



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación *in vitro* del efecto antihelmíntico de la
naftoquinona LLJMY3 sobre cisticercos de *Taenia
crassiceps***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

YULI ARANDA LÓPEZ



MÉXICO, D.F.

2016



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profesor Abel Gutiérrez Ramos
VOCAL: Profesor Atonatiu Edmundo Gómez Martínez
SECRETARIO: Profesor Jorge Morales Montor
1er. SUPLENTE: Profesor María Eva González Trujano
2° SUPLENTE: Profesor José Cordero Hernández

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Interacciones Neuroinmunoendocrinas, Departamento de Inmunología,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Jorge Morales Montor _____

SUSTENTANTE:

Yuli Aranda López _____

ABREVIATURAS

ABZSO	Sulfóxido de albendazol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
CO ₂	Dióxido de carbono
CE ₅₀	Concentración efectiva 50
DMSO	Dimetilsulfóxido
FDA	Food and Drug Administration
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>
NCC	Neurocisticercosis
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
RCB20	derivado 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol
<i>T. crassiceps</i>	<i>Taenia crassiceps</i>
<i>T. solium</i>	<i>Taenia solium</i>
VHC	Vehículo

El nombre dado al compuesto “**LLJMY3**”, es una sigla de la primera letra del nombre y apellido de los investigadores y alumna involucrados en este trabajo (LL: Lluvia López; JM: Jorge Morales; Y: Yuli). Mientras que, el número 3 indica que fue la tercera naftoquinona aislada de un total de siete.

CONTENIDO

I. RESUMEN	8
II. ANTECEDENTES	9
1. Generalidades de los helmintos	9
2. Ciclo de vida del céstodo <i>Taenia solium</i>	10
3. Neurocisticercosis	12
4. Fármacos utilizados en el tratamiento de la neurocisticercosis y teniasis causados por <i>Taenia solium</i>	14
5. Albendazol	15
5.1 Mecanismo de acción del albendazol	16
5.2 Reacciones adversas, toxicidad y contraindicaciones	16
6. Nuevas moléculas con actividad antiparasitaria: Naftoquinonas.....	17
6.1 Mecanismos de acción de las naftoquinonas.....	21
6.2 La naftoquinona LLJMY3.....	22
7. La cisticercosis murina causada por <i>Taenia crassiceps</i> como herramienta en la investigación	23
III. JUSTIFICACIÓN	26
IV. HIPÓTESIS	27
V. OBJETIVOS	28
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. Declaración de principios éticos.....	29
2. Infección y obtención de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF	29
3. Preparación de las soluciones stock de la naftoquinona LLJMY3.....	30
4. Curva temporal y curva concentración-respuesta para evaluar el efecto de la naftoquinona LLJMY3	30
4.1 Curva temporal, efecto de la naftoquinona LLJMY3 a la concentración máxima de 100 µg/mL	30
4.2 Curva concentración-respuesta, efecto de la naftoquinona LLJMY3 a 25, 50, 75 y 100 µg/mL	31
5. Evaluación macroscópica del efecto de la naftoquinona LLJMY3	

sobre los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF	32
6. Análisis estadístico.....	33
VII. RESULTADOS	34
1. Curva temporal del efecto de la naftoquinona LLJMY3 sobre los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF	34
1.1 Observaciones macroscópicas	34
1.2 Efecto de la naftoquinona LLJMY3 sobre la motilidad de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF.	36
1.3 Efecto de la naftoquinona LLJMY3 sobre la reproducción de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF.....	38
2. Curva concentración-respuesta del efecto de la naftoquinona LLJMY3 sobre los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF	40
2.1 Observaciones macroscópicas	40
2.2 Efecto de la naftoquinona LLJMY3 sobre la motilidad de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF.....	43
2.3 Efecto de la naftoquinona LLJMY3 sobre la reproducción de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF.....	45
2.4. Efecto de la naftoquinona LLJMY3 sobre la mortalidad de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF.....	48
VIII. DISCUSIÓN	50
IX. CONCLUSIÓN	54
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	Página
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	10
Figura 2. Distribución mundial de la cisticercosis en 2011 de acuerdo a la OMS	13
Figura 3. Estructuras químicas del albendazol, el sulfóxido de albendazol y la sulfona de albendazol	15
Figura 4. Estructuras químicas del naftaleno, la 1,4-naftoquinona y la 1,2-naftoquinona	18
Figura 5. Estructura química de la naftoquinona natural lapachol y de la naftoquinona sintética atovacuona	20
Figura 6. Estructuras químicas de los intermediarios de las naftoquinonas	21
Figura 7. Cisticercosis murina causada por <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF.	24
Figura 8. Cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF.	24
Figura 9. Curva temporal-respuesta para evaluar el efecto <i>in vitro</i> de la naftoquinona LLJMY3 sobre la aparición de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	35
Figura 10. Curva temporal-respuesta para evaluar el efecto <i>in vitro</i> de la naftoquinona LLJMY3 sobre la motilidad de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	37
Figura 11. Curva temporal-respuesta para evaluar el efecto <i>in vitro</i> de la naftoquinona LLJMY3 sobre la reproducción de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	39
Figura 12. Curva concentración-respuesta para evaluar el efecto <i>in vitro</i> de la naftoquinona LLJMY3 sobre la aparición de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	42
Figura 13. Curva concentración-respuesta para evaluar el efecto <i>in vitro</i> de la naftoquinona LLJMY3 sobre la motilidad de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	44

Figura 14. Curva temporal-respuesta para evaluar el efecto <i>in vitro</i> de la naftoquinona LLJMY3 sobre la reproducción de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	47
Figura 15. Curva temporal de la mortalidad de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> tratados con LLJMY3	49
Tabla 1. Estructura química de varias naftoquinonas, sus características y algunas propiedades	19
Tabla 2. Patrón de solubilidad de la naftoquinona LLJMY3	23
Tabla 3. Datos obtenidos de la reproducción de los cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> durante la curva concentración-respuesta	46

I. RESUMEN

La cisticercosis, es una enfermedad causada por el metacéstono del parásito *Taenia solium*. En humanos, la complicación más severa de esta enfermedad es la neurocisticercosis. El fármaco de primera elección para el tratamiento de esta enfermedad es el albendazol.

Sin embargo, la biodisponibilidad y eficacia de este fármaco es variable. Por ello, es necesario seguir en la búsqueda de nuevas moléculas que tengan efectos terapéuticos contra ésta y otro tipo de infecciones parasitarias causadas por helmintos que afectan tanto a humanos como animales.

En la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas, las que son aisladas de fuentes naturales tienen gran importancia. Dentro de estos compuestos de origen natural, encontramos a las naftoquinonas, a las cuales se les han atribuido propiedades farmacológicas como agentes antibacterianos, antifúngicos, antitumorales y antiparasitarios.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antihelmíntico *in vitro* de la naftoquinona LLJMY3, una naftoquinona que se aisló de una fuente natural y que posteriormente fue sintetizada. Para evaluar este efecto se utilizó el modelo experimental de cisticercosis murina causada por *Taenia crassiceps* cepa ORF y se utilizaron curvas temporales y curvas concentración-respuesta.

Durante la realización de este trabajo observamos que la naftoquinona LLJMY3 a una concentración de 100 µg/mL causa la parálisis de la membrana de los cisticercos a partir del día tres después de haber iniciado el tratamiento *in vitro*. Además, este compuesto induce cambios en la forma, tamaño y apariencia de los cisticercos. Así mismo, se observa una disminución en la reproducción.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la naftoquinona LLJMY3 tiene un efecto cisticida *in vitro*, pero estudios en modelos *in vivo* son necesarios para establecer su eficacia y seguridad y con ello determinar si es un buen candidato como tratamiento de la cisticercosis.

II. ANTECEDENTES

1. Generalidades de los helmintos.

Las infecciones causadas por helmintos, se consideran una de las causas más importantes de la pérdida de productividad en la crianza de ganado y la mayor causa de morbilidad en humanos.¹

Se estima que este tipo de infecciones, afecta a más de 2 billones de personas alrededor del mundo. Su prevalencia, es mayor en zonas rurales, en donde la pobreza es predominante. Frecuentemente, las infecciones en estas áreas, son causadas por más de una especie de helminto.

Helminto es un término general que se utiliza para designar a animales invertebrados macroscópicos, de cuerpo plano (Platyhelminthes) o cuerpo redondo (Nematoda), monoicos o dioicos. Los platelmintos, son metazoarios, es decir, organismo formados por muchas células, pero poco evolucionados. Carecen de aparato digestivo, y tienen una membrana denominada tegumento, la cual les permite captar los nutrientes del medio que los rodea. En cambio, los nematelmintos son organismos más evolucionados que los mencionados anteriormente, ya que, poseen un aparato digestivo completo, tienen una cutícula que los aísla del ambiente, de manera que no se alimentan a través de su superficie, sino mediante un orificio denominado boca.²

Existen tres grupos de helmintos de importancia médica: nemátodos, céstodos y tremátodos.³

Los céstodos, constituyen un grupo de gusanos planos del phylum Platelminthos. Son animales invertebrados macroscópicos, aplanados, en forma de listón, de diferentes tamaños.⁴

Dentro de los céstodos de importancia médica y veterinaria, encontramos a la especie *Taenia solium*, la cual es causante de enfermedades como la teniasis y la cisticercosis.

2. El ciclo de vida del céstodo *Taenia solium*.

El ciclo de vida de *Taenia solium* que se muestra en la figura 1, involucra dos hospederos: los humanos son hospederos definitivos para la tenia adulta, mientras que, tanto cerdos como humanos, pueden actuar como hospederos intermediarios para el estado larvario conocido como cisticerco.

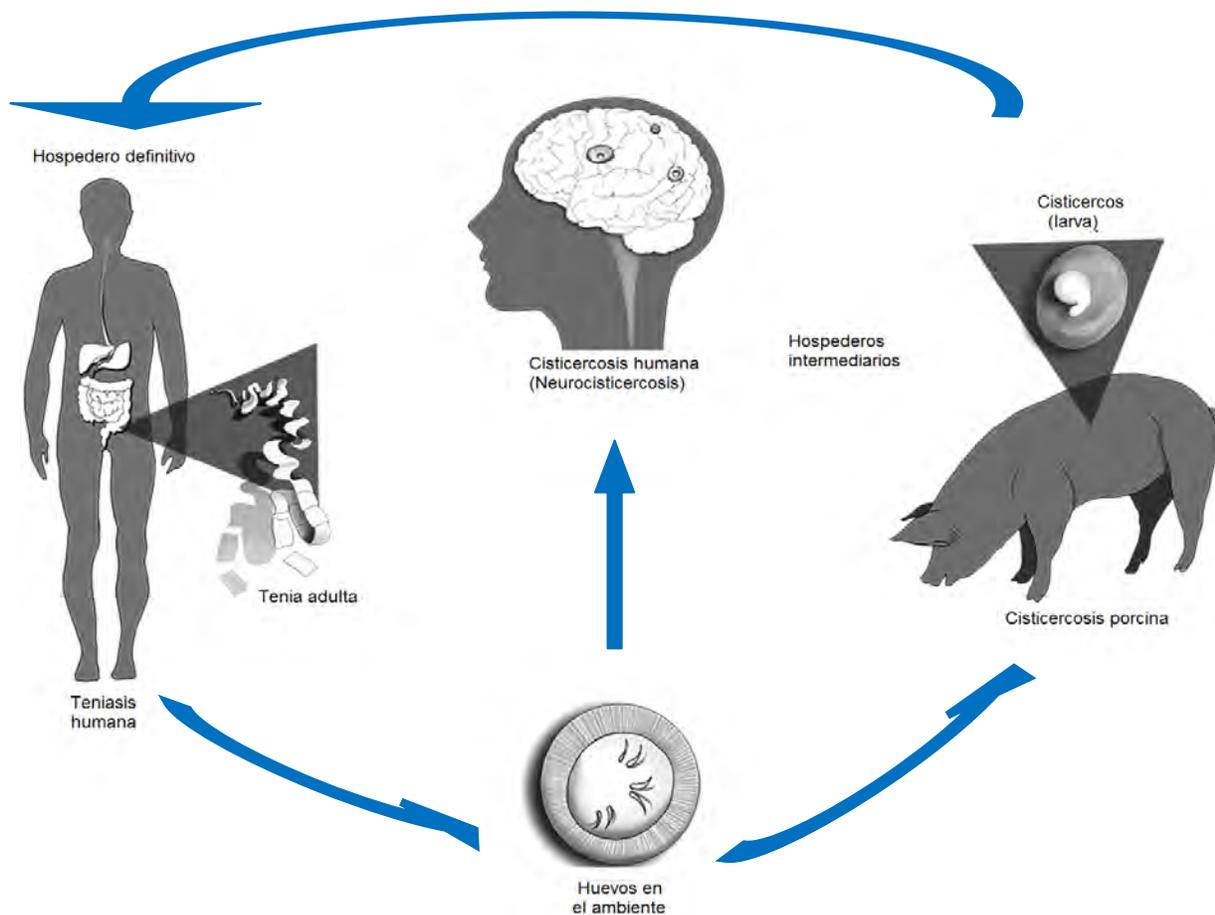


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*. Figura modificada de Bobes *et al.* 2014

La teniasis, es la infección causada por la presencia en el intestino delgado de parásitos adultos de la *Taenia solium*.

Las tenias adultas, en algunos casos, llegan a medir de 2 a 4 metros de longitud. Su morfología, se caracteriza por la presencia del escólex, el cual, es el órgano de fijación

que está compuesto por cuatro ventosas y un róstelo con alrededor de 22-32 ganchos. Seguido del escólex, se encuentra el cuello, el cual es una región de tejido indiferenciado que da origen a la cadena de proglótidos. Y finalmente, el estróbilo, es el conjunto de los proglótidos; cerca del cuello, encontramos los proglótidos inmaduros y en la parte final del estróbilo a los proglótidos maduros. Cada proglótido maduro, puede contener 40 000 huevos. Un sólo parásito adulto de *Taenia solium* puede liberar hasta 300 000 huevos diariamente.⁶

Esta enfermedad es adquirida después del consumo de carne de cerdo cruda o mal cocida que contiene el metacéstodo o cisticerco de este parásito. Generalmente, esta infección es asintomática, pero se han reportado síntomas en humanos, como dolor abdominal, náusea, alteraciones en el apetito, pérdida de peso, cefalea, diarrea o constipación, mareo y prurito anal.⁷

Por otro lado, la cisticercosis puede presentarse en humanos y cerdos. Su distribución es cosmopolita.

