



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DEL COMPUESTO LQM996 EN  
*Meriones Unguiculatus* INFECTADO CON *Helicobacter pylori*

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
P R E S E N T A:

**ROCÍO REYES GONZÁLEZ**

ASESARAS: Dra. SANDRA DÍAZ-BARRIGA ARCEO  
Dra. NORMA VELAZQUEZ GUADARRAMA



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.

La Presente investigación se realizó en el laboratorio de Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”; bajo la dirección de la Dra. Norma Velásquez Guadarrama.

El compuesto LQM996 fue proporcionado por el Dr. Enrique Ángeles Anguiano del laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

## DEDICATORIAS

### A MI FAMILIA

Gracias a mi familia que amo tanto, por apoyarme durante este largo camino, y al final obtener la meta anhelada.

### A MIMPADRE

**PADRE** no tengo palabras para agradecerte lo todo lo que me has dado, ni todo el oro del mundo serviría para pagarte lo que me has regalado, un arma muy poderosa en esta vida, mi estudio que tanto sacrificio te costo, pero mira ahora el resultado, al final obtuvimos lo que tanto anhelábamos, eres el mejor papá del mundo. **TE AMO PAPÁ**

### A MI MADRE

**MADRE**, eres única en este mundo y mi mejor amiga, sabes que te adoro, mil gracias por haberme encaminado en esta vida que no ha sido fácil, pero si muy bonita por que te tengo a ti, a papá y a mis hermanos, sobretodo que siempre me has acompañado siempre en las buenas y malas, escuchado y orientado, has sido una madre ejemplar. **TE AMO MAMÁ.**

### A MIS HERMANOS

Gracias a **MIS HERMANOS OMAR y ALEJANDRO**, por brindarme el apoyo cuando lo necesite, y aun por seguirme apoyando. Por que se que siempre estaremos unidos y contare con ustedes. **LOS AMOS CHAMACOS.**

### A MIS SOBRINOS Y CUÑADAS

A mis niños ( **OMAR, ARIEL, IAN y JIMENA**) que Quiero Tanto, a **GLENDIA** por estar en mi familia y tener unos niños lindos, así como **ASTRA** y que además a sido una gran amiga, que siempre me hecha porras para seguir adelante. **LOS QUIERO MUCHÍSIMO.**

*ESTE TRIUNFO LO HAGO MÍO Y DE TODA MI FAMILIA.*

## AGRADECIMIENTOS

Muchísimas Gracias a ti Amor Mío (**Oscar Gabriel Sánchez Manríquez**) por estar conmigo, por compartirme tu vida y tu espacio, así como brindarme tu gran y muy valioso apoyo, para salir adelante y no rendirme tan fácil en esta meta propuesta, seguir forjando metas futuras, sobre todo por estar conmigo en todo en este tiempo, y ayudarme a encontrar solución cuando los problemas se agravan, simplemente gracias por ser como eres. TE AMO MUCHO.

Gracias a mis amigos y amigas de la FES-C por hacer la estancia en ella más amena.

Gracias a mis queridos amigos: **María Luisa, Aureola, Adrián**, por compartir momentos de su vida conmigo y apoyarme siempre que lo necesito.

Gracias **Aury** por ser como eres, sensible, sincera, tierna, y organizada.

Gracias **Mari** por todo el tiempo compartido, ha claro también por todas las borracheras que te tuve que soportar.

Gracias **Adrián** por tu ayuda en este trabajo, y por ser mi amigo, por que aunque lo dudes te considero un gran amigo.

Gracias a los **Tres** por todo su apoyo y ayuda que me han brindado, saben lo mejor del caso es que siempre seremos amigos y estaremos unidos los Quiero Mucho.

Por su puesto no podían faltar ustedes, que dijeron ya se me olvidaron pues no:

**Karla** por no ser normal, **Carmen** por los juegos de básquet bool, **Selindios** por las parrandas, **Mario** por platicar nuestras penas, **Viquez** por los semestres que estuvimos juntos y las parrandas **Netis** por las chelas y por los juegos de cartas, **Misa** por el baile y las vueltas dobles, **Eva** por todos los cumpleaños compartidos y por el marido tan inquieto, **Mari Chuchis** por sido una amiga singular, a todos ustedes gracias por hacerme pasar momentos felices e inolvidables que nunca en mi vida olvidare.

A ti **Luis Abel**, gracias por ser alguien especial en mi vida y estar cuando siempre que te necesito y apoyarme en momentos difíciles.

A mi queridísima prima **Ceci**, ahora Comadre, por compartir momentos tan especiales a lo largo de mi vida, y echarme porras, recuerda que siempre estaremos unidas, Te Quiero Mucho.

Gracias a mis asesoras **Dra. Norma Velásquez Guadarrama** y la **Dra. Sandra Díaz-Barriga Arceo** por dedicarme su tiempo, dedicación, paciencia y sus enseñanzas, para realizar este trabajo y por su puesto por su apoyo incondicional.

Gracias a todas las personas de Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México "Federico Gómez", por hacer una estancia agradable para realizar este trabajo, en especial a la Bióloga **Leti**, por su tiempo, esfuerzo, dedicación y enseñanzas, para que este trabajo saliera bien. Al personal del bióterio de esta misma institución, para facilitarme los animales con los que se trabajó a lo largo de este proyecto.

Al **Dr. Valencia** del Hospital Infantil "Federico Gómez", por valiosa colaboración en los estudios de patología.

Gracias a mis **Sinodales: Leticia Zuñiga, Sandra Díaz-Barriga, Guadalupe Avilés, Jonathan Paredes y Jazmín Flores**, por compartir su valioso tiempo, para revisar mi tesis y compartir su muy acertado punto de vista para mejorar este trabajo, así como tomarse la molestia de evaluar mi examen profesional.

*La vida es una falacia, en la que todo esta en tu mente, y tu eres el único que puede hacer que tus sueños sean tangibles.*

*Ser, no es lo mismo que estar, y estar no es lo mismo que ser. Pero querer y poder es lo mismo que lograr.*

**RRG.**

## ÍNDICE

Índice de figuras .....	1
Índice de cuadros .....	3
Abreviaturas.....	5
Resumen .....	6
Introducción.....	8
1.1.2 Generalidades .....	8
1.1.3 Características morfológicas de <i>Helicobacter pylori</i> .....	8
1.1.4 Características Bioquímicas <i>Helicobacter pylori</i> .....	9
1.1.5 Genoma bacteriano <i>Helicobacter pylori</i> .....	10
1.1.6 Metabolismo.....	11
1.1.7 Epidemiología.....	11
1.1.8 Diagnóstico.....	12
1.1.9 Tratamiento.....	13
1.2 Amoxicilina.....	15
1.2.1 Clasificación del fármaco.....	15
1.2.2 Mecanismo de acción .....	16
1.2.3 Mecanismos de resistencia dada por <i>Helicobacter pylori</i> .....	16
1.3 Claritromicina.....	17
1.3.1 Clasificación del fármaco.....	17
1.3.2. Mecanismo de acción .....	18
1.3.3 Mecanismos de resistencia dada por <i>Helicobacter pylori</i> .....	18
1.4 Metronidazol.....	19
1.4.1 Clasificación del fármaco.....	19
1.4.2 Mecanismo de acción.....	20
1.4.3 Mecanismos de resistencia dada por <i>Helicobacter pylori</i> .....	20

1.5	Carbamatos.....	22
1.5.1	Generalidades.....	22
1.5.2	Aplicaciones.....	23
1.5.3	Mecanismo de acción en humanos.....	24
1.5.4	Farmacocinética.....	25
1.5.5	Toxicidad.....	25
1.6	Compuesto LQM996.....	27
1.6.1	Síntesis .....	27
1.6.2	Pruebas biológicas.....	28
1.6.3	Pruebas toxicológicas.....	29
1.6.4	Pruebas de actividad antimicrobiana.....	29
1.7	Jerbos de Mongolia ( <i>Meriones unguiculatus</i> ).....	30
1.7.1	Generalidades.....	30
1.7.2	Los jerbos en la investigación.....	33
1.7.3	Modelo animal para la evaluación de nuevos fármacos.....	34
2	Justificación.....	36
3	Hipótesis .....	37
4	Objetivos.....	37
4.1	Objetivo General.....	37
4.2	Objetivos Particulares.....	37
5	Material.....	38
5.1	Biológico.....	38
5.2	Reactivos.....	38
5.3	Medios de Cultivo.....	38

6	Métodos.....	39
6.1	Determinación de la Dosis Letal Media.....	39
6.1.1	Primera Etapa.....	39
6.1.2	Segunda Etapa.....	40
6.2	Actividad Bacteriostática y Bactericida en Suero de jerbos Previa Inoculación de los Antibióticos.....	41
6.2.1	Preparación de Animales.....	41
6.2.2	Montaje.....	41
6.2.3	Diluciones.....	42
6.2.4	Preparación de Inóculo.....	42
6.2.5	Incubación.....	43
6.2.6	Leer y Anotar Títulos.....	44
6.2.7	Sembrar los Títulos Bactericidas.....	45
6.2.8	Determinación del Punto Bactericida Final.....	45
6.2.9	Resultados.....	45
6.3	Cinética de Muerte.....	46
6.3.1	Preparación del Microorganismo.....	46
6.3.2	Preparación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).....	46
6.3.3	Realización de Diluciones Seriadas.....	47
6.4	Evaluación de la Actividad Antibiótica del Compuesto LQM996 en <i>Meriones unguiculatus</i> .....	48
6.4.1	Inducción de la Infección en Jerbos de Mongolia.....	48
6.4.2	Administración de Tratamientos.....	48
6.4.3	Sacrificio y Procesamiento de Órganos de Animales.....	49
6.4.4	Análisis Microscópico.....	49

7. Resultados.....	50
8. Discusión.....	59
9. Conclusiones.....	68
10. Bibliografía.....	70

## I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Helicobacter pylori</i> amplificada por computadora 10,000X, que muestra la forma encorvada y flagelar de la bacteria que le permite impulsarse en la mucosa gástrica.....	9
Figura 2. Estructura química del Metronidazol.....	18
Figura 3. Estructura básica de los carbamatos.....	21
Figura 4. Intoxicación por insecticidas.....	25
Figura 5. Reacción general de la síntesis de los 4-R-fenilcarbamatos de etilo.....	28
Figura 6. Jerbo de Mongolia.....	31
Figura 7. Jerbos de Mongolia recién nacidos.....	33
Figura 8. Realización Diluciones.....	42
Figura 9. Preparación del inóculo.....	42
Figura 10. Sembrado en tres direcciones.....	47
Figura 11. Microgranuloma visto a 40X, hígado de jerbo. Tinción H-E.....	58
Figura 12. Esteatosis, que se observan en forma de vacuolas blancas, vistas a 10X en hígado de jerbo. Tinción H-E.....	58

Figura 13. Células Kupffer, se observan como pequeños puntos rojos, a 40X	
Tinción H-E.....	58
Figura 14. Células de Ito, se observan puntos rojos amarillentos, a 40X	
Tinción H-E.....	58
Figura 15. Se observa un conglomerado de células rojas, se le denomina Congestión, a 40X	
Tinción H-E.....	58
Figura 16. Se observa un color amarillo verdoso, al cual se le denomina pigmento, a 40X	
Tinción H-E.....	58

## II. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Sensibilidad y especificidad de pruebas diagnósticas para el diagnóstico de <i>Helicobacter pylori</i> .....	13
Cuadro 2. Esquemas de tratamiento de siete días contra la infección de <i>H. pylori</i> , más utilizados.....	14
Cuadro 3. Uso de Carbámato en diferentes áreas.....	22
Cuadro 4. Clasificación tóxica de las sustancias de acuerdo con el índice toxicológico con base en la dosis letal cincuenta (DL50) en roedores.....	26
Cuadro 5. Insecticidas Organofosforados.....	27
Cuadro 6. Insecticidas Carbámato.....	27
Cuadro 7. Propiedades del compuesto LQM996.....	28
Cuadro 8. Dosis que se administran en la primera etapa del método de Dietrich Lorke.....	39
Cuadro 9. Dosis que se deben administrar a los jerbos (segunda etapa del método), para la determinación de la DL <sub>50</sub> dependiendo del número de animales vivos y muertos (primera etapa del método). Lorke 1983.....	40
Cuadro 10. Conteo organismos probados.....	45
Cuadro 11. Determinación del Punto Final Bactericida.....	46
Cuadro 12. Administración de tratamientos en jerbos de Mongolia.....	49

Cuadro 13. Administración de la 3 dosis, de la primera etapa del método.....	51
Cuadro14. Registro de mortalidad de los animales .....	51
Cuadro15. Determinación de la Dosis de la segunda etapa del método para determinar la DL <sub>50</sub> . .....	52
Cuadro 16. Registro de dosis vs estados de los animales para determinar la DL <sub>50</sub> .....	52
Cuadro 17. Relación de los títulos bacteriostáticos y bactericidas del LQM996 versus Amoxicilina y Metronidazol en suero de <i>Meriones unguiculatus</i> .....	54
Cuadro 18. Valores de la concentración inhibitoria realizada por el método de dilución en Agar según la NCCLS (ahora CLSI).....	54
Cuadro 19. Cinética de muerte de <i>Helicobacter pylori</i> a diferentes concentraciones del compuesto LQM996 .....	55
Cuadro 20. Grado de infección de los Jerbos frente a tratamientos administrados.....	56
Cuadro 21. Patologías en Hígado para determinar la toxicidad del compuesto LQM996 y los tratamiento recomendados.....	57

## I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. *Helicobacter pylori* amplificada por computadora 10,000X, que muestra la forma encorvada y flagelar de la bacteria que le permite impulsarse en la mucosa gástrica

Figura 2. Estructura química del Metronidazol

Figura 3. Estructura básica de los carbamatos

Figura 4. Intoxicación por insecticidas

Figura 5. Reacción general de la síntesis de los 4-R-fenilcarbamatos de etilo

Figura 6. Jerbo de Mongolia

Figura 7. Jerbos de Mongolia recién nacidos

Figura 8. Realización Diluciones

Figura 9. Preparación del inóculo.

Figura 10. Sembrado masivo

Figura 11. Microgranuloma, visto a 40X en hígado de jerbo.

Figura 12. Esteatosis, se observan cúmulos de grasa en forma de vacuolas blancas, vistas a 10X en hígado de jerbo.

Figura 13. Células Kupffer, se observan como pequeños puntos rojos, a 40X

Figura 14. Células de Ito, se observan puntos rojos amarillentos, a 40X.

Figura 15. Se observa un conglomerado de células rojas, se le denomina congestión, a 40X.

Figura 16. Se observa un color amarillo verdoso, esto se debe al pigmento presente en el hígado del jerbo, a 40X.

## II. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Sensibilidad y especificidad de pruebas diagnósticas para *Helicobacter pylori*.

Cuadro 2. Esquemas de tratamiento de siete días más empleados, contra la infección de *H. pylori*,

Cuadro 3. Uso de Carbamatos en diferentes áreas.

Cuadro 4. Clasificación tóxica de las sustancias de acuerdo con el índice toxicológico de la dosis letal cincuenta (DL<sub>50</sub>) en roedores.

Cuadro 5. Insecticidas Organofosforados

Cuadro 6. Insecticidas Carbamatos

Cuadro 7. Propiedades del compuesto LQM996

Cuadro 8. Dosis que se administran en la primera etapa del método de Dietrich Lorke

Cuadro 9. Dosis que se deben administrar para la segunda etapa del método para la determinación de la DL<sub>50</sub>.

Cuadro10. Administración de tratamientos en jerbos de Mongolia

Cuadro 11. Administración de la 3 dosis, de la primera etapa del método

Cuadro 12. Determinación del Punto Final Bactericida

Cuadro13. Determinación de la Dosis de la segunda etapa del método

Cuadro14. Registro de dosis vs. estado de los animales para determinar la DL<sub>50</sub>.

Cuadro 15. Relación de los títulos bacteriostáticos y bactericidas del LQM996 vs. Amoxicilina y Metronidazol en suero de *Meriones unguiculatus*

Cuadro16. Conteo organismos probados

Cuadro 17. Determinación del Punto Final Bactericida

Cuadro 18. Valores de la concentración inhibitoria realizada por el método de dilución en Agar según la CLSI (antes NCCLS)

Cuadro 19. Logaritmo del número de colonias a diferentes tiempos

Cuadro 20. Grado de infección de los Jerbos frente a los tratamientos administrados

Cuadro 21. Patologías en Hígado para determinar la toxicidad del compuesto LQM996 vs. los tratamiento recomendados.

### III. ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARNr	Ácido Ribonucleico Ribosomal
NaCl	Cloruro de Sodio
CI M	Concentración Mínima Inhibitoria
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DL <sub>50</sub>	Dosis Letal Cincuenta
IBP	Inhibidor de la Bomba de Protones
IOP	Insecticidas Organofosforados
ICH	Intercambio de Cromátidas Hermanas
MTZ	Metronidazol
MN	Micronúcleos
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrógeno
PMN	Polimorfonucleares
PBP	Proteína Enlazadora de Penicilina
PAU	Prueba de Aliento de la Ureasa
TIBS	Títulos Inhibitorios y Bactericidas en suero
TIS	Títulos Inhibitorios en Suero
SNC	Sistema Nervioso Central
SFB	Suero Fetal Bovino
UFC	Unidad Formadora de Colonia
V.O.	Vía Oral
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
CLSI	Clinical Laboratory Testing and <i>in vitro</i> Diagnostic Test Systems

#### IV. RESUMEN

##### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DEL COMPUESTO LQM996 EN *Meriones Unguiculatus* INFECTADOS CON *Helicobacter pylori*

En los últimas décadas la preocupación por encontrar mejores fármacos y terapias, para combatir los daños causados por *Helicobacter pylori*, ha establecido la necesidad de evaluar un nuevo compuesto químico, derivado del ácido carbámico. El LQM996 ha mostrado en estudios previos actividad antiparasitaria y en este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana, específicamente contra *H. pylori*, determinando el efecto hepatotóxico e histológico del compuesto sobre la infección, incluyendo el efecto de las terapias combinadas del fármaco en estudio y los antibióticos de uso frecuente para la infección (tratamiento combinado de dos antibióticos: amoxicilina + metronidazol y claritromicina + metronidazol). El empleo de fármacos como el Metronidazol ha dejado de ser práctico, en estos días, debido al incremento en la resistencia que del microorganismo a dicho compuesto, esto ha llevado a desarrollar nuevas sustancias químicas para poder sustituirlo y desarrollar modelos animales que puedan evaluar su efecto antibacteriana y citotóxico. El Jerbo de Mongolia (*Meriones Unguiculatus*), desarrolla la infección semejante a los humanos permitiendo la evaluación del fármaco en estudio.

