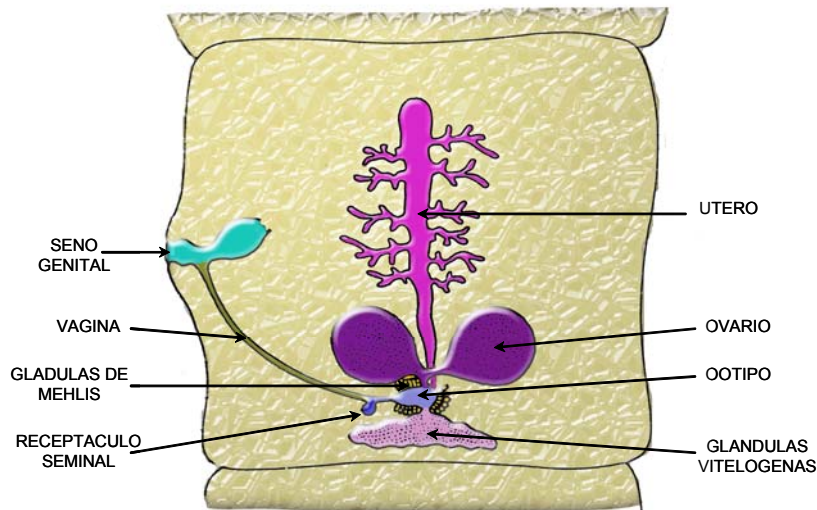


Fig. 7. Estructura general del aparato reproductor femenino y sus componentes (A.G.B.P., 2007).

- *Ciclo de vida:* Generalmente requieren de uno o dos hospederos intermediarios (Lamothe, 1983). El ciclo biológico es indirecto. En el orden *Cyclophyllidea*, el embrión hexacanto u oncósfera no tiene cilios y permanece dentro de la cubierta del huevo hasta que es ingerido por el hospedero intermediario vertebrado o invertebrado (Quiroz, 2005). Posteriormente el embrión evoluciona a una de las fases larvarias o metacestodos que se desarrolla en un hospedador intermediario y al final se convierte en adulto en el hospedero definitivo (Kassai, 1998).
- Tipos de estadios larvarios infectantes (metacestodos) de los cestodos *Cyclophyllidea* (Kassai, 1998).
 - *Cisticerco:* vesícula llena de líquido con un escolex invaginado (Kassai, 1998).
 - *Estrobilocerco:* pequeña vesícula unida a un escolex evaginado mediante un tejido sólido, segmentado y largo similar a un estróbilo juvenil (Kassai, 1998).
 - *Cisticercoide:* un escolex evaginado embebido en una pequeña vesícula sólida (Kassai, 1998).

- *Tetraridio*: un escolex invaginado con una larva sólida, vermiforme (Kassai, 1998).
- *Cenuro*: vesícula llena de líquido y tapizada internamente por una membrana germinal a partir de la cual se forman por gemación numerosos protoescolex, que permanecen unidos a la pared (Kassai, 1998).
- *Quiste hidatídico* (metacestodo de *Echinococcus spp.*): vesícula llena de líquido con una pared cuticular laminar tapizada internamente por una membrana a partir de la cual se forman por gemación numerosos protoescolex libres o en grupos (Kassai, 1998).

2.3 **Características generales:** Familia ***Hymenolepididae*** (Dunn, 1978).

⇒ 2.3.1 **Descripción general de *Hymenolepis spp.***

- *Hospederos definitivos*: Las aves, los mamíferos y el hombre.
- *Hospederos intermediarios*: Una gran variedad de artrópodos, entre los que tenemos a las tijeretas (*Anisobis*), los escarabajos estercoleros, los miriápodos (*Fontaria* y *Janus*), las pulgas (*Ctenocephalides*), las polillas (*Pyralis*) y los copépodos (*Cyclops*).
- *Localización dentro del hospedero*: Intestino delgado.
- *Distribución geográfica*: Mundial

⇒ 2.3.2 **Descripción del cestodo modelo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*** (Fig. 8, 8a, 8b).

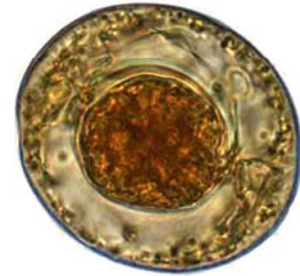


Fig. 8. Cestodo adulto

Fig. 8a. Cisticercoide

Fig. 8b. Huevo

Fig. 8. Fotografía del escolex de *H. nana* obtenida por microscopía electrónica (<http://www.stanford.edu>). Fig. 8a. Esquema representativo del cisticercoide de *H. nana* (Kearn, 1998). Fig. 8b. Fotografía del huevo de *H. nana*, obtenida por microscopio óptico (<http://www.helsenr.no>).

Hymenolepis nana parasita a los ratones y al hombre (Dunn, 1978). Este parásito se describe como un cestodo pequeño, raramente excede los 40mm de largo por 1mm de ancho, es llamado la “*tenia enana*” del humano y es comúnmente vista en niños que se contaminan con heces e ingieren accidentalmente los huevos del parásito (Kearn, 1998). *Hymenolepis nana* var. *fraterna* es un cestodo similar al del humano, pero sólo parasita a los ratones e infecta a otros animales, no se ha demostrado completamente que ésta variedad parasite al humano, por lo tanto es considerada como una especie morfológicamente igual (Henderson et al. 1987).

Es conocido que las ratas y ratones ingieren heces, este hábito facilita el desarrollo del ciclo de vida al cestodo *Hymenolepis nana*, parásito del ratón. En las heces van los huevos de dicho parásito, y son ingeridos por algunos escarabajos, en su cavidad hemocélica se origina el cisticercoide. El huevo de este parásito es de forma ovoide, mide 50µm de largo y en su interior se encuentra el embrión que posee un botón en cada extremo. Estos botones tienen un filamento largo y delgado, le dan al huevo un aspecto de limón. Las

oncósferas tardan dos semanas en alcanzar su estado de cisticercoide dentro del artrópodo (Dunn, 1978). Un aspecto interesante de éste cestodo, es que sus oncósferas pueden seguir su ciclo de vida como cualquier otro cestodo o alcanzar la misma fase de cisticercoide en las vellosidades del hospedero final (Kearn, 1998). El hospedero final adquiere la infección por ingestión del hospedero intermediario. Las oncósferas se diferencian en metacestodos (cisticercoides) en el tejido intestinal de ratón o rata en 4 días o en escarabajos en aproximadamente 2 semanas (a una temperatura promedio de 20°C). Los metacestodos desarrollados en el ratón o escarabajos desarrollan a formas adultas en el lumen intestinal del mismo ratón u otro hospedero definitivo en 10 días. *Hymenolepis nana* (adaptada al ratón) no desarrolla a formas adultas en ratas (Ito, 1997; Ito et al. 1988). Sin embargo, en un ciclo directo, los huevos ingeridos por el ratón quedan atrapados en el intestino y el embrión hexacanto penetra en las vellosidades intestinales para después transformarse en un cisticercoide. En 5 o 6 días el cisticercoide maduro vuelve a la luz intestinal y el escolex que se evagina de él se adhiere a la mucosa intestinal (Kearn, 1998). Este tipo de comportamiento representa el punto más alto en la evolución de los cestodos, pues han suprimido al hospedero intermediario. El periodo de prepatencia es de dos a tres semanas (Dunn, 1978).

⇒ 2.3.3 Ciclo biológico *Hymenolepis nana* var. *fraterna* (Fig. 9)

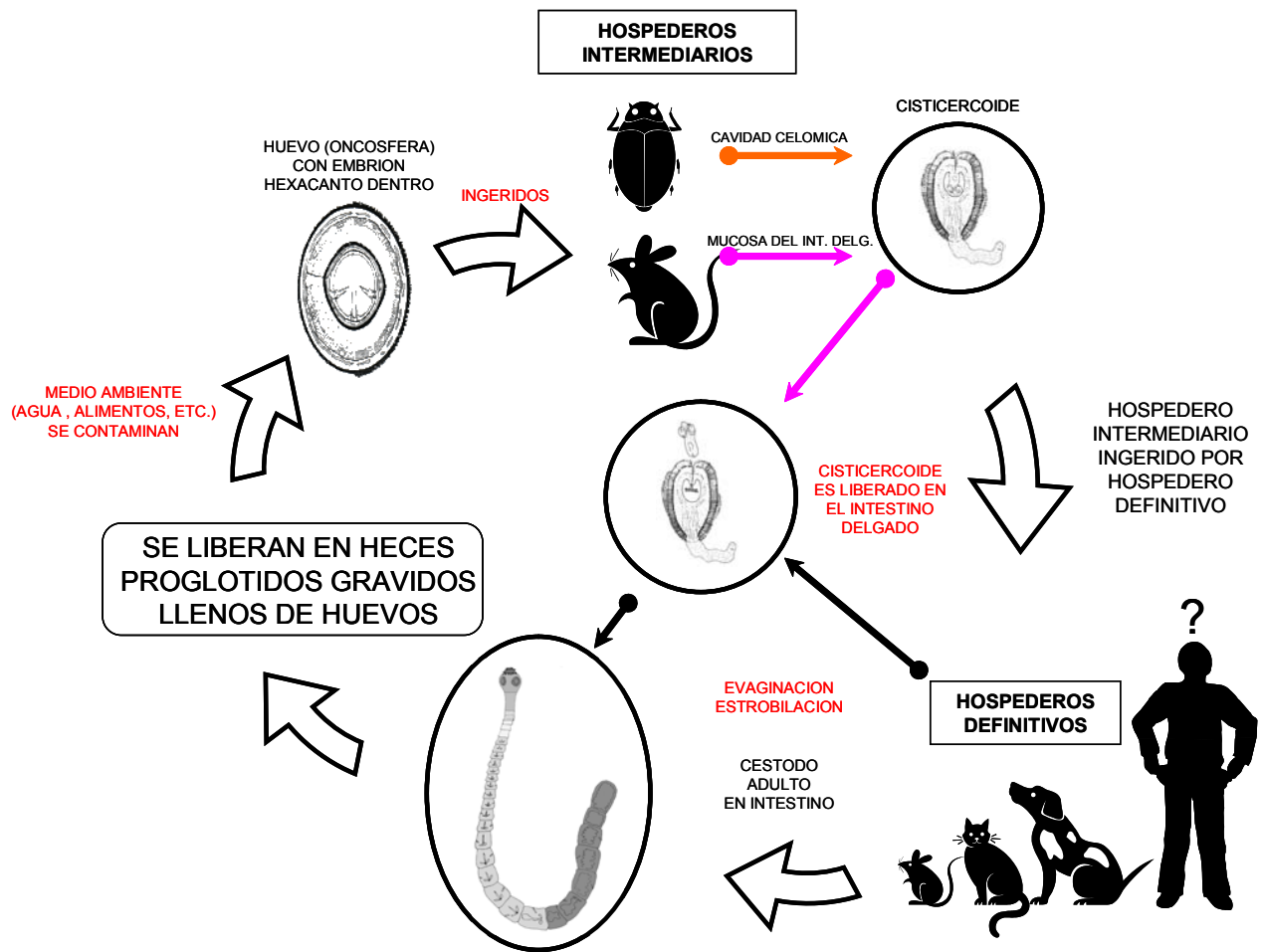


Fig. 9. Ciclo biológico de *Hymenolepis nana* (A.G.B.P., 2007).

La presencia del cestodo en el intestino de los roedores genera una respuesta inmune a dicho parásito. *Minero, 1997*; recomienda utilizar animales de experimentación jóvenes para la realización de pruebas de fármacos anticestódicos, ya que cestodos del tipo de *Hymenolepis nana*, en los que la fase larvaria es de cisticercoide, y en particular cuando tienen un ciclo de vida con la variabilidad de ser directo o indirecto, se toma en cuenta que, en general, los embriones recién eclosionados del huevo son potencialmente antigénicos, ya que producen sustancias estimuladoras que son capaces de desencadenar respuestas contra ellos, convirtiéndose de este modo en factores que impiden la implantación de los gusanos, por lo que la exposición de los organismos a la infestación sensibiliza al animal impidiendo la implantación posterior de nuevos

parásitos. Se ha visto una marcada susceptibilidad al parásito en animales jóvenes, ya que tardan más tiempo en montar una respuesta inmunológica que un hospedero adulto (Minero, 1997). *Hymenolepis nana* es un cestodo altamente inmunogénico en el ratón. Los ratones que reciben una sola inoculación vía oral de huevos de *Hymenolepis nana*, adquieren la infección y suelen generar una inmunidad protectora, dichos huevos pueden ser rechazados completamente si se les inhibe el crecimiento larvario en la vellosidad intestinal. Esta inmunidad adquirida es dependiente del timo y en ratones atímicos desnudos se ha visto que es transferida porque las células T cooperadoras (Linfocitos T), específicamente las identificadas como L3T4⁺ (Asano et al. 1986), juegan un papel importante. Estas células median la respuesta inmune a través de la producción de diferentes tipos de factores humorales, llamados citocinas, en respuesta a la estimulación antigénica (Asano et al. 1993). Este aumento de producción de citocinas ha sido observada *in vivo*, donde se ha obtenido extracto acuoso de nódulos mesentéricos del intestino delgado de ratones infectados con *Hymenolepis nana*, y se ha demostrado que contienen grandes cantidades de células T, citocinas como IFN γ (interferón gamma), e IL 2 (interleucina 2), comparados con ratones control no infectados. El IFN γ es el factor activador de macrófagos más importante, ya que ha sido demostrado que induce la expresión de antígenos en la superficie de los macrófagos, esto tiene una particular importancia en la presentación de dichos antígenos a las células T, ya que influye en la expulsión de los cisticercoides del intestino delgado. Otras citocinas están asociadas con la infección de *Hymenolepis nana* como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) e IL 1 β . Estas dos citocinas son producidas endógenamente en el intestino delgado, y el pico de actividad coincide con la eliminación del cestodo durante la infección, ya que dichas citocinas crean, directa o indirectamente, un ambiente desfavorable para los estadios larvarios (Asano et al. 1997).

El utilizar animales de experimentación jóvenes, y preferencialmente machos, se debe a que hay varios factores relacionados al hospedero que pueden afectar el crecimiento de los helmintos. El sexo del hospedero es una variable que puede

afectar el crecimiento o la cantidad de parásitos, ya que existen diferencias intrínsecas entre hospederos machos o hembras en cuanto a fisiología, inmunología, conducta y ecología, que pueden hacer que un sexo u otro hagan un buen ambiente para los helmintos. Las diferencias entre ambos sexos se han visto en niveles de infección en poblaciones naturales: hospederos machos, especialmente aves y mamíferos, casi siempre hospedan más helmintos que las hembras. Esto se debe, por ejemplo, a la acción de la testosterona que induce cierto nivel de inmunosupresión, por lo tanto no se monta una respuesta inmune adecuada; a que los machos son más grandes y consumen más cantidad de alimento, entonces aportan una cantidad mayor de nutrientes que los parásitos aprovechan, entre otros. Los hospederos machos crean mejores condiciones para el desarrollo de los helmintos que las hembras (Poulin, 1996).

2.4 El diseño de fármacos y el modelado molecular

El Laboratorio de Química Medicinal de la FES Cuautitlán utiliza, como herramienta para la creación de fármacos en general, programas de computadora especializados para realizar búsquedas sistemáticas a gran escala, con el propósito de encontrar sustancias cada vez con mayor efecto terapéutico y menor toxicidad. Los programas que realizan esta búsqueda, la efectúan en etapas. La primera, en el complejo proceso del desarrollo de fármacos, es la elección del blanco molecular sobre el que actuará el medicamento para lograr el efecto terapéutico deseado. Diversas investigaciones sobre los fármacos empleados en las últimas décadas han revelado que la acción terapéutica de éstos incide principalmente en proteínas, ya sea como receptores moleculares o como enzimas. Por esta razón, en el diseño racional de medicamentos, las proteínas pueden considerarse como la primera opción para fungir como moléculas blanco. La selección de la proteína específica de trabajo dependerá de la información disponible sobre el mecanismo molecular responsable del desarrollo de la enfermedad particular que se estudie (Cea et al. 2002). El efecto deseable en un nuevo fármaco es el control de los procesos bioquímicos alterados en un

paciente, o bien el evitar que un organismo patógeno realice sus procesos invasivos naturales. En este último caso, lo ideal es seleccionar como molécula blanco a una proteína que sea indispensable para la supervivencia del organismo patógeno y que esté ausente en el hospedero; así, un fármaco que se una a esa proteína e impida su correcto funcionamiento tiene posibilidades de ser un buen fármaco. La identificación de moléculas blanco con estas características es complicada ya que en muchas ocasiones, la proteína en cuestión existe simultáneamente en el hospedero y en la especie patógena y es entonces necesario que el ligando, o fármaco por desarrollar, se fije exclusivamente a la proteína del patógeno. En los casos donde la enfermedad que desea tratarse se debe al funcionamiento inapropiado de la maquinaria molecular del propio paciente, es preciso indagar el tipo y modo de acción particular de las enzimas involucradas en la disfunción y elegir como blanco de estudio la molécula que esté mejor caracterizada. La elección del sujeto de estudio puede validarse a través de experimentos que permitan conocer el efecto de la modificación funcional del blanco (o incluso de la ausencia total del mismo) sobre un microorganismo (Cea et al. 2002).

Cuando se trabaja con proteínas, y particularmente con enzimas como sustancias blanco, deben considerarse tres factores importantes: la especificidad o selectividad molecular de la enzima, la afinidad o fuerza con que se fija el sustrato a ella, y la geometría del sitio de unión. Muchos fármacos son inhibidores de la función de una enzima a través de un bloqueo efectivo del sitio activo o de las zonas coadyuvantes de la catálisis. En estos casos es deseable desarrollar compuestos que se unan con gran firmeza y alta especificidad a los sitios funcionales, y para desarrollar un fármaco con ambas características es imprescindible conocer con detalle la geometría del sitio de unión. La siguiente etapa del proceso en el diseño de medicamentos es la identificación de moléculas líder, que son aquellos compuestos que muestran tener una actividad significativamente alta sobre el blanco seleccionado. En esta fase del trabajo es preciso realizar una serie de experimentos en microescala con varios cientos de

miles de compuestos distintos (Cea et al. 2002). Estos ensayos masivos de laboratorio son realizados rutinariamente por las grandes compañías farmacéuticas; y son costosos dado que requieren de la instrumentación de pruebas biológicas que puedan ser realizadas y analizadas ágilmente, y porque además se requiere de un banco enorme de compuestos químicos que debe ofrecer acceso y consulta expeditos. Las moléculas líder que demuestran ser químicamente viables y poseer alta actividad biológica son caracterizadas estructuralmente y sometidas después a un proceso de optimización de su potencia farmacológica. En este paso se generan derivados de las moléculas líder, y se determina su estructura tridimensional, así como la relación que existe entre la actividad biológica que manifiestan y algunas de sus propiedades moleculares; tarea que se lleva a cabo con el empleo de la técnica conocida como QSAR (siglas en inglés para *Quantitative Structure-Activity Relationship*). Los resultados obtenidos con esta técnica dirigen el diseño de nuevos compuestos con actividad farmacológica que se presume será mayor a la de los líderes previos. Estos nuevos compuestos deben ser sintetizados en el laboratorio y, si confirman poseer mayor potencia farmacológica, se reincorporan al proceso de optimización en una serie de etapas interactivas. Si alguna de estas sustancias logra unirse con suficiente firmeza al blanco, entonces se realiza un estudio detallado de su viabilidad biológica, su estabilidad química y metabólica, sus propiedades fisicoquímicas (solubilidad, lipofilidad, etc.), su selectividad y su posible mecanismo de acción (Cea et al. 2002).

Los ensayos masivos que se llevan a cabo en las primeras etapas del desarrollo de fármacos, requieren de un gran despliegue de recursos puesto que, además de utilizar grandes bancos de datos, es necesario obtener, procesar y almacenar cantidades colosales de resultados experimentales. Por esta razón, en años recientes se ha optado por los estudios *in silico*, donde una simulación molecular por computadora realiza los ensayos masivos con el fin de hallar moléculas líder de una forma eficiente y relativamente económica. Este método de reconocimiento molecular o *docking*, es ampliamente utilizado alrededor del

mundo por compañías privadas y por instituciones de investigación pública para el hallazgo de nuevos compuestos con efectos terapéuticos. Si bien la técnica del *docking* representa una alternativa a los procedimientos de ensayo masivo de laboratorio, también, y de manera más importante, ella ha sido utilizada en el diseño de fármacos, tanto para llevar a cabo las etapas de identificación del sitio de unión sobre el blanco, como las de construcción y evaluación de los complejos moleculares resultantes (Cea et al. 2002).

Para describir la metodología del *docking* es útil dividirla en una serie de etapas: la primera de ellas consiste en disponer de la estructura tridimensional de la molécula blanco, la cual debe ser acondicionada para los cálculos subsecuentes y sobre la que debe identificarse el sitio de unión de una molécula de prueba (generalmente pequeña en relación con el blanco). La siguiente etapa requiere poseer un archivo numeroso de ligandos potenciales, esto es, moléculas orgánicas con estructuras tridimensionales conocidas y que se encuentran en condiciones adecuadas para simular su asociación al blanco. La tercera etapa, que es la parte medular del método, consiste en un algoritmo de computadora que toma cada uno de los ligandos de la base de datos y lo coloca dentro del sitio de unión en una gran cantidad de orientaciones. Durante esta etapa es indispensable emplear un criterio numérico para distinguir cuál de todas las opciones probadas resulta ser la más adecuada, es decir, la que adoptaría el ligando si tuviera acceso al sitio de unión; a este criterio se le llama puntaje. Una vez establecidas las condiciones descritas anteriormente, el proceso para probar orientaciones se repite para cada ligando de la base de datos, ésta es la etapa que consume la mayor cantidad de tiempo de cálculo. Finalmente, el programa de cómputo ordena los diferentes compuestos probados de acuerdo al puntaje de su orientación óptima y entonces, el usuario puede analizar estos resultados y planear experimentos para validar los resultados generados en la simulación por computadora (Cea et al. 2002).

Antes de que un producto salga al mercado, es preciso realizar muchas pruebas sobre organismos específicos para determinar los efectos secundarios y la dosis correspondiente para su administración (Cea et al. 2002).

2.5 Quimioterapia antihelmíntica utilizada en este proyecto

En un panorama general, se puede reconocer que existen muy pocos fármacos que sean anticestódicos efectivos como la niclosamida o praziquantel, el albendazol y con ciertas limitaciones el mebendazol. Al descubrirse el praziquantel, los laboratorios Bayer y Merck, en conjunto, efectuaron diversas pruebas para identificar el espectro antihelmíntico de éste último, teniendo un gran éxito como anticestódico; se le hizo una comparación frente a la niclosamida, ya probada con antelación, y se determinó que era “*igualmente efectivo*” dándole una gran aceptación en el mercado farmacológico y haciéndolo una opción segura contra las cestodosis (Minero, 1997). En cuanto a los benzimidazoles como el albendazol y el mebendazol han sido efectivos como anticestódicos en quimioterapias de larga duración, como en procesos de neurocisticercosis e hidatidosis. Es importante remarcar que el albendazol posee un amplio espectro antihelmíntico reconocido, y que el mebendazol en algunos países está restringido debido a los molestos efectos secundarios que produce (mareos, vómitos, etc.), no así en México. Este último fármaco sigue siendo parte de investigaciones para determinar su eficacia clínica en otros padecimientos parasitarios (Metwally et al., 1995).

⇒ 2.5.1 Praziquantel

Como se describió anteriormente, el praziquantel ya ha sido probado y es un fármaco de elección contra las cestodosis, entre sus ventajas está que se usa en dosis única de 25 mg/kg en humanos (Minero, 1997); como desventaja está el precio del fármaco, lo que reduce su accesibilidad.

El prazicuantel posee un sistema de anillo pirazino-isoquinolina (Fig. 10), esto representa una estructura completamente nueva en la terapia antihelmíntica, que no se relaciona con otras estructuras de productos antiparasitarios (Köhler, 2001).

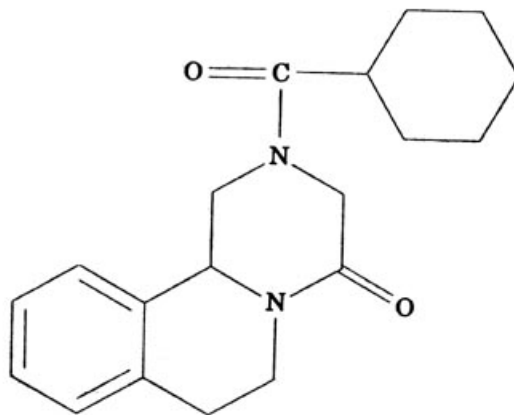


Fig. 10. Estructura química del prazicuantel (Sumano et al. 1999).

El prazicuantel es usado frecuentemente para la esquistosomiasis y cestodosis humana, se tiene estudiado ampliamente su modo de acción (Martin, 1997; Metwally, 1995). Estudios han demostrado que el prazicuantel genera una contracción rápida de los músculos de los parásitos y vacuoliza sus tegumentos. Estas alteraciones, sugieren que los sitios de acción son canales de iones permeables al Ca^{2+} en la membrana del tegumento y en las células musculares, baña a los parásitos con Ca^{2+} libre del medio que los rodea para inducirles una contracción (Martin, 1997), y dado que el tegumento esta unido por cargas eléctricas a células musculares, hay un incremento de Ca^{2+} dentro del retículo sarcoplásmico de dichas células y ocasiona una fuerte contracción muscular en el parásito (Köhler, 2001). El efecto del fármaco sobre el parásito es lento, toma aproximadamente 10 hr, y hasta entonces se comienzan a expulsar los gusanos. Las contracciones pueden ser revertidas y pueden ser bloqueadas por Mg^{2+} o La^{3+} pero no por Ni^{2+} , Co^{2+} u otros bloqueadores de canales de Ca^{2+} (Martin, 1997).

⇒ 2.5.2 Los carbamatos, propiedades y características generales

Estas sustancias son usadas principalmente en la agricultura como insecticidas, herbicidas, nematodocidas e inhibidores de retoños. Son conocidas tres clases de carbamatos pesticidas, los derivados de esteres, usados como insecticidas y nematodocidas que generalmente son estables y poseen una baja solubilidad en agua. Los carbamatos herbicidas que contienen radicales aromáticos o alifáticos y los carbamatos fungicidas que contienen un grupo bencimidazol (*Minero, 1997*). La síntesis y comercialización de los carbamatos pesticidas se ha dado desde 1950. Los fungicidas bencimidazoles fueron introducidos en el mercado alrededor de 1970. El medio acuoso es una ruta importante de transporte para los carbamatos altamente solubles, la característica de ligera absorción de los carbamatos contribuye a su rápida descomposición (por fotodegradación o fotodescomposición) bajo condiciones acuosas. Los carbamatos insecticidas son aplicados principalmente a las plantas y pueden llegar al suelo, mientras que los carbamatos nematodocidas y herbicidas son aplicados directamente en el suelo y existen varios factores que influyen en su biodegradación tales como volatilidad, tipo de suelo, humedad, absorción, pH, temperatura y fotodescomposición (*Minero, 1997*).

Los carbamatos son tóxicos para los gusanos y otros organismos que viven en el suelo, hay una gran reducción en la población de gusanos de tierra cuando se aplican carbamatos en el suelo. La ruta metabólica de los carbamatos es básicamente la misma en plantas, insectos y mamíferos, son fácilmente absorbidos a través de las membranas mucosas, tracto respiratorio y gastrointestinal, los metabolitos generalmente son menos tóxicos que los compuestos similares, sin embargo, en casos específicos los metabolitos son tan tóxicos o más que los compuestos parientes de los carbamatos, en muchos mamíferos los metabolitos son rápidamente excretados en la orina. El primer paso en el metabolismo de carbamatos es la hidrólisis a ácido carbámico, el cual se descompone en bióxido de carbono (CO_2) y su correspondiente amina. Existe muy poca información disponible sobre la distribución de los carbamatos en varios órganos y tejidos de mamíferos, posterior a la exposición a la inhalación o

por ruta oral. Los órganos en los cuales han sido detectados residuos son: hígado, riñones, cerebro, grasa y músculo. La vida media en la rata es de 3-8 hr. Los datos disponibles muestran que la excreción de carbamatos por vía urinaria también es rápida en el hombre y la ruta metabólica es la misma en ratas (*Minero, 1997*).

Los carbamatos son efectivos insecticidas en virtud de su habilidad para inhibir la Acetilcolinesterasa (AChE) en el sistema nervioso. La AChE cataliza la hidrólisis de la neurotransmisión de la Acetilcolina (ACh) a colina y acetato. La ACh es un mediador sináptico de los impulsos eléctricos del sistema nervioso de los mamíferos e insectos y actúa como: neurotransmisor del cerebro de mamíferos y sistema nervioso central de insectos, neurotransmisor preganglionar del sistema nervioso autónomo y como regulador de la contracción neuromuscular del músculo esquelético.

Para entender el mecanismo de toxicidad es necesario revisar el evento que da lugar a la contracción muscular (Fig. 11). La inervación muscular produce un impulso nervioso alcanzando la terminación nerviosa donde la ACh se encuentra almacenada en vesículas en dicha terminación, la ACh es liberada en la contracción. Dentro de los 2-3 milisegundos siguientes, la AChE interfiere del lado del receptor. La ACh es convertida hidrolíticamente en colina y acetato, causando que la contracción decrezca y cese. Cuando la AChE es inhibida por un carbamato éster, no puede hidrolizar la ACh, así la concentración permanece alta en la contracción, incrementando la estimulación continua del músculo el cual lleva a la tetania. De esta manera, la inhibición de AChE por carbamatos esteres causa efectos letales en animales y humanos, siendo el resultado una gran variedad de signos y síntomas de envenenamiento, pudiendo eventualmente culminar en fallas respiratorias y muerte (*Pereyra, 2004*).

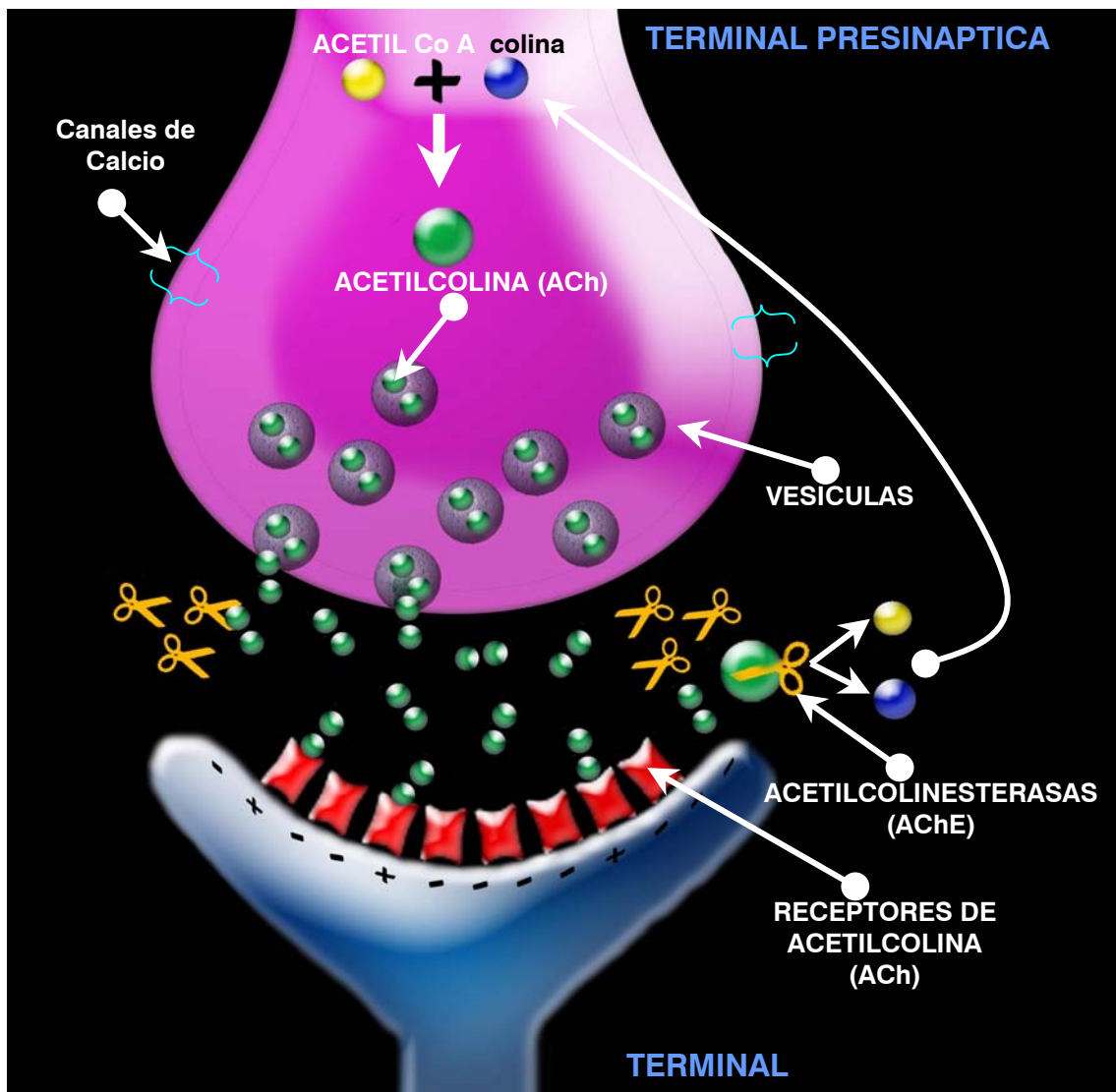


Fig. 11. Mecanismo de liberación de Acetilcolina (A.G.B.P., 2007).

