



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

Evaluación de la actividad cisticida de la combinación de praziquantel y mebendazol:
estudios in vitro e in vivo

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

FERNANDA ITZEL GURRUSQUETA MIRANDA

ASESORAS:

DRA. FRANCISCA PALOMARES ALONSO

DRA. HELGI JUNG COOK

Cuautilán Izcalli, Estado de México, 2018



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis.

Evaluación de la actividad cisticida de la combinación de praziquantel y mebendazol: estudios *in vitro* e *in vivo*.

Que presenta la pasante **Fernanda Itzel Gurrusqueta Miranda**
Con número de cuenta: **307113173** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de Agosto de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Helgi Helene Jung Cook	
VOCAL	M.V.Z. Gabriela Fuentes Cervantes	
SECRETARIO	M.F.C. Cecilia Hernández Barba	
1er. SUPLENTE	Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana	
2do. SUPLENTE	Dra. Dolores Molina Jasso	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos especiales a la Dra. Francisca Palomares, en primer lugar, por haberme aceptado como su alumna, por la paciencia que me tuvo durante mi estancia en el laboratorio y todo el conocimiento transmitido durante ese tiempo, por la asesoría brindada para poder finalizar este proyecto, y por último, por sus consejos y apoyo personal. Le estaré agradecida siempre.

Agradezco a la Dra. Helgi Jung por aceptarme como alumna, por la asesoría dada y por siempre estar al pendiente de los avances en este trabajo. Sus sugerencias y comentarios han sido de gran importancia para mí.

Agradezco también a todos los investigadores que forman parte del laboratorio de Neuropsicofarmacología, por hacerme sentir cómoda durante mi estancia ahí. De todos ellos aprendí y gracias a ellos desperté un gran interés por la investigación.

A la Dra. Guadalupe Palencia del laboratorio de Neuroinmunología por su ayudada en la realización de una importante parte del proyecto, por su disponibilidad y colaboración siempre que le necesité. Por compartirme sus conocimientos, por su entusiasmo y por hacer agradable el trabajo en su laboratorio.

Al Sr. Héctor por aquellos momentos de distracción, aquellas pláticas interesantes y de temas muy variados, por los bocadillos y golosinas que compartió conmigo, por sus consejos y su amistad, siempre dispuesto a escuchar.

Agradezco a mis compañeros Jonathan y Melissa por los conocimientos transmitidos, pero sobre todo por su amistad y los momentos de diversión y alegría que compartimos. Espero algún cercano día volver a reunirnos los tres.

Agradezco a todas las personas que conocí y contribuyeron de algún modo en mi formación personal y profesional. Al Dr. César Rodríguez por su enseñanza en el manejo de animales de laboratorio, por su amistad y todas aquellas pequeñas pláticas que hicieron agradable mis visitas al Bioterio. A la Dra. Carmen Rubio y al Dr. Moisés Rubio porque las comidas con ellos fueron enriquecedoras a nivel personal y profesional, agradezco sus consejos y su amistad. A Leo por su amistad, por las comidas que compartimos, gracias por presentarme a grandes personas. Por último agradezco a César Mendoza por los momentos que compartimos, sin duda aprendí mucho de cada uno de ellos, siempre te llevaré con cariño en mis recuerdos. Sé que tú también cumplirás tus sueños.

Agradezco especialmente a mis padres, quienes fueron mi principal apoyo durante todo este tiempo. Por su confianza y por seguir creyendo en mí. Este logro es tanto de ellos como mío.

A mi padre, el hombre que más amo y admiro.

Sin ti no lo habría logrado.

RESUMEN	1
1. ANTECEDENTES	2
1.1 Neurocisticercosis	2
1.1.1 <i>Taenia solium</i>	2
1.1.1.1 Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	3
1.1.1.2 Metabolismo energético	4
1.1.1.3 Modelo experimental de cisticercosis	6
1.1.2. Epidemiología de NCC	8
1.1.3 Etiopatogenia	9
1.1.4 Manifestaciones clínicas	10
1.1.5 Tratamiento farmacológico de la NCC.	10
1.2 Albendazol	11
1.2.1 Farmacocinética	11
1.2.2 Mecanismo de acción	11
1.3 Praziquantel	12
1.3.1 Farmacocinética	12
1.3.2 Mecanismo de acción	13
1.4 Mebendazol	13
1.4.1 Farmacocinética	13
1.4.2 Mecanismo de acción	14
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVO GENERAL	17
4.1 <i>Objetivos particulares</i>	17
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	18
6. METODOLOGÍA	19
6.1 <i>Obtención de cisticercos de Taenia crassiceps</i>	19
6.2 <i>Preparación del medio de cultivo</i>	19
6.3 <i>Estudios in vitro</i>	19
6.3.1 <i>Preparación de soluciones de PZQ y MBZ</i>	19
6.3.2 <i>Preparación de la combinación PZQ+MBZ</i>	22
6.3.3 <i>Evaluación de la relación Concentración-Respuesta de PZQ y MBZ</i>	22

6.3.4 Evaluación del efecto de la combinación de PZQ+MBZ	22
6.3.5 Determinación del metabolismo energético de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> expuestos a la combinación de PZQ+MBZ	23
6.3.5.1. Condiciones experimentales y obtención de muestra	23
6.3.5.2 Actividad de PGI	24
6.3.5.3 Actividad de ALP	25
6.3.5.4 Cuantificación de ATP	26
6.4 Estudios in vivo	27
6.4.1 Evaluación de la eficacia de PZQ y MBZ in vivo	27
6.4.2 Evaluación del efecto de la combinación de PZQ+MBZ in vivo	27
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
7.1. Resultados in vitro	29
7.1.1. Determinación de la actividad cisticida de PZQ, MBZ y la combinación de PZQ+MBZ	29
7.1.2 Determinación del metabolismo energético de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> tratados con la combinación de PZQ+MBZ	35
7.1.2.1 Actividad de PGI	35
7.1.2.2 Actividad de ALP	37
7.1.2.3 Cuantificación de ATP	39
7.2 Resultados in vivo	40
7.2.1 Efecto individual de PZQ y MBZ en el modelo de cisticercosis murina	40
7.2.2 Efecto de la combinación PZQ+MBZ en el modelo de cisticercosis murina	40
8. CONCLUSIONES	43
9. BIBLIOGRAFÍA	44

RESUMEN

La neurocisticercosis (NCC) es la infección parasitaria más frecuente del sistema nervioso central y es la primera causa de epilepsia en México. Durante las últimas dos décadas el tratamiento cisticida ha estado limitado al uso de dos fármacos: albendazol (ABZ) y praziquantel (PZQ). Estos fármacos tienen diferente eficacia, sin embargo, ninguno es 100% efectivo, por lo que se requieren otras alternativas para el tratamiento de esta parasitosis. Los fármacos en combinación es una de las alternativas propuestas y que a la fecha no ha sido explorada en su totalidad.

Uno de los fármacos antiparasitarios que ha mostrado actividad cisticida es el mebendazol (MBZ). Considerando que MBZ y PZQ tienen actividad antiparasitaria y diferente mecanismo de acción se espera que la combinación de ambos fármacos resulte en un aumento en la eficacia, por lo que en el presente proyecto se exploró la actividad cisticida de la combinación PZQ+MBZ sobre cisticercos de *Taenia crassiceps*.

Para la evaluación se utilizó la metodología de “Superficie de Interacción Sinérgica” para identificar las combinaciones con mayor sinergismo. Además, una vez identificada aquella combinación con mayor interacción, se exploraron los cambios en la actividad de algunas enzimas del parásito para establecer la posible correlación entre el efecto cisticida y la alteración en el metabolismo energético del parásito. Asimismo, se evaluó la eficacia *in vivo* de la combinación sobre el modelo de cisticercosis murina causada por *Taenia crassiceps*.

Los resultados mostraron que *in vitro* la combinación PZQ+MBZ exhibió un efecto sinérgico en la eficacia cisticida. La eficacia se incrementó hasta cinco veces en comparación con la eficacia de cada fármaco solo, así mismo, el efecto fue observado en menor tiempo. La combinación ocasionó una mayor alteración en el metabolismo de los cisticercos comparada con la provocada por cada fármaco por separado. *In vivo* la combinación de PZQ+MBZ (1:2) también exhibió un efecto sinérgico en la eficacia cisticida.

Con estos resultados se concluye que la combinación PZQ+MBZ tiene una mayor eficacia que la monoterapia, por lo que podría ser alternativa prometedora para el tratamiento de la NCC.

1. ANTECEDENTES

1.1 *Neurocisticercosis*

La NCC es la parasitosis más frecuente del sistema nervioso central (SNC) y es causada por la presencia de cisticercos de *Taenia solium* adquiridos por contaminación fecal-oral con huevos de este parásito. El agua, el viento y otros medios indirectos de infección juegan un papel muy pequeño en la transmisión. La frecuencia de autoinfección no se conoce con exactitud, pero hay estudios que demuestran que cerca del 25% de los pacientes con NCC habían albergado o tenían la forma adulta del parásito y hasta el 15% de los pacientes alberga una tenia en el momento del diagnóstico de NCC, lo cual sugiere una autoinfección.¹

1.1.1 *Taenia solium*

T. solium, como otras especies del género, son gusanos aplanados y muy largos. Normalmente mide entre 1.5 y 5 m de longitud; el escólex posee un róstelo coronado por dos hileras de ganchos y cuatro ventosas; con el primero se prende del intestino y con las segundas se adhiere a sus paredes (Figura 1A). Estudios en modelos experimentales han permitido un análisis detallado de la íntima unión que establece este parásito sobre la pared intestinal.²

El proceso de estrobilación (producción de proglótidos) ocurre en la región distal del cuello. Los proglótidos son segmentos independientes pero unidos entre sí. Los más cercanos al cuello son inmaduros y van mostrando un grado creciente de desarrollo y diferenciación a medida que se alejan del escólex, hasta aparecer maduros en la parte media del estróbilo.

Cada proglótido maduro posee órganos genitales masculinos y femeninos. Los más alejados del escólex muestran un útero grávido ramificado, lleno de huevos (Figura 1B), éstos son liberados espontáneamente con las heces.³

Los huevos contenidos se encuentran en distintos grados de maduración; alrededor del 50% contienen oncósferas infectivas totalmente desarrolladas (Figura 1C). Los inmaduros pueden madurar fuera del hospedero y permanecer viables e infectivos en el ambiente por semanas, los proglótidos grávidos de *T. solium* contienen miles de huevos, de manera que la ingestión de uno puede dar lugar a varios cientos de cisticercos en el hospedero intermediario.

