



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Evaluación *in vivo* de cuatro derivados del 5-(1naftiloxi)-1H-bencimidazol carbamato de metilo en un modelo de triquinelosis murina

TESIS

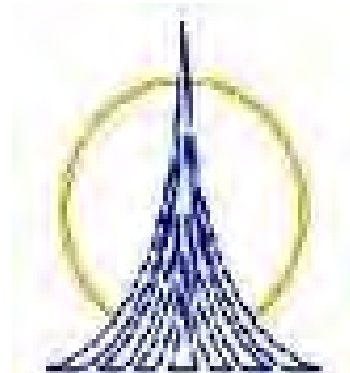
**PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN QUIMICO
FARMACEUTICO BIOLOGO**

PRESENTA

DENNYS IVAN FERNÁNDEZ SOLANO

DIRECTOR DE TESIS: DRA. LILIAN YPEZ MULIA

ASESOR INTERNO: Q.F.B PATRICIA VIDAL MILLÁN



MEXICO D.F

NOVIEMBRE 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

***A TI QUE ME DISTE VIDA Y LUEGO ME ENSEÑASTE
COMO VIVIRLA***

GRACIAS MAMA.

AGRADECIMIENTOS:

El primero y mas grande a ti madre, la persona que más admiro en mi vida; solo con estas palabras puedo hacerte justicia.

A mis hermanos que han sido el aliciente más grande para mi superación y fortaleza.

A mi novia el ser que trajo amor a mi vida.

A la Dra. Lilian y todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Parasitología en la Unidad de Investigación Medica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias que me apoyaron y alentaron en todo momento para la conclusión de este trabajo.

A todos y cada uno de los profesores que me instruyeron en la FES ZARAGOZA por su titánica labor educativa y su calidad humana.

A la gran cantidad de amigos y compañeros con los que conviví en la FES.

A la gran familia que conformamos el cuerpo técnico, los jugadores, la porra y los egresados de la Selección de Futbol Rápido. Gracias por enseñarme a sentir en el alma los colores universitarios.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

VOCAL DRA. LILIÁN YÉPEZ MULIA

SECRETARIO Q.F.B PATRICIA VIDAL MILLÁN

SUPLENTE Q.F.B GABRIEL A. ROMERO DÍAZ

SUPLENTE Q.F.B BEATRIZ E. ARELLANO PIMENTEL

El presente trabajo se realizo en el Laboratorio de Parasitología de la Unidad de Investigación Medica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría en Centro Medico Nacional XXI del IMSS; bajo la dirección de la Dra. Lilián Yépez Mulia.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	2
Triquinelosis.....	2
Epidemiología.....	2
Taxonomía.....	4
Morfología.....	5
Ciclo de vida.....	7
Aspectos Clínicos.....	10
Diagnóstico.....	12
Tratamiento.....	13
Metabolismo del Albendazol.....	15
Mecanismo de Acción y Resistencia.....	16
Nuevos Derivados Bencimidazólicos.....	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
OBJETIVOS.....	24
HIPÓTESIS.....	24
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	25
MATERIALES.....	26
DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	27
RESULTADOS.....	32
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIONES.....	37
PERSPECTIVAS.....	38
REFERENCIAS.....	39

Desde los comienzos de la humanidad se ha descrito gran número de afecciones causadas por una diversidad de seres vivos que parasitan al hombre, en la actualidad las enfermedades parasitarias siguen constituyendo un problema de salud a nivel mundial que aun no ha podido ser erradicado; la disminución de la fuerza laboral, la dificultad en el aprendizaje y las deficiencias en el crecimiento resultan consecuencias menores, pues en muchos casos puede sobrevenir la muerte.

Aunque la población de las naciones en vía de desarrollo resultan más afectadas, debido a que las prácticas sanitarias son insuficientes, conllevando a que se presenten nuevos casos diariamente y además de que la atención en salud que reciben es deficiente; las parasitosis no son exclusivas de estos países, existen parasitosis en países desarrollados como la triquinosis que causan grandes estragos, pues es una infección sistémica que requiere de tratamientos largos que llegan a ser infructuosos debido a que los antiparasitarios usados no tienen el efecto esperado sobre el parásito en su fase parenteral.

Los antiparasitarios actuales fueron diseñados hace ya varios años y por mucho tiempo no se tuvo necesidad de mejorarlos, sin embargo su uso indiscriminado ha terminado por generar resistencia, además, muchos como los bencimidazoles presentan problemas de solubilidad limitando su acción a las parasitosis intestinales, algunos además son tóxicos y aunque algunos miembros como el albendazol son de amplio espectro no existe el antiparasitario universal.

Desde el punto de vista farmacéutico se ha tratado de mejorar los antiparasitarios actuales con el uso de acarreadores como las dextrinas o con nuevas formulaciones que resuelvan el problema de la solubilidad, sin embargo estas acciones parecen de corto alcance pues no solucionan el problema de la resistencia.

Por lo antes mencionado, es necesario contar con nuevas moléculas antiparasitarias con mejores características fisicoquímicas, que sean eficaces, no tóxicas, y que cuenten con un amplio espectro antiparasitario.

Las enfermedades parasitarias (protozoosis y helmintiosis), representan un problema de salud pública, estimándose que un cuarto de la población total mundial tiene alguna parasitosis. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que para el año 2000, alrededor de 3,500 millones de habitantes en el mundo estarían parasitados y aproximadamente 450 millones padecerían de alguna enfermedad parasitaria, de ellos la proporción mayor corresponde a la población infantil. De hecho 65,000 muertes anuales pueden ser atribuidas a infecciones por nematodos gastrointestinales¹⁻⁴.

Las parasitosis ocasionan pérdidas económicas importantes, principalmente en países en desarrollo. En México, las infecciones helmínticas intestinales fueron evaluadas como causantes de una pérdida económica equivalente a 7 semanas de ingreso por año en 54% de las familias afectadas⁵⁻⁷.

TRIQUINELOSIS

La triquinelosis es la enfermedad cuyo agente etiológico son los nematodos del género *Trichinella*. Su distribución es cosmopolita y el mecanismo de transmisión al humano es a través del consumo de carne fresca y embutidos contaminados con las larvas infectivas del parásito, principalmente de cerdo, caballo, perro y algunos animales silvestres como el oso y el jabalí⁸⁻¹¹.

EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia global de la triquinelosis es difícil de evaluar, pero se calcula que alrededor de 11 millones de personas podrían estar infectadas con el parásito. La Comisión Internacional sobre Triquinelosis (ICT) reportó de 1995 a junio de 1997 más de 10,000 casos humanos de triquinelosis. En algunos países se considera que la triquinelosis es una enfermedad emergente y/o reemergente. En los Balcanes,

Rusia y en algunas partes de China y Argentina la triquinelosis se considera un problema de salud alarmante.

Desde 1964, en China se han registrado más de 5 brotes de triquinelosis humana, involucrando alrededor de 25,161 casos con 240 muertes; en Argentina en 2005, se registraron más de 80 casos de triquinelosis en varias de sus provincias, y más recientemente en 2006, se registró un brote de triquinelosis en Alemania del Este, que involucró a 17 personas. En Francia e Italia se han registrado 3000 casos de triquinelosis en los últimos 25 años por consumo de carne de caballo.^{9, 12,13}

En México la presencia de *T. spiralis* fue reportada por primera vez en cadáveres humanos durante el siglo XIX. Subsecuentemente, la triquinelosis en humanos, cerdos, ratas, gatos y perros ha sido reportada en varios estados de México (Fig. 1). En 1985 se registró en la Ciudad de México el mayor brote de triquinelosis humana de nuestro país cuando empleados gubernamentales consumieron carne mal cocida de cerdo, resultando en 65 personas infectadas.¹⁴

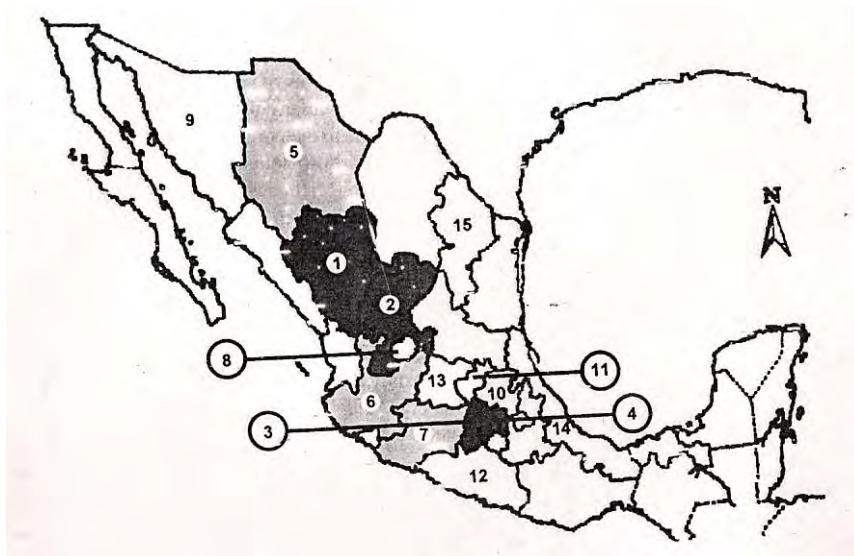


Figura 1. Incidencia de Trichinellosis en México. Los Estados con Alta incidencia (■) incluyen Durango, Zacatecas, Edo de México y Distrito Federal; Los Estados que se agrupan con incidencia media (▒) son: Chihuahua, Jalisco, Michoacán; Estados con baja incidencia (□): Aguascalientes, Sonora, Hidalgo, Querétaro, Guerrero, Guanajuato, Veracruz, y Nuevo León.

La Organización Internacional de Epizootias (OIE) tiene registrado en México para 2002 y 2003, 31 y 77 casos de triquinelosis humana; aunque las cifras pudieran

ser aún más elevadas de lo que se piensa, ya que puede haber muchos individuos infectados que no revelan manifestaciones clínicas.

En el Hospital General de México, en un estudio se encontró que entre el 4 y 5% de autopsias realizadas a los pacientes, tenían *Trichinella* en alguno de sus músculos; sin embargo ninguno de estos pacientes había muerto de triquinelosis.¹⁵⁻¹⁶

De esta forma se piensa que el número de casos de triquinelosis no refleja la situación epidemiológica verdadera pues en los pacientes asintomáticos difícilmente se diagnóstica la infección; por otro lado, el monitoreo de las principales fuentes de infección ayuda a vislumbrar la dimensión del problema, por ejemplo en el año 2000, del análisis de 539 muestras de carne de cerdos de traspatio del área de Toluca en el Estado de México, se detectó el 12.4% de muestras positivas para *T. spiralis*.¹⁷⁻¹⁸

TAXONOMÍA

Originalmente se reconocía como única especie a *T. spiralis*, pero en diversas áreas geográficas se han descrito parásitos que, aunque morfológicamente son similares, presentan sutiles deferencias en sus características biológicas, isoenzimáticas, de infectividad, fertilidad, presencia/ausencia de célula nodriza, resistencia al congelamiento, viabilidad en cadáveres y de inducibilidad de choque anafiláctico. La clasificación actual de *Trichinella* se determina por medio de un análisis de PCR multiplex-, permitiendo la determinación 7 especies y tres genotipos T6, T8 y T9, que comparten algunas características con otras especies.¹⁹⁻²⁰

Phylum: Nematelminthes

Clase: Nematoda

Orden: Eneplida

Familia: Trichinellidae

Género: *Trichinella*

Especie: *T. spiralis*

T. pseudospiralis

T. britovi

T. nativa

T. nelsoni

T. murrelli

T. papuae

Todas las especies de *Trichinella* son infectivas para el hombre y se distribuyen en zonas particulares de todo el mundo (Fig. 2). *T. spiralis* en regiones cálidas y tropicales, con presencia en animales salvajes y domésticos; *T. nativa* y T6 son parásitos de animales carnívoros de las regiones árticas y sub árticas; *T. britovi* es el agente etiológico de la triquinosis silvestre en las regiones cálidas de Eurasia y *T. murrelli* lo es en Norteamérica. A *T. nelsoni* se le encuentra en África, al sur del desierto del Sahara; *T. pseudoespiralis* es cosmopolita y la presencia de *T. papuae* solo se ha documentado en Nueva Guinea.²¹