Se emplearon Jerbos de Mongolia, los cuales fueron inoculados con la cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 43504, el tratamiento inició 18 meses post-infección, los animales se dividieron en 7 grupos (control negativo, metronidazol (MTZ), LQM996, MTZ+Amoxicilina, MTZ+Claritromicina, LQM996+Amoxicilina y LQM+Claritromicina). Para cada antibiótico se emplearon las dosis recomendadas para los pacientes pediátricos en mg/kg. Se determinó la LD<sub>50</sub> del LQM996 en jerbo sin infectar y a partir de ella se empleó 90 y 180 mg/kg de peso de LQM996 para evaluar la actividad bactericida y bacteriostática del compuesto *ex vivo*. Se realizó la cinética de muerte de *H. pylori* frente al compuesto y la concentración inhibitoria mínima (CIM) del compuesto a 19 cepas de *H. pylori* aislados de pacientes pediátricos y finalmente se evaluó la histología y hepatotoxicidad del compuesto en jerbos previamente infectados con *H. pylori*.

La LD<sub>50</sub> fue de 288.53 mg/Kg de peso, se emplearon 90 y 180 mg/kg de peso de LQM996 para evaluar la actividad bactericida y bacteriostática, utilizándose estas dosis de la determinación de una tercera parte de la DL<sub>50</sub>. La dosis de 180 mg/kg se interpretó como adecuada para ambos parámetros, no así la dosis menor. La CIM de LQM996 para las 19 cepas y ATCC 43504 de *H. pylori* fue de 16 µg/ mL y su cinética de muerte mostró que a una concentración de 64µg/ml y a un tiempo de 48 horas, el compuesto LQM996 ejerce una actividad bactericida.

Los estudios histopatológicos mostraron un estado de infección moderado en el estómago de los jerbos y hepatotoxicidad; de los tratamientos la combinación del compuesto LQM996 y Claritromicina fue la terapia que mayormente logró eliminar la infección por *H. pylori*. En el hígado la Claritromicina más Metronidazol representó el tratamiento de mayor toxicidad y menor el de Claritromicina más LQM996.

## 1.1. INTRODUCCIÓN

### 1.1.1. GENERALIDADES

Durante muchos años la úlcera gastroduodenal se vio vista fundamentalmente como una enfermedad psicosomática del ácido clorhídrico (HCl) como el principal responsable. En 1959 Fitzgerald relaciona la patología gástrica con una actividad ureásica debida a contaminación bacteriana, pero fue hasta 1983 que Marshall y Warren, describen una bacteria Gram negativa como agente causal de los trastornos gástricos. La bacteria sólo había sido considerada como huésped del estómago, sin ninguna relación con la enfermedad ácido péptica. Fue aislada por primera vez del medio de cultivo Agar Chocolate bajo condiciones microaerofílica. Inicialmente se le identificó como *Compylobacter pyliridis/pylori* y en 1989 Goodwin crea el género *Helicobacter* basándose en la secuencia de bases de la molécula 16S del ácido ribosomal (RNA<sub>r</sub>) y desde entonces se han aislado al menos otras 19 especies que infectan al hombre y animales (Guerrero 2000).

### 1.1.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Helicobacter pilory*

Es un bacilo Gram (-) curvo (0.5-1 x 2.5-4 $\mu$ ), en forma de espiral posee de 1-8 (4-6) flagelos unipolares envainados con aspecto de coma o S, ocasionalmente adopta formas cocoides, las cuales pueden considerarse como formas de su estado latente que le permite mantenerse viable en un medio muy adverso. Es un microorganismo de crecimiento lento, toma de 3-7 días para poder apreciar las colonias en medios de cultivos sólidos y su crecimiento en el laboratorio se requiere de condiciones de microaerofilia (10% de CO<sub>2</sub>, 5% de Oxígeno y 85% de Nitrógeno) y medios artificiales ricos en nutrimento como: peptona, triptona, extracto de levadura, glucosa, y sales como NaCl, bisulfito de sodio, suplementados con sangre de caballo, polienriquecimiento, suero fetal bovino (SFB) o ambos. Morfológicamente se identifica en el Agar como colonias pequeñas translúcidas y relucientes con una elevación convexa, un borde entero y una zona de hemólisis  $\beta$  (Guerrero 2002).

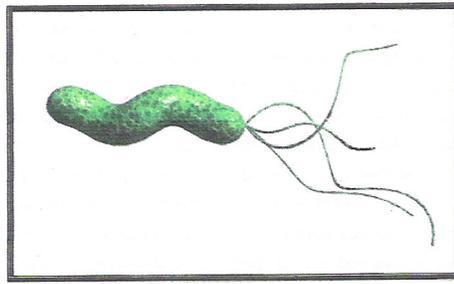


Fig. 1. *H. pylori* amplificada por computadora 10,000X, que muestra la forma encorvada y flagelar de la bacteria que le permite impulsarse en la mucosa gástrica (tomada de : Research Laboratory website: [www.hpylori.com.au](http://www.hpylori.com.au))

### 1.1.3. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE *Helicobacter pylori*

**Ureasa.** Una de las propiedades que contribuyen a la patogenicidad de *H. pylori* es la actividad de la ureasa. Esto le permite sobrevivir en el medio ácido del estómago, el amonio producido forma una capa protectora que rodea al microorganismo y neutraliza la acidez del jugo gástrico y su efecto bactericida permitiéndole a *H. pylori* poder llegar más fácilmente a la parte inferior de la capa mucoide. El amonio producido también es capaz de causar efectos tóxicos a las células de la mucosa cercana a donde *H. pylori* se implanta. Esto provoca que las microvellosidades se destruyan y por consiguiente el impedimento de la producción y secreción de moco (Piña 1994).

**Catalasa.** La catalasa de *H. pylori* le confiere un importante mecanismo de protección contra efectos dañinos del  $H_2O_2$  endógeno producido durante el proceso inflamatorio del tejido a causa de la infección y como una respuesta local, predominando leucocitos PMN. La capacidad rápida descomposición del  $H_2O_2$  puede ser su gran ventaja para colonizar la mucosa gastroduodenal y protegerse de la respuesta primaria de las células epiteliales del estómago humano al inducir la inflamación y la infiltración de linfocitos y PMN que realiza  $H_2O_2$  como parte de su respuesta inflamatoria (Piña, 1994).

**Citotoxina.** Esta fue detectada para por su habilidad para inducir vacuolaciones en los cultivos celulares. Esta toxina produce efectos citopáticos en algunas líneas celulares, dicha toxina se caracteriza por formar vacuolas ácidas en el citoplasma de células eucariotas (Romo, 2000).

**Proteasa.** Provoca efectos adversos en el moco de las células gástricas al causar disminución de la cantidad y la viscosidad. Esta proteasa al disminuir la viscosidad le permite al microorganismo desplazarse más rápido hacia las intersecciones celulares por debajo de la capa del moco, por lo que es un factor importante de patogenicidad (Piña, 1994).

#### 1.1.4. GENOMA BACTERIANO DE *Helicobacter pylori*

El genoma de *H. pylori* está constituido por un solo cromosoma circular de 1.6-1.7 Mb. El 40% de los aislados tienen plásmidos de 1.5-23.1 Kb, los cuales a la fecha no han sido reconocidos como factores de virulencia, dentro del genoma existen 3 copias de los genes 16s y 23s RNA<sub>r</sub>. (Reyes, 2000).

**EL gen cag A** (citotoxina Associated Gene A). Solo el 60% de las cepas de *H. pylori* poseen este gen que codifica para una proteína inmunogénica de 120-128 Kda de función desconocida llamada Cag A (Antígeno inmunodominante). La presencia de Cag se asocia a la úlcera péptica; se ha reportado que las cepas cag A<sup>+</sup> actúan como promotoras en la inducción de citocinas principalmente la IL-8 en las células del epitelio gástrico. (Reyes, 2000).

**Citotoxina Vacuolizante (Vac A).** Todas las cepas de *H. pylori* tienen el gen vac A y solo el 50-60% expresan Vac A (citotoxina de 87 Kda), el gen vac A (3.9 Kb) tiene regiones conservadas y no conservadas formando un mosaico genético, que incluyen 2 regiones: Región “s” (codifica para la secuencia señal) con 3 tipos alélicos (sla, slb, s2) y la región “m” (codifica para la región media) con 2 tipos alélicos (ml, m2); las cepas son más citotóxicas y causan mayor grado de inflamación gástrica y las s2 no son citotóxicas Vac A es capaz de inducir la formación de vacuolas ácidas en el citoplasma de células eucarióticas. (Reyes, 2000).

**Gen pic B o cag E** (promote the induction of Cytokines). Hay cepas cag A que inducen la producción de IL-8, debido a la presencia de otros genes como picB (codifica para una proteína de 101 Kda), es un gen que actúa como promotor de la respuesta inflamatoria aumentando la producción de IL-8 en epitelio gástrico. (Reyes, 2000).

**Gen ice A** (Induced Contact with Epithelium). Es un nuevo gen asociado a virulencia, no se encuentra dentro de cag PAI; se activa la bacteria hace contacto con las células de la mucosa gástrica. Presenta 2 álelos llamados A1 y A2; la presencia de ice A1 esta fuertemente asociado a pacientes con úlcera péptica y al incremento en la concentración de IL-8 en la mucosa gástrica. (Reyes, 2000).

#### 1.1.5. METABOLISMO

*H. pylori* utiliza como única fuente de energía a la glucosa, es capaz de metabolizar aminoácidos por vía fermentativa (serina, alanina, asparatato, prolina) y usar varios sustratos como fuente de nitrógeno (urea, amonio, serina, glutamina). Las proteínas de membrana externa más importantes y abundantes son la ureasa y la proteína de choque térmico B (Hsp). (Reyes, 2000).

#### 1.1.6. EPIDEMIOLOGÍA

Las naciones en desarrollo registran un crecimiento en la incidencia de problemas ocasionados por la bacteria *Helicobacter pylori*, la principal causa de contagio son malos hábitos higiénicos como no lavarse las manos y el consumo de alimentos contaminados con heces. El microorganismo puede vivir en forma latente alojándose en ambientes húmedos como en el sarro de los dientes y transmitirse a otra persona incluso por un beso, así como sobrevivir a los ácidos estomacales. ([www.Issste.gob.mx/website/comunicados/boletines/2006/febrero/b031\\_2006.html](http://www.Issste.gob.mx/website/comunicados/boletines/2006/febrero/b031_2006.html)).

Los estudios han mostrado que la infección por *H. pylori* ocurre en la población mundial; sin embargo, su incidencia entre países desarrollados y en vías de desarrollo es significativamente diferente mostrando en los primeros de 0.5-1 % su presencia en niños menores de 10 años y en los segundos 80% en niños de la misma edad. (Reyes, 2000).

La enfermedad ácido péptica es por definición crónica persistente. Un 95-100% de los casos de úlcera duodenal está asociada a *H. pylori*. En México se ha detectado en el 95% de los casos. Asimismo, el carcinoma gástrico ocupa el segundo lugar como causa de muerte en pacientes que fallecen con cáncer. En el bienio 1993-1994 se registraron 2,343 casos ocupando el quinto lugar por frecuencia, tercero en hombres y sexto en mujeres. Se estima que la tasa de mortalidad es de  $5.5 \times 10^5$  (Reyes, 2000).

### 1.1.7. DIAGNÓSTICO

**Directa o Invasor:** incluyen la realización de una endoscopia al paciente en el cual las biopsias son tomadas de sitios múltiples en el esófago, estómago y duodeno. A estas se les realiza la prueba de ureasa a demás de histología para analizar a través del microscopio con ayuda de tinciones como hematoxilina-eosina o giemsa (Guerrero, 2002).

**Cultivo.** Es considerado como el “estándar de oro” para el diagnóstico de la infección. Permite determinar la susceptibilidad antimicrobiana y la obtención de cepas para su caracterización genética; se pueden obtener resultados falsos negativos por tomar biopsias de sitios no colonizados o por el transporte inadecuado de la muestra antes del cultivo. (Guerrero, 2002).

**Prueba rápida de la ureasa.** Es un método de detección indirecta, se basa en la actividad de la ureasa producida por *H. pylori* en estómago la cual degrada a la urea en amonio y CO<sub>2</sub>.

Es una prueba rápida pero se requiere de endoscopia además de un gran número de bacterias.

**Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).** Se basa en el análisis de una secuencia específica de ADN del genoma de *H. pylori*. Es una prueba rápida, sensible y específica para la detección de *H. pylori*.

### MÉTODOS NO INVASOR

**Serología.** (ELISA) se basa en la detección de anticuerpos específicos contra *H. pylori*. Cuando *H. pylori* infecta la mucosa gástrica se desarrolla una respuesta inmune local aumentando los niveles de IgM e IgA en suero y de IgA secretores en estómago, después se crea una respuesta IgG de memoria. Esta prueba es relativamente rápida, fácil de realizar, aunque no se puede diferenciar entre una infección activa y una infección pasiva (Reyes, 2000).

**Prueba de Aliento de la Ureasa (PAU).** Se basa en la presencia de grandes cantidades de ureasa producida por *H. pylori*, Sé monitoreo la liberación de CO<sub>2</sub> marcado durante la espiración como resultado de la degradación de la urea marcada (con C<sup>13</sup> y C<sup>14</sup>). Es una prueba rápida, sensible, permite medir la actividad de la ureasa en todo el estómago (Reyes, 2000).

**Ensayo Inmunoenzimático para Detección de Antígeno en Heces (EIA).** Es un método nuevo para detectar *H. pylori*. Se basa en la detección directa de antígenos de *H. pylori* en heces de pacientes particularmente niños con infección activa. Es un método simple, no requiere personal especializado ni equipo sofisticado y es altamente sensible y específico (Reyes2000).

Cuadro 1. Sensibilidad y especificidad de pruebas diagnósticas para el diagnostico de *Helicobacter pylori*. (Reyes, 2000).

PRUEBA	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
Histología	93-98 %	95-98%
Cultivo	77-95%	100%
Prueba Rápida de la Ureasa (CLO-test)	89-98%	93-98%
Prueba de Aliento de la Ureasa (PAU)	90-95%	90-95%
Serología	88-95%	86-95%
PCR	85-96%	90-100%

#### 1.1.8. TRATAMIENTO

El tratamiento para la erradicación de *H. pylori* fue desarrollado por Boroy en 1989, en donde se incluyen medicamentos como el Bismuto, Metronidazol y Tetraciclinas. *H. pylori* desarrolla rápida resistencia a Metronidazol y Claritromicina, la cual es mediada a nivel cromosomal y no por plásmidos. Se recomienda el uso de terapias múltiples. La resistencia a los antibióticos en países desarrollados es del 11-70% y en países en vías de desarrollo es mayor del 95%. (Reyes, 2000)

Para el tratamiento de la infección por *H. pylori* se han utilizado 3 tipos de terapias:

1. Terapia Dual: Un Antibiótico + Un Inhibidores de Bomba de Protones (IBP). Tiene buenos resultados pero se causa resistencia por las bajas dosis de antibióticos.
2. Terapia Triple. 2 Antibióticos + 2 IBP. Es la terapia más recomendada. Puede llegar a alcanzar una erradicación del 95%.
3. Terapia Cuádruple: 2 antibióticos en dosis elevadas + 2 IBP.

Cuadro 2. Esquemas de tratamiento de siete días contra la infección de *H. pylori*, más utilizados. Tomada de Pylopac, Medey Mex. (2001).

ESQUEMA DE TRAMIENTO	DOSIS
Inhibidor de la bomba de protones + Claritromicina + Amoxicilina	Dosis estándar 500 mg 1000 mg
Inhibidor de la bomba de protones + Claritromicina + Metronidazol	Dosis estándar 500 mg 400 mg
Ranitidina con citrato de bismuto + Claritromicina + Amoxicilina	400 mg 500 mg 1000 mg
Ranitidina con citrato de bismuto + Claritrimicina + Metronidazol	400 mg 500mg 400 mg

Para nuestro estudio se utilizó Metronidazol como testigo positivo, este medicamento es un agente antiparasitario y antibacteriano sintético cuyo nombre sistemático es el 1-(β-hidroxietil) -2-metil-5-5-nitroimidazol. (Márquez 2002), así como Claritromicina y Amoxicilina, estos dos últimos son antibióticos de espectro medio y amplio respectivamente.

## 1.2. AMOXACILINA

### 1.2.1. CLASIFICACIÓN DEL FÁRMACO

La Amoxicilina es una penicilina semisintética, de amplio espectro. (Luna, 1998).

### 1.2.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE AMOXACILINA

La penicilina actúa inhibiendo la biosíntesis del mucopéptido de la pared celular bacteriana, esta tiene una acción bactericida, debido a que inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana durante la fase de crecimiento, mediante la inhibición competitiva de transpeptidasas. (Luna, 1998).

### 1.2.2. FARMACOCINÉTICA DE AMOXACILINA

Aproximadamente el 20% de la Amoxicilina circulante está ligada a proteínas plasmáticas como otras penicilinas; la Amoxicilina se distribuye en primer término en el líquido extracelular. Altas concentraciones son encontradas en bilis y en orina.

Este antibiótico no llega al cerebro ni a líquido cefalorraquídeo a menos que se encuentren inflamadas las meninges.

En su proceso de eliminación la Amoxicilina se incorpora en el círculo entero-hemato-hepático, logrando muy altas concentraciones en bilis, donde se recupera el 6.6% de la dosis administrada.

La Amoxicilina se elimina por filtración glomerular, excretándose como antibiótico activo por la orina, después de la administración de una dosis por vía oral, se recupera en la orina de las primeras 6 horas del 70 al 74% de la dosis administrada, aproximadamente el 10% es metabolizado.

La fase de eliminación de vida media en pacientes con función renal normal es de aproximadamente una hora. La vida media es prolongada en pacientes con daño renal. (Goodman y Gilman, 1995).

Recientemente se ha comprobado su eficacia en asociación con Metronidazol y sales de bismuto para las úlceras pépticas o duodenales y gastritis crónicas, ocasionadas por *Helicobacter pylori* (Luna, 1998).