El cisticerco de *T. solium* está formado por una vesícula ovalada y traslúcida, llena de líquido, de 0.5 a 2 centímetros de diámetro y dotada de un pequeño escólex en su interior (Figura 1D). Al carecer de tracto digestivo, obtienen sus nutrientes y excretan sus desechos a través de la superficie tegumental.⁴

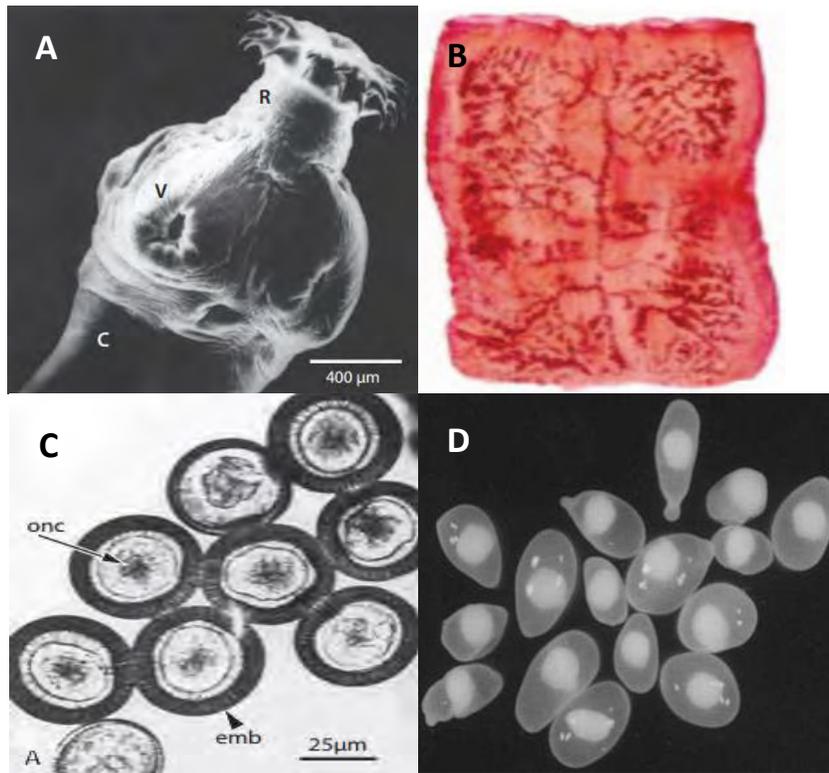


Figura 1. (A) Forma adulta de *T. solium*. Rostelo (R), ventosa (V), cuello (C). (B) Proglótido grávido de *T. solium*, se aprecia el conducto uterino central del que se desprenden las ramas. (C) Huevos de *T. solium*. Oncósfera (onc), embrión (emb). (D) Cisticercos de *T. solium* obtenidos del músculo de cerdos infectados (Willms y col, 2006).

1.1.1.1 Ciclo de vida de *Taenia solium*

El hombre es el hospedero definitivo de *T. solium*, la forma adulta se localiza en el intestino delgado y libera proglótidos grávidos, los cuales se rompen antes de salir en la materia fecal; estos huevos contaminan el ambiente.¹

Cuando los huevos son ingeridos por el hospedero intermediario, el cerdo, las enzimas digestivas y sales biliares activan a las oncósferas contenidas en los huevos, los embriones activados penetran la pared intestinal hasta alcanzar los capilares linfáticos y sanguíneos que los distribuyen a una gran variedad de órganos y tejidos (tejido subcutáneo, músculo esquelético y cardíaco, cerebro, ojos, etc.) convirtiéndose en la forma larvaria o cisticerco.

El ciclo culmina cuando el hombre consume carne de cerdo cruda o insuficientemente cocida e infectada por cisticercos. De nuevo, las enzimas proteolíticas y las sales biliares participan en la activación, ahora del cisticerco, induciendo la evaginación del escólex y su fijación a la pared intestinal. Una vez anclado, el parásito crece y se diferencia hasta convertirse en gusano adulto (Figura 2). Aunque el cerdo es el principal hospedero intermediario, algunas otras especies, incluyendo al hombre, también pueden alojar cisticercos, al ingerir los huevos del parásito.^{1, 3, 4}

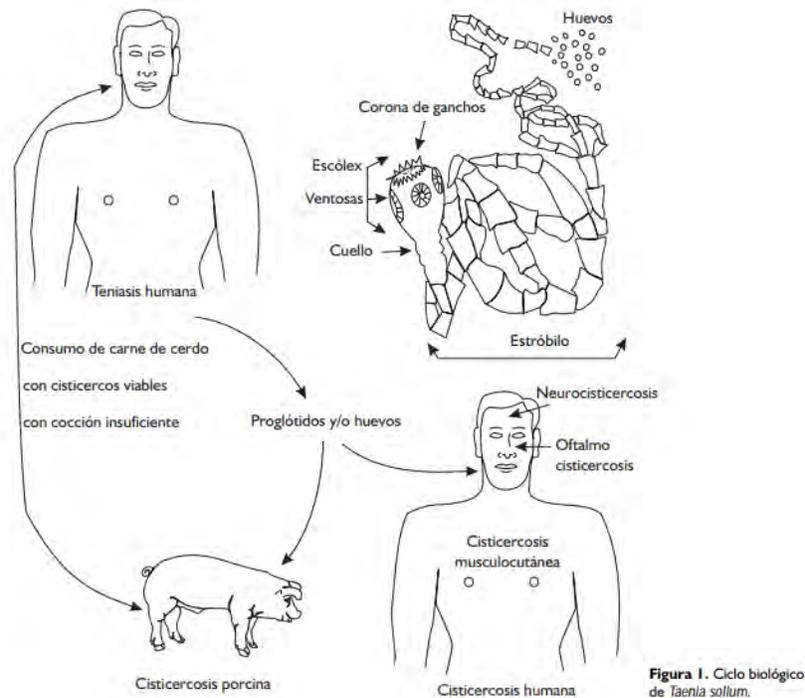


Figura 2. Ciclo de vida de *T. solium* (Meza-Lucas y col, 2002).

1.1.1.2 Metabolismo energético

Los cisticercos utilizan rutas metabólicas tanto aeróbicas como anaeróbicas dependiendo de la disponibilidad de oxígeno en el medio y obtienen sus nutrientes por difusión facilitada a través de la pared vesicular (Figura 3). Se han identificado dos transportadores de glucosa (TGTP1 y TGTP2), el segundo se localiza en la superficie tegumentaria del cisticerco, mientras que el primero es abundante en estructuras de la pared vesicular del cisticerco, así como en el parásito adulto.³ En su fase adulta presentan un metabolismo preferentemente anaeróbico debido a la falta de oxígeno en su hábitat

natural. Mientras que su fase larvaria presenta actividad *in vivo* aeróbica dependiente de oxígeno, que se difunde por los tejidos del hospedero.

La principal fuente de energía en los céstodos es el glucógeno que se almacena en grandes cantidades en su membrana externa, o la glucosa que se obtiene principalmente del hospedero.

Los estudios *in vitro* sobre el metabolismo energético y respiratorio de los cisticercos describieron las vías de degradación de la glucosa y el ciclo del ácido cítrico con una cadena de transporte de electrones activa. La evidencia de la existencia de estas rutas en los céstodos consiste esencialmente en la demostración de las reacciones enzimáticas y en la identificación de varios intermediarios en las vías.⁵

6

El catabolismo de los carbohidratos produce piruvato en dos regiones celulares: en el citoplasma, por la acción de la enzima piruvato cinasa sobre el fosfoenolpiruvato, y en la mitocondria, debido a la acción de la enzima málica sobre el malato. El piruvato citosólico adicional podría ser formado por la acción de la enzima málica citosólica sobre el malato. El piruvato mitocondrial es convertido a acetil-CoA generando: citrato, que participará en el ciclo del ácido cítrico, o acetato, que será excretado. Así mismo, puede sufrir la acción de la enzima málica mitocondrial, generando malato, lo que provoca una inversión parcial del ciclo del ácido cítrico.⁷ El piruvato citosólico puede seguir tres caminos:

1. Sufrir la acción de la enzima lactato deshidrogenasa generando lactato que será excretado o reutilizado en la gluconeogénesis.
2. Sufrir la acción de la transaminasa generando alanina, que será excretada.
3. Es transportado para el interior de la mitocondria.

La cadena transportadora de electrones detectada en los cisticercos es semejante a la cadena encontrada en sus hospederos mamíferos, demostrando la presencia de citocromos bc1, c y aa3, en tanto, este tipo de respiración está ausente en los parásitos adultos.⁸

La mayoría de los helmintos son incapaces de sintetizar lípidos, siendo, por tanto, dependientes de la absorción del medio. Los ácidos grasos absorbidos de fuentes exógenas son rápidamente incorporados a las reservas de triacilglicerol y fosfolípidos encontrados principalmente en la membrana cística y el tegumento de los céstodos.