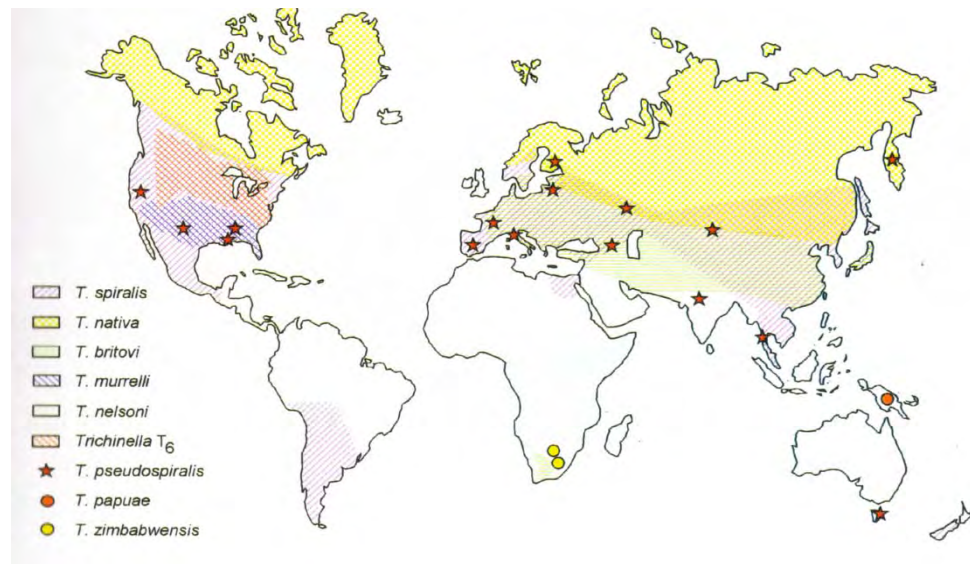


Figura 2. Distribución mundial de las distintas especies conocidas de *Trichinella*, en México solo se ha documentado la presencia de *T. spiralis*.

MORFOLOGÍA

T. spiralis es un nematodo dioico, de pequeño tamaño y con una boca pequeña que presenta un estilete y un esófago glandular llamado esticosoma con 50-55 células discoides especializadas denominadas esticositos (células de secreción y soporte) dispuestas en hileras. Los machos miden entre 1.4 y 1.6 mm de longitud por 40 µm

y presentan dos apéndices caudales lobulados sin espículas copulatrices a menudo denominados mamelones copulatrices.

Las hembras miden de 3 a 4 mm de longitud por 60 μm de diámetro y tienen el extremo superior romo y redondeado; poseen un solo ovario que se localiza en la parte superior y produce óvulos con tres cromosomas, luego sigue el útero y después la vulva cerca de la mitad del esticosoma; el oviducto, el receptáculo seminal, el útero y la vagina, forman un canal casi recto hasta la vulva que se abre a nivel del extremo distal del esófago (Fig. 3). Los machos (Fig. 4), producen espermatozoides no flagelados de dos o tres cromosomas. Las células somáticas de las hembras tienen seis cromosomas y la de los machos cinco.²²⁻²³

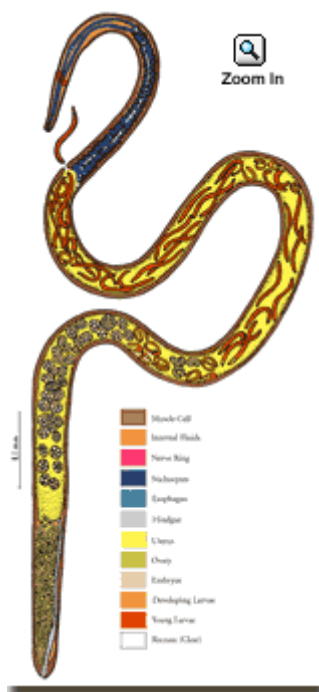


Figura 3. Hembra Adulta *T. spiralis*

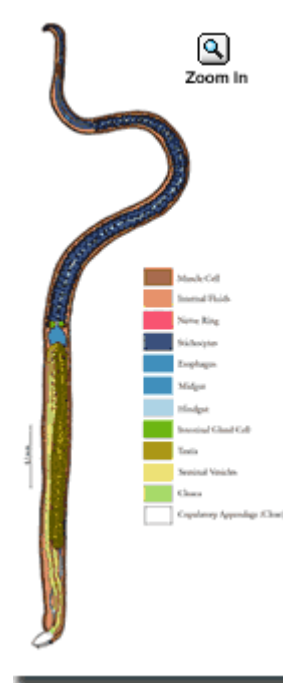


Figura 4. Macho Adulto *T. spiralis*

Las larvas recién nacidas (LRN) miden 120 μm de longitud por 7 μm de diámetro, invaden músculo esquelético y se transforman en larvas musculares (LM) (Fig. 5), las que miden 1.2 mm de longitud por 40 μm de diámetro y se encuentran dentro de una estructura especializada denominada “célula nodriza”, donde se puede encontrar a más de una LM.²⁴

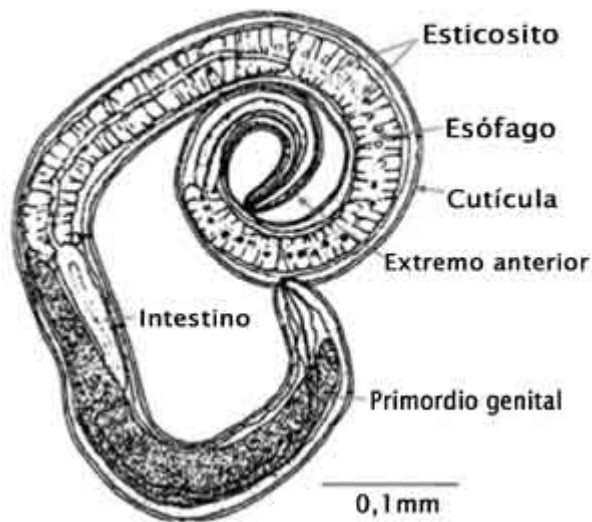


Figura 5. Larva Muscular de *T. spiralis*

Las LM y los adultos tienen la parte posterior del cuerpo ligeramente más ancha que la anterior. El esófago de la LM consiste en una parte anterior pequeña y muscular, y una parte posterior más ancha y glandular integrada por el esticosoma que contiene a los esticositos que poseen gránulos secretores cuyos productos antigénicos se descargan hacia la luz del esófago y de ahí al exterior del parásito. Los esticositos se dividen en alfa y beta, lo que depende del tamaño de los polipéptidos que secretan (los alfa secretan polipéptidos mayores de 50 kDa y los beta un polipéptidos de 48 kDa), su morfología y el gradiente de sedimentación que presentan. El tubo digestivo se prolonga hasta el intestino del tipo tubular y culmina en un ano²⁵⁻²⁶

CICLO DE VIDA DE *Trichinella spiralis*

T. spiralis es un parásito con poca predilección por un hospedador específico, pues se ha observado en estudios experimentales como en estudios poblacionales de animales salvajes, que puede alojarse en casi cualquier mamífero, siendo el hámster chino la única excepción.

El ciclo de vida de *T. spiralis* (Fig. 6) comprende la fase enteral, representada por el organismo adulto, y la fase parenteral, representada por la LRN y la LM.²²

FASE ENTERAL

Se inicia cuando la carne de un animal infectado con la LM del parásito, es ingerida cruda o insuficientemente cocida, y por acción de los jugos gástricos, las LM son liberadas y llegan al intestino delgado donde penetran la mucosa intestinal y maduran a su estado adulto, se ha sugerido que las larvas liberan proteasas con las que logran alojarse en las células epiteliales columnares, ya que las larvas de este estadio carecen de estilete que facilite esta acción. Después de 3 mudas de cutícula, se diferencian en machos y hembras adultas; unas 30 horas después de la ingestión. La cópula se realiza en el lumen intestinal, y una vez terminada los adultos machos son arrastrados en el tránsito intestinal y expulsados del intestino del hospedero.

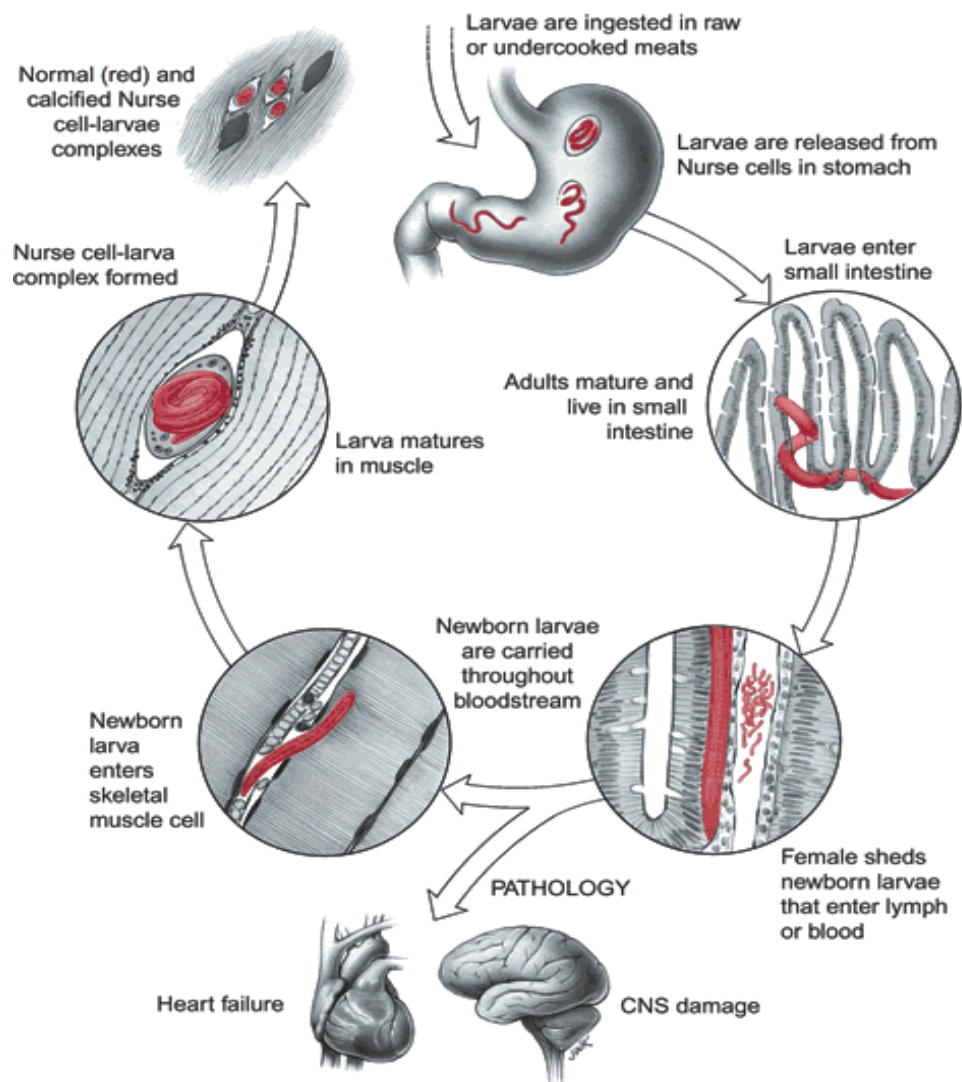


Figura 6. Ciclo de vida de *T. spiralis*.

Las hembras grávidas invaden la mucosa duodenal y alrededor del día 5 post-infección, cada hembra libera alrededor de 1500 LRN, en un tiempo de 4 a 6 semanas, tiempo después del cual las hembras también mueren y son eliminadas en las heces.^{22,24}

FASE PARENTERAL

Las LRN penetran los capilares y/o vasos linfáticos, y alcanzan la circulación sanguínea por la vena porta hepática o la vía linfática. Con la irrigación de los capilares, las LRN son transportadas y distribuidas a los diferentes músculos para su localización definitiva.