### 1.2.3. MECANISMO DE ACCIÓN Y RESISTENCIA A AMOXACILINA DADA POR *Helicobacter pylori*

La resistencia a Amoxicilina es extremadamente infrecuente y parece estar producida por modificaciones en las PBP (proteína enlazadora de penicilina). Las  $\beta$ -lactamasas: Corresponden a enzimas que hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico de estos antibióticos y los convierte en compuestos biológicamente inactivos. De acuerdo a la especificidad de las  $\beta$ -lactamasas (capacidad relativa de hidrolizar penicilinas o cefalosporinas) se clasifican en penicilinasas y cefalosporinasas (Tankovic et. al, 2000 ).

Modificación del sitio de acción: Los  $\beta$  lactámicos deben alcanzar sus puntos de fijación (PBP; proteína enlazadora de penicilina) que se encuentra en la cara externa de la membrana celular. Esto se consigue por difusión en las gram positivas y por paso a través de las porinas en las Gram negativas. Si el gen de esta proteína muta se da la resistencia (Cabrita, 2000).

La resistencia bacteriana a Amoxicilina, como ya se dijo anteriormente, es prácticamente inexistente (Parsons, 2000; Luna 1998). No obstante se han detectado cepas resistentes a Tetraciclina en Corea y Japón que tienen la característica de presentarla a múltiples drogas antibacterianas (Kwon, 2001).

### 1.3. CLARITROMICINA

#### 1.3.1. CLASIFICACIÓN DEL FÁRMACO

Es un antibiótico macrólido, de espectro medio que incluye bacterias aeróbicas y anaeróbicas, así como grampositivas y negativas. (Marais A. et. al, 1999)

#### 1.3.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE CLARITROMICINA

La subunidad ribosomal 50S bacteriana, actúa inhibiendo la síntesis de proteínas, ejerciendo así su acción bactericida (Goodman y Gilman, 1995).

#### 1.3.3. FARMACOCINÉTICA

La Claritromicina se elimina principalmente por el hígado y el riñón. Después de la dosificación de 250 mg V.O. cada 12 horas cerca del 20% se excreta por la orina, con 500 mg V.O. cada 12 horas la excreción urinaria es aproximadamente del 30%, sin embargo, la depuración renal de la Claritromicina es relativamente independiente de la dosis y se aproxima al índice de la filtración glomerular normal con la administración de 250 a 500 mg V.O. cada 12 horas; el metabolito 14-hidroxiado es el que más se encuentra en la orina (Goodman y Gilman, 1995).

La vida media de eliminación de la Claritromicina, cuando se administró una tableta de 250 mg o 500 mg V.O. cada 12 horas fue de 2.6 a 4.4 horas. Con dosis única de 250 mg de claritromicina, se encontró que la excreción urinaria fue de 37.9% y su eliminación por heces fue 40.2%(Goodman y Gilman, 1995).

La concentración plasmática de Claritromicina en el estado estable, en sujetos con insuficiencia hepática, no difiere de la encontrada en sujetos normales; la concentración plasmática del metabolito 14-OH-Clarithromicina es menor en los insuficientes hepáticos (Goodman y Gilman, 1995).

La disminución en la formación del metabolito 14-hidroxiado, es al menos parcialmente, compensada por un incremento en la aclaramiento renal de la claritromicina en los sujetos con insuficiencia hepática, respecto de los sujetos sanos; no es necesario

ajustar la dosificación en pacientes con daño hepático moderado o severo, siempre y cuando la función renal sea normal. Cualquier problema en el manejo de claritromicina se relaciona con la función renal y no con la edad (Goodman y Gilman, 1995).

La farmacocinética de Claritromicina también se altera proporcionalmente en sujetos con insuficiencia renal, son mayores los niveles plasmáticos y vida media para la Claritromicina y su metabolito 14-OH-claritromicina, por lo tanto, es conveniente reducir la dosis o prolongar el intervalo entre ambas (Goodman y Gilman, 1995).

No existen datos disponibles acerca de la penetración en el líquido cefalorraquídeo. La Claritromicina y su metabolito 14-hidroxilado se distribuye rápidamente hacia los líquidos y los tejidos corporales. Por su alta concentración intracelular, las concentraciones tisulares son por lo general varias veces mayores que las concentraciones plasmáticas, incluso en senos paranasales (Goodman y Gilman, 1995).

Estudios *in vitro* e *in vivo* y resultados clínicos preliminares indican que puede ser efectiva en mono o multiterapia para la erradicación del *H. pylori* (en presencia de supresión ácida), lo que disminuye la recurrencia de úlcera duodenal y en aquellas infecciones en donde el germen causal sea sensible a la claritromicina (Marais A. et. al, 1999).

### 1.3.3. MECANISMO DE ACCIÓN Y RESISTENCIA A CLARITROMICINA DADA POR *Helicobacater pylori*

La Claritromicina actúa en la región de la peptidiltransferasa por unión con la unidad ribosomal 50S, uno de cuyos componentes es el RNAr 23S, inhibiendo de tal manera la síntesis proteica. El mecanismo de la resistencia bacteriana es una mutación en la posición 2142 o 2143 del ARNr 23S, provocando una modificación de la estructura ribosómica que impide la unión al macrólido. (Stone et. al, 1996).

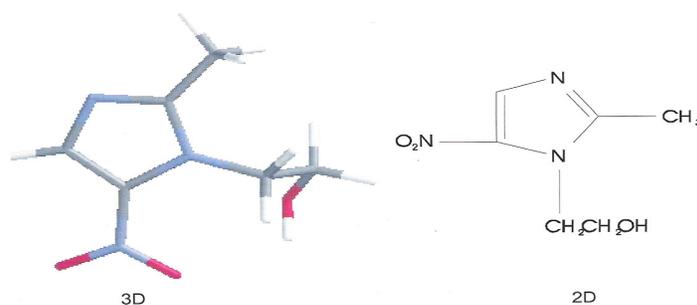
La resistencia bacteriana primaria a este antibiótico es variable geográficamente y es generalmente baja, aunque va en aumento debido a su empleo en infecciones extradigestivas. Esto sucede especialmente en niños menores de diez años. Se considera que la resistencia secundaria es alta ( Amendola, 2001; Hyde 1997).

Además, otros autores describen la existencia de un nuevo mecanismo de resistencia a Claritromicina en 7 aislamientos clínicos de *H. pylori*, en los que describen un cambio de timina a citosina en la posición 2717 del gen 23S ARNr que confiere resistencia de bajo nivel (1µg/ml). Además describen que esa mutación se puede detectar mediante la digestión con un enzima de restricción (*HhaI*).

Nuevos métodos de detección de resistencia que incluyen: nueva PCR *mis-matched*, utilización de PCR en tiempo real utilizando el LightCycler, o por Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) (Quiroz, 2001).

#### 1.4 METRONIDAZOL

Fig. 2. Estructura química del Metronidazol



##### 1.4.1. CLASIFICACIÓN DEL FÁRMACO

El metronidazol es un tricomonocida de primera elección. En 24 horas, a la concentración de 2.5µg/mL mata el 99% de *Tricomonas vaginalis* en cultivo. Es también amebicida en muy baja concentración. Desde el punto de vista farmacológico es inerte en animales ya que no afecta, aún a dosis elevadas, el aparato circulatorio ni el respiratorio (Goodman y Gilman, 1995).

##### 1.4.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE METRONIDAZOL

La acción selectiva del metronidazol contra bacterias anaerobias se debe a la reducción preferencial del grupo 5'-nitro del fármaco original por estos microorganismos, presumiblemente por un sistema análogo al de la ferredoxina. Un ambiente anaerobio se requiere para que se lleve a cabo la reducción. La vida corta activa, los productos intermedios formados, subsecuentemente interactúa con el ADN bacteriano y quizá con

otras macromoléculas. Aunque el mecanismo de acción preciso es desconocido, probablemente se produce una doble cadena de divisiones en el ADN. El metronidazol no es activado y, por lo tanto, falla para inhibir a la mayoría de los microorganismos aerobios y facultativos. Como otros fármacos, el metronidazol es consistentemente bactericida en bacterias anaeróbicas sensibles (Depuydt S, et. al. 2005).

#### 1.4.3 FARMACOCINÉTICA DE METRONIDAZOL

La disposición del metronidazol en el cuerpo es similar tras una administración oral o intravenosa, y su tiempo de vida media en el humano es de 8 horas. Se elimina de un 60 a 90% por vía urinaria y solo de un 6 a un 15% por las heces fecales. Los metabolitos que aparecen en la orina es resultado de una oxidación primaria de sus cadenas laterales que originan el 1-( $\beta$ -hidroxietil)-2-hidroxiometil-5-nitromidazol y el 2-metil-5-nitroimidazol-1-il-ácido acético. El metronidazol es el componente mayoritario que aparece en plasma el cual está unido a proteínas plasmáticas, aproximadamente en un 20%. Durante el tratamiento se excretan pequeñas cantidades del compuesto en la saliva y también en la leche de mujeres durante la lactancia (Guerrero, 2002).

A nivel mundial, el 50% de la población de 600 años padecen la enfermedad y es rara en los niños. En México, la prevalencia de la bacteria aumenta con la edad se presenta en un 20% en niños de 1 año y 50% en niños menores de 10 años alcanzando más del 70% positivos en personas de 20 años, lo que indica que en nuestro país la infección por el microorganismo se adquiere en edades tempranas (Guerrero 2002).

#### 1.4.3. MECANISMO DE ACCIÓN Y RESISTENCIA A METRONIDAZOL DADA POR *Helicobacter pylori*

El mecanismo de la resistencia a Metronidazol estaría relacionado con mutaciones en el gen *rdxA* y probablemente también en el gen *flav* (relacionado con la oxidoreductasa NAD(P)H-flavina) (Bilardi, 1999).

La resistencia bacteriana primaria a este fármaco se explica por:

- Uso generalizado del mismo para infecciones principalmente parasitarias.
- Notables variaciones geográficas
- Mayor en países subdesarrollados debido a su empleo en giardiasis y amebiasis

- Se observa más en la mujer por su indicación en infecciones ginecológicas
- Su frecuencia es mayor en menores de 60 años (Brusentsev, 2000).

Las tasas de erradicación bajan significativamente en pacientes que han presentado resistencia bacteriana al fármaco (Amendola, 2001).

Se cree que el fenómeno de resistencia bacterina a Metronidazol va en aumento (Taylor, 1997).

La detección de la proteína RdxA por inmunoblot, en los aislamientos clínicos que contengan esta proteína intacta (cepas sensibles a metronidazol y algunas resistentes por mecanismo diferente de la inactivación del RdxA) o no (cepas resistentes). Se realiza un análisis molecular del gen *rdxA* y se describen que con la excepción de mutaciones puntuales que generan una señal de terminación no existen otras mutaciones de nucleótidos particulares o sustituciones de aminoácidos que se asocien con la resistencia a Metronidazol (Huang J-Q, et. al,1999).

Observan que las alteraciones de las proteínas de membrana externa y del lipopolisacárido afecta a la resistencia a diferentes antimicrobianos y que esa resistencia puede ser transferida por transformación a partir del ADN de las cepas resistentes en cepas sensibles (Parsons, 2000).

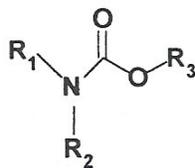
## 1.5. CARBAMATOS

### 1.5.1. GENERALIDADES

Los carbamatos eran utilizados principalmente como pesticidas y se sintetizan en forma pura como análogos de la fisostigmina, un alcaloide tóxico anticolinesterasa extraído de las semillas de la planta de fríjol Calabar, *Physostigma venenosu*. (Santillán, 1993).

El carbamato más simple es el ácido carbámico ( $R_1=R_2=R_3=H$ ). AL polimerizarse produce compuestos conocidos como poliuretanos, los cuales se han usado en diferentes área.

Fig. 3. Estructura básica de los carbamatos.



$R_1, R_2, R_3 = H, \text{ Alquilo, arilo}$

La mayor parte de los carbamatos se han obtenido por síntesis química, aunque algunos se han obtenido de fuentes naturales (como las bleomicinas se obtienen del actinomiceto *Streptomyces verticillus*). Los carbamatos se dividen en tres grupos:

1.N-metil carbamatos: uno de los hidrógenos del grupo amino es reemplazado por un grupo metilo (ejemplos: Aldicarb, Carbaryl, Carbofuran).

2. N,N, dimetil Carbamato: ambos hidrógenos del grupo amino son reemplazados por grupos metilos (ejemplos: Isolan, Pirolan).

3.N-fenil Carbamatos: un grupo fenilo sustituye a uno de los hidrógenos del grupo amino (Santillán, 1993).

### 1.5.2. APLICACIONES

La aplicación de los carbamatos está vinculado con diversas áreas, por ejemplo: Los pesticidas carbamatos se usan comúnmente porque son biodegradables en comparación con organoclorados y tienen una toxicidad dérmica más baja que los pesticidas organofosforados más comunes. Como insecticidas se usan en el control de insectos, resistentes a los compuestos organofosforados. (Najera 1995).

Cuadro 3. Uso de Carbamatos en diferentes áreas. Fote, 1984; Hasall, 1990; Santillán, 1993; Bernal 2000.

ÁREA	USOS
Medicina	Relajante muscular, hipnótico, sedante, ansiolítico, tranquilizante, anestésico local, anticonvulsionante, antiparkinsoniano, anticarcinogénico, antiulceroso, antimicrobiano, antihelmíntico, aparatos ortopédicos, injertos artificiales, hemoaglutinante, compuestos hemocompatibles, antitrombogénico, corazón artificial, protector de piel, sustituto de piel temporal, piel sintética.
Cosmética	Desodorizantes
Agrícola	Insecticida, herbicida, nematocida, rodenticida, funguicida.
Industria	Preservativo de pinturas, pintura para autos, accesorios para autos, cristales de seguridad, mezcla para bloque, pegamento para loseta vinílica, tuberías, salas, sillas, colchones, cuerdas, zapatos, telas, hilos
Navegación	Recubrimiento de barcos y submarinos, elementos de flotación, velero, boyas.
Investigación	Inhibidores de proteasas, colinesterasa y elastasa.

### 3. MECANISMO DE ACCIÓN DE CARBAMATOS EN HUMANOS

Los carbamatos tienen una alta afinidad por las esterasas, tales como la quimiotripsina, la acetilcolinesterasa, la pseudocolinesterasa, carboxilesterasa plasmáticas y hepáticas, paraoxonasas y otras esterasas no específicas dentro del cuerpo.

Cuando la acetilcolinesterasa es inhibida por un carbámato, ésta no puede hidrolizar la acetilcolina, de tal forma que su concentración permanece elevada dando lugar a la contracción, y generando una estimulación masiva de los receptores colinérgicos 1,5 y 11; los carbamatos forman un complejo inhibitorio reversible con la enzima acetilcolinesterasa (Fig. 4), posteriormente se remueve el grupo sustituyente (alquilo o arilo) y se forma la enzima carbamilada, que por ser inestable lleva rápidamente al segundo paso de la enzima libre y activa, la cual puede entonces participar en más reacciones con el sustrato natural o con más carbámato. En general, todas estas reacciones ocurren de manera muy rápida. La disociación carbámato- enzima ocurre dentro de 24 horas posteriores a su administración (Minero, 1997).

Los carbamatos reaccionan con la enzima de manera similar a la acetilcolina es decir inhiben competitivamente la actividad colinesterásica comportándose como sustancias anticolinesterásicas (permitiendo así que la acetilcolina siga ejerciendo su actividad). La enzima acetilcolinesterasa es la responsable de la destrucción y terminación de la actividad biológica del neurotransmisor acetilcolina, al estar esta enzima inhibida se acumula acetilcolina en el espacio sináptico alterando el funcionamiento normal del impulso nervioso. La acumulación de acetilcolina se produce en las uniones colinérgicas neuroefectoras (efectos muscarínicos), en las uniones mioneurales del esqueleto y los ganglios autónomos (efectos nicotínicos) así como en el sistema nervioso central. Seguidamente se muestra de qué manera los plaguicidas de tipo organofosforados y carbamatos actúan sobre el organismo humano (Santillán, 1993).

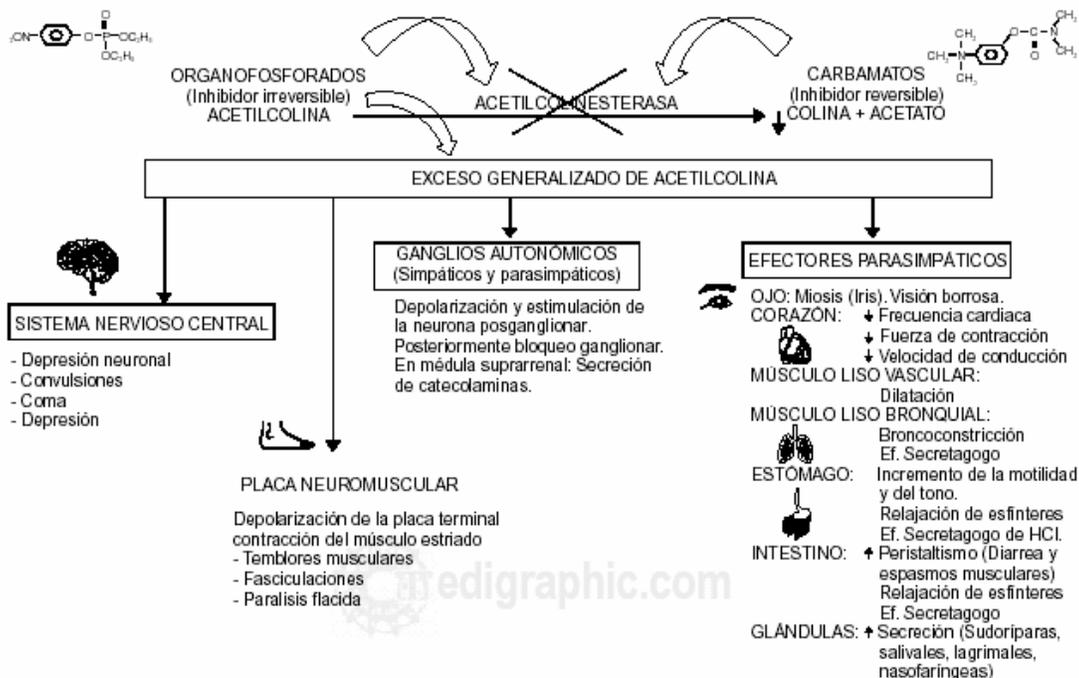


Fig. 4. Intoxicación por insecticidas (Campos-Sepúlveda, 2001).