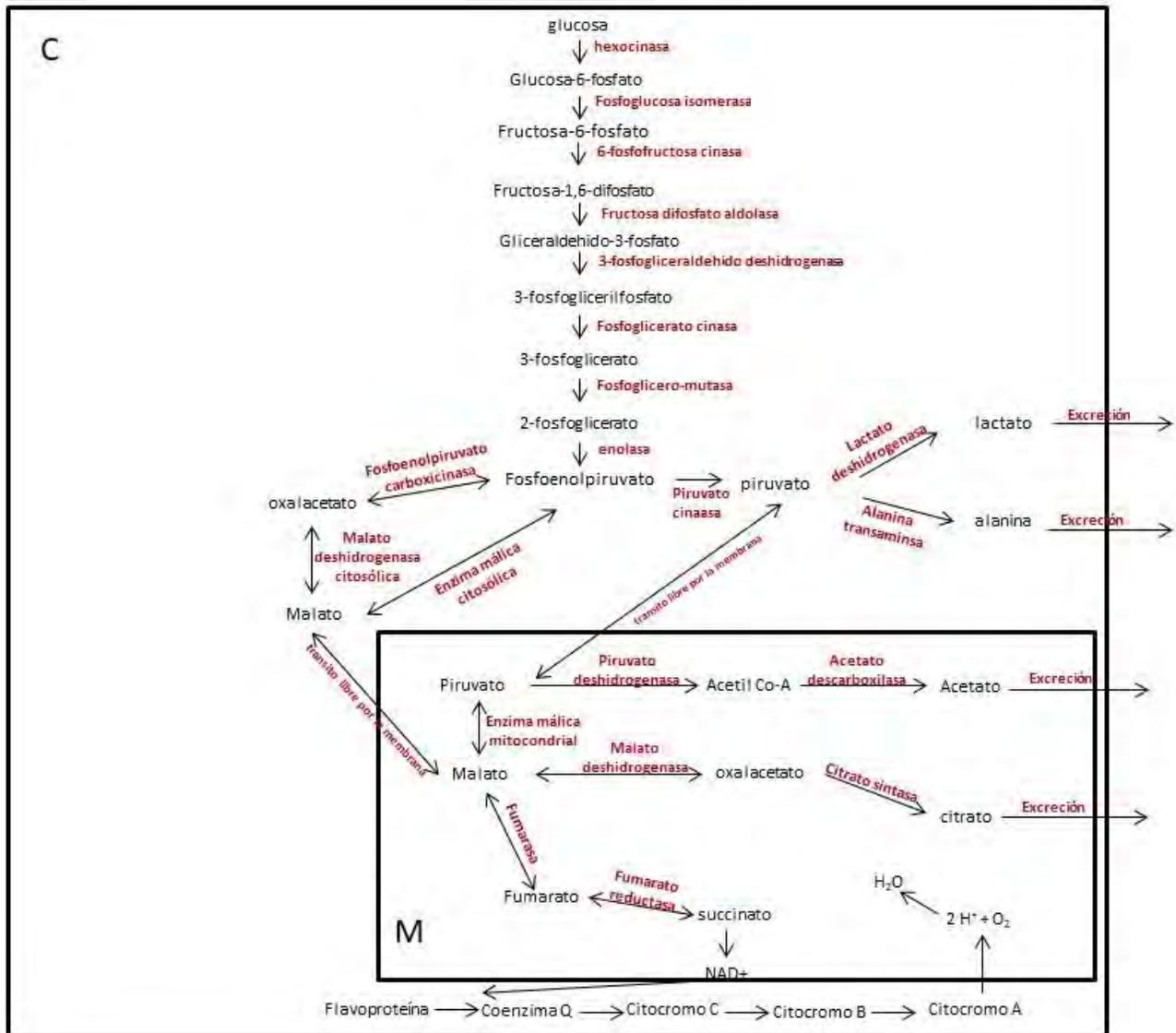


Figura 3. Rutas metabólicas de los céstodos. Glucólisis, ciclo del ácido cítrico y cadena de transporte de electrones. Citoplasma (C), Mitocondria (M). (Composición: Vinaud y col., 2012, 2016 y 2017).

1.1.1.3 Modelo experimental de cisticercosis

Los modelos animales son fundamentales para entender las relaciones hospedero-parásito, inmunología y otros factores que intervienen en la adquisición de la enfermedad y el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Varios mamíferos y roedores han sido utilizados como modelos experimentales para la infección con *T. solium* (cobayos, conejos, perros, gatos, cerdos, monos, ratones, ratas, etc.); los mejores resultados han sido obtenidos en el gibón y en el hámster dorado,

además de jerbos y chinchillas, el modelo porcino sigue el curso de la infección, además de que la histopatología en los cerdos es similar a la humana y la respuesta mostrada por los cerdos contra el tratamiento antiparasitario sigue el mismo patrón que se muestra en el ser humano. La limitante es la difícil manipulación y el elevado costo de manutención. Por esta razón se utilizan modelos más viables como los modelos murinos con tenias semejantes a *T. solium*.⁹

T. crassiceps ha sido ampliamente utilizado como modelo experimental. La multiplicación asexual por gemación de los cisticercos de *T. crassiceps*, permite que distintas cepas se mantengan indefinidamente en la cavidad peritoneal de ratones inmunosuprimidos. Es por esto que ha sido ampliamente utilizada en los últimos 50 años.

Se han aislado diversas cepas de *T. crassiceps* para propagar en el laboratorio, algunas son: *HYG*, *KBS*, *Toi*, la cepa *ORF* (carece de escólex) y la cepa *WFU* obtenida de la infección en un roedor silvestre en Norte América; adicionalmente se han aislado cepas en Alemania y Japón.¹⁰

Algunas de las características que lo hacen un buen modelo son que la ultraestructura de la forma larvaria y adulta de *T. crassiceps* no difieren significativamente de otros ténidos. Se han caracterizado varias enzimas de *T. solium* y *crassiceps* y se ha observado que presentan alta similitud entre ellas. Su similitud y homología con *T. solium* son algunos de los atributos que lo hacen útil. Los estudios sobre estas cepas de *T. crassiceps*, en especial la *ORF*, han indicado que el balance hormonal y género del hospedero murino son de gran importancia para la velocidad de reproducción, ya que en ratones hembra se reproducen mejor.¹¹

Taenia crassiceps

Es un céstodo cuya forma adulta se encuentra en el intestino de zorros rojos de Europa y del Norte de América. El estado larvario se desarrolla en pequeños roedores, donde los cisticercos pueden multiplicarse asexualmente produciendo gemas en su polo abscólex. La cepa *ORF* ha sido una de las más ampliamente utilizadas debido a su capacidad para multiplicarse rápidamente en la cavidad peritoneal del ratón.¹²

La forma adulta de *T. crassiceps* parasita el intestino del zorro rojo y en su forma larvaria el tejido subcutáneo, muscular y cavidades corporales de pequeños roedores silvestres. El parásito adulto, sexualmente maduro, forma huevos dentro de los proglótidos. Cuando estos proglótidos son expulsados con las heces, los huevos ya fecundados o en las primeras etapas de desarrollo de una oncósfera, pasan al medio ambiente en donde pueden ser ingeridos por el hospedero intermediario. En el intestino del hospedero intermediario, las cubiertas del huevo son digeridas y la oncósfera

liberada invade preferentemente los tejidos antes mencionados, donde continúa su desarrollo para dar lugar a cisticercos con un escólex completo, pero aun invaginado.

Los cisticercos pueden continuar su desarrollo a tenias adultas sólo si el roedor infectado es ingerido por un zorro. Dentro de éste, el cisticerco evagina su escólex y se fija al intestino, inicia su crecimiento y desarrollo hasta dar lugar a una tenia adulta sexualmente madura, de esta forma se completa su ciclo biológico.^{12, 13}

1.1.2. Epidemiología de NCC

La NCC es endémica en prácticamente todos los países en vías de desarrollo. La organización mundial de la salud (OMS) calcula que cada año hay en el mundo más de 50, 000 muertes por NCC, aunque esta podría ser una cifra subestimada.¹⁴

En América, esta enfermedad representa una carga de 31,390 casos anuales, constituyendo la primera causa, entre los 31 riesgos reportados en 2015, para la región de las Américas por Enfermedades Transmitidas por los Alimentos. Desde el año 2010, la OMS ha añadido este problema en el grupo de enfermedades tropicales desatendidas y se han planteado estrategias multidisciplinarias para el control del complejo teniasis/cisticercosis.¹⁵

En México, el 12% de las intervenciones de neurocirugía las motiva la NCC y hasta el 4% de las autopsias revelan la presencia de parásitos en el SNC.² El Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, durante el periodo 1995-2001, diagnosticaron 386 casos, un promedio de 55 por año, de los que uno de cada tres casos requirió alguna intervención neuroquirúrgica hospitalaria. Más reciente (2002-2007), de un total de ingreso de 14,320 personas, el 2.75% presentaba neurocisticercosis (Figura 4).^{16, 17}

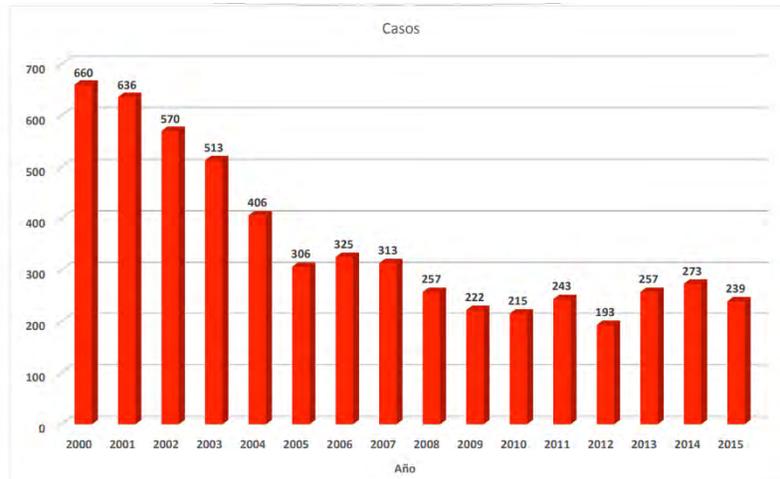


Figura 4. Casos de cisticercosis en todo el sector salud, México 2000-2015. (Dirección General de Epidemiología. Sistema Único Automatizado de Información, 2016).

1.1.3 Etiopatogenia

Después de penetrar en el SNC, los parásitos provocan una reacción inflamatoria en el tejido circundante. En este estado los cisticercos son vesículas que contienen un líquido con la misma densidad al líquido cefalorraquídeo (estadio vesicular) y pueden mostrar un nódulo mural (escólex invaginado). En este estado pueden permanecer durante semanas, meses o años, dependiendo de la reacción inmunológica y generalmente son asintomáticos. Una vez el cisticerco comienza a degenerarse y morir, el tejido vesicular se vuelve opaco y denso y el escólex muestra signos de degeneración (estadio coloidal). Esta lesión se encuentra rodeada de una cápsula gruesa e irregular de colágeno y el tejido circundante muestra gliosis astrocitaria y edema difuso. Posteriormente, la pared se engrosa y el escólex se transforma en una forma granulosa (estadio granular). El estado final es el calcificado, donde el tejido granulado es reemplazado por estructuras de colágeno y calcificación. No es frecuente encontrar todos los estadios evolutivos en un mismo paciente.^{14, 18}

El aspecto de los cisticercos depende de su localización: los parenquimatosos son pequeños y se localizan en corteza cerebral y ganglios basales; los cisticercos subaracnoideos pueden ser pequeños si se localizan en la profundidad de los surcos corticales o pueden alcanzar tamaños mayores de 50 mm si están en las cisternas de líquido cefalorraquídeo (LCR). Los ventriculares pueden ser pequeños

o grandes y se localizan de preferencia en el IV ventrículo. Los cisticercos espinales se encuentran en el espacio subaracnoideo o en el parénquima medular.¹⁹

1.1.4 Manifestaciones clínicas

Los síntomas dependen de la localización, número de parásitos y de la respuesta inmune del hospedero ante los mismos, por lo que la NCC se clasifica en dos: 1) NCC inactiva y 2) NCC activa. La NCC inactiva se refiere a cuando no hay evidencia de parásito (ni viable, ni en degeneración) pero los estudios de neuroimagen muestran residuos de una infección previa y de una respuesta del hospedero. Las formas más frecuentes son las calcificaciones parenquimatosas y en algunos pacientes se puede presentar hidrocefalia.