En este tránsito, algunas no llegan a invadir músculo y continúan en circulación hasta que quedan retenidas en el hígado, pulmones, cerebro o corazón. Las LRN invaden los músculos mejor irrigados y pobres en glucógeno, como lo son el diafragma, los maseteros, los músculos de la lengua, intercostales, bíceps y tríceps. Después de la invasión, la LRN se diferencia a LM.^{27, 28}

La gran mayoría de los parásitos intracelulares terminan por matar a la célula hospedante, en cambio la LM de *T. spiralis* modifica la maquinaria bioquímica de la célula muscular para transformarla en una unidad anatómica independiente y especializada llamada *célula nodriza* (Fig. 7).

La transformación de la célula muscular en célula nodriza se genera en forma gradual gestándose cambios como la pérdida de los filamentos de actina y miosina, el agregado de mitocondrias parcialmente disfuncionales, alargamiento del núcleo y desarrollo de nucleolo, hipertrofia del glicocalix para convertirse en una cubierta de colágena del tipo IV y V. Además la formación de una nueva red vascular (vasculogénesis) que permite que la LM obtenga nutrientes. A la par en la LM se desarrolla especialmente el esticosoma. Las LM permanecen viables en la célula nodriza alrededor de 24 meses tiempo después la célula nodriza es calcificada, sin embargo en algunos casos permanece viable indefinidamente.²⁹⁻³¹

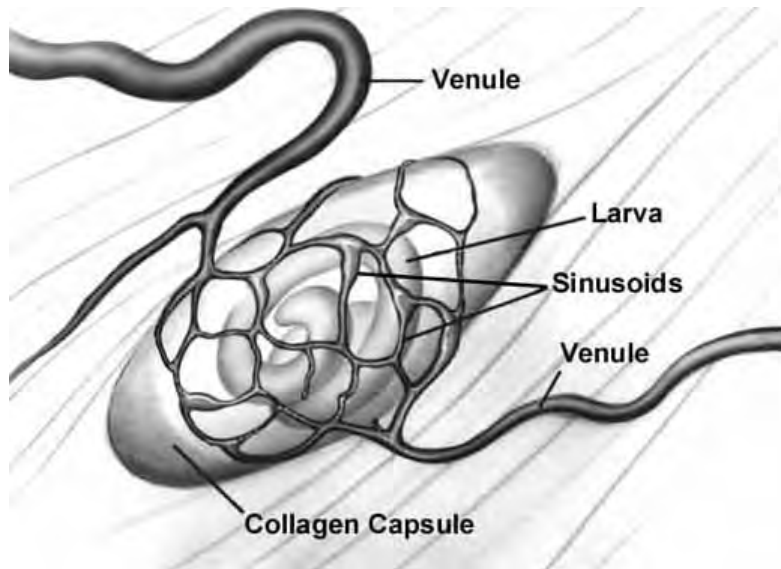


Figura 7. Célula nodriza, con una *Larva Muscular* de *T. spiralis*.

ASPECTOS CLÍNICOS

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad dependen de la fase en que se encuentre la infección dividiéndose en intestinal, invasiva y muscular, sin embargo la magnitud de los síntomas pueden variar con la cantidad de larvas ingeridas al momento de la infección, la susceptibilidad y el tipo de respuesta que presente el huésped.

FASE INTESTINAL

Algunos individuos se mantienen asintomáticos en el transcurso de esta fase sin embargo en la mayor parte de los infectados se produce vómito, dolor abdominal y diarrea ocasionados por la reacción a la penetración de las hembras al epitelio intestinal y la actividad de las LRN en la mucosa del intestino.³²

FASE INVASIVA

La migración de las LRN hacia el músculo produce una reacción inmediata a su paso por diferentes órganos ocasionando disturbios inmunológicos y metabólicos. El sistema inmune reacciona elevando la presencia de células inflamatorias en las áreas afectadas (linfocitos B y T, células plasmáticas, eosinófilos y monocitos, además con la segregación de anticuerpos y citocinas.

La triquinosis es la única helmintiasis que cursa con fiebre, además se presenta, malestar generalizado, fotofobia, conjuntivitis y edema, ocasionado por la ruptura de vasos que se manifiesta más comúnmente en cara y párpados. Los órganos que pueden verse comprometidos son el corazón, los ojos, los pulmones, riñones y el sistema nervioso.^{27, 28}

FASE MUSCULAR

Se establece con la presencia de las larvas en el músculo esquelético (Fig. 8) y el desarrollo de la célula nodriza, se producen las mayores modificaciones al organismo, el malestar generalizado que se exagera con el ejercicio es el principal síntoma; las mialgias desencadenadas con los movimientos de respiración, deglución y masticación también suelen estar presentes, la artralgia, el edema, y la cefalea pueden de igual forma presentarse. Infrecuentemente en casos severos en que las larvas se alojan en otros tejidos también es posible la miocarditis y la encefalitis con consecuencias que pueden llegar a ser fatales.^{27, 33}

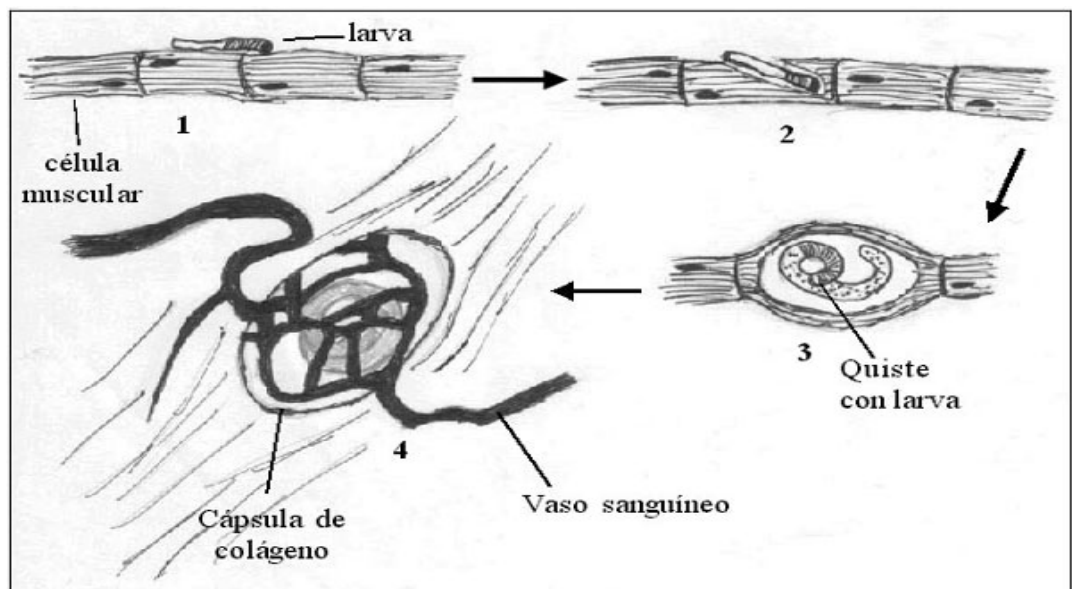


Figura 8. Fase Muscular: Invasión del músculo por la larva recién nacida, transformación a larva muscular y formación de la célula nodriza.

DIAGNÓSTICO

Existen signos no específicos de la infección como la eosinofilia y la fiebre, que junto con la sintomatología inicial y el antecedente de ingestión de carne de cerdo o de animales silvestres mal cocida, permite orientar el diagnóstico hacia una triquinosis. El diagnóstico de la etapa intestinal se dificulta debido a que las manifestaciones clínicas corresponden con infecciones como la brucelosis, shigellosis, fiebre tifoidea, escarlatina, cisticercosis etc.

Cuando la infección cursa etapas tardías, el diagnóstico se resuelve por técnicas invasivas que evidencian al parásito en forma directa. Estas técnicas se basan en la obtención de una biopsia de músculo esquelético (2-4 mm³) o (0.2 a 0.5 g) para su tratamiento por digestión artificial o la compresión entre dos portaobjetos también llamada triquinoscopia.

Recientemente se ha utilizado, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que denota el DNA del parásito en la muestra de carne y ha demostrado alta eficacia; sin embargo por su costo, no es todavía una alternativa comercial.³³⁻³⁵

El inmunodiagnóstico es una herramienta muy útil pues permite identificar la enfermedad en su etapa tardía y como herramienta en estudio epidemiológico incluyendo la identificación de casos asintomáticos. Algunos de los métodos que componen al inmunodiagnóstico son el radioinmunoensayo y la inmunofluorescencia que son directos y la hemaglutinación que es un método indirecto y por tanto no tan sensible. Sin embargo los inmunodiagnósticos no pueden ser utilizados en la identificación de la infección en etapas tempranas. En la actualidad las pruebas de elección son el Western blot y ELISA muy específicas y altamente sensibles cuando se emplean antígenos específicos obtenidos de larvas musculares.^{23, 25,33}

TRATAMIENTO

El control de la triquinelosis y en general de las infecciones por nematodos se realiza en la actualidad a través de la quimioterapia que ofrece bajo costo, procedimientos sencillos en su aplicación y antes de que se documentara la resistencia a los fármacos utilizados, se creía de alta efectividad. Los bencimidazoles (BZ) son un grupo de moléculas que inicialmente tuvieron aplicaciones en el campo veterinario y posteriormente fueron introducidos en la clínica, actualmente son los más comúnmente usados en el control de las infecciones por parásitos helmintos, debido a su amplio espectro.³⁶⁻³⁷

Los BZ son polvos blancos cristalinos, con puntos de fusión ligeramente altos, baja solubilidad en agua, alta solubilidad en medios orgánicos, y con naturaleza anfotérica. Presentan una estructura compuesta por un anillo de benceno que se fusiona en las posiciones 4 y 5 a un anillo imidazólico formando el anillo benzoimidazólico característico de los BZ (Fig. 9).³⁸⁻⁴⁰

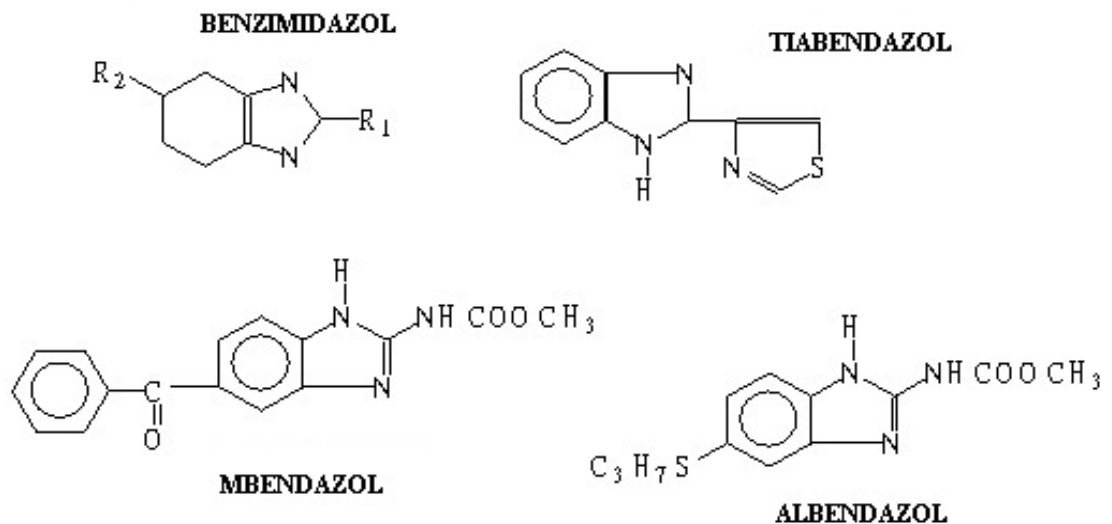


Figura 9. Algunos Bencimidazoles empleados en el tratamiento de helmintiasis.