⇒ 2.5.3 Los bencimidazoles: aspectos generales

Muy frecuentemente se ha descubierto el uso de fármacos de forma alterna a otros. El uso potencial de estos compuestos, como quimioterápicos en enfermedades parasitarias, se estableció en el año de 1950 a partir del descubrimiento de la molécula α -D-ribofuranacil (Fig. 12), que es parte integral de la vitamina B₁₂ y que da origen al anillo básico de los bencimidazoles (Bennet-Jenkins et al. 1996; Sumano et al. 1999).

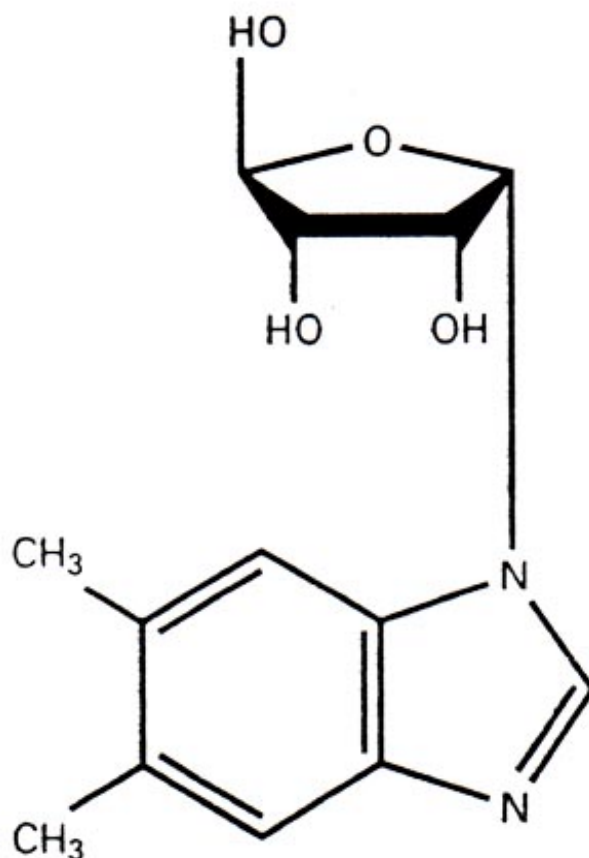


Fig. 12. Molécula (S)-D-ribofuranacil (Sumano et al. 1999).

Los compuestos bencimidazólicos aparecen como los productos más disponibles y más ampliamente utilizados. La historia de estos potentes y efectivos fármacos comienza con la introducción del Tiabendazol en 1961, el primer antihelmíntico de amplio espectro producido. Este compuesto dio paso al desarrollo de una variedad de nuevos productos estructuralmente relacionados, estos últimos sustituyeron al primero debido a que tenían mejores características, como generar una baja toxicidad a los mamíferos y un amplio margen de efecto antihelmíntico (Köhler, 2001). Desde que se introdujo el tiabendazol como antihelmíntico de amplio espectro, éste y otros fármacos comenzaron con los conceptos modernos de la quimioterapia antiparasitaria, estableciendo muchos criterios de toxicología para los desarrollos subsecuentes. Investigaciones

intensivas desde los años 60's y 70's, han dejado una serie de antihelmínticos bencimidazólicos y probencimidazólicos (llamados así porque son convertidos en bencimidazoles activos por procesos metabólicos en el hospedero, y los metabolitos activos son los responsables de la acción antihelmíntica), que presentan una mejoría en el espectro de actividad que ha quedado firmemente establecido para la mayoría de los bencimidazoles dentro del arsenal quimioterápico (Lacey, 1988).

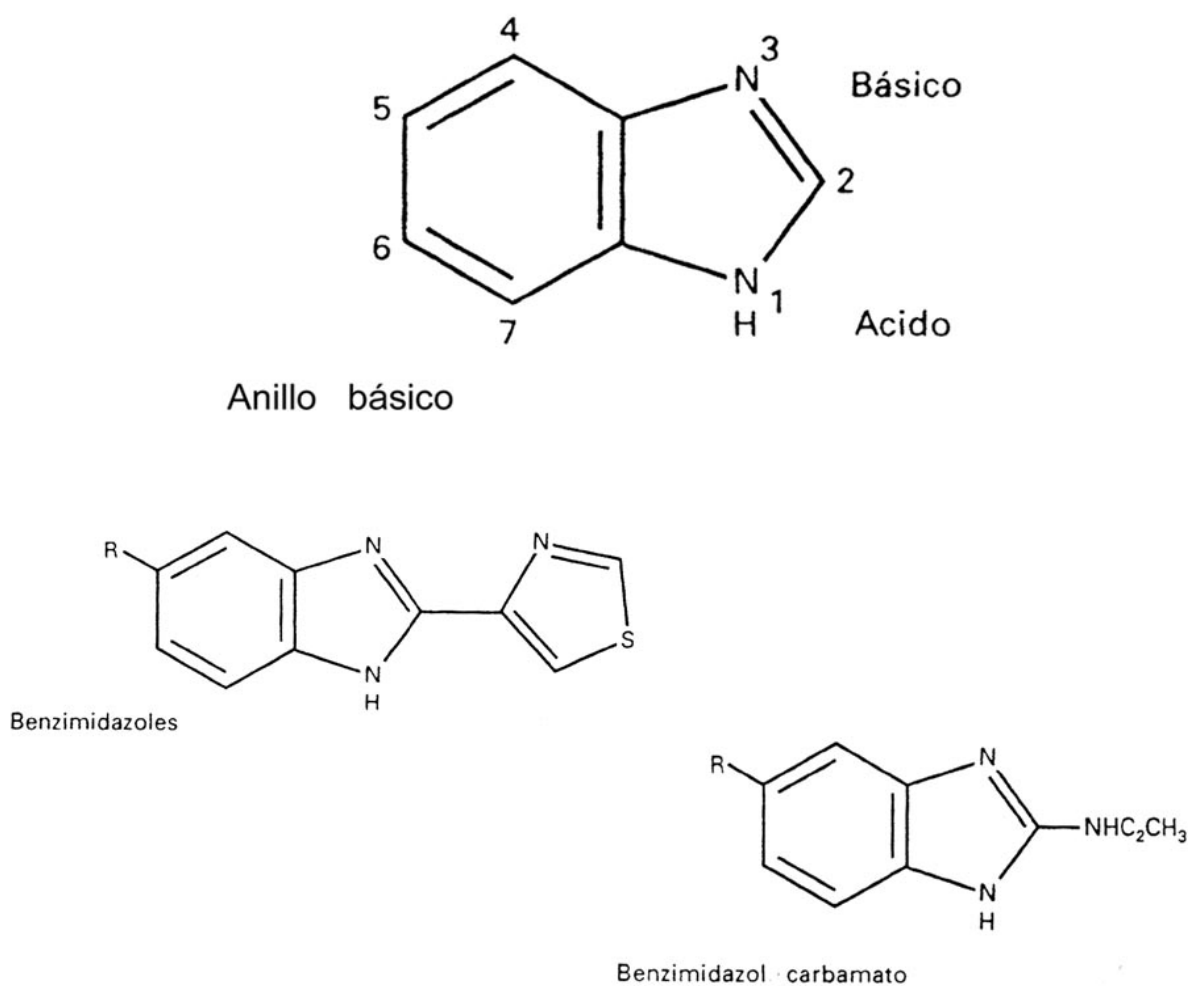
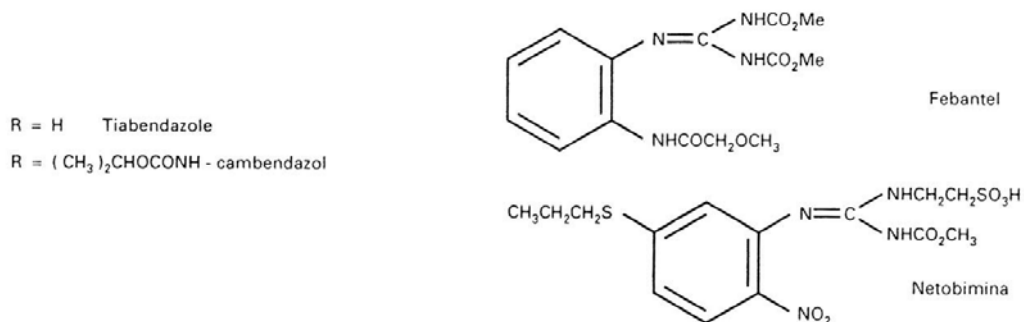


Fig. 13. Estructura general de la molécula de los bencimidazoles (Sumano et al. 1999).

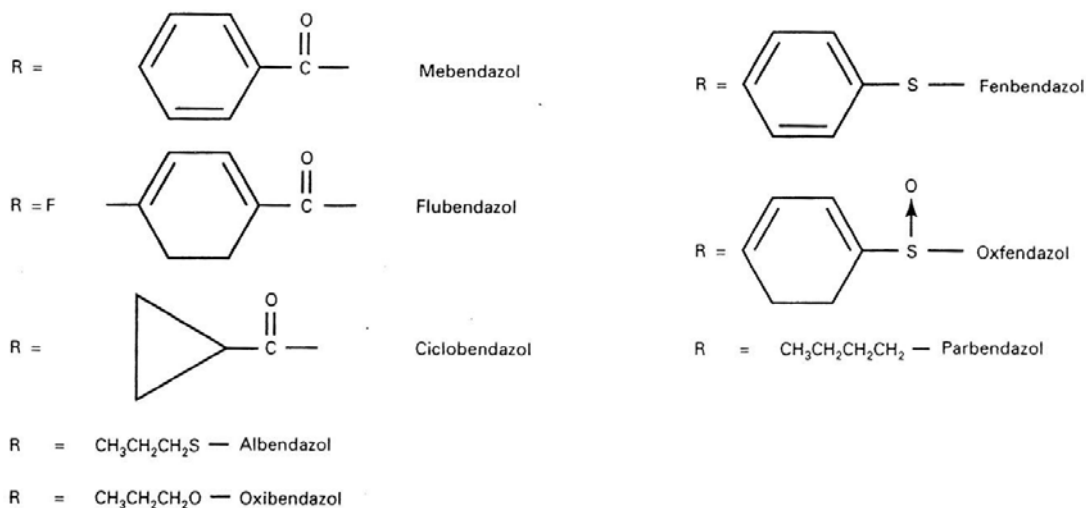
Los bencimidazoles (Fig. 13), denominados así en forma general, y en particular los llamados bencimidazol – carbamatos, son los que poseen la mayor actividad antihelmíntica, son materiales cristalinos con un punto de fusión alto y

relativamente insolubles en agua (*Minero, 1997*). Su actividad está íntimamente relacionada con la presencia del grupo nitro en el anillo bencimidazol. Los bencimidazoles son compuestos sintetizados a partir de los siguientes pasos: primero, la construcción de un anillo benceno con el sustitutivo deseado y, de 1,2 grupos diaminos, en el anillo de cierre y el derivado del 1,2 diaminobenceno. De acuerdo al radical incluido en posición 2, se generará el bencimidazol normal o el bencimidazol carbamato, siendo éste último del cual se obtienen los bencimidazoles más modernos. Los bencimidazoles con efecto antiparasitario son: tiabendazol (TBZ); cambendazol (CBZ); bencimidazoles carbamatos: mebendazol (MBZ), flubendazol (FLBZ), ciclobendazol (CBZ), fenbendazol (FBZ), oxfendazol (OFZ), albendazol (ABZ), oxibendazol(OBZ), parbendazol (PBZ), luxabendazol (LBZ), ricobendazol (RBZ), y albendazol sulfóxido (ABZSO). Además los bencimidazoles halogenados: triclabendazol (TCBZ) y los probencimidazoles como: tiofanato (TFN), febantel (FEB), netobimina (NTB), clorsulón (CLN) (*Sumano et al. 1999*) (Fig. 14).

BENCIMIDAZOLES



BENCIMIDAZOLES CARBAMATOS



R = Radical a sustituir en el anillo básico de los bencimidazoles carbamatos.

Fig. 14. Estructura de las moléculas que conforman los bencimidazol carbamatos (Sumano et al. 1999).

Los antihelmínticos albendazol, fenbendazol y mebendazol, con una estructura bencimidazólica, son los fármacos mas representativos del grupo, y se usan ampliamente en la medicina veterinaria (Baliharová et al. 2003).

Cuando se comenzó con el uso los productos bencimidazólicos, se pudo demostrar que estos nuevos fármacos causaban alteraciones ultraestructurales

en las células intestinales de los nematodos y en las células tegumentarias de los cestodos, en particular en la redistribución de las vesículas citoplasmáticas y otros organelos (Köhler, 2001). Es así como dichos cambios coincidieron con la desaparición de los microtúbulos, por lo tanto se sugirió que los bencimidazoles actúan inhibiendo el transporte de vesículas secretoras mediadas por ellos en los tejidos de absorción de los parásitos, estas vesículas liberan sus enzimas causando daños tisulares en las células parasitarias. Actualmente se sabe claramente que la acción de los bencimidazoles es la de su pseudoirreversible acoplamiento y la capacidad de unión con alta afinidad en la subunidad proteica de los microtúbulos, la tubulina, interfiriendo así en la funcionalidad y estructura de los mismos (Köhler, 2001). Análisis espectroscópicos sugieren que los bencimidazoles efectúan la inhibición de la polimerización de la tubulina debido a que el fármaco induce un desdoblamiento local en una pequeña región dentro del monómero de la porción β de la tubulina (Köhler, 2001). Los microtúbulos son altamente dinámicos, presentes siempre para servir a otros organelos, para que éstos lleven a cabo sus funciones vitales incluyendo la mitosis, movilidad y transporte, esta función es similar en todas las células eucariotas (Köhler, 2001). El que estos productos se fijen en estas subunidades proteicas deja una cascada de efectos bioquímicos y fisiológicos adversos, los cuales causan el desplazamiento del parásito de su sitio de establecimiento y su subsecuente expulsión del hospedero (Gill et al. 1992). También se han informado efectos inhibitorios de algunos bencimidazoles sobre las enzimas, principalmente la fumarato reductasa (el bloqueo del paso de ésta enzima inhibe la generación de energía mitocondrial en la forma de ATP, en ausencia de energía disponible, el parásito muere), entonces, se genera un efecto aditivo a la acción en la tubulina, lo que aumenta el poder antiparasitario del fármaco. A este efecto se le puede sumar el bloqueo del paso de glucosa desde el intestino del parásito a su sistema, acentuando el déficit energético del parásito (Sumano et al. 1999). La baja disociación de los bencimidazólicos en la tubulina de los helmintos hace que permanezcan más tiempo en las células parasitarias, en particular de los

nematodos, la cual contrasta con la rápida disociación de éstos en la tubulina de los mamíferos. Esta diferencia de permanencia entre las células parasitarias y la de mamíferos, genera el efecto tóxico y letal de los bencimidazólicos en los parásitos (Gill et al. 1992).

○ 2.5.3.1 Importancia de la tubulina y microtúbulos

La existencia de los microtúbulos en las células eucariotas se conoce desde el último siglo, sin embargo su estudio intensivo en la biología celular es relativamente reciente (Lacey, 1988). Los microtúbulos, son fibras citoplasmáticas con una forma tubular compuesta por heterodímeros de α y β tubulina como mayores componentes, y las proteínas asociadas a los microtúbulos en minoría. Están involucrados en muchas funciones celulares incluyendo la mitosis, la morfogénesis celular y el transporte intracelular (Koizumi et al. 2004). Los microtúbulos son unos organelos intracelulares que tienen una gran variedad de funciones incluidas el movimiento de los cromosomas durante la división celular, proveen la estructura al esqueleto celular, movimiento de partículas intracelulares incluyendo metabolitos energéticos. Son elementos casi aislados esparcidos al azar en toda la célula y están dispuestos en grupos en forma paralela para formar dupletes o tripletes, se encuentran en animales y plantas, hongos y algunas células bacterianas (Leeson et al. 1988). Los microtúbulos están compuestos por dos proteínas con 450 aminoácidos conocidas como α y β tubulina (Martin, 1997) (Fig. 15 y 15a).

Los microtúbulos del citoesqueleto juegan un papel importante en la regulación de la arquitectura celular. Los sistemas de microtúbulos de las células eucarióticas comprenden una matriz dinámica en los cuales los heterodímeros de tubulina se polimerizan para formar los microtúbulos, tanto en células normales como en anormales (neoplásicas). Como consecuencia, las sustancias tanto sintéticas como naturales capaces de alterar la polimerización y despolimerización de los microtúbulos, hacen que sean efectivos los agentes quimioterapéuticos (Romagnoli et al. 2005).

Fig. 15. Esquema representativo del acomodo de las subunidades de α y β tubulina (A.G.B.P., 2007).

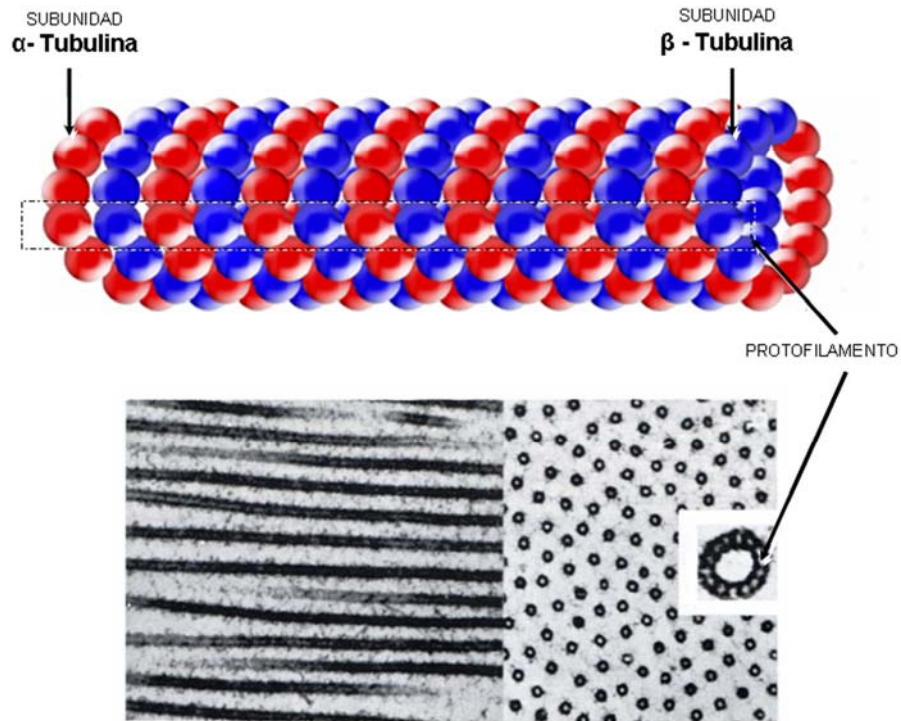


Fig. 15a. Imagen tomada por microscopía electrónica de los microtúbulos celulares (Leeson et al. 1988).

En 1972, Weisenberg fue el primero en notar que el Ca^{2+} era necesario para la polimerización de los microtúbulos. Él sugirió que el Ca^{2+} juega un papel importante en la regulación de la formación de los microtúbulos y numerosas investigaciones han ido confirmando esta observación. El Ca^{2+} al mismo tiempo impide la polimerización de los dímeros de tubulina y causa una rápida despolimerización de los tubos preformados los cuales pueden ser repolimerizados por quelación (Berkowitz et al. 1981; Lacey, 1988). La tubulina contiene sitios únicos de alta afinidad para Ca^{2+} y Mg^{2+} . *In vitro*, dichos iones muestran acciones opuestas; el Mg^{2+} es requerido para el ensamble y el Ca^{2+} unido a proteínas como la calmodulina, inhibe el ensamble e inducen el

desensamble, aquí mismo actúan proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP's) (Lacey, 1988).

La formación de los microtúbulos es un proceso dinámico. La formación incluye la polimerización de la tubulina hasta un final y la despolimerización en el otro final (el polo positivo es más inestable, por lo que la despolimerización casi siempre se da aquí). Los microtúbulos que se forman están hechos de 13 anillos moleculares de tubulina (6 de α tubulina + 7 de β tubulina alternando con anillos 7 de α tubulina + 6 de β tubulina). Del 75 al 85% de la masa esta compuesta por tubulina y proteínas en adición, las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP's) están presentes estabilizando la estructura. Existen varios factores que favorecen la polimerización incluyendo GTP, Mg^{2+} y el incremento de temperatura hasta 37°C. Un decremento en la temperatura hasta 4°C, la presencia de Ca^{2+} , calmodulina van a favorecer la despolimerización. La formación de los microtúbulos puede ser inhibida por sustancias que se unan al borde de cabecera (el polo positivo) de polimerización (Martin, 1997).

Para apreciar completamente el bloqueo de los mecanismos de los microtúbulos, es necesario considerar que la naturaleza del equilibrio tubulina - microtúbulos no es sólo bioquímicamente, porque no sólo es parte de una célula eucariota sino de un organismo entero. Se le han atribuido funciones a los microtúbulos en diferentes niveles celulares, por ejemplo: formación del huso mitótico en la división celular (Fig. 16), mantenimiento de la forma celular, motilidad celular, secreción celular, absorción de nutrientes y transporte intracelular. La asociación intracelular de ambos, tubulina o microtúbulos incluye muchos organelos: mitocondria, aparato de Golgi, ribosomas, lisosomas, membranas celulares y por supuesto el núcleo. Es probable la asociación directa de la tubulina y los microtúbulos, con mecanismos fisiológicos de: hormonas, neurotransmisores, nutrientes, enzimas y receptores, pero aún no se conocen en sí los efectos concretos. La alteración del equilibrio tubulina-microtúbulos deja una cascada de cambios bioquímicos y fisiológicos directos o indirectos, resultando en una pérdida de la homeostasis celular. Las condiciones del

desequilibrio celular, si se mantienen, son letales, estos efectos son más evidentes en una división celular activa o en crecimiento celular. Cada célula requiere de gran utilización de tubulina y éstas se tornan mas sensibles a los inhibidores de la tubulina, ya que generan una modificación de la regulación de eventos fisiológicos críticos (como lo es la división celular) lo cual lleva a un daño irreversible si dichos eventos se alteran (Lacey, 1988).

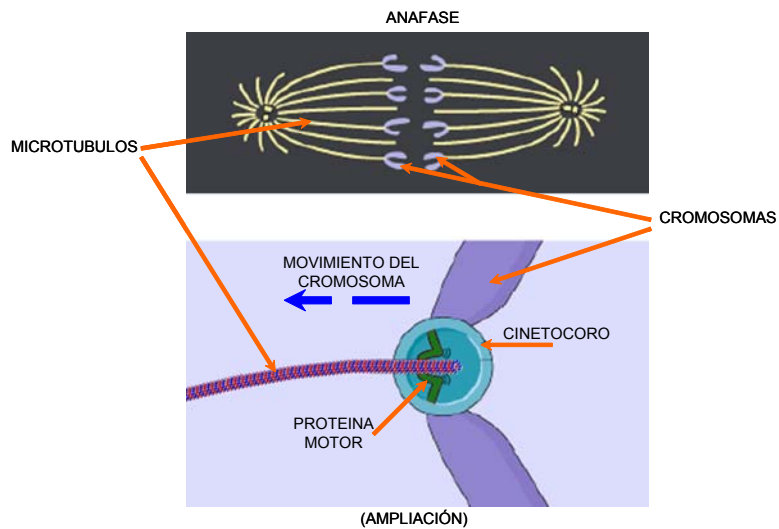


Fig. 16. Representación esquemática de la participación de los microtúbulos en la división celular (A.G.B.P., 2007).

Los bencimidazoles más usados en la medicina veterinaria, inducen la pérdida citoplasmática de los microtúbulos de las células tegumentarias e intestinales de los cestodos y nematodos, seguido por la pérdida de transporte de las vesículas secretoras, un decremento de la entrada de glucosa y se incrementa la utilización del glicógeno almacenado del parásito (Martin, 1997).

En cuanto a la absorción presentan un ciclo enterohepático. Los bencimidazoles tienen una baja solubilidad en agua, lo que limita su absorción por vía gástrica y, por ende, su distribución. Se deben de considerar las pequeñas diferencias en cuanto a solubilidad debido a que aumentando ésta, se manifiesta un incremento en la distribución que conlleva a un incremento de la actividad sistémica del producto (Sumano et al. 1999). La solubilidad es un factor esencial para la eficacia de muchos fármacos, independientemente de la ruta de administración. Esto genera un mayor reto para las compañías farmacéuticas

para el desarrollo de nuevos fármacos. Un factor limitante para el funcionamiento *in vivo* de productos pobremente solubles en agua, siguiente a una administración oral, es su resistencia a ser humedecida y a ser disuelta en los fluidos del tracto gastrointestinal. Si se incrementa la proporción de disolución de fármacos pobremente solubles en agua, se optimiza su biodisponibilidad (Kocbek *et al.* 2006). La absorción de muchos de los productos administrados oralmente, puede estar relacionada a sus propiedades de solubilidad y permeabilidad. Esas dos características, especialmente la solubilidad, pueden ser modificadas por la combinación de fármacos con diferentes excipientes y a través de este proceso, la biodisponibilidad oral de productos con una baja solubilidad acuosa puede ser mejorada (Mwambete *et al.* 2004). La baja solubilidad de los bencimidazoles es una limitante que influye directamente en la formulación de los fármacos; esto determina la elección del tipo de preparación comercial como: suspensiones, gránulos, polvos, jarabes y pastas para administración oral, intrarruminal e intrarreticular principalmente (Sumano *et al.* 1999).

En cuanto al metabolismo (Fig.17), todos los bencimidazoles sufren un proceso de inactivación o de activación. En el caso de los probencimidazoles, este efecto se puede llevar a cabo en el estómago, intestino, rumen o hígado, siendo la principal vía metabólica la aril-hidroxilación y en segunda instancia, la hidrólisis de la función carbamato por la n- metil- acetilación o reducción. Los bencimidazoles del grupo de los carbamatos pueden sufrir metabolismo oxidativo o dealquilativo, originando un alcohol que por lo general es activo contra parásitos migrantes (Sumano *et al.* 1999; Walchshofer *et al.* 1991). La presencia de estos medicamentos en un organismo pueden inducir la activación del sistema microsómico enzimático, aumentando la concentración de enzima citocromo P450, monoaminoxidasa y monooxigenasa, que son las que intervienen primero en el metabolismo de estos fármacos (Sumano *et al.* 1999).

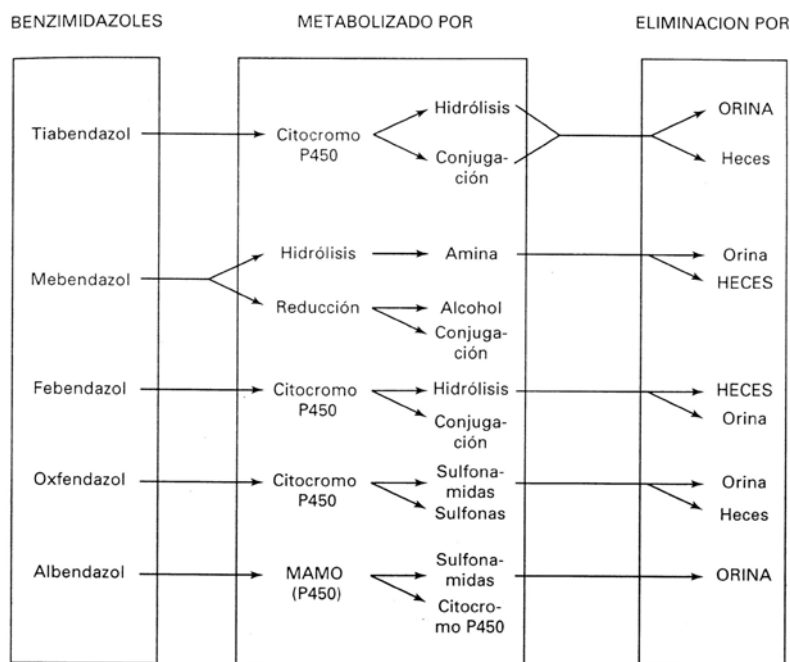


Fig.17. Rutas generales de metabolización y eliminación de los bencimidazol carbamatos (*Sumano et al. 1999*).

Existen diferentes vías para eliminar los bencimidazoles (Fig.17). Esto dependerá del tipo de radicales que contenga el núcleo en particular, no obstante, todos muestran el ciclo enterohepático, por lo cual siempre se eliminan de manera primaria por heces y secundaria por otras rutas como orina y leche (*Sumano et al. 1999*). Los efectos tóxicos son escasos y se limitan a anorexia, vómito, mareo, anemia normocrómica, diarrea y prurito, aunque se ha descrito que en hembras gestantes, estos fármacos son altamente dañinos para el producto, ya que son teratogénicos y embriotóxicos (*Capecce et al., 2003*). Los bencimidazoles tienen aplicaciones antinematódicas básicamente, tanto ovicidas y larvicidas, pero algunos miembros del mismo grupo pueden tener efectos cestodícticas y trematodícticas (*Sumano et al. 1999*). Los bencimidazoles y sus derivados han sido usados ampliamente por su amplio espectro antihelmíntico para el control de estos parásitos en el ganado y en otras especies (*Gill et al. 1992*). El desarrollo de resistencia a esta clase de productos, dentro de las poblaciones de parásitos, ha ido limitando su utilidad en los programas de control parasitario (*Gill et al. 1992*).

⇒ 2.5.4 Resistencia a los antiparasitarios

Como se mencionaba al inicio de la parte introductoria, no se han reportado casos de resistencia por parte del parásito *Hymenolepis nana* var. *fraterna*, pero sí se ha hallado lo que podría considerarse un indicio de resistencia a productos comerciales, con principios activos anticestódicos, en otros cestodos que afectan a pequeñas especies, ya que dichos parásitos comienzan a tolerar las dosis normales de fármacos conocidos (como el prazicuantel) en las desparasitaciones convencionales (Balbuena et. Al, 2004) esto crea la necesidad de mejorar los fármacos antiparasitarios existentes y de encontrar nuevos productos efectivos que ayuden a ampliar las opciones de tratamiento.

En general, la resistencia a los antihelmínticos continúa incrementándose en diversas áreas geográficas, así como en el número de especies afectadas y la cantidad de fármacos antiparasitarios involucrados en este proceso (Sangster, 1999).

Cuando decidimos hacer el control parasitario con algún fármaco, es probable que la resistencia ya esté en desarrollo. Esto se debe a que el tratamiento con fármacos, sea el producto que sea, deja parásitos sobrevivientes, los cuales al final se reproducen, contribuyendo así a transmitir los genes de resistencia a la descendencia, quedando poco a poco fuera los genes que podrían darles susceptibilidad y adquiriendo los de resistencia (Sangster, 1999).

El fenómeno de resistencia a los fármacos es, esencialmente, un cambio en la frecuencia de genes de una población de vermes, producida por la selección de un fármaco; debido al cual la dosis mínima recomendada para destruir un porcentaje determinado de la población, deja de ser eficaz; en otras palabras, se define como la capacidad de los vermes para sobrevivir al efecto letal de un compuesto con propiedades antihelmínticas (Kassai, 1998).

La resistencia colateral y la resistencia cruzada son estados en los que una población parasitaria seleccionada tiene un gene que codifica un mecanismo para evitar la toxicidad de fármacos con el mismo mecanismo de acción o de fármacos con mecanismos de acción diferentes respectivamente (Kassai, 1998).

La resistencia múltiple es un estado en el que una población parasitaria ha sido seleccionada para resistir la acción de fármacos pertenecientes a familias con distintos mecanismos de acción, dando lugar a mecanismos de evasión diferentes pero concurrentes (en ocasiones también se utiliza como sinónimo de resistencia cruzada) (Kassai, 1998; FAO, 2003).

Puesto que los antihelmínticos constituyen por el momento el principal medio de prevención y control de la helmintosis, es absolutamente vital conservar la de los fármacos actualmente mediante su uso racional (Kassai, 1998).

El costo del descubrimiento, investigación y desarrollo de un producto farmacéutico (*p. ej.* para uso en animales de abasto) requiere millones de pesos y puede involucrar hasta unos 12 años de investigación; por ello, las posibilidades de que en un futuro cercano podamos disponer de antihelmínticos de amplio espectro con nuevos mecanismos de acción, son escasas; por lo tanto, la siguiente advertencia resulta oportuna e imperativa: *mantener la eficacia de nuestros antihelmínticos*; además, deberíamos estar preparados para el momento en que los fármacos de amplio espectro ya no sean eficaces (Kassai, 1998; FAO, 2003).

○ **2.5.4.1 Características esenciales de la resistencia a los fármacos** (Kassai, 1998, FAO, 2003).

- El desarrollo de cepas de vermes resistentes, es evolutivo.
- Es una propiedad fisiológica hereditaria.
- Se basa en la selección de individuos de una pequeña población parasitaria que poseen los alelos de resistencia a determinados fármacos (variabilidad genética). La resistencia aparece heredada directamente por los procesos de la genética Mendeliana (Sangster, 1999).
- Las posibilidades de selección inversa para que las cepas de vermes resistentes vuelvan a ser sensibles a los antihelmínticos son débiles y transitorias (Kassai, 1998).