La NCC activa se refiere a la presencia de parásitos en el SNC y éstos están viables. Esta forma de NCC se clasifica dependiendo de la localización de las larvas en:

- 1) Parenquimatosa, es la forma más frecuente. Son metacéstodos de tipo celuloso localizados en áreas corticales del SNC y ganglios de la base. La larva puede permanecer viva durante un largo tiempo y el paciente se muestra asintomático. Los síntomas aparecen cuando el parásito muere, lo que provoca inflamación y edema cerebral.
- 2) Subaracnoidea, suelen ser metacéstodos racemosos de gran tamaño que se localizan principalmente en cisterna supraselar y cuadrigémina.
- 3) Intraventricular, suelen ser parásitos únicos localizados en el IV ventrículo, que provocan obstrucción del líquido cefalorraquídeo. Cuando la obstrucción es continua se produce hidrocefalia; cuando es intermitente, se produce pérdida de conciencia.
- 4) Espinal, es muy rara y resulta de la presencia de cisticercos en el espacio subaracnoideo. Puede provocar aracnoiditis o afectar al parénquima medular.
- 5) Extraneural, los cisticercos pueden aparecer en los ojos, músculo, tejido subcutáneo.^{19, 20, 21}

1.1.5 Tratamiento farmacológico de la NCC.

El tratamiento depende del número, localización y la viabilidad de los parásitos en el SNC e incluye la utilización de fármacos cisticidas, corticoides y otros fármacos y cirugía. Los fármacos cisticidas de elección incluyen al PZQ y al ALB. PZQ es efectivo en 60-70% en tratamientos de 15 días con una dosis de 50 mg/Kg/ al día. Para el ALB, administrado en dosis de 15 mg/Kg/d, dividido en tres dosis, durante 30 días, la eficacia es del 75-86%, ligeramente superior a la del PZQ.¹⁴

1.2 Albendazol

El ABZ (metil-5-(propiltio)-2-bencimidazolcarbamato) (Figura 5) es un agente antiparasitario de amplio espectro, aprobado por primera vez para uso humano en 1982.²² P.M= 265.34 g/mol, pKa= 6.9, logP= 2.7, solubilidad en agua= 0.022 mg/mL.

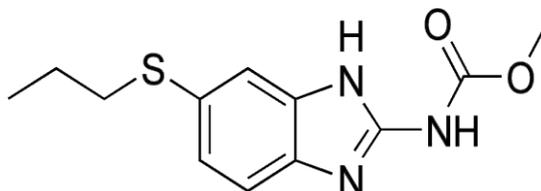


Figura 5. Estructura química del ABZ.

1.2.1 Farmacocinética

Tiene una baja biodisponibilidad después de su administración oral, que puede estar relacionado con la baja absorción (1 - >5%) del fármaco debida a su solubilidad limitada. Después de su absorción, el ABZ se metaboliza rápidamente a su metabolito activo, sulfóxido de albendazol (SOABZ), que es el responsable de la actividad cisticida. El SOABZ se une altamente a proteínas plasmáticas (70%) y se distribuye por todo el cuerpo.^{22, 23}

Las flavin monooxigenasas y las isoenzimas 3A del citocromo P450 (CYP) son responsables del metabolismo hepático de primer paso del ABZ en SOABZ. El SOABZ se convierte en un metabolito inactivo (albendazol sulfona) en un proceso que también está mediado por el CYP450; sin embargo, las isoformas precisas responsables de este proceso siguen sin estar claras.²³

1.2.2 Mecanismo de acción

Inhibe la polimerización de tubulina, lo que provoca una degeneración en los microtúbulos citoplasmáticos en las células del parásito. Esto conlleva a una alteración del metabolismo y la disminución en la producción de ATP, ocasionando la inmovilización y muerte del parásito, la ruptura de las células y la pérdida de funcionalidad secretora y de absorción. En consecuencia, disminuye la captación de glucosa y se consumen los depósitos de glucógeno. Estos cambios generan la acumulación de enzimas proteolíticas que son liberadas intracelularmente, lo cual provoca la lisis de la célula y la muerte del parásito.^{24, 25}

1.3 Praziquantel

El PZQ {2-(ciclohexilcarbonil)-1, 2, 3, 6, 7, 11 b- hexahidro- 4 H- pirazino [2,1-a] isoquinolin-4-1}²⁷ (Figura 6) es un antihelmíntico que actualmente se usa con éxito para el tratamiento de varias infecciones parasitarias que afectan al ser humano.²⁸ P.M= 312.40 g/mol, pKa= 19.38, logP= 2.4, solubilidad en agua= 0.381 mg/mL.

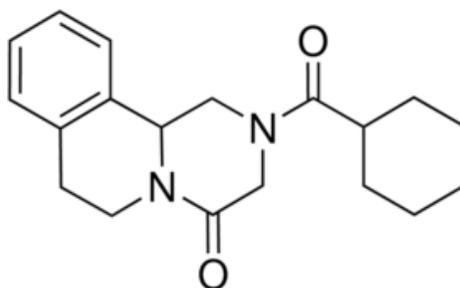


Figura 6. Estructura química del PZQ.

1.3.1 Farmacocinética

Se absorbe de forma rápida (T_{max} 2-2.6 h) y casi por completo (>80%) en el tracto gastrointestinal debido a que es una molécula lipofílica,²³ pero su biodisponibilidad sistémica es baja y varía considerablemente de un individuo a otro, aunque se ve favorecida si se administra con una dieta rica en carbohidratos. El fármaco se distribuye por todo el cuerpo concentrándose especialmente en el hígado y riñones, atraviesa la barrera hematoencefálica, lo que explica su eficacia en la NCC.^{27, 28}

El PZQ se une altamente a proteínas (~80%, casi exclusivamente a albúmina), por lo que los niveles de fármaco libre están sujetos a factores tales como la desnutrición e inflamación.²²

Es rápidamente metabolizado a metabolitos inactivos por sistema CYP (CYP1A2, CYP3A4, CYP2B1, CYP3A5 y CYP2C19). Los metabolitos identificados son productos de hidroxilación que contienen uno, dos o tres grupos hidroxilo.^{27, 22} La eliminación es esencialmente renal (80% en 4 días, el 90% ocurre dentro de las 24 primeras horas), como el producto es extensamente metabolizado <0.01% se encuentra en la orina como compuesto principal.²⁷

1.3.2 Mecanismo de acción

Los principales efectos del PZQ incluyen contracciones musculares, parálisis y daño tegumentario. Otros efectos incluyen cambios en el metabolismo de los carbohidratos, una disminución en la actividad enzimática y alteraciones en la superficie de membranas.³⁰

Aunque su mecanismo de acción no está del todo claro, existen dos propuestas. La primera sugiere un incremento en el flujo de los iones de Ca^{2+} acompañado de cambios morfológicos en el parásito, que incluyen contracciones y vacuolización. Con esto se ha identificado a subunidades beta de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje como blancos moleculares potenciales del PZQ. El segundo mecanismo sugerido es el bloqueo de los receptores de adenosina en los parásitos por la acción del PZQ, lo que provoca la alteración en el flujo del calcio.³¹

1.4 Mebendazol

El mebendazol (MBZ) (5-benzoil-1H-benzimidazol-2-il-carbamato de metilo) (Figura 7) es un benzimidazol que ha sido utilizado durante más de 20 años en medicina humana y veterinaria para tratar diversas infecciones parasitarias.²² P.M= 295.28 g/mol, pKa= 8.4, logP= 2.9, solubilidad en agua= 0.0387 mg/mL.

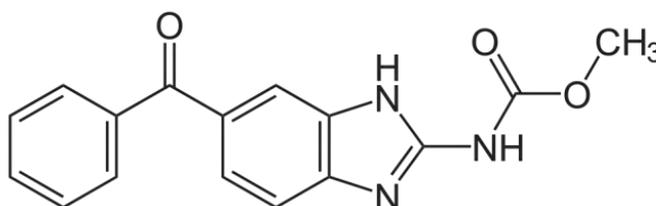


Figura 7. Estructura química del MBZ.

1.4.1 Farmacocinética

La absorción oral del fármaco es baja, de un 5-10%, y se ve favorecida si se administra con una dieta rica en grasas. La absorción de este fármaco se ve disminuida hasta 1-2% a dosis altas. Se une intensamente a proteínas plasmáticas (95%), su biodisponibilidad es muy limitada y se debe principalmente a su escasa solubilidad.²² Después de la administración oral la acción del fármaco es lenta, alcanzando niveles plasmáticos en un periodo de 2-4 horas con una vida media de 1-5.5 horas.³² Estudios recientes comprueban que el MBZ atraviesa la barrera hematoencefálica en concentraciones

significativas,³³ esto es importante para considerarlo como fármaco potencial para el tratamiento de NCC.

Se metaboliza predominantemente en el hígado y los principales metabolitos en el plasma resultan de la reducción del grupo ceto a un grupo hidroxilo y de la descarbamilación independiente del anillo imidazol.²² Las enzimas responsables del metabolismo y la conjugación no han sido identificadas. Sin embargo, es posible que las enzimas del citocromo P450 estén involucradas debido a la inhibición documentada con cimetidina.³⁰ Tanto la forma activa como los metabolitos descarboxilados producidos se excretan por orina (aproximadamente 2%) y en la bilis (en su mayoría) en un plazo de 24 a 48 horas.³³

1.4.2 Mecanismo de acción

En nemátodos, el MBZ actúa sobre los microtúbulos citoplasmáticos y en las células tegumentarias. Estas lesiones son irreversibles y conducen a la pérdida de las funciones de absorción y secreción de las células del parásito. La rotura de los microtúbulos origina una acumulación de sustancias secretoras en el aparato de Golgi, la disminución de la captación de glucosa y la depleción de los depósitos de glucógeno. Las sustancias acumuladas son enzimas hidrolíticas y proteolíticas que al liberarse dentro de la célula producen la autólisis celular y la muerte del parásito.³⁴

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La NCC es una parasitosis del sistema nervioso central que constituye un problema de salud pública en países en desarrollo que afectan principalmente a las poblaciones de estratos socioeconómicos bajos y que en México aún no ha sido erradicada. Por más de 20 años se han usado los mismos fármacos para el tratamiento de esta parasitosis, el PZQ y el ABZ. Sin embargo, estos fármacos no alcanzan a ser 100% efectivos; por lo que se requieren otras alternativas para su tratamiento. Los fármacos en combinación es una estrategia para incrementar la eficacia de fármacos que son efectivos por sí solos y que poseen diferentes mecanismos de acción sobre el mismo blanco terapéutico. A la fecha sólo existe un estudio de fármacos en combinación para el tratamiento de la NCC, la combinación de PZQ+ALB, ésta ha mostrado un modesto incremento en la eficacia cuando se comparó con la monoterapia. Por otro lado, considerando que MBZ es un agente antiparasitario que en la última década ha mostrado ser efectivo sobre diferentes parasitosis y que puede atravesar barrera hematoencefálica, el presente trabajo exploró la combinación PZQ+MBZ, que a la fecha no ha sido evaluada. Con estos resultados se determinó si esta combinación podría representar una alternativa terapéutica a los fármacos actualmente usados para el tratamiento de la NCC.