Los BZ difieren en los grupos funcionales que se encuentran sobre las posiciones 2 y 5/6 del anillo bencimidazólico que les confieren diferencias en solubilidad y actividad antiparasitaria, de acuerdo a ello se pueden clasificar en:

- Mertilcarbamatos: albendazol (ABZ), sulfóxido de albendazol, parbendazol, mebendazol, (MBZ) flubendazol, ciclobendazol, oxibendazol, luxabendazol, fenbendazol y oxfendazol.
- Tiazólicos: tiabendazol, cambendazol.
- Tiol Halogenados: Triclabendazol.

De ellos el ABZ es el más usado por su amplio espectro de acción y por que no produce efectos secundarios como los que presentan otros BZ. El ABZ a una dosis de 15mg/Kg/día y el MBZ a una dosis de 20-25 mg/Kg/día, son administrados por diez a quince días, además de la prescripción de corticosteroides para el control de las reacciones inflamatorias observadas en los pacientes y también de drogas inmunomoduladoras y preparaciones que compensen el déficit de proteínas y electrolitos, constituyen el esquema de tratamiento para la triquinosis.^{27, 33,41}

Sin embargo, el ABZ presenta la limitante de tener muy poca solubilidad en los fluidos corporales, lo que limita su biodisponibilidad contra parasitosis sistémicas, para alcanzar concentraciones adecuadas se requieren esquemas de administración prolongados; por el contrario en las parasitosis intestinales se favorecen los esquemas de administración única pues la efectividad de la molécula es muy alta. Si se logra superar la problemática de su solubilidad, el ABZ constituye quizá la molécula que más se acerca a la descripción del fármaco ideal; que entre otras características debe tener amplio espectro de acción, ser altamente eficaz cuando se administra en una dosis única, se debe poder administrar a niños y mujeres embarazadas, y ser estable a las condiciones climatológicas además de ser lo menos caro posible.³⁹⁻⁴¹

Con el propósito de incrementar la solubilidad del ABZ, desde el punto de vista farmacéutico se ha explorado el uso de diferentes formulaciones para incrementar su solubilidad y biodisponibilidad.

Por ejemplo se ha experimentado con buenos resultados el uso de acarreadores moleculares del tipo de la Hidroxipropil Beta ciclodextrina, se ha reportado que las larvas musculares recuperadas de animales tratados con ABZ/ciclodextrina disminuyeron su capacidad de re-infección en al menos el doble comparando con la formulación de ABZ convencional, al obtenerse solo el 25 % de las larvas con las que se habían infectado los animales originales. La cubierta de ciclodextrina compuesta por oligosacáridos de D- glucopiranososa, forman una matriz que recubre el principio activo y lo liberan en su sitio de acción, ya que son hidrofílicas en su superficie externa e hidrofóbicas en la interna (Fig. 10).^{42, 43}

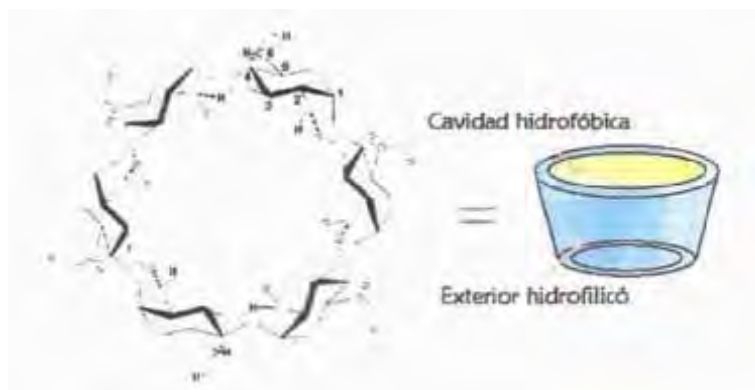


Figura 10. Representación de una ciclodextrina.

METABOLISMO DEL ABZ

Los BZ pueden ser administrados en dosis únicas para el tratamiento de las parasitosis entéricas o en periodos sostenidos de administración para las sistémicas. La molécula se absorbe por difusión simple en los epitelios gástricos e intestinales, favoreciéndose este proceso en condiciones ácidas, por lo que la absorción es mayor en el estómago y las primeras porciones del intestino. Las dietas ricas en grasas cuando se administra el ABZ han demostrado aumentar la biodisponibilidad de 4.5 a 9 veces más ya que favorecen la acidez estomacal.⁴⁴

Una vez adsorbido, el ABZ es metabolizado en el hígado donde la molécula sufre sulfoxidación para convertirse en su metabolito sulfóxido (ABZSO) con actividad antiparasitaria, proceso llevado a cabo por el citocromo p450 y enzimas como la flavin monooxigenasa; este metabolito primario también es susceptible del mismo proceso pero la oxidación sucesiva de la molécula original deriva en la pérdida de actividad.⁴⁴

El ABZ se caracteriza por una vida corta cuantificable en plasma, con predominio de sus metabolitos, señalándose que el ABZSO conserva casi la misma actividad que la molécula de ABZ y de hecho es usado directamente como principio activo inicial en algunas presentaciones farmacéuticas pues es más soluble que el propio ABZ, aunque sigue conservando su naturaleza lipofílica alta por lo que tampoco es totalmente absorbido en estómago e intestino.^{44, 45}

La molécula de ABZSO presenta un centro de asimetría (R-:SO:-R`) lo que le confiere dos estructuras quirales ABZSO + / ABZSO - con diferente actividad antiparasitaria, siendo mayor la de la molécula ABZSO +.^{45, 46}

MECÁNISMO DE ACCIÓN Y ORIGEN DE LA RESISTENCIA.

Se han propuesto tres mecanismos de acción básicos para el efecto antihelmíntico de los BZ: 1) la inhibición del sistema enzimático de la fumarato reductasa, la cual es vital para la producción de energía en la mayoría de los parásitos, al jugar un papel importante en el metabolismo anaerobio de la glucosa, lo que conduce a la parálisis del parásito; 2) la inhibición de la captación de glucosa; 3) la unión selectiva a la β -tubulina del parásito, lo que impide la polimerización de las subunidades de tubulina α y β , alterando la estructura y función de los microtúbulos en las células intestinales de los nematodos, bloqueando actividades vitales del parásito como el movimiento de los cromosomas durante la división celular, la absorción de nutrientes, la motilidad y el soporte estructural de la célula; el movimiento de partículas intracelulares, la exocitosis, además de que la comunicación intercelular es bloqueada por la pérdida del transporte de vesículas secretoras que por otro lado se acumulan en el citoplasma; la suma de todos estos eventos termina por producir la muerte del parásito, siendo este último mecanismo, señalado como el principal modo de acción de los BZ.^{44,47, 48}

Aunque los BZ constituyen una de las mejores herramientas de las que hasta ahora se dispone para el tratamiento de las parasitosis, existen reportes sobre todo en la medicina veterinaria, de helmintos y protozoarios resistentes principalmente a los bencimidazol-carbamatos.

En la mayoría de los casos documentados en que se ha descrito la resistencia a los BZ, principalmente en parásitos nematodos, se aprecia que el fenómeno se ha desarrollado casi exclusivamente en aquellos lugares donde los tratamientos antiparasitarios se han efectuado en gran cantidad y de manera empírica e irracional, o también por la introducción de animales portadores de parásitos resistentes provenientes de lugares con el problema instalado. El uso racional de los antiparasitarios aunado a medidas complementarias como la rotación de los diversos principios activos existentes en el mercado, la planificación de etapas de desparasitación durante el año, la correcta dosificación y la determinación de la reducción de carga parasitaria como control son algunos ejemplos de cómo se puede evitar la aparición de la resistencia.^{36, 38, 49}

La resistencia al ABZSO se ha estudiado en *Haemochoncus contortus* y *T. colubriformis*, determinándose que el cambio de una fenilalanina por tirosina en la posición 200 de la β -tubulina, confiere la resistencia al fármaco, además, por métodos computacionales se demostró que el 1H y el carbamato en posición 2 del bencimidazol participan en la unión a la β -tubulina de *Haemochoncus contortus* (Fig. 11).⁵⁰⁻⁵⁵

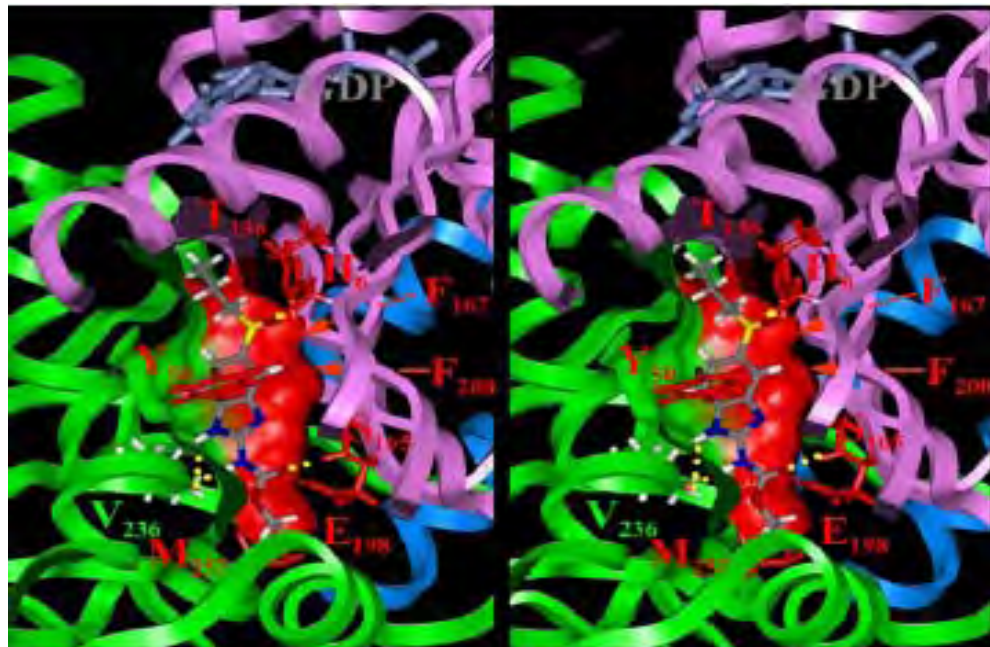


Figura 11. Interacción del ABZSO con la tubulina de *Haemochoncu contortus*.⁵⁰

NUEVOS DERIVADOS BENCIMIDAZÓLICOS CON ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA

La problemática de la solubilidad aunado a la aparición de resistencia a los BZ empleados en la quimioterapia de las enfermedades helmínticas, obliga a la búsqueda de alternativas en el tratamiento de estas parasitosis, por ello se investigan nuevas moléculas, que además de ser eficaces a nivel enteral como parenteral, no generen resistencia y tengan un amplio espectro antiparasitario.³⁹

La molécula del bencimidazol es susceptible de un gran número de sustituciones químicas, por lo que representa un prototipo de molécula guía para la creación de nuevos fármacos. Con el objetivo de desarrollar nuevos fármacos antiparasitarios, se han diseñado, sintetizado y evaluado la actividad antiparasitaria de derivados bencimidazólicos con diversos grupos funcionales en diferentes posiciones de la molécula (como trifluorometilos, propiltios, propilsulfonilos, benzoilos, aminos, metiltios y metilos, entre otros). En algunos de estos compuestos se ha sustituido el H en posición 1 de la molécula por un grupo $-CH_3$, observándose que la permeabilidad de estos compuestos fue mayor que la del ABZ⁵⁶. Además, se demostró que el mecanismo por el cual estos compuestos ejercen su acción es diferente al del ABZ, ya que no inhibieron la polimerización de la β -tubulina.⁵⁶⁻⁵⁸

Un ejemplo de modificación estructural al anillo bencimidazólico lo constituye la molécula del 5-cloro-2-metil-6-(1-naftiloxy)-1H-benzimidazol, conocido como “compuesto alfa”, este es un derivado del triclabendazol con un grupo naftoxy y el cloro como únicas modificaciones al anillo bencimidazólico; que demostró tener gran actividad contra *Fasciola hepática* (Fig. 12).⁵⁹

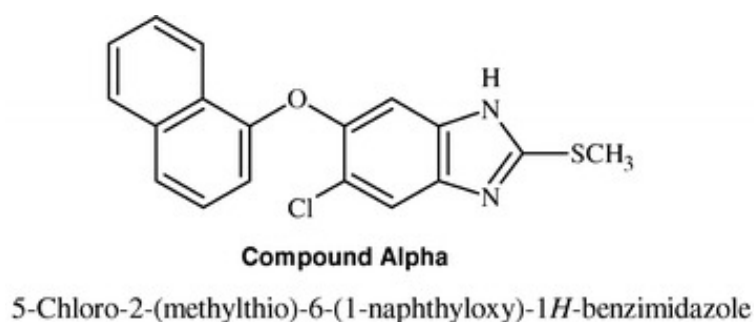


Figura 12. Compuesto *Alfa*.