#### 1.5.4. FARMACOCINÉTICA

- a. **Absorción:** Ingresan al organismo a través de la piel, conjuntiva, vía respiratoria y vía digestiva.
- b. **Biotransformación:** No se acumulan en el organismo; la biotransformación se realiza a través de tres mecanismos básicos: hidrólisis, oxidación y conjugación.
- c. **Eliminación:** La eliminación se hace principalmente por la orina, las heces y el aire expirado.

#### 1.5.5. TOXICIDAD

El paratión, sustancia del grupo de los insecticidas organofosforados (IOP) ampliamente utilizada en la agricultura que es muy poco tóxico y que requiere bioactivarse a paraoxón, a través de un proceso oxidativo de desulfuración, convirtiéndose en un producto sumamente tóxico que acorde con la clasificación toxicológica (Cuadro 4) le corresponde un índice de seis (sustancia supertóxica). Este grupo de sustancias que fueron desarrolladas inicialmente como insecticidas, dieron origen a la síntesis de potentes gases neurotóxicos como el somán, el sarín y el tabún que se emplearon como “armas químicas” durante la Segunda Guerra Mundial (Campos-Sepúlveda, 2001).

Índice toxicológico	Dosis letal probable por vía oral, en el humano Dosis (mg/kg)	Para una persona de 70 kg
6 Super tóxica	Menos de 5	Menos de 1 mL
5 Extremadamente tóxica	5 a 50	Entre 1 y 5 mL
4 Muy tóxica	50 a 500	Entre 5 y 30 mL
3 Moderadamente tóxica	500 a 5,000	Entre 30 y 480 mL
2 Poco tóxica	5,000 a 15,000	Entre 480 y 946 mL
1 Prácticamente no tóxica	Mayor a 15,000	Más de 946 mL

Cuadro 4. Clasificación tóxica de las sustancias de acuerdo con el índice toxicológico con base en la dosis letal cincuenta (DL<sub>50</sub>) en roedores (Campos-Sepúlveda, 2001).

Los estudios de toxicidad ocupacional por agroquímicos indican que los IOP son los agentes que inducen intoxicaciones con mayor frecuencia, siendo el paratión el agente causal del mayor número de casos. Los IOP comprenden diversas estructuras químicas que tienen en común la condensación de ésteres y tioésteres del ácido fosfórico, en este sentido, se han desarrollado numerosos congéneres con el propósito de aumentar su selectividad, de modificar sus características toxocinéticas o modificar su toxicidad inherente; sin embargo, todos ellos comparten el mecanismo de acción tóxica en que a través de un proceso de fosforilación inhiben selectivamente y de manera irreversible a la acetilcolinesterasa, enzima que en condiciones normales es acetilada por la acetilcolina endógena y ésta es hidrolizada en fracciones de segundo en colina y ácido acético (figura 4), tanto en los insectos como en los mamíferos; la fosforilación les confiere su utilidad como plaguicidas (Campos-Sepúlveda, 2001).

Nombre genérico	Otros nombres	DL <sub>50</sub> (mg/kg) oral	CT
Azimphos etil	Gusation etílico, cotnion etílico	18	5
Carbophenothion	Trithion	3.2	6
Coumaphos	Coral, asuntol, resistox	56 a 230	5
Chlorfenvinphos	Birlane	10 a 39	5
Chlorpirifos	Dursban, Iorsban	163	4
Demeton	Syxtox, mercaptophos	2.5 a 12	6
Dichlorvos	DDVP, Dichorphos	56 a 80	4
Dicrotophos	Bidrin, carbicon	22	5
Dimethoato	Rogor, Roxion, Fostion, Cygon	320 a 380	4
Folimat	Omethoate	50	4
Hostathion	HOE-2960, triazophos	82	5
Lepthophos	Phosvel	52.8	5
Malation	Cythion, Fyfanon, Iucation	1375	3
Methidathion	Supracid, ultracide	65	4
Metilparation	E-601, Folidol	9 a 25	5
Monocrotofos	Azodrin, Nuvacron	20	5
Nemacur	Bay-68138	8.1 a 9.6	5
Phenthoate	Cidial	300 a 400	4
Phosdrin	Mevinphos	3.7 a 12	6
Phosphamidon	Dimecron	20 a 22.4	5
Tamaron	Monitor, metamidophos, ortho 9006	18.9 a 21	5
Thimet	Phorato	2 a 4	6

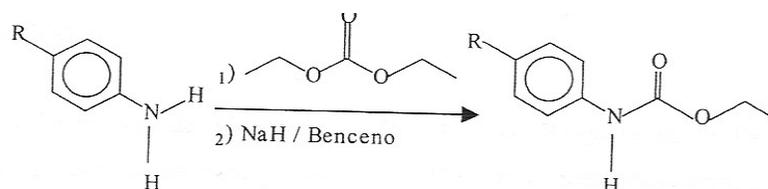
Cuadro 5. Insecticidas Organofosforados (Campos-Sepúlveda, 2001).

Nombre genérico	Otros nombres	DL50 (mg/kg/)	oral	CT
Aldicarab	Temik, UC-21149	0.93		6
Baygon	Undem	95 a 104		5
Bux	Metalkamato	170		4
Carbaryl	Sevin	850		3
Carzol		20		5
Furadan		11		5
Isolan	Primin	11 a 50		5
Lannate	Methomyl	17		5
Matacil	Aminocarab	30		5
Mesurool	Methiocarb	87 a 130		4
Primor	Primicarb	147		4
Benomyl	Benlate	> 10,000		1

Cuadro 6. Insecticidas Carbamatos (Campos-Sepúlveda, 2001).

Las *intoxicaciones accidentales* son generalmente de origen profesional, afectando a los obreros que trabajan en la preparación de los insecticidas o a los peones rurales durante o inmediatamente después de la aplicación en cultivos.

Las *intoxicaciones alimentarias* se deben al consumo de alimentos tratados impropriadamente con pesticidas. Las *intoxicaciones casuales* se deben generalmente a confusiones, manejo imprudente y falta de vigilancia de los niños.



R=Br, Cl

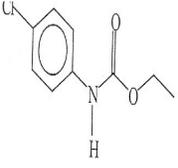
Fig 5. Reacción general de la síntesis de los 4-R-fenilcarbamatos de etilo (Ángeles et al, 1994).

## COMPUESTO LQM996

### 1.6.1. SÍNTESIS

El compuesto LQM 996 es un derivado del ácido carbámico, por lo cual tenemos que éste procede de un carbámato, (Santillán 1993). El compuesto se sintetizaron de acuerdo a una comparación teórica de la influencia de sustituyentes presentes en fármacos antihelmínticos y antibacterianos bencimidazólicos (Arratia, 2004).

Propiedades del 4-R-fenilcarbamatos de etilo

CLAVE	ESTRUCTURA	NOMBRE	p.f (°C)	SOLUBILIDAD	DL50 (mg/Kg)
LQM 996		p-Cl carbamato de etilo	64-66	Acetona, Aceite  de Maíz y DMSO	471.16

Cuadro 7. Propiedades del compuesto LQM 996. Moreno, 1997; Ángeles et al., 2000; Márquez, 2002.

### 1.6.2. PRUEBAS BIOLÓGICAS

#### PARASITOLOGÍA

En el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, bajo la asesoría de M.V.Z. Pablo Martínez Labat, se estudio la actividad antiparasitaria contra *Hymenolepis nana* en ratones CD1.

Los resultados mostraron que el compuesto LQM996 a dosis de 5, 10 y 50 mg/kg, presento una eficacia de entre el 85 el 95% de la actividad antiparasitaria, siendo muy similar esta respuesta a la del medicamento prazicualtel (testigo), además, mediante microscopia electrónica se evidenció la desaparición de las vellosidades que recubren los proglótidos de los parásitos lo que afectaba la nutrición del organismo (Minero, 1997).

Por otro lado, se evaluaro *in vitro* el compuesto LQM996 contra *Giardia lamblia* y se determinó una concentración efectiva entre 3.80 y 18.16 µg/ml, para eliminar este parásito, llevándose acabo este trabajo por la Dra. Enedina Jiménez Cardoso, del Hospital Infantil de México (Jiménez et al., 2003).

Se realizó una evaluación *in vitro* de 10 derivados carbámicos sobre la inhibición del crecimiento de *Entamoeba histolytica*, así como la evaluación del modo de acción del compuesto. Estos estudios los realizó la M. En C. Cynthia Ordaz, bajo la dirección de la Dra. Mireya de la Garza Amaya en el departamento de Biología Celular de Investigación y Estudios Avanzados del IPN.

### 1.6.3. PRUEBAS TOXICOLÓGICAS

#### MUTAGÉNICAS

Se realizó la prueba de revertentes en *S. typhimurium*, mediante la prueba de Ames y de preincubación, por parte de la Dra. Miriam Arriaga del Hospital Juárez de la SSA. Se encontraron que el compuesto no fue mutagénico (no altera la composición del ADN) que es mutagénico en concentración de nanogramos a concentraciones mayores de 250 µg, en comparación con el Metronidazol, (Márquez, 2002).

Se evaluó la genotoxicidad y citotoxicidad de algunos derivados carbámicos, mediante la prueba de micronúcleos, bajo la dirección de la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo y el Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar, en el laboratorio de Genética de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. Los resultados mostraron que el compuesto LQM996 presenta genotoxicidad a partir de una dosis de 30 mg/kg. En cuanto al efecto citotóxico solo se presentó con la dosis máxima empleada (300 mg/kg) que representa el 70% de la DL<sub>50</sub>. También se evaluó el mecanismo de formación de MN, mediante la utilización de la tinción de anticuerpos CREST que detecta cinetocoros en los MN, encontrándose que los escasos MN que produce el compuesto carbámico, son rupturas y no por efecto aneugénico (Márquez, 2002).

Bajo la dirección de la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, en el laboratorio de Citogenética de la FESC-UNAM, se realizó el estudio del potencial genotóxico de los fenilcarbamatos (LQM996) mediante la técnica de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH) *in vitro*. Se trabajaron los compuestos a concentraciones de 25, 75 y 150 µg/mL, obteniendo como resultado que éstos, no alteran ciclo celular, no interfieren con la división celular y no aumentan el número de ICH, en comparación con el Metronidazol usado como testigo a las mismas concentraciones; por lo tanto, los nuevos compuestos no presentan efectos genotóxicos, ni citotóxicos (Hernández, 2003).

#### 1.6.4. PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

En el laboratorio del Dr. Andrés Romero Rojas, en la FES-C, se determinó la actividad de los derivados carbámico contra *Helicobacter pylori*, *in vitro*, mediante los métodos de difusión en agar o Kirby Bauer y de dilución en Agar. Nueve compuestos mostraron actividad inhibitoria en diferentes grados, la concentración mínima de inhibición (CMI). En el caso del compuesto LQM996 se obtuvo una CMI de 32mg/mL, siendo este el más efectivos de los compuestos evaluados (Guerrero, 2002).

#### 1.7. JERBOS DE MONGOLIA (*Meriones unguiculatus*)

##### 1.7.1 GENERALIDADES

Las referencias más recientes sitúan a los jerbos en la familia *Cricetidae*, a la que pertenecen también el hámster. Todos los verdaderos jerbos pertenecen a la subfamilia *Gerbillinae*, que se compone de unos diez géneros y un total de unas 40 especies que difieren sólo ligeramente en tamaño y aspecto ([www.dirat.com.ar/tl\\_roedores3.htm](http://www.dirat.com.ar/tl_roedores3.htm)).

La especie más fácil de conseguir actualmente es el jerbo de Mongolia (Fig. 6.), originario del noreste de China y del este de Mongolia, zonas de extrema aridez.

En el árbol de la familia de los animales, los jerbos domésticos son miembros del orden *Rodentia*, suborden Myomorpha, superfamilia Muroidea, familia *Cricetidae*, subfamilia *Gerbillinae*, género *Meriones*, y especie *unguiculatus*. Así, para designar al jerbo de Mongolia se emplea el nombre científico *Meriones unguiculatus*. Meriones era un guerrero griego que usaba un yelmo decorado con colmillos de jabalí; *unguiculatus* viene de una palabra latina que significa uñas. Este concepto de "dientes y uñas", parece muy poco apropiado para un animalito tan pequeño ([www.biol.unlp.edu.ar/toxicología/seminarios/parte\\_21/plaguicidas.html](http://www.biol.unlp.edu.ar/toxicología/seminarios/parte_21/plaguicidas.html)).

Los jerbos maduros son más pequeños que las ratas pero mayores que los ratones. El pelaje de su lomo y cola es de color canela o marrón rojizo, con las puntas negras y una pelusa gris. La cabeza es más ancha y menos alargada, y con orejas menos prominentes que las de la rata o el ratón. La parte inferior del cuerpo es de color gris claro o blanco crema. Los ojos son grandes, oscuros y ligeramente salidos. Las patas traseras son alargadas y las delanteras son relativamente pequeñas; cada pie tiene cinco dedos con uñas largas y delgadas. Sus colores pueden ir desde el agutí –cada pelo presenta bandas de color blanco, café y negro en la punta, hasta el blanco, negro o gris.

Así, el jerbo se ha desarrollado con un colorido que lo protege en el desierto y con sus extremidades adaptadas para estar de pie, y para saltar, excavar, sentarse, deslizarse o dar brincos. Su aspecto general, colorido, posturas y acciones son similares a los de algunas ardillas. Estos animales son relativamente silenciosos ([www.dirat.com.ar/tl\\_roedores3.htm](http://www.dirat.com.ar/tl_roedores3.htm)).



Fig. 6. Jerbo de Mongolia ([www.dirat.com.ar/tl\\_roedores3.htm](http://www.dirat.com.ar/tl_roedores3.htm))

Los jerbos no son nocturnos sino que alternan periodos de sueño y actividad durante el día, no hay hibernación en invierno ni se adormecen en verano. La vida del jerbo es una vida de actividad cíclica. Alterna períodos de intensa actividad con breves períodos de sueño o de descanso a lo largo del día. Viven de tres a cuatro años, los machos pesan de 65 a 100 g y las hembras de 55 a 85 g, aunque en ocasiones, su peso no suele superar los 120 g. El cuerpo del macho tiene un bulto cónico -normalmente con un mechón de pelo- cerca de la base de la cola, y hay una bolsa escrotal de color oscuro. La grupa de la hembra es más redondeada; la abertura genital está cerca de la abertura anal. Como regla general, los machos maduros son algo más grandes y más pesados que las hembras ([www.biol.unlp.edu.ar/toxicología/seminarios/parte\\_21/plaguicidas.html](http://www.biol.unlp.edu.ar/toxicología/seminarios/parte_21/plaguicidas.html)).

Puesto que los jerbos son originarios de climas muy secos, su piel produce ciertos aceites naturales para protegerse de la sequedad. La humedad puede alterar los efectos de estos aceites, dando como resultado una capa enmarañada, que los animales cuidarán acicalándose y rodando sobre el material seco del lecho.

Estos animales pueden tener una temperatura de 22.5 a 26.5 C° y de un 40% a 60% de humedad relativa-. Pueden tolerar temperaturas más bajas, hasta de unos 10 C° si tienen suficiente cantidad de material de lecho y para anidar.

Se alimentan de semillas, granos, hierbas, raíces y plantas del entorno desértico. Un jerbo adulto necesita un 12% de proteínas y un 7% de grasa. Les encantan los cubos de alfalfa y estos ayudan en el desgaste de sus dientes ([www.gratistodogratis.com.ar/sitios/tiempolibre/roedores/pagina3.php](http://www.gratistodogratis.com.ar/sitios/tiempolibre/roedores/pagina3.php))

La madurez sexual se alcanza entre las 9-12 semanas y generalmente los sexos pueden distinguirse a las 3 semanas. El parto es relativamente sencillo e indoloro, y una camada grande puede nacer en un período de sólo una hora, aproximadamente; El tamaño de la camada puede variar entre uno y diez cachorrillos, siendo el promedio de unas cuatro o cinco crías por camada; la relación entre machos y hembras es prácticamente de uno a uno. La mayor parte de las hembras tendrán su primera camada más o menos a los seis meses de edad. Aproximadamente un tercio de las hembras pueden tener su primera camada a una edad de tres o cuatro meses ([www.dirat.com.ar/tl\\_roedores3.htm](http://www.dirat.com.ar/tl_roedores3.htm)).

La vida reproductiva de la hembra puede durar unos 20 meses, aunque generalmente se termina a una edad de unos 14 meses.

Los jerbos nacen desprovistos de pelaje y de color rozado, ciegos, sordos y sin dientes. Tienen algo más de 2,5 cm de longitud y pesan unos 3 gramos (Fig. 7.). El porcentaje de supervivientes del parto es relativamente alto, y el canibalismo es raro. Si la hembra devora a sus crías, es posible que éstas hayan muerto a causa de una falta de leche debida a su vez a una deficiencia vitamínica; puedes evitar esto dando a la hembra algo de leche evaporada durante la preñez y la lactancia. Si alcanza la edad de un mes, lo más probable es que un jerbo pueda tener una vida larga y saludable; es conveniente tomarse un margen de seguridad ([www.gratistodogratis.com.ar/sitios/tiempolibre/roedores/pagina3.php](http://www.gratistodogratis.com.ar/sitios/tiempolibre/roedores/pagina3.php))



Figura 7. Jerbos de Mongolia recién nacidos ([www.gratistodogratis.com.ar/sitios/tiempolibre/roedores/pagina3.php](http://www.gratistodogratis.com.ar/sitios/tiempolibre/roedores/pagina3.php))

### 1.7.2. LOS JERBOS EN LA INVESTIGACIÓN

Los jerbos fueron llevados por primera vez a Estados Unidos por el Dr. Victor Schwentker en 1954. Desde entonces ha habido un creciente interés científico en estos animales debido a sus únicas características y susceptibilidades, además de lo fácil que resulta cuidarlos, de su buen carácter y de otros factores.