3. HIPÓTESIS

- 1- El MBZ tendrá actividad cisticida sobre cisticercos de *Taenia crassiceps*.
- 2- Debido a que el PZQ y el MBZ tienen diferente mecanismo de acción, la combinación de PZQ+MBZ presentará un efecto cisticida sinérgico.

4. OBJETIVO GENERAL

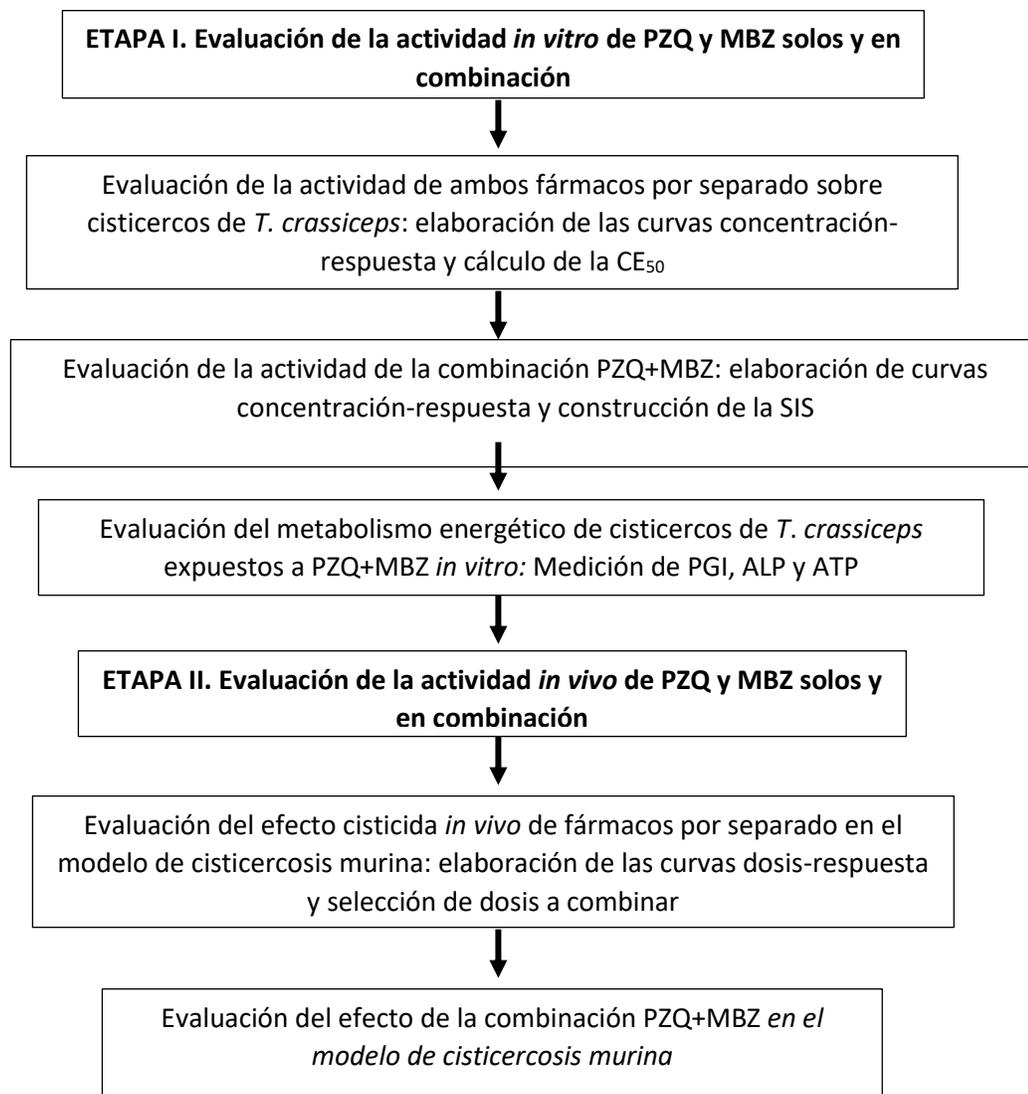
- Evaluar el efecto cisticida de la combinación de praziquantel y mebendazol *in vitro* e *in vivo*.

4.1 Objetivos particulares

- Evaluar la relación concentración-respuesta *in vitro* de praziquantel contra cisticercos de *Taenia crassiceps*.
- Evaluar la relación concentración-respuesta *in vitro* de mebendazol contra cisticercosis de *Taenia crassiceps*.
- Evaluar el efecto de la combinación *in vitro* de praziquantel y mebendazol sobre cisticercos de *Taenia crassiceps*.
- Determinar la actividad enzimática de la fosfoglucoasa isomerasa y de la fosfatasa alcalina de los cisticercos de *Taenia crassiceps* expuestos a la combinación de praziquantel y mebendazol *in vitro*.
- Cuantificar el ATP producido por cisticercos de *Taenia crassiceps* expuestos a la combinación de praziquantel y mebendazol *in vitro*.
- Evaluar el efecto *in vivo* de la(s) combinación(es) que hayan presentado un efecto de sinergismo *in vitro*.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos el proyecto se dividió en dos etapas. Etapa I. Evaluación de actividad *in vitro* de MBZ, PZQ y la combinación. Etapa II. Evaluación *in vivo* de MBZ, PZQ y la combinación (Esquema 1).



Esquema 1. Diagrama de trabajo. SIS: Superficie de interacción sinérgica, ATP: Adenosin trifosfato, PGI: Fosfoglucoasa isomerasa, ALP: Fosfatasa alcalina.

6. METODOLOGÍA

6.1 Obtención de cisticercos de *Taenia crassiceps*

Los cisticercos se obtuvieron de un ratón hembra BALB/c infectado con cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF. El ratón se sacrificó por dislocación cervical, se abrió la cavidad peritoneal y los parásitos se removieron con solución salina al 0.9%. Para los experimentos se utilizaron cisticercos de 2-3 mm, con membrana intacta y fluido vesicular transparente.

6.2 Preparación del medio de cultivo

Se disolvieron 17 g de medio de cultivo Dulbecco's modificado en 800 mL de agua destilada, se agregaron 3.7 g de bicarbonato de sodio agitando hasta disolver. El pH del medio se ajustó a 7.3 con hidróxido de sodio 0.1 N y se aforó a 1000 mL con agua destilada. A los 1000 mL de medio se le agregaron 110 mL de suero fetal bovino y 11 mL antibiótico-antimicótico GIBCO BRL (penicilina G 10,000 unidades/mL, estreptomina 10,000 µg/mL y anfotericina B 25 µg/mL). El medio se filtró a través de membranas Millipore de 0.22 µm de diámetro de poro. El medio de cultivo se mantuvo en refrigeración hasta el momento en que fue utilizado.

6.3 Estudios *in vitro*

6.3.1 Preparación de soluciones de PZQ y MBZ

Dado que el PZQ y el MBZ son insolubles en agua se requirió el uso de disolventes como el etanol (EtOH) y el dimetilsulfóxido (DMSO) para su solubilización.

Praziquantel

Se preparó una solución PZQ de 1 mg/mL en EtOH de la siguiente manera; se pesaron 2 mg de PZQ y se transfirieron a un tubo de 2 mL donde se aforó con EtOH. De esta solución se transfirió una alícuota de 100 µL a un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó con agua. Esta solución contiene 10 µg/mL. Para obtener las concentraciones a probar se tomaron alícuotas de esta última solución y se realizaron las diluciones pertinentes en medio de cultivo Dulbecco's, (M.C.) como se muestra en la Figura 8.

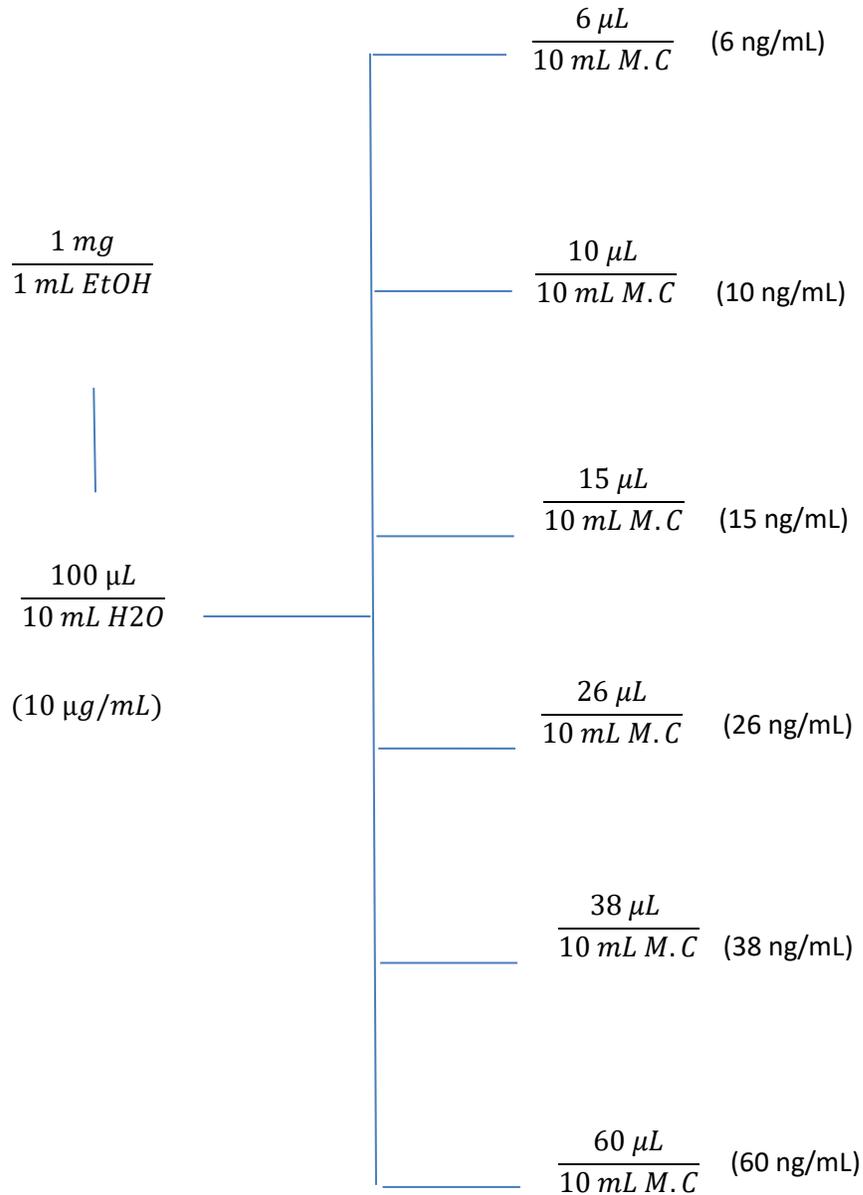


Figura 8. Procedimiento para la preparación de soluciones de PZQ en medio de cultivo Dulbecco's. Medio de cultivo (M.C), etanol (EtOH).