Un enfoque recientemente adoptado en la generación de nuevos compuestos antiparasitarios es el de la utilización de pro-fármacos. Estas moléculas son farmacológicamente inactivas pero que son convertidas al fármaco activo mediante biotransformación con lo que se espera favorecer que el pro-fármaco sea soluble, mejorando la absorción, distribución, así como la liberación prolongada del fármaco activo una vez que se ha metabolizado.^{39, 60}

Un ejemplo de pro-fármaco del ABZ es el netobimin, el cual sufre una serie de reacciones complejas incluyendo la reducción del grupo nitro y posterior ciclación para formar el albendazol. Otros precursores del bencimidazol 2- carbamato de metilo son el promebendazol, el tiofanato y el febantel y se muestran en la Figura 13.³⁹

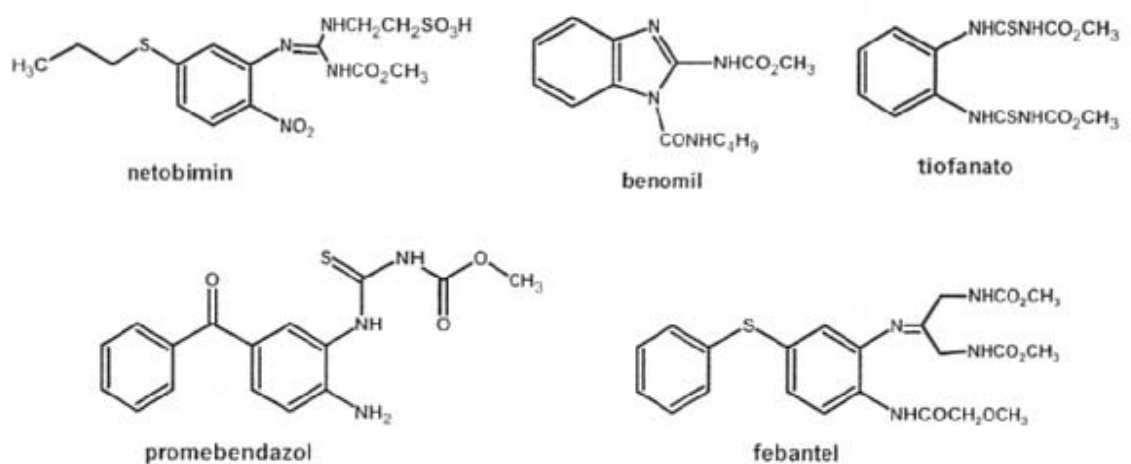


Figura13. Profármacos del bencimidazol 2- carbamato de metilo.

En la producción de pro-fármacos del ABZ, también se han sintetizado moléculas metiladas en diferentes posiciones del anillo bencimidazólico, con la finalidad de obtener el fármaco más soluble, que mediante una N- desmetilación, pueda generar el compuesto activo. Este enfoque toma como modelo a la cafeína que es oxidada por las enzimas microsomales hepáticas en las posiciones 1, 3 y 7 mediante una N- desmetilación. Como producto de la desmetilación se generan teobromina, paraxantina y teofilina, según la posición en la molécula del metilo eliminado (Fig. 14).⁶⁰

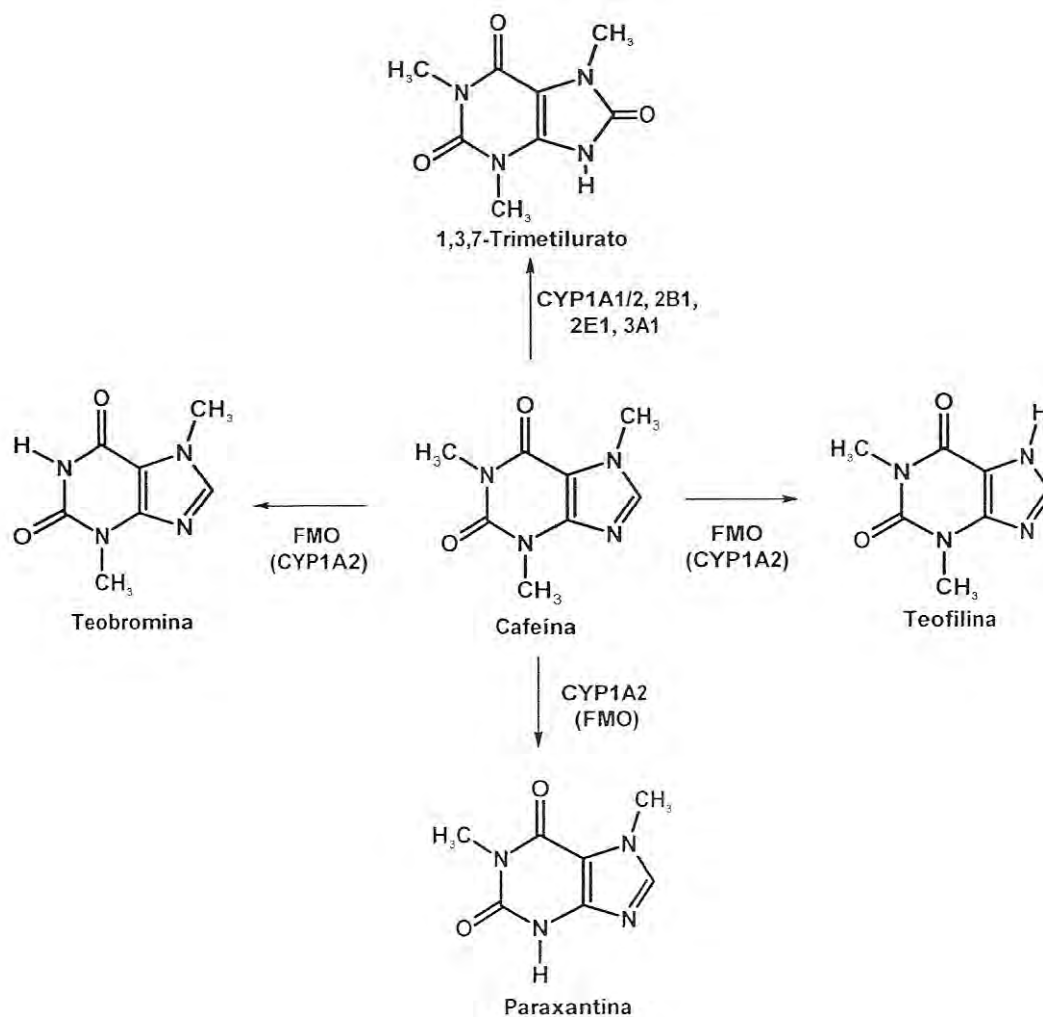


Figura 14. Metabolismo de la Cafeína.

El proceso de desmetilación ha sido observado en el nematodo *H. contortus* por lo que el mismo parásito al ser tratado con los bencimidazoles metilados, puede generar al compuesto activo.⁶¹

Recientemente se sintetizó y evaluó la actividad in vivo contra *T. spiralis* de un pro-fármaco del compuesto “alfa-carbamato”, denominado HSK. El compuesto “alfa-carbamato” mostró actividad previa contra *Paramphistomon* sp y en intento de aumentar su solubilidad se sintetizó HSK, que está metilado en posición 1 (Fig. 15). Los resultados mostraron que HSK fue más activo contra la fase intestinal de *T. spiralis* que contra la fase sistémica del parásito. Lo anterior sugiere que el sustituyente CH₃ en posición 1 del anillo bencimidazólico no le confirió mayor solubilidad y biodisponibilidad a HSK.

Cabe mencionar que por los resultados obtenidos a nivel sistémico, pudiera ser que HSK haya sido desmetilado para dar origen al compuesto alfa., lo que se ve reforzado por la actividad mostrada por el compuesto HSK a nivel sistémico, que fue similar al alfa carbamato⁶⁰

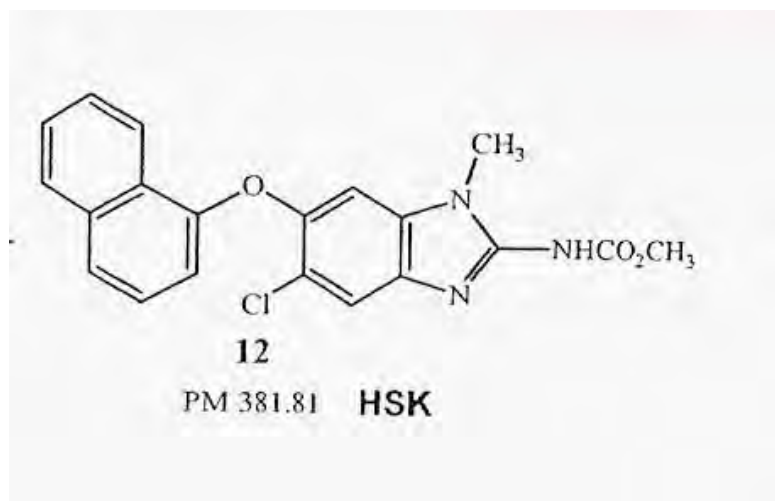
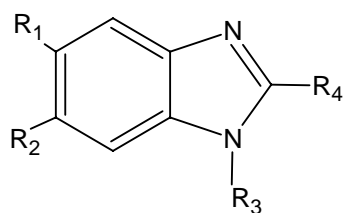


Figura 15. Pro-fármaco metilado del compuesto alfa, denominado HSK

Con la finalidad de continuar generando conocimiento de los requerimientos estructurales del bencimidazol para la actividad antiparasitaria y así emplearlos en el diseño de nuevos y mejores fármacos, investigadores del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM, diseñaron y sintetizaron derivados del bencimidazol carbamato sustituidos con un grupo CH₃ en diferentes posiciones de la molécula (1, 2) y sustituidos en posición 5 o 6 con un grupo naftoxi (**Tabla 1**). El **ABZ**, un bencimidazol carbamato, un antihelmíntico de amplio uso, también tiene una gran actividad giardicida⁶², y su blanco de acción es la beta tubulina, inhibiendo su polimerización y formación de microtúbulos. Considerando lo anterior resultó de interés evaluar la actividad de los compuestos **AMG1-AMG4** contra trofozoitos de *Giardia intestinalis*. La concentración inhibitoria al 50% (CI₅₀ (ug/mL), (datos no publicados) se presenta en el cuadro 1. La actividad giardicida de AMG1-AMG4 fue mayor que la del Metronidazol, pero ninguno de los compuestos fue más activo que el ABZ.

Cuadro 1. Estructura y actividad giardicida de los nuevos compuestos bencimidazólicos.



No.	Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	<i>G. intestinalis</i> CI ₅₀ (ug/mL)
AMG1	C ₂₀ H ₁₇ N ₃ O ₃	H	6-(1-naftiloxi)	CH ₃	Carbamato de Metilo	0.023
AMG2	C ₂₁ H ₁₉ N ₃ O ₃	H	6-(1-naftiloxi)	CH ₃	N-metil carbamato de Metilo	0.031
AMG3	C ₁₉ H ₁₅ N ₃ O ₃	5-(1-naftiloxi)	H	H	Carbamato de Metilo	0.046
AMG4	C ₂₀ H ₁₇ N ₃ O ₃	5-(1-naftiloxi)	H	H	N-metil carbamato de Metilo	0.032
Metronidazol						0.210
Albendazol						0.012

El ABZ es ampliamente usado en el tratamiento de infecciones intestinales por helmintos, sin embargo, su uso contra parásitos extraintestinales tiene limitantes debido a su baja solubilidad en agua que ocasiona una pobre absorción a nivel intestinal y por ende una baja biodisponibilidad y actividad a nivel sistémico. Además se tiene conocimiento del desarrollo de resistencia a este fármaco en parásitos nematodos. Lo anteriormente mencionado pone en evidencia la necesidad de investigar nuevas moléculas que ofrezcan un tratamiento alternativo a las infecciones helmínticas.