El jerbo puede vivir normalmente con muy poca agua para beber. La tolerancia al calor y la regulación de la temperatura del cuerpo del jerbo son muy superiores a las de la mayor parte de los demás animales del desierto. Cuando se les proporciona una dieta rica en grasas, se ajustan fácilmente a altos niveles de colesterol, que están relacionados con los trastornos circulatorios y cardíacos en los seres humanos.

Además, los jerbos tienen una resistencia a las radiaciones relativamente alta. Poseen una insólita glándula abdominal que parece protegerles.

En psicología y en investigación sobre el comportamiento, los jerbos resultan superiores a algunas ratas en algunos experimentos, y su naturaleza dócil los ha hecho populares para el tratamiento de algunos niños con problemas emocionales.

Ha habido un creciente interés científico en estos animales debido a sus únicas características y susceptibilidades, además de lo fácil que resulta cuidarlos, de su buen carácter y de otros factores.

Los jerbos comparten el mismo tipo de enfermedades que el resto de los roedores como los ratones, ratas, hámster y cuyos. Los jerbos son animales fuertes y no son propensos a enfermarse se los mantiene en condiciones favorables de limpieza y alimentación, pero ocasionalmente puede enfermar. Las siguientes son las enfermedades que suelen aparecer entre los jerbos.

### 1.7.3. MODELO ANIMAL PARA LA EVALUACIÓN DE NUEVOS FÁRMACOS

Recientemente, se han hechos estudios experimentales con respecto a la infección y carcinogénesis gástrica de *Helicobacter pylori*, esto ha presentado nuevos hallazgos. Para estudiar las relación entre la infección *Helicobacter pylori* y carcinogénesis gástrica; existen muchos factores, que incluyen la respuesta del huésped: como la condición ambiental, y los factores de virulencia de las bacterias, *in vivo* en un corto tiempo (Masao, 2002).

En 1996 Hiramaya y colaboradores reportaron la inducción de úlcera gástrica y metaplasia intestinal en jerbos infectados con *Helicobacter pylori*. Los jerbos de Mongolia pueden ser considerados infectados con este microorganismo y se obtiene un resultado de gastritis crónica activa, úlcera péptica y metaplasia intestinal, las lesiones aparentes pueden parecerse a la de los humanos. Este modelo puede ser ideal, para desarrollar el análisis de el papel de *Helicobacter pylori* en desordenes gástricos (Masao, 2002).

Después de la infección con el *Helicobacter pylori*, las glándulas estomáticas de los jerbos presentan cambios hiperplásicos, erosión con grados de dilatación de quistes multifocal, infiltración de células inflamatorias y proliferación de glándulas gástricas, la formación de lesiones displásicas, llamadas glándulas heterotópicas proliferativas. Estas lesiones mucosales son rodeadas con fibras de colágena, presentado un cambio fenotipo de tipo gástrico a tipo intestinal (Guofei, 2005).

Existen otros estudios donde indica Watanabe y Honda concluyen que la infección de *Helicobacter pylori*, solo prodría inducirse diferenciando bien adenocarcinoma, en muy altas incidencias (38% y 40%), en el estroma glandular de los jerbos solo en la semana 62 o 72 (Watanabe, 1998).

Mientras que Hirayama encontró una diferenciación en la infección de *Helicobacter pylori* a la semana 64 (18%). Las incidencias y el modelo histológico de las lesiones difiere un mayor medida, posiblemente por la diferencia en el diagnóstico de las lesiones de la submucosa y una buena diferenciación de adenocarcinoma en estas especies animales (Watanabe, 1998).

Lo llamados jerbos de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) pueden ser fácilmente infectados con *Helicobacter pylori* y proporciona un excelente modelo experimental *in vivo* para aclarar el papel de *Helicobacter pylori* en gastritis activa, úlcera péptica, metaplasia intestinal y carcinoma gástrico. Así como los factores que están implicados en la inflamación, células de proliferación y células de diferenciación, pueden ser examinadas con estos modelos experimentales para ayudar a elucidar este mecanismo de carcinogénesis gástrica (Watanabe, 1998).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La infección por *H. pylori* es considerada en la actualidad como una de las más difundidas en el mundo y de importancia clínica. La eficacia del tratamiento de infección gástrica causada por *H. pylori*, puede ser reducido por la resistencia adquirida a varios fármacos, sobre todo al Metronidazol, ampliamente utilizados en los distintos hallazgos de la infección, los cuales han creado resistencia en un (1-85%). Esto ha intensificado la búsqueda de antimicrobianos eficaces que permitan erradicar a esta bacteria del estómago. Teniendo esto en cuenta se recurrió a la síntesis del ácido carbámico del cual surgieron nuevas moléculas con actividad biológica menos dañinas de bajo costo en relación a las ya existentes, las cuales son los 4-R-fenilcarbamatos de etilo como es el compuesto LQM996 que han mostrado efectividad biológica *in vitro* como antibacterianos y antihelmínticos, por lo cual es importante conocer los posibles efectos dañinos. En el presente estudio se realizaron títulos bactericidas en el suero del Jerbo, con el cual se sabrá *in vivo* la farmacodinamia del compuesto obteniendo la concentración a la que muere el microorganismo una vez metabolizado, así como la evaluación histopatológica del órgano en el que se podrá estudiar si el compuesto puede eliminar al microorganismo.

En cuanto al compuesto LQM996, ha dado buenos resultados en estudios *in vitro* realizados anteriormente, por lo cual es importante evaluarlos en sistemas vivos; que en este caso se realizara con Jerbos de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) ya que se ha reportado que este modelo animal, es el ideal para realizar la infección con *H. pylori* debido a que el resultado es una gastritis crónica activa, úlcera péptica y metaplasia intestinal, y estas lesiones a su vez son muy parecidas a la de humanos, por tanto de esta forma se emitirá una conclusión acerca del daño que puedan producir en el organismo.

Con las evaluaciones realizadas en este trabajo se contribuirá con los estudios preclínicos, por los que todo nuevo principio activo debe pasar antes de ser comercializado, considerando que se pretende que el derivado carbámico sea utilizado como tratamiento, para la infección a nivel del tracto gastrointestinal, ofreciendo una mejor opción en comparación a los compuestos ya existentes tanto en efectividad como en la capacidad para no producir lesiones en el organismo consumidor.

### 3. HIPÓTESIS

Si el derivado del ácido carbámico LQM996 ha demostrado gran actividad potencialmente antimicrobiana en estudios *in vitro* contra *H. pylori*, entonces mostrará resultados semejantes en estudios *in vivo* en *Meriones Unguiculatus* (jerbos de Mongolia).

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antibiótica del LQM996 en *Meriones unguiculatus* infectados con *Helicobacter pylori*

#### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) del nuevo producto derivado del ácido carbámico en *Meriones unguiculatus* (jerbos de Mongolia).
2. Determinar los títulos inhibitorios y bactericidas *ex vivo* a diferentes dosis del derivado LQM996.
3. Determinar el efecto bactericida *in vivo* del LQM996 contra *H. pylori*.
4. Determinar la infección por *H. pylori* en *Meriones unguiculatus*.
5. Evaluar la actividad del LQM996 en *Meriones unguiculatus* infectados con *Helicobacter pylori*

## 5. MATERIAL

### 5.1. BIOLÓGICO

Se utilizaron jerbos de Mongolia machos y hembras, de un peso de 60 a 110 gramos, los animales se adquirieron del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” y se mantuvieron en el bioterio del mismo, en cajas metabólicas y en cajas de acrílico con cama de aserrín, con agua y alimento.

### 5.2. REACTIVOS

Derivado carbámico LQM996

Metronidazol

Amoxicilina

Claritromicina Suspensión

Claritromicina

Aceite de Canola

Buffer de Fosfatos

Metanol

Solución Salina Fisiológica

Agua Destilada

### 5.3. MEDIOS DE CULTIVO

Agar Casman con antibiótico y sin Antibiótico

Caldo Brucella

Caldo Miuller Hinton.

## 6. MÉTODOS

### 6.1 DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL<sub>50</sub>)

Se prepararon tres lotes de tres jerbos cada uno, libres de patógenos específicos, lo cual se constató mediante el método de ELISA, se pesaron los animales para administrarles el compuesto LQM996 el cual es disuelto previamente en aceite de canola.

La determinación de la dosis letal media o cincuenta del compuesto LQM996 se determinó mediante el método de Dietrich Lorke (Lorke, 1983). El método consiste en dos etapas.

#### 6.1.1 PRIMERA ETAPA

En la primera se administraron por vía oral las 10, 100 y 1000 mg/Kg a 3 jerbos por grupo, y se observaron a las 24h. Posteriormente se realiza un registro de mortalidad.

En el cuadro presenta la relación de animales vivos y muertos; por ejemplo 0/3 nos indica que de tres animales a los cuales se les administro las diferentes dosis mencionadas, ninguno murió, ya que cero de tres animales murieron, con esto nos da la pauta para poder determinar la siguiente dosis que debemos administrar, que constituye la segunda etapa del método de Dietrich Lorke.

Dosis mg/ Kg 1° Etapa		
10	100	1000
0/3	0/3	0/3
0/3	0/3	1/3
0/3	0/3	2/3
0/3	0/3	3/3
0/3	1/3	3/3
0/3	2/3	3/3
0/3	3/3	3/3
1/3	3/3	3/3
2/3	3/3	3/3
3/3	3/3	3/3

Cuadro 8. Dosis administradas vs número de animales vivos y muertos; primera etapa del método de Dietrich Lorke (Lorke, 1983).

### 6.1.2 SEGUNDA ETAPA

Los resultados anteriores son comparados en la cuadro 9, en el cual determinaremos que dosis debemos administrar a los jerbos, en esta etapa se utilizaron 3 jerbos, uno para cada dosis. Al igual que en la etapa anterior se observan por 24 horas, para determinar el número de animales sobrevivientes y realizar el cálculo pertinente (más adelante se menciona) para obtener la DL<sub>50</sub>.

Dosis mg/Kg 2º Etapa			
	1600	2900	5000
600	1000	1600	2900
200	400	800	1600
140	225	370	600
140	225	370	600
50	100	200	400
20	40	80	160
15	25	40	60
5	10	20	40
2	4	8	16
1	2	4	8

Cuadro 9. Dosis que se deben administrar a los jerbos (segunda etapa del método), para la determinación de la DL<sub>50</sub> dependiendo del número de animales vivos y muertos (primera etapa del método). Lorke, 1983.

De acuerdo a la mortalidad obtenida en esta etapa. La DL<sub>50</sub> del compuesto se obtiene calculando la media geométrica entre la dosis máxima administrada, en la que se presenta sobrevivencia del jerbo y la dosis en la que se presenta la muerte del animal.

$$\bar{X}_g = \sqrt{X_1 \cdot X_2}$$

X<sub>1</sub> = Dosis a la que se encuentra vivo el jerbo

X<sub>2</sub> = Dosis a la que fallece el jerbo

De esta manera queda establecida la Dosis Letal Cincuenta.

## 6.2. ACTIVIDAD BACTERIOSTATICA Y BACTERICIDA EN SUERO DE JERBOS PREVIA INOCULACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS.

### 6.2.1. PREPARACIÓN DE ANIMALES

1. Se forman 4 lotes de 3 jerbos cada uno
2. Se administra el antibiótico Amoxicilina (50 mg/kg), Metronidazol (500mg/kg) y el compuesto LQM996 (90 y 180 mg/kg), al jerbo por vía oral. Solo a estos lotes ya que cada lote cuenta con su testigo positivo (infectado con *Helicobacter pylori*), y solo se administra el aceite de cánola ya que es el diluyente del compuesto.
3. Se realizó punción cardiaca para obtener sangre periférica (aproximadamente de 1-2mL), para realizar la técnica *ex-vivo*, es decir que el animal no muere y se obtiene sangre al tiempo 0, 30minutos y 60 minutos.
4. Centrifugar la sangre a 7000rpm/min, para obtener el suero.

### 6.2.2. MONTAJE

Teniendo el suero de los jerbos se procede como sigue:

1. Ensamblar 14 tubos estériles de 13 X100 para cada muestra
2. Marcar los tubos del 1-12 y colocarlos en su sitio de una misma hilera
  - a) Los tubos del 1-11 se realizan diluciones seriadas dobles del suero del animal (1:2 a 1: 2048)
  - b) Tubo 12 es para control de crecimiento, control positivo (caldo con el microorganismo).
  - c) Tubo 13 es para el control negativo, prueba de esterilidad (caldo únicamente).
3. El volumen final de cada tubo debe ser de 1ml para cada muestra de suero es corrida por duplicado.

### 6.2.3. DILUCIONES

1. Usar pipetas estériles 5ml para adicionar 0.5ml de caldo a los tubos del 2-14 adicionar 1.0 ml al tubo 13 si se desea.
2. Homogeneizar el suero del jervo
3. Usar una micropipeta estéril adicionar 0.5 mL del suero a los tubos 1 y 2.
4. Homogeneizar el tubo 2
5. Usar una punta estéril transferir 0.5 mL del suero con caldo
6. Mezclar y pasar del tubo 2 al tubo 3.
7. Repetir este procedimiento hasta llegar al tubo 11 utilizando una punta para cada tubo.
8. Descartar los 0.5 mL de la mezcla del tubo 11

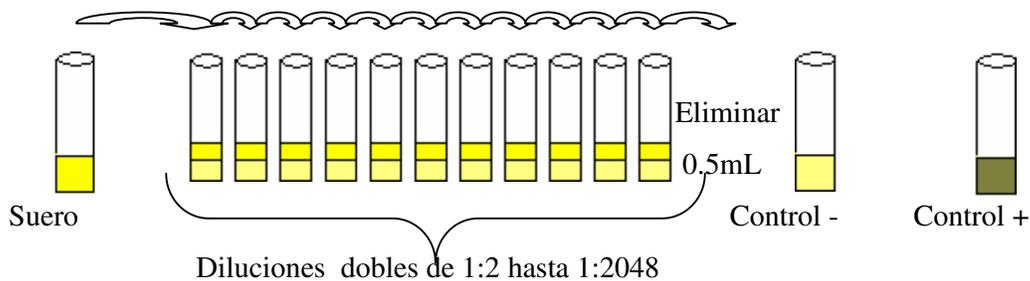


Figura 8. Realización Diluciones

### 6.2.4. PREPARACION DEL INOCULO

1. Utilizando asa estéril inocular de 20 a 30 colonias del microorganismo del ATCC e inocularlo en 5ml de caldo Brucella con suero fetal bovino (SFB).
2. Ajustar la suspensión hasta obtener una turbidez comparable de 3.0 Mac Farland
3. Adicionar 0.05mL de esta suspensión a 10mL de caldo Brucella con SFB vortexiando (concentración aproximadamente de  $7.5 \times 10^5$  UFC/ml)

- Usar el inóculo 15min, ya que puede morir el microorganismo.

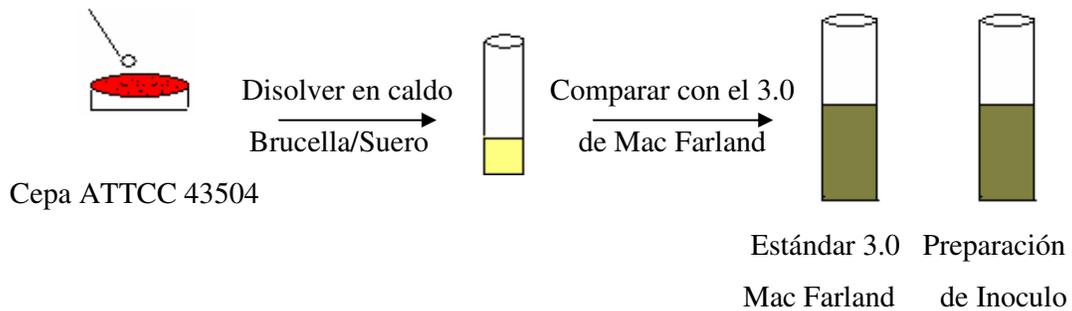


Figura 9. Preparación del inóculo

### 6.2.5. INCUBACIÓN

- Adicionar 0.5 mL de inóculo a cada tubo del 1 al 12 usar punta nueva de 1ml,
- Mezclar la solución dentro del tubo, subiendo y bajando esta de 2 a 3 veces procurando no hacer burbujas o salpicar.
- Usar nuevas puntas para cada tubo.
- Preparar una placa de pureza por propagación de una a cepa con 0.001 $\mu$ l del 3.0 Mac Farland, la suspensión se coloca en la superficie del agar.
- Preparar una placa para verificar conteo de colonias como sigue:
  - Preparar una dilución 1:100 del inóculo de Mac Farland (0.1 mL de inóculo de estándar 3.0 de Mac Farland más 9.9 ml de caldo Brucella con SFB)
  - Mezclar gentilmente
  - Usar 0.01mL transferirlos a una placa por propagación de la dilución (1:100) para conteo de colonia (cuadrículando la placa de agar).
- Incubar los tubos a 37°C en CO<sub>2</sub> por cuatro días
- Incubar la prueba de pureza y el conteo en CO<sub>2</sub> a las mismas condiciones.
- Remover la gradilla del incubador
- Mezclar gentilmente cada tubo por la mano hasta turbidez uniforme

### 6.2.6. LEER Y ANOTAR TÍTULOS

1. Examinar los tubos después 3 a 5 días, ya que los tubos serán comparados con el control positivo que se le asignará una turbidez de 3 a 4 +.

Evaluar crecimiento como sigue:

- a) 3 a 4+ checar la turbidez, esta debe ser pesada o crecimiento granular fino dentro del tubo o un precipitado denso que es semejante a un botón en el tubo.
  - b) Durante la incubación la proteínas del suero pueden precipitar e interferir con la interpretación de las TIS. No puede reportar el TIS si no se puede diferenciar entre crecimiento bacteriano y precipitado de proteínas en suero.
3. Examinar los controles no inoculados control negativo comparar crecimiento cuestionable cuando sea necesario.
  4. Examinar el conteo de colonias en la placa, el conteo es inadecuado si hay menos de **20 o más de 200 colonias** repetir la prueba.
  5. La dilución más alta del TIS, resultado de un crecimiento no visible después de los 5 días de incubación.
  6. Reportar los resultados.
    - a) Del tubo 1 a 5 el título es 1:32

### Preparación para determinar Títulos Bactericidas

Calcular el conteo de colonias (inoculo final o número actual de organismos probados)

- a) Conteo de las colonias de crecimiento en cada inoculo para verificación en la placa de agar y sacar el promedio de 2 conteos.
- b) Multiplicar el promedio de 2 conteos  $\times 10^4$  (el inoculo es diluido 1:100 para el inoculo de conteo de colonias y se debe multiplicar  $\times 100$  para convertir a 1ml).
- c) Dividir por 2 ( el inoculo es diluido 1:2 en cada prueba)

### 6.2.7. SEMBRAR LOS TÍTULOS BACTERICIDAS

1. Puntas de 0.01 mL y colocar 0.001 mL del caldo homogeneizado como sigue:
2. Cada alícuota colocarla en ¼ de caja. Preparar subcultivos por duplicado.
3. No permitir que el inóculo seque antes de incubar.
4. Invertir las placas, incubar en CO<sub>2</sub> por 4 días
5. Leer resultados preliminares (número de colonias crecidas en cada cuadrante)
6. Leer resultados finales se leerán de 5 a 7 días después de la incubación.