Mebendazol

Se preparó una solución de MBZ de 1 mg/mL en DMSO de la siguiente manera. Se pesaron 2 mg de MBZ y se transfirieron a un tubo 2 mL donde se aforó con DMSO. Se transfirió una alícuota de 100 μL a un tubo de 1 mL y se aforó con el mismo disolvente. Esta solución contiene 100 $\mu\text{g/mL}$. A partir de esta solución se tomó una alícuota de 200 μL y se aforaron a 2 mL con DMSO obteniéndose una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$. De esta última solución se tomaron una alícuota de 500 μL y una de 200

μL y se transfirieron a tubos de 1 mL donde se aforaron con DMSO. Estas soluciones contienen $5 \mu\text{g/mL}$ y $2 \mu\text{g/mL}$ respectivamente. Para obtener las concentraciones a probar se tomaron alícuotas de esta última solución y se realizaron las diluciones pertinentes en medio de cultivo Dulbecco's, (M.C.) como se muestra en la Figura 9.

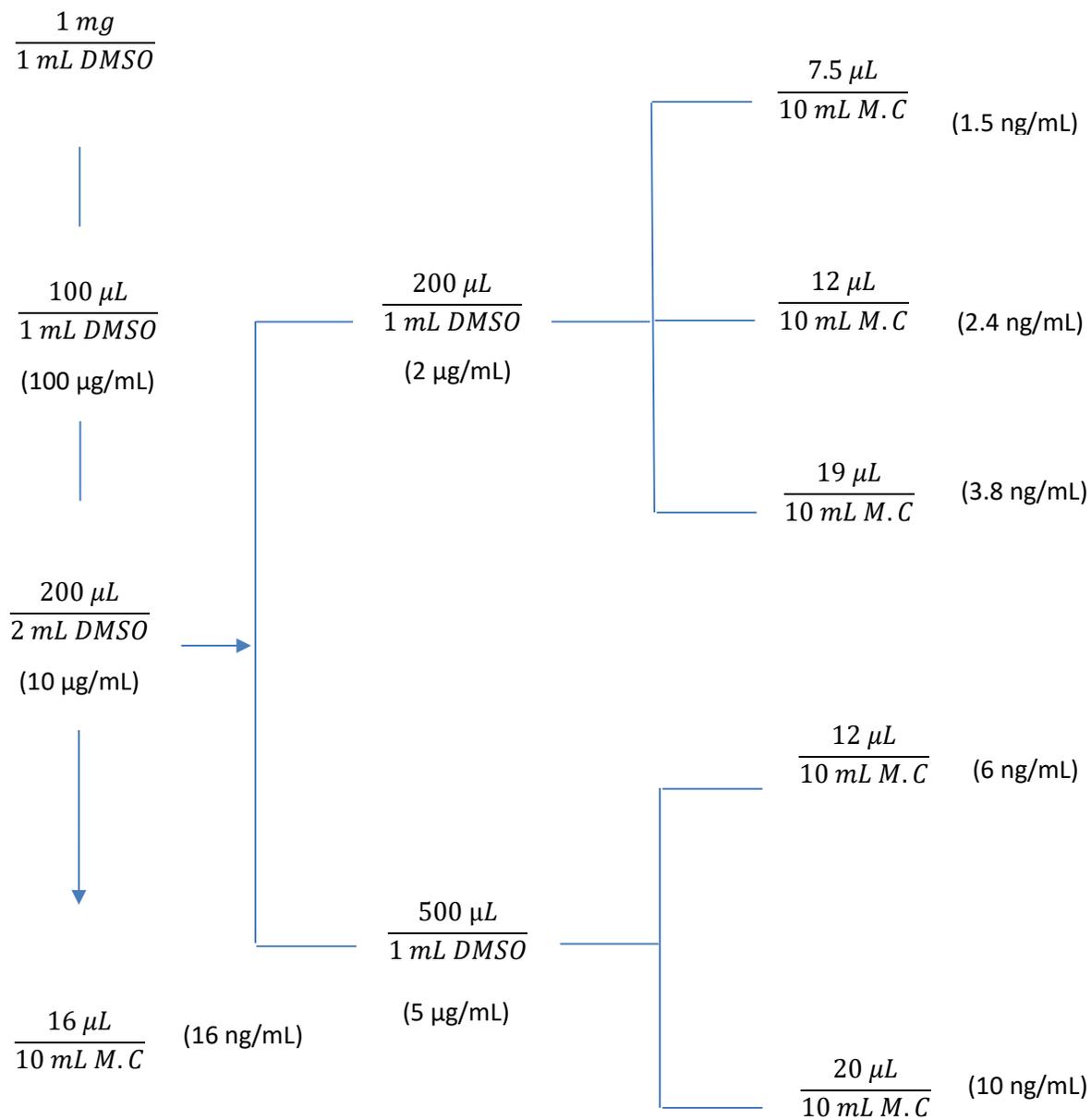


Figura 9. Procedimiento para la preparación de soluciones de MBZ en medio de cultivo Dulbecco's. Medio de cultivo (M.C), dimetilsulfóxido (DMSO).

6.3.2 Preparación de la combinación PZQ+MBZ

Para la preparación de las soluciones en combinación se agregaron alícuotas de las soluciones de trabajo cada fármaco (PZQ y MBZ) en un tubo Falcon y se realizó la dilución con medio de cultivo Dulbecco's.

6.3.3 Evaluación de la relación Concentración-Respuesta de PZQ y MBZ

Una vez preparadas las soluciones a las diferentes concentraciones de PZQ y MBZ en medio de cultivo, se realizaron los estudios *in vitro* como se indica a continuación; en condiciones de esterilidad, se colocaron en placas de 24 pozos de fondo plano para cultivo celular 2 mL de medio de cultivo con los fármacos a probar a las distintas concentraciones por triplicado. Como controles se incubaron cisticercos con DMSO al 0.2% y EtOH al 0.02%. En cada pozo se colocaron 10 cisticercos y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa por 11 días. Se realizó el cambio de medio de cultivo con los fármacos cada dos días y se registró la viabilidad de los cisticercos, determinándose por observación directa en el microscopio de luz invertida. Los criterios de viabilidad fueron:

- 1) Integridad de la membrana
- 2) Pérdida de fluido vesicular
- 3) Pérdida de movimiento del parásito

El Día 12 se confirmó la viabilidad de los parásitos usando la prueba de exclusión con azul tripano, la cual se realizó de la siguiente manera; se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se lavó cada uno con 2 mL de solución salina al 0.9% para eliminar el medio de cultivo. Posteriormente, se adicionó 1 mL de solución salina más 30 µL de azul tripano (solución al 0.4%) a cada pozo y se incubó por 5 minutos. Por último, se determinó la mortalidad individual y el valor promedio. Con los resultados obtenidos de esta prueba se realizaron las curvas de concentración-respuesta para cada fármaco.

6.3.4 Evaluación del efecto de la combinación de PZQ+MBZ

Después de obtener las curvas dosis respuesta de cada fármaco por separado, se seleccionaron las concentraciones que mostraron una mortalidad inferior al 50% para evaluarlas en combinación. La evaluación se llevó a cabo bajo las condiciones experimentales anteriormente mencionadas en el punto 3.3.3.

Con los resultados se obtuvieron las curvas concentración-respuesta de los fármacos solos o en combinación y se construyó la superficie de interacción sinérgica (SIS). Los resultados se analizaron usando ANOVA y una prueba de t-Student comparando los valores de mortalidad obtenidos de los fármacos en combinación con la suma teórica de cada uno de ellos por separado. Si la mortalidad obtenida con la combinación era mayor a la suma correspondiente de la mortalidad causada con cada fármaco por separado, el resultado se consideró como sinergismo, si era similar a la suma, se consideró efecto aditivo. En el caso de las combinaciones que mostraron una mortalidad menor a la suma teórica el resultado fue considerado como efecto antagónico. Un valor de $p < 0.05$, o menor, fue considerado estadísticamente significativo.

*6.3.5 Determinación del metabolismo energético de cisticercos de *T. crassiceps* expuestos a la combinación de PZQ+MBZ*

Para determinar el metabolismo energético de los cisticercos tratados con la combinación PZQ+MBZ: se realizaron 3 pruebas: (a) actividad de la fosfoglucoasa isomerasa (PGI), (b) actividad de fosfatasa alcalina (ALP) y (c) cuantificación de ATP. La combinación evaluada fue MBZ 2.4 ng/mL + PZQ 26 ng/mL, la cual fue la que presentó el mayor efecto sinérgico, *in vitro* así como un porcentaje de mortalidad cercano al 100%.

6.3.5.1. Condiciones experimentales y obtención de muestra

Los cisticercos (aprox. 400) se incubaron en frascos de cultivo celular con 5 mL de medio de cultivo conteniendo cada una de las combinaciones y los fármacos por separado a las concentraciones de prueba. Como controles se incubaron cisticercos en DMSO al 0.2% o Etanol al 0.02%. Para el estudio se utilizaron 9 frascos. Tres de ellos se utilizaron para la medición a las 24 horas, otros 3 para la medición a las 48 horas y los últimos 3 para la medición a las 72 horas. En los últimos casos, el medio de cultivo fue reemplazado cada 24 h.