En la búsqueda por moléculas con potencial antiparasitario, que tengan mejores características fisicoquímicas, se han diseñado y sintetizado 4 derivados del 5-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol carbamato de metilo (AMG1 a AMG4) (Tabla 1). Estos compuestos tienen un grupo naftoxi como sustituyente en posición 5/6 del anillo benzimidazólico (este grupo funcional ya ha sido incluido en el compuesto “alfa”, que demostró actividad faciolicida⁶³) y un sustituyente H (AMG3 y AMG4) o CH₃ (AMG1 y AMG2) en posición 1 de la molécula. Además, se incluyó en AMG2 y AMG4 un sustituyente CH₃ en el carbamato. La adición del sustituyente CH₃ es con la finalidad de conferir mayor solubilidad al derivado, que le permita tener mayor actividad a nivel sistémico. La actividad giardicida de estos compuestos fue superior a la del Metronidazol, fármaco de elección en el tratamiento de la giardiasis. Sin embargo, la actividad antihelmíntica de estos compuestos no ha sido evaluada.

Un aspecto de importancia en la evaluación *in vivo* de nuevas moléculas antiparasitarias es contar con modelos experimentales apropiados. A este respecto, debido a que el ciclo de vida de *T. spiralis* incluye una fase intestinal y una sistémica además de que puede mantenerse en animales de experimentación, puede usarse como modelo de helmintos, permitiendo a su vez la evaluación de la actividad de nuevos compuestos a nivel enteral y parenteral. De esta forma, se puede obtener información acerca de los requerimientos estructurales para la actividad anti-helmíntica.

OBJETIVOS

General:

- Evaluar la actividad de los derivados bencimidazólicos AMG1, AMG2, AMG3 y AMG 4 contra *T. spiralis* en un modelo murino de triquinosis.

Particulares:

- Evaluar la actividad *in vivo* de los compuestos AMG1, AMG2, AMG3 y AMG4 contra la fase enteral y sistémica de *T. spiralis* en ratones BALB/c infectados con el parásito.
- Evaluar la relación estructura-actividad antihelmíntica de los cuatro compuestos derivados del bencimidazol.

HIPÓTESIS

El grupo metilo en los compuestos AMG1, AMG2 y AMG4 les conferirá mayor solubilidad y biodisponibilidad y por ende mayor actividad contra *T. spiralis*, que el ABZ y AMG3, en un modelo de triquinelosis murino.

Tipo de estudio: El estudio diseñado es experimental, prospectivo, transversal, comparativo y controlado.

Población de estudio: Ratones de la cepa BALB/c.

Criterios de Inclusión: Ratones machos de la cepa BALB/c de entre 20 y 25 g de peso, debidamente desparasitados.

Criterios de Exclusión: Ratones Hembras, ratones con parásitos intestinales, ratones con peso diferente al rango establecido.

VARIABLES:

- Independiente: Compuestos de la serie AMG y el ABZ.
- Dependiente. Carga parasitaria.

Equipo:

- Agitador marca Ultraturex
- Aparato de Baerman
- Microscopio óptico marca Olympus

Reactivos:

- Los compuestos AMG1, AMG2, AMG3 y AMG4 proporcionados por el Dr. Castillo de la Facultad de Química, UNAM
- Albendazol grado Farmacéutico de Sigma
- Amortiguador de Fosfatos (PBS) pH 7
- Formulación (10 mL de Cremofor (Sigma) y 10 mL Etanol en 80 mL de agua)
- Bactoagar al 0.2 % (semisólido)(Difco)

Material:

- Tubos falcon de 15 ml
- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Micropipetas Gilson
- Puntas azules
- Puntas amarillas
- Sonda intragástrica

Material Biológico:

- *Trichinella spiralis* cepa MSUS/MEX/91/CM-91, cuyo ciclo de vida se mantiene en ratas Sprague Dawley de 250 g de peso.
- Ratones machos de la cepa BALB/c, de 20-25g de peso.

MANTENIMIENTO DEL CICLO DE VIDA DE *Trichinella spiralis* Y
OBTENCIÓN DE LARVAS MUSCULARES

El ciclo de vida de *T. spiralis* se mantuvo en ratas de la cepa Sprague Dawley de aproximadamente 250g, las cuales se infectaron con 5000 LM de *T. spiralis* vía intragástrica. Para la obtención de las larvas musculares (LM) del parásito se realizó el método de digestión artificial descrito previamente por Dennis y cols⁶⁴. Los animales se sacrificaron utilizando éter y desmedulación al día 28 días post-infección y se les quitó la piel, extremidades, cabeza y vísceras, cuidando de no romper el diafragma, que es uno de los sitios de predilección para la localización del parásito. El músculo se maceró y se colocó en una solución de pepsina-HCl al 1 %, a una proporción de 100 mL de solución por 10 g de muestra macerada. Esta suspensión se incubó durante 3 h a 37°C y 150 rpm, y posteriormente, el material digerido se pasó a través de un tamiz con malla No. 40 y se vertió sobre el aparato modificado de Bearman, dejando que las LM sedimentaran por 20 min.

Las larvas obtenidas se centrifugaron en tubos falcon a 2500 rpm durante 3 min y se realizaron 3 lavados o hasta que las larvas se observaran limpias, con amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7, retirándose el exceso y resuspendiendo en 4.5 mL de amortiguador, adicionando 500µL de penicilina-estreptomicina. Para la determinación del número de parásitos, se tomaron 10 µL de la suspensión muy bien agitada anteriormente preparada y se depositaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL con 990 µL de bactoagar al 0.2 % (suave), se homogenizaron y se tomaron alícuotas de 10 µL que se depositaron en portaobjetos para leerse al microscopio. Se registraron las lecturas de 5 portaobjetos y se estimó el promedio del número de larvas contenidas en el tubo falcon. Estas LM se emplearon para mantener el ciclo de vida y para infectar a los animales que se usaron en la evaluación de la actividad antiparasitaria.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS AMG SOBRE EL ADULTO DE *TRICHINELLA SPIRALIS*

Ratones de la cepa BALB/c se infectaron con 500 LM de *T. spiralis*. Al día 3 post-infección (p.i.) se formaron 6 grupos de 10 ratones cada uno, a los primeros cuatro grupos se les administraron los compuestos AMG1 a AMG4 respectivamente, el quinto grupo se incluyó como el control positivo, al que se le administró ABZ y el sexto grupo, se incluyó como el control de infección, al que solo se le administró la formulación. Todos los compuestos se administraron a una dosis única equivalente molar de 75 mg/kg de peso por vía intragástrica. Los compuestos se resuspendieron en una formulación de cremofor y etanol (10%/10%).

Los animales fueron sacrificados al día 6 p.i y los adultos se obtuvieron de acuerdo a la metodología descrita por Dennis y cols⁶³. Se recuperó el intestino delgado y se abrió longitudinalmente, cortándose en segmentos de aproximadamente 1 cm de largo. Los segmentos se colocaron en el aparato de Bearman, preparado con PBS y gasa doble, para ser incubados a 37°C por 3h.

Una vez colectados los adultos, se centrifugaron a 1500 rpm por 1 min, se retiró el sobrenadante hasta 200 µL y se agregaron 800 µL de bactoagar al 0.2%. Se tomaron alícuotas de 10µL en portaobjetos y se contaron el número de adultos, se determinó el número total de parásitos obtenidos. Los resultados se presentan como el porcentaje de reducción de la carga parasitaria con respecto al control negativo.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS AMG SOBRE LA LM DE *Trichinella spiralis*

Grupos de 10 ratones de la cepa BALB/c se infectaron con 500 LM de *T. spiralis*. A partir del día 28 p.i. se formaron 6 grupos, a los primeros cuatro grupos se les administraron los compuestos AMG1 a AMG4 respectivamente, el quinto grupo se incluyó como control positivo al que se le administró ABZ y el último grupo se incluyó como control de infección al que solo se le administro la formulación en la que se resuspendieron los compuestos. Los compuestos y el ABZ se administraron a una dosis equimolar de 75 mg/kg de peso por siete días consecutivos por vía intragástrica.

Los animales fueron sacrificados 7 días después de haber concluido la última administración de los compuestos y las LM se recuperaron como se describió anteriormente (Fig. 16).

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

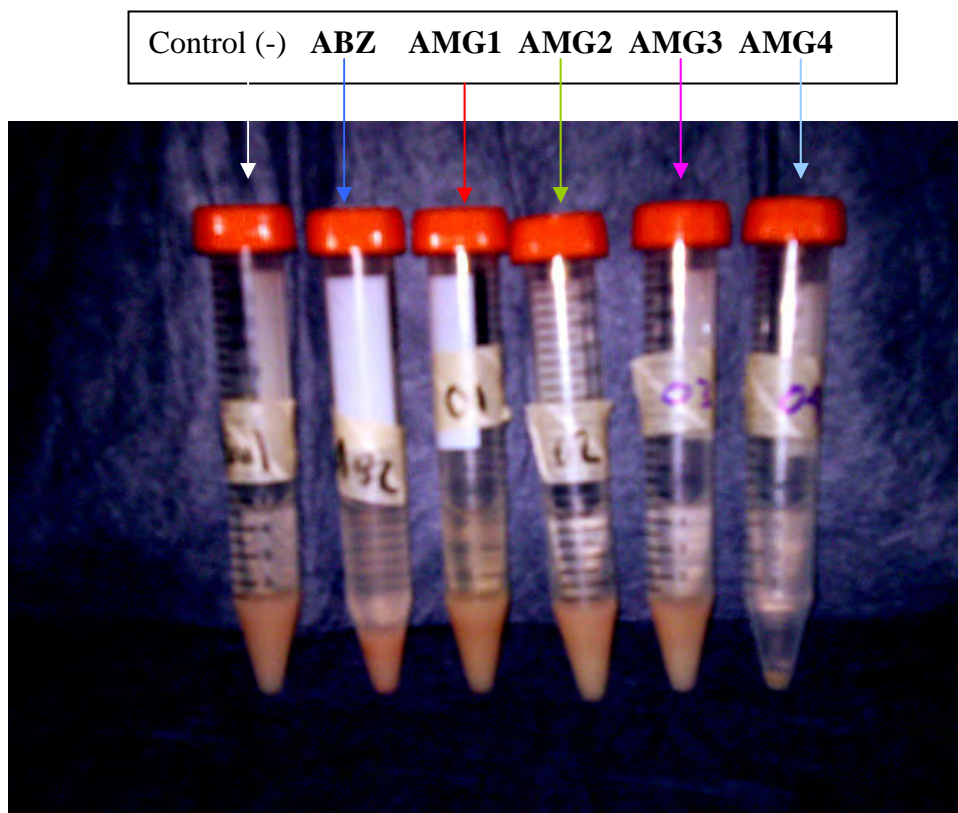


Figura 16. Larvas musculares de *T. spiralis* obtenidas de cada uno de los grupos tratados o no tratados con los nuevos compuestos bencimidazólicos y ABZ.

En este estudio se determinó la actividad biológica de cuatro derivados del 5-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol carbamato de metilo (AMG1-AMG4) sobre las fases entérica y sistémica de *T. spiralis* en un modelo murino de triquinelosis. Su actividad se comparó con la del ABZ, fármaco de elección en el tratamiento de diversas helmintiasis.

Los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad nematocida del ABZ y de los derivados bencimidazólicos sobre la fase adulta de *T. spiralis* se presentan en el Cuadro 2 y Figura 18. Los compuestos AMG3 y AMG4 redujeron la carga del adulto 62.75% y 73.9% respectivamente, presentando mayor actividad que el ABZ (53%). El número de parásitos adultos recuperados de animales tratados con AMG3, AMG4 y ABZ fue significativamente diferente con respecto al ABZ ($p < 0.001$). Por otro lado, los compuestos AMG1 y AMG2 mostraron muy poca actividad contra el organismo adulto (reducción del 21.69% y 26.67% respectivamente).