### 6.2.8. DETERMINACIÓN DE PUNTOS BACTERICIDAS FINALES

1. Contar las colonias crecidas en cada cuadrante
2. Determinar si la dilución es bactericida.
  - a. Sumar el número de colonias por duplicado de cada dilución
  - b. Cuando la suma del crecimiento de colonias por duplicado de cada dilución es igual o menor al valor de rechazo ( $1 \times 10^5$  a  $9 \times 10^7$ ), la dilución en suero es declarada bactericida ( indicando la muerte del 99.9% del microorganismo probado)

### RESULTADOS

A. El control de calidad es aceptable, interpretación de resultados. Guía NCCLS (Linton, 2003) en el Documento M21-T (3); con el procedimiento de la microdilución.

Se realizaron diferentes cálculos como están indicados en la técnica (paso 6 de leer y anotar los títulos), para poder hacer los cálculos y poder determinar si la prueba es válida o no.

TRATAMIENTO	CONTEO DE COLONIAS
AMOXACILINA	$8.0 \times 10^7$ UFC/mL
METRONIDAZOL	$5.1 \times 10^7$ UFC/mL
LQM996	$3.8 \times 10^7$ UFC/mL

### Cuadro 10. Conteo organismos probados

Aquí se presenta el Punto Final Bactericida, para los diferentes tratamientos administrados a los jerbos.

TRATAMIENTO	TIEMPO (Minutos)	PUNTO FINAL BACTERICIDA (UFC/mL)
AMOXACILINA	30	$8.1 \times 10^3$
	60	$2.5 \times 10^3$
METRONIDAZOL	30	$4.2 \times 10^3$
	60	$3.5 \times 10^3$
LQM 996	30	$3.5 \times 10^3$
	60	$3.0 \times 10^2$

Cuadro 11. Determinación del Punto Final Bactericida

### 6.3. CINÉTICA DE MUERTE

#### 6.3.1. PREPARACIÓN DEL MICROORGANISMO

1. Tomar 20 mL de caldo MH con SFB (Fig. 9)
2. Disolver una cantidad de bacteria en la pared del tubo
3. Comparar la turbidez con el estándar 3.0 de Mac Farland.

#### 6.3.2. PREPARACION DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CIM)

1. Rotular los tubos que se va a utilizar con las concentraciones deseadas.
2. Preparar 50 mL de MH y agregarles el suero que es al 10%
3. Agregar 1ml del caldo previamente preparado a cada tubo.
4. Agregar 1ml del antibiótico al primer tubo, homogeneizar.
5. Extraer 1ml del este tubo y pasarlo al siguiente tubo.
6. Del tubo anterior repetir el paso 5, así sucesivamente hasta la concentración que uno desee, cuando se llegue a la última se desecha el ml que se extrajo.

7. Agregar 1ml del la turbidez 3.0 de Mac Farland ( $7.5 \times 10^5$  UFC/mL) que se preparó anteriormente, a cada tubo.
8. Se tomó muestra de cada tubo y a este mismo se realizó diferentes diluciones seriadas desde el concentrado hasta la dilución 1:100000 a distintos tiempos como fueron 3, 6, 24 y 48 horas.

### 6.3.2. REALIZACIÓN DE DILUCIONES SERIADAS

Rotular tubos como: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 y 1:100000.

1. Repetir el procedimiento para cada concentración y tiempo
2. Colocar 0.9ml o 900 $\mu$ l de caldo MH sin SFB a cada tubo anterior.
3. Agregar 0.1ml o 100 $\mu$ l de uno de tubos con la concentración que se va tratar del MIC, así para las demás concentraciones
5. Se sembraron 0.01 mL en forma en tres direcciones, por duplicado por cada dilución en agar Casman sin antibiótico (por cuartos).

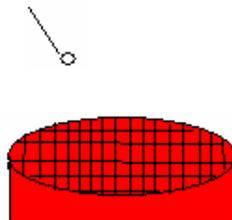


Fig. 10. Sembrado en tres direcciones  
(Realizar esta forma en cada cuarto de la placa).

6. Incubar a 37°C en CO<sub>2</sub> durante 3 días aunque es preferible que se deje de 5 a 7 días, ya que el crecimiento se aprecia mejor.
7. Realizar el conteo correspondiente a cada placa, se deben tomar en cuenta que el número de bacterias este de 20 a 200 para realizar los cálculos correspondientes y determinar que tan eficiente es el compuesto. (Lionton 2003).

#### 6.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DEL COMPUESTO

##### LQM996 EN *Meriones unguiculatus*

#### 6.4.1. INFECCIÓN EN JERBOS DE MONGOLIA

1. Se puso en ayuno de 24 horas a los animales (jerbos de Mongolia) que se infectarían.
2. Preparar caldo Brucella y agregar una cantidad de bacteria, de tal manera que la turbidez sea muy concentrada.
3. Administrar 1 ml de cloruro de potasio dejar pasar 1 hora y administrar 1ml de la bacteria antes preparada a los jerbos de Mongolia por vía oral.
4. Darles de comer a los animales después de 1 hora de administración.
5. Repetir esta metodología cada tercer día, hasta completar 5 veces el proceso.
6. Se dejaron de esta manera durante un año y medio.

#### 6.4.2. ADMINISTRACIÓN DE TRATAMIENTOS

1. Se formaron lotes de 3 jerbos cada uno
2. Se dejaron en ayuno por 24 horas a cada lote.
3. Se administró el tratamiento respectivo a cada lote los cuales fueron los siguientes:

Lote	No. de animales	Dosis mg/kg	Administración	Tiempo
Aceite de Maíz (Control Negativo)	9	----	Vía Oral	15 Días
LQM 996	6	90	Vía Oral	15 Días
MTZ	3	20	Vía Oral	15 Días
MTZ +Amoxicilina	3	20 + 50	Vía Oral	15 Días
LQM + Amoxicilina	3	90 + 50	Vía Oral	15 Días
LQM +Claritromicina	3	90 +15	Vía Oral	15 Días
MTZ + Claritromicina	3	20 + 15	Vía Oral	15 Días

Cuadro 12. Administración de tratamientos en jerbos de Mongolia

4. Al cabo de este procedimiento se sacrificaron los animales.

#### 6.4.3. SACRIFICIO Y PROCESAMIENTO DE ORGÁNOS DE ANIMALES.

1. Poner en ayuno a los animales un día previo al sacrificio.
2. Meter a cada jerbo a una cámara saturada de éter hasta que el animal halla muerto.
3. Poner al animal boca arriba, para extraer el estómago e hígado.
4. Colocar los órganos en un recipiente de formol, de tal manera que la cantidad de volumen a tres veces la extensión del órgano.
5. Dejar el órgano durante 24 horas en el formol, para que este se fije.
6. Se realiza la técnica de Histopatología.

#### 6.4.4. ANÁLISIS MICROSCÓPICO

Se observaron laminillas (Histopatología) de los lotes tratados con los diferentes tratamientos con la tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E), en las cuales se determinaron diversos parámetros en los cuales se realizó el análisis para determinar el grado de infección de los animales y destacar cual fue el mejor tratamiento, así como determinar el grado de toxicidad hepática, que provocan los mismos.

## 7. RESULTADOS

### DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL CINCUENTA

La DL50 se determinó mediante el método de Dietrich Lorke.

Se realizó la primera etapa

Lote	Dosis (mg/Kg)	Peso del jerbo (g)	mL del compuesto (LQM996)
1	10	66	0.029
		74.5	0.033
		65	0.024
2	100	70.5	0.31
		70	0.31
		76	0.34
3	1000	66	2.9
		69	3.1
		74.5	3.35

Cuadro 13. Administración de la 3 dosis, de la primera etapa del método

Se verifico cuantos animales estaban vivos para poder determinar la dosis que se utilizo en la segunda etapa del método.

Jerbo	10mg/kg	100 mg/kg	1000mg/kg
1	Vivo	Vivo	Muerto
2	Vivo	Vivo	Muerto
3	Vivo	Vivo	Muerto

Cuadro 14. Registro de Mortalidad de los animales

Teniendo estos resultados son comparados en la siguiente tabla:

Dosis mg/Kg 1ª Etapa			Dosis mg/Kg 2ª Etapa			
10	100	1000				
0/3	0/3	0/3		1600	2900	5000
0/3	0/3	1/3	600	1000	1600	2900
0/3	0/3	2/3	200	400	800	1600
<b><u>0/3</u></b>	<b><u>0/3</u></b>	<b><u>3/3</u></b>	<b><u>140</u></b>	<b><u>225</u></b>	<b><u>370</u></b>	<b><u>600</u></b>
0/3	1/3	3/3	50	100	200	400
0/3	2/3	3/3	20	40	80	160
0/3	3/3	3/3	15	25	40	60
1/3	3/3	3/3	5	10	20	40
2/3	3/3	3/3	2	4	8	16
3/3	3/3	3/3	1	2	4	8

Cuadro 15. Determinación de la Dosis de la segunda etapa del método de Dietrich Lorke.

En la fila donde están los números en negritas y subrayados, son las siguientes dosis que administramos, ya que como vemos tenemos que en la dosis de 10 mg/kg murieron cero de tres animales, en la dosis de 100 murieron cero de tres, mientras que en la dosis de 1000 murieron 3 de los tres animales; entonces tomamos la dosis de 140, 225, 370 y 600 mg/kg estas dosis fueron administradas a cada jerbo respectivamente.

En este cuadro muestra las dosis que se administraron a los jerbos del compuesto LQM996 y el estado que se obtuvo de la administración a estas dosis, teniendo que las filas en negritas, son los valores que se tomarán para determinar la  $DL_{50}$

Peso del jerbo (g)	Dosis	mL Adm. (LQM996)	ESTADO
68	140	0.47	VIVO
61.8	<b>225</b>	0.68	<b>VIVO*</b>
66	<b>370</b>	0.21	<b>MUERTO</b>
68.9	600	2.04	MUERTO

Cuadro 16. Registro de dosis vs estado de los animales para determinar la DL<sub>50</sub>.

Obtenidas las dosis, se procede a calcular la DL<sub>50</sub>, mediante una media geométrica, con la fórmula presentada en el apartado de los métodos.

Así tenemos lo siguiente:

$$\bar{X}_g = \sqrt{225 \cdot 370} = 288.53\text{mg/kg}$$

Resultando una DL<sub>50</sub> de 288.53 mg/kg en jerbos de 60 g.

ACTIVIDAD BACTERIOSTÁTICA Y BACTERICIDA EN SUERO DE JERBOS  
PREVIA INOCULACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS.

En este cuadro muestra los títulos bacteriostáticos y bactericidas en suero de jerbos frente a diferentes antibióticos y el compuesto LQM996, teniendo que el título de 1:32 es el de un fármaco adecuado.

Fármaco	Dosis (mg/kg de peso)	Número de Jerbos	Títulos			
			Bacteriostáticos		Bactericidas	
			Tiempo (min)		Tiempo (min)	
			30	60	30	60
Amoxicilina	50	3	1:64	1:64	1:64	1:64
Metronidazol	500	3	1:16	1:32	1:16	1:16
LQ996	90	3	<2	<2	<2	<2
	180	3	1:4	1:64	1:4	1:32

Cuadro 17. Relación de los títulos bacteriostáticos y bactericidas del LQM996 versus Amoxicilina y Metronidazol en suero de *Meriones unguiculatus*

Interpretación de resultados del cuadro 16.

Picos de títulos bactericidas	Interpretación
1:2	Inadecuado
1:4 a 1:16	Intermedio
1:32	Adecuado

## CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)

Se realizó la prueba de CIM, por el método de dilución en agar, para 20 cepas de *Helicobacter pylori* provenientes de diferentes paciente infantiles, así como la cepa ATCC (43504), los fármacos probados fueron Metronidazol, Amoxicilina, Claritromicina y el compuesto LQM 996 para lo cual se obtuvo lo siguiente:

No. de Cepa	Amoxicilina	Claritromicina	Metronidazol	LQM996
1	0.12	0.06	256	16
2	0.12	0.03	256	16
3	0.06	0.03	256	16
4	0.06	0.03	256	16
6	0.06	0.03	128	16
7	0.06	0.06	32	16
8	0.06	0.03	64	16
9	0.06	0.03	512	16
10	0.06	0.03	512	16
11	0.06	0.03	512	16
12	0.06	0.03	256	16
13	0.06	0.03	>16	16
14	0.12	0.03	256	16
15	0.06	0.06	>16	16
16	0.06	0.03	512	16
17	0.06	0.03	>16	16
18	0.06	0.03	256	16
19	0.06	0.03	>16	16
20	0.06	0.03	>16	16
ATCC 43504	0.06	0.06	128	16

Cuadro 18. Valores de la concentración inhibitoria realizada por el método de dilución en Agar según la NCCLS (ahora CLSI)

Interpretación de resultados para la Concentración Inhibitoria Mínima:

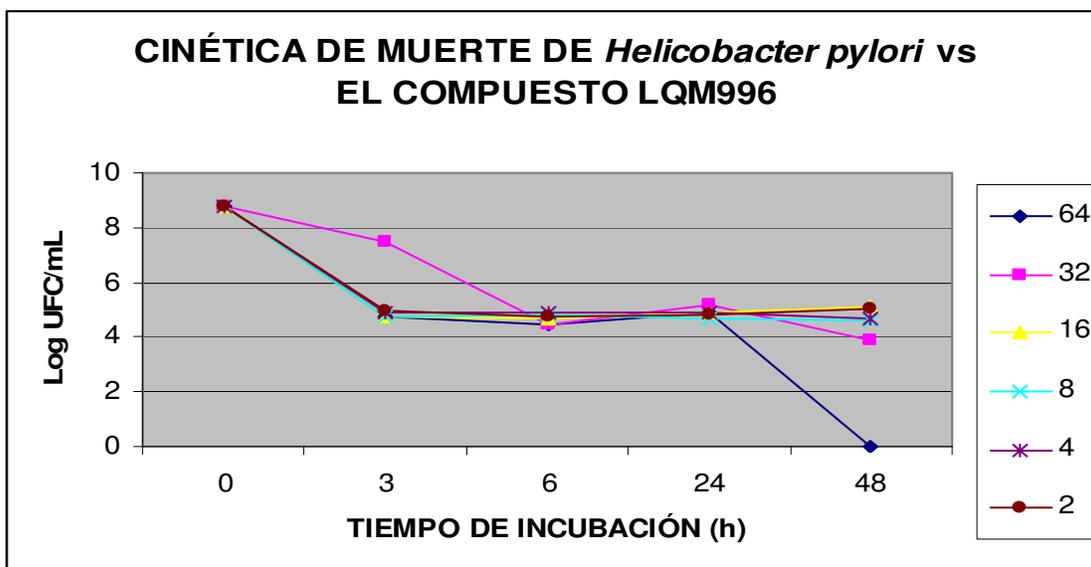
Antibiótico	Sensible	Intermedio	Resistente
Amoxicilina	$\leq 0.5$	--	$\geq 1.0$
Claritromicina	$\leq 0.25$	0.5	$\geq 1.0$
Metronidazol	$\leq 8$	--	$\geq 8$
LQM996	16	--	--

### CINÉTICA DE MUERTE

En esta tabla muestra la cinética de muerte que lleva la bacteria *Helicobacter pylori* frente a diferentes concentraciones del compuesto LQM996, teniendo una concentración inicial de bacteria de 8.77 UFC/mL para todas las concentraciones, este valor se da porque se utilizó el estándar 3.0 de Mac Farland.

Horas	0	3	6	24	48
Concentración $\mu\text{g/mL}$					
64	8.77	4.77	4.43	4.9	0
32	8.77	7.483	4.47	5.18	3.9
16	8.77	4.75	4.71	4.92	5.1
8	8.77	4.78	4.83	4.71	4.64
4	8.77	4.91	4.92	4.91	4.66
2	8.77	4.93	4.77	4.81	5.02

Cuadro 19. Cinética de muerte de *Helicobacter pylori* a diferentes concentraciones del compuesto LQM996.



Grafica 1. Cinética de Muerte de la bacteria *Helicobacter pylori* vs el compuesto LQM 996.

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DEL COMPUESTO LQM 996  
EN *Meriones unguiculatus***

Se dividieron en lotes los animales, y se administraron los diferentes tratamientos, en unos casos solos y en otros combinados, evaluando el grado de infección provocada por la *Helicobacter pylori* en ellos.

Tratamiento	No. de Animales	-	+	++	+++	% S/I
Aceite de Canola (testigo positivo)	12	0	2	6	4	0
LQM996	6	1	4	1	0	16.66
MTZ	3	0	1	2	0	0
Amoxicilina/LQM996	3	1	2	0	0	33.33
Amoxicilina/MTZ	3	1	2	0	0	33.33
Claritromicina/LQM996	3	2	1	0	0	66.66
Claritromicina/ MTZ	3	0	0	1	2	0

Cuadro 20. Grado de infección de los Jerbos frente a tratamientos administrados.

**INTERPRETACIÓN**

- = Sin Infección
- + = Ligera infección
- ++ = Media Infección
- +++ = Fuerte Infección
- S / I = Sin infección

Tratamiento	Microgranulomas	Congestión	Células Kuffer	Esteatosis	Células de Ito	Colestasis	Pigmento
Aceite de Canola	-	-	+	-	-	-	-
Mtz+Amoxicilina	++	+	+	+	-	-	-
LQM996	+	+	+	+	+	+	+
MTZ	+	++	+	+	-	-	+
LQM996+Amoxicilina	+	+	+	++	-	-	-
LQM966+Clarithromicina	+	-	+	+	-	-	-
Clarithromicina+MZT	++	+	++	++	+	+	+

Cuadro 21. Patologías en Hígado para determinar la toxicidad del compuesto LQM996 y los tratamiento recomendados.