Las muestras se obtuvieron de la siguiente manera:

- a) Muestra del medio de cultivo: Para el análisis se recolectó el medio de cultivo sobrenadante, teniendo precaución de no pinchar a los parásitos.
- b) Fluido vesicular: Los cisticercos se retiraron del medio de cultivo y se lavaron con solución salina al 0.9% 3 veces, posteriormente los cisticercos fueron colocados en una jeringa de 3 mL

y se procedió a pasarlos a través de un filtro pirinola de 0.45 μm , el fluido claro fue utilizado para los ensayos.

- c) Liofilizado de membranas de cisticercos: Los cisticercos se retiraron del medio de cultivo y se lavaron con solución salina 0.9%, 3 veces, posteriormente se colocaron en 20 mL de solución salina 0.9% en tubos Falcon y se homogenizaron. Cada tubo se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 min, los sedimentos se transfirieron a viales y se congelaron a -70°C . y se liofilizaron durante 24 h a -50°C al vacío.

La actividad de PGI y ALP se determinó a las 24, 48 y 72 h de incubación, tanto en medio de cultivo como en fluido vesicular. La cuantificación de ATP se realizó en medio de cultivo, fluido vesicular y liofilizado de membranas.

6.3.5.2 Actividad de PGI

Para medir la actividad de la PGI se utilizó un kit, Phosphoglucose Isomerase Activity Colorimetric Assay Kit (BioVision, USA) el cual mide la concentración de NADH en las muestras. La PGI convierte la fructuosa-6-fosfato a glucosa-6-fosfato y ésta a su vez es oxidada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa para formar el NADH, que reacciona con un reactivo incoloro para generar una absorbancia a 450 nm.

Para la cuantificación de NADH se realizó una curva estándar de 0, 2.5, 5, 7.5 10 y 12.5 nmol de NADH. Las muestras fueron analizadas inmediatamente después de su obtención. En una placa de fondo plano de 96 pozos se agregaron 10 μL de cada muestra por separado, ajustando el volumen a 50 μL con buffer de ensayo. Se agregaron 50 μL de mezcla de reacción (PGI buffer 44 μL , PGI enzyme mix 2 μL , PGI developer 2 μL , PGI substrate 2 μL) a cada pozo. Se mezcló bien y se incubó a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a los 40 y 60 min de incubación (T_1 y T_2) a 450 nm. Cada prueba se realizó por triplicado

Los resultados se corrigieron restando el valor de la lectura obtenida en la muestra de 0 nmol de NADH de la curva estándar a cada lectura. Se calculó la actividad de la PGI en la muestra: $\Delta\text{OD} = \text{Abs1} - \text{Abs2}$. Se interpolaron los valores de ΔOD a la curva estándar de NADH para obtener los nmol de NADH (**B**) generado durante el tiempo de reacción ($\Delta\text{T} = T_2 - T_1$). La actividad de la PGI se calculó aplicándose la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad de la PGI en la muestra} = \frac{B}{(\Delta T)(V)} \times \text{factor de dilución} = \text{nmol/min/mL} = \text{mU/mL}$$

Donde: **B** es la cantidad de NADH obtenida de la curva estándar (nmol)

V es el volumen de muestra agregado en el pozo (mL)

ΔT es el tiempo de reacción (min)

Los resultados obtenidos de cada prueba fueron expresados como la media de incremento porcentual de la actividad enzimática y analizados por medio de ANOVA seguida por una prueba de Dunnett a un nivel de significancia de 0.05.

6.3.5.3 Actividad de ALP

Para medir la actividad de la ALP se utilizó el kit, Alkaline Phosphatase Activity Colorimetric Assay Kit (BioVision, USA). Este kit utiliza p-nitrofenil fosfato (pNPP) como sustrato de fosfatasa que se vuelve amarillo cuando se desfosforila por la acción de la ALP generando una absorbancia a 405 nm.

Para esta prueba se realizó una curva estándar de 0, 4, 8, 12, 16 y 20 nmol de pNPP. Las muestras fueron analizadas inmediatamente después de su obtención. En una placa de fondo plano de 96 pozos se agregaron 10 μL de cada muestra por separado, ajustando el volumen a 80 μL con buffer de ensayo. A cada pozo se le agregó 50 μL de solución de pNPP 5 mM, se mezcló bien y se incubó a 25° C y protegido de la luz por 60 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación a cada pozo se le agregó 20 μL de solución para detener la reacción. La placa se leyó a 405 nm. Cada prueba se realizó por triplicado. Los resultados se corrigieron restando el valor de la lectura obtenida en la muestra de 0 nmol de pNPP de la curva estándar a cada lectura. Se interpoló las lecturas ya corregidas en la curva para obtener la cantidad de pNP generada por la ALP en las muestras. La actividad de la ALP en las muestras se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad de la ALP (U/mL)} = A/V/T$$

Donde: **A** es la cantidad de pNP generada en la muestra, obtenida de la curva estándar (μmol)

V es el volumen de muestra agregado en el pozo (mL)

T es el tiempo de reacción (min)

Los resultados obtenidos de cada prueba fueron expresados como la media de disminución porcentual de la actividad enzimática y analizados por medio de ANOVA seguida por una prueba de Dunnett a un nivel de significancia de 0.05.

6.3.5.4 Cuantificación de ATP

El ATP fue cuantificado utilizando el kit ATP colorimetric/Fluorometric Assay Kit (BioVision, USA), este kit utiliza la fosforilación del glicerol para generar un producto que es fácilmente cuantificable por colorimetría. Para realizar la cuantificación del ATP se realizó una curva estándar de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 nmol de ATP. Se preparó un blanco de medio de cultivo y uno de fluido vesicular con parásitos sin tratamiento. Para el caso del liofilizado de membranas se preparó un blanco de cisticercos sin incubación y de cisticercos sin tratamiento. Debido a que el ATP es sumamente lábil el fluido vesicular y el medio de cultivo fueron analizados inmediatamente después de su obtención.

En el caso de liofilizado se pesaron 10 mg de muestra y se homogenizaron en 400 μ L de buffer de ensayo, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min obteniendo el sobrenadante para realizar la cuantificación. En una placa de fondo plano de 96 pozos se colocaron 10 μ L de muestra (sobrenadante de medio de cultivo, fluido vesicular o sobrenadante de liofilizado) y se ajustó el volumen a 50 μ L con buffer de ensayo. Se agregaron 50 μ L de la mezcla de reacción (ATP assay buffer 44 μ L, ATP probe 2 μ L, ATP converter 2 μ L, Developer 2 μ L) a cada pozo. Se mezcló bien y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos protegido de la luz. Una vez transcurrido este tiempo la placa se leyó a 570 nm. Cada prueba se realizó por triplicado

Los resultados se corrigieron restando el valor de la lectura obtenida en la muestra de 0 nmol de ATP de la curva estándar a cada lectura. Se interpolaron los valores obtenidos en la curva estándar para obtener los nmol de ATP y calcular la concentración en la muestra usando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de ATP en la muestra} = \frac{B}{V} \times D = \text{nmol}/\mu\text{L o } \mu\text{mol/mL o mM}$$

Donde: **B** es la cantidad de ATP en el pozo de reacción obtenido de la curva estándar (nmol)

V es el volumen de muestra agregado en el pozo (μ L)

D es el factor de dilución

Los resultados obtenidos de cada prueba fueron expresados como la media de los mM de ATP generados durante la reacción y analizados por medio de ANOVA seguida por una prueba de Dunnett a un nivel de significancia de 0.05.

6.4 Estudios *in vivo*

6.4.1 Evaluación de la eficacia de PZQ y MBZ *in vivo*

Para la evaluación *in vivo* se infectaron ratones hembra BALB/c con cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF. Para realizar la infección se contaron 30 cisticercos de 1-2 mm suspendidos en solución salina al 0.9% y se inyectaron en el peritoneo de cada ratón. Después de 10 días de infección los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos de 8 ratones por tratamiento farmacológico.

Dado que los fármacos de estudio son insolubles en agua se utilizó como vehículo para su administración una dispersión de carboximetilcelulosa (CMC) al 0.5%, misma que se utilizó como control. Las dosis de PZQ probadas fueron: 15, 25, 30 y 50 mg/Kg/día; y las de MBZ fueron: 15, 25, 50 y 100 mg/Kg/día. A cada ratón se le administraron 100 µL de dispersión vía oral una vez al día durante 20 días. Una vez concluidos los tratamientos los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, los cisticercos fueron extraídos de la cavidad peritoneal lavando con solución salina al 0.9% para obtenerlos en su totalidad. Los cisticercos fueron colocados en tubos Falcon de 50 mL con solución salina y se homogenizaron. Posteriormente, se centrifugó cada tubo a 3,000 rpm durante 15 min, los sedimentos se transfirieron a viales previamente pesados y se congelaron a -70°C. Las muestras congeladas se liofilizaron durante 24 h a -50°C al vacío. Los viales con el residuo liofilizado se pesaron y por diferencia de pesos se obtuvo el peso seco de los cisticercos obtenidos de cada ratón. La respuesta al tratamiento se reportó como porcentaje de eficacia, y se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Eficacia} = \frac{P_{\text{control}} - P_{\text{trat}}}{P_{\text{control}}} \times 100$$

Donde P_{control} es el peso promedio de parásitos obtenido en el tratamiento control negativo (carboximetilcelulosa), P_{trat} es el peso promedio de parásitos obtenido después de cada tratamiento con PZQ o MBZ.

6.4.2 Evaluación del efecto de la combinación de PZQ+MBZ *in vivo*

Para el estudio se seleccionaron dosis de la curva dosis respuesta de PZQ y de MBZ de que exhibieran una eficacia menor al 50%. La combinación evaluada fue: PZQ (25 mg/Kg) + MBZ (50 mg/kg). Para ello se preparó una dispersión sólida de PZQ y MBZ en CMC 0.5%. Los fármacos se pesaron de manera

individual y posteriormente se agregaron al vehículo (CMC); esta mezcla fue agitada por 5 minutos con un homogeneizador (Polytron PT2100) para asegurar que no quedaran grumos.

El estudio se realizó en ratones BALB/c infectados experimentalmente y divididos en 4 grupos de 8 ratones cada uno: a) Control (CMC 0.5%), b) PZQ 25 mg/Kg, c) MBZ 50 mg/Kg y d) PZQ 25 mg/Kg + MBZ 50 mg/Kg.