Cuadro 2. Adultos de *T. spiralis* recuperados de animales tratados con una dosis equimolar de 75 mg/kg de peso de los compuestos AMG1- AMG4 y el ABZ.

No. Adultos/ Ratón [¥]	
Control (-)	89.21± 57.14
ABZ	42.46± 28.51 ⁺
AMG 01	70.94± 48.14
AMG 02	62.24± 32.01
AMG 03	33.6± 22.48 ⁺
AMG 04	23.72± 16.29 ⁺

¥ Media de dos experimentos

+ La diferencia de medias es estadísticamente diferente con respecto al ABZ ($p < 0.001$)

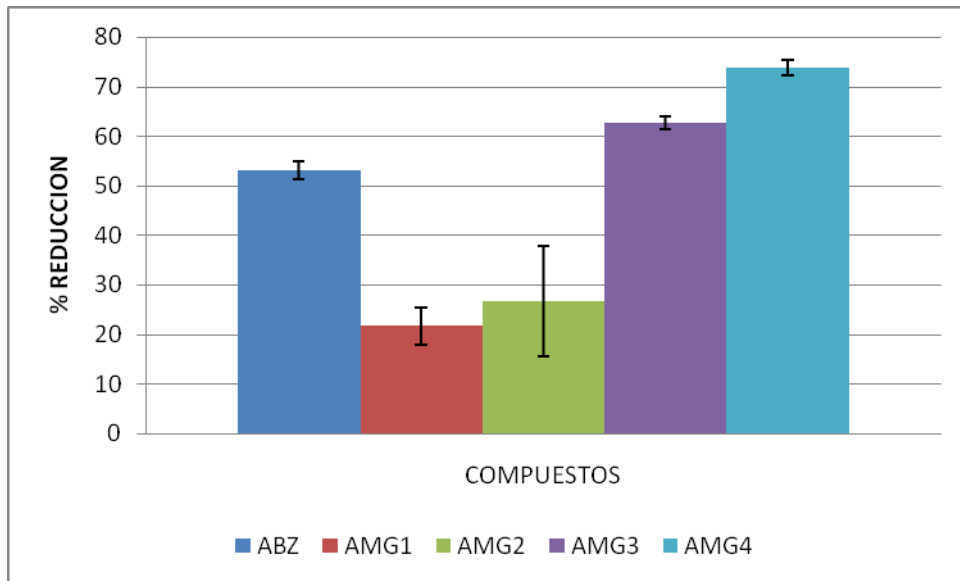


Figura 18. Reducción de la carga parasitaria (%) del adulto de *T. spiralis* en animales tratados con los compuestos AMG1- AMG4 y ABZ.

Con respecto a la actividad de los compuestos AMG sobre la LM de *T. spiralis*, ésta se muestra en el cuadro 3 y en la Figura 19. El compuesto AMG4 redujo la carga parasitaria en un 92.82%, superando la actividad mostrada por el ABZ (52.64%). El número de LM recuperadas de los animales tratados con AMG4 y ABZ fue significativamente diferente con respecto al ABZ ($p < 0.001$). AMG3 fue menos activo contra la fase sistémica de *T. spiralis* que contra la fase intestinal del parásito (20.68% vs 62.75% respectivamente). Los compuestos AMG1 y AMG2 no mostraron actividad significativa contra la LM de *T. spiralis*.

Cuadro 3. Larvas Musculares de *T. spiralis* recuperadas de animales tratados con una dosis equimolar de 75 mg/kg de peso de los compuestos AMG1-AMG4 y el ABZ.

Larvas Musculares/ Ratón [¥]	
Control (-)	47314.77±5630.61
ABZ	22499± 4321.20*
AMG 01	54074.05± 3666.50
AMG 02	54074.05± 9951.89
AMG 03	37314.77± 916.56
AMG 04	3333± 523.81*

¥ Media de dos experimentos.

La diferencia de medias es significativamente diferente con respecto al ABZ (* $p < 0.05$, + $p < 0.001$).

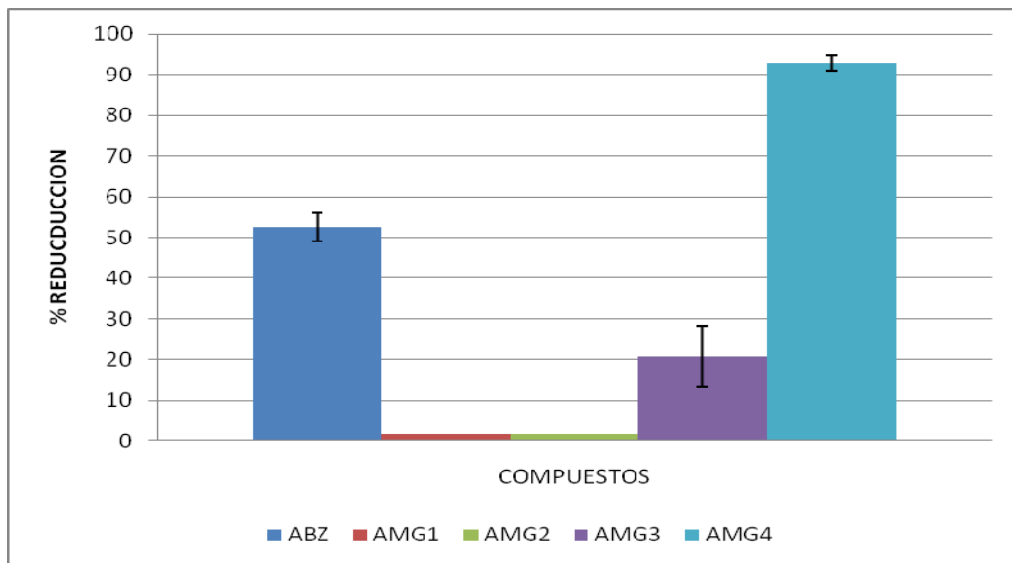


Figura 19. Reducción de la carga parasitaria (%) de LM en animales tratados con los compuestos AMG1- AMG4 y ABZ.

Los resultados obtenidos muestran que AMG3 y AMG4 fueron los compuestos que mejor actividad tuvieron contra *T. spiralis* tanto a nivel enteral como sistémico. AMG4 fue el más activo de todos los compuestos evaluados, particularmente fue más activo contra la fase muscular de *T. spiralis*, reduciendo 92.82% la carga parasitaria. Este compuesto fue más activo que el ABZ contra ambas fases de desarrollo del parásito. Con respecto a AMG3, éste fue activo contra la fase enteral de la infección pero perdió actividad a nivel sistémico y fue menos activo que el ABZ.

Todos los compuestos AMG comparten el sustituyente naftiloxy en posición 5/6 del bencimidazol; la actividad de este grupo ha sido estudiada en el “compuesto alfa”, un derivado del triclabendazol con actividad contra cepas de *Fasciola hepática* susceptibles y resistentes al triclabendazol⁶⁴. AMG4 a diferencia de AMG1 y AMG2, tiene un H como sustituyente en posición 1 del anillo bencimidazólico, característica que comparte con AMG3, pero sin embargo difiere con este último en la presencia de un CH₃ en el grupo metil carbamato de la molécula. Tanto AMG3 como AMG4 tuvieron buena actividad nematocida, que pudiera relacionarse a que la molécula cumple con los requerimientos para la unión a la tubulina del parásito como es la presencia de H y el grupo carbamato como sustituyentes en posición 1 y 2 respectivamente del anillo bencimidazólico^{50,57}. Lo anterior también explica la pobre reducción de la carga parasitaria obtenida con AMG1 y AMG2, ambas con un sustituyente CH₃ en posición 1 del anillo bencimidazólico.

Es importante resaltar que AMG4 fue más activo que AMG3 contra el organismo adulto y la LM de *T. spiralis*, difiriendo ambos compuestos, como ya se mencionó anteriormente, únicamente en la presencia de un grupo CH₃ en el carbamato de metilo en la posición 2 de AMG4.

En este trabajo de tesis no se determinó la solubilidad de los compuestos AMG, solo se observó de manera cualitativa que efectivamente AMG4 fue más soluble que los otros compuestos.

Considerando esta observación, se puede inferir que la adición del sustituyente CH₃ en AMG4 le confirió mayor solubilidad, que influyó en su actividad nematocida *in vivo*; de manera particular, se puede decir que al ser AMG4 más soluble, su biodisponibilidad aumentó y fue más activo a nivel sistémico, obteniéndose una excelente reducción de la carga de la LM de *T. spiralis* (92.82%), a diferencia de AMG3, cuya actividad disminuyó a nivel sistémico (20.68%), debido posiblemente a problemas de solubilidad.

A este respecto, resulta de gran importancia que en estudios posteriores se determine si el sustituyente CH₃ le confirió mejores características fisicoquímicas a AMG4, evaluando su solubilidad así como su permeabilidad en la línea celular Caco-2. Por otro lado, cabe mencionar que el sustituyente CH₃ en el carbamato de metilo en la posición 2 de AMG4, puede sufrir una reacción de desmetilación dando origen a AMG3. La metilación del anillo bencimidazólico ha sido previamente utilizada para la producción de pro-fármacos del ABZ, con la finalidad de obtener un fármaco más soluble, que mediante una N- desmetilación, pueda generar el compuesto activo⁶⁰. Este enfoque toma como modelo a la cafeína que es oxidada por las enzimas microsomales hepáticas en las posiciones 1, 3 y 7 mediante una N-desmetilación⁶⁰. El proceso de desmetilación también ha sido observado en el nematodo *H. contortus*⁶¹, por lo que es posible que *T. spiralis* al ser tratado con los bencimidazoles metilados, puede generar al compuesto activo.

Considerando que AMG4 sufrió una N-desmetilación para dar origen a AMG3, entonces la diferencia en cuanto la actividad nematocida de estas dos moléculas está relacionada principalmente con la solubilidad y biodisponibilidad de la molécula a nivel sistémico. Sin embargo, en este momento no se cuenta con evidencias experimentales que permitan afirmar que AMG4 sufrió el proceso de N-desmetilación.

- AMG3 y AMG4 fueron más activos contra el adulto de *T. spiralis* que el ABZ.
- La actividad de AMG3 fue mayor a nivel enteral que a nivel sistémico.
- AMG4 fue más activo contra la LM de *T. spiralis* que el ABZ, incrementando su actividad a nivel sistémico.

- El grupo metilo en el carbamato de metilo en posición 2 del compuesto AMG4 confirió mayor actividad nematocida a la molécula.
- El sustituyente CH₃ en posición 1 del anillo bencimidazólico disminuyó la actividad nematocida de la molécula.
- Solo AMG4 mostró mayor actividad contra el adulto y LM de *T. spiralis* que AMG3 y ABZ.
- La mayor actividad nematocida de AMG4 puede deberse a que el grupo CH₃ le confirió mayor solubilidad y por ende mayor biodisponibilidad.

- Determinar la solubilidad y permeabilidad de los compuestos AMG3 y AMG4.
- Determinar el proceso de N-desmetilación de AMG4 en presencia de enzimas microsomales.
- Analizar la posible desmetilación de AMG4 por la LM de *T. spiralis*.
- Determinar si el mecanismo de acción de AMG4 es similar al del ABZ (inhibición de la polimerización de la β -tubulina).
- Determinar el comportamiento farmacocinético de AMG4 en animales de experimentación.