○ **2.5.4.2 Factores que influyen en la selección de parásitos resistentes a los fármacos**

El desarrollo de resistencia a los productos antihelmínticos se considera la mayor amenaza para el control parasitario en todo el mundo (*Dobson et al. 1996*). Muchos factores influyen en la forma del desarrollo de resistencia a los pesticidas y su propagación en una población (*Dobson et al. 1996*). Estos factores se han clasificado, por su importancia, en: *genéticos*, incluyendo la proporción de la mutación y la dominancia relativa de la característica afectada; *reproductivos*, incluyendo generaciones por año y el tamaño de las fluctuaciones en la población; *medio ambientales*, incluyendo migración de los insectos o especies afectadas y su capacidad de evitar a los pesticidas; *operacionales*, incluye la proporción de la población expuesta y la persistencia del agente químico para el control de dichas poblaciones (*Dobson et al. 1996*).

- *Factores operativos* (*Dobson et al. 1996; Kassai, 1998; FAO, 2003*).
 - * La naturaleza química del fármaco utilizado y la rotación del mismo: si no se realiza rotación o si ésta es muy frecuente, favorece el desarrollo de resistencias.
 - * Frecuencia y momento de los tratamientos: el desarrollo de resistencias puede ser consecuencia tanto del uso frecuente y continuado de antihelmínticos con el mismo mecanismo de acción como de uno o dos tratamientos; el porcentaje de helmintos de la suprapoblación que están protegidos, es decir, el número de estadíos larvarios existentes en el medio no expuestos a la presión de selección por el fármaco, determinan en qué medida contribuyen los genes de los supervivientes al tratamiento farmacológico al conjunto global de genes de las futuras generaciones (infrapoblaciones de vermes).
 - * Dosis: recientemente se ha demostrado que la dosis más peligrosa para favorecer la diseminación de resistencias a los antihelmínticos

depende de la frecuencia del alelo de la resistencia y de factores que controlan la fecundidad y supervivencia de los vermes cuando se instaura el tratamiento; por lo tanto, la idea actualmente existente de “una dosificación insuficiente” siempre promueve la selección de cepas resistentes, debe ser evaluada y corregida; las dosis más altas imponen una mayor presión de selección (*Kassai, 1998; FAO, 2003*).

- * Pautas de manejo de pastoreo y climatología en animales sometidos a éste régimen: por ejemplo, el traslado de animales después del tratamiento a un pasto poco contaminado (“seguro”) (cuando se utiliza la estrategia de “medicar y trasladar”) o el tratamiento de animales que pastan en zonas poco contaminadas (durante las sequías) acelera la diseminación de los alelos de resistencia.
- * Movimiento de ganado entre granjas: los vermes resistentes son habitualmente introducidos en una explotación o rebaño al adquirir animales portadores de vermes resistentes a fármacos.
- *Factores genéticos*: frecuencia, dominancia y número de alelos de resistencia en la población de vermes.
- *Factores biológicos o ecológicos*: longevidad y fecundidad de los vermes adultos, prolificidad y cantidad de larvas ingeridas (*Kassai, 1998*).

- **2.5.4.3 Medidas de prevención y control para evitar el desarrollo de resistencia a los fármacos** (*Kassai, 1998; FAO, 2003*).

Se debe tener en cuenta que el momento más adecuado para luchar frente a las resistencias a los fármacos, es antes de que éstas se hagan evidentes y se extiendan.

Los siguientes métodos y principios sugeridos podrían reducir el “riesgo de aparición de resistencias” o prevenir la difusión de las ya existentes:

- Usar antihelmínticos eficaces. Cuando se detectan resistencias a un determinado fármaco, se debería interrumpir su empleo (recordar también la resistencia colateral) (*Kassai, 1998*). Al entender el modo de acción de los antihelmínticos, se pueden establecer medidas que ayuden a mejorar la eficacia antihelmíntica, reducir su toxicidad en el hospedero buscando siempre que dé como resultado una baja resistencia al mismo (*Prichard, 1997*).
- Administrar la dosis correcta.
- Utilizar de forma alternativa antihelmínticos de diferentes grupos siguiendo una pauta anual (no más frecuentemente).
- Evitar la introducción de vermes resistentes, mediante la desparasitación de todos los animales adquiridos antes de juntarlos con el resto del rebaño.
- Utilizar el número mínimo de tratamientos; recordar que la frecuencia de tratamientos es una de las principales causas de selección rápida de resistencia.
- Utilizar los principios epidemiológicos del control de helmintosis, integrando el tratamiento de los animales con pautas de manejo.
- Fomentar entre los ganaderos el control anual del estado de resistencia de las parasitosis en sus explotaciones.
- Educar a los veterinarios de campo y ganaderos sobre la resistencia frente a los antihelmínticos y su *control* (*Kassai, 1998*).
- Aunado a esto, es indispensable el uso de alternativas de control no quimioterapéuticas como: estrategias de manejo del rebaño, del pasto, evitar la introducción de animales nuevos con parásitos poseedores de genes de resistencia, utilizar nuevas alternativas como la vacunación antihelmíntica y el control biológico en el medio ambiente de la explotación, etc. (*Kassai, 1998, FAO, 2003*).

2. INTRODUCCIÓN

Desde que se han ido presentando las enfermedades parasitarias, se les han dado diferentes tratamientos para su control y erradicación. Los parásitos que afectan a los humanos, fueron el primer foco de interés para generar productos antiparasitarios efectivos (*Bennet-Jenkins et al. 1996*). Actualmente, en la medicina veterinaria, las afecciones parasitarias son una causa importante de pérdidas debido a morbilidad y mortalidad de animales, reducción de niveles de producción y productividad, alteraciones reproductivas y los altos costos de control que esto implica, entre otros; dichas afecciones también están presentes en las especies que conviven continuamente con el humano, como mascotas o especies ornamentales (*FAO, 2003*). Las parasitosis diversas de las que hablamos, están originadas por la presencia de protozoos y metazoos parásitos, estos últimos organismos pluricelulares que incluyen grupos con diferente nivel evolutivo, entre los que se sitúan los helmintos (nematodos, cestodos, acantocéfalos) y los artrópodos, encontrando que algunos de ellos generan zoonosis y ocasionan serios problemas salud pública (*FAO, 2003*).

Los últimos 30 años se han caracterizado por la generación de muchas estrategias de control de endo y ectoparásitos que afectan a muchas especies, éstas tienen como principal objetivo eliminar o reducir ampliamente las poblaciones de parásitos con el uso de fármacos y/o productos químicos (*FAO, 2003; Minero, 1997*). Resulta fácil instaurar una estrategia de control cuando la economía de un país o región se encuentra en apogeo, los fármacos son eficaces y el productor se encuentra dispuesto a colaborar (*FAO, 2003*). La situación cambia radicalmente, cuando hay problemas de financiamiento y el productor debe afrontar otras prioridades dando origen a abusos en el uso de productos que se adquieren a un precio más económico o que se tienen al alcance de la mano,

entonces; el uso indiscriminado, dosis inadecuadas y/o condiciones ambientales adversas, propician que las poblaciones parasitarias generen resistencia de diversas maneras. Ésta se define, ampliamente, como la habilidad de una población de parásitos para tolerar dosis de productos tóxicos que serían letales para la mayoría de individuos en una población normal (susceptible) de la misma especie *(FAO, 2003)*. El desarrollo constante de nuevos principios para control antiparasitario, tiene como fin encontrar estrategias que permitan el uso prudente de un principio activo con acciones conjuntas que faciliten el uso racional del mismo, para que éste tenga un funcionamiento eficaz con el mínimo de efectos indeseables tanto para el paciente como para el medio ambiente *(Pereyra, 2004)*.

Como se citó anteriormente, las enfermedades parasitarias son un problema de salud pública de gran magnitud, y el problema es similar cuando de animales domésticos se trata *(Köhler, 2001)*. En resumen, los helmintos en general, son la causa más marcada de serias pérdidas económicas, particularmente en áreas donde se practica el pastoreo extensivo. Las compañías farmacéuticas han mejorado la seguridad y ampliado el espectro de los antihelmínticos, con esto han ayudado a reducir la incidencia de gran número de enfermedades parasitarias *(Köhler, 2001)*. Actualmente ha habido un sustancial progreso en la terapia antihelmíntica, se han desarrollado nuevos productos antiparasitarios y se han encontrado las dosis, el grado de eficacia y la seguridad en ellas, como en sus predecesores. Los antihelmínticos modernos son altamente eficaces, tanto en fases parasitarias maduras como inmaduras, así como en especies de helmintos gastrointestinales y en aquellos que son extraintestinales. Muchos de esos fármacos son bastante bien tolerados por el hospedero y en algunos casos los tratamientos solo requieren de dosis únicas, así como de pequeñas cantidades *(Köhler, 2001)*. La mayoría de los nuevos productos desarrollados afectan bioquímica y

fisiológicamente a sitios blanco de los parásitos como las proteínas estructurales, canales de iones, enzimas y transporte de moléculas (Köhler, 2001). Los blancos encontrados como “adecuados” en los helmintos, incluyen procesos como: actividad muscular y coordinación neuromuscular, procesos sensoriales, alimentación y la regulación de la presión celómica, por ejemplo. Hay algunos otros blancos quimioterapéuticos potenciales que incluyen metabolismo energético, obtención de nutrientes, metabolismo de ácidos nucleicos y algunas rutas anabólicas (Geary et al. 1999).

Se ha mencionado el gran avance en el desarrollo de nuevos productos antiparasitarios, sin embargo, hay que tener en cuenta que la generación y propagación de resistencia ha desgastado la utilidad de los antihelmínticos disponibles (aún siendo de nueva generación), favoreciendo la reducción de opciones de tratamiento. Los productos nuevos que formarán parte del arsenal quimioterápico, que están todavía en investigación y desarrollo, deberán de ser diseñados o producidos de tal forma que disminuyan estos aspectos adversos para el combate eficaz de las parasitosis.

El cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*, es difícil de erradicar del hospedero (Andrews et al., 1979), pero no han habido reportes de resistencia como tal a los fármacos antiparasitarios utilizados para su control y eliminación. Se ha encontrado recientemente que otros cestodos, principalmente de perros y gatos, persisten en sus hospederos aún después de la desparasitación con fármacos utilizados para tratar las cestodosis (p.ej. praziquantel) a las dosis recomendadas (Balbuena et al., 2004), por lo cual, es importante generar nuevos principios activos que amplíen las opciones para el tratamiento de este tipo de parasitosis, y no solo se limite al uso de unos cuantos productos, ya que se estaría propiciando la resistencia de los parásitos a dichos fármacos.

2.1 Tipos de parásitos

Bajo la condición de parásitos existen una gran variedad de organismos en la naturaleza. La parasitología cubre grupos definidos entre los que se incluyen: los protozoarios, helmintos y artrópodos.

La distinción más general en la morfología, está dada por el número de células que los componen. Existen protozoos y metazoos parásitos. Los primeros constituidos por una célula, y los últimos pluricelulares que incluyen grupos con diferente nivel evolutivo entre los que se sitúan los helmintos (nematodos, cestodos, acantocéfalos) y los artrópodos. En estos últimos organismos se considera una estructuración célula-tejido-aparato-sistema que integra al individuo, de diferente nivel evolutivo, con más o menos propiedades o componentes (Minero, 1997).

A continuación, se describe el grupo de los helmintos, por su importancia en este trabajo:

Los helmintos son animales invertebrados, de vida libre o parasitaria, conocidos como gusanos. El término helminto deriva de las palabras griegas *helmins* o *helmentos* y significa vermes, dicho término no tiene un significado zoológico claramente definido. Se utiliza para denominar popularmente a muchas variedades de pequeños animales invertebrados, carentes de extremidades, con cuerpo blando y alargado. El término helminto se restringe a los vermes parásitos, por lo tanto, éstos se definen como organismos que viven sobre o dentro de otros, a partir de los cuales obtienen parte o todos sus nutrientes orgánicos, éstos presentan habitualmente cierto grado de modificación estructural adaptativa y producen un daño real a su hospedador (Kassai, 1998).

Principalmente se distinguen los *Platyhelminthes* o gusanos aplanados, y los *Nematelminthes* o gusanos cilíndricos. La forma etimológica y correcta del nombre del phylum es *Platyhelminthes*, que deriva de dos voces griegas:

Platys: plano y *helminthes*: gusano (Lamothe, 1983). Los *Platyhelminthes* incluyen a los trematodos y los cestodos, los platelmintos en general, se caracterizan por su aspecto aplanado o acintado, con simetría bilateral y sin cavidad celómica. Con excepción de algunas planarias, todos son parásitos. Los trematodos son platelmintos cuyas fases adultas son aplanadas dorsoventralmente y tienen un aspecto ovalado o foliáceo. Presentan una ventosa muscular peribucal y una ventosa ventral o acetábulo, casi todos son hermafroditas. Los cestodos son aplanados dorsoventralmente, semejan cintas y por ello se les denomina tenias; son de tamaño variable, pero de constitución anatómica semejante, en la cual se puede diferenciar el escolex, el cuello y el estróbilo. Los nematodos son cilíndricos, alargados y aguzados en los extremos, de sección redonda con simetría bilateral, no segmentados y de tamaño variable (Minero, 1997).

Por ser el cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*, el organismo empleado como modelo en este trabajo, profundizaremos en la descripción del grupo a que pertenece.

2.2 Generalidades de los cestodos

Estos platelmintos son exclusivamente parásitos del intestino de vertebrados en estado adulto. No cuentan con una epidermis ciliada, pero sí con una cutícula especializada, órganos adhesivos en el extremo anterior, cuerpo segmentado, cada segmento o proglótido cuenta con un juego de órganos reproductores masculinos y femeninos, carecen de aparato digestivo, circulatorio y respiratorio, el excretor y nervioso apenas representados, el reproductor bien desarrollado, ciclos de vida complejos en los que intervienen dos o más hospederos. El huevo contiene un embrión hexacanto (6 ganchos). Se conocen aproximadamente 3,500 especies (Lamothe, 1983).

⇒ 2.2.1 Clasificación de los cestodos (Lamothe, 1983).

- *Phylum: Platyhelminthes.* Organismos con cuerpo aplanado dorsoventralmente.
- *Clase: Cestoda.* Con cuerpo generalmente segmentado.
- *Subclase: Eucestoda.* Cuerpo con escolex, cuello y estróbilo, sin aparato digestivo.

Incluye éstos órdenes:

1. Protocephallidea
2. Tetraphyllidea
3. Lecanicephaloidea
4. Pseudophyllidea
5. Trypanorhyncha
6. Cyclophyllidea

○ Familias:

- *Mesocestoididae*
- *Anoplocephalidae*
- *Devaineidae*
- *Dilepididae*
- *Hymenolepididae*
 - *Hymenolepis nana*
 - *Hymenolepis diminuta*
 - *Hymenolepis microstoma*
- *Taeniidae*
- *Pseudophyllidae*
- *Diphyllobotriidae*

7. Aporidea
8. Nippotaeniidea
9. Caryophyllidea
10. Spathebothridea

⇒ **2.2.2 Clase: Cestoda** (Lamothe, 1983)

▪ *Características generales*

Los cestodos presentan un cuerpo acintado, aplanado en sentido dorsoventral, en el que se observan tres regiones bien definidas: el escolex, el cuello y el estróbilo o cuerpo. En la mayoría el estróbilo es segmentado (proglótidos) (Lamothe, 1983; Kassai, 1998). Las estructuras internas de los cestodos incluyen: pared del cuerpo, parénquima, musculatura, sistema osmorregulador, sistema nervioso, aparato reproductor masculino y femenino (Quiroz, 2005).

- *Localización:* Los adultos de la mayoría de las especies de cestodos se localizan en el intestino delgado, fijados a la mucosa por medio de su escolex (Kassai, 1998).
- *Tamaño:* Por lo general son pequeños, pero pueden medir desde 1mm hasta varios metros (Lamothe, 1983).
- *Color:* Por regla general son blancos o blanco amarillentos (Lamothe, 1983).
- *Escolex:* El escolex o región cefálica es un órgano de fijación característico de los cestodos está provisto de diferentes estructuras adhesivas como botrias, botridios, ventosas o ganchos (Lamothe, 1983). Las ventosas o acetábulos son característicos de los *Cyclophyllidea*, y se presentan como 4 depresiones musculosas. Con frecuencia presentan ganchos arreglados en una o dos hileras, llamadas rostelo (que puede estar armado por una o más coronas concéntricas de ganchos) cuyo número, forma y disposición son de importancia taxonómica (Lamothe, 1983; Kassai, 1998).
- *Cuello:* Esta porción situada inmediatamente abajo del escolex, no es segmentada, su función es generar el proceso de estrobilación para formar nuevos proglótidos (Lamothe, 1983) (Fig. 1).

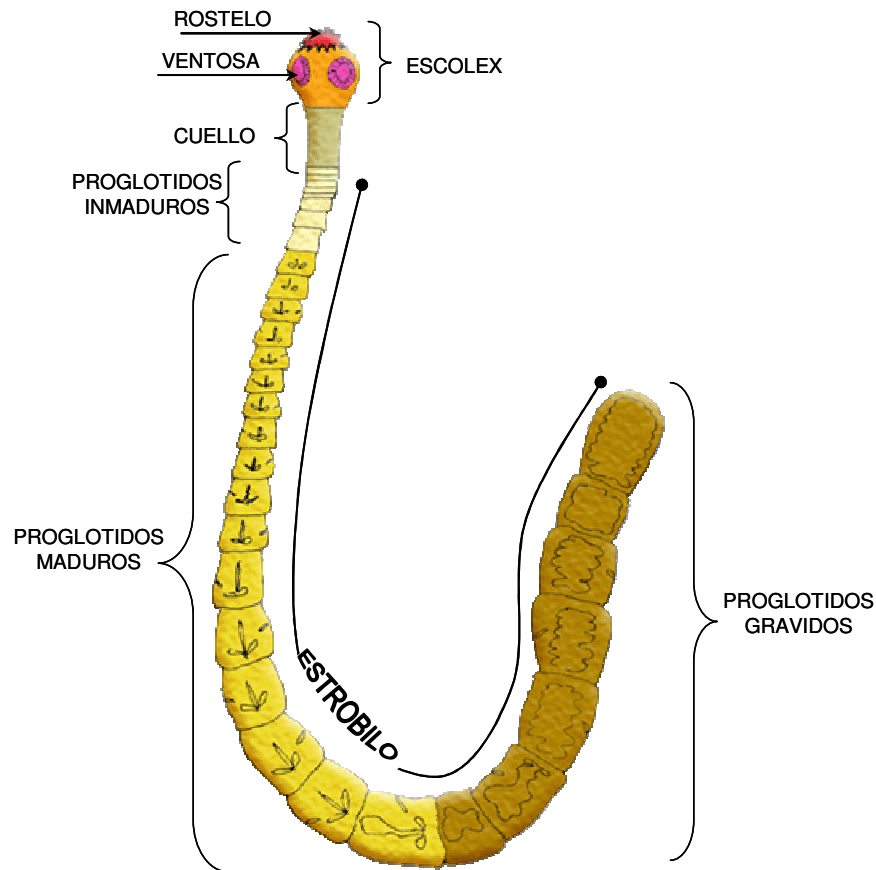


Fig. 1. Esquema general de un cestodo (A.G.B.P., 2007).

- Estróbilo:* El estróbilo o cuerpo propiamente dicho, está constituido, generalmente, por una especie de segmentos o proglótidos que varían según la edad y la especie, se pueden distinguir tres zonas. La primera, cercana al cuello, que presenta segmentos inmaduros; la media, en donde los segmentos son maduros, es decir, se observan los órganos reproductores; y la posterior, en donde se observan proglótidos grávidos, éstos de mayor tamaño, en donde el útero se encuentra hipertrofiado por estar lleno de huevos. (Lamothe, 1983). Los proglótidos maduran a medida que avanzan por el estróbilo (Kassai, 1998). Cada segmento maduro es una unidad hermafrodita compleja que contiene una o dos dotaciones de órganos femeninos y varios masculinos (Kassai, 1998; Quiroz, 2005). Los proglótidos grávidos

o seniles, ocupan la porción posterior del parásito, la mayoría de los órganos genitales se atrofian por la presión que ejerce el útero lleno de huevos o las cápsulas ovígeras que llegan a ocupar gran parte del proglótido grávido (Quiroz, 2005). Los proglótidos pueden contener huevos aislados, fragmentos del útero (fragmentos parauterinos) con los huevos o paquetes de huevos o cápsulas ovígeras (Kassai, 1998). Estos proglótidos se desintegran o se desprenden para ser eliminados en las heces (Quiroz, 2005). En algunos cestodos el estróbilo está formado por un proglótido de cada tipo; entonces se le llama monozoico, otras veces tienen docenas o cientos de proglótidos de cada tipo y entonces se les denomina polizoicos (Quiroz, 2005).

- *Tegumento* (Fig. 2): Los cestodos dependen únicamente de su tegumento para la adquisición de alimento (Halton, 1997), éste es su principal órgano digestivo y de absorción (Jones, 1998). Como enteroparásitos, estos viven en ambientes que son generalmente ricos en nutrientes de bajo peso molecular, siempre abundantes por la forma de nutrición del hospedero. Esto ha sido una ventaja para dichos parásitos, ya que explotan la superficie de su cuerpo como un “sistema” para obtener alimento, porque al carecer de intestino desarrollaron un mecanismo interno para la obtención de nutrientes (Halton, 1997). La pared del cuerpo está formada por varias capas; una externa llamada cutícula, de la que es parte el tegumento, y que tiene uno o más estratos, de aspecto transparente sin poros (Quiroz, 2005). Haciendo una comparación, el tegumento de un parásito plano tiene funciones de absorción similares a las de la mucosa intestinal de los mamíferos, pero tienen funciones más complejas (Jones, 1998). Este tegumento posee un borde de micropelos el cual es análogo a las microvellosidades intestinales, estos micropelos son únicos en

los cestodos (Jones, 1998). La membrana plasmática que delimita estas estructuras mueve moléculas que son fáciles de transportar como azúcares, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos (Halton, 1997). El parénquima de los cestodos es un tejido sólido que contiene células, principalmente miocitos, alrededor de una extensa matriz extracelular (Jones, 1998). El amplia área de superficie de los parásitos aplanados y la corta distancia de difusión, favorecen la absorción de nutrientes a través de la superficie (Kearn, 1998). La superficie de absorción puede incrementarse hasta diez veces debido a que los micropelos, y otras modificaciones morfológicas y bioquímicas, han evolucionado para facilitar el transporte eficiente dentro del parásito y cubrir sus necesidades nutricionales (Halton, 1997).

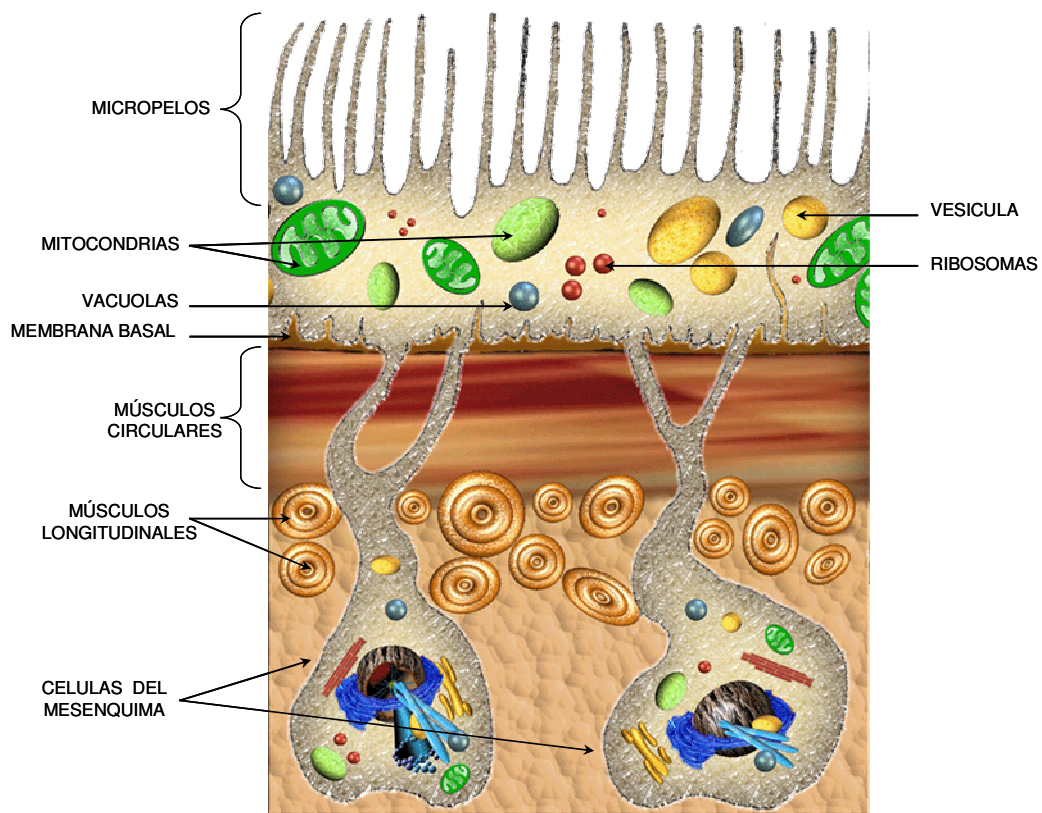


Fig. 2. Capas que conforman el tegumento de los cestodos (A.G.B.P., 2007).

La capa citoplasmática, de la cual los micropelos derivan, es un sincitio con dos niveles: uno externo con numerosos organelos como mitocondrias, ribosomas, vacuolas y gránulos etc., y uno interno comunicado por puentes al exterior, consistiendo principalmente de citones con citoplasma perinuclear, ambos divididos por una lámina basal, debajo de la cual se encuentra la musculatura, constituida por una capa externa de músculos circulares y una interna de músculos longitudinales (*Lamothe, 1983*). Una delgada capa de células neuromusculares está debajo de la anterior, que continúa por una capa subcuticular compuesta de células bipolares, alargadas o epidérmicas situadas a varias profundidades (*Quiroz, 2005*).

El parénquima es el espacio que encierra el cuerpo independientemente de las estructuras osmorreguladoras, fibras musculares, sistema nervioso y reproductor. Las células parenquimatosas sirven de reserva de glicógeno y entre ellas hay abundante fluido (*Lamothe, 1983; Quiroz, 2005*).

- *Nutrición:* La absorción se realiza a través de los tegumentos donde intervienen de una manera directa los micropelos. Las reservas de glicógeno representan un 60% de su cuerpo (*Lamothe, 1983*). Existen evidencias de estudios realizados *in vitro* que sugieren una compleja relación nutricional entre hospedero y cestodo. Hay que considerar dos aspectos: primero, los cestodos como las plantas y algunos protozoarios, son capaces de fijar el CO₂, dando como consecuencia una eficiente utilización de material de la mucosa intestinal del hospedero; es conocida la alta actividad metabólica que tienen las células de la mucosa, asociadas sin duda al alto nivel de CO₂ intestinal. El segundo aspecto observado es que los cestodos son capaces de tomar el material nutritivo por contacto directo con la mucosa intestinal. Tanto el escolex como el estróbilo tienen

capacidad para absorber nutrientes de la mucosa intestinal. Este proceso se conoce parcialmente, aunque se considera que el tegumento del parásito solamente ingiere partículas de moco o detritus celulares por pinocitosis (Quiroz, 2005). Otra alternativa que se considera es que el escolex secreta enzimas proteolíticas u otras enzimas, que atacan la mucosa intestinal y las células degeneradas o las secreciones de moco, incluyendo en algunos casos la digestión de la membrana. Los cestodos utilizan su estróbilo para obtener nutrientes del medio en donde viven, o sea material semilíquido y semidigerido, el cual es absorbido por difusión, transporte activo y posiblemente pinocitosis por medio del tegumento. Posteriormente los materiales nutritivos disponibles en el intestino son suplementados con carbono y oxígeno obtenidos del CO₂ y materiales relacionados con la interfase hospedero - parásito (Quiroz, 2005).

- *Metabolismo respiratorio:* Carecen de un aparato respiratorio diferenciado; la respiración es anaerobia, y utilizan el glicógeno como fuente de energía (Lamothe, 1983)
- *Carecen de aparato circulatorio* (Lamothe, 1983).
- *Aparato excretor* (Fig. 3 y 3a): Es de tipo protonefridial o en células flama (llamadas así por su movimiento). Está constituido por 4 vasos colectores longitudinales principales, 2 ventrolaterales y 2 dorsolaterales, los primeros se unen entre sí, por medio de un canal transversal, en la parte inferior de cada proglótido (Lamothe, 1983). El líquido colectado por las células flama, entre ellos agua y excreciones, es lanzado a los tubos de mayor calibre para llegar al exterior del último proglótido y ser eliminado al exterior del parásito (Quiroz, 2005).

Fig. 3. Estructura del aparato excretor en los proglótidos de un cestodo (A.G.B.P., 2007).

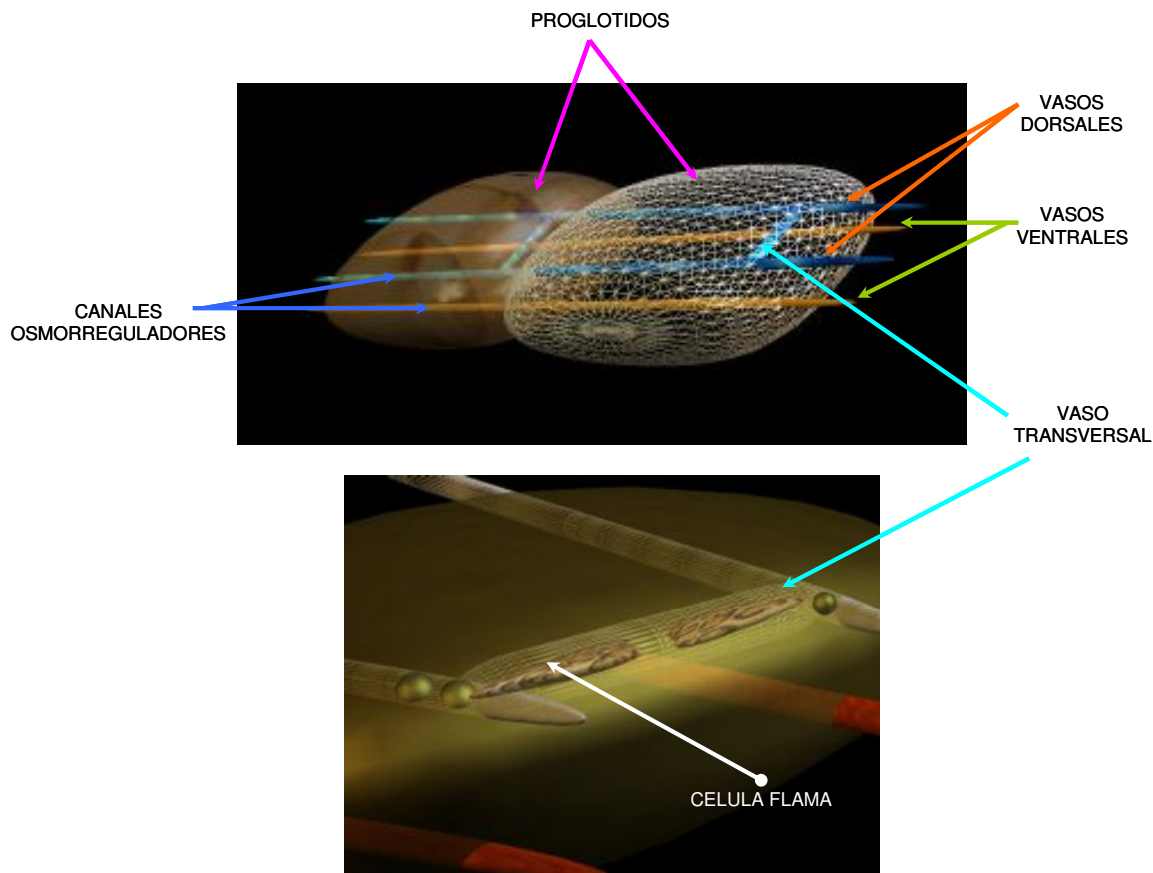


Fig. 3a. Detalle de la localización de la célula flama (transversal) en el aparato excretor (A.G.B.P., 2007).

Sistema nervioso (Fig. 4 y 4a): Considerando que carecen de coordinación, el sistema nervioso de los cestodos consiste, básicamente, en un ganglio cerebroide (denominado así por que regula las funciones vitales del organismo con células semejantes a neuronas) y está situado en el escolex, de forma más o menos rectangular, del que parten 4 troncos nerviosos longitudinales, 2 ventrolaterales y 2 dorsolaterales más delgados, unidos entre sí por comisuras transversales a nivel de cada proglótido. Los nervios que salen del ganglio cerebroide inervan los músculos, tegumentos y órganos

reproductores. Recientemente se ha demostrado que existen terminaciones nerviosas sensoriales, morfológicamente semejantes a las de otros invertebrados, aunque su exacto mecanismo funcional es aún desconocido (Lamothe, 1983).

Fig. 4. Esquema general del escolex que detalla la ubicación del sistema nervioso en los cestodos (A.G.B.P., 2007).