En cada caso se administró, a cada ratón, por vía oral, 100 µL del tratamiento correspondiente, durante 20 días una vez al día. Una vez concluido el tratamiento los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se recuperaron los parásitos del peritoneo. Los cisticercos se procesaron para la obtención del peso seco, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el punto anterior. La respuesta al tratamiento se reportó como porcentaje de eficacia, y se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Eficacia} = \frac{P_{\text{control}} - P_{\text{trat}}}{P_{\text{control}}} \times 100$$

Donde P_{control} es el peso promedio de parásitos obtenido en el tratamiento control negativo, P_{trat} es el peso promedio de parásitos obtenido después de cada tratamiento con MBZ o PZQ.

Los resultados obtenidos fueron analizados por medio de ANOVA seguida por una prueba de Tukey a un nivel de significancia de 0.05.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Resultados *in vitro*

7.1.1. Determinación de la actividad cisticida de PZQ, MBZ y la combinación de PZQ+MBZ

La Figura 10 muestra las curvas concentración-respuesta *in vitro* del PZQ y MBZ en cisticercos de *T. crassiceps* cepa *ORF*. En ellas se puede observar que el efecto de ambos fármacos es dependiente de la concentración. La concentración efectiva que mata al 50% de los parásitos (CE_{50}) para ambos fármacos se determinó por regresión logística usando el programa SPSS (versión 15.0). Para el caso del PZQ el valor de CE_{50} fue de 118.92 nM y para el MBZ fue de 23.70 nM, esto muestra que el MBZ es más potente que PZQ.

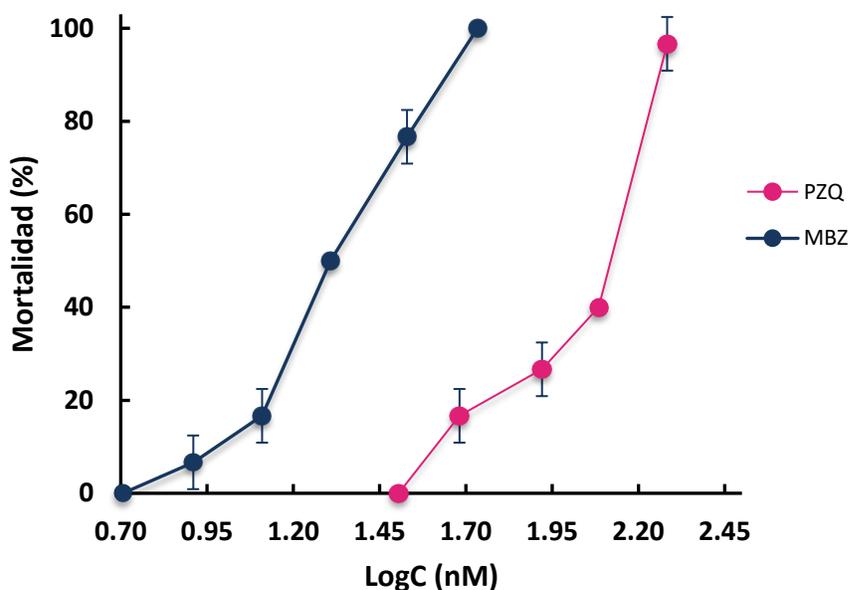


Figura 10. Curvas concentración-respuesta de praziquantel (PZQ) y mebendazol (MBZ) en cisticercos de *T. crassiceps* cepa *ORF*. Cada punto representa el promedio de parásitos muertos \pm DE.

La Figura 11 muestra los resultados de mortalidad obtenidos con cada una de las combinaciones de PZQ+MBZ, mientras que en la Figura 12 se observa el efecto producido por las diferentes combinaciones de PZQ+MBZ después de restar el efecto individual cada uno de los fármacos. En esta figura se puede observar el efecto sinérgico o antagónico que presentó cada combinación.

Al unir todos los puntos de interacción en un mismo plano, se obtuvo la Superficie de Interacción Sinérgica (SIS) de la combinación de PZQ+MBZ, lo cual se muestra en la figura 13. En ella se puede visualizar con facilidad el efecto sinérgico o antagónico que presentaron las distintas combinaciones. Sólo una de las 16 combinaciones probadas presentó un efecto antagónico (pico azul hacia abajo), mientras que 14 combinaciones presentaron efecto sinérgico, resaltando las combinaciones con mayor interacción sinérgica (zona azul rey). Se seleccionaron dos combinaciones que presentaron el mayor efecto de sinergismo:

- a) Combinación A: PZQ 32 nM + MBZ 8.13 nM presentó un incremento en la mortalidad porcentual en comparación de la suma teórica obtenida de cada fármaco individual. La mortalidad de PZQ 32 nM no presentó efecto cisticida mientras que MBZ 8.13 nM presentó una mortalidad de 6.66%, la combinación produjo una mortalidad de 30%, aumentando el efecto cisticida cinco veces (Figura 14 A).

Los resultados se analizaron usando ANOVA y una prueba de t-Student comparando los valores de mortalidad experimentales obtenidos de los fármacos en combinación con la suma teórica de cada uno de ellos por separado, encontrándose una diferencia significativa ($p < 0.05$) por lo que el efecto de esta combinación fue sinérgico.

- b) Combinación B: PZQ 83.22 nM + MBZ 8.13 nM mostró un incremento en la mortalidad porcentual en comparación con la mortalidad de suma teórica obtenida de cada fármaco por separado. La mortalidad obtenida con PZQ 83.22 nM fue de 26.66 % y la de MBZ 8.13 nM fue de 6.66 %, mientras que con la combinación la mortalidad fue del 93.7% (Figura 14 B).

Los resultados se analizaron usando ANOVA y una prueba de t-Student comparando los valores de mortalidad experimentales obtenidos de los fármacos en combinación con la suma teórica de cada uno de ellos por separado, encontrándose una diferencia significativa ($p < 0.05$), por lo que el efecto de esta combinación fue sinérgico.

Un efecto similar a esta combinación se podría encontrar con una concentración de PZQ 2.3 veces mayor a la utilizada (PZQ 192.05 nM), la cual produjo 96.6% de mortalidad y con una concentración 6.7 veces mayor de MBZ (54.18 nM) que causó una mortalidad de 100%.

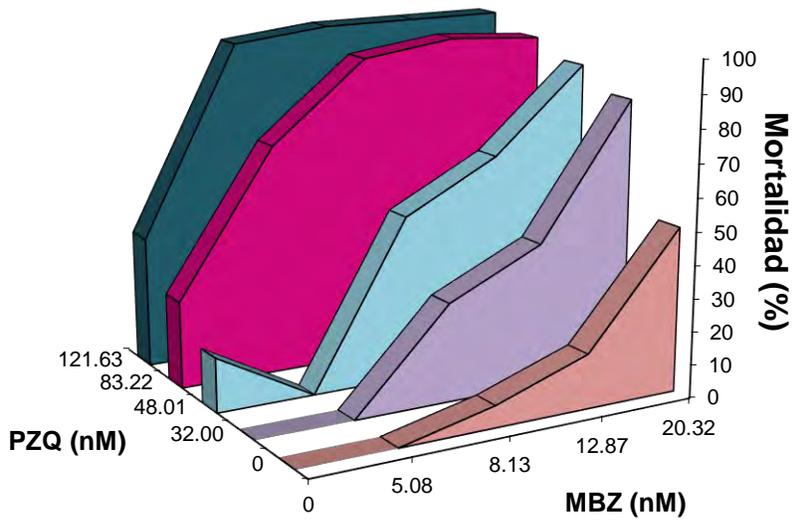


Figura 11. Curvas concentración-respuesta de las 16 combinaciones evaluadas de PZQ+MBZ. Cada punto representa el promedio de parásitos muertos. Praziquantel (PZQ), mebendazol (MBZ).

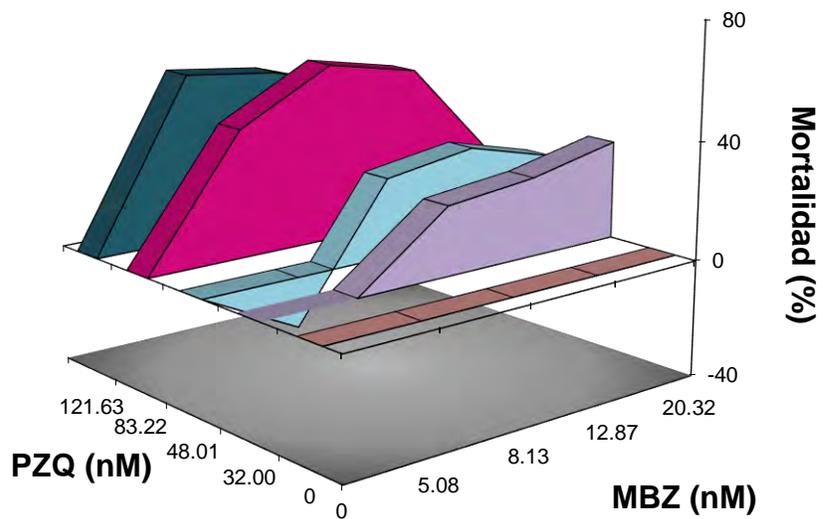


Figura 12. Efecto cisticida producido por las diferentes combinaciones de PZQ+MBZ después de restar el efecto individual. Praziquantel (PZQ), mebendazol (MBZ).

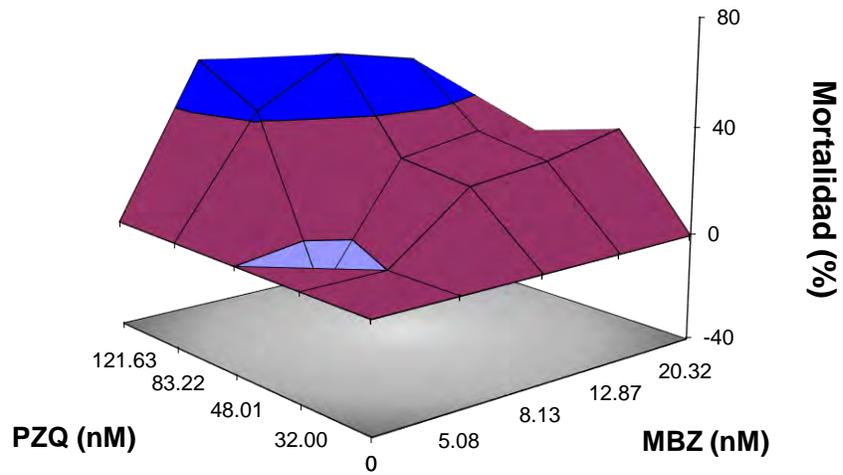


Figura 13. Superficie de interacción sinérgica (