Este padecimiento se adquiere después del consumo de huevos de *Taenia solium* que son liberados a través de las heces fecales de los sujetos infectados. Las oncosferas, se liberan y activan en el intestino delgado, probablemente debido a la acción de las sales biliares. En menos de dos horas, las oncosferas entran a los vasos sanguíneos o linfáticos de la mucosa intestinal, y migran hacia órganos y tejidos como el músculo estriado y sistema nervioso.^{6,7}

En 2010, la Organización Mundial de la Salud (OMS), la añadió a la lista de enfermedades tropicales desatendidas.¹³

Se estima que aproximadamente 2.5 millones de personas son portadores de la forma adulta de *Taenia solium* y no menos de 20 millones de personas están infectadas con el cisticerco de la *Taenia solium*.⁸

3. Neurocisticercosis.

La complicación más severa de la cisticercosis en humanos es la neurocisticercosis (NCC). La OMS ha calculado más de 50 000 muertes anuales debidas a la neurocisticercosis.¹⁰

Aunque no hay estadísticas oficiales, se estima que en América latina el número de casos de cisticercosis en humanos es de 11-29 millones. Para nuestro país, no existen datos disponibles del número de personas afectadas por esta enfermedad.¹⁴

Los síntomas varían dependiendo del número, localización anatómica, y la respuesta inflamatoria del paciente hacia el parásito. Las principales manifestaciones clínicas neuronales de esta enfermedad son: convulsiones, cefalea crónica, hipertensión intracraneal, demencia y es la principal causa de epilepsia adquirida.^{6, 9, 10, 11,12} En el mundo, 50 millones de personas padecen epilepsia y se estima que el 29% de estos casos están asociados con la NCC.¹³ En nuestro país, se calcula que aproximadamente que entre 140 a 150 mil personas, padecen epilepsia asociada con la NCC.^{14,15}

De acuerdo a datos obtenidos por la OMS y que pueden apreciarse en la figura 2, la NCC tiene una alta prevalencia en países en vías de desarrollo de Latinoamérica, África y Asia¹⁶ y se relacionan con servicios sanitarios escasos, higiene inadecuada, defecación al aire libre, crianza de cerdos en los traspatios de los hogares y la pobreza.¹⁷ Además, se ha observado un incremento en los casos en países desarrollados como resultado de la migración.⁶

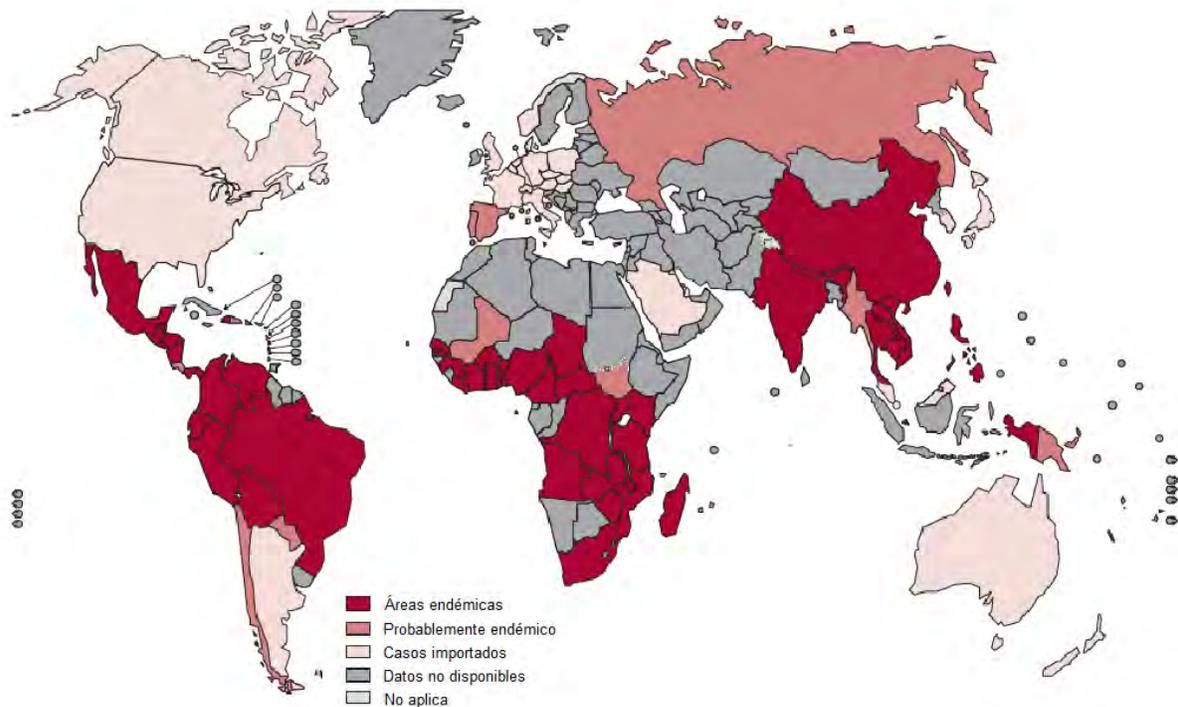


Figura 2. Distribución mundial de la cisticercosis en 2011 de acuerdo a la OMS. Figura modificada de *Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases. 2013*

La NCC, tiene un alto impacto económico y social, ya que para su diagnóstico se requieren estudios especializados, como el análisis del líquido cefalorraquídeo; estudios de imagen cerebral, como lo son: la tomografía axial computada y la resonancia magnética.

Además, la mayoría de los pacientes que padecen síntomas relacionados con la neurocisticercosis provienen de comunidades rurales, lo cual dificulta que tengan acceso a esta clase de estudios. Y, en muchas ocasiones, los pacientes necesitan consultas múltiples y cirugías que permitan retirar a los cisticercos de las áreas afectadas.

4. Fármacos utilizados en el tratamiento de la neurocisticercosis y la teniasis causados por *Taenia solium*.

Dentro de las alternativas terapéuticas para tratar la teniasis y la cisticercosis, encontramos el uso de fármacos como el albendazol, el prazicuantel y la niclosamida. Sin embargo, en el mercado mexicano, la niclosamida no se encuentra disponible.

Los fármacos más utilizados en el tratamiento de la neurocisticercosis son el albendazol y el prazicuantel. Usualmente son acompañados de corticoesteroides o de otros agentes antiinflamatorios. No obstante, el uso de algunos corticoesteroides como la dexametasona, suelen aumentar (albendazol) o disminuir (prazicuantel) los niveles plasmáticos de ambos fármacos.^{18, 19}

Hoy en día, el albendazol (metil N-(6-propilsulfanil-1H-benzimidazol-2-il) carbamato), es el fármaco de primera elección para el tratamiento de la neurocisticercosis.¹⁶ Éste es un fármaco antihelmíntico de amplio espectro, que ha sido utilizado extensamente tanto en medicina veterinaria como en la medicina humana. Su uso en humanos fue aprobado en 1982.²⁰ Se prefiere respecto al prazicuantel, debido a que tiene una mayor disponibilidad, un menor costo y, normalmente requiere periodos cortos de tratamiento.

La posología de este fármaco en pacientes adultos con NCC, es de 400 mg, dos veces al día, dependiendo del número, tipo y localización de los cisticercos, y la duración del tratamiento puede ser de 8 a 30 días. En niños, la dosis recomendada es de 15 mg/Kg al día (no debe excederse los 800 mg) divididos en dos dosis, con una duración del tratamiento de 8 a 30 días. Tanto en pacientes adultos y niños, el tratamiento puede repetirse si es necesario.

En algunos ensayos clínicos, se ha mostrado que el tratamiento con albendazol lleva a la desaparición de cisticercos viables, sólo en un tercio de los pacientes, después de un primer curso de tratamiento. Y, en un estudio realizado por Góngora *et al* (2006), se encontró que existe una alta variabilidad inter-individual en los niveles plasmáticos del fármaco y en eficacia. Además, se menciona que un sólo curso de terapia con albendazol es insuficiente como tratamiento para pacientes que tienen cisticercos localizados en la zona intraventricular del cerebro o cisticercos gigantes.²¹

5. Albendazol.

El albendazol, es prácticamente insoluble en agua y en consecuencia, es pobremente absorbido en el tracto gastrointestinal, lo cual limita su biodisponibilidad. Su absorción puede ser incrementada cuando se consumen alimentos ricos en grasas.^{20,22}

Una vez que el albendazol es absorbido por el intestino, este fármaco lleva un extenso metabolismo de primer paso mediado por el hígado. Esta biotransformación, da origen a sus principales metabolitos, el sulfóxido y la sulfona de albendazol. Las estructuras químicas del albendazol y sus metabolitos pueden observarse en la figura 3.

Dos sistemas enzimáticos median la biotransformación del albendazol a sus metabolitos. En estudios *in vitro*, se ha observado que la producción del sulfóxido de albendazol esta mediada por el sistema flavin mono-oxigenasa y por la enzima del citocromo p450, CYP 3A4. Mientras que la formación de la sulfona es principalmente catalizada por la subfamilia del CYP 1A.^{22, 23,24}

Se sabe que, el sulfóxido de albendazol, es la forma activa de este fármaco, mientras que, la sulfona es el metabolito inactivo. Estos metabolitos son excretados principalmente en la orina.

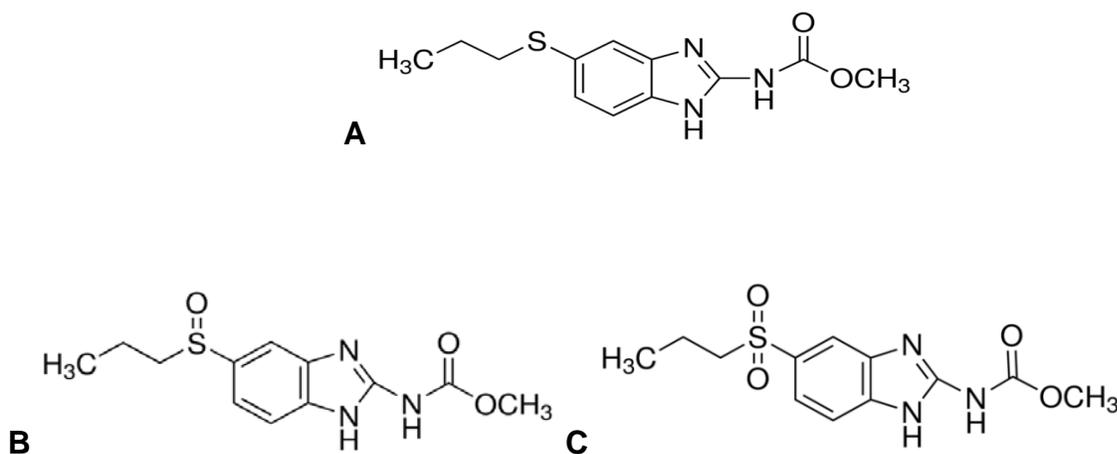


Figura 3. Estructuras químicas del albendazol (A) y sus principales metabolitos el sulfóxido de albendazol (B) y la sulfona de albendazol (C). Figuras tomadas de

www.sigmaaldrich.com

Tanto el albendazol, como su metabolito, el sulfóxido de albendazol, se unen a las proteínas plasmáticas en un porcentaje de 89-92% y de 62-67% respectivamente.²²

Por estas razones, es necesario seguir en la búsqueda de nuevas moléculas que tengan efectos terapéuticos contra ésta y otro tipo de infecciones parasitarias causadas por helmintos, tanto en humanos como en animales de consumo humano e importancia veterinaria.

5.1 Mecanismo de acción del albendazol.

La actividad farmacológica del albendazol en el parásito se debe a que esta molécula tiene afinidad por la β -tubulina. El albendazol, causa alteraciones degenerativas en el tegumento y las células intestinales del parásito, por su unión selectiva al sitio tubulina-colchicina, por lo que se inhibe la polimerización de los microtúbulos. La pérdida de los microtúbulos citoplasmáticos, lleva a la disminución en la captación de glucosa por larvas y/o adultos de parásitos susceptibles, por lo que, los parásitos tienen que hacer uso de sus reservas de glucógeno.

Los cambios degenerativos en el retículo endoplásmico, la capa germinal de la mitocondria y la consecuente liberación de los lisosomas, resultan en la disminución de la producción de ATP. Debido a la disminución de energía, los parásitos son inmovilizados y eventualmente mueren.^{25, 26}

Aunque la unión a la tubulina del parásito es más potente para el albendazol que para el sulfóxido de albendazol, la rápida biotransformación del albendazol a su metabolito sulfóxido, lleva a la consideración de que el sulfóxido de albendazol (ABZSO) es el fármaco activo en el tratamiento de las helmintiasis.^{24, 31}

5.2 Reacciones adversas, toxicidad y contraindicaciones.

El albendazol ocasiona pocos efectos adversos cuando se utiliza por corto tiempo. En cerca del 1% de personas tratadas, se observan síntomas leves y transitorios como

dolor epigástrico, diarrea, náusea y vómito. A veces, aparecen mareos y cefaleas. La reacción adversa más frecuente, es la disfunción hepática que suele manifestarse por aumento de las transaminasas séricas; pero la actividad enzimática se normaliza una vez que termina el tratamiento. Los efectos adversos durante el tratamiento prolongado son: dolor en vías gastrointestinales, cefaleas intensas, fiebre, fatiga, alopecia, leucopenia y trombocitopenia.