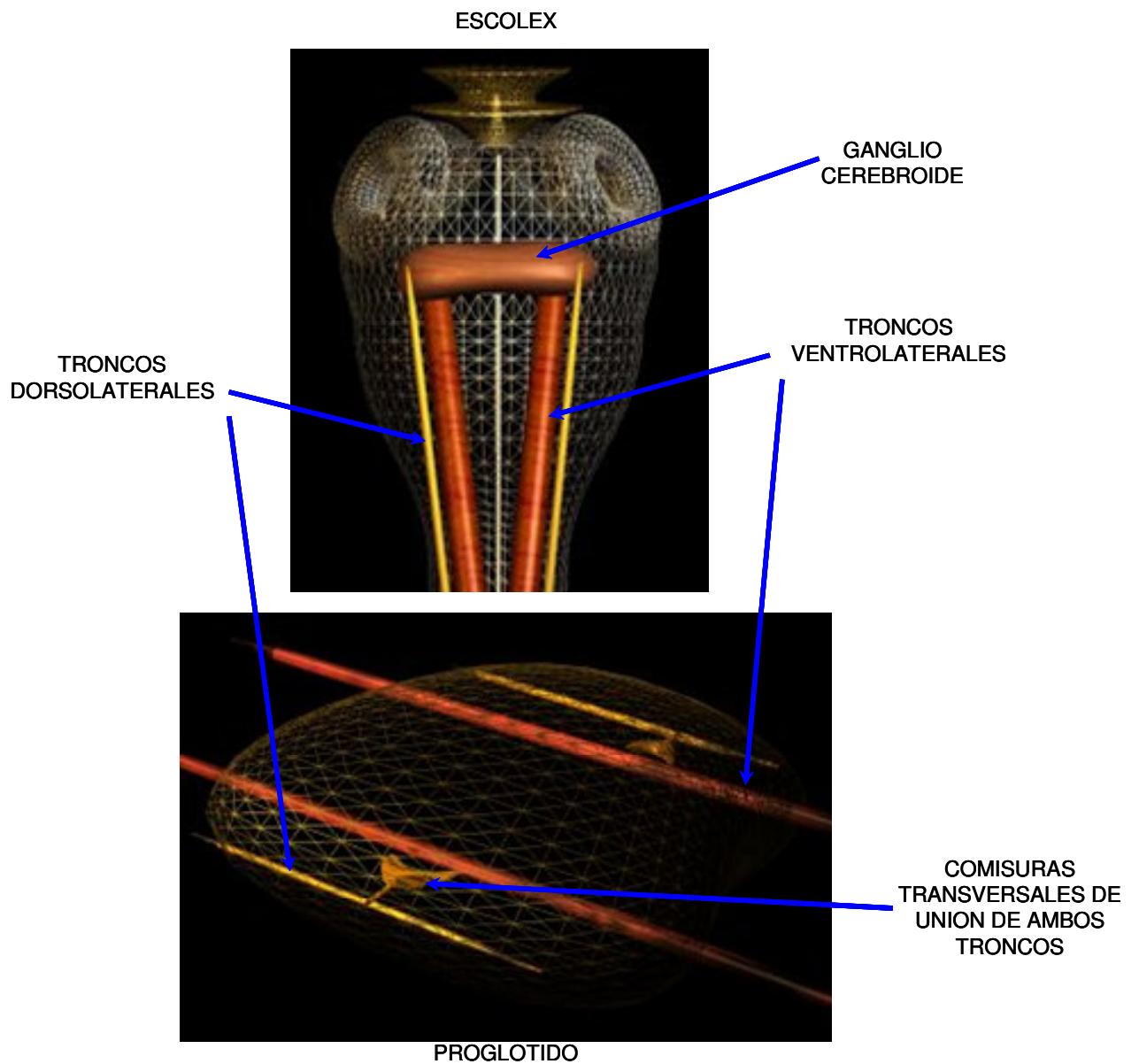


Fig. 4a. Esquema que muestra la ubicación de los troncos nerviosos en los proglótidos de un cestodo (A.G.B.P., 2007).

- *Aparatos reproductores* (Fig. 5): Los cestodos son reproductores altamente prolíficos, y este enorme potencial reproductivo en muchas especies origina, asimismo, la capacidad de replicar su sistema reproductivo. Muchos cestodos copian uno o más veces su sistema reproductivo en muchos de sus segmentos somáticos. Este proceso puede ser repetido con gran velocidad, generando muchos cientos o miles de segmentos, frecuentemente con una pequeña variación entre éstos, excepto por desviaciones en la localización de los poros (senos) genitales, así como el número y lugar de algunas gónadas (Jones, 1998).

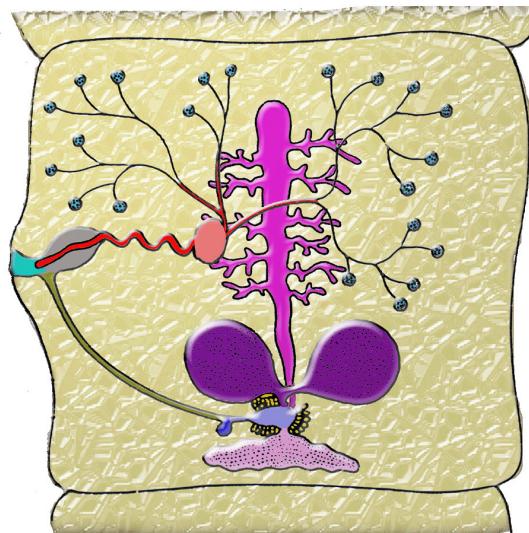


Fig. 5. Disposición anatómica general de la ubicación de los aparatos reproductores en un proglótido maduro de cestodo (A.G.B.P., 2007).

- *Aparato reproductor masculino* (Fig. 6): Este consiste de uno, dos o numerosos testículos. En la mayoría de los cestodos, están situados en el parénquima medular, de cada testículo sale un conducto eferente, este se ensancha para constituir una vesícula seminal que entra, por regla general, a un cirro junto con las glándulas prostáticas. En algunas especies puede existir una vesícula seminal

externa, además de una interna, la bolsa del cirro desemboca a un atrio genital y éste al poro genital que se encuentra localizado, casi siempre lateralmente en el proglótido (*Lamothe, 1983*).

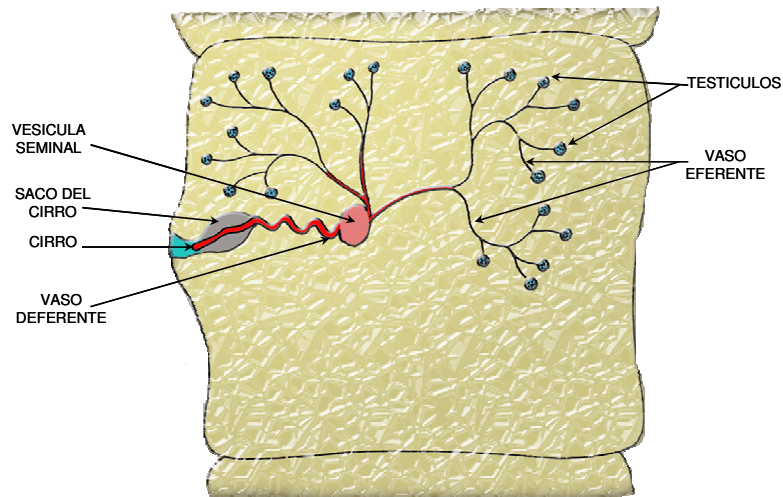


Fig. 6. Estructura general del aparato reproductor masculino y sus componentes
(*A.G.B.P., 2007*).

- *Aparato reproductor femenino* (Fig. 7): Consiste por lo general, de un solo ovario, lobulado o no, del cual parte un oviducto que llega al ootipo, que se encuentra rodeado por unas glándulas unicelulares llamadas de Mehlis, dichas glándulas secretan una membrana muy delgada alrededor del cigoto y están asociadas a las glándulas vitelinas o vitelógenas. La formación de la cutícula o cascarón del huevo es completada en el interior de las glándulas vitelinas (*Schmid, 2000*). El ootipo recibe la desembocadura del viteloducto, que resulta de la unión de varios conductos que vienen en las glándulas vitelógenas, cuya situación varía según las especies. La vagina llega al ootipo, ésta se ensancha y constituye un receptáculo seminal. Del ootipo sale el útero, que, por regla general es ciego; la vagina se inicia en el poro genital común. Durante la cópula, el cirro de un

proglótido se introduce en la vagina de otro proglótido del mismo gusano, o de otro, cuando existen varios individuos en un hospedero (Lamothe, 1983).

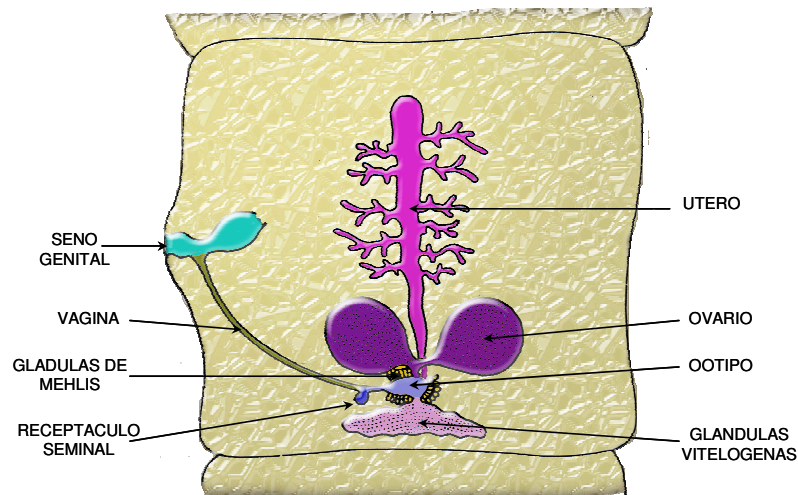


Fig. 7. Estructura general del aparato reproductor femenino y sus componentes (A.G.B.P., 2007).

- *Ciclo de vida:* Generalmente requieren de uno o dos hospederos intermediarios (Lamothe, 1983). El ciclo biológico es indirecto. En el orden *Cyclophyllidea*, el embrión hexacanto u oncósfera no tiene cilios y permanece dentro de la cubierta del huevo hasta que es ingerido por el hospedero intermediario vertebrado o invertebrado (Quiroz, 2005). Posteriormente el embrión evoluciona a una de las fases larvarias o metacestodos que se desarrolla en un hospedador intermediario y al final se convierte en adulto en el hospedero definitivo (Kassai, 1998).
- Tipos de estadios larvarios infectantes (metacestodos) de los cestodos *Cyclophyllidea* (Kassai, 1998).
 - *Cisticerco:* vesícula llena de líquido con un escolex invaginado (Kassai, 1998).

- *Estrobilocerca*: pequeña vesícula unida a un escolex evaginado mediante un tejido sólido, segmentado y largo similar a un estróbilo juvenil (Kassai, 1998).
- *Cisticercoide*: un escolex evaginado embebido en una pequeña vesícula sólida (Kassai, 1998).
- *Tetraridio*: un escolex invaginado con una larva sólida, vermiforme (Kassai, 1998).
- *Cenuro*: vesícula llena de líquido y tapizada internamente por una membrana germinal a partir de la cual se forman por gemación numerosos protoescolex, que permanecen unidos a la pared (Kassai, 1998).
- *Quiste hidatídico* (metacestodo de *Echinococcus spp.*): vesícula llena de líquido con una pared cuticular laminar tapizada internamente por una membrana a partir de la cual se forman por gemación numerosos protoescolex libres o en grupos (Kassai, 1998).

2.3 Características generales: Familia *Hymenolepididae* (Dunn, 1978).

⇒ 2.3.1 Descripción general de *Hymenolepis spp.*

- *Hospederos definitivos*: Las aves, los mamíferos y el hombre.
- *Hospederos intermediarios*: Una gran variedad de artrópodos, entre los que tenemos a las tijeretas (*Anisobis*), los escarabajos estercoleros, los miriápodos (*Fontaria* y *Janus*), las pulgas (*Ctenocephalides*), las polillas (*Pyralis*) y los copépodos (*Cyclops*).
- *Localización dentro del hospedero*: Intestino delgado.
- *Distribución geográfica*: Mundial

⇒ 2.3.2 Descripción del cestodo modelo *Hymenolepis nana* var. *fraterna* (Fig. 8, 8a, 8b).

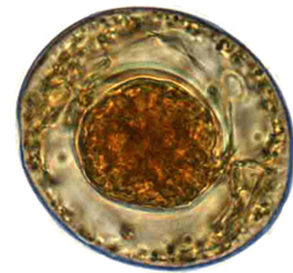


Fig. 8. Cestodo adulto

Fig. 8a. Cisticercoide

Fig. 8b. Huevo

Fig. 8. Fotografía del escolex de *H. nana* obtenida por microscopía electrónica (<http://www.stanford.edu>). Fig. 8a. Esquema representativo del cisticercoide de *H. nana* (Kearn, 1998). Fig. 8b. Fotografía del huevo de *H. nana*, obtenida por microscopio óptico (<http://www.helsenr.no>).

Hymenolepis nana parasita a los ratones y al hombre (Dunn, 1978). Este parásito se describe como un cestodo pequeño, raramente excede los 40mm de largo por 1mm de ancho, es llamado la “*tenia enana*” del humano y es comúnmente vista en niños que se contaminan con heces e ingieren accidentalmente los huevos del parásito (Kearn, 1998). *Hymenolepis nana* var. *fraterna* es un cestodo similar al del humano, pero sólo parasita a los ratones e infecta a otros animales, no se ha demostrado completamente que ésta variedad parasite al humano, por lo tanto es considerada como una especie morfológicamente igual (Henderson et al. 1987).

Es conocido que las ratas y ratones ingieren heces, este hábito facilita el desarrollo del ciclo de vida al cestodo *Hymenolepis nana*, parásito del ratón. En las heces van los huevos de dicho parásito, y son ingeridos por algunos escarabajos, en su cavidad hemocélica se origina el cisticercoide.

El huevo de este parásito es de forma ovoide, mide 50µm de largo y en su interior se encuentra el embrión que posee un botón en cada extremo. Estos botones tienen un filamento largo y delgado, le dan al huevo un aspecto de limón. Las oncósferas tardan dos semanas en alcanzar su estado de cisticercoide dentro del artrópodo (Dunn, 1978). Un aspecto interesante de éste cestodo, es que sus oncósferas pueden seguir su ciclo de vida como cualquier otro cestodo o alcanzar la misma fase de cisticercoide en las vellosidades del hospedero final (Kearn, 1998). El hospedero final adquiere la infección por ingestión del hospedero intermediario. Las oncósferas se diferencian en metacestodos (cisticercoides) en el tejido intestinal de ratón o rata en 4 días o en escarabajos en aproximadamente 2 semanas (a una temperatura promedio de 20°C). Los metacestodos desarrollados en el ratón o escarabajos desarrollan a formas adultas en el lumen intestinal del mismo ratón u otro hospedero definitivo en 10 días. *Hymenolepis nana* (adaptada al ratón) no desarrolla a formas adultas en ratas (Ito, 1997; Ito et al. 1988). Sin embargo, en un ciclo directo, los huevos ingeridos por el ratón quedan atrapados en el intestino y el embrión hexacanto penetra en las vellosidades intestinales para después transformarse en un cisticercoide. En 5 o 6 días el cisticercoide maduro vuelve a la luz intestinal y el escolex que se evagina de él se adhiere a la mucosa intestinal (Kearn, 1998). Este tipo de comportamiento representa el punto más alto en la evolución de los cestodos, pues han suprimido al hospedero intermediario. El periodo de prepatencia es de dos a tres semanas (Dunn, 1978).

⇒ 2.3.3 Ciclo biológico *Hymenolepis nana* var. *fraterna* (Fig. 9)

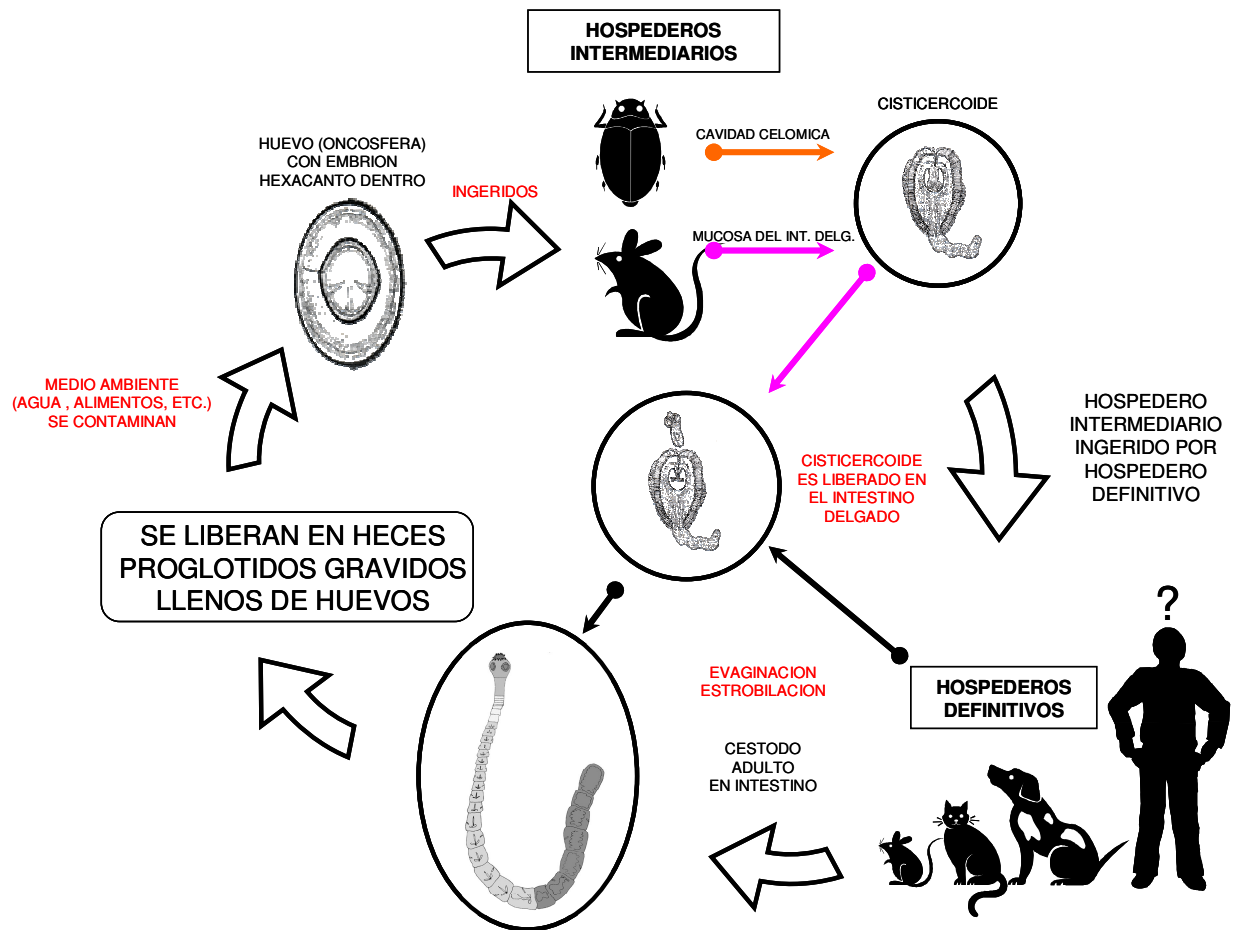


Fig. 9. Ciclo biológico de *Hymenolepis nana* (A.G.B.P., 2007).

La presencia del cestodo en el intestino de los roedores genera una respuesta inmune a dicho parásito. *Minero, 1997*; recomienda utilizar animales de experimentación jóvenes para la realización de pruebas de fármacos anticestódicos, ya que cestodos del tipo de *Hymenolepis nana*, en los que la fase larvaria es de cisticercoide, y en particular cuando tienen un ciclo de vida con la variabilidad de ser directo o indirecto, se toma en cuenta que, en general, los embriones recién eclosionados del huevo son potencialmente antigénicos, ya que producen sustancias estimuladoras que son capaces de desencadenar respuestas contra ellos, convirtiéndose

de este modo en factores que impiden la implantación de los gusanos, por lo que la exposición de los organismos a la infestación sensibiliza al animal impidiendo la implantación posterior de nuevos parásitos. Se ha visto una marcada susceptibilidad al parásito en animales jóvenes, ya que tardan más tiempo en montar una respuesta inmunológica que un hospedero adulto (Minero, 1997). *Hymenolepis nana* es un cestodo altamente inmunogénico en el ratón. Los ratones que reciben una sola inoculación vía oral de huevos de *Hymenolepis nana*, adquieren la infección y suelen generar una inmunidad protectora, dichos huevos pueden ser rechazados completamente si se les inhibe el crecimiento larvario en la vellosidad intestinal. Esta inmunidad adquirida es dependiente del timo y en ratones atímicos desnudos se ha visto que es transferida porque las células T cooperadoras (Linfocitos T), específicamente las identificadas como L3T4⁺ (Asano et al. 1986), juegan un papel importante. Estas células median la respuesta inmune a través de la producción de diferentes tipos de factores humorales, llamados citocinas, en respuesta a la estimulación antigénica (Asano et al. 1993). Este aumento de producción de citocinas ha sido observada *in vivo*, donde se ha obtenido extracto acuoso de nódulos mesentéricos del intestino delgado de ratones infectados con *Hymenolepis nana*, y se ha demostrado que contienen grandes cantidades de células T, citocinas como IFN γ (interferón gamma), e IL 2 (interleucina 2), comparados con ratones control no infectados. El IFN γ es el factor activador de macrófagos más importante, ya que ha sido demostrado que induce la expresión de antígenos en la superficie de los macrófagos, esto tiene una particular importancia en la presentación de dichos antígenos a las células T, ya que influye en la expulsión de los cisticercoides del intestino delgado. Otras citocinas están asociadas con la infección de *Hymenolepis nana* como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) e IL 1 β . Estas dos citocinas son producidas endógenamente en el intestino

delgado, y el pico de actividad coincide con la eliminación del cestodo durante la infección, ya que dichas citocinas crean, directa o indirectamente, un ambiente desfavorable para los estadios larvarios (*Asano et al. 1997*).

El utilizar animales de experimentación jóvenes, y preferencialmente machos, se debe a que hay varios factores relacionados al hospedero que pueden afectar el crecimiento de los helmintos. El sexo del hospedero es una variable que puede afectar el crecimiento o la cantidad de parásitos, ya que existen diferencias intrínsecas entre hospederos machos o hembras en cuanto a fisiología, inmunología, conducta y ecología, que pueden hacer que un sexo u otro hagan un buen ambiente para los helmintos. Las diferencias entre ambos sexos se han visto en niveles de infección en poblaciones naturales: hospederos machos, especialmente aves y mamíferos, casi siempre hospedan más helmintos que las hembras. Esto se debe, por ejemplo, a la acción de la testosterona que induce cierto nivel de inmunosupresión, por lo tanto no se monta una respuesta inmune adecuada; a que los machos son más grandes y consumen más cantidad de alimento, entonces aportan una cantidad mayor de nutrientes que los parásitos aprovechan, entre otros. Los hospederos machos crean mejores condiciones para el desarrollo de los helmintos que las hembras (*Poulin, 1996*).

2.4 El diseño de fármacos y el modelado molecular

El Laboratorio de Química Medicinal de la FES Cuautitlán utiliza, como herramienta para la creación de fármacos en general, programas de computadora especializados para realizar búsquedas sistemáticas a gran escala, con el propósito de encontrar sustancias cada vez con mayor efecto terapéutico y menor toxicidad. Los programas que realizan esta búsqueda, la efectúan en etapas. La primera, en el complejo proceso del desarrollo de fármacos, es la elección del blanco molecular sobre el que

actuará el medicamento para lograr el efecto terapéutico deseado. Diversas investigaciones sobre los fármacos empleados en las últimas décadas han revelado que la acción terapéutica de éstos incide principalmente en proteínas, ya sea como receptores moleculares o como enzimas. Por esta razón, en el diseño racional de medicamentos, las proteínas pueden considerarse como la primera opción para fungir como moléculas blanco. La selección de la proteína específica de trabajo dependerá de la información disponible sobre el mecanismo molecular responsable del desarrollo de la enfermedad particular que se estudie (*Cea et al. 2002*). El efecto deseable en un nuevo fármaco es el control de los procesos bioquímicos alterados en un paciente, o bien el evitar que un organismo patógeno realice sus procesos invasivos naturales. En este último caso, lo ideal es seleccionar como molécula blanco a una proteína que sea indispensable para la supervivencia del organismo patógeno y que esté ausente en el hospedero; así, un fármaco que se una a esa proteína e impida su correcto funcionamiento tiene posibilidades de ser un buen fármaco. La identificación de moléculas blanco con estas características es complicada ya que en muchas ocasiones, la proteína en cuestión existe simultáneamente en el hospedero y en la especie patógena y es entonces necesario que el ligando, o fármaco por desarrollar, se fije exclusivamente a la proteína del patógeno. En los casos donde la enfermedad que desea tratarse se debe al funcionamiento inapropiado de la maquinaria molecular del propio paciente, es preciso indagar el tipo y modo de acción particular de las enzimas involucradas en la disfunción y elegir como blanco de estudio la molécula que esté mejor caracterizada. La elección del sujeto de estudio puede validarse a través de experimentos que permitan conocer el efecto de la modificación funcional del blanco (o incluso de la ausencia total del mismo) sobre un microorganismo (*Cea et al. 2002*).

Cuando se trabaja con proteínas, y particularmente con enzimas como sustancias blanco, deben considerarse tres factores importantes: la especificidad o selectividad molecular de la enzima, la afinidad o fuerza con que se fija el sustrato a ella, y la geometría del sitio de unión. Muchos fármacos son inhibidores de la función de una enzima a través de un bloqueo efectivo del sitio activo o de las zonas coadyuvantes de la catálisis. En estos casos es deseable desarrollar compuestos que se unan con gran firmeza y alta especificidad a los sitios funcionales, y para desarrollar un fármaco con ambas características es imprescindible conocer con detalle la geometría del sitio de unión. La siguiente etapa del proceso en el diseño de medicamentos es la identificación de moléculas líder, que son aquellos compuestos que muestran tener una actividad significativamente alta sobre el blanco seleccionado. En esta fase del trabajo es preciso realizar una serie de experimentos en microescala con varios cientos de miles de compuestos distintos (Cea et al. 2002). Estos ensayos masivos de laboratorio son realizados rutinariamente por las grandes compañías farmacéuticas; y son costosos dado que requieren de la instrumentación de pruebas biológicas que puedan ser realizadas y analizadas ágilmente, y porque además se requiere de un banco enorme de compuestos químicos que debe ofrecer acceso y consulta expeditos. Las moléculas líder que demuestran ser químicamente viables y poseer alta actividad biológica son caracterizadas estructuralmente y sometidas después a un proceso de optimización de su potencia farmacológica. En este paso se generan derivados de las moléculas líder, y se determina su estructura tridimensional, así como la relación que existe entre la actividad biológica que manifiestan y algunas de sus propiedades moleculares; tarea que se lleva a cabo con el empleo de la técnica conocida como QSAR (siglas en inglés para *Quantitative Structure-Activity Relationship*). Los resultados obtenidos con esta técnica dirigen el diseño de nuevos compuestos con

actividad farmacológica que se presume será mayor a la de los líderes previos. Estos nuevos compuestos deben ser sintetizados en el laboratorio y, si confirman poseer mayor potencia farmacológica, se reincorporan al proceso de optimización en una serie de etapas interactivas. Si alguna de estas sustancias logra unirse con suficiente firmeza al blanco, entonces se realiza un estudio detallado de su viabilidad biológica, su estabilidad química y metabólica, sus propiedades fisicoquímicas (solubilidad, lipofilicidad, etc.), su selectividad y su posible mecanismo de acción (Cea et al. 2002).

Los ensayos masivos que se llevan a cabo en las primeras etapas del desarrollo de fármacos, requieren de un gran despliegue de recursos puesto que, además de utilizar grandes bancos de datos, es necesario obtener, procesar y almacenar cantidades colosales de resultados experimentales. Por esta razón, en años recientes se ha optado por los estudios *in silico*, donde una simulación molecular por computadora realiza los ensayos masivos con el fin de hallar moléculas líder de una forma eficiente y relativamente económica. Este método de reconocimiento molecular o *docking*, es ampliamente utilizado alrededor del mundo por compañías privadas y por instituciones de investigación pública para el hallazgo de nuevos compuestos con efectos terapéuticos. Si bien la técnica del *docking* representa una alternativa a los procedimientos de ensayo masivo de laboratorio, también, y de manera más importante, ella ha sido utilizada en el diseño de fármacos, tanto para llevar a cabo las etapas de identificación del sitio de unión sobre el blanco, como las de construcción y evaluación de los complejos moleculares resultantes (Cea et al. 2002).

Para describir la metodología del *docking* es útil dividirla en una serie de etapas: la primera de ellas consiste en disponer de la estructura tridimensional de la molécula blanco, la cual debe ser acondicionada para los cálculos subsecuentes y sobre la que debe identificarse el sitio de unión

de una molécula de prueba (generalmente pequeña en relación con el blanco). La siguiente etapa requiere poseer un archivo numeroso de ligandos potenciales, esto es, moléculas orgánicas con estructuras tridimensionales conocidas y que se encuentran en condiciones adecuadas para simular su asociación al blanco. La tercera etapa, que es la parte medular del método, consiste en un algoritmo de computadora que toma cada uno de los ligandos de la base datos y lo coloca dentro del sitio de unión en una gran cantidad de orientaciones. Durante esta etapa es indispensable emplear un criterio numérico para distinguir cuál de todas las opciones probadas resulta ser la más adecuada, es decir, la que adoptaría el ligando si tuviera acceso al sitio de unión; a este criterio se le llama puntaje. Una vez establecidas las condiciones descritas anteriormente, el proceso para probar orientaciones se repite para cada ligando de la base de datos, ésta es la etapa que consume la mayor cantidad de tiempo de cálculo. Finalmente, el programa de cómputo ordena los diferentes compuestos probados de acuerdo al puntaje de su orientación óptima y entonces, el usuario puede analizar estos resultados y planear experimentos para validar los resultados generados en la simulación por computadora (Cea et al. 2002).

Antes de que un producto salga al mercado, es preciso realizar muchas pruebas sobre organismos específicos para determinar los efectos secundarios y la dosis correspondiente para su administración (Cea et al. 2002).

2.5 Quimioterapia antihelmíntica utilizada en este proyecto

En un panorama general, se puede reconocer que existen muy pocos fármacos que sean anticestódicos efectivos como la niclosamida o pranicuanter, el albendazol y con ciertas limitaciones el mebendazol. Al

descubrirse el praziquantel, los laboratorios Bayer y Merck, en conjunto, efectuaron diversas pruebas para identificar el espectro antihelmíntico de éste último, teniendo un gran éxito como anticestódico; se le hizo una comparación frente a la niclosamida, ya probada con antelación, y se determinó que era "*igualmente efectivo*" dándole una gran aceptación en el mercado farmacológico y haciéndolo una opción segura contra las cestodosis (Minero, 1997). En cuanto a los bencimidazoles como el albendazol y el mebendazol han sido efectivos como anticestódicos en quimioterapias de larga duración, como en procesos de neurocisticercosis e hidatidosis. Es importante remarcar que el albendazol posee un amplio espectro antihelmíntico reconocido, y que el mebendazol en algunos países está restringido debido a los molestos efectos secundarios que produce (mareos, vómitos, etc.), no así en México. Este último fármaco sigue siendo parte de investigaciones para determinar su eficacia clínica en otros padecimientos parasitarios (Metwally et al., 1995).

⇒ 2.5.1 Praziquantel

Como se describió anteriormente, el praziquantel ya ha sido probado y es un fármaco de elección contra las cestodosis, entre sus ventajas está que se usa en dosis única de 25 mg/kg en humanos (Minero, 1997); como desventaja está el precio del fármaco, lo que reduce su accesibilidad.

El praziquantel posee un sistema de anillo pirazino-isoquinolina (Fig. 10), esto representa una estructura completamente nueva en la terapia antihelmíntica, que no se relaciona con otras estructuras de productos antiparasitarios (Köhler, 2001).

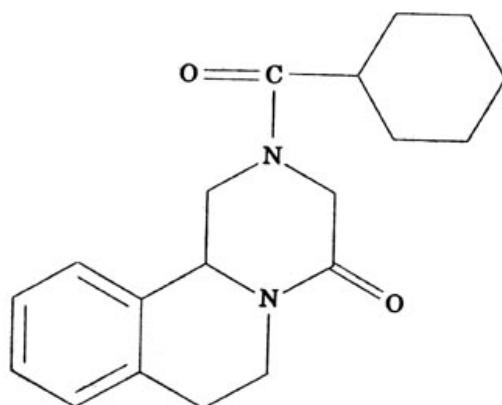


Fig. 10. Estructura química del praziquantel (*Sumano et al. 1999*).

El praziquantel es usado frecuentemente para la esquistosomiasis y cestodosis humana, se tiene estudiado ampliamente su modo de acción (*Martin, 1997; Metwally, 1995*). Estudios han demostrado que el praziquantel genera una contracción rápida de los músculos de los parásitos y vacuoliza sus tegumentos. Estas alteraciones, sugieren que los sitios de acción son canales de iones permeables al Ca^{2+} en la membrana del tegumento y en las células musculares, baña a los parásitos con Ca^{2+} libre del medio que los rodea para inducirles una contracción (*Martin, 1997*), y dado que el tegumento está unido por cargas eléctricas a células musculares, hay un incremento de Ca^{2+} dentro del retículo sarcoplásmico de dichas células y ocasiona una fuerte contracción muscular en el parásito (*Köhler, 2001*). El efecto del fármaco sobre el parásito es lento, toma aproximadamente 10 hr, y hasta entonces se comienzan a expulsar los gusanos. Las contracciones pueden ser revertidas y pueden ser bloqueadas por Mg^{2+} o La^{3+} pero no por Ni^{2+} , Co^{2+} u otros bloqueadores de canales de Ca^{2+} (*Martin, 1997*).