1. Uribarren T, Tay Z J. Microbiología y Parasitología Médicas. México: Méndez Editores; 1993.
2. Romero R. Microbiología y Parasitología humana. 3 era ed. México: Panamericana; 2007
3. Mottier L, Álvarez L, Ceballos L, Lanusse C. Drug transport mechanisms in helminth parasites: Passive difusión of benzimidazole anthelmintics. *Exp Parasitol.* 2006; 113: 49-57.
4. Ximénez C, Gómez A, Melendro I, Ramiro M, Ramos F, Morán P. Las parasitosis intestinales en México. *Fundación Mexicana para la Salud.* 2002; 36: 13-35.
5. Tay J , Velasco O, Lara R, Gutiérrez M. *Parasitología Médica.* 7 ed. México: Méndez Editores; 2002.
6. Botero D, Restrepo M. *Parasitosis Humanas.* Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2003.
7. Palmieri O J. *Enfermedades Infecciosas.* México: Mc Graw Hill; 2002
8. Di Pietro S, Haritchabalet K, Cantoni G, Iglesias L, Mancini S, Temperoni A, et al. Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por alimentos en la provincia de Rio Negro Argentina, 1993-2001. *Medicina.* 2004; 64: 120-124.
9. Dupoy-Camet J. Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Vet Parasitol.* 2000; 93: 191-200.
10. Gajadhar A, Gamble H. Historical perspectives and current global challenges of *Trichinella* and trichinellosis. *Vet Parasitol.* 2000; 93:183-189.
11. Takahashi Y, Mingyuan L, Waikagul J. Epidemiology of trichinellosis in Asia and the Pacific Rim. *Vet Parasitol.* 2000; 93: 227-239.
12. Boireau P, Vallée I, Roman T, Perret C, Mingyuan L, Gamble H, Gajadhar A. *Trichinella* in horses : a low frequency infection with high human risk. *Vet Parasitol.* 2000; 93: 309-320.

13. Robert Koch-Institut. Trichinellose: Zu einer Häufung in Mecklenburg-Vorpommern. *Epidemiologisches Bulletin* 2006; 18: 139-40. En www.Trichinella.org Disponible en línea http://www.trichinella.org/index_epid_summary.htm Consultado: Abril 2009.
14. Organización Internacional de Epizootas (OIE). Disponible en http://www.oie.int/esp/es_index.htm. Consultado: noviembre 2008.
15. Gutiérrez S, Elsa J, Gutiérrez, Ospina I, Koopman J. Brote de triquinosis ocurrido en una oficina de gobierno; México. *Trichinosis outbreak in a governmental office. Salud publica.* 1986; 28(1):41-7.
16. Ortega M, Arriaga C, Yépez L. Epidemiology of trichinellosis in México, Central and South América. *Vet Parasitol.* 2000; 93: 201-22.
17. De la Rosa G, Gómez A, Tinoco I, Mendoza R. El Síndrome Febril y su Relación con la Triquinellosis Humana Oculta. *EPIDEMIOLOGIA boletín del SINAVE.* 2003; 50(20):1-3.
18. Monroy H, Flores-trujillo M, Benitez E, Arriaga C.. Swinw trichinellosis slaughterhouses of the metropolitana area of Toluca. *Parasite,* 2001; 8:S249-S251.
19. Pozio D, La Rosa G, Murell K, Linchtenfels J. Taxonomic revision of the Genus of the *Trichinella*. *J Parasitol.* 1992; 78(4): 654-659.
20. Murrel K. D, Lichtenfels R J, Zarlenga D S, Pozio E. The systematic of the genus *Trichinella* with a key to species. *Vet Parasitology.* 2000; 93:293-307.
21. Christian M. O. Kapel. Host diversity and biological characteristics of the *Trichinella* genotypes and their effect on transmission. *Vet Parasitol* 2000; 93: 263-278.
22. Chavez G. E, Saldivar E S, Muños E J, Moreno G M. Trichinellosis una zoonosis vigente. *REDVET.* 2006; 7(5):1-15. Disponible en línea: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060606.html> Consultado Noviembre 2008.

23. Dea Ayuela. Caracterización inmunobiológica de las especies quísticas de *Trichinella*. España. Tesis Doctorado Universidad Complutense de Madrid. 1999. Disponible en línea en <http://www.ucm.es/BUCM/tesis/19972000/D/1/D1039701.pdf>. Consultado Febrero 2009.
24. Becerril F, Romero C. Parasitología Médica de las moléculas a la enfermedad. Mexico: Ed. Mc Graw Hill; 2006.
25. Ribicich M. Fundamentos e importancia de la utilización del test de ELISA para el diagnóstico de trichinellosis en cerdos de argentina. En línea OIE.
26. Robinson M, Gare D, Connolly B. Profiling excretory/secretory proteins of *Trichinella spiralis* muscle larvae by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry.. *Vet Parasitol* 2005; 132: 37-41.
27. Kociecka W. Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. *Vet Parasitol* 2000; 93: 365-383.
28. Capo V, Despommier D. Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp. *Clin Micro Rev.* 1996; 47- 54.
29. Ribicich M, Chávez M, Carfagnin J, Basso N, Rosa A, Francisco A. Estudio de alteraciones histopatológicas en cerdos infectados experimentalmente con *Trichinella spiralis*. *Inter Vet* 2004; 6(1): 61-69.
30. Sacchi L, Corona S, Gajadhar A, Pozio E. Ultrastructural characteristics of nurse cell- larva complex of four species of *Trichinella* in several hosts. *Parasite* 2001; 8: S54- S58.
31. Despommier D. How does *Trichinella spiralis* make itself at home?. *Parasitol Today* 1998; 14 (8):318-323.
32. Luna B, Sanchez S. Triquinelosis Humana. *Arch Med.* 2006; 2(04): 1-11 Disponible en línea <http://archivosdemedicina.com>. Consultado: enero 2008.
33. Dupouy J, Kociecka W, Bruschi F, Bolas F, Pozio E. Opinion on the Diagnosis and Treatment the human Trichinellosis. *Expert Opin Pharmacother* 2002; 3(8):1117-1130.
34. Martínez I , Vázquez O, Romero R, Gutiérrez M, García Y, Fernández A .Búsqueda de *T. spiralis* en carnicerías que se expende en el Distrito Federal. *Vet México.* 2001; 32(2):141-144.

35. Beck R, Mihaljevic´ Z, Marinculic A. Comparison of trichinelloscopy with a digestion method for the detection of *Trichinella* larvae in muscle tissue from naturally infected pigs with low level infections. *Vet Parasitol* 2005; 132: 97–100.
36. Pritchard R. Anthelmintic resistance. *Vet Parasitol*. 1994; 54: 259-268.
37. Esstefan P, Fiel C, Fuse C, Iglesias L. Uso de antihelmínticos en los programas de control y el riesgo potencial de Resistencia. En línea portal Red de Helminología para América y el Caribe, FAO. <http://cniia.inta.gov.ar/helminto/pdf%20Resistencia/Steffan.pdf> consultado: octubre 2008.
38. Goodman & Gilman. Bases Farmacológicas de la Terapéutica. México: Mc Graw Hill; 2001.
39. López García M L. Potenciación de la actividad antihelmíntica del albendazol mediante modificaciones en su biodisponibilidad y metabolismo. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense Madrid, España. 1996. Disponible en línea <http://www.ucm.es/BUCM/tesis/19911996/D/1/AD1023701.pdf> Consultado: Noviembre 2008.
40. Townsend L B, Wise D S. The synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles. *Parasitol Today* 1990; 6:107-112.
41. Pozio E, Sacchini D, Sacchi L, Tamburrini A, Alberici F. Failure of Mebendazole in the Treatment of Humans with *Trichinella spiralis* Infection at the Stage of Encapsulating Larvae. *Brief Report* 2001; 32: 638-642.
42. Garcia R, Torrado J, Bolas F. Improving bioavailability and anthelmintic activity of Albendazole cyclodextrin complexes. *Parasite* 2001; 8: S188-S190.
43. Casulli A, Morales M, Gallinella B, Turchetto L, Pozio E. 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin improves the effectiveness of albendazole against encapsulated larvae of *Trichinella spiralis* in a murine model. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 58 (4): 886-90.
44. Bettencourt P S. Caracterización Farmacológica del Albendazol Sulfoxido y de sus Enantiómeros en ovejas y ratas. Análisis del metabolismo ruminal. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona. España. 2001. Disponible en línea: <http://www.tdx.cesca.es/TDX-0111102-112327/> .

45. López M, Torrado S, Torrado J, Martínez A, Bolas F. Albendazole Versus Ricobendazole (Albendazole-sulphoxide) Against Enteral and Parenteral Stages of *Trichinella spiralis* in mice. *Int J Parasitol* 1997; 27(7): 781-785.
46. García R J, Torrado D J, Bolas F F. Farmacocinética del ricobendazol en larvas musculares de *Trichinella spiralis*. Congreso Ibérico de Parasitología Madrid 2007. Disponible en línea: <http://www.ucm.es/info/CIP2007.Madrid/index.php?a=actas> Consultado: Enero 2009.
47. Jiménez A, De Armas C, Criado A, Casado N, Rodríguez F, Diez J. Preliminary characterization and interaction of tubulin of *Trichinella spiralis* larvae with benzimidazole derivatives. *Vet Parasitol* 1991; 39: 89-99.
48. Scarcella S, Ceriani C, Rodríguez Julio, Solana Hugo Caracterización de la proteína microtubular de diferentes helmintos parásitos. Sus implicaciones en el modo de acción de los benzimidazoles antihelmínticos. *Redvet Vol. VIII, No 6* Disponible en línea: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060607.html>.
49. Mottier L, Lanusse C. Bases moleculares de la resistencia a fármacos antihelmínticos. *Med Vet*. 2001; 82 (2): 74-85.
50. Robinson M, McFerran N; Turdgett A, Hoey L, Fairweather I. A possible model of benzimidazole binding to β -tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *J Mol Graphics and Modelling* 2004; 23: 275- 284.
51. Jackson F. Anthelmintic resistance-The state of play. *British Vet J* 1993; 149: 123-135.
52. Kaplan R. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol*.2004; 20(10): 477-480.
53. Wolstenholme A, Fairweather I, Prichard R, Samson G, N. Sangster. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol* 2004; 20(10): 469-476.
54. Walsh T., Donnan A, Jackson F, Skuce P, Wolstenholme A. Detection and measurement of benzimidazole resistance alleles in *Haemonchus contortus* using real-time PCR with locked nucleic acid Taiman probes. *Vet Parasitol* 2007; 144: 304-312.

55. Ghisi M, Kaminsky R, Mäser P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Vet Parasitol* 2007; 144: 313-320.
56. Morales H R. Determinación del coeficiente de permeabilidad aparente de derivados del 1-metilbencimidazol, utilizando a la línea celular Caco-2 como modelo in vitro. Tesis de Maestría Facultad de Química, UNAM, 2000.
57. Navarrete G, Yépez L, Hernández A, Tapia A, Hernández F, Cedillo R, et al. Síntesis and Antiparasitic Activity of Albendazole and Mebendazole Analogues. *Bioorg Med Chemistry* 2003; 11: 4615-4622.
58. Valdez J, cedillo R, Hernández A, Yépez L, Hernandez F, Navarrete G, Tapia A, Cortes R, Castillo R. Synthesis and Antiparasitic Activity of 1 H-Benzimidazole derivatives. *Bioorg Med Chem*, 2002; 12: 2221-2224.
59. Campos A, Ibarra F, Vera Y, Rivera N, Castillo R. Síntesis and Faciolicidal Activity of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthyloxy)-1H-bencimidazole. *Chem Pharm Bull* 2002; 50(5):649-652.
60. Hernández M A. Síntesis y actividad antiparasitaria de [5-cloro-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol-2-il] carbamato de metilo y de un derivado 1-metilado como profármaco potencial. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.
61. Kotze AC. Cytochrome P450 Monooxygenase activity in *Haemonchus contortus* (Netamatoda) *Int. Jour. for Parasitol*, 1997; 27(1):33-40.
62. Chavez B, Cedillo-Rivera R, Martinez-Palomo A. *Giardia lamblia* : Ultrastructural Study of the in vitro effect of Benzimidazoles. *J. Protozool*, 1992; 39 (4): July-August.
63. McConville M, Brennan g, McCoy M, Castillo R, Hernandez-Campos A, Ibarra F, Fairweather I. Adult triclabendazole-resitant *Fasciola hepatica*: surface and subsurface tegumental responses to in vitro treatment whit the sulphoxide metabolite of the experimental fasciolicide compound alpha. *Parasitology* 2006; 133:195-208.
64. Dennis D, Despommier D, Davis N. Infectivity of the newborn larve of *Trichinella spiralis* in the rat. *J Parasitol* 1970; 56(5):974-977.