Por otro lado, el albendazol ha mostrado efectos teratogénicos que causan embriotoxicidad y malformaciones esqueléticas en ratas y conejas gestantes. El efecto teratogénico en ratas, fue mostrado a dosis orales de 10 y 30 mg/kg/día administradas durante los días 6 al 15 de gestación y, en conejas preñadas a la dosis oral de 30/mg/kg/día administrada durante los días 7 al 19 de gestación.^{27,28}

Hasta ahora no hay estudios adecuados y bien controlados en mujeres embarazadas. Por lo que, la FDA ha definido el riesgo de usar el albendazol durante el embarazo como categoría C. Sin embargo, los beneficios de usar el albendazol en mujeres embarazadas pueden ser aceptables a pesar de los efectos embriotóxicos y teratogénicos que pueda sufrir el feto.²⁷

Además, se sabe que el albendazol es excretado en la leche de los animales. Y no se sabe si también es excretado por leche humana. Por lo tanto, también deben tomarse precauciones en mujeres que se encuentran amamantando.²⁷ Por otro lado, la inocuidad de este fármaco en niños menores de dos años de edad no se ha definido.^{27,29,30}

6. Nuevas moléculas con actividad antiparasitaria: Naftoquinonas.

Las fuentes naturales, como las plantas, representan la mayor oportunidad para descubrir nuevas moléculas con actividad farmacológica.

Las quinonas son una clase de compuestos orgánicos cuyas propiedades químicas les permiten interactuar con blancos biológicos, mediante la formación de enlaces covalentes y por su acción en reacciones de óxido-reducción como agentes de

transferencia de electrones.³² Dentro de esta clase de compuestos, se encuentran las naftoquinonas, que se caracterizan por ser pigmentos naturales. Estructuralmente, son compuestos derivados del naftaleno, y se caracterizan por tener dos grupos funcionales carbonilo en uno de los anillos aromáticos en posición 1,4 a los cuales se les conoce como 1,4-naftoquinonas y, en la posición 1,2 llamados 1,2-naftoquinonas (figura 4).³³

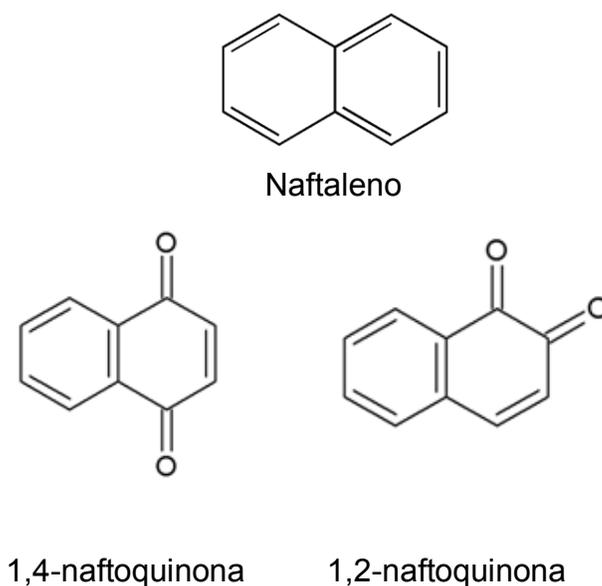


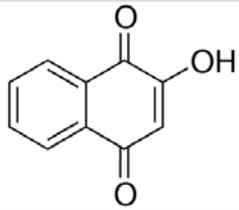
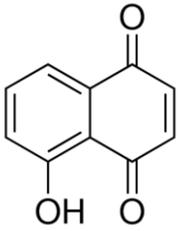
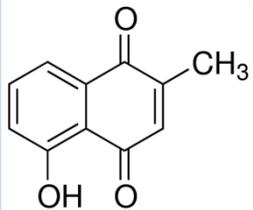
Figura 4. Estructuras químicas del naftaleno y de la 1,4-naftoquinona y la 1,2-naftoquinona. Figura tomada de Cantú R *et al.* 2012

La distribución en la naturaleza de las naftoquinonas es muy amplia. Se encuentran en mayor proporción en plantas superiores de determinadas familias de Angiospermas como: *Ebenaceae*, *Droseraceae*, *Bignoniaceae*, *Verbenaceae*, *Plumbaginaceae*, *Juglandaceae*, *Boraginaceae*, etc. Mientras que, otras naftoquinonas, como las menaquinonas, la naftarazina y los espinocromos y equinocromos, son sintetizadas por bacterias, hongos y erizos respectivamente.^{33, 58}

Algunas naftoquinonas naturales, como la lawsona, juglona, plumbagina, lapachol, alkalina y shikona aisladas de fuentes vegetales destacan por su uso en la medicina tradicional.⁵⁸

Algunos ejemplos de naftoquinonas y sus propiedades se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Estructura química de varias naftoquinonas, sus características y algunas propiedades que se les han atribuido.^{34, 58}

Compuesto	Características	Propiedades
Lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) 	Colorante naranja que se encuentra en las hojas y tallos de la henna (<i>Lawsonia inermis</i> L.)	Colorante dérmico.
Juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) 	Colorante marrón que se aísla en las especies del género <i>Juglans</i> .	Le confiere el color característico a la cáscara de nuez. Se le ha utilizado como herbicida y como un agente colorante para alimentos y cosméticos.
Plumbagina (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona) 	Colorante amarillo que se encuentra en las especies de los géneros <i>Plumbago</i> .	Se le han atribuido actividades antiinflamatorias, inmunosupresoras y anti-ateroescleróticas.

Especialmente, las 1,4-naftoquinonas, son una clase de compuestos estudiados en la síntesis orgánica, química medicinal y en la química de productos naturales.³⁶

Además, de las propiedades colorantes de estas naftoquinonas, en varios estudios, se ha mostrado que estas moléculas poseen propiedades farmacológicas como agentes antibacterianos⁵⁵, antifúngicos⁵⁵, antitumorales⁵³ y antiparasitarios.^{35,36, 49, 50, 51,52, 58}

Para varias 1,4-naftoquinonas, la actividad antiprotozoaria ha sido reportada^{35, 36,54}. Por ejemplo, el lapachol es una naftoquinona de origen natural, que pertenece a la clase de las alquil 1,4-naftoquinonas; fue la primera naftoquinona descubierta con actividad contra el agente infeccioso causante de la malaria, *P. falciparum*. Más tarde se descubrió que su toxicidad contra este parásito era debida a su interacción con la cadena respiratoria de la mitocondria.^{35, 36}

Sin embargo, esta naftoquinona no ha sido usada como tratamiento contra la malaria; pero, la estructura molecular del lapachol sirvió como inspiración para sintetizar la naftoquinona atovacuona (figura 5). Actualmente, la terapia conjunta de atovacuona-proguanil es una alternativa para la profilaxis y terapia para combatir la malaria.³⁵

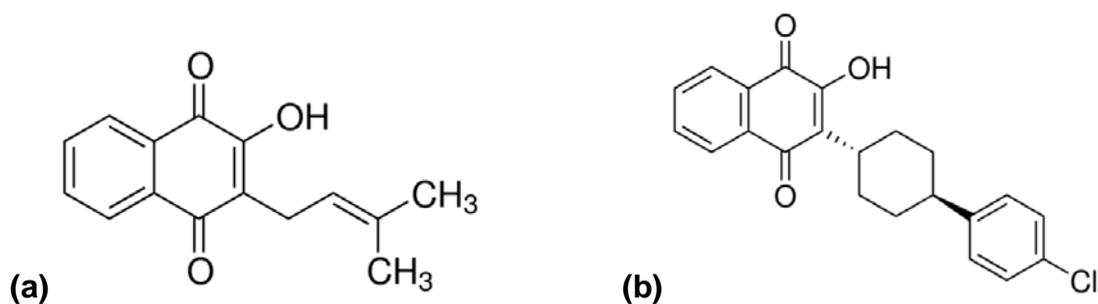


Figura 5. Estructura química de la naftoquinona natural lapachol (a) y de la naftoquinona sintética atovacuona (b). Figura modificada de Sharma et al. 2012

La actividad antiparasitaria de la atovacuona, también se relaciona con su acción selectiva sobre el complejo bc1 del citocromo mitocondrial. Esta molécula inhibe el transporte de electrones y colapsa el potencial de la membrana mitocondrial. La principal función del transporte de electrones en *P. falciparum* es regenerar la

ubiquinona, que es el aceptor de electrones de la enzima dihidroorotato deshidrogenasa del parásito, una enzima esencial para la biosíntesis de pirimidina.²⁹

De manera general, las naftoquinonas naturales y sintéticas han mostrado su actividad antiprotozoaria por la generación de especies reactivas de oxígeno causando la peroxidación de lípidos y la alteración en el transporte electrónico con inhibición de la respiración celular.⁵⁸

6.1. Mecanismos de acción de las naftoquinonas.

La gran diversidad de actividades biológicas que tienen las naftoquinonas han sido explicadas basándose en su estructura química, ya que, estas moléculas tiene la capacidad de aceptar uno o dos electrones para formar su correspondiente radical anión ó dianión y a sus propiedades ácido-base (figura 6).⁵⁸

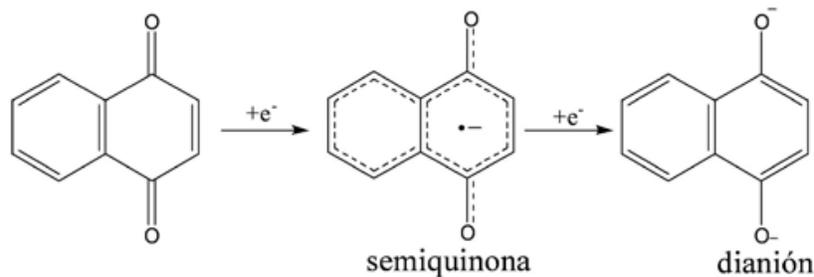


Figura 6. Estructuras químicas de los intermediarios de las naftoquinonas. Figura tomada de Leyva et al. 2011

Las naftoquinonas pueden experimentar una reducción no enzimática por ganancia de un electrón, lo que da lugar a la formación de la semiquinona; pero, la formación de este intermediario puede llevarse a cabo enzimáticamente, usualmente por una reacción de reducción mediada por flavoenzimas. La reducción de la naftoquinona puede seguir un mecanismo de un electrón, en donde participan la NADPH-citocromo P450 reductasa, NADH deshidrogenasa y la NADP ferredoxina reductasa, y por un mecanismo mixto de reducción por uno y dos electrones, con participación de las enzimas NAD(P)H deshidrogenasa y la lipoamida deshidrogenasa.⁵⁸

Con base en lo anterior, la toxicidad de las naftoquinonas se debe a dos mecanismos principales:

Por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), por ejemplo, bajo condiciones aeróbicas, los radicales semiquinona pueden auto-oxidarse para regenerar la quinona, lo que da lugar a la formación de aniones superóxido y peróxido de hidrógeno.⁵⁸

O bien, mediante la formación de aductos con macromoléculas tales como el ADN y proteínas (por ejemplo: la glutatión reductasa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, tubulina, entre otras).^{32,36, 58}

No obstante, algunas naftoquinonas como la ubiquinona, la plastoquinona y el grupo de la vitamina K, participan en procesos fisiológicos importantes como la respiración celular y en el proceso de coagulación respectivamente.

6.2. La naftoquinona LLJMY3.

En este trabajo, la naftoquinona denominada como LLJMY3 utilizada durante los experimentos de la presente tesis fue donada por el grupo de la Dra. Lluvia López López, de la Universidad Autónoma de Coahuila; dicha naftoquinona fue aislada de una fuente natural del género *Lawsonia*. Junto con la naftoquinona LLJMY3, se aislaron seis naftoquinonas más. Posteriormente dicho grupo de investigación sintetizó y evaluó químicamente a la naftoquinona LLJMY3, obteniendo los datos de masa molecular y patrón de solubilidad (tabla 2):

Masa molecular calculada LLJMY3: 391.39 g/mol

Tabla 2. Patrón de solubilidad de la naftoquinona LLJMY3.

Disolventes	Lawsona*	LLJMY 3
Agua	-	-
Metanol	+	+
Etanol	+	+
Dimetilsulfóxido	++	++
Acetona	++	++
Cloroformo	++	++
Éter etílico	-	-
Hexano	-	-

++ Completamente soluble, + Parcialmente soluble, - Insoluble.

*Lawsona, compuesto de referencia.

7. La cisticercosis murina causada por *Taenia crassiceps* como herramienta en la investigación.

Debido a la dificultad que representa trabajar con los hospederos definitivos de *Taenia solium*, nuevas estrategias experimentales han sido desarrolladas.

La cisticercosis murina causada por *Taenia crassiceps* (figura 7) inducida experimentalmente, representa una estrategia experimental alternativa para estudiar la relación hospedero-parásito y los factores fisiológicos del huésped que están asociados con la cisticercosis porcina y en algún grado con la neurocisticercosis humana.³⁷ La cisticercosis murina, puede ser inducida tanto en ratones hembras como en machos, por la inyección directa del metacéstodo de *Taenia crassiceps* en la cavidad peritoneal de los ratones.

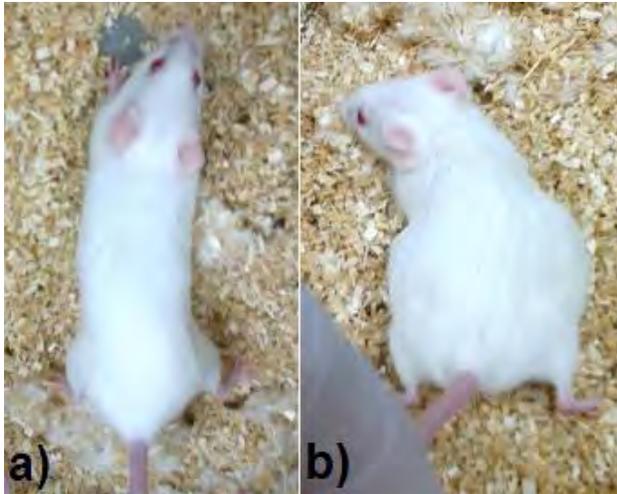


Figura 7. Cisticercosis murina causada por *Taenia crassiceps* cepa ORF. a) ratón hembra Balb/c no infectado; b) ratón hembra Balb/c infectado, se observa el aumento del volumen de la cavidad peritoneal (Fotografías tomadas por Yuli Aranda López).