⇒ 2.5.2 Los carbamatos, propiedades y características generales

Estas sustancias son usadas principalmente en la agricultura como insecticidas, herbicidas, nematocidas e inhibidores de retoños. Son

conocidas tres clases de carbamatos pesticidas, los derivados de esteres, usados como insecticidas y nematodocidas que generalmente son estables y poseen una baja solubilidad en agua. Los carbamatos herbicidas que contienen radicales aromáticos o alifáticos y los carbamatos fungicidas que contienen un grupo bencimidazol (*Minero, 1997*). La síntesis y comercialización de los carbamatos pesticidas se ha dado desde 1950. Los fungicidas bencimidazoles fueron introducidos en el mercado alrededor de 1970. El medio acuoso es una ruta importante de transporte para los carbamatos altamente solubles, la característica de ligera absorción de los carbamatos contribuye a su rápida descomposición (por fotodegradación o fotodescomposición) bajo condiciones acuosas. Los carbamatos insecticidas son aplicados principalmente a las plantas y pueden llegar al suelo, mientras que los carbamatos nematodocidas y herbicidas son aplicados directamente en el suelo y existen varios factores que influyen en su biodegradación tales como volatilidad, tipo de suelo, humedad, absorción, pH, temperatura y fotodescomposición (*Minero, 1997*).

Los carbamatos son tóxicos para los gusanos y otros organismos que viven en el suelo, hay una gran reducción en la población de gusanos de tierra cuando se aplican carbamatos en el suelo. La ruta metabólica de los carbamatos es básicamente la misma en plantas, insectos y mamíferos, son fácilmente absorbidos a través de las membranas mucosas, tracto respiratorio y gastrointestinal, los metabolitos generalmente son menos tóxicos que los compuestos similares, sin embargo, en casos específicos los metabolitos son tan tóxicos o más que los compuestos parientes de los carbamatos, en muchos mamíferos los metabolitos son rápidamente excretados en la orina. El primer paso en el metabolismo de carbamatos es la hidrólisis a ácido carbámico, el cual se descompone en bióxido de carbono (CO₂) y su correspondiente amina. Existe muy poca información disponible sobre la distribución de los carbamatos en varios órganos y

tejidos de mamíferos, posterior a la exposición a la inhalación o por ruta oral. Los órganos en los cuales han sido detectados residuos son: hígado, riñones, cerebro, grasa y músculo. La vida media en la rata es de 3-8 hr. Los datos disponibles muestran que la excreción de carbamatos por vía urinaria también es rápida en el hombre y la ruta metabólica es la misma en ratas (*Minero, 1997*).

Los carbamatos son efectivos insecticidas en virtud de su habilidad para inhibir la Acetilcolinesterasa (AChE) en el sistema nervioso. La AChE cataliza la hidrólisis de la neurotransmisión de la Acetilcolina (ACh) a colina y acetato. La ACh es un mediador sináptico de los impulsos eléctricos del sistema nervioso de los mamíferos e insectos y actúa como: neurotransmisor del cerebro de mamíferos y sistema nervioso central de insectos, neurotransmisor preganglionar del sistema nervioso autónomo y como regulador de la contracción neuromuscular del músculo esquelético.

Para entender el mecanismo de toxicidad es necesario revisar el evento que da lugar a la contracción muscular (Fig. 11). La inervación muscular produce un impulso nervioso alcanzando la terminación nerviosa donde la ACh se encuentra almacenada en vesículas en dicha terminación, la ACh es liberada en la contracción. Dentro de los 2-3 milisegundos siguientes, la AChE interfiere del lado del receptor. La ACh es convertida hidrolíticamente en colina y acetato, causando que la contracción decrezca y cese. Cuando la AChE es inhibida por un carbamato éster, no puede hidrolizar la ACh, así la concentración permanece alta en la contracción, incrementando la estimulación continua del músculo el cual lleva a la tetania. De esta manera, la inhibición de AChE por carbamatos esteres causa efectos letales en animales y humanos, siendo el resultado una gran variedad de signos y síntomas de envenenamiento, pudiendo eventualmente culminar en fallas respiratorias y muerte (*Pereyra, 2004*).

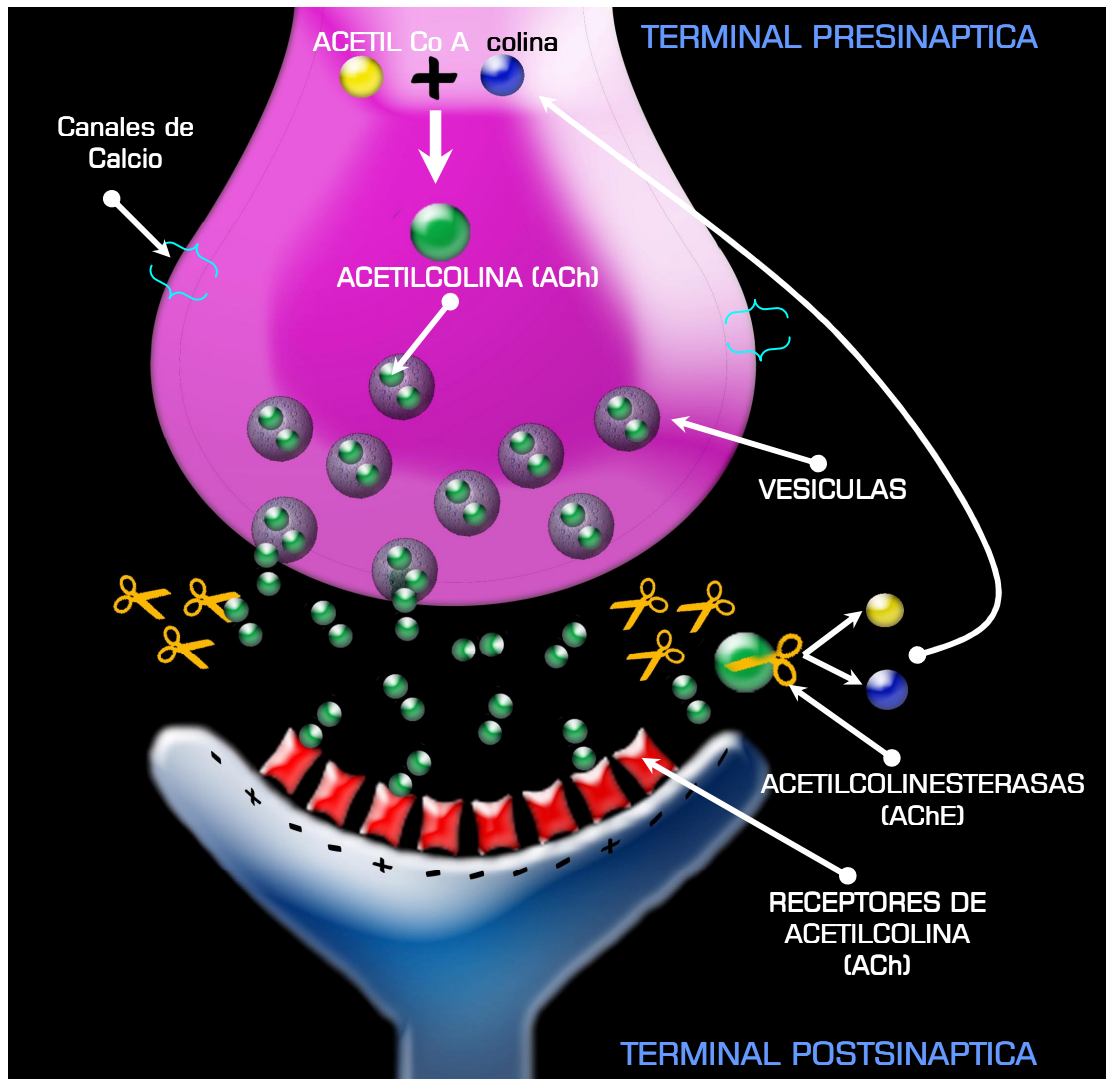


Fig. 11. Mecanismo de liberación de Acetilcolina (A.G.B.P., 2007).

⇒ 2.5.3 Los bencimidazoles: aspectos generales

Muy frecuentemente se ha descubierto el uso de fármacos de forma alterna a otros. El uso potencial de estos compuestos, como quimioterápicos en enfermedades parasitarias, se estableció en el año de 1950 a partir del descubrimiento de la molécula α -D-ribofuranacil (Fig. 12), que es parte integral de la vitamina B₁₂ y que da origen al anillo básico de los bencimidazoles (Bennet-Jenkins et al. 1996; Sumano et al. 1999).

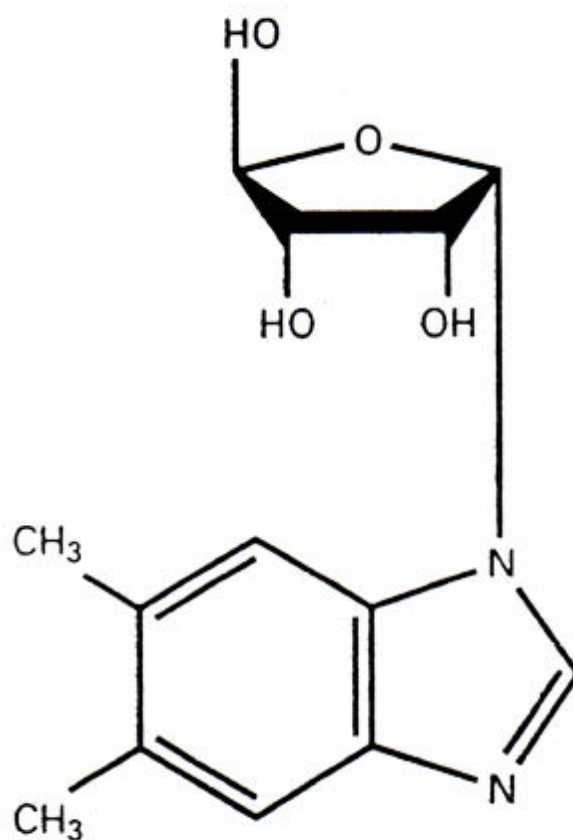


Fig. 12. Molécula (S)-(+)-D-ribofuranacil (Sumano et al. 1999).

Los compuestos bencimidazólicos aparecen como los productos más disponibles y más ampliamente utilizados. La historia de estos potentes y efectivos fármacos comienza con la introducción del Tiabendazol en 1961, el primer antihelmíntico de amplio espectro producido. Este compuesto dio paso al desarrollo de una variedad de nuevos productos estructuralmente relacionados, estos últimos sustituyeron al primero debido a que tenían mejores características, como generar una baja toxicidad a los mamíferos y un amplio margen de efecto antihelmíntico (Köhler, 2001). Desde que se introdujo el tiabendazol como antihelmíntico de amplio espectro, éste y otros fármacos comenzaron con los conceptos modernos de la quimioterapia antiparasitaria, estableciendo muchos criterios de

toxicología para los desarrollos subsecuentes. Investigaciones intensivas desde los años 60's y 70's, han dejado una serie de antihelmínticos bencimidazólicos y probencimidazólicos (llamados así porque son convertidos en bencimidazoles activos por procesos metabólicos en el hospedero, y los metabolitos activos son los responsables de la acción antihelmíntica), que presentan una mejoría en el espectro de actividad que ha quedado firmemente establecido para la mayoría de los bencimidazoles dentro del arsenal quimioterápico (Lacey, 1988).

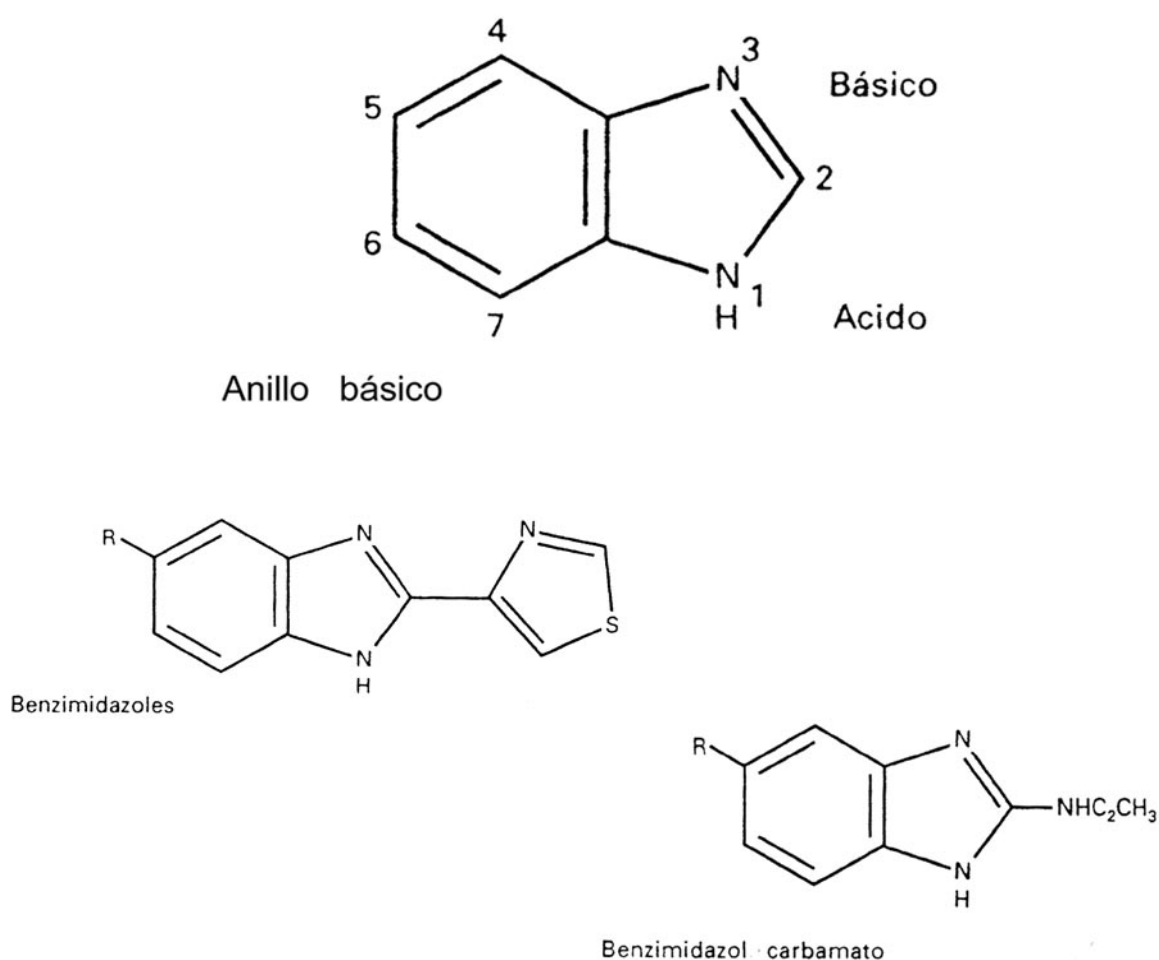
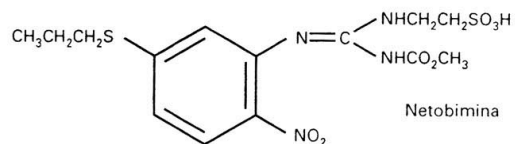
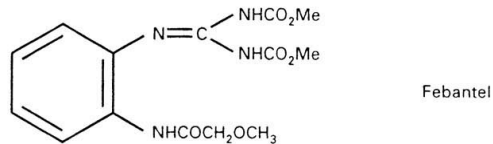


Fig. 13. Estructura general de la molécula de los bencimidazoles (Sumano et al. 1999).

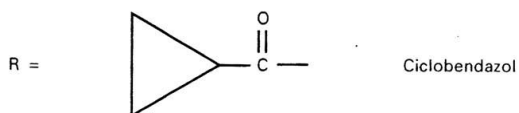
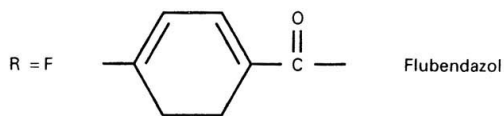
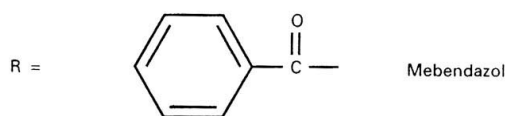
Los bencimidazoles (Fig. 13), denominados así en forma general, y en particular los llamados bencimidazol – carbamatos, son los que poseen la mayor actividad antihelmíntica, son materiales cristalinos con un punto de fusión alto y relativamente insolubles en agua (*Minero, 1997*). Su actividad está íntimamente relacionada con la presencia del grupo nitro en el anillo bencimidazol. Los bencimidazoles son compuestos sintetizados a partir de los siguientes pasos: primero, la construcción de un anillo benceno con el sustitutivo deseado y, de 1,2 grupos diaminos, en el anillo de cierre y el derivado del 1,2 diaminobenceno. De acuerdo al radical incluido en posición 2, se generará el bencimidazol normal o el bencimidazol carbamato, siendo éste último del cual se obtienen los bencimidazoles más modernos. Los bencimidazoles con efecto antiparasitario son: tiabendazol (TBZ); cambendazol (CBZ); bencimidazoles carbamatos: mebendazol (MBZ), flubendazol (FLBZ), ciclobendazol (CBZ), fenbendazol (FBZ), oxfendazol (OFZ), albendazol (ABZ), oxibendazol(OBZ), parbendazol (PBZ), luxabendazol (LBZ), ricobendazol (RBZ), y albendazol sulfóxido (ABZSO). Además los bencimidazoles halogenados: triclabendazol (TCBZ) y los probencimidazoles como: tiofanato (TFN), febantel (FEB), netobimina (NTB), clorsulón (CLN) (*Sumano et al. 1999*) (Fig. 14).

BENCIMIDAZOLES

R = H Tiabendazole
 R = (CH₃)₂CHOCONH - cambendazol

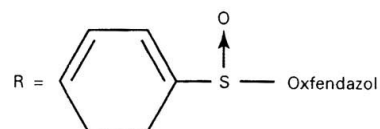
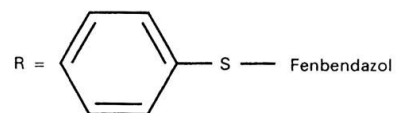


BENCIMIDAZOLES CARBAMATOS



R = CH₃CH₂CH₂S — Albendazol

R = CH₃CH₂CH₂O — Oxibendazol



R = CH₃CH₂CH₂CH₂ — Parbendazol

R = Radical a sustituir en el anillo básico de los bencimidazoles carbamatos.

Fig. 14. Estructura de las moléculas que conforman los bencimidazol carbamatos (Sumano et al. 1999).

Los antihelmínticos albendazol, fenbendazol y mebendazol, con una estructura bencimidazólica, son los fármacos mas representativos del grupo, y se usan ampliamente en la medicina veterinaria (Baliharová et al. 2003).

Cuando se comenzó con el uso los productos bencimidazólicos, se pudo demostrar que estos nuevos fármacos causaban alteraciones ultraestructurales en las células intestinales de los nematodos y en las células tegumentarias de los cestodos, en particular en la redistribución de las vesículas citoplasmáticas y otros organelos (Köhler, 2001). Es así como dichos cambios coincidieron con la desaparición de los microtúbulos, por lo tanto se sugirió que los bencimidazoles actúan inhibiendo el transporte de vesículas secretoras mediadas por ellos en los tejidos de absorción de los parásitos, estas vesículas liberan sus enzimas causando daños tisulares en las células parasitarias. Actualmente se sabe claramente que la acción de los bencimidazoles es la de su pseudoirreversible acoplamiento y la capacidad de unión con alta afinidad en la subunidad proteica de los microtúbulos, la tubulina, interfiriendo así en la funcionalidad y estructura de los mismos (Köhler, 2001). Análisis espectroscópicos sugieren que los bencimidazoles efectúan la inhibición de la polimerización de la tubulina debido a que el fármaco induce un desdoblamiento local en una pequeña región dentro del monómero de la porción β de la tubulina (Köhler, 2001). Los microtúbulos son altamente dinámicos, presentes siempre para servir a otros organelos, para que éstos lleven a cabo sus funciones vitales incluyendo la mitosis, movilidad y transporte, esta función es similar en todas las células eucariotas (Köhler, 2001). El que estos productos se fijen en estas subunidades proteicas deja una cascada de efectos bioquímicos y fisiológicos adversos, los cuales causan el desplazamiento del parásito de su sitio de establecimiento y su subsecuente expulsión del hospedero (Gill et al. 1992). También se han informado efectos inhibitorios de algunos bencimidazoles sobre las enzimas, principalmente la fumarato reductasa (el bloqueo del paso de ésta enzima inhibe la generación de energía mitocondrial en la forma de ATP, en ausencia de energía disponible, el parásito muere), entonces, se genera un

efecto aditivo a la acción en la tubulina, lo que aumenta el poder antiparasitario del fármaco. A este efecto se le puede sumar el bloqueo del paso de glucosa desde el intestino del parásito a su sistema, acentuando el déficit energético del parásito (*Sumano et al. 1999*). La baja disociación de los bencimidazólicos en la tubulina de los helmintos hace que permanezcan más tiempo en las células parasitarias, en particular de los nematodos, la cual contrasta con la rápida disociación de éstos en la tubulina de los mamíferos. Esta diferencia de permanencia entre las células parasitarias y la de mamíferos, genera el efecto tóxico y letal de los bencimidazólicos en los parásitos (*Gill et al. 1992*).

○ 2.5.3.1 Importancia de la tubulina y microtúbulos

La existencia de los microtúbulos en las células eucariotas se conoce desde el último siglo, sin embargo su estudio intensivo en la biología celular es relativamente reciente (*Lacey, 1988*). Los microtúbulos, son fibras citoplasmáticas con una forma tubular compuesta por heterodímeros de α y β tubulina como mayores componentes, y las proteínas asociadas a los microtúbulos en minoría. Están involucrados en muchas funciones celulares incluyendo la mitosis, la morfogénesis celular y el transporte intracelular (*Koizumi et al. 2004*). Los microtúbulos son unos organelos intracelulares que tienen una gran variedad de funciones incluidas el movimiento de los cromosomas durante la división celular, proveen la estructura al esqueleto celular, movimiento de partículas intracelulares incluyendo metabolitos energéticos. Son elementos casi aislados esparcidos al azar en toda la célula y están dispuestos en grupos en forma paralela para formar dupletes o tripletes, se encuentran en animales y plantas, hongos y algunas células bacterianas (*Leeson et al. 1988*). Los microtúbulos están compuestos por dos proteínas con 450 aminoácidos conocidas como α y β tubulina (*Martin, 1997*) (Fig. 15 y 15a).

Los microtúbulos del citoesqueleto juegan un papel importante en la regulación de la arquitectura celular. Los sistemas de microtúbulos de las células eucarióticas comprenden una matriz dinámica en los cuales los heterodímeros de tubulina se polimerizan para formar los microtúbulos, tanto en células normales como en anormales (neoplásicas). Como consecuencia, las sustancias tanto sintéticas como naturales capaces de alterar la polimerización y despolimerización de los microtúbulos, hacen que sean efectivos los agentes quimioterapéuticos (Romagnoli et al. 2005).

Fig. 15. Esquema representativo del acomodo de las subunidades de α y β tubulina (A.G.B.P., 2007).

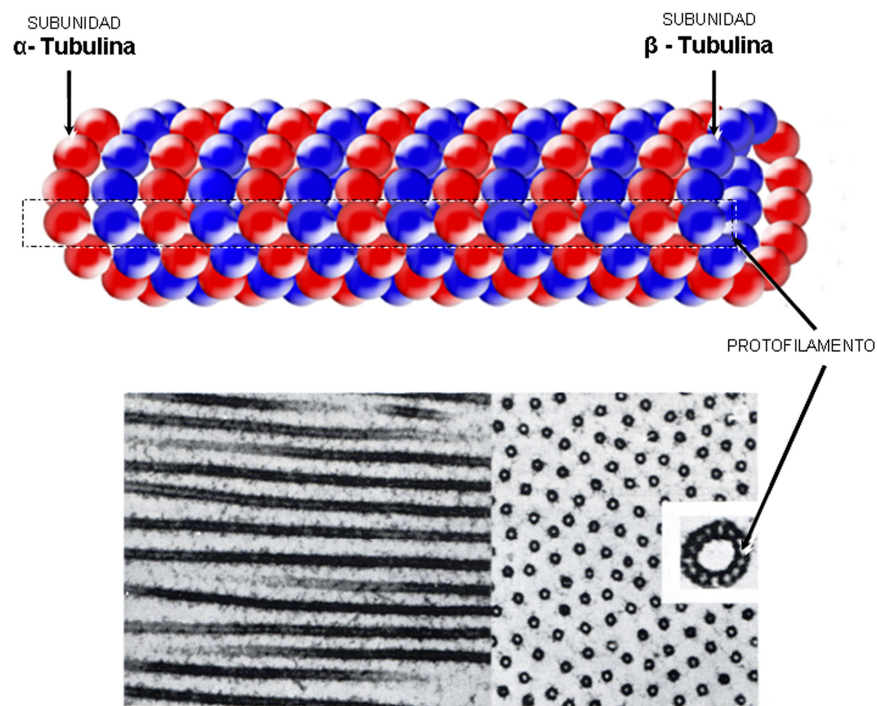


Fig. 15a. Imagen tomada por microscopía electrónica de los microtúbulos celulares (Leeson et al. 1988).

En 1972, Weisenberg fue el primero en notar que el Ca^{2+} era necesario para la polimerización de los microtúbulos. Él sugirió que el Ca^{2+} juega un papel importante en la regulación de la formación de los microtúbulos y

numerosas investigaciones han ido confirmando esta observación. El Ca^{2+} al mismo tiempo impide la polimerización de los dímeros de tubulina y causa una rápida despolimerización de los tubos preformados los cuales pueden ser repolimerizados por quelación (*Berkowitz et al. 1981; Lacey, 1988*). La tubulina contiene sitios únicos de alta afinidad para Ca^{2+} y Mg^{2+} . *In vitro*, dichos iones muestran acciones opuestas; el Mg^{2+} es requerido para el ensamble y el Ca^{2+} unido a proteínas como la calmodulina, inhibe el ensamble e inducen el desensamble, aquí mismo actúan proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP's) (*Lacey, 1988*).

La formación de los microtúbulos es un proceso dinámico. La formación incluye la polimerización de la tubulina hasta un final y la despolimerización en el otro final (el polo positivo es más inestable, por lo que la despolimerización casi siempre se da aquí). Los microtúbulos que se forman están hechos de 13 anillos moleculares de tubulina (6 de α tubulina + 7 de β tubulina alternando con anillos 7 de α tubulina + 6 de β tubulina). Del 75 al 85% de la masa esta compuesta por tubulina y proteínas en adición, las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP's) están presentes estabilizando la estructura. Existen varios factores que favorecen la polimerización incluyendo GTP, Mg^{2+} y el incremento de temperatura hasta 37°C . Un decremento en la temperatura hasta 4°C , la presencia de Ca^{2+} , calmodulina van a favorecer la despolimerización. La formación de los microtúbulos puede ser inhibida por sustancias que se unan al borde de cabecera (el polo positivo) de polimerización (*Martin, 1997*).

Para apreciar completamente el bloqueo de los mecanismos de los microtúbulos, es necesario considerar que la naturaleza del equilibrio tubulina - microtúbulos no es sólo bioquímicamente, porque no sólo es parte de una célula eucariota sino de un organismo entero. Se le han atribuido funciones a los microtúbulos en diferentes niveles celulares, por

ejemplo: formación del huso mitótico en la división celular (Fig. 16), mantenimiento de la forma celular, motilidad celular, secreción celular, absorción de nutrientes y transporte intracelular. La asociación intracelular de ambos, tubulina o microtúbulos incluye muchos organelos: mitocondria, aparato de Golgi, ribosomas, lisosomas, membranas celulares y por supuesto el núcleo. Es probable la asociación directa de la tubulina y los microtúbulos, con mecanismos fisiológicos de: hormonas, neurotransmisores, nutrientes, enzimas y receptores, pero aún no se conocen en sí los efectos concretos. La alteración del equilibrio tubulina-microtúbulos deja una cascada de cambios bioquímicos y fisiológicos directos o indirectos, resultando en una pérdida de la homeostasis celular. Las condiciones del desequilibrio celular, si se mantienen, son letales, estos efectos son más evidentes en una división celular activa o en crecimiento celular. Cada célula requiere de gran utilización de tubulina y éstas se tornan mas sensibles a los inhibidores de la tubulina, ya que generan una modificación de la regulación de eventos fisiológicos críticos (como lo es la división celular) lo cual lleva a un daño irreversible si dichos eventos se alteran (Lacey, 1988).

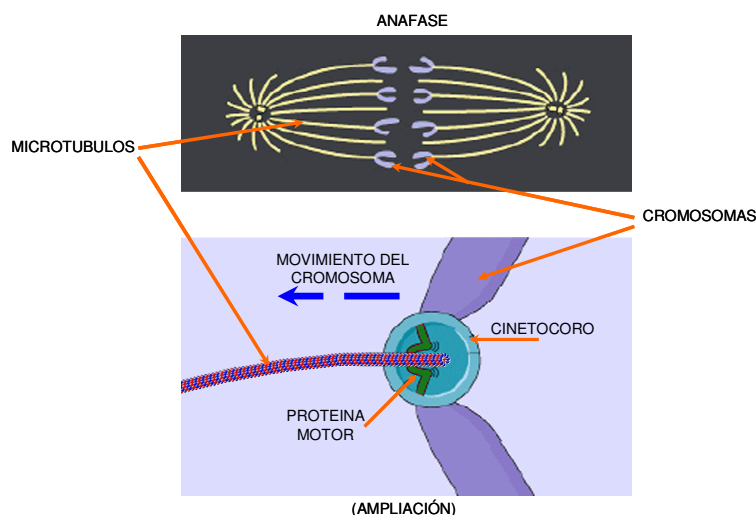


Fig. 16. Representación esquemática de la participación de los microtúbulos en la división celular (A.G.B.P., 2007).

Los bencimidazoles más usados en la medicina veterinaria, inducen la pérdida citoplasmática de los microtúbulos de las células tegumentarias e intestinales de los cestodos y nematodos, seguido por la pérdida de transporte de las vesículas secretoras, un decremento de la entrada de glucosa y se incrementa la utilización del glicógeno almacenado del parásito (*Martin, 1997*).

En cuanto a la absorción presentan un ciclo enterohepático. Los bencimidazoles tienen una baja solubilidad en agua, lo que limita su absorción por vía gástrica y, por ende, su distribución. Se deben de considerar las pequeñas diferencias en cuanto a solubilidad debido a que aumentando ésta, se manifiesta un incremento en la distribución que conlleva a un incremento de la actividad sistémica del producto (*Sumano et al. 1999*). La solubilidad es un factor esencial para la eficacia de muchos fármacos, independientemente de la ruta de administración. Esto genera un mayor reto para las compañías farmacéuticas para el desarrollo de nuevos fármacos. Un factor limitante para el funcionamiento *in vivo* de productos pobremente solubles en agua, siguiente a una administración oral, es su resistencia a ser humedecida y a ser disuelta en los fluidos del tracto gastrointestinal. Si se incrementa la proporción de disolución de fármacos pobremente solubles en agua, se optimiza su biodisponibilidad (*Kocbek et al. 2006*). La absorción de muchos de los productos administrados oralmente, puede estar relacionada a sus propiedades de solubilidad y permeabilidad. Esas dos características, especialmente la solubilidad, pueden ser modificadas por la combinación de fármacos con diferentes excipientes y a través de este proceso, la biodisponibilidad oral de productos con una baja solubilidad acuosa puede ser mejorada (*Mwambete et al. 2004*). La baja solubilidad de los bencimidazoles es una limitante que influye directamente en la formulación de los fármacos; esto determina la elección del tipo de preparación comercial como: suspensiones, gránulos,

polvos, jarabes y pastas para administración oral, intraruminal e intrarreticular principalmente (Sumano et al. 1999).

En cuanto al metabolismo (Fig. 17), todos los bencimidazoles sufren un proceso de inactivación o de activación. En el caso de los probencimidazoles, este efecto se puede llevar a cabo en el estómago, intestino, rumen o hígado, siendo la principal vía metabólica la aril-hidroxilación y en segunda instancia, la hidrólisis de la función carbamato por la n- metil- acetilación o reducción. Los bencimidazoles del grupo de los carbamatos pueden sufrir metabolismo oxidativo o dealquilativo, originando un alcohol que por lo general es activo contra parásitos migrantes (Sumano et al. 1999; Walchshofer et al. 1991). La presencia de estos medicamentos en un organismo pueden inducir la activación del sistema microsómico enzimático, aumentando la concentración de enzima citocromo P450, monoaminooxidasa y monooxigenasa, que son las que intervienen primero en el metabolismo de estos fármacos (Sumano et al. 1999).

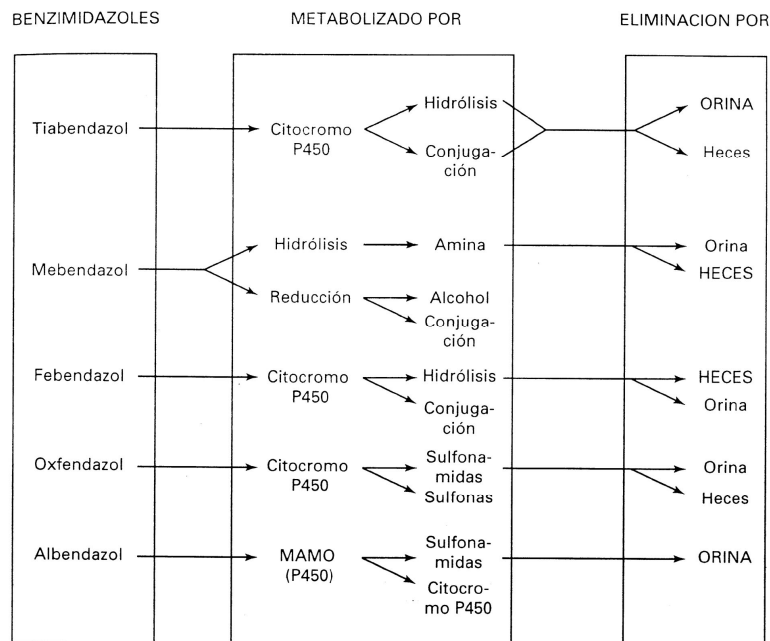


Fig. 17. Rutas generales de metabolización y eliminación de los bencimidazol carbamatos (Sumano et al. 1999).