#### INTERPRETACIÓN

- = Sin presencia

+ = Ligera presencia

++ = Media presencia

+++ = Fuerte presencia

**IMÁGENES DE CORTES HISTOPATOLÓGICOS DE HIGADO Y ESTOMAGO DE LOS GERBOS ELECTRONICA**

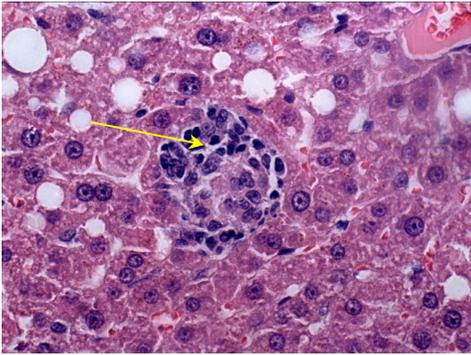


Figura 11. Microgranuloma visto a 40X, hígado de jerbo. Tinción H-E.

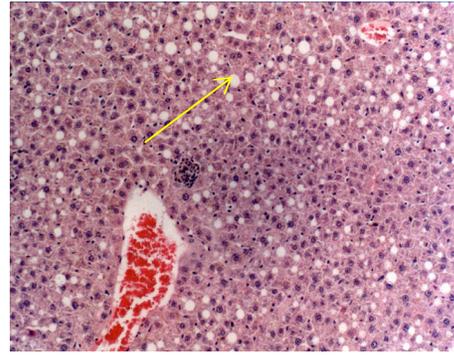


Figura 12. Esteatosis, que se observan en forma de vacuolas blancas, vistas a 10X en hígado de jerbo. Tinción H-E.

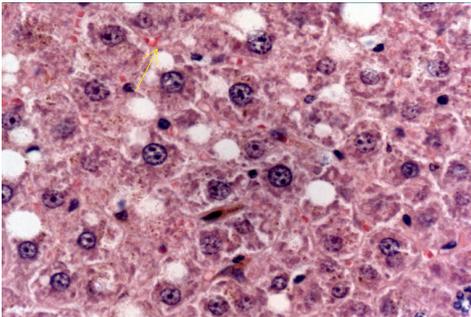


Figura 13. Células Kupffer, se observan como pequeños puntos rojos, a 40X. Tinción H-E.

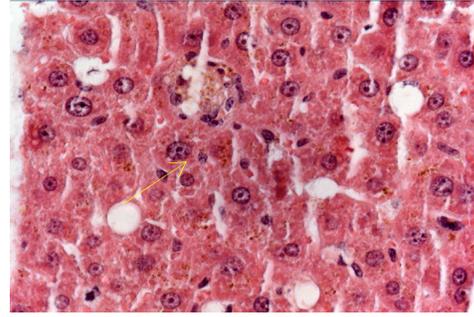


Figura 14. Células de Ito, se observan puntos rojos amarillentos, a 40X. Tinción H-E.

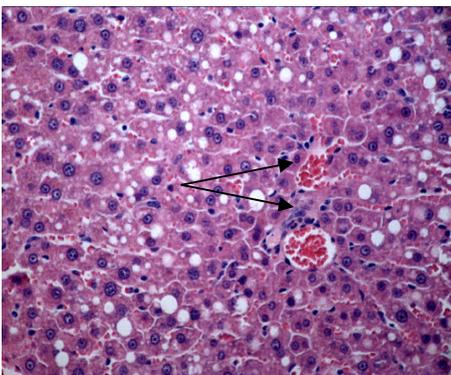


Figura 15. Se observa un conglomerado de células rojas, se le denomina Congestión, a 40X Tinción H-E.

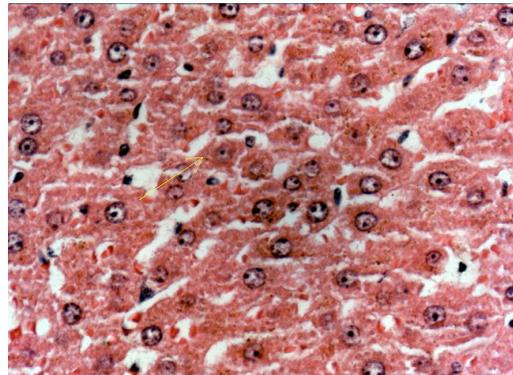


Figura 16. Se observa un color amarillo verdoso, al cual se le denomina pigmento, a 40X. Tinción H-E.

## 8. DISCUSIÓN

### DOSIS LETAL MEDIA

Realizando los cálculos pertinentes se obtuvo la  $DL_{50}$  del compuesto LQM996 obtenida en Jerbos Mongolia, obteniendo un valor de 288.53 mg/kg, sirviéndonos como referencia para no provocar daño en los animales que se utilizaron para realizar otras pruebas.

Con este valor de  $DL_{50}$  obtenido (288.53 mg/kg) y haciendo referencia al cuadro de Casarett and Dull's Toxicology (G. G de Fernicola, 1985), presenta los grados de toxicidad que pueden provocar la dosis letal en humanos, extrapolarlo nuestro valor (30 a 900 mg/Kg) apropiadamente en jerbos, obtenemos que el compuesto LQM996 ejerce una moderada toxicidad. Ahora también en la literatura se reporta que los carbamatos pueden tener valores desde 1 mg/Kg hasta 5000 mg/Kg (Terry y Hutson, 1999), por lo cual el compuesto LQM996 tiene un valor relativamente bajo en carbamatos. Cabe mencionar que en un estudio anteriormente realizado para determinar la  $DL_{50}$  en ratones, este compuesto (LQM996), mostró tener casi el doble del valor que reportamos en este trabajo, que fue de 471.16 mg/Kg cuyo diluyente fue dimetil sulfoxido (Márquez, 2002), siendo así al compuesto LQM996 se le atribuiría una toxicidad menor. Sin embargo, en nuestro caso se empleo aceite de canóla como diluyente, debido a que el dimetil sulfoxido mataba a los animales dando el tratamiento vía oral, así el aceite de canóla reporta como el que menos libera radicales libres después de su cocción comparado con el aceite de maíz y este último ya ha sido empleado en otros estudios como diluyente de compuestos orgánicos que no se disuelven en agua; asimismo, existe diversos reportes que mencionan la diferencia de toxicidad de un compuesto dependiente de la especie empleada, los jerbos de Mongolia es una especie muy sensible que se estresa fácilmente afectando su metabolismo, lo que contribuye a la determinación de estos valores en la  $DL_{50}$ . Por lo que a nuestro modelo animal se refiere, se pueden trabajar bien diversas dosis que no sean muy altas, para poder realizar diferentes tipos de pruebas.

## ACTIVIDAD BACTERIÓSTATICA Y BACTERICIDA EN SUERO DE JERBOS DE MONGOLIA PREVIA ADMINISTRACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

En esta técnica *ex-vivo*, los jerbos son administrados con diferentes antibióticos, así como el compuesto LQM996, se obtiene sangre de los animales a diferentes tiempos, retándose los sueros contra un cultivo de la cepa *Helicobacter pylori* ATCC 43504. Esto nos permitió determinar el tiempo en que el compuesto LQM996 tiene la acción bactericida en sangre.

En el cuadro 11 se muestran los títulos bacteioestáticos y bactericidas para el compuesto LQM996 a diferentes dosis de 90 y 180 mg/kg, se trabajaron a estas dosis debido a que la  $DL_{50}$  fue de 288.53 mg/Kg y se tomó la tercera parte de este valor, para tener un margen confiable de que los animales no murieran. Así pues para Amoxicilina y Metronidazol, teniendo que para el primero a la dosis de 90 mg/kg no demostró ser bactericida a ninguno de los tiempos estudiados, aunque se observó efecto bacteriostático parcial (cambios morfológicos de las colonias), y a la dosis de 180 mg/kg se observó un poder bactericida adecuado a los 60 minutos de  $>1:32$ , con un poder bacteriostático de  $>1:64$ ; mientras que los animales tratados con Amoxicilina presentaron un poder uniformemente bactericida  $>1:64$  a los 60 minutos, y para el Metronidazol su poder bacteriostático a los 30 minutos fue de 1:16, mientras que para los 60 minutos fue de 1:32, siendo que el poder bactericida fue de 1:16 para los dos tiempos. Ningún efecto, ni bacteriostático ni bactericida, se observó con los animales que solo recibieron el diluyente. Con se puede decir que el compuesto LQM996 no demostró actividad bactericida en suero a 90mg/Kg, sin embargo, a la dosis de 180 mg/kg mostró igual actividad a Amoxicilina en el tiempo de 60 minutos para títulos inhibitorios, o bacteriostáticos, mientras que para títulos bactericidas fue mayor la actividad de Amoxicilina (1:64) que el compuesto (1:32) y por último presentó mayor actividad que el Metronidazol.

Para poder verificar que la prueba estuvo bien realizada el manual de procedimientos de la CLSI establece que deberán realizarse conteos de las colonias y establecer el control de calidad de la misma debido a que, ya que el número de colonias debe estar de 20 a no más de 200 colonias ( Linton 2003). Realizando los cálculos pertinentes, se obtuvieron los resultados de el cuadro 11, en la cual se da por válida la prueba para los tres tratamientos administrados ya que los valores entran dentro del valor de no rechazo, ya que estos están con base diez a la siete como lo indica la NCCLS ahora CLSI.

Teniendo lo anterior en cuenta, se determina el punto final bactericida, el cual indica si el tratamiento es o no letal para el microorganismo probado y la dilución bactericida, la cual como se refieren en los resultados una dilución de 1:32 es adecuada, en este sentido, sólo amoxicilina mostró una adecuada acción bactericida a los dos tiempos probados, y en el caso de metronidazol después de 60 minutos de haber tratado al animal. LQM996 mostró actividad bactericida adecuada sólo después de 60 minutos de inoculación y en la dosis mayor, lo que significa muy probablemente que el carbamato sintetizado requiera de otro diluyente u otra vía de administración, que le permita llegar más rápido a torrente sanguíneo y de ahí difundirse a los órganos correspondientes; lo anterior debido a que se tiene conocimiento que son los aceites lo que se metabolizan más lento.

#### CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA

En esta prueba las ventajas son la reproducibilidad de los resultados y el crecimiento satisfactorio del microorganismo. Se trabajaron 20 muestras clínicas de pacientes infantiles y una cepa de *Helicobacter pylori*, ATCC (43504), poniéndolas frente a Amoxicilina, Claritromicina, Metronidazol y el compuesto LQM996. En el Cuadro 18 podemos observar los resultados; para el primer antibiótico los valores van desde 0.06 hasta 0.12 µg/mL, lo cual indica que el microorganismo es sensible a este fármaco, así como para Claritromicina se puede ver que los valores están entre 0.03 y 0.06, esto al igual que el otro fármaco es sensible, mientras que para el Metronidazol se ve claramente que todas las muestras son resistente, lo anterior es muy semejante a lo reportado en la literatura; estos se debe en gran medida a el uso indiscriminado del medicamento entre otros factores, y por último el compuesto LQM996, en el cual se puede ver una uniformidad en la muestras tratadas, así como en la cepa de *Helicobacter*

*pylori*, ATCC 43520, ya que el valor de la concentración mínima inhibitoria fue 16µg/mL, teniendo en cuenta esto se puede observar que el compuesto, si puede atacar a la bacteria *Helicobacter pylori in vitro*, este valor se tomó en cuenta para realizar la siguiente prueba (cinética de muerte).

#### CINETICA DE MUERTE

El método de recuento en placa determina la unidad formadora de colonias (UFC), la que se denomina como una célula viva y aislada que se encuentra en un sustrato y en condiciones ambientales adecuadas produce una colonia en un tiempo determinado. Una UFC también puede corresponder a más de una célula, cuando éstas forman parte de grupos unidos fuertemente ya que cada grupo formará una sola colonia. (Perea, 2006).

En la gráfica 1 se observa la cinética de muerte de la bacteria *Helicobacter pylori* frente al compuesto LQM996, donde las concentraciones ensayadas van de 2-64 µg/mL colocándose una cantidad inicial conocida de la cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 43520, la cual fue de  $6 \times 10^8$  UFC/ml, en la que tenemos un Log UFC/mL de 8.77 (al igual que para las demás concentraciones). El comportamiento de la cinética es muy similar entre todos los tratamientos (4 a 3 log UFC/mL), ya que se presenta una meseta a concentraciones de 2 hasta 32 µg/mL, sin embargo a la concentración de 64 µg/mL a las 48 horas se reporta un descenso a valor de cero, lo cual nos indica que se presenta una muerte total de los organismos, teniendo esto presente se puede decir que el compuesto LQM996 ejerce una actividad bactericida.

## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DEL COMPUESTO LQM996 EN *Meriones unguiculatus*

En esta prueba se trabajaron con 7 lotes de jerbos de Mongolia, estos animales se infectaron previamente con la bacteria *Helicobacter pylori*, posteriormente se les administraron diferentes tratamiento solos y combinados, para determinar que tratamiento es el óptimo y combatir el grado de infección de la bacteria (Cuadro 20) además de determinar la toxicidad de los mismos (Cuadro 21), comparados con el compuesto LQM996.

El primer lote de 12 animales fungió como testigo positivo; a estos animales solo se les administró el diluyente que fue el aceite de canola, el cual contiene omega 3 que reduce las lipoproteínas de alta densidad comparados con otros ácidos grasos, así como también sirve como antioxidante celular (Morgado, 2005), además que en este tipo de aceite se pudo disolver perfectamente el compuesto LQM 996. Todos los animales resultaron infectados con la bacteria en diferentes grados, siendo casi la mitad (6 animales) con una infección media y otros con infección fuerte (4 animales) lo cual se puede atribuir a la idiosincrasia de cada animal. Esto sería el control de calidad para la prueba.

En el lote que recibió el compuesto LQM996, se observó que la infección se vio disminuida en diferentes grados hasta la ausencia de infección; para Metronidazol la infección permaneció media y ligera pero no se eliminó; para Amoxicilina combinada con el compuesto LQM996 se observó que la infección tiende de ligera a desaparecer, de igual manera como para el tratamiento de Amoxicilina y MTZ, mientras que en la combinación de Claritromicina y el compuesto LQM996 se observa que la infección desaparece casi en la totalidad de los animales tratados, y por último para Claritromicina y MTZ se observa que la infección no disminuye tanto, ya que de infección fuerte pasa a media, sin desaparecer.

Teniendo en cuenta lo anterior, se hizo la comparación en porcentaje, obteniendo que el mejor tratamiento es el de Claritromicina/ LQM996, ya que presenta el porcentaje más alto de erradicación de la bacteria, que es de 66.66 % que lo denota por 2 de 3 animales sin infección y uno con ligera infección, así como también tenemos que hay tres

tratamientos con un porcentaje igual, pero con diferentes grados de infección y dos tratamientos con 100% infección, lo que querría decir que en éstos, el tratamiento no fue efectivo. Habiendo hecho la comparación de los dos tenemos que Claritromicina/ MTZ no elimina el microorganismo, esto se puede deber a la resistencia bacteriana que existe para ambos tratamientos, ya que hay una alta prevalencia de resistencia a Metronidazol y también a Claritromicina pero en menor grado.

Así mismo para determinar la toxicidad del compuesto LQM996 frente a los demás tratamientos, se extrajo el hígado de los jerbos de Mongolia (Métodos; Sacrificio y procesamiento de órganos de animales, Análisis Microscópico), ya que este tiene funciones sintéticas, excretoras y metabólicas (Parakrama, 1999), que nos dirán si el compuesto es tóxico. Mediante la observación de laminillas al microscopio; en las que se evaluó cada parámetro mediante un determinado número de cruces.

En el Cuadro 21, se pueden observar los diferentes parámetros, teniendo en primera instancia a los microgranulomas (Figura 11), que son un agregado de macrófagos (Parakrama, 1999). Teniendo que en el caso de Amoxicilina combinado con MTZ y Claritromicina combinado con MTZ, se presentan en mayor cantidad los microgranulomas (infección media), mientras que en los demás tratamientos todos resultaron tener una sola cruz y en el caso del aceite de canola (testigo negativo), hubo ausencia de microgranulomas. La importancia de estos radica en que las sustancia persistentes, causan inflamación crónica (Pérez, 1987) debido a que esta sustancia no son antigénicas, pero al producir necrosis celular provocan una respuesta inmunitaria.

Otro de los parámetros analizados en los tejidos fue la congestión (Figura 15), donde todos los tratamientos resultaron ser positivos (infección ligera), excepto el control negativo y el de Claritromicina combinada con el compuesto LQM996, la congestión se debe a la dilatación pasiva de los vasos que se produce de obstrucciones del flujo de salida venoso (Parakrama, 1999), esto podría atribuirse a la pérdida de sangre de los animales, durante el sacrificio, por lo cual se presentaron estos resultados.

Las células Kupffer (Figura 13) son células como los macrófagos, como podemos observar en el cuadro 21, estas células estuvieron presentes, en todos los tratamientos administrados, debido a que son células que se encuentran en el hígado, ya que juegan un papel importante en la fisiología y homeostasis de este órgano (Roberts, 2006), pero a diferencia del último tratamiento, que hubo una mayor proporción de estas células, esto pudiera deberse a que hay mayor cantidad del compuesto, que no se puede eliminar adecuadamente, dando como resultado, una notable capacidad para la fagocitosis, lo que contribuye a la eliminación del material particulado, que pudiera circular por sangre, evitando pudiesen entrar en contacto directo con el hepatocito, que tienen un papel muy relevante en los procesos inflamatorios del hígado ([www.bondisalud.com.ar/37.html](http://www.bondisalud.com.ar/37.html)). Es importante mencionar que las células Kupffer contribuyen en procesos de activación de carcinogénesis hepática (Roberts, 2006).