Los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF, tienen la capacidad de proliferar asexualmente por gemación (figura 8) dentro de su hospedero intermediario, en este caso el ratón. Esta es una característica útil, que ha permitido mantener las cepas indefinidamente en la cavidad peritoneal de los ratones, a través de pasajes seriados.³⁸



Figura 8. Cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF. Morfológicamente son vesículas ovaladas y translúcidas, llenas de fluido. En los polos se observa la gemación de los parásitos (señalados con flechas). (Fotografías tomadas por Yuli Aranda López).

Otra característica, es que los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF son incapaces de desarrollarse en tenias adultas dentro de su hospedero definitivo, debido a la pérdida de su escólex.

Además, *Taenia crassiceps* cepa ORF, comparte antígenos y muestra una alta homología de su ADN con otros céstodos, como *Taenia solium*. Por lo que, este modelo

experimental, se ha considerado útil para el diseño de estudios aplicables a los cisticercos de *Taenia solium*.

A continuación, se mencionan algunos ejemplos:

- A partir de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF, se han obtenido antígenos que han servido para el desarrollo de vacunas experimentales, como la S3PVAC y la KETc7 que van dirigidas contra la cisticercosis porcina y la cisticercosis murina respectivamente. ^{46,57}
- Esta estrategia experimental ha sido ampliamente utilizada, en la evaluación de moléculas con actividad antiparasitaria, por ejemplo, se ha estudiado el efecto de moléculas derivadas de benzimidazoles (como el sulfóxido de albendazol (ABZSO) y RCB20) sobre proteínas del citoesqueleto de *Taenia crassiceps* cepa ORF. ⁴⁵
- Además, *Taenia crassiceps* cepa ORF ha sido útil como modelo para evaluar la actividad de extractos que provienen de plantas, como los obtenidos de *Teloxys graveolens* conocida comúnmente como “epazote de zorrillo” y al cual se le han atribuido propiedades antiparasitarias. ⁴³
- Por otro lado, existe evidencia que muestra que la cisticercosis murina causada por *T. crassiceps* cepa ORF presenta dimorfismo sexual, los ratones hembra desarrollan cargas parasitarias mayores en comparación a los ratones machos. A partir de esta evidencia, se han realizado estudios donde se ha evaluado el efecto *in vitro* de esteroides sexuales, como o-estradiol, la progesterona, la testosterona y la dihidrotestosterona. Los hallazgos encontrados han mostrado que algunas de estas hormonas alteran la morfología de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF. Estos descubrimientos, han ayudado a comprender la relación molecular hospedero-parásito y podrían servir de guía para el diseño de fármacos que actúen sobre moléculas importantes del parásito que median su establecimiento, crecimiento y reproducción dentro de un hospedero. ^{37,44}

JUSTIFICACIÓN

Los múltiples reportes en la literatura, donde se evalúa la actividad de naftoquinonas naturales y sintéticas sobre parásitos están dirigidos principalmente hacia protozoarios, esta extensa investigación ha dado como resultado que la naftoquinona sintética atovacuona sea utilizada como tratamiento contra el agente causante de la malaria. Sin embargo, el efecto de las naftoquinonas sobre helmintos, ha sido poco estudiado y no hay ningún reporte donde se evalúe su actividad sobre céstodos.

El uso de las naftoquinonas puede ser considerada una nueva estrategia para la prevención y tratamiento de infecciones causadas por helmintos de importancia médica y veterinaria, como lo son las causadas por el céstodo *Taenia solium*. Las infecciones causadas por este parásito aun se consideran endémicas de países en vías de desarrollo, entre ellos México.

Para evaluar el efecto antiparasitario de las naftoquinonas sobre céstodos, el modelo experimental de cisticercosis murina causada por *Taenia crassiceps* cepa ORF representa una alternativa viable porque ha sido ampliamente utilizado para el desarrollo de experimentos *in vitro* e *in vivo* que son aplicables a los cisticercos de *Taenia solium*.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

En cultivos *in vitro* ¿La naftoquinona LLJMY3 mostrará efecto cisticida sobre el metacéstodo de la *Taenia crassiceps* cepa ORF?

III. HIPÓTESIS

La naftoquinona LLJMY3 mostrará directamente actividad cisticida *in vitro* sobre el parásito *Taenia crassiceps* cepa ORF.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar el efecto antihelmíntico de la naftoquinona LLJMY3 sobre la motilidad, reproducción y apariencia de cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF *in vitro*.

Objetivos particulares

- Determinar mediante curvas temporales en cultivos *in vitro* de cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF, el efecto de la naftoquinona LLJMY3.
- Evaluar mediante curvas concentración-respuesta en cultivos *in vitro* de cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF, el efecto de la naftoquinona LLJMY3.
- Estudiar mediante microscopia óptica, el efecto de la naftoquinona LLJMY3 sobre la motilidad y viabilidad del cisticerco de *Taenia crassiceps* cepa ORF.
- Observar, mediante microscopía óptica la reproducción y apariencia de los cisticercos de *Taenia crassiceps* tratados con la naftoquinona LLJMY3 de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Declaración de principios éticos

El Comité de Cuidado y Uso Animal del Instituto de Investigaciones Biomédicas, evaluó el cuidado y las prácticas de experimentación llevadas con los animales de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Esta norma está en estricta conformidad con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud (NIH) de E.U.A, para garantizar el cumplimiento con las reglas y directrices internacionales establecidas. El Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas aprobó este protocolo, número de permiso 2009-16

Ratones hembra Balb/C de 6 semanas de edad fueron adquiridos de Harlan México. Los animales se mantuvieron en las instalaciones del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), en condiciones controladas de temperatura (22 ° C) y ciclos de 12 horas de luz-oscuridad. Fueron alimentados con la dieta Purina 5015 (Purina, St. Louis, MO) y agua esterilizada ad libitum.

2. Infección y obtención de cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

Los ratones hembra Balb/C se infectaron por vía intraperitoneal con 20 cisticercos de *Taenia crassiceps* (cepa ORF) de aproximadamente 2 mm, sin gemas, motiles y translúcidos. Los cisticercos fueron resuspendidos en 0.3mL de PBS estéril (PBS: 0.15M NaCl, 0.01M, pH 7.3) y cuidadosamente se inyectaron utilizando una aguja de calibre 21G. Después de cuatro a seis semanas de infección, los ratones se sacrificaron con la ayuda de la cámara de CO₂. La obtención de los cisticercos de la cavidad peritoneal de los ratones, se realizó en condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar. Los cisticercos recuperados se lavaron cinco veces con PBS estéril suplementado con 250 U/mL de Penicilina y 250 µg/mL de Estreptomina (Invitrogen).

Para los ensayos de la actividad de la naftoquinona LLJMY3, se seleccionaron los cisticercos de acuerdo a los siguientes criterios: tamaño aproximado de 2 mm, sin gemas, motiles y translúcidos.

3. Preparación de las soluciones stock de la naftoquinona LLJMY3.

Se prepararon dos soluciones de la naftoquinona LLJMY3 en DMSO (99.9%, J.T Baker)

La primera, a una concentración de 20 mg/mL. Esta solución fue esterilizada con ayuda de un filtro de 0.2 μm y conservada en oscuridad a 4°C. A partir de esta solución se prepararon las soluciones de la naftoquinona utilizadas para evaluar su efecto en la curva temporal.

La segunda solución de la naftoquinona se preparó a una concentración de 40 mg/mL. Esta solución fue esterilizada con ayuda de un filtro de 0.2 μm y conservada en oscuridad a 4°C. A partir de esta solución, se preparó una solución stock de 500 $\mu\text{g/mL}$ en medio RPMI suplementado. La solución de 500 $\mu\text{g/mL}$, se utilizó para preparar las soluciones a diferentes concentraciones de la naftoquinona LLJMY3 que fueron utilizadas para evaluar su efecto en la curva concentración-respuesta.

4. Curva temporal y curva concentración-respuesta para evaluar el efecto de la naftoquinona LLJMY3.

4.1 Curva temporal, efecto de la naftoquinona LLJMY3 a la concentración máxima de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Medio RPMI 1640 (*In Vitro s.a*) fue suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y una mezcla de 250 U/mL de Penicilina y 250 $\mu\text{g/mL}$ de Estreptomicina (Invitrogen). Al medio de cultivo se le adicionó el volumen correspondiente de la solución stock de 20 mg/mL de LLJMY3 para obtener una concentración final de 100 $\mu\text{g/mL}$. En ensayos por triplicado, en una placa de cultivo de seis pozos (Corning®), se colocaron 10 cisticercos por pozo y 2 mL de la solución de 100 $\mu\text{g/mL}$. La placa de cultivo fue colocada en incubadora Revco Technologies ajustada a 37°C, 5% CO₂ y 90% de humedad. El cultivo se realizó durante 10 días; el cambio medio se realizó cada dos días.

Se incluyó el control de vehículo, en el cual, los cisticercos se incubaron con medio RPMI suplementado al cual se le adicionó DMSO; la concentración final de DMSO en el medio de cultivo fue de 0.5%.

4.2 Curva concentración-respuesta, efecto de la naftoquinona LLJMY3 a 25, 50, 75 y 100 µg/mL.

Medio RPMI 1640 (*In Vitro s.a*) fue suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y una mezcla de 250 U/mL de Penicilina y 250 µg/mL de Estreptomicina (Invitrogen). Al medio de cultivo se le adicionó el volumen correspondiente de la solución stock de 500 µg/mL de LLJMY3 para obtener las respectivas concentraciones. El volumen necesario de cada una de las soluciones a las diferentes concentraciones utilizadas se preparó en fresco. En ensayos por triplicado, en una placa de cultivo de 24 pozos (Corning®), se colocaron 10 cisticercos por pozo y 2 mL de cada una de las soluciones. La placa de cultivo fue colocada en la incubadora Revco Technologies ajustada a 37°C, 5% CO₂ y 90% de humedad. El cultivo se realizó durante 5 días; el cambio medio se realizó cada dos días.

Se incluyeron dos controles: el control intacto, en el cual los cisticercos sólo se incubaron con medio RPMI 1640 suplementado; y, el control de vehículo, en el cual los cisticercos se incubaron con medio RPMI 1640 suplementado al cual se le adicionó DMSO; la concentración final de DMSO en el medio de cultivo fue de 0.25%.

Al finalizar el periodo de incubación correspondiente de ambas metodologías, los cisticercos se lavaron tres veces con 1 mL de PBS estéril y fueron incluidos en Trizol® y mantenidos a -70°C.

5. Evaluación macroscópica del efecto de la naftoquinona LLJMY3 sobre los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

Diariamente, durante el tiempo que se mantuvieron los cultivos *in vitro* de los ensayos de la curva temporal, así como, para los ensayos de la curva concentración-respuesta, los parásitos fueron observados con ayuda de un microscopio estereoscópico (Bausch&Lomb). Se evaluó y registró el cambio en la motilidad, tamaño, número de gemas y apariencia de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

En la evaluación de la motilidad de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF, se utilizó la siguiente escala de categorías:

+++	Completamente motil (100%)
++	Medianamente motil (>50%)
+	Ligeramente motil (<50%)
0	Sin motilidad (0%)

Para llevar un registro de los cambios observados en los parásitos, cada día se tomaron fotografías con la ayuda de una cámara de 5 megapíxeles que se adaptó manualmente al microscopio estereoscópico.

5. Análisis estadístico.

Todos los ensayos para determinar la curva temporal-respuesta y la curva concentración-respuesta, fueron realizados por triplicado. Fueron tres experimentos independientes, cada uno con tres pozos por concentración y con 10 cisticercos por pozo, para cada una de las curvas.

➤ Datos reproducción (número de gemas)

Los datos obtenidos del número de gemas de cada experimento, fueron reunidos y expresados como su media \pm desviación estándar.

En el caso de la curva temporal-respuesta, los datos fueron analizados utilizando la prueba Mann-Whitney. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de $P < 0.05$.

En el caso de la curva concentración-respuesta, estos datos fueron analizados utilizando la prueba Kruskal-Wallis y la prueba *post hoc* Dunns. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de $P < 0.05$.

➤ Datos motilidad

Los datos obtenidos de motilidad, fueron organizados en tablas de contingencia.

El software utilizado fue GraphPad Prism 6.

VI. RESULTADOS

1. Curva temporal del efecto de la naftoquinona LLJMY3 sobre los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

1.1. Observaciones macroscópicas.

En la figura 9 podemos observar el cambio paulatino de la morfología de los cisticercos tratados con la naftoquinona LLJMY3 a una concentración de 100 µg/mL. En los primeros días del tratamiento con LLJMY3, los cisticercos adoptan una forma circular para posteriormente disminuir considerablemente de tamaño a partir del día tres de cultivo. Aunque en la imagen no puede apreciarse claramente, los cisticercos aumentaron la opacidad de su membrana. Día tras día, podía observarse en el fondo de los pozos, pequeñas partículas de color oscuro, lo cual correlacionaba con la disminución de tamaño de los cisticercos y nos llevó a pensar, que posiblemente la membrana se estaba desintegrando. El tegumento de los cisticercos parecía bastante dañado y frágil.

Mientras tanto, los cisticercos tratados solo con el vehículo (VHC), el cual fue DMSO al 0.5% conservaron su morfología característica de vesículas ovaladas y pudo notarse un ligero aumento en su tamaño.