Existen diferentes vías para eliminar los bencimidazoles (Fig.17). Esto dependerá del tipo de radicales que contenga el núcleo en particular, no obstante, todos muestran el ciclo enterohepático, por lo cual siempre se eliminan de manera primaria por heces y secundaria por otras rutas como orina y leche (Sumano et al. 1999). Los efectos tóxicos son escasos y se limitan a anorexia, vómito, mareo, anemia normocrómica, diarrea y prurito, aunque se ha descrito que en hembras gestantes, estos fármacos son altamente dañinos para el producto, ya que son teratogénicos y embriotóxicos (Capece et al., 2003). Los bencimidazoles tienen aplicaciones antinematódicas básicamente, tanto ovicidas y larvicidas, pero algunos miembros del mismo grupo pueden tener efectos cestodidas y trematodidas (Sumano et al. 1999). Los bencimidazoles y sus derivados han sido usados ampliamente por su amplio espectro antihelmíntico para el control de estos parásitos en el ganado y en otras especies (Gill et al. 1992). El desarrollo de resistencia a esta clase de productos, dentro de las poblaciones de parásitos, ha ido limitando su utilidad en los programas de control parasitario (Gill et al. 1992).

⇒ 2.5.4 Resistencia a los antiparasitarios

Como se mencionaba al inicio de la parte introductoria, no se han reportado casos de resistencia por parte del parásito *Hymenolepis nana* var. *fraterna*, pero sí se ha hallado lo que podría considerarse un indicio de resistencia a productos comerciales, con principios activos anticestódicos, en otros cestodos que afectan a pequeñas especies, ya que dichos parásitos comienzan a tolerar las dosis normales de fármacos conocidos (como el praziquantel) en las desparasitaciones convencionales (Balbuena et al. 2004) esto crea la necesidad de mejorar los fármacos antiparasitarios existentes y de encontrar nuevos productos efectivos que ayuden a ampliar las opciones de tratamiento.

En general, la resistencia a los antihelmínticos continúa incrementándose en diversas áreas geográficas, así como en el número de especies afectadas y la cantidad de fármacos antiparasitarios involucrados en este proceso (*Sangster, 1999*).

Cuando decidimos hacer el control parasitario con algún fármaco, es probable que la resistencia ya esté en desarrollo. Esto se debe a que el tratamiento con fármacos, sea el producto que sea, deja parásitos sobrevivientes, los cuales al final se reproducen, contribuyendo así a transmitir los genes de resistencia a la descendencia, quedando poco a poco fuera los genes que podrían darles susceptibilidad y adquiriendo los de resistencia (*Sangster, 1999*).

El fenómeno de resistencia a los fármacos es, esencialmente, un cambio en la frecuencia de genes de una población de vermes, producida por la selección de un fármaco; debido al cual la dosis mínima recomendada para destruir un porcentaje determinado de la población, deja de ser eficaz; en otras palabras, se define como la capacidad de los vermes para sobrevivir al efecto letal de un compuesto con propiedades antihelmínticas (*Kassai, 1998*).

La resistencia colateral y la resistencia cruzada son estados en los que una población parasitaria seleccionada tiene un gene que codifica un mecanismo para evitar la toxicidad de fármacos con el mismo mecanismo de acción o de fármacos con mecanismos de acción diferentes respectivamente (*Kassai, 1998*).

La resistencia múltiple es un estado en el que una población parasitaria ha sido seleccionada para resistir la acción de fármacos pertenecientes a familias con distintos mecanismos de acción, dando lugar a mecanismos de evasión diferentes pero concurrentes (en ocasiones también se utiliza como sinónimo de resistencia cruzada) (*Kassai, 1998; FAO, 2003*).

Puesto que los antihelmínticos constituyen por el momento el principal medio de prevención y control de la helmintosis, es absolutamente vital conservar la de los fármacos actualmente mediante su uso racional (*Kassai, 1998*).

El costo del descubrimiento, investigación y desarrollo de un producto farmacéutico (*p. ej.* para uso en animales de abasto) requiere millones de pesos y puede involucrar hasta unos 12 años de investigación; por ello, las posibilidades de que en un futuro cercano podamos disponer de antihelmínticos de amplio espectro con nuevos mecanismos de acción, son escasas; por lo tanto, la siguiente advertencia resulta oportuna e imperativa: *mantener la eficacia de nuestros antihelmínticos*; además, deberíamos estar preparados para el momento en que los fármacos de amplio espectro ya no sean eficaces (*Kassai, 1998; FAO, 2003*).

o **2.5.4.1 Características esenciales de la resistencia a los fármacos** (*Kassai, 1998, FAO, 2003*).

- El desarrollo de cepas de vermes resistentes, es evolutivo.
- Es una propiedad fisiológica hereditaria.
- Se basa en la selección de individuos de una pequeña población parasitaria que poseen los alelos de resistencia a determinados fármacos (variabilidad genética). La resistencia aparece heredada directamente por los procesos de la genética Mendeliana (*Sangster, 1999*).
- Las posibilidades de selección inversa para que las cepas de vermes resistentes vuelvan a ser sensibles a los antihelmínticos son débiles y transitorias (*Kassai, 1998*).

○ **2.5.4.2 Factores que influyen en la selección de parásitos resistentes a los fármacos**

El desarrollo de resistencia a los productos antihelmínticos se considera la mayor amenaza para el control parasitario en todo el mundo (*Dobson et al. 1996*). Muchos factores influyen en la forma del desarrollo de resistencia a los pesticidas y su propagación en una población (*Dobson et al. 1996*). Estos factores se han clasificado, por su importancia, en: *genéticos*, incluyendo la proporción de la mutación y la dominancia relativa de la característica afectada; *reproductivos*, incluyendo generaciones por año y el tamaño de las fluctuaciones en la población; *medio ambientales*, incluyendo migración de los insectos o especies afectadas y su capacidad de evitar a los pesticidas; *operacionales*, incluye la proporción de la población expuesta y la persistencia del agente químico para el control de dichas poblaciones (*Dobson et al. 1996*).

- *Factores operativos (Dobson et al. 1996; Kassai, 1998; FAO, 2003).*
 - * La naturaleza química del fármaco utilizado y la rotación del mismo: si no se realiza rotación o si ésta es muy frecuente, favorece el desarrollo de resistencias.
 - * Frecuencia y momento de los tratamientos: el desarrollo de resistencias puede ser consecuencia tanto del uso frecuente y continuado de antihelmínticos con el mismo mecanismo de acción como de uno o dos tratamientos; el porcentaje de helmintos de la suprapoblación que están protegidos, es decir, el número de estadíos larvarios existentes en el medio no expuestos a la presión de selección por el fármaco, determinan en qué medida contribuyen los genes de los supervivientes al tratamiento farmacológico al conjunto global de genes de las futuras generaciones (infrapoblaciones de vermes).

- * Dosis: recientemente se ha demostrado que la dosis más peligrosa para favorecer la diseminación de resistencias a los antihelmínticos depende de la frecuencia del alelo de la resistencia y de factores que controlan la fecundidad y supervivencia de los vermes cuando se instaure el tratamiento; por lo tanto, la idea actualmente existente de “una dosificación insuficiente” siempre promueve la selección de cepas resistentes, debe ser evaluada y corregida; las dosis más altas imponen una mayor presión de selección (*Kassai, 1998; FAO, 2003*).
- * Pautas de manejo de pastoreo y climatología en animales sometidos a éste régimen: por ejemplo, el traslado de animales después del tratamiento a un pasto poco contaminado (“seguro”) (cuando se utiliza la estrategia de “medicar y trasladar”) o el tratamiento de animales que pastan en zonas poco contaminadas (durante las sequías) acelera la diseminación de los alelos de resistencia.
- * Movimiento de ganado entre granjas: los vermes resistentes son habitualmente introducidos en una explotación o rebaño al adquirir animales portadores de vermes resistentes a fármacos.
- *Factores genéticos*: frecuencia, dominancia y número de alelos de resistencia en la población de vermes.
- *Factores biológicos o ecológicos*: longevidad y fecundidad de los vermes adultos, prolificidad y cantidad de larvas ingeridas (*Kassai, 1998*).

- **2.5.4.3 Medidas de prevención y control para evitar el desarrollo de resistencia a los fármacos** (*Kassai, 1998; FAO, 2003*).

Se debe tener en cuenta que el momento más adecuado para luchar frente a las resistencias a los fármacos, es antes de que éstas se hagan evidentes y se extiendan.

Los siguientes métodos y principios sugeridos podrían reducir el “riesgo de aparición de resistencias” o prevenir la difusión de las ya existentes:

- Usar antihelmínticos eficaces. Cuando se detectan resistencias a un determinado fármaco, se debería interrumpir su empleo (recordar también la resistencia colateral) (*Kassai, 1998*). Al entender el modo de acción de los antihelmínticos, se pueden establecer medidas que ayuden a mejorar la eficacia antihelmíntica, reducir su toxicidad en el hospedero buscando siempre que dé como resultado una baja resistencia al mismo (*Prichard, 1997*).
- Administrar la dosis correcta.
- Utilizar de forma alternativa antihelmínticos de diferentes grupos siguiendo una pauta anual (no más frecuentemente).
- Evitar la introducción de vermes resistentes, mediante la desparasitación de todos los animales adquiridos antes de juntarlos con el resto del rebaño.
- Utilizar el número mínimo de tratamientos; recordar que la frecuencia de tratamientos es una de las principales causas de selección rápida de resistencia.
- Utilizar los principios epidemiológicos del control de helmintosis, integrando el tratamiento de los animales con pautas de manejo.

- Fomentar entre los ganaderos el control anual del estado de resistencia de las parasitosis en sus explotaciones.
- Educar a los veterinarios de campo y ganaderos sobre la resistencia frente a los antihelmínticos y su *control (Kassai, 1998)*.
- Aunado a esto, es indispensable el uso de alternativas de control no quimioterapéuticas como: estrategias de manejo del rebaño, del pasto, evitar la introducción de animales nuevos con parásitos poseedores de genes de resistencia, utilizar nuevas alternativas como la vacunación antihelmíntica y el control biológico en el medio ambiente de la explotación, etc. *(Kassai, 1998, FAO, 2003)*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Contribuir al estudio del desarrollo de nuevas opciones en productos antihelmínticos.

3.2 Objetivo específico

- Determinar la presencia de actividad anticestódica entre varios principios activos a prueba, de nueva síntesis, derivados del ácido carbámico; así como la dosis más eficaz que produzca el 100% de eliminación del cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

- Obtención de ejemplares adultos del cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*.

Ésta se realizó adquiriendo, primeramente, 18 ratones de distintos lugares (mercados, tiendas de mascotas y bioterios), con el propósito de obtener las formas adultas y extraer los huevos de los parásitos en cuestión para utilizarlos como inóculo. Los roedores obtenidos fueron sacrificados por desnucamiento, sus intestinos fueron revisados para detectar los cestodos, 11 de ellos los tuvieron, una vez encontrados en el intestino, se extrajeron; se les separaron las porciones del estróbilo que contenían los proglótidos grávidos, éstos se desintegraron con una aguja hipodérmica en una caja de Petri y se formó una suspensión de huevos (mezclando los proglótidos desintegrados con 50ml de una solución buffer), la cual fue utilizada como primer inóculo.

A 30 ratones más se les suministro el inóculo (fue una suspensión homogeneizada por agitación, no se cuantificó la cantidad de huevos suministrada por ml), se administró vía oral 1 ml por roedor (por sondeo gástrico), fueron mantenidos por 4 semanas más en una misma jaula, con alimento balanceado y agua a libre demanda, después de este tiempo, las heces de estos animales fueron sometidas individualmente a la prueba de flotación (para comprobar la infestación). Los roedores negativos a la presencia de huevos del parásito en las heces, se sometieron hasta por tres días consecutivos a dicha prueba, y los que resultaron nuevamente negativos, les fue suministrado una vez más el mismo volumen del inóculo (esto se realizó para obtener la mayor cantidad posible de ratones infestados). Se obtuvieron 22 ratones infestados después de ésta inoculación. Los roedores se sacrificaron, se les extrajeron los organismos

y estos parásitos adultos proporcionaron suficientes proglótidos grávidos, que fueron desintegrados para reunir una gran cantidad de huevos y generar el último inóculo que se utilizó en los ratones experimentales. Se preparó el inóculo final haciendo una suspensión con una concentración de 50 unidades (huevos) aproximadamente, en un volumen de 50 μ l, que les fueron suministrados a los ratones experimentales por sondeo gástrico. Esta cantidad y volumen se utilizaron respaldados en el trabajo de *Minero, 1997*, quien describe que el inóculo utilizado en su trabajo, con estas características, generó una implantación de parásitos, en sus ratones experimentales, de alrededor del 70%.

4.2 Animales experimentales

Con el propósito de trabajar con animales genéticamente similares y reducir el margen de error de experimentación, se adquirieron 1100 roedores con una compañía especializada en la crianza de animales de laboratorio, fueron ratones singénicos de la cepa CD1, todos machos de tres semanas edad. Se adquirieron con estas características por ser los más susceptibles a la implantación de los parásitos que se usaron en este trabajo, de acuerdo con lo concluido por *Minero, 1997*.

Se realizaron pruebas coproparasitoscópicas (Faust) a las heces de los ratones experimentales adquiridos, para determinar que estuvieran libres de cualquier tipo de parásitos y valorarlos clínicamente sanos, los animales positivos a parásitos se descartaron y con los restantes se procedió a la inoculación final.

Transcurridas cuatro semanas posteriores a la inoculación (usando como base el tiempo promedio en el que se desarrolla el adulto en el intestino del ratón), se comprobó la infestación por el cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*, realizando la prueba de flotación a las heces de cada uno de los ratones experimentales, los animales positivos a

la presencia del parásito fueron integrando los grupos de tratamiento, los negativos fueron reinoculados y cuando se les comprobó la infestación pasaron, también, a formar parte de los grupos experimentales.

4.3 Fármacos antiparasitarios

4.3.1 Principios activos de nueva síntesis

Los principios que se usaron en este trabajo, fueron derivados del *4-hidroxifenil carbamato de etilo*, productos de síntesis orgánica obtenidos en el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, a cargo del Dr. Enrique Ángeles Anguiano, identificados de la siguiente manera en razón de que sus fórmulas son confidenciales: **IRE1A, IRE2A, IRE2B, IRE4A, IRE5A, IRE6A, IRE6B, IRE7B, IRE8B**. Estos principios activos fueron suspendidos en agua destilada (no son solubles en ésta), y se dosificó según el peso del roedor, agitándose vigorosamente cada vez que se iba a utilizar para poder mantenerla de forma homogénea con el agua y que no se hicieran grumos en la superficie.

4.3.2 Pracicuantel

Se utilizó un fármaco comercial en presentación de tabletas, conteniendo pracicuantel con una concentración de 50mg (rotulada en la caja) denominado Droncit (Laboratorios Bayer), cada tableta se maceró en un mortero y fue disuelta en 10 ml de agua destilada (para obtener 5mg/ml del principio), una parte de esta suspensión se utilizó para hacer diluciones nuevamente en agua destilada, hasta ajustarla para que se pudiera administrar de una forma práctica a los roedores según su peso, a la dosis recomendada por *Thomas, 1977; Baldock et al., 1977; Gemmel et al., 1977; Andrews et al., 1979; Zbigniew, 1991* de 5mg/kg.

4.4 Integración de los grupos experimentales

Se utilizaron 810 animales, los cuales se dividieron en 9 grupos de 90 animales y cada grupo estuvo integrado por:

- 10 animales control positivos
- 10 animales tratados con prazicuantel a dosis de 5mg/kg
- 70 animales dosificados con el principio a prueba repartidos así:
 - 10 animales con 5 mg/kg
 - 10 animales con 10 mg/kg
 - 10 animales con 20 mg/kg
 - 10 animales con 50 mg/kg (dosis única)
 - 10 animales con 50 mg/kg (dosis duplicada)(cada dosis administrada con 24 hr de diferencia)
 - 10 animales con 100 mg/kg (dosis única)
 - 10 animales con 100 mg/kg (dosis duplicada)(cada dosis administrada con 24 hr de diferencia)

Los fármacos (tanto el prazicuantel como los principios activos de nueva síntesis a prueba) fueron dosificados y suministrados con una jeringa insulínica, conectada a una sonda para alimentación de prematuros. Los roedores se mantuvieron bajo las mismas condiciones: temperatura ambiental de 22^oC, se alojaron en cajas acrílicas con tapas de alambre galvanizado (jaulas) con comederos y bebederos, se alimentaron a libre demanda con alimento balanceado (Rodent Laboratory Chow 5001, fabricado por la empresa Agribrands Purina México S.A. de C.V.), agua potable y una cama de aserrín que se cambió dos veces por semana. Dichas jaulas se mantuvieron en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4 de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.5 Revisión intestinal

Pasados ocho días, posteriores a la administración de los principios, se sacrificaron a los roedores por desnucamiento, fueron sometidos a disección para extraerles los intestinos (cortándolos longitudinalmente con tijeras), y se realizó una revisión cuidadosa para determinar la presencia o ausencia de los cestodos.

4.6 Análisis de resultados

Los resultados obtenidos se emplearon para identificar el efecto antiparasitario primario (tamizaje) de forma cualitativa de los principios activos de nueva síntesis, así como del pracicuantel. Dichos resultados se concentraron en tablas y gráficas de barras para su análisis.

5. RESULTADOS

Para el análisis y/o interpretación de resultados:

- a. *Si no hubo mortalidad en un lote, no se menciona en la descripción de resultados*
- b. *El porcentaje de eficacia de los principios activos a prueba y del pracicuantel, se determinó así:*

$$\% \text{ Eficacia} = \frac{\text{NO. DE ANIMALES NEGATIVOS}^*}{\text{TOTAL DE ANIMALES VIVOS FINALES}^{**}} \times 100$$

** Posterior a la desparasitación.*

*** Animales vivos restantes que se sacrificaron para llevar a cabo la revisión intestinal.*

- c. *En las tablas de resultados, los valores en negritas y con mayor tamaño de letra indican los porcentajes de eficacia antiparasitaria del pracicuantel y el mejor porcentaje de eficacia antiparasitaria, en ese lote, del principio activo a prueba.*
- d. *“MUERTES ANTES DEL SACRIFICIO” se refiere a roedores que no fueron sacrificados para revisión intestinal, fueron animales que murieron por diversas causas en un lote.*
- e. *La mortalidad se determinó así:*

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{\text{NO. DE ANIMALES MUERTOS}^+}{10^{++}} \times 100$$

+ Incluye los animales que murieron por diversas causas en un lote (p. ej. canibalismo o toxicidad del principio activo), no llegaron al sacrificio para revisión intestinal.

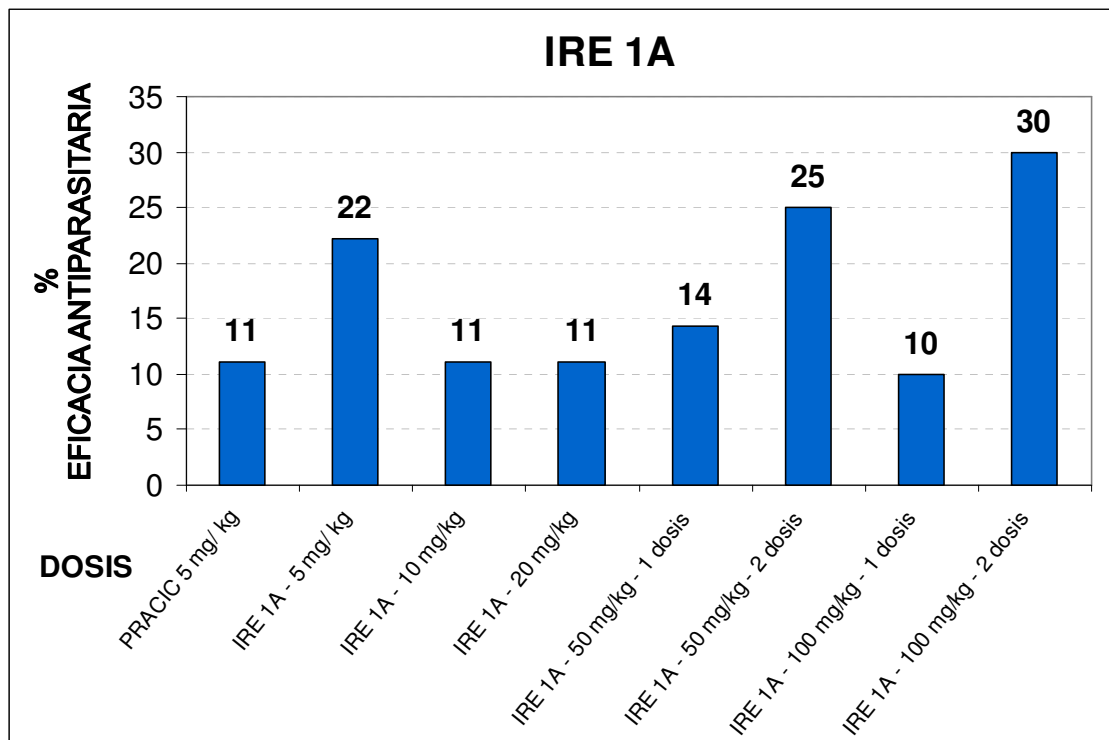
++ Se inició el experimento por cada principio activo y dosis con 10 animales.

- f. *Testigos positivos, animales control con la presencia del cestodo (determinada por técnica de flotación en heces).*

La tabla y gráfica 1 muestran que el principio IRE1A en la dosis única de 5mg/kg presentó una eficacia antiparasitaria del 22% (con mortalidad del 10%). Para las dosis únicas de 10 mg/kg y 20 mg/kg hubo una eficacia antiparasitaria en la población muestreada del 11% (mortalidad del 10%). La dosis única de 50mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 14% (mortalidad del 30%). La dosis duplicada de 50mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 25% (mortalidad del 20%). La dosis única de 100mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 10% (sin mortalidad). La dosis duplicada de 100mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 30% (sin mortalidad). El praziquantel a dosis única de 5mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 11% (una mortalidad del 10%) en el lote de animales dosificados con este principio. Es decir, las dosis de 10 mg/kg y 20 mg/kg tuvieron un efecto similar al praziquantel, pero la dosis duplicada de 100mg/kg de IRE1A fue mejor que ambas.

| TRATAMIENTO Y DOSIS | | PRESENCIA CESTODO | | MUERTES ANTES DEL SACRIFICIO | TOTAL VIVOS | % EFICACIA PRINC. A PBA. | |
|-----------------------|---------------------|-------------------|------|---------------------------------|----------------|-----------------------------|---|
| | | POS. | NEG. | | | | |
| TESTIGOS | | 10 | 0 | 0 | 10 | SIN TRATAMIENTO | |
| PRACICUANTEL 5 mg/ kg | | 8 | 1 | 1 | 9 | 11 | % |
| IRE1A | 5 mg/ kg | 7 | 2 | 1 | 9 | 22 | % |
| | 10 mg/kg | 8 | 1 | 1 | 9 | 11 | % |
| | 20 mg/kg | 8 | 1 | 1 | 9 | 11 | % |
| | 50 mg/kg - 1 dosis | 6 | 1 | 3 | 7 | 14 | % |
| | 50 mg/kg - 2 dosis | 6 | 2 | 2 | 8 | 25 | % |
| | 100 mg/kg - 1 dosis | 9 | 1 | 0 | 10 | 10 | % |
| | 100 mg/kg - 2 dosis | 7 | 3 | 0 | 10 | 30 | % |

Tabla 1. Resultados después de suministrar el principio IRE1A a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana var. fraterna*.

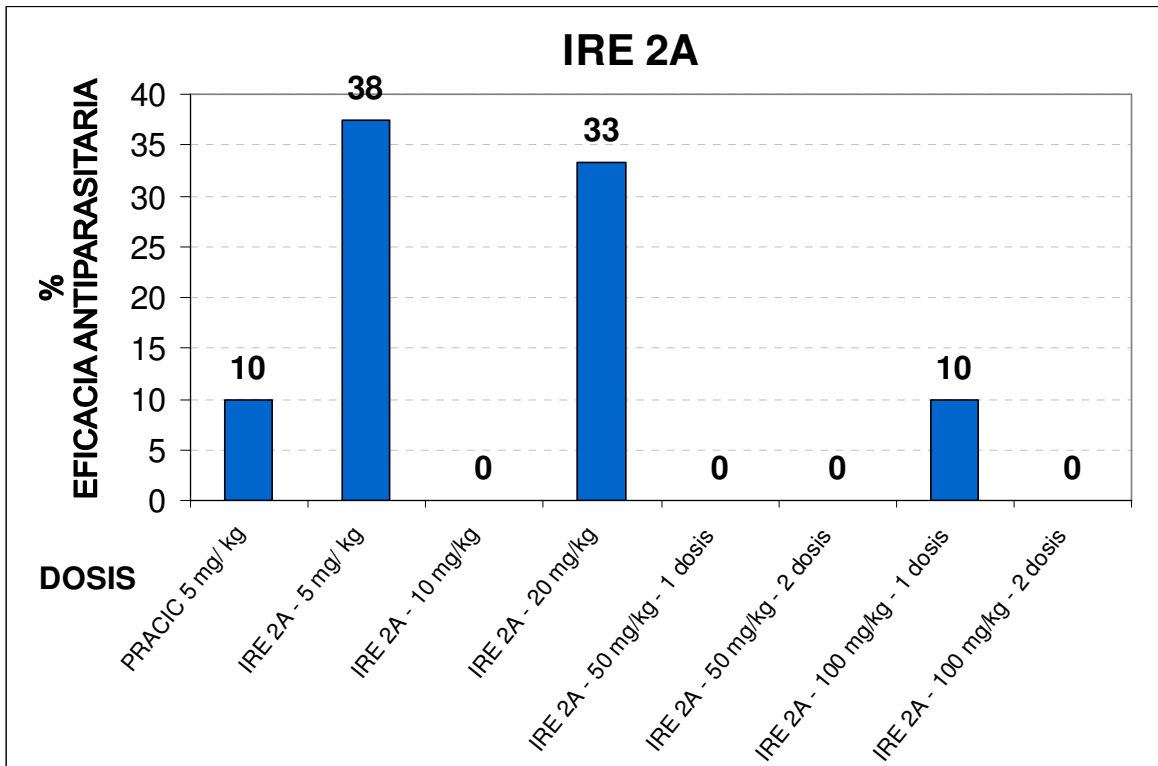


Gráfica 1. Representación gráfica de la eficacia antiparasitaria después de suministrar el principio IRE1A a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*.

La tabla y gráfica 2 muestran que el principio IRE2A en la dosis única de 5mg/kg presentó una eficacia antiparasitaria del 38% (con mortalidad del 20%). En la dosis única de 10mg/kg muestra una eficacia del 0% (mortalidad del 10%). Para la dosis única de 20mg/kg hubo una eficacia antiparasitaria del 33% (con mortalidad del 40%). La dosis única de 50mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 0%. La dosis duplicada de 50mg/kg tuvo una eficacia del 0% (mortalidad del 100%). La dosis única de 100mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 10%. La dosis duplicada de 100mg/kg tuvo una eficacia del 0% (con mortalidad del 100%). El praziquantel a dosis única de 5mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 10% (una mortalidad del 10%) en el lote de animales dosificados con este principio. La dosis única de 100 mg/kg del principio a prueba tuvo el mismo efecto comparado al praziquantel, pero la dosis única de IRE2A a 5mg/kg fue mejor que ambas.

| TRATAMIENTO Y DOSIS | | PRESENCIA CESTODO | | MUERTES ANTES DEL SACRIFICIO | TOTAL VIVOS | % EFICACIA PRINC. A PBA. | |
|-----------------------|---------------------|-------------------|------|---------------------------------|----------------|-----------------------------|---|
| | | POS. | NEG. | | | | |
| TESTIGOS | | 10 | 0 | 0 | 10 | SIN TRATAMIENTO | |
| PRACICUANTEL 5 mg/ kg | | 9 | 1 | 0 | 10 | 10 | % |
| IRE2A | 5 mg/ kg | 5 | 3 | 2 | 8 | 38 | % |
| | 10 mg/kg | 9 | 0 | 1 | 9 | 0 | % |
| | 20 mg/kg | 4 | 2 | 4 | 6 | 33 | % |
| | 50 mg/kg - 1 dosis | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | % |
| | 50 mg/kg - 2 dosis | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | % |
| | 100 mg/kg - 1 dosis | 9 | 1 | 0 | 10 | 10 | % |
| | 100 mg/kg - 2 dosis | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | % |

Tabla 2. Resultados después de suministrar el principio IRE2A a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*.

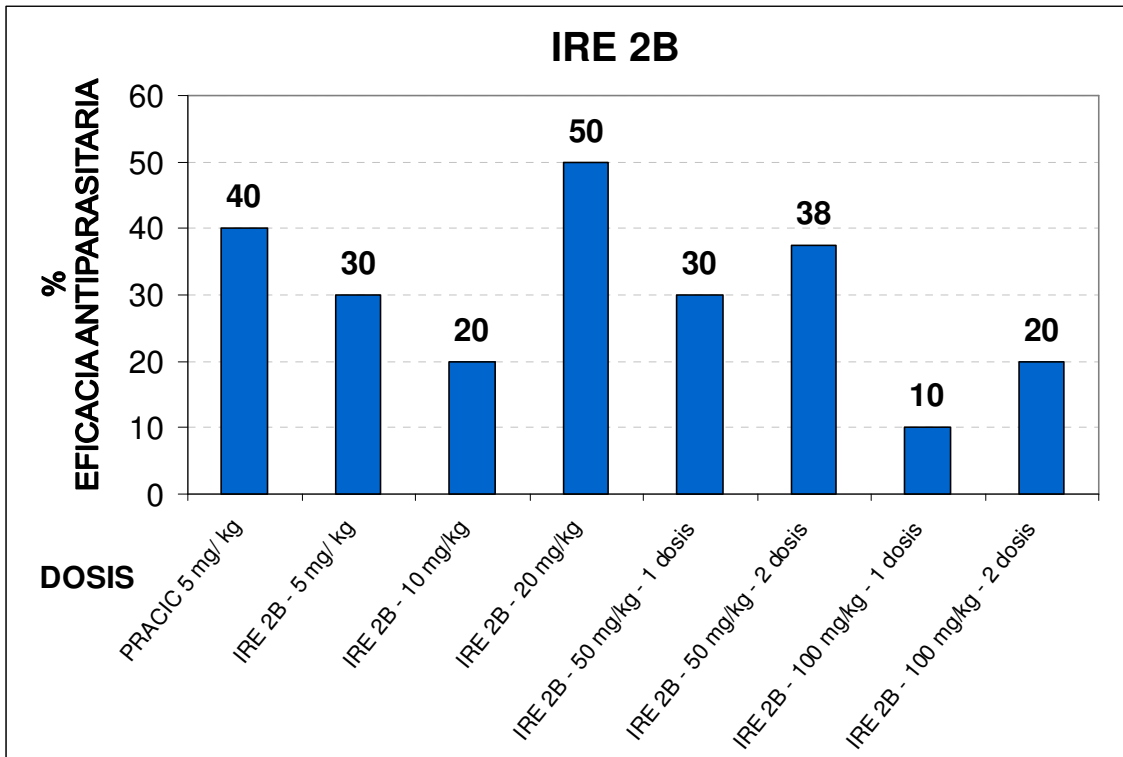


Gráfica 2. Representación gráfica de la eficacia antiparasitaria después de suministrar el principio IRE2A a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*.

La tabla y gráfica 3 muestran que el principio IRE2B en las dosis únicas de 5mg/kg y 50mg/kg, presentó una eficacia antiparasitaria del 30%. La dosis única de 10mg/kg presentó una eficacia antiparasitaria del 20%. Para la dosis única de 20 mg/kg hubo una eficacia antiparasitaria en la población muestreada del 50%. La dosis única de 50mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 30%. La dosis duplicada de 50mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 38% (mortalidad del 20%). La dosis única de 100mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 10%. La dosis duplicada de 100mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 20%. El pranicuantelel a dosis única de 5mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 40% en el lote de animales dosificados con este principio. Entonces, la dosis única de 20 mg/kg del principio a prueba tuvo un efecto superior comparado al pranicuantelel.

| TRATAMIENTO Y DOSIS | | PRESENCIA CESTODO | | MUERTES ANTES DEL SACRIFICIO | TOTAL VIVOS | % EFICACIA PRINC. A PBA. | |
|-----------------------|---------------------|-------------------|------|------------------------------|-------------|--------------------------|---|
| | | POS. | NEG. | | | | |
| TESTIGOS | | 10 | 0 | 0 | 10 | SIN TRATAMIENTO | |
| PRACICUANTEL 5 mg/ kg | | 6 | 4 | 0 | 10 | 40 | % |
| IRE2B | 5 mg/ kg | 7 | 3 | 0 | 10 | 30 | % |
| | 10 mg/kg | 8 | 2 | 0 | 10 | 20 | % |
| | 20 mg/kg | 5 | 5 | 0 | 10 | 50 | % |
| | 50 mg/kg - 1 dosis | 7 | 3 | 0 | 10 | 30 | % |
| | 50 mg/kg - 2 dosis | 5 | 3 | 2 | 8 | 38 | % |
| | 100 mg/kg - 1 dosis | 9 | 1 | 0 | 10 | 10 | % |
| | 100 mg/kg - 2 dosis | 8 | 2 | 0 | 10 | 20 | % |

Tabla 3. Resultados después de suministrar el principio IRE2B a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana var. fraterna*.