Para la esteatosis (Figura 12), se obtuvieron casi los mismos resultados, que lo anterior, solo que el control negativo resultó con ausencia de esteatosis y el tratamiento de Amoxicilina combinado con el compuesto LQM996 resultó tener mayor proporción de esteatosis, esto se puede interpretar de la siguiente forma; la esteatosis es la respuesta común del hígado a una variedad de estrés metabólicos (Brunt, 2001), que da como resultado la manifestación inespecífica de una gran serie de factores que interfieren con el metabolismo intermedio, y que actúan favoreciendo el depósito y la síntesis de la grasa en el hígado, dificultando su oxidación y transporte, por el bloqueo en la síntesis de proteínas (Pérez, 1987).

Células de Ito (Figura 14), son lipocitos con capacidad de almacenar lípidos y constituyen el principal reservorio de vitamina A del organismo ( Michalopoulos, 1997). Estas células que al igual que las células Kupffer se encuentran normalmente en hígado. Como se ve en el cuadro 21 solo el compuesto LQM996 es el que presenta estas células a diferencia de los otros tratamientos, posiblemente el compuesto pudiera inducir la síntesis de importantes cantidades de colágeno en respuesta a estímulos inflamatorios (Michalopoulos, 1997).

Las células Kupffer (Figura 13) proliferan y su citoplasma aumenta de tamaño; pueden contener pigmento férrico (Figura 16) y bilis (Pérez, 1987), debido a que los eritrocitos se destruyen con rapidez en el tejido intersticial y el hierro de la molécula de hemoglobina es ingerido por macrófagos en el intersticio y convertido a hemosiderina, que presenta un pigmento granulomatoso pardo, en el citoplasma de los macrófagos (Parakrama, 1999). En cuanto al pigmento (Figura 16) se vio que tres tratamientos lo presentaron (cuadro 21), siendo el Metronidazol nuevamente solo y combinado con Claritromicina, así como también el compuesto LQM996.

Teniendo en cuenta todo lo anterior se puede observar que en casi todos los tratamientos resultan ser positivos a los parámetros contemplados, pero si se hace referencia con el control negativo vemos que solo este tiene células Kupffer, ya que como se sabe son células que se encuentran en hígado, pues el 60% de este, esta constituido por hepatocitos y el resto por células endoteliales y Kupffer (Pérez 1987), basados en esto y en los parámetros de cantidad de Microgranulomas, Esteatosis, Células Kupffer, de Ito y Colestasis, sin restar importancia a los demás parámetros ya que estos se dan debido a los anteriores, se pudo discernir cual es, dentro de todos los tratamientos, el más tóxico.

Así pues el tratamiento tóxico resulta ser Claritromicina combinada con Metronidazol, ya que tiene mayor número de cruces tanto en Microgranulomas, en células Kupffer y en Esteatosis, los cuales son parámetros de toxicidad.

En este tratamiento (Claritromicina combinado con MTZ), como nos podemos dar cuenta en los tratamientos que contienen MTZ, se nota que en algunos casos los parámetros suelen tener más cruces que en otros, así pues, tal vez en este caso sea el MTZ, el que este actuando como tóxico, debido a que éste tiene mayor cantidad de Microgranulomas, lo que nos está indicando un daño inflamatorio, en la cual está involucrada una compleja red de comunicaciones intra e intercelulares, entre los hepatocitos (Adams, 1994; Williams, 1987). En este proceso están involucrados células endoteliales, monocitos, linfocitos, neutrófilos, así como con las células de Ito y células de Kupffer (Lands, 1995), pues participan como respuesta crónica de compuestos tóxicos administrados (Roberts, 2006); así como también incrementan aún más la actividad inflamatoria de éstos (Sherman, 1994).

La activación de los neutrófilos origina una producción incrementada de radicales libres de oxígeno (iones superóxido y peróxido de hidrógeno) (Aderem, 1993; Newberger 1995). La Esteatosis que se presenta, predice que puede haber un daño en el metabolismo de los lípidos, por lo cual existe una acumulación de grasa, así como también se puede producir falta de secreción de bilis; esta anomalía es un resultado común del daño hepatocelular debido a la reacción a ciertos fármacos (Sherman, 1994), y un posible daño biliar en un lapso de tiempo de quince días, teniendo un año y medio de infección los jerbos tratados, lo cual conlleva a que se presente la Colestasis.

El tratamiento menos tóxico, resultó ser Claritromicina combinado con el compuesto LQM996, como se puede observar en el cuadro 21, ya que es el que tiene menor cantidad de cruces en cada uno de los parámetros dándonos cuenta que es el óptimo, así como es importante resaltar que este mismo tratamiento, fue el que mejor eliminó al microorganismo (cuadro 20). Así pues, se ve el compuesto LQM996 combinado con la Amoxicilina sería el segundo tratamiento que resulta ser menos tóxico, ya que esta presenta congestión a diferencia del anterior.

Se compararon los parámetros con el grado de infección, el compuesto LQM996 con el MTZ, resultan ser similares, pero diferentes en congestión, tal vez esto se deba a la composición de los sustituyentes del compuesto, pues si recordamos este se sintetizó en base a la influencia teórica de compuestos antihelmínticos y antibacterianos benzimidazólicos (Arratia, 2004), en los que estaría involucrado el MTZ. Así mismo esto lo se sustenta observando que en el tratamiento con el MTZ y combinado con la Claritromicina resulta ser el más tóxico en contraste la Claritromicina combinada con el compuesto LQM996 es el menos tóxico, por lo que se deduce que el Metronidazol es el causante de la toxicidad generada en el hígado de los animales. Por tanto resulta ser que el compuesto LQM996 da mejores resultados combinado con otros antibióticos.

## 9. CONCLUSIONES

- El compuesto LQM996 presentó una dosis letal 50 ( $DL_{50}$ ), determinada en *Meriones unguiculatus*, de 288.53 mg/kg
- Los Títulos Inhibitorios y Bactericidas del compuesto LQM996 a la dosis de 90 mg/kg no demostraron ser bactericida, aunque se observó efecto bacteriostático parcial (cambios morfológicos de las colonias), y a la dosis de 180 mg/kg se observó un poder bactericida adecuado a los 60 minutos de  $\geq 1/32$  con un poder bacteriostático de  $\geq 1/64$ .
- El compuesto LQM996 es declarado letal para la bacteria *Helicobacter pylori*, dando un punto final bactericida es  $3.5 \times 10^3$  UFC/mL a los 30 minutos y  $3.0 \times 10^2$  UFC/mL a los 60 minutos que cae por debajo del valor de rechazo.
- La Concentración Inhibitoria Mínima del compuesto LQM996 en 19 muestra de pacientes infantiles y la cepa ATCC 43520 *Helicobacter pylori* fue de 16  $\mu$ g/mL, el cual es un valor aceptable.
- El compuesto LQM996 ejerce una actividad bactericida a las 48 horas a una concentración de 64  $\mu$ g/mL, pues se presenta una muerte total de organismos vivos (*Helicobacter pylori*).
- El mejor tratamiento para la eliminación de la infección de la bacteria *Helicobacter pylori* en Jerbos de Mongolia, es la combinación de Claritromicina con el Compuesto LQM996, presentando una alta erradicación de la bacteria.

- El tratamiento menos tóxico fue el de Claritromicina combinado con el Compuesto LQM996, y el tratamiento más tóxico fue el de Claritromicina combinado con Metronidazol en *Meriones unguiculatus*.
  
- El compuesto LQM 996, combate a la bacteria *Helicobacter pylori*, aunque requiere de altas dosis, y es más efectivo en combinación con otros antibióticos, ya que da mejores resultados que por si solo, así como es necesario realizar otras pruebas pre-clínicas que conlleven a que en un futuro pueda servir como alternativa para la erradicación de está bacteria.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams David. (1994). Leucocyte adhesion molecules and alcoholic liver disease. *Alcohol & Alcoholism*,;29(3):249-260.
2. Aderem Alan. (1993). How cytokines signal messages within cells. *J Infect Dis.* 167(Suppl 1): S2-7.
3. Améndola R, Racca J, Barrantes C et al. (2001). Sensibilidad de *Helicobacter pylori* a los distintos antibióticos en la Argentina. *Acta Gastroenterol Lat Am*, 4 (Supl):169.
4. Arratia, Jenny. (2004). Estudio del daño al ADN en células de estómago de ratón administrado con los derivados carbámicos LQM 919 y LQM 996. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
5. Bilardi C, Marais A, Birac C et al. (1999). Characterization of the rdxA gene and the gene encoding the NAD(P)H-flavin oxidoreductase in metronidazole resistant *Helicobacter pylori* strains., United European Gastroenterology Week, Abstract 0.5.06.
6. Brunt EM, Nonalcoholic Steatohepatitis. 2001. Definition and Pathology. *Seminars Liver Disease.* 21: 3.
7. Cabrita J, Oleastro M, Matos R et al. (2000). *Helicobacter pylori* resistance and use of antibiotics in Portugal. *Gut*; 47 (Suppl I) :A107.
8. Campos-Sepúlveda Alfonso Efraín et al. (2001). Aprendizaje basado en problemas (ABP)“La huerta de Arnulfo”. *Rev Fac Med UNAM.* Vol.44 No.6 Noviembre-Diciembre. Pp 265-268.
9. Depuydt S, Vogelaers P. et. al. (2005). Colonization status and appropriate antibiotic therapy for nosocomial bacteremia caused by antibiotic-resistant Gram-negative bacteria in an intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*;26:575-579.
10. G. G de Fernícola Nilda. (1985). *Nociones básicas de Toxicología.* Centro de Estudios Avanzados, IPN.

11. Guerrero, Juana. (2002). Determinación de la concentración mínima inhibitoria de nuevos derivados del ácido carbámico contra *Helicobacter pylori*. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
12. Goodman L.S Gilman, (1995). Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 14<sup>a</sup> edición. Interamericana. México.
13. Guofei Dai, et. al. (2005). Bactericidal Morfological effects of NE-2001, a novel synthetic agent directed against Hecobacter pylori. American Sociery for Microbiology. 49(8): 3468-3473.
14. Hernández. Mayra. (2003). Estudio genotóxico de fenilcarbamatos en cultivo de linfocitos humanos por medio de frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlan Izcalli, México.
15. Huang J-Q, Hunt R H. (1999).Impact of metronidazole-resistant H. Pylori strains on PPI-based triple therapies: a meta-analysis. 45 (Supl III) :A108
16. Hyde D K, Buckley M J, O'Morain C A. (1997).Clinical relevance of antimicrobial resistance in Helicobacter pylori infection. In: Moran A P, O'Morain C A: Pathogenesis and host response in Helicobacter pylori infections. Hamburg, Normed Verlag,. Pp 230-241
17. Jiménez, E., Flores, A., Ángeles, E., Martínez, P., López, C., Castañeda, H., y Pérez, U. (2003). In vitro anti-giardial activity of IRE-7B, two ethyl-phenylcarbamate derivatives. La revista de investigación Clínica, 02-076.
18. Kwon D H, Lee M, Kim J J. (2001). Emergence of acquired- multidrug resistant Helicobacter pylori among clinical isolates. DDW. Abstract 2616.
19. Lands William. (1995)Cellular signals in alcohol-induced liver injury: A review. Alcohol Clin Exp Res. 19(4):928-938
20. Linton, A.; Howe, K.; Bennett, P.M.; Richmond, M.; Whiteside, E. (2003). CLSI/NCCLS Documento M21-T (3). Normas de desempenho para test de sensibilidade antimicrobiana: suerum. Inhibitory and Bactericidal Titers, Vol 25 (1) : 5.17.
21. Livermore D. Acquired. (1997). Carbapenemases. J. Antimicrob Chemother; 39: 673-6.
22. Livermore D. (1993). Carbapenemases: the next generation of  $\beta$ -lactamases. ASM News. 59.

23. 11. Livermore D. (1992). Interplay of impermeability and chromosomal  $\beta$ -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 36:2046-8.
24. Livermore D, Woodford N. (2000). Carbapenemases: a problem in waiting?. *Curr Opin Microbiol.* 3:489-95.
25. Lorke, D.(1983). A new approach to practical acute toxicity testig. *Arch. Toxicol.* 54:275-278.
26. Luna P, Farías R, Boerr L et al: (1998). Terapéutica de la infección por *Helicobacter pylori*. En: Corti R y col: *Helicobacter pylori*. Buenos Aires. Pp 303-310.
27. Marais A. et. al. (1999). Direc detection of *Helicobacter pylori* resistance to macrolides by a polymerase chain reaction/DNA enzyme immunoassay in gastric biosy specimes. *Gut.* 44: 463-467.
28. Márquez , Pilar (2002). Actividad antígenotóxica de 4 derivados carbámicos en ratón y análisis de la relación de dicho efecto con su estructura química. Tesis de Maestría. ENCB, IPN, México.
29. Masao A. Kanuma et. al. (2002). The evaluation of putative virulence factors of *Helicobacter pylori* gastroduodenal disease by use of a short-term Mongolian Gerbil infection model. *The journal of infectious diseases.* 185: 341-347.
30. Mégraud F. Bacterial resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. (2000). *Actas III Simposio Internacional de Patología gastroduodenal, Bariloche,* pp15-16.
31. Michalopoulos GK, DeFrances MC. (1997). Liver regeneration. *Science;* 276:60-66.
32. Minero, Claudia. (1997). Comparación de la eficacia anticestódica de dos principios de nueva síntesis contra el prazicualtel usando *H. nana* como modelo en ratones. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
33. Mitchell H M, Brusentsev S, Hazell S L et al. (2000). A high level of primary resistance to metronidazole and clarithromycin in previously untreated symptomatic patients presenting for endoscopy in Australia. *47(Suppl I) :A107*

34. Morgado N, Rogotti A, et. al. (2005). Comapative effect of fish oil feeding and dietary fatty acids on plasma lipoproteins, biliary lipids, and hepatic, Expresión of proteins involved in reverse cholesterol transport in the rat, *Ann nutr Metab.* 14;49(6): 397-406.
35. Moreno, Enrique. (1997). Diseño molecular y síntesis orgánica de fenilcarbamatos de etilo con actividad antihelmíntica. Relación estructura química-actividad biológica. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
36. Najera, Rocío. (1995). Efectos carcinogénicos de los insecticidas de uso permitido en México. Revisión bibliográfica. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
37. Newberger P, Chovanec M, Cohen H. (1995). Activity and activation of the granulocyte superoxide-generating system. *Blood*; 55(1): 85-92.
38. Pagniez G, Radice M, Amoroso A, Famiglietti A, Gutkind G. *Class.* (2004). 1 integron containing a new variant of VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. 44th. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abstract C1-p 293, Washington D.C., USA.
39. Parsons H, Carter M J, Sanders D S et al. (2000). Incidence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance and relationship to age, sex and socio-economic status.46 (Suppl II):A52
40. Parakrama Chandrasoma, Clive R. Teylor. 1999. *Patología General. El manual Moderno.* 3a edición. México, D.F.
41. Penston J G, McColl K E L. (1997). Eradication of *Helicobacter pylori*: an objective assessment of current therapies. *Br J Clin Pharmacol.* 43:223-243.
42. Perea, Maria Luisa. (2006), Preparaciçon de una Antçigeno para la determinaciön de anticuerpos contra *Erysipelotrix rhusiopathie* en suero de cerdos, Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
43. Perez Tamayo Ruy. 1987. *Principios de Patología.* La Prensa Mexicana. 2ª Ediciön. México.
44. Piña, Gustavo. (1994). Frecuencia de *Helicobacter pylori* en pacientes infectados con VHI del Hospital de Infectología del Centro Médico la Raza. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.

45. Quiroz D M M, Rocha G A, Barbosa D V C et al. (2001). Factors associated with clarithromycin resistance in a developing country. *Gut*. 49 (Suppl II): A90.
46. Reyes Adriana. (2000). Presencia de los genes *cag A*, *pic B E*, *ice A* en colonias de *H. pylori* aisladas en niños y adultos con enfermedad ácido péptica. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
47. Roberts Ruth A. (2006). Kupffer cells therefore appear to play a central role in the hepatic response to toxic and carcinogenic agents. *Role of the Kupffer Cell in Mediating Hepatic Toxicity and Carcinogenesis*. *Society Toxicology*. 96(1):2-15.
48. Santillán, Odilón. (1993). Síntesis de carbamatos a partir de aminas aromáticas. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
49. Sherman D, Williams R. (1994). Liver damage: mechanisms and management. *Bri Med. Bull*.30 (1):124-138.
50. Stone G G, Shortridge D, Flamm R K et al. (1996). Identification of a 23S rRNA gene mutation in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 1:227-228. (21,23).
51. Tamber S, Ochs M, Hancock R. (2006). Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*. 188: 45-54.
52. Tankovic J, Lamarque D, Lascols C et al. (2000). Primary and secondary clarithromycin resistances of *H. Pylori*: impact on efficacy of the omeprazole-amoxicillin-clarithromycin (OAC) triple therapy. 47 (Suppl I) :A105
53. Taylor D E. (1997). Antibiotic resistance mechanisms of *Helicobacter pylori*. In: Moran A P, O'Morain C A: Pathogenesis and host response in *Helicobacter pylori* infections. Hamburg, Normed Verlag. Pp 101-109
54. Terry R y Hutson D. (1999) Parte dos: Insecticidas and Fungicidas. In *Metabolic Pathways of Agrochemicals*. The Royal Society of Chemistry Information Services. U.S.A.
55. Watanabe Takeshi, et. al. (1998). *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian Gerbils. *Gastroenterology*. 115; 642-648.)
56. Watanabe M., Iyobe S., Inoue M. (1991). Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 35: 147
57. Williams R., Barry R. (1987). Free radical generation by neutrophils: a potential mechanism of cellular injury in acute alcoholic hepatitis. *Gut*. 29(3): 249-260.

58. [www.biol.unlp.edu.ar/toxicología/seminarios/parte\\_21/plaguicidas.html](http://www.biol.unlp.edu.ar/toxicología/seminarios/parte_21/plaguicidas.html)
59. [www.gratistodogratis.com.ar/sitios/tiempolibre/roedores/pagina3.php](http://www.gratistodogratis.com.ar/sitios/tiempolibre/roedores/pagina3.php)
60. [www.dirat.com.ar/tl\\_roedores3.htm](http://www.dirat.com.ar/tl_roedores3.htm)
61. [www.bondisalud.com.ar/37.html](http://www.bondisalud.com.ar/37.html)
62. [www.issste.gob.mx/website/comunicados/boletines/2006/febrero/b031\\_2006.html](http://www.issste.gob.mx/website/comunicados/boletines/2006/febrero/b031_2006.html)