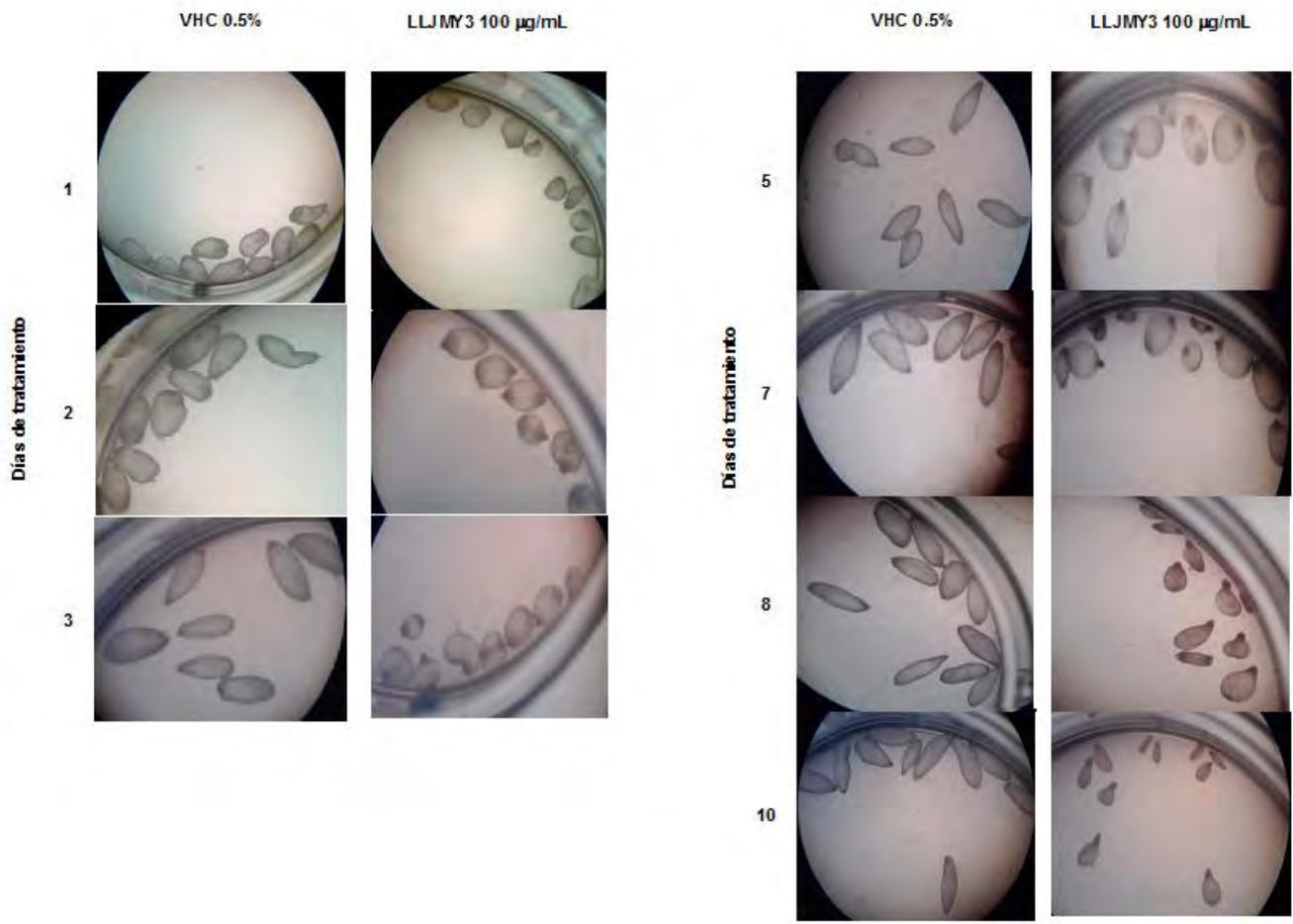


Figura 9. En cultivo *in vitro*, la naftoquinona LLJMY3 modifica el tamaño y la apariencia de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF. Curva temporal-respuesta para evaluar el efecto *in vitro* de la naftoquinona LLJMY3 a la concentración de 100 µg/mL durante diez días de cultivo. Se muestra el cambio progresivo de los cisticercos no tratados y tratados con LLJMY3 en diferentes días. VHC 0.5 %: vehículo, RPMI suplementado-DMSO al 0.5%

1.2. Efecto de la naftoquinona LLJMY3 sobre la motilidad de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

Como se especifico previamente en la sección de materiales y métodos, para evaluar la motilidad de utilizó una escala de categorías:

+++	Completamente motil (100%)
++	Medianamente motil (>50%)
+	Ligeramente motil (<50%)
0	Sin motilidad (0%)

Al comienzo del cultivo, todos los cisticercos incluidos en cada uno de los experimentos fueron completamente motiles, ya que presentaban movimientos de contracción y relajación de su membrana.

Como se ve en la figura 10, los cisticercos que fueron tratados solo con el vehículo (VHC), conservaron su motilidad completa durante los primeros tres días de tratamiento; con el paso de los días, los parásitos disminuyeron ligeramente su motilidad y a partir del día 8 de cultivo era necesario estimularlos mecánicamente para que mostraran su motilidad característica.

Por otro lado, los cisticercos que recibieron el tratamiento con LLJMY3 a 100 µg/mL, disminuyeron drásticamente su motilidad desde el día 2, ya que, sólo mostraban una ligera motilidad en los polos germinales. Los cisticercos perdieron esta pequeña motilidad por completo a partir de los días 3 a 4. Este efecto se mantuvo durante los 10 días que se mantuvieron los cultivos. La estimulación mecánica no ofreció algún cambio en su motilidad.

Todos los datos obtenidos fueron organizados en tablas de contingencia.

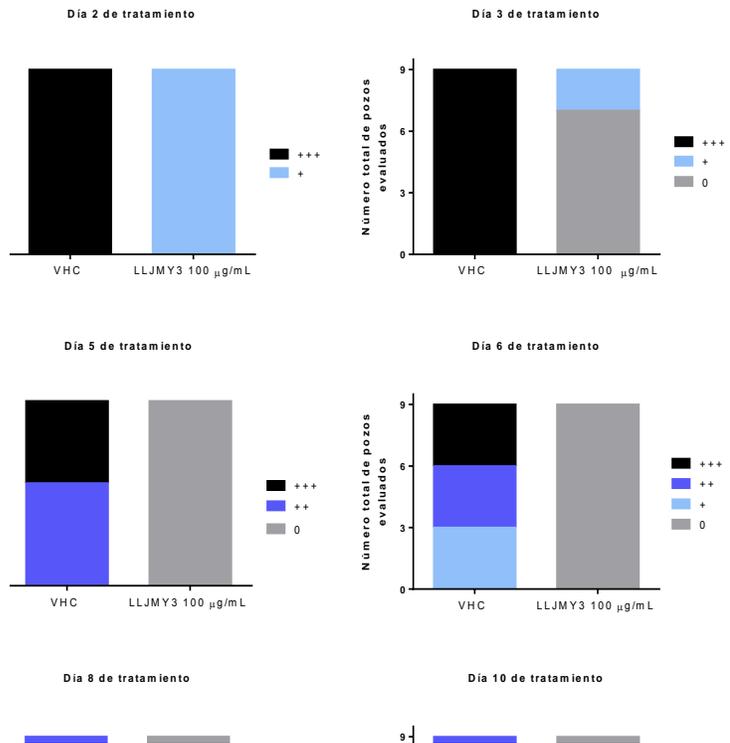


Figura 10. La naftoquinona LLJMY3 inhibe la motilidad de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF. Curva temporal-respuesta para evaluar el efecto *in vitro* de la naftoquinona LLJMY3 a la concentración de 100 µg/mL durante diez días de cultivo. Se muestran los cambios en la motilidad de los cisticercos de *Taenia crassiceps* durante los diez días de cultivo.

+++ : completamente motil; ++ : medianamente motil; + : ligeramente motil; 0 : sin motilidad.

1.3. Efecto de la naftoquinona LLJMY3 sobre la reproducción de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

Los cisticercos elegidos como individuos de cada experimento no debían presentar ninguna gema. Esto se muestra en la figura 11, donde se observa que los cisticercos que fueron incubados solo con el vehículo aumentaron gradualmente su reproducción asexual por gemación en el transcurso de los días de cultivo, las gemas podían observarse principalmente en los polos germinales. Estas nuevas gemas eran motiles.

En cambio, los parásitos tratados con LLJMY3 comenzaron su proceso de gemación en los primeros días del cultivo; sin embargo, el número de gemas que presentaron estos individuos fue menor a los tratados solo con el vehículo (VHC), la diferencia fue significativa desde el día 2 de tratamiento y la tendencia se mantuvo hasta el día 10. A partir del día 4, ya era difícil poder distinguir si los cisticercos estaban gemando, ya que las pequeñas gemas también parecían estar desintegrándose.

Con la realización de estos experimentos, obtuvimos datos sorprendentes del efecto de la naftoquinona LLJMY3 sobre la inhibición de la reproducción de este parásito.

Los datos fueron analizados utilizando la prueba de Mann-Whitney.

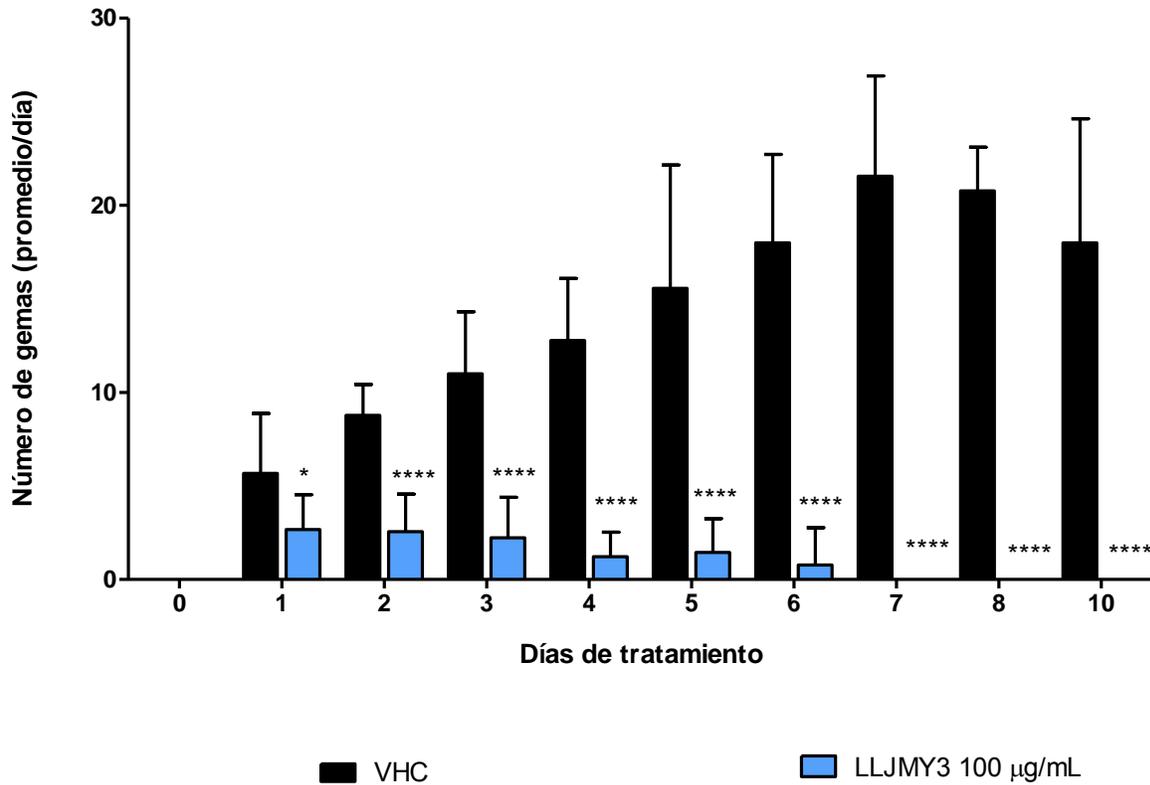


Figura 11. En cultivos *in vitro*, la naftoquinona LLJMY3 disminuye la reproducción asexual por gemación de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF. Curva temporal-respuesta para evaluar el efecto *in vitro* de la naftoquinona LLJMY3 a la concentración de 100 µg/mL durante diez días de cultivo. Se muestran los cambios en la reproducción de los cisticercos de *Taenia crassiceps* durante los diez días de cultivo.

VHC: Vehículo, RPMI suplementado-DMSO al 0.5%

LLJMY3: naftoquinona

* P<0.05; **** P<0.0001, diferencias significativas respecto a los cisticercos incubados con RPMI suplementado-DMSO al 0.5%.

2. Curva concentración-respuesta del efecto de la naftoquinona LLJMY3 sobre los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

2.1. Observaciones macroscópicas.

La figura 12 es una composición representativa y comparativa de los cambios en la morfología que presentaron los cisticercos tratados con LLJMY3 a diferentes concentraciones contra los cambios que presentaron los individuos del control intacto y vehículo (VHC) durante los 5 días que se mantuvo el cultivo. Los 5 días se eligieron en base a las curvas temporales.

Como se puede apreciar, en el día cero de tratamiento, los cisticercos son pequeñas vesículas ovaladas.

En la primera columna del cuadro que corresponde a los cisticercos intactos, las imágenes nos muestran que los cisticercos mantuvieron su morfología característica e incluso se pudo notar el aumento en el tamaño de los cisticercos al día 5 respecto a los cisticercos del día cero.

La segunda columna corresponde a los cisticercos que fueron tratados solo con el vehículo (DMSO al 0.25%). Se observa que los cisticercos aumentan de tamaño y ligeramente se ve aumentada la opacidad de la membrana.

La tercera columna corresponde a los cisticercos que fueron tratados con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LLJMY3. En estos individuos observamos que aumentan de tamaño, y tienen cambios poco perceptibles en el aumento de la opacidad de su membrana.