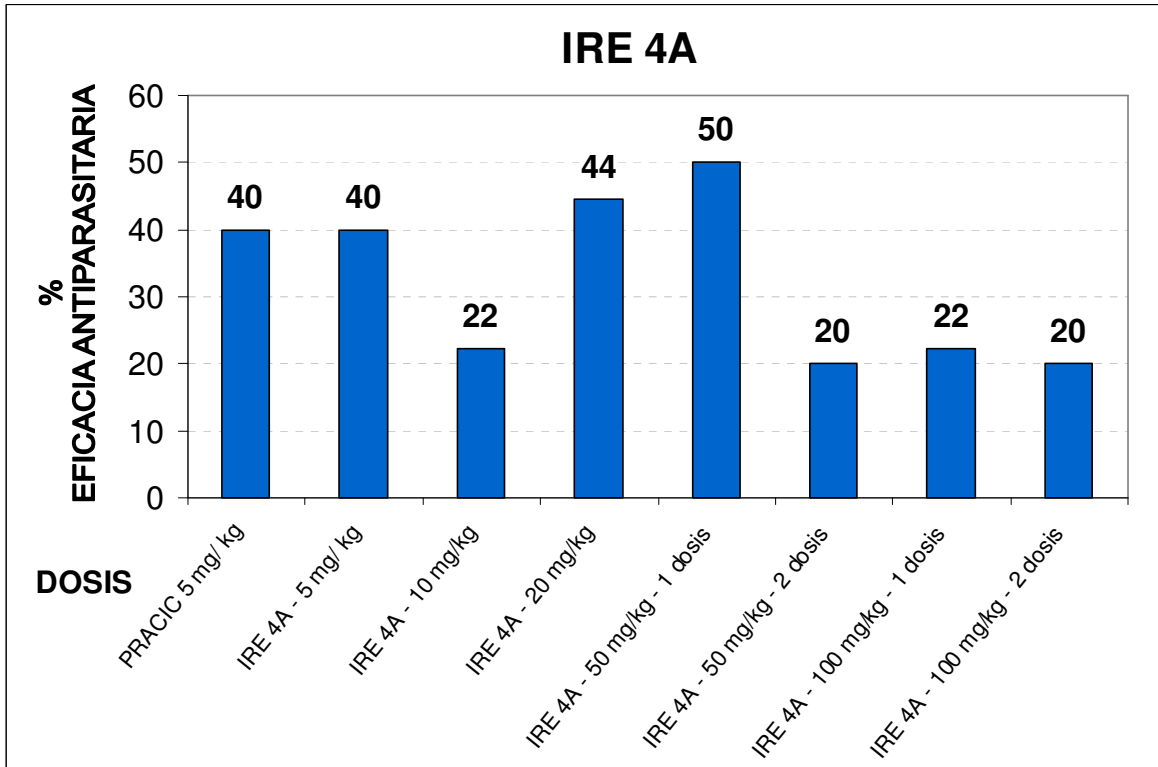


Gráfica 3. Representación gráfica de la eficacia antiparasitaria después de suministrar el principio IRE2B a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*.

La tabla y gráfica 4 muestran que el principio IRE4A en la dosis única de 10mg/kg y en la dosis única 100mg/kg obtuvo una eficacia antiparasitaria del 22% (ambos con una mortalidad del 10%). Para la dosis única de 20 mg/kg hubo una eficacia antiparasitaria del 44% (mortalidad del 10%). La dosis única de 50mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 50% (mortalidad del 40%). Las dosis duplicadas de 50mg/kg y 100 mg/kg tuvieron una eficacia antiparasitaria del 20%. La dosis única de 5mg/kg de IRE4A presentó una eficacia antiparasitaria del 40% similar a la dosis de 5mg/kg de praciquantel.

| TRATAMIENTO Y DOSIS | | PRESENCIA CESTODO | | MUERTES ANTES DEL SACRIFICIO | TOTAL VIVOS | % EFICACIA PRINC. A PBA. | |
|------------------------------|---------------------|-------------------|------|------------------------------|-------------|--------------------------|----------|
| | | POS. | NEG. | | | | |
| TESTIGOS | | 10 | 0 | 0 | 10 | SIN TRATAMIENTO | |
| PRACICUANTEL 5 mg/ kg | | 6 | 4 | 0 | 10 | 40 | % |
| IRE4A | 5 mg/ kg | 6 | 4 | 0 | 10 | 40 | % |
| | 10 mg/kg | 7 | 2 | 1 | 9 | 22 | % |
| | 20 mg/kg | 5 | 4 | 1 | 9 | 44 | % |
| | 50 mg/kg - 1 dosis | 3 | 3 | 4 | 6 | 50 | % |
| | 50 mg/kg - 2 dosis | 8 | 2 | 0 | 10 | 20 | % |
| | 100 mg/kg - 1 dosis | 7 | 2 | 1 | 9 | 22 | % |
| | 100 mg/kg - 2 dosis | 8 | 2 | 0 | 10 | 20 | % |

Tabla 4. Resultados después de suministrar el principio IRE4A a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana var. fraterna*.

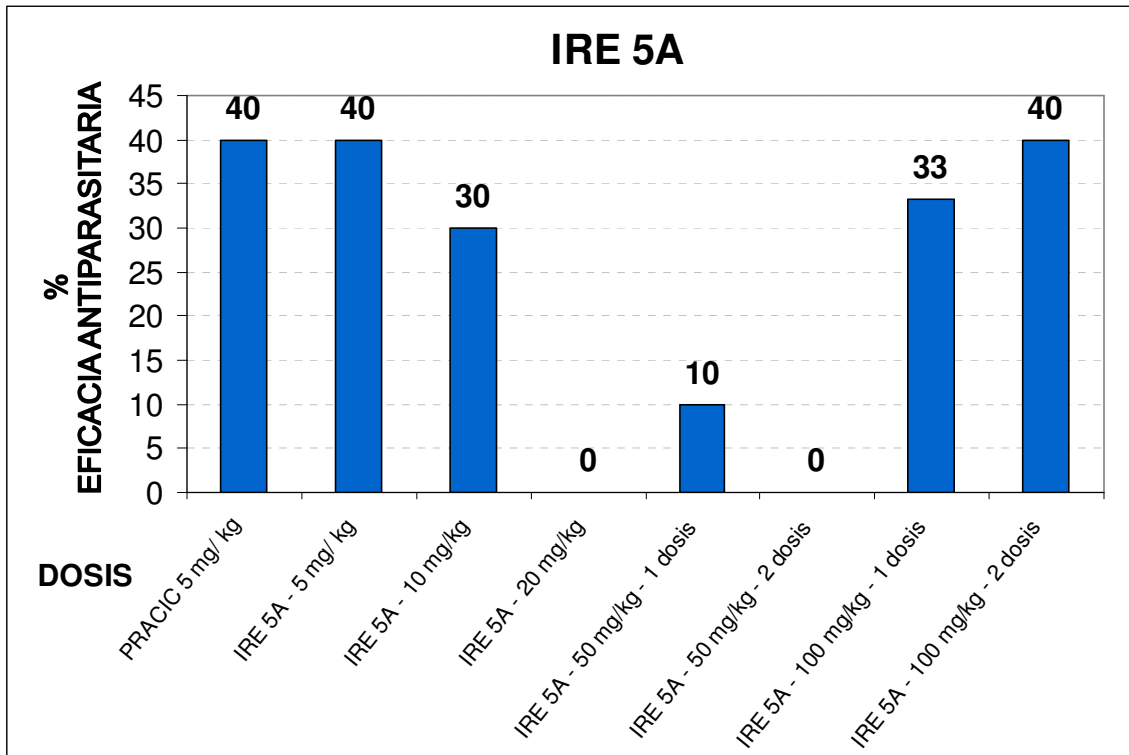


Gráfica 4. Representación gráfica de la eficacia antiparasitaria después de suministrar el principio IRE4A a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*.

La tabla y gráfica 5 muestran que el principio IRE5A en la dosis única para este principio a prueba de 10mg/kg obtuvo una eficacia antiparasitaria del 30%. Para la dosis única de 20 mg/kg hubo una eficacia antiparasitaria del 0% (mortalidad del 10%). La dosis única de 50mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 10%. La dosis duplicada de 50mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 0%. La dosis única de 100mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 33% (mortalidad del 10%), la dosis duplicada de 100mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 40%. Las dosis administradas del principio denominado IRE5A en dosis única de 5mg/kg, la dosis duplicada de 100mg/kg y el pranicuante a dosis de 5mg/kg obtuvieron una eficacia antiparasitaria similar del 40%.

| TRATAMIENTO Y DOSIS | | PRESENCIA CESTODO | | MUERTES ANTES DEL SACRIFICIO | TOTAL VIVOS | % EFICACIA PRINC. A PBA. | |
|-----------------------|---------------------|-------------------|------|---------------------------------|----------------|-----------------------------|----------|
| | | POS. | NEG. | | | | |
| TESTIGOS | | 10 | 0 | 0 | 10 | SIN TRATAMIENTO | |
| PRACICUANTEL 5 mg/ kg | | 6 | 4 | 0 | 10 | 40 | % |
| IRE5A | 5 mg/ kg | 6 | 4 | 0 | 10 | 40 | % |
| | 10 mg/kg | 7 | 3 | 0 | 10 | 30 | % |
| | 20 mg/kg | 9 | 0 | 1 | 9 | 0 | % |
| | 50 mg/kg - 1 dosis | 9 | 1 | 0 | 10 | 10 | % |
| | 50 mg/kg - 2 dosis | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | % |
| | 100 mg/kg - 1 dosis | 6 | 3 | 1 | 9 | 33 | % |
| | 100 mg/kg - 2 dosis | 6 | 4 | 0 | 10 | 40 | % |

Tabla 5. Resultados después de suministrar el principio IRE5A a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*.

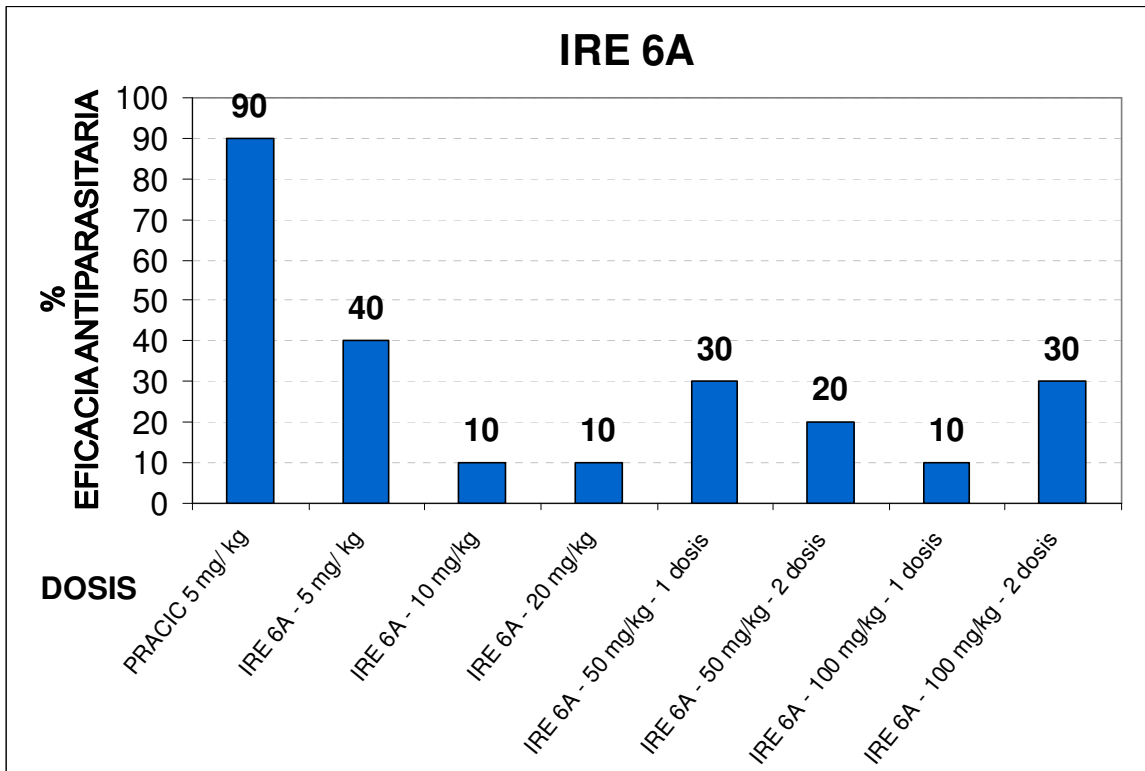


Gráfica 5. Representación gráfica de la eficacia antiparasitaria después de suministrar el principio IRE5A a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*.

La tabla y gráfica 6 muestran que el principio IRE6A en la dosis única de 5mg/kg se obtuvo una eficacia antiparasitaria del 40%. En la dosis única de 10mg/kg, 20mg/kg y 100mg/kg se obtuvo una eficacia antiparasitaria del 10%. La dosis única de 50mg/kg y la dosis duplicada de 100mg/kg tuvieron una eficacia antiparasitaria del 30%. La dosis duplicada de 50mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 20%. El prazicuantel a dosis única de 5mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 90% demostrando un efecto superior a las dosis administradas del principio a prueba.

| TRATAMIENTO Y DOSIS | | PRESENCIA CESTODO | | MUERTES ANTES DEL SACRIFICIO | TOTAL VIVOS | % EFICACIA PRINC. A PBA. | |
|-----------------------|---------------------|-------------------|------|------------------------------|-------------|--------------------------|---|
| | | POS. | NEG. | | | | |
| TESTIGOS | | 10 | 0 | 0 | 10 | SIN TRATAMIENTO | |
| PRACICUANTEL 5 mg/ kg | | 1 | 9 | 0 | 10 | 90 | % |
| IRE6A | 5 mg/ kg | 6 | 4 | 0 | 10 | 40 | % |
| | 10 mg/kg | 9 | 1 | 0 | 10 | 10 | % |
| | 20 mg/kg | 9 | 1 | 0 | 10 | 10 | % |
| | 50 mg/kg - 1 dosis | 7 | 3 | 0 | 10 | 30 | % |
| | 50 mg/kg - 2 dosis | 8 | 2 | 0 | 10 | 20 | % |
| | 100 mg/kg - 1 dosis | 9 | 1 | 0 | 10 | 10 | % |
| | 100 mg/kg - 2 dosis | 7 | 3 | 0 | 10 | 30 | % |

Tabla 6. Resultados después de suministrar el principio IRE6A a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana var. fraterna*.

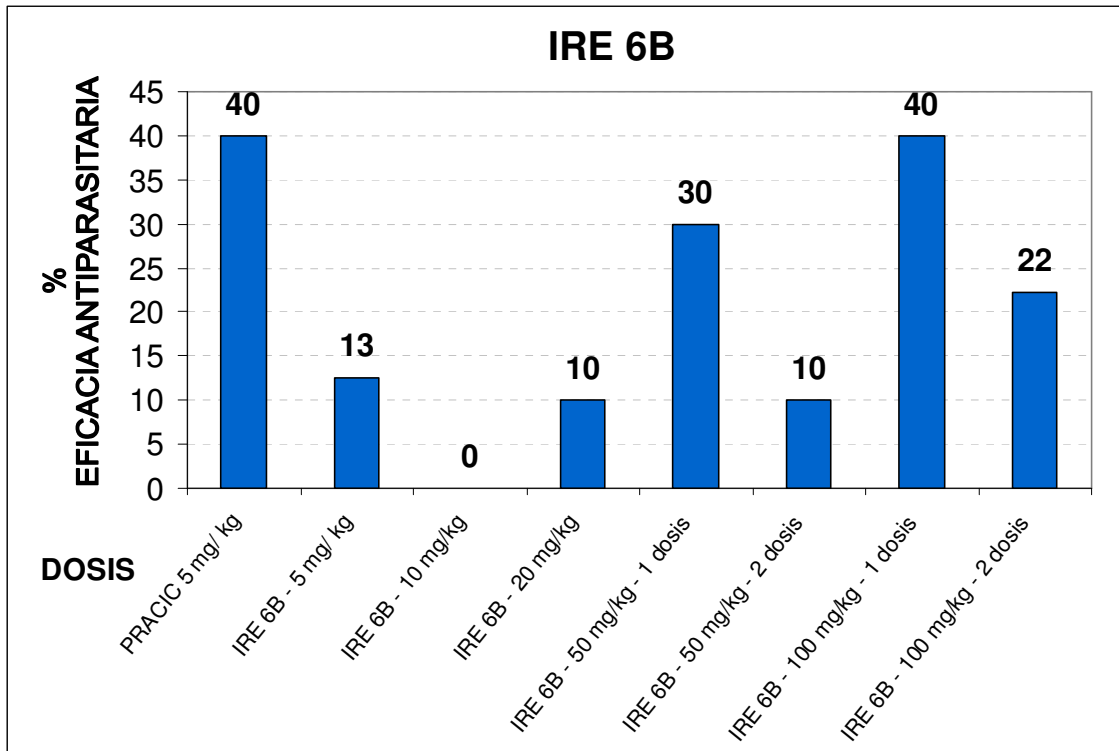


Gráfica 6. Representación gráfica de la eficacia antiparasitaria después de suministrar el principio IRE6A a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*.

La tabla y gráfica 7 muestran que el principio IRE6B en la dosis única de 5mg/kg presentó una eficacia antiparasitaria del 13% (mortalidad del 20%). En la dosis única de 10mg/kg se obtuvo una eficacia antiparasitaria del 0%. La dosis única de 20 mg/kg y la dosis duplicada de 50mg/kg tuvieron una eficacia antiparasitaria del 10%. La dosis duplicada de 100mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 22% (mortalidad del 10%). El pranicuantele a dosis única de 5mg/kg y la dosis única de 100mg/kg del principio a prueba tuvieron una eficacia antiparasitaria del 40% demostrando un efecto antiparasitario similar y superior a las demás dosis administradas.

| TRATAMIENTO Y DOSIS | | PRESENCIA CESTODO | | MUERTES ANTES DEL SACRIFICIO | TOTAL VIVOS | % EFICACIA PRINC. A PBA. | |
|------------------------------|---------------------|-------------------|------|---------------------------------|----------------|-----------------------------|----------|
| | | POS. | NEG. | | | | |
| TESTIGOS | | 10 | 0 | 0 | 10 | SIN TRATAMIENTO | |
| PRACICUANTEL 5 mg/ kg | | 6 | 4 | 0 | 10 | 40 | % |
| IRE6B | 5 mg/ kg | 7 | 1 | 2 | 8 | 13 | % |
| | 10 mg/kg | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | % |
| | 20 mg/kg | 9 | 1 | 0 | 10 | 10 | % |
| | 50 mg/kg - 1 dosis | 7 | 3 | 0 | 10 | 30 | % |
| | 50 mg/kg - 2 dosis | 9 | 1 | 0 | 10 | 10 | % |
| | 100 mg/kg - 1 dosis | 6 | 4 | 0 | 10 | 40 | % |
| | 100 mg/kg - 2 dosis | 7 | 2 | 1 | 9 | 22 | % |

Tabla 7. Resultados después de suministrar el principio IRE6B a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*.

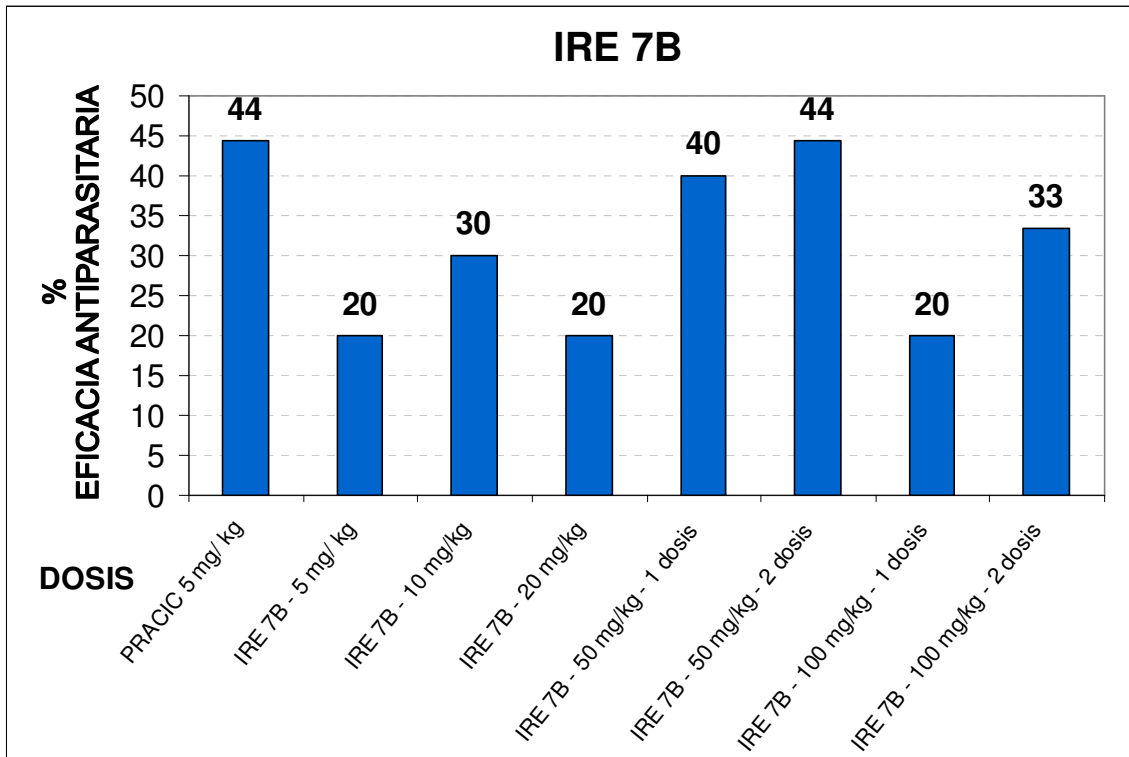


Gráfica 7. Representación gráfica de la eficacia antiparasitaria después de suministrar el principio IRE6B a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*.

La tabla y gráfica 8 muestran que el principio IRE7B en la dosis única de 5mg/kg, 20mg/kg y 100mg/kg presentó una eficacia antiparasitaria del 20%. En la dosis única de 10mg/kg se obtuvo una eficacia antiparasitaria del 30%. La dosis única de 50mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 40%. La dosis duplicada de 100mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 33% (mortalidad del 10%). La dosis duplicada de 50mg/kg de IRE7B y la de praziquantel de 5mg/kg tuvieron una eficacia antiparasitaria similar del 44% (y mortalidad del 10%) demostrando un efecto superior a las demás dosis administradas.

| TRATAMIENTO Y DOSIS | | PRESENCIA CESTODO | | MUERTES ANTES DEL SACRIFICIO | TOTAL VIVOS | % EFICACIA PRINC. A PBA. | |
|------------------------------|---------------------|-------------------|------|---------------------------------|----------------|-----------------------------|----------|
| | | POS. | NEG. | | | | |
| TESTIGOS | | 10 | 0 | 0 | 10 | SIN TRATAMIENTO | |
| PRACICUANTEL 5 mg/ kg | | 5 | 4 | 1 | 9 | 44 | % |
| IRE7B | 5 mg/ kg | 8 | 2 | 0 | 10 | 20 | % |
| | 10 mg/kg | 7 | 3 | 0 | 10 | 30 | % |
| | 20 mg/kg | 8 | 2 | 0 | 10 | 20 | % |
| | 50 mg/kg - 1 dosis | 6 | 4 | 0 | 10 | 40 | % |
| | 50 mg/kg - 2 dosis | 5 | 4 | 1 | 9 | 44 | % |
| | 100 mg/kg - 1 dosis | 8 | 2 | 0 | 10 | 20 | % |
| | 100 mg/kg - 2 dosis | 6 | 3 | 1 | 9 | 33 | % |

Tabla 8. Resultados después de suministrar el principio IRE7B a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana var. fraterna*.

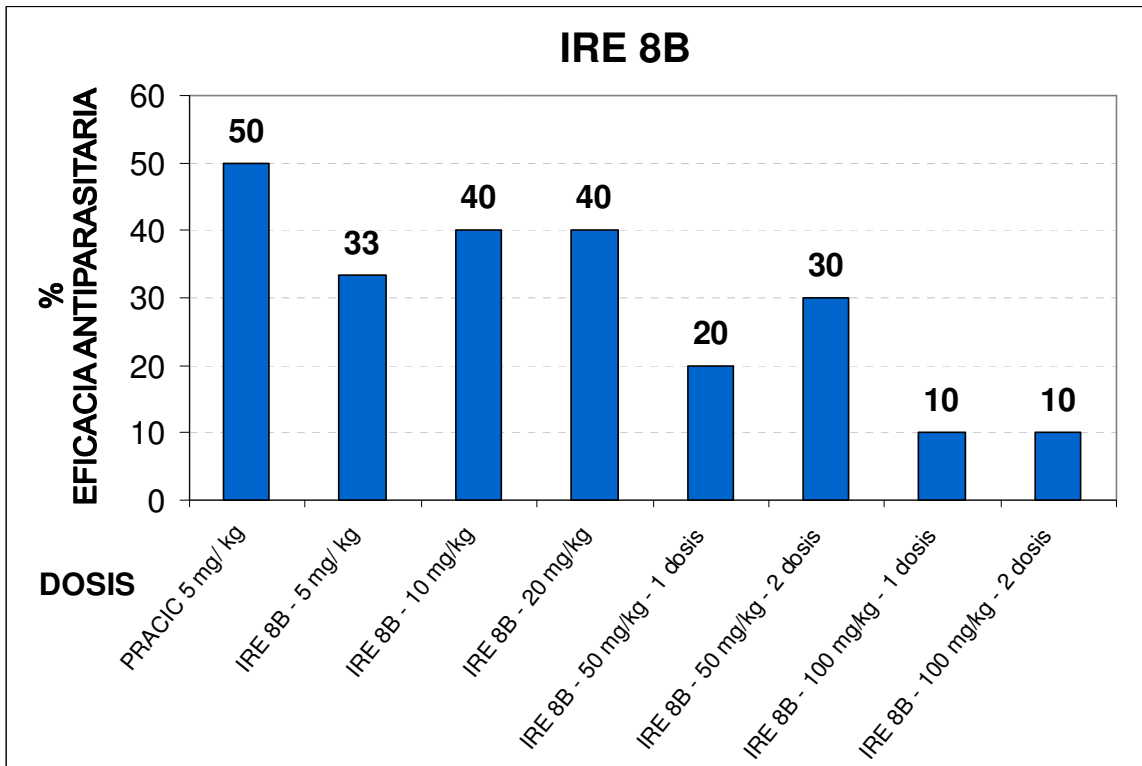


Gráfica 8. Representación gráfica de la eficacia antiparasitaria después de suministrar el principio IRE7B a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*.

La tabla y gráfica 9 muestran que el principio IRE8B en la dosis única de 5mg/kg presentó una eficacia antiparasitaria del 33% (mortalidad del 10%). En la dosis única de 10mg/kg y 20mg/kg se obtuvo una eficacia antiparasitaria del 40%. La dosis única de 50mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 20%. La dosis duplicada de 50mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 30%. Las dosis única y duplicada de 100mg/kg tuvieron una eficacia antiparasitaria del 10%. El pranicuantelel a dosis única de 5mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 50% manifestando un efecto superior a las demás dosis administradas del principio IRE4A.

| TRATAMIENTO Y DOSIS | | PRESENCIA CESTODO | | MUERTES ANTES DEL SACRIFICIO | TOTAL VIVOS | % EFICACIA PRINC. A PBA. | |
|------------------------------|---------------------|-------------------|------|---------------------------------|----------------|-----------------------------|----------|
| | | POS. | NEG. | | | | |
| TESTIGOS | | 10 | 0 | 0 | 10 | SIN TRATAMIENTO | |
| PRACICUANTEL 5 mg/ kg | | 5 | 5 | 0 | 10 | 50 | % |
| IRE8B | 5 mg/ kg | 6 | 3 | 1 | 9 | 33 | % |
| | 10 mg/kg | 6 | 4 | 0 | 10 | 40 | % |
| | 20 mg/kg | 6 | 4 | 0 | 10 | 40 | % |
| | 50 mg/kg - 1 dosis | 8 | 2 | 0 | 10 | 20 | % |
| | 50 mg/kg - 2 dosis | 7 | 3 | 0 | 10 | 30 | % |
| | 100 mg/kg - 1 dosis | 9 | 1 | 0 | 10 | 10 | % |
| | 100 mg/kg - 2 dosis | 9 | 1 | 0 | 10 | 10 | % |

Tabla 9. Resultados después de suministrar el principio IRE8B a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana var. fraterna*.



Gráfica 9. Representación gráfica de la eficacia antiparasitaria después de suministrar el principio IRE8B a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*.

En la tabla 10, se recopilan los mejores resultados de los principios a prueba, en orden descendiente, se expresan el principio activo, la dosis, la eficacia antiparasitaria y la mortalidad en porcentaje, además de los resultados obtenidos con el praziquantel a dosis de 5mg/kg por cada lote de experimentación con su respectivo porcentaje de eficacia antiparasitaria y mortalidad.

Se puede observar que el principio activo de nueva síntesis IRE 2B a dosis de 20mg/kg tuvo un 50% de eficacia antiparasitaria, así como el denominado IRE 4A a 50mg/kg en dosis única, pero con una mortalidad del 40% para esa dosis, en ambos lotes, el praziquantel a dosis de 5mg/kg tuvo una eficacia antiparasitaria del 40%, siendo inferior a dichos principios. El principio IRE 7B tuvo un 44% de eficacia al igual que el praziquantel a 5mg/kg de ese mismo lote, ambos con una mortalidad del 10%. El IRE 6A tuvo un 40% de eficacia, contra el praziquantel a 5mg/kg que tuvo el 90%, siendo mejor que éste. El IRE 8B a dosis de 10 y 20mg/kg tuvo una eficacia del 40%, pero fue superado por el praziquantel a 5mg/kg que tuvo el 50% de eficacia antiparasitaria. IRE 5A e IRE 6B tuvieron una eficacia antiparasitaria del 40%, al igual que el praziquantel a 5mg/kg de sus mismos lotes. El IRE 2A a dosis de 5mg/kg, tuvo una eficacia del 38% y una mortalidad del 20%, en ese mismo lote el praziquantel tuvo una eficacia del 10% sin mortalidad, siendo inferior al principio activo. El IRE 1A tuvo una eficacia antiparasitaria del 30% y el praziquantel a 5mg/kg de ese mismo lote fue inferior, ya que tuvo una eficacia del 11% con una mortalidad del 10%.

MEJORES RESULTADOS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS A PRUEBA

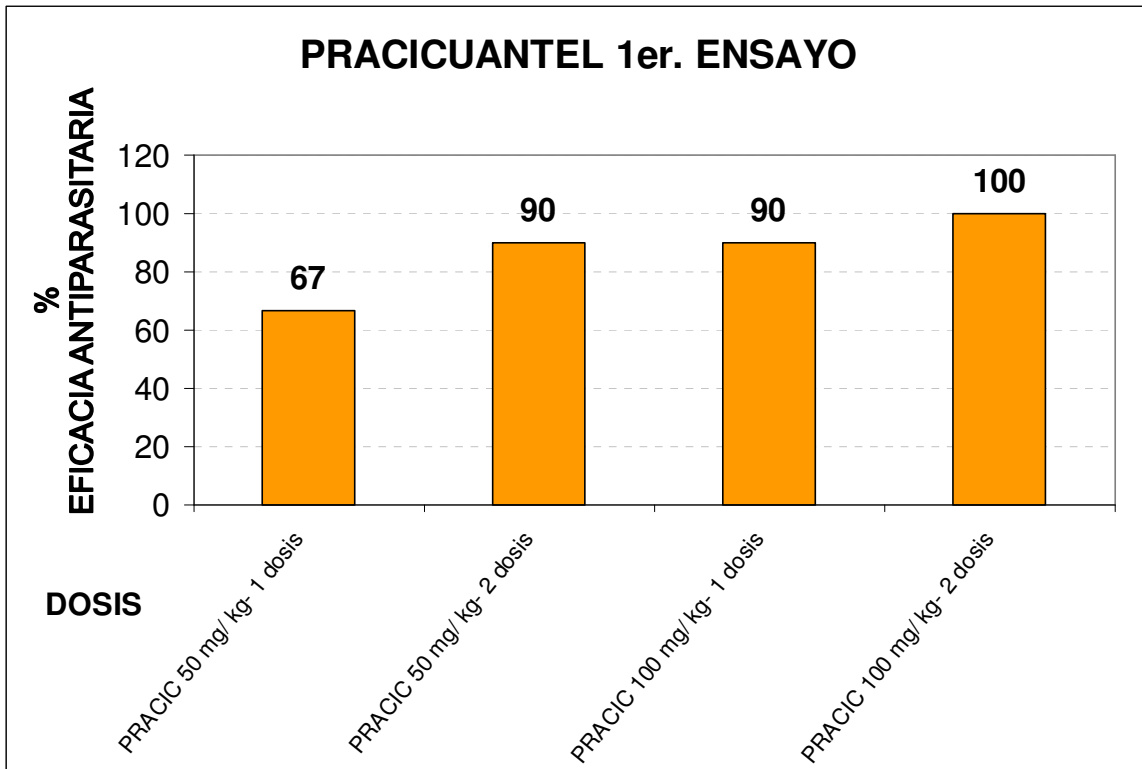
| No. prog. | PRINCIPIO Y DOSIS | | % EFICACIA ANTIPARASITARIA | % MORTALIDAD por dosis |
|-----------|-------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------------|
| 1 | IRE 2B | 20 mg/kg | 50 | 0 |
| | PRACICUANTEL | 5 mg/kg | 40 | 0 |
| 2 | IRE 4A | 50 mg/kg - 1 dosis | 50 | 40 |
| | PRACICUANTEL | 5 mg/kg | 40 | 0 |
| 3 | IRE 7B | 50 mg/kg - 2 dosis | 44 | 10 |
| | PRACICUANTEL | 5 mg/kg | 44 | 10 |
| 4 | IRE 6A | 5 mg/kg | 40 | 0 |
| | PRACICUANTEL | 5 mg/kg | 90 | 0 |
| 5 | IRE 8B | 10 mg/kg | 40 | 0 |
| | | 20 mg/kg | 40 | 0 |
| | PRACICUANTEL | 5 mg/kg | 50 | 0 |
| 6 | IRE 5A | 5 mg/kg | 40 | 0 |
| | | 100 mg/kg - 2 dosis | 40 | 0 |
| | PRACICUANTEL | 5 mg/kg | 40 | 0 |
| 7 | IRE 6B | 100 mg/kg - 1 dosis | 40 | 0 |
| | PRACICUANTEL | 5 mg/kg | 40 | 0 |
| 8 | IRE2A | 5 mg/kg | 38 | 20 |
| | PRACICUANTEL | 5 mg/kg | 10 | 0 |
| 9 | IRE 1A | 100mg/kg - 2 dosis | 30 | 0 |
| | PRACICUANTEL | 5 mg/kg | 11 | 10 |

Tabla 10. Mejores resultados obtenidos en orden descendiente (por cada lote de desafío) entre los principios activos derivados del ácido carbámico a prueba y el pracicuanтел.