En la cuarta, quinta y sexta columna observamos a los individuos que fueron tratados con 50, 75 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LLJMY3 respectivamente. A la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a partir del día 4 se observa una ligera disminución sobre el tamaño de los cisticercos y en el último día se tiene una mayor opacidad comparada con los grupos controles.

Los tratados con 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, comenzaron a disminuir de tamaño a partir del día 3 de tratamiento; en día 4, ya se observa una mayor opacidad del tegumento comparada con

los grupos controles y de las concentraciones menores y, al día 5 la disminución en el tamaño es considerable.

De igual manera los cisticercos tratados con 100 $\mu\text{g/mL}$ de LLJMY3, desde el día 3 de tratamiento, aumenta su opacidad, disminuyen de tamaño considerablemente comparado contra los controles y las concentraciones de 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ y, respecto a la concentración de 75 $\mu\text{g/mL}$ los cisticercos son ligeramente más pequeños. Al día 5, el cambio en opacidad y tamaño es importante.

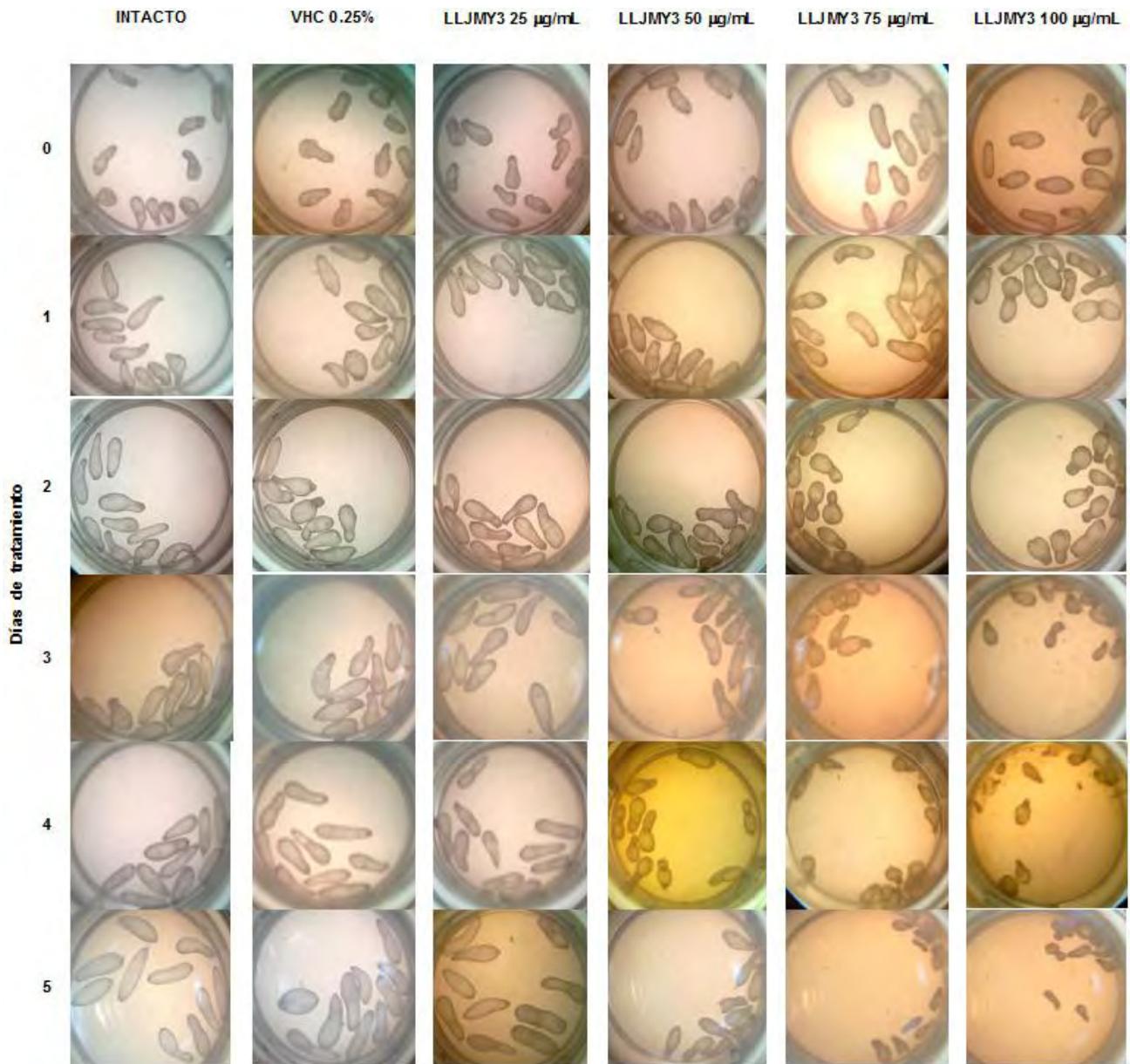


Figura 12. En cultivo *in vitro*, la naftoquinona LLJMY3 modifica el tamaño y la apariencia de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF. Curva concentración-respuesta para evaluar el efecto *in vitro* de la naftoquinona LLJMY3 durante cinco días de cultivo. Se muestra el cambio progresivo de los cisticercos no tratados y tratados con la naftoquinona LLJMY3 a diferentes concentraciones. VHC 0.25%: vehículo, RPMI suplementado-DMSO al 0.25%.

2.2. Efecto de la naftoquinona LLJMY3 sobre la motilidad de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

En la figura 13, se muestran los cambios que se obtuvieron en la motilidad de los cisticercos durante cada día. Es importante destacar que desde el día 1 (figura 13b), los cisticercos tratados con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LLJMY3 disminuyen considerablemente su motilidad y al finalizar el tratamiento la motilidad fue totalmente inhibida.

También observamos que los individuos del grupo intacto, del vehículo y del tratado con LLJMY3 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mantuvieron un comportamiento similar de su motilidad durante los cinco días de cultivo.

Al finalizar el tratamiento (figura 13f), los cisticercos tratados con LLJMY3 a las concentraciones de 50,75 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ perdieron considerablemente su motilidad. Los controles y vehículos, presentaron motilidad durante todo el tiempo de cultivo.

Todos los datos obtenidos fueron organizados en tablas de contingencia.

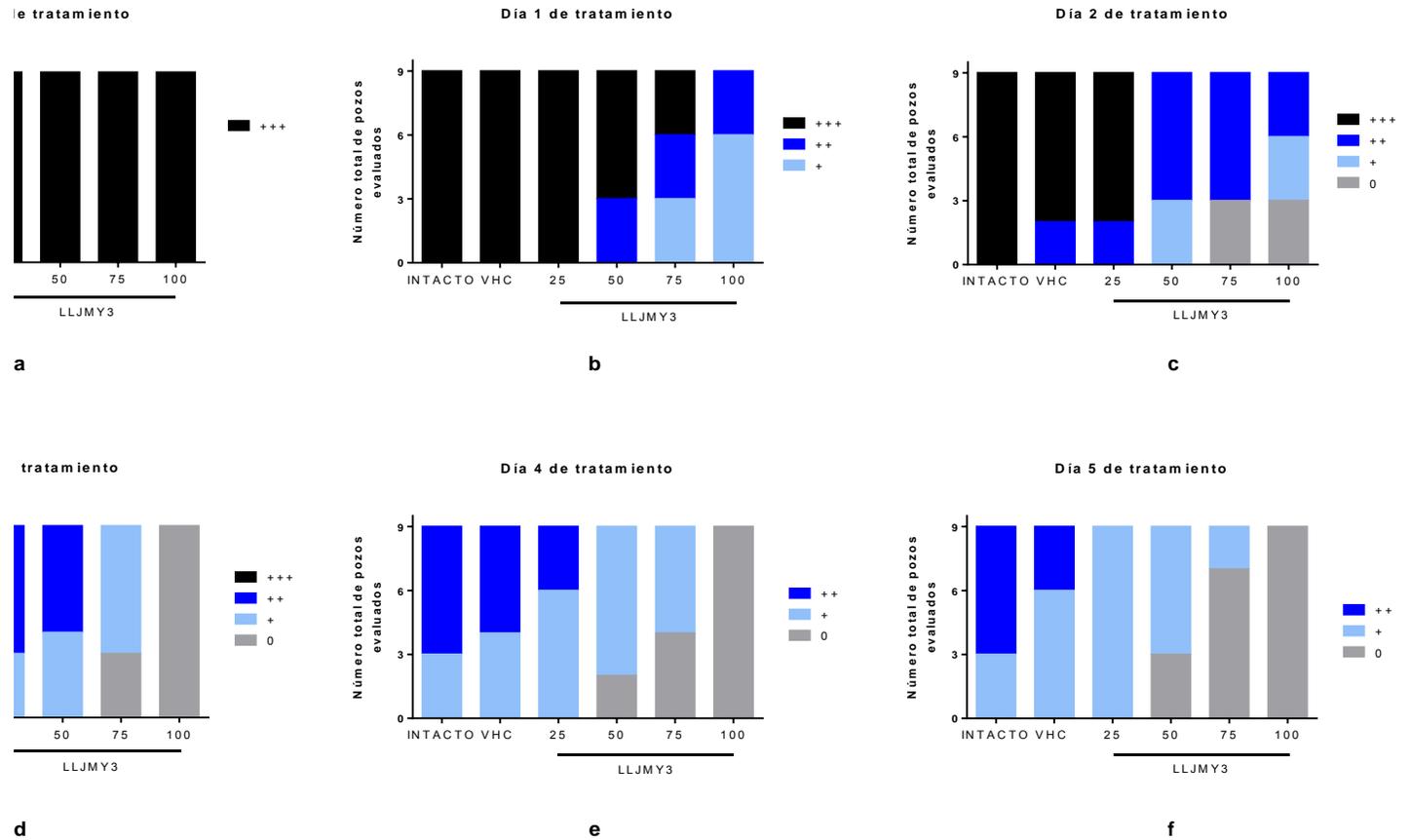


Figura 13. La naftoquinona LLJMY3 inhibe la motilidad de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF, el efecto es concentración dependiente. **a, b, c, d** y **e** Curvas concentración-respuesta del efecto *in vitro* de la naftoquinona LLJMY3 sobre la motilidad de los cisticercos de *Taenia crassiceps* en los diferentes días de tratamiento. +++: completamente motil; ++: medianamente motil; +: ligeramente motil; 0: sin motilidad.

2.3. Efecto de la naftoquinona LLJMY3 sobre la reproducción de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

En la figura 14, podemos observar los cambios inducidos por la naftoquinona LLJMY3 sobre la reproducción de los cisticercos. Se muestran los datos obtenidos de cada uno de los días de cultivo. Estos datos son apoyados con la tabla 4.

En la figura 14a, observamos que los cisticercos comenzaron su proceso asexual de reproducción a partir del día 1 de tratamiento. Durante los primeros dos días de cultivo, todos los grupos muestran un comportamiento similar en el proceso de gemación.

El proceso de gemación de los cisticercos se inhibe por completo en el día 4 y 5 para los cisticercos tratados con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

El número de gemas del grupo intacto y el grupo tratado con vehículo, con respecto al grupo tratado con LLJMY3 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ muestran diferencias significativas evidentes a partir del día tres de tratamiento.

También, podemos observar que los grupos tratados como intactos, vehículos y con LLJMY3 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, muestran un comportamiento similar en lo que respecta a su reproducción.

Por otro lado, se esperaba una cantidad mayor de gemas para los grupos intacto y vehículo, como lo que se había observado previamente en los resultados obtenidos en el experimento de la curva temporal.

Los datos fueron analizados utilizando la prueba Kruskal-Wallis y la prueba post hoc Dunns. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de $P < 0.05$.

Tabla 3. Número de gemas de tres experimentos independientes, cada uno con tres pozos por concentración y con 10 cisticercos por cada pozo. Los datos obtenidos de cada día de tratamiento fueron reunidos y expresados como su media \pm desviación estándar.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
	Número de gemas (media \pm SD)				
INTACTO	8.4444 \pm 3.8442	11.4444 \pm 4.4190	12.1111 \pm 4.6756	11.5556 \pm 3.8766	10.3333 \pm 4.9749
VHC	8.1111 \pm 2.4210	10.6667 \pm 3.7417	11.1111 \pm 4.4001	12.2222 \pm 3.6324	11.2222 \pm 3.8333
LLJMY3 25 μ g/mL	7.4444 \pm 4.0035	8.8889 \pm 4.4284	9.6667 \pm 3.9370	10.0000 \pm 4.2720	9.5556 \pm 4.7726
LLJMY3 50 μ g/mL	7.0000 \pm 2.1794	8.6667 \pm 2.2913	6.3333 \pm 1.5000	6.1111 \pm 1.1667	6.2222 \pm 2.3333
LLJMY3 75 μ g/mL	6.6667 \pm 2.0616	7.0000 \pm 1.5000	5.6667 \pm 2.2913	4.6667 \pm 3.0822	4.5556 \pm 3.4681
LLJMY3 100 μ g/mL	5.7778 \pm 4.4096	7.2222 \pm 4.9944	3.0000 \pm 4.3875	0	0

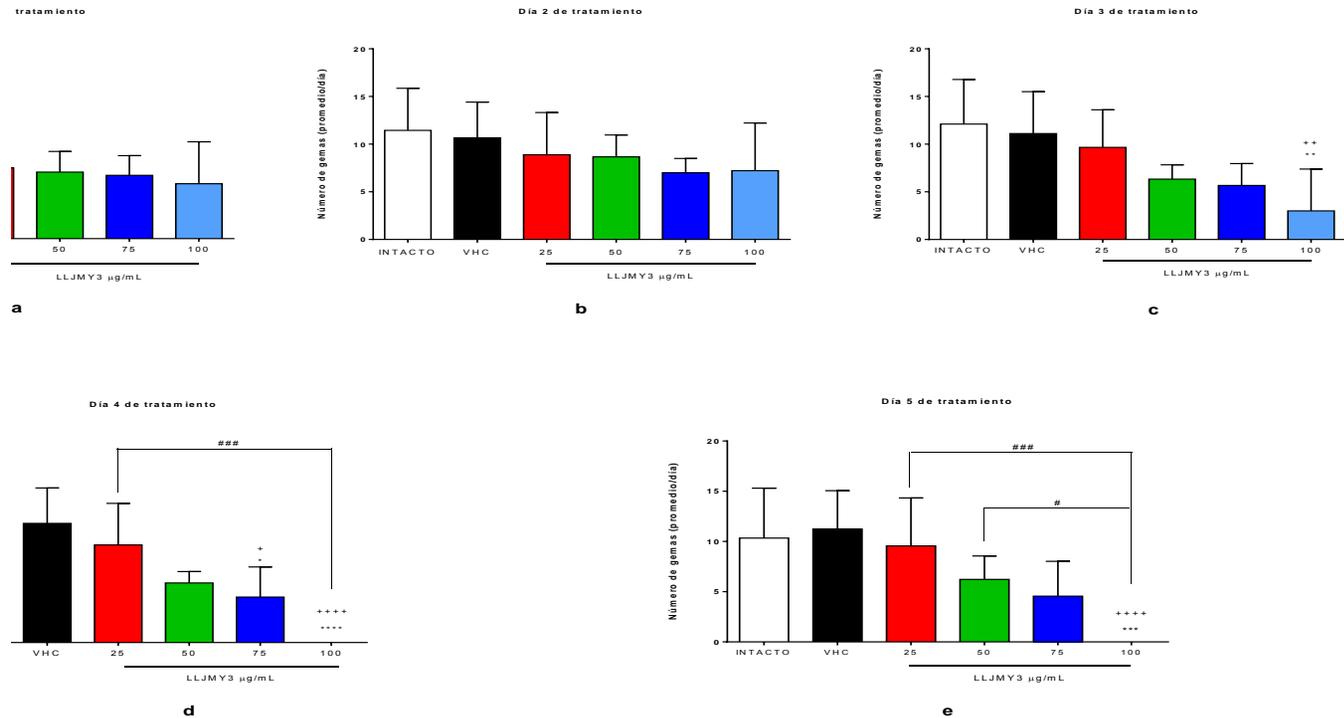


Figura 14. La naftoquinona LLJMY3 afecta la reproducción de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF, el efecto es concentración dependiente. **a, b, c, d y e** Curvas concentración-respuesta del efecto *in vitro* de la naftoquinona LLJMY3 sobre la reproducción de los cisticercos de *Taenia crassiceps* en los diferentes días de tratamiento.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, diferencias significativas respecto al grupo intacto.

+ $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, diferencias significativas respecto al grupo incubado vehículo (VHC: RPMI suplementado-DMSO al 0.25%).

$p < 0.05$, ### $p < 0.001$, diferencias significativas entre grupos tratados con la naftoquinona LLJMY3.

2.4. Efecto de la naftoquinona LLJMY3 sobre la mortalidad de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

En la figura 15, se representa la mortalidad de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF durante los cinco días de cultivo *in vitro*. Los criterios que fueron establecidos se basaron en la pérdida de la motilidad parcial o total, disminución de tamaño debida probablemente a la pérdida del fluido vesicular, esta disminución de tamaño tenía que ser mayor del 50% respecto del tamaño inicial de los cisticercos. Cabe señalar que el tamaño de los cisticercos no fue medido, pese a esto, en las imágenes se puede observar el aumento o disminución de tamaño.

En dicha figura observamos que el tratamiento con la naftoquinona LLJMY3 a 100 $\mu\text{g/mL}$ provoca la muerte de los parásitos en un 100% a partir de día 3, seguido del tratamiento a 75 $\mu\text{g/mL}$ a partir del día 4.

El tratamiento a 50 $\mu\text{g/mL}$, provoca el 74% de la mortalidad de los cisticercos al día 5. Es muy probable que si estos cultivos se hubieran mantenido por más días esta concentración quizás habría alcanzado el 100% del efecto.

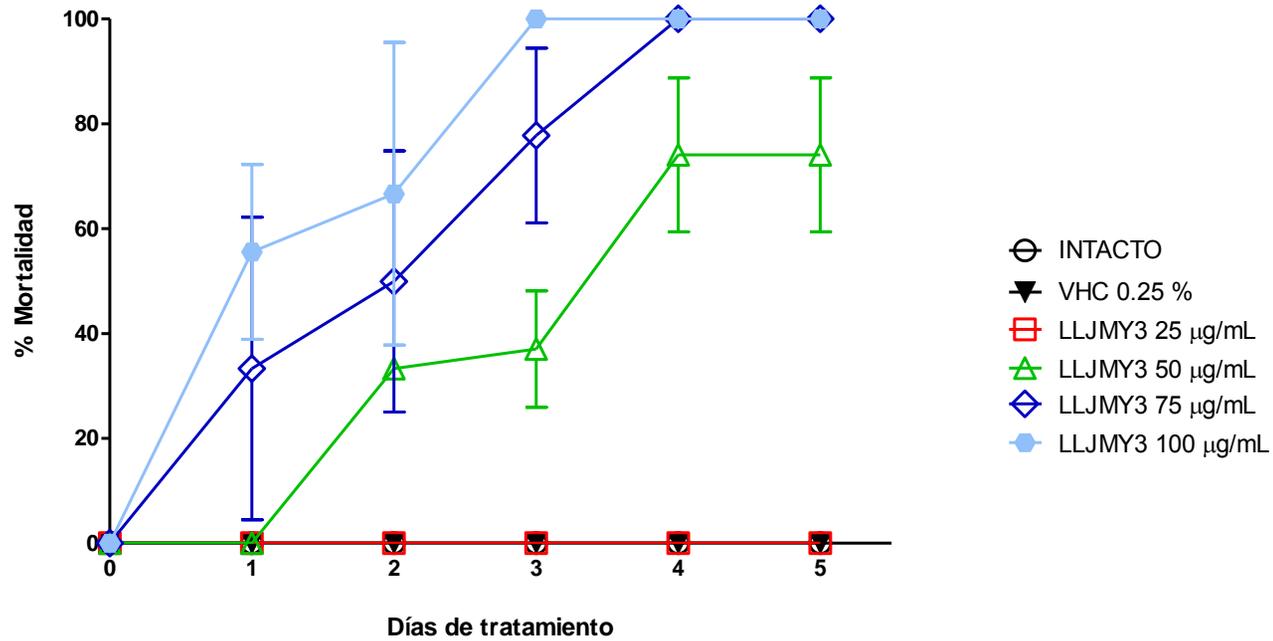


Figura 15. Curva temporal de la mortalidad de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF después de haber sido expuestos a diferentes concentraciones de la naftoquinona LLJMY3. Cada punto representa la media del porcentaje de mortalidad de los cisticercos de tres experimentos diferentes \pm SD. VHC: vehículo, RPMI suplementado-DMSO al 0.25%.

VII. DISCUSIÓN

El descubrimiento y/o desarrollo de nuevas moléculas con actividad biológica sigue siendo de vital importancia, en especial, cuando los tratamientos disponibles dejan de ser completamente eficaces para control de diversas enfermedades. También, se sabe que, algunos microorganismos que causan enfermedades tanto a humanos como a animales, son capaces de desarrollar resistencias contra los fármacos que usualmente eran efectivos contra ellos. El desarrollo de resistencia a los fármacos, es resultado de la selección de una subpoblación de los microorganismos que son capaces de tolerar los efectos letales y/o dañinos de los fármacos usados.⁵⁹

Desechar los medicamentos inadecuadamente; no terminar los tratamientos, son algunas de las razones que podrían explicar el incremento del desarrollo de resistencias en los microorganismos. Por otro lado, la OMS señala que medidas como las campañas masivas de desparasitación, podrían originar que los microorganismos adquieran fenotipos resistentes. Esta clase de medidas son muy empleadas en los países donde las infecciones causadas por helmintos siguen siendo endémicas y, en estas campañas el fármaco más utilizado es el albendazol, un antihelmíntico de amplio espectro que es utilizado en las infecciones causadas por parásitos que se transmiten por el suelo, como *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*; y en las infecciones causadas por *Taenia solium* y *Taenia saginata*.⁴⁷

En algunos nemátodos como *H. contortus*, se han identificado dos mecanismos de resistencia contra los benzimidazoles, uno implica la pérdida de un gen susceptible en la β -tubulina que va de la mano con la aparición de un isotipo de resistencia con una mutación que codifica el aminoácido tirosina en lugar de fenilalanina en la posición 200 de la β -tubulina.^{29, 48}

La búsqueda de compuestos naturales y/o sintéticos nos da la oportunidad de desarrollar nuevos tratamientos, como terapias únicas o como terapias conjuntas con los ya existentes.

Por ello, en el presente trabajo, se evaluó la actividad antihelmíntica *in vitro* de la naftoquinona LLJMY3 en el modelo experimental de *Taenia crassiceps* cepa ORF. Este modelo es ampliamente reportado en la literatura para probar la actividad de fármacos y hormonas; así como, para evaluar los prospectos de potenciales vacunas.^{40-46,57}

Los estudios donde se evalúa la actividad antiparasitaria *in vitro* e *in vivo* de varias naftoquinonas de origen natural y sintéticas, están dirigidos principalmente contra protozoarios como: *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania*. Y actualmente, la información relacionada con la actividad de las naftoquinonas contra helmintos es escasa. En algunos estudios, se reporta la actividad *in vitro* de la naftoquinona plumbagina contra *Schistosoma mansoni* y *Fasciola gigantica*^{49, 50}; en otros, se evalúa la actividad *in vitro* e *in vivo* de la naftoquinona β -lapachona sobre *Schistosoma mansoni* cepa BH.⁵¹

Hoy en día, no hay estudios disponibles donde se evalúe la actividad de alguna naftoquinona sobre *Taenia solium* ó en modelos alternativos como lo es *Taenia crassiceps* cepa ORF.

Un primer acercamiento para determinar la actividad *in vitro* de LLJMY3 fue la realización de la curva temporal-respuesta, la cual nos ayudó a determinar el tiempo al cual se presentaba el efecto máximo de 100 μ g/ml LLJMY3 sobre los cisticercos de *T. crassiceps*. En la figura 10, observamos que esta naftoquinona disminuye la motilidad de los cisticercos de *T. crassiceps* a partir del día dos de tratamiento, e inhibe por completo la motilidad desde el día cuatro, este efecto se mantuvo durante los diez días cultivo. También, las observaciones macroscópicas mostraron que LLJMY3 provoca que los cisticercos pierdan su morfología característica (figura 9), lo cual se reflejó en una disminución de tamaño causada probablemente por la pérdida del fluido vesicular. LLJMY3 tuvo efecto sobre la reproducción, porque paulatinamente disminuyó la gemación de los cisticercos hasta inhibirla por completo (figura 11).

A partir de estos resultados, se determinó que el efecto máximo de LLJMY3 sobre los cisticercos de *Taenia crassiceps* se presentaba en el día 5 de tratamiento.

Posteriormente se evaluó la actividad de LLJMY3 a diferentes concentraciones sobre los cisticercos de *Taenia crassiceps*. Para ello se realizó una curva concentración-respuesta, en la cual se incluyeron las concentraciones 25, 50,75 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Aunque no se realizaron mediciones del tamaño de los cisticercos durante cada día de cultivo, en la figura 12 observamos que los cisticercos tratados con medio RPMI suplementado (intacto), con vehículo (DMSO 0.25%) y LLJMY3 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aumentan de tamaño; mientras que, los tratados con LLJMY3 a 75 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disminuyen de tamaño. Y hasta el día 5 de cultivo comienza a notarse la disminución de tamaño de los cisticercos tratados con LLJMY3 a la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Los resultados obtenidos muestran que la naftoquinona LLJMY3 ejerce efectos concentración dependientes sobre la reproducción, la motilidad, la apariencia, el tamaño y la mortalidad de los cisticercos de *Taenia crassiceps* mantenidos durante 5 días en cultivo.

Los efectos son más evidentes a la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo cual concuerda con los resultados obtenidos de la misma concentración evaluada en la curva temporal-respuesta.

Respecto al cambio en la morfología característica de los cisticercos y su motilidad, podemos destacar lo siguiente:

Como sabemos, el tegumento es una barrera que protege a los parásitos del medio exterior; además, es el responsable de la absorción de nutrientes, del metabolismo de lípidos y colesterol y de la absorción selectiva de fármacos.⁵¹ De manera general, otra característica observada fue que, los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF que fueron tratados con 50, 75 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LLJMY3 mostraron la pérdida de integridad de su tegumento, ya que, pudimos observar restos de esta membrana en el fondo de los pozos de cultivo. La calidad de las imágenes de las figuras 9 y 12 no nos permiten apreciar claramente este efecto. Dicha observación, correlaciona con la disminución de tamaño de los cisticercos.

Por los reportes en la literatura, sabemos que, las naftoquinonas plumbagina contra *Schistosoma mansoni* y *Fasciola gigantica*^{49, 50} y β -lapachona sobre *Schistosoma mansoni* cepa BH⁵¹, causan alteraciones del tegumento y disminuyen la motilidad de estos parásitos. Nuestros resultados concuerdan con estas observaciones a un nivel macroscópico. Pese a esto, es necesario hacer uso de otras técnicas de microscopía para conocer como la naftoquinona LLJMY3 afecta la integridad y organización del tegumento de los cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

Como ya se ha mencionado, el tratamiento con la naftoquinona LLJMY3 provoca que los cisticercos pierdan su morfología característica de vesículas ovaladas, este efecto es similar al que presentan los cisticercos de *Taenia crassiceps* tratados de manera *in vitro* con el metabolito sulfóxido de albendazol (ABZSO). Este metabolito altera la organización del tegumento.⁶⁰

Sin embargo, las concentraciones a las que se han observado estos efectos para el ABZSO son menores respecto a las concentraciones a las que evaluamos a la naftoquinona LLMJY3. Los datos publicados para el parámetro farmacológico de la concentración efectiva 50 (CE₅₀) para el ABZSO son de 0.068 $\mu\text{g/mL}$ (0.041-0.0112) y 0.08 $\mu\text{g/mL}$ (0.05-0.12); las cuales ejercen su efecto máximo a los 11 días de tratamiento *in vitro*.^{42,43} Estos datos fueron obtenidos utilizando el modelo de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

Los resultados obtenidos nos indican que la naftoquinona LLJMY3 a partir de una concentración de 75 $\mu\text{g/mL}$ ejerce un efecto cisticida sobre *Taenia crassiceps*, pese a esto, la naftoquinona denominada como LLJMY3 no es un compuesto más potente que el sulfóxido de albendazol.