Haciendo un ajuste a la dosificación, a 10 y 20 veces más de la dosis recomendada de 5mg/kg del producto comercial Droncit, que contiene praziquantel, en el primer ensayo se obtuvo en la dosis única de 50mg/kg una eficacia antiparasitaria del 67% (una mortalidad del 10%), la dosis duplicada de este mismo principio a 50mg/kg y la dosis única de 100mg/kg tuvieron una eficacia antiparasitaria del 90% y la dosis duplicada de 100mg/kg tuvo una eficacia cestodocida del 100%.

| PRIMER ENSAYO | | | | | | |
|---------------------|---------------------|-------------------|------|---------------------------------|----------------|-----------------------------|
| TRATAMIENTO Y DOSIS | | PRESENCIA CESTODO | | MUERTES ANTES DEL SACRIFICIO | TOTAL VIVOS | % EFICACIA PRINC. A PBA. |
| | | POS. | NEG. | | | |
| PRACICUANTEL | 50 mg/kg - 1 dosis | 3 | 6 | 1 | 9 | 67 % |
| | 50 mg/kg - 2 dosis | 1 | 9 | 0 | 10 | 90 % |
| | 100 mg/kg - 1 dosis | 1 | 9 | 0 | 10 | 90 % |
| | 100 mg/kg - 2 dosis | 0 | 10 | 0 | 10 | 100 % |

Tabla 11. Resultados del primer ensayo después del suministro del praziquantel ajustado a 10 y 20 veces más de la dosis recomendada a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana var. fraterna*.

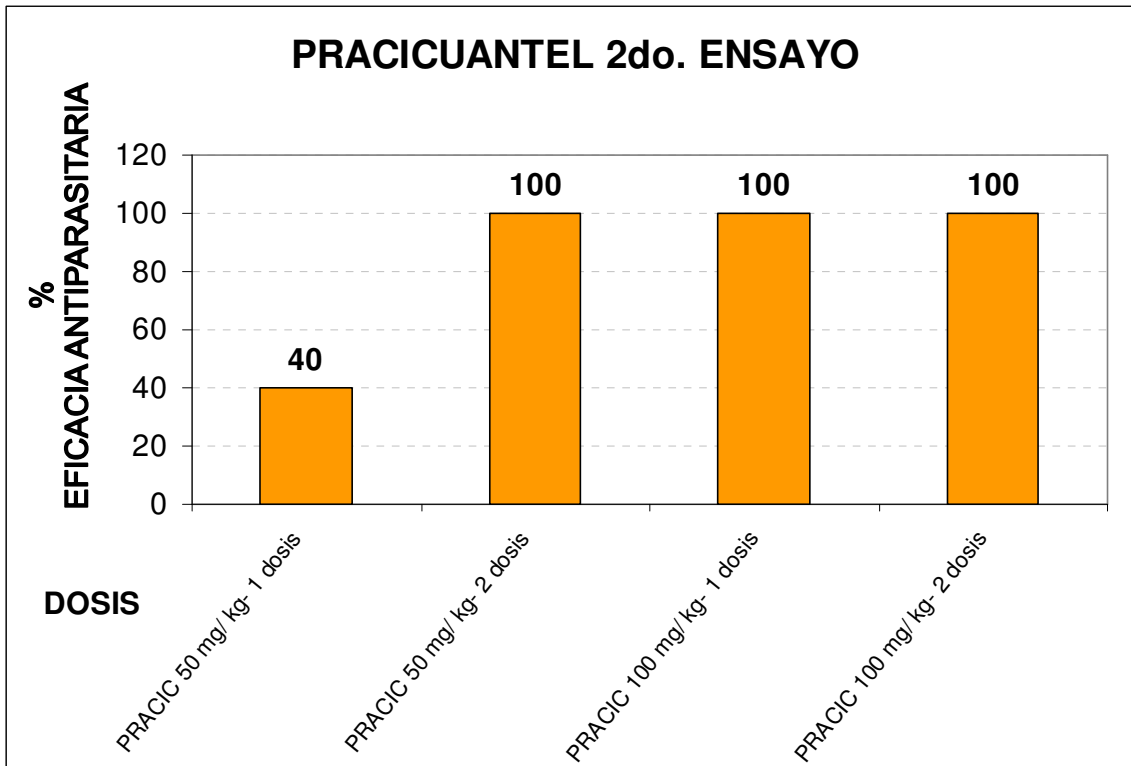


Gráfica 10. Representación gráfica de la eficacia antiparasitaria del primer ensayo después del suministro del praciquantel ajustado a 10 y 20 veces más de la dosis recomendada a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana var. fraterna*.

En el segundo ensayo, posterior al ajuste de dosis, el pracicuantel a dosis única de 50mg/kg obtuvo una eficacia antiparasitaria del 40% (sin mortalidad), a dosis doble de 50mg/kg, única y doble de 100mg/kg tuvieron una eficacia antiparasitaria del 100%, mostrando un comportamiento totalmente cestodicida.

| SEGUNDO ENSAYO | | | | | | | |
|---------------------|---------------------|-------------------|------|---------------------------------|----------------|-----------------------------|---|
| TRATAMIENTO Y DOSIS | | PRESENCIA CESTODO | | MUERTES ANTES DEL SACRIFICIO | TOTAL VIVOS | % EFICACIA PRINC. A PBA. | |
| | | POS. | NEG. | | | | |
| PRACICUANTEL | 50 mg/kg - 1 dosis | 6 | 4 | 0 | 10 | 40 | % |
| | 50 mg/kg - 2 dosis | 0 | 10 | 0 | 10 | 100 | % |
| | 100 mg/kg - 1 dosis | 0 | 10 | 0 | 10 | 100 | % |
| | 100 mg/kg - 2 dosis | 0 | 10 | 0 | 10 | 100 | % |

Tabla 12. Resultados del segundo ensayo después del suministro del pracicuantel ajustado a 10 y 20 veces más de la dosis recomendada a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna*.



Gráfica 11. Representación gráfica de la eficacia antiparasitaria del segundo ensayo después del suministro del praciquantel ajustado a 10 y 20 veces más de la dosis recomendada a ratones infestados con la forma adulta del cestodo *Hymenolepis nana var. fraterna*.

6. DISCUSIÓN

Este estudio se desarrolló para detectar la presencia de actividad antiparasitaria de varios compuestos de síntesis orgánica derivados del ácido carbámico (bencimidazol-carbamatos). Este último, pertenece a un grupo químico en el que previamente se han identificado propiedades como insecticidas y antihelmínticos por lo que existe la factibilidad de que compuestos emparentados estructuralmente presenten propiedades similares.

Se utilizó un modelo en ratones con el cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna* que previamente había sido validado con otros compuestos de la misma familia denominados *4 - hidroxí y 4 - nitro fenil carbamato de etilo* que manifestaron sus propiedades anticestódicas a dosis de 5,10 y 50 mg/kg, semejantes a la del prazicuantel (*Minero, 1997*), éstos mostraron ser adecuados para identificar primeramente que los compuestos de esta familia presentan actividad anticestódica, y con el empleo de diferentes concentraciones de los principios activos de nueva síntesis, determinar el nivel de eficacia con la que actúa el principio. El modelo incluye al prazicuantel como un principio de referencia que ya está plenamente identificado como anticestódico, y se emplea cotidianamente en los humanos para el tratamiento contra sus cestodos. Se usa en medicina veterinaria particularmente en el combate de la cestodosis canina y felina, también está recomendado su uso en el tratamiento de este tipo de parasitosis en los animales de laboratorio. Se trata de un modelo fácil de reproducir y controlar cualitativamente, y brinda una buena opción para tamizar productos anticestódicos.

En los modelos experimentales *in vivo* es común encontrar factores intrínsecos que pueden modificar los resultados obtenidos; intervienen la alimentación del hospedero, el sexo, edad, estado inmunológico,

idiosincrasia; dichos factores modifican en gran magnitud el comportamiento de los resultados en poblaciones heterogéneas, y para reducir dichos elementos adversos se utilizaron ratones machos singénicos (genéticamente similares, sólo difieren en un gene) de la misma edad, así el manejo se facilita y sólo se controlan variables como el microclima (temperatura, humedad, etc.). Se sabe que existen diferencias en cuanto a respuestas ante desafíos entre individuos aunque sean genéticamente iguales, entre estas están que el metabolismo de un individuo puede procesar de diferente manera un producto farmacológico que otro individuo, dependiendo, también, de la naturaleza del fármaco; además de las condiciones físicas, alimentación, estrés, estatus entre la población que lo rodea, entre otros (Bertram, 2001).

La solubilidad es un factor esencial para la eficacia de los fármacos, independientemente de la ruta de administración (Kocbek et al. 2006). Los principios activos de nueva síntesis usados en este trabajo, se caracterizaron por ser muy insolubles en agua, lo cual afectó mucho sus concentraciones finales, requiriendo de un sistema de agitación continua al hacerse la suspensión y mantenerse homogénea. Se requirió incluso mezclar los productos en mortero en el medio líquido gradualmente hasta alcanzar el volumen adecuado a las concentraciones usadas. La baja solubilidad generó variaciones en perjuicio del experimento, ya que en algunos casos se debían recuperar los productos de la superficie de la suspensión hecha, para resuspenderlos y suministrarla a los roedores, pudiendo producir esto amplias variaciones en la concentración final suministrada. La solubilidad nos crea un importante factor de variación debido a que no se contaba con opciones respecto al posible uso de otros solventes, como diluyentes, por la posible toxicidad. Experimentos realizados en modelos *in vitro*, desarrollados con larvas de nematodos, se empleó acetona como solvente temporal para usar dosis exactas en los

ensayos, el solvente se evaporaba antes de poner los principios en contacto con los organismos. También se logró solubilizar los principios con dimetilsulfóxido pero no resultó viable esta estrategia debido a la toxicidad del solvente (*Pereyra, 2004*). A esto le podemos agregar el hecho de que en algunos casos los principios pueden resultar tóxicos por si solos o irritar la mucosa gástrica de los animales y estos, en respuesta, regurgitan el producto, alterándolo y eliminando cualquier posibilidad de funcionamiento del fármaco.

Los compuestos bencimidazólicos son fármacos que tienen muy pocos efectos adversos, es poco probable la intoxicación, pero en hembras gestantes son teratogénicos y embriotóxicos (*Capece et al., 2003*). Su toxicidad es relativamente baja, existen reportes que describen que la LD₅₀ oral (Dosis letal 50, que significa que es la dosis máxima en la cual mueren el 50% de los animales a los que se les suministró a esta dosis de un fármaco a prueba (*Kuklinski, 2000*), en ratón la LD₅₀ oral es de > 3000 mg/kg para el albendazol, y > 1280mg/kg para el mebendazol (ratones y conejos), mostrando como signos más notorios diarrea y vómito (*Dayan, 2003*). Lo anterior explica porqué se decidió emplear dosis crecientes en este trabajo, se usaron desde dosis bajas y comunes estandarizadas para bencimidazólicos como el albendazol y mebendazol, que van desde los 5-10mg/kg y probar hasta 10 veces más.

El presente trabajo tuvo como finalidad aportar datos primarios de comportamiento de fármacos bencimidazólicos a la investigación de dicho grupo de antiparasitarios. Se observó similitud de resultados entre los principios usados en este experimento. Este efecto se da, porque existe una estrecha relación entre los componentes de los fármacos (sus elementos estructurales son similares, sólo varían la posición tridimensional y/o alguno de sus componentes moleculares), dando como tal

una respuesta antiparasitaria casi idéntica (*McCraken et al. 1991*). En resumen, los resultados obtenidos fueron que los principios IRE1A, IRE2A, IRE5A, IRE 6A, IRE6B, IRE7B, IRE8B mostraron una respuesta variable que va desde el 0%,10%,20%,30% y 40% de eficacia antiparasitaria, el IRE4A tuvo un 50% de eficacia antiparasitaria en la dosis de única de 50mg/kg, pero una mortalidad posterior a la administración de esta dosis del 40%. El producto que mejor efecto tuvo (según sus características) fue el IRE2B con un 50% de eficacia a la dosis de 20mg/kg, sin mortalidad, y también fue el más eficaz en su lote, comparándolo con el pranicuante a dosis única de 5mg/kg, ya que este último principio solo tuvo un 40% de actividad antiparasitaria. La mortalidad fue más importante en el lote del producto denominado IRE2A, donde se presentó un 100% de ésta, en las dosis duplicadas de 50 y 100mg/kg de este principio activo a prueba, presentó toxicidad aguda en los roedores (que murieron inmediatamente después de la administración del principio activo), este principio a prueba, en 4 de las 7 dosis diferentes administradas no tuvo efecto antiparasitario, estos resultados lo ubican como el fármaco con más características adversas.

Una de las posibles causas directas de mortalidad se dio, principalmente, porque había 10 individuos por caja generando competencia entre ellos (sobre todo por el alimento), hubo canibalismo (que en la etología de los roedores es común), por lo que al existir un microambiente saturado de elementos y como una forma de controlar la sobrepoblación, se atacan y sólo sobreviven los más fuertes. La otra causa de mortalidad pudo asociarse a la toxicidad del producto a prueba, ya que se dio posterior a la administración del principio activo de nueva síntesis (en el caso del IRE2A). Se concluyó que en los lotes donde hubo individuos muertos, éstos fallecieron por causas ajenas al fármaco, la mayoría por canibalismo como ya se había mencionado. Cabe aclarar que en los casos

en los que sucedió este evento, solo se encontró (la mayoría de veces) la piel de los cadáveres, en realidad no se pudo determinar si el animal murió sólo por el ataque de sus compañeros, cabe la posibilidad de que el roedor muriera por efecto del fármaco y posteriormente fuera consumido por sus congéneres pero no se les realizó ninguna prueba toxicológica, ya que *Pereyra, 2004 y Minero, 1997;* mencionan en sus respectivos trabajos que los órganos donde se concentran residuos de carbamatos bencimidazólicos son: hígado, riñones, grasa o músculo; por lo tanto la piel no fue un órgano apropiado para realizar dichas pruebas.

Habiéndose mostrado en el trabajo previo de *Minero, 1997;* que los principios derivados del *4 - hidroxí y el 4 - nitro fenil carbamatos de etilo,* si cuentan con un efecto antiparasitario, y la eficacia depende de la administración de varias dosis repetidas de dichos principios activos, nos hace suponer que el principio IRE 2B utilizado en este trabajo puede llegar a un 100% de eficacia si se repiten las dosis, particularmente cuando se trata de uno de los cestodos más difíciles de eliminar (*Andrews et al., 1979*).

En cuanto al pranicuante a dosis recomendada de 5 mg/kg, tuvo un bajo efecto cestodocida, en promedio 41% (se esperaba el 100%), al realizar los ajustes de las dosis a 10 y 20 veces más de la dosis recomendada, éstas mostraron un 90% y 100% de eficacia en los dos ensayos posteriormente realizados, sin observar signos de toxicidad en los roedores, lo que nos puede sugerir la hipótesis de que la calidad de la sal de pranicuante utilizada por el farmacéutico entre lotes puede ser diferente, debido a deficiente control de calidad en la producción del producto comercial, o en otro caso, que en la línea de producción de la presentación comercial (tabletas) la mezcla utilizada para producir cada una de ellas, no sea homogénea. El pranicuante fue superior en eficacia

cestodocida a los principios de nueva síntesis en un 18% ya que éstos últimos tuvieron una eficacia general del 23%.

De referencia, el prazicuantel utilizado en este trabajo es producido por los Laboratorios Bayer, en tabletas de 50mg. Este fármaco es conocido como un cestodocida eficaz, y en estudios experimentales se ha demostrado una exitosa respuesta en contra de varias cestodiasis intestinales, *Andrews et al., 1979*; han descrito una excelente respuesta en una sola dosis de 5mg/kg contra la infestación por *Taenia pisiformis* en perros, *Taenia taeniformis* en gatos, *Mesocestoides corti* en perros, *Hymenolepis microstoma* en ratones, en dosis única de 2.5 mg/kg contra *Dipylidium caninum* en perros, *Moniezia sp.* en borregos e *Hymenolepis diminuta* en ratas; en dosis única de 1.0 mg/kg ha funcionado en primoinfecciones por *Echinococcus multilocularis* en perros (*Thomas, 1977*). Bajas dosis de prazicuantel han tenido una reducción sustancial de parásitos adultos que oscila entre el 66% a 99% (*Thomas, 1977*). La eficacia de bajas dosis de prazicuantel (5mg/kg) en *Taenia ovis* y en *Taenia hydatigena* ha sido confirmada también por otros autores (*Baldock et al., 1977*; *Gemmel et al., 1977*). Estudios *in vitro* probando el prazicuantel, han encontrado un efectivo funcionamiento contra cestodos como *Hymenolepis diminuta*, *H. microstoma*, *H. nana* y *E. multilocularis* a esta concentración (*Zbigniew, 1991*). Aunque estos estudios muestran una buena respuesta antiparasitaria a bajas dosis (en promedio 5mg/kg), no describen si el prazicuantel utilizado fue de forma pura o como producto comercial, porque como hemos mencionado anteriormente, una variable que no podemos controlar en los principios comerciales es la calidad y concentración del mismo, ya que varían de laboratorio a laboratorio y de lote a lote por diversas causas, en las que se puede mencionar el control de calidad del sistema de producción. Se pudo observar en los datos proporcionados por los primeros resultados de los grupos experimentales de este trabajo, que

el comportamiento antiparasitario no era el descrito por la literatura, ya que en la población de ratones usados para este trabajo, el Droncit estaba teniendo un comportamiento que variaba desde el 10%, 40% al 90% de eficacia en dichos grupos, sin llegar al 100% como también lo ha reportado en su momento *Minero, 1997*; que obtuvo una completa eficacia antiparasitaria en la eliminación de *Hymenolepis nana* a 25 mg/kg en su trabajo, pero utilizando pranicuante puro, sintetizado en la FES Cuautitlán. Esto dejaba una interrogante en cuanto a la dosis a utilizar de pranicuante, ya que datos recopilados por *Dayan, 2003*, describen que la dosis frecuente utilizada para tratar la cestodosis, es de entre 10 y 25 mg/kg en dosis única. Este fármaco es una sustancia muy noble, con efectos secundarios prácticamente nulos, es considerado como el mejor cestodocida, se han realizado pruebas para determinar la toxicidad y se ha encontrado que la LD₅₀ en los ratones es de 2560 mg/kg (*Dayan, 2003*). Es notorio el amplio rango de seguridad sin efectos adversos, por tanto, y debido a que no se estaba obteniendo la respuesta antiparasitaria adecuada con el principio a desafiar, se hicieron otros dos ensayos incrementando la dosis de pranicuante a 50 mg/kg y 100mg/kg a dosis única y dosis duplicada de ambos, y los resultados se acercaron a los obtenidos por *Andrews, 1976*; en los que usando 250mg/kg contra cestodos en los ratones, elimina al 100% de los parásitos, y éstos fueron desechados en heces 2 hr después del tratamiento.

La determinación de usar dosis más altas de pranicuante se da, también, debido a que se han realizado trabajos de investigación (*Balbuena et. Al, 2004*), en los cuales se utilizaron productos comerciales que contienen pranicuante en su formulación (en diferentes formas de presentación comercial), que han arrojado datos que manifiestan que aún después de administrado el tratamiento antiparasitario con dichos productos, se ha encontrado la presencia del cestodo *Dipylidium caninum*,

común en perros y gatos. Esto nos lleva a tomar en cuenta la posibilidad de que se esté generando resistencia en este tipo de parásitos, para lo cual sería indicado realizar ajustes en la dosificación del prazicuantel, porque ya son varios los productos comerciales que han tenido deficiencias en su desempeño (*Balbuena et. Al, 2004*). Una causa de estas deficiencias sería la posible subdosificación del producto antiparasitario, interviniendo también la calidad de la sal utilizada. En los dos últimos ensayos realizados en este proyecto, posterior a las modificaciones de las dosis de prazicuantel (Droncit), se obtuvo una eficacia antiparasitaria del 90% y 100%.

7. CONCLUSIONES

En general, todos los principios de nueva síntesis mostraron un efecto antiparasitario, hubo variación de resultados que partían desde el funcionamiento nulo del principio activo hasta el 40% de eficacia en las dosis utilizadas, situándose la mayoría de los productos en un 23% de eficacia antiparasitaria, el producto que mejor respuesta antiparasitaria presentó fue el denominado IRE2B con un 50% de eficacia a dosis única de 20mg/kg, sin mortalidad. El producto que mostró la más baja eficacia antiparasitaria fue el IRE2A con un 38%, además de que en cuatro de las siete dosis utilizadas no se observó respuesta antiparasitaria, y mostró mortalidad por toxicidad aguda (100%) para las dosis duplicadas de 50 y 100mg/kg.

Respecto a la comparación entre los nueve principios activos a prueba y el pranicuante, podemos mencionar que éste tuvo un funcionamiento del 41% de eficacia, siendo superior a los principios a prueba. El pranicuante es un cestodocida eficaz a dosis de 5mg/kg, pero en este caso no fue efectivo, se realizaron ajustes a las dosis utilizadas aumentándolas hasta 10 y 20 veces, respecto a la dosis mínima recomendada, y se obtuvo una eficacia antiparasitaria del 90 y 100%. Este resultado podría deberse a la calidad de la sal utilizada para la producción de las tabletas. Se observa, también, que el pranicuante es un producto seguro con mínimos efectos tóxicos a posibles dosis altas.

La insolubilidad de los productos de nueva síntesis dio como resultado la incorrecta dosificación de éstos, es difícil mantenerlos homogeneizados con agua, requirieron de agitación constante, formaron grumos irregulares en la superficie que modificaron la concentración final administrada para cada roedor, es factible que en muchos de los casos se haya administrado más fármaco y en otros más agua, por lo cual se concluye que es

importante contar con solventes apropiados para la combinación con los carbamatos bencimidazólicos, con poca o nula toxicidad a la combinación y que mantengan estable la concentración de estos fármacos. Por otra parte es conveniente trabajar en dosis repetidas del fármaco IRE2B para determinar el número de tratamientos para lograr el 100% de eficacia antiparasitaria.

Con esto se considera que el objetivo general del presente trabajo se ha cumplido, ya que se contribuyó al aporte de los primeros datos experimentales, para nuevos fármacos bencimidazólicos, que probablemente se utilizarán en investigaciones futuras para la estandarización de nuevos productos antiparasitarios efectivos y sus respectivas dosis.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Andrews, P. 1976 Pharmacokinetic studies with Droncit (R) in animals using a biological assay. Vet. Med. Nachr. 2, 154-165.
- 2) Andrews, P. and Thomas, H. 1979. The effect of praziquantel on *Hymenolepis diminuta in vitro*. Tropenmed. Parasitkd. 30, 391-400.
- 3) Asano, K.; Muramatsu, K.; Okamoto, K. 1993. Lymphokine production by mesenteric lymph node cells from BALB/c mice during *Hymenolepis nana* infection. Int J Parasitol 23 : 51-56.
- 4) Asano K.; Shinoda M.; Nakamura F.; Okamoto K. 1986. *Hymenolepis nana*: passive transfer of mouse immunity by T-cell subset of phenotype Lyt-1. Exp Parasitol Vol. 61: 373-378.
- 5) Balbuena, V.; León, L. 2004. Comparación de actividad antihelmíntica de siete productos comerciales contra los nematodos *Toxocara canis* y *Ancylostoma caninum* usando perros con infestación natural por medio de una prueba crítica. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 6) Baldock, F.; Fluke, W.; Hopkins, T. 1977. Efficiency of Droncit (R) a new cestocide, against *Taenia hydatigena* in the dog. Res. Vet. Sci. 23,237-238.
- 7) Baliharová, V.; Skálová, L.; Maas, R.; De Vrieze, G.; Bull, S.; Fink-Gremmels J. 2003. The effects of benzimidazole anthelmintics on P4501A in rat hepatocytes and HepG2 cells. Res. Vet. Sci. Vol. 75: 61 – 69.
- 8) Bennet-Jenkins, E.; Bryant C. 1996. Novel sources of anthelmintics. Int. J. Parasitol. Vol. 26. No. 8/9. Pp. 937 - 947.
- 9) Bertram, G. 2001. Farmacología básica y clínica. 8ª. ed. Ed. El manual moderno. México

- 10) Berkowitz, S.; Wolff J. 1981. Intrinsic calcium sensitivity of tubulin polymerization. *J Biol. Chem.* Vol. 256. No. 21: 11216 - 11223.
- 11) Capece, B.; Navarro, M.; Arcalis, T.; Castells, G.; Toribio, L.; Pérez, F.; Carretero, A.; Ruberte, J.; Arboix, M.; Cristófol, C. 2003. Albendazole Sulphoxide Enantiomers in Pregnant Rats Embryo Concentrations and Developmental Toxicity. *Vet. J.* 165: 266-275.
- 12) Cea, A.; del Arenal, I.; Riveros, H.; Vázquez-Contreras, E. 2002. Mensaje bioquímico Vol XXVI. Simulación del reconocimiento entre proteínas y moléculas orgánicas o dockings, aplicación al diseño de fármacos. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Cd. Universitaria. Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF. (<http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>).
- 13) Dayan, A. 2003. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Ac Trop* 86 : 141-159
- 14) Dobson, R.; Lejambre, L.; Gill J. 1996. Management of anthelmintic resistance: Inheritance of resistance and selection with persistent drugs. *Int. J. Parasitol.* Vol. 26. No. 8/9: 993-1000.
- 15) Dunn, A. 1978. *Helmintología Veterinaria*. 1ª. ed. Ed. El Manual Moderno. México.
- 16) FAO. 2003. Resistencia a los Antiparasitarios; Estado actual con énfasis en América Latina. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Estudio FAO Producción y Sanidad Animal 157. Italia.
- 17) Geary, T.; Thompson, D.; Klein R. 1999. Mechanism – based screening: discovery of the next generation of anthelmintics depends upon more basic research. *Int. J. Parasitol.* Vol. 29: 105-112.
- 18) Gemmel, M.; Johnstone, P.; Oudemans, G. 1977. The effect of Praziquantel on *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *Taenia ovis* infections in dogs. *Res. Vet. Sci.* 23, 121-123.

- 19) Gill, J.; Lacey E. 1992. The kinetics of mebendazole binding to *Haemonchus contortus* tubulin. Int. J. Parasitol. Vol. 22. No.7: 939-946.
- 20) Halton, D. 1997. Nutritional adaptations to parasitism within the platyhelminthes. Int. J. Parasitol. Vol. 27. No. 6: 693 – 704.
- 21) Henderson, D.; Hanna, R. 1987. *Hymenolepis nana* (Cestoda: Cyclophyllidea): migration, growth and development in the laboratory mouse. Int. J. Parasitol. Vol.17. No.7: 1249-1256.
- 22) Ito, A. 1997. Basic and applied immunology in cestode infections: from *Hymenolepis* to *Taenia* and *Echinococcus*. Int. J. Parasitol. Vol. 27. No. 10: 1203 – 1211.
- 23) Ito, A.; Onitake, K.; Andreassen, J. 1988. Lumen phase specific cross immunity between *Hymenolepis microstoma* and *H. nana* in mice. Int. J. Parasitol. Vol. 18. No. 8: 1019-1027.
- 24) Jones, M. 1998. Structure and diversity of cestode epithelia. Int. J. Parasitol. Vol. 28: 913 – 923.
- 25) Kassai, T. 1998. Helminología Veterinaria. Ed. Acribia. España.
- 26) Kearn, G. 1998. Parasitism and the platyhelminths. Ed. Chapman & Hall. England.
- 27) Kocbek, P.; Baumgartner, J.; Kristl J. 2006. Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. Int. J. Pharmac. Vol. 312: 179 – 186.
- 28) Köhler, P. 2001. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. Int. J. Parasitol. Vol. 34: 336-345.
- 29) Koizumi, Y.; Arai, M.; Tomoda, H.; Ōmura S. 2004. Oxaline, a fungal alkaloid, arrest the cell cycle in M phase by inhibition of tubulin polymerization. Bioch. et Bioph. Act. Vol. 1693: 47-55.
- 30) Kuklinski, C. 2000. Farmacognosia. Ediciones Omega. España

- 31) Lacey, E. 1988. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int. J. Parasitol.* Vol. 18. No.7: 885-936.
- 32) Lamothe, R. 1983. *Introducción a la biología de los platelmintos*. Ed. AGT Editor. México.
- 33) Leeson, T.; Leeson, R.; Paparo A. 1988. *Texto- Atlas de Histología*. 1ª. ed. Ed. Interamericana – McGraw Hill. México.
- 34) Martin, R. 1997. Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet. J.* Vol. 154:11-34.
- 35) McCracken, R.; Stillwell, W. 1991. A possible biochemical mode of action for benzimidazole anthelmintics. *Int. J. Parasitology* Vol. 21, No. 1: 99-104
- 36) Metwally, A.; Bennett, J.; Botros, S.; Ebeid, F.; Din M. El Attar, G. 1995. Impact of drug dosage and brand on bioavailability and efficacy of praziquantel. *Pharmacol. Res.* Vol. 31, No. 1
- 37) Minero, C. 1997. Comparación de la anticestódica de dos principios de nueva síntesis contra el praziquantel, usando *Hymenolepis nana* como modelo en ratones. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 38) Mwambete, K.; Torrado, S.; Cuesta-Bandera, C.; Ponce-Gordo, F.; Torrado J. 2004. The effect of solubilization on the oral bioavailability of three benzimidazole carbamate drugs. *Int. J. Pharmac.* Vol. 272: 29-36.
- 39) Pereyra, N. 2004. Determinación de la actividad antihelmíntica de nueve principios de nueva síntesis derivados del 4-hidroxifenil carbamato de etilo usando *Haemonchus contortus* como modelo *in vitro*. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Químico

Farmacéutico Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
Universidad Nacional Autónoma de México.

- 40) Poulin, R. 1996. Helminth growth in vertebrate hosts: does host sex matter?. *Int. J. Parasitol.* Vol. 26. No. 11: 1311-1315.
- 41) Prichard, R. 1997. How do anthelmintic drugs work?. *Vet. J.* Vol. 154: 5-7.
- 42) Quiroz, H. 2005. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos.* Ed. Limusa. México.
- 43) Romagnoli, R.; Baraldi, P.; Jung, K.; Laconinoto, M.; Carrion, M.; Remusat, V.; Preti, D.; Tabrizi, M.; Francesca, F.; De Clereq, E.; Balzarini, J.; Hamel E. 2005. Synthesis and preliminary biological evaluation of new anti-tubulin agents containing different benzoheterocycles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* Vol. 15: 4048-4052.
- 44) Sangster, N. 1999. Anthelmintic resistance: past, present and future. *Int. J. Parasitol.* Vol. 29: 115-124.
- 45) Schmid, G. 2000. *Handbook of tapeworm identification.* Ed. CRC Press, U.S.A.
- 46) Sumano, H.; Ocampo L. 1999. *Farmacología Veterinaria.* 2ª. ed. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. México.
- 47) Thomas, H. 1977. Resultados experimentales con praziquantel (Embay 8440) en cestodiasis y cisticercosis. *Bol. Chile. Parasitol.* 32, 2-6.
- 48) Thomas, H., Andrews, P. and Mehlhorn, H. 1982. New results on the effect of praziquantel in experimental cysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31,803-810
- 49) Walchshofer, N.; Delatour, P.; Paris J. 1991. Pharmacokinetics of anthelmintic potential prodrug of a new benzimidazole in gerbil, mouse and sheep. *Int. J. Pharmac.* Vol. 77:265-268.

50) Zbigniew, S. 1991. Efficacy of low doses of praziquantel in taeniasis.
Acta Tropica. Vol. 48: 83-88

- Direcciones electrónicas (imágenes):

1. <http://www.stanford.edu>

2. <http://www.helsenr.no>

- Imágenes originales

América Guadalupe Bernabe Pérez *(A.G.B.P., 2007)*