No obstante, no podemos descartarlo como posibilidad, más estudios son necesarios para determinar su seguridad y mecanismos de acción en modelos *in vivo*. Y no debemos de perder de vista que también la estructura química de esta naftoquinona podría ser modificada o servir como molécula base para el desarrollo de otras moléculas que posean actividades biológicas.

VIII. CONCLUSIÓN

La naftoquinona LLJMY3 tiene actividad cisticida *in vitro* sobre cisticercos de *Taenia crassiceps*. Los efectos de esta naftoquinona sobre la reproducción, motilidad, morfología y mortalidad dependen de la duración del tratamiento así como de la concentración de este compuesto.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarez L, Mottier M, Lanusse C. 2007. Drug transfer into target helminth parasites. Trends Parasitol. 23:97-104
2. Romero R. Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3era edición. Editorial medica panamericana. Págs. 853-864
3. World Health Organization. Parásitos intestinales. Recuperado el 15 de agosto de 2015 de World Health Organization: [http://whqlibdoc.who.int/publications/9243544101_\(part2\).pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/9243544101_(part2).pdf)
4. Generalidades De Cestodos. Recuperado el 10 de junio de 2015 de Departamento de Microbiología y Parasitología- Recursos en Parasitología, Facultad De Medicina, UNAM: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/cestodos.html>
5. Bobes R, Fragoso G, Fleury A, García M, Sciutto E, Larralde C, Laclette J. 2014. Evolution, molecular epidemiology and perspectives on the research of taeniid parasites with special emphasis on *Taenia solium*. Infection, Genetics and Evolution. 23: 150-160
6. Carpio A. 2002. Neurocysticercosis: an update. Lancet Infect Dis. 2: 751-62
7. Taeniosis o teniasis. Recuperado el 10 de junio de 2015 de Departamento De Microbiología y Parasitología-Recursos en Parasitología, Facultad De Medicina, UNAM: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/taeniosis.html>
8. Pawlowski Z, Allan J, Sarti E. 2005. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: from research towards implementation. Int. J. Parasitol. 35: 1221-1232
9. Cisticercosis. Recuperado el 10 de junio de 2015 de Departamento de Microbiología y Parasitología-Recursos en Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/cisticercosis.html>
10. García H, Del Brutto, O. 2005. Neurocysticercosis: update concepts about old disease. Lancet Neurol. 4:653-61
11. Del Brutto O. 2012. Neurocysticercosis: A Review. The Scientific World Journal.

12. Lightowers M. 2013. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: past practices and new possibilities. *Parasitology*. 140: 1566-1577
13. Organización Mundial de la Salud. (Mayo 2015) Nota Descriptiva No. 376 Taeniasis/ Cisticercosis. Recuperado el 16 de mayo de 2015: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs376/es/>
14. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases. 2013
15. Bhattarai R, Budke C, Carabin H, Proaño J, Flores T, Ivanek R, Snowden K, Flisser A. 2012. Estimating the non-monetary burden of neurocysticercosis in Mexico. *Plos Negl Trop Dis* 6(2): e1521
16. Palomares F, Piliado J, Palencia G, Ortiz A, Jung H. 2007. Efficacy of nitazoxanide, tizoxanide and tizoxanide/albendazole sulphoxide combination against *Taenia crassiceps* cysts. *J Antimicrob Chemother*. 59: 212-218
17. Coral-Almeida M, Gabriël S, Abatih EN, Praet N, Benitez W, Dorny P. 2015. *Taenia solium* human cysticercosis: a systematic review of sero-epidemiological data from endemic zones around the world. *Plos Negl Trop Dis* 9(7): e0003919.
18. Paredes A, De Campos T, Marzal M, Rivera A, Dorny P, Mahanty S, Guerra C, García H, Nash T, Cass Q. 2013. *In vitro* analysis of albendazole sulfoxide enantiomers shows that (+)-(r)-albendazole sulfoxide is the active enantiomer against *Taenia Solium*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 57: 944-949
19. Mahanty S, Paredes A, Marzal M, Gonzalez E, Rodriguez S, Dorny P, Guerra C, García h, Nash T. 2011. Sensitive *in vitro* system to asses morphological and biochemical effects of praziquantel and albendazole on *Taenia solium* cysts. *Antimicrob. Agents Chemother*. 55: 211-217
20. Dayan AD. 2003. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Trop*. 86: 141-159
21. Góngora F, Soto J, González D, Cook, H, Márquez C, Hernández R, Santos J. 2006. Albendazole trial at 15 or 30 mg/kg/day for subarachnoid and intraventricular cysticercosis. *Neurology* 66: 436-438.

22. Jung H, Cárdenas G, Sciutto E, Fleury A. 2008. Medical Treatment for Neurocysticercosis: Drugs, Indications and Perspectives. *Curr. Top. Med. Chem.* 8: 424-433
23. Rawden H, Kokwaro G, Ward S, Edwards G. 2000. Relative contribution of cytochromes P-450 and flavin-containing monooxygenases to the metabolism of albendazole by human liver microsomes. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 49:313–322
24. García J, del Vegas M, Torrado J, Bolás F. 2012. Enantiomeric pharmacokinetic prevalence of (+) albendazole sulphoxide in *Trichinella spiralis* muscle larva. *Parasitol Res.* 110: 993-999
25. Lacey E. 1990. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol. Today.* 6:112-115
26. Gottschall D, Theodorides V, Wang R. 1990. The metabolism of benzimidazole antihelminthics. *Parasitol. Today.* 6: 115-124.
27. Food and Drug Administration. ALBENZA (albendazole) Tablets. Recuperado el 1 de septiembre de 2015 de FDA: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/020666s005s006lbl.pdf
28. Food and Drug Administration. Highlights of prescribing information. ALBENZA (albendazole) tablets, ALBENZA (albendazole) chewable tablets for oral use. Recuperado el 1 de septiembre de 2015 de FDA: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/207844s000lbl.pdf
29. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12a. Editorial McGrawHill.
30. Venkatesan P. 1998. Albendazole. *J Antimicrob Chemother* 41, 145–147
31. Palomares F, Jung H, Pérez J, Piliado J, Rodríguez S, Palencia G, López N, Hernández A, Castillo R, Hernández F. 2009. Synthesis and *in vitro* cysticidal activity of new benzimidazole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 44: 1794-1800
32. Kumagai Y, Shinkai Y, Miura T, Cho A. 2012. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52: 221-247
33. Cantú R, Palomo L, Nery S, López LL, Barajas L. 2012. Naftoquinonas: de simples pigmentos a moléculas terapéuticas. *Revista de la DES Ciencias Biológicas Agropecuarias, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.* 14(2): 48-56

34. Kumar S, Gautam S, Sharma A. 2013. Antimutagenic and antioxidant properties of plumbagin and other naphthoquinones. *Mutation Research*. 755: 30-41
35. Sharma A, Santos I, Gaur P, Ferreira V, Garcia C, da Rocha D. 2012. Addition of thiols to o-quinone methide: New 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl[1,4]naphthoquinones and their activity against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* (3D7). *Eur. J. Med. Chem.* 59: 48-53
36. Días L., Fumagalli F, Schiavon M, García M, Helder M, Ferreira V, da Silva F. 2013. In vivo antimalarial activity of novel 2-hydroxy-anilino-1,4-naphthoquinones obtained by epoxide ring-opening reaction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23: 4583-4586
37. Ambrosio J, Ostoa P, Palacios M, Ruiz A, Sanchez P, Reynoso O, Nava K, Martínez N, Escobedo G, Ibarra E, Valverde L, Morales J. 2014. Oestradiol and progesterone differentially alter cytoskeletal protein expression and flame cell morphology in *Taenia crassiceps*. *Int. J. Parasitol.* 44: 687-696
38. Willms K, Zurabian R. 2010. *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. *Parasitology*. 137: 335-346
39. Morales J, Escobedo G, Rodríguez M, Téllez N, Cerbón M, Larralde C. 2004. Differential expression of AP-1 transcription factor genes c-fos and c-jun in the helminth parasites *Taenia crassiceps* and *Taenia solium*. *Parasitology*. 129: 233-243
40. Trejo H, García D, Reynoso O, Ambrosio J. 2010. In vitro evaluation of cysticidal drugs in the *Taenia crassiceps* cysticerci ORF strain using fluorescent celltracker CMFDA. *Exp Parasitol.* 127: 294-299
41. Reynoso O, Valverde L, Paredes C, Pérez A, Landa A, Mendoza G, Ambrosio J. 2014. Analysis of the expression of cytoskeletal proteins of *Taenia crassiceps* ORF strain cysticerci (Cestoda). *Parasitol Res.* 113: 1955-1969
42. Palomares F, Palencia G, Pérez R, González-Esquivel D, Castro N, Jung H. 2004. *In vitro* effects of albendazole sulfoxide and praziquantel against *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysts. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 2302-2304
43. Palomares-Alonso F, Rojas-Tomé I, Juárez V, Palencia G, González-Maciel A, Ramos-Morales A, Santiago-Reyes R, González-Hernández I, Jung-Cook H. 2015. Cysticidal activity of extracts and isolated compounds from *Teloxys graveolens*: *In vitro* and *in vivo* studies. *Exp Parasitol* 156: 79-86

44. Ambrosio J, Valverde L, Nava K, Palacios M, Ostoa P, Reynoso O, Escobedo G, Ruíz A, Domínguez L, Morales J. 2015. Androgens Exert a Cysticidal Effect upon *Taenia crassiceps* by Disrupting Flame Cell Morphology and Function. PLoS One 10(6):e0127928.
45. Márquez A, Pérez A, Zepeda A, Reynoso O, Hernández A, Hernández L, Castillo R, Yépez L, Ambrosio J. 2013. RCB20, an experimental benzimidazole derivate, affects tubulin expression and induces gross anatomical changes in *Taenia crassiceps* cysticerci. Parasitol Res 112: 2215-2226
46. Sciutto E, Fragoso G, Hernández M, Rosas G, Martínez J, Fleury A, Cervantes J, Aluja A, Larralde C. 2013. Development of the S3PVAC vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis: a historical review. J Parasitol 99(4): 686-692
47. Organización Mundial de la Salud. Farmacorresistencia. Recuperado el 4 de octubre de 2015 de World Health Organization: http://www.who.int/drugresistance/Microbes_and_Antimicrobials/es/
48. Barrèrea V, Alvarez L, Suarez G, Ceballos L, Moreno L, Lanusse C, Prichard R. 2012. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the β -tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. Veterinary Parasitology 186: 344– 349
49. Lorsuwannarat N, Saowakon N, Ramasoota P, Wanichanon C, Sobhon P. 2013. The antihelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. Exp Parasitol 133: 18-27
50. Lorsuwannarat N, Piedrafita D, Chantree P, Sansri V, Songkoomkrong S, Bantuchai S, Sangpairot K, Kueakhai P, Changkliungmoa N, Chaichanasak P, Chansela P, Sobhon P. 2014. The *in vitro* antihelmintic effects of plumbagin on newly excysted and 4-weeks-old juvenile parasites of *Fasciola gigantica*. Exp Parasitol 136: 5-13
51. de Lima A, Azevedo E, Ramos R, Xavier V, da Silva A, Alves C, Oliveira V, de Azevedo M. 2014. Ultrastructural analysis of β -lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. Exp Parasitol 142: 83-90

52. de Lima A, Azevedo E, Xavier V, da Silva A, Oliveira V, de Azevedo M. 2014. β -lapachone: a naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. *Phytomedicine* 21: 261-267
53. Liew K, Yong P, Lim Y, Navaratman V, Ho A. 2014. 2-Methoxy-1,4-Naphthoquinone (MNQ) suppresses the invasion and migration of human metastatic breast cancer cell line (MDA-MB-231). *Toxicol In Vitro*. 28: 335-339
54. Schuck D, Ferreira S, Cruz L, da Rocha D, Moares M, Nakabashi M, Rosenthal P, Ferreira V, Garcia C. 2013. Biological evaluation of hidroxynaphthoquinones as anti-malarials. *Malar J*. 12:234
55. Rahmoun N, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, Benabdallah M, Villemin D, Choukchou-Braham N. 2012. Antibacterial and antifungal activity of lawsone and novel naphthoquinone derivates. *Med Mal Infect*. 42:270-275
56. de Almeida L, Fraga C, de Souza R, Vinaud M. 2014. Partial reverse of the TCA cycle is enhanced in *Taenia crassiceps* experimental neurocysticercosis after in vivo treatment with anthelmintic drugs. *Parasitol Res* 113(4): 1313-7
57. Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernandez M, Acero G, Rosas G, López-Casillas F, Kubli C, Vazquez R, Terrazas I, Sciutto E. 1999. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect. Immun*. 67(5): 2522-2530
58. Leyva E, López L, García de la Cruz R, 2011. Las naftoquinonas: más que pigmentos naturales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 42() 6-17. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57918590002>
59. Lespine A, Ménez C, Bourguinat C, Prichard R. 2012. Pglycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *Int J Parasitol: Drugs and Drug Resistance* 2: 58-75
60. Palomares F, Palencia G, Ambrosio J, Ortiz A, Jung H. 2006. Evaluation of the Efficacy of albendazole sulphoxide and praziquantel in combination on *Taenia crassiceps* cysts: in vitro studies. *J Antimicrob Chemother* 57: 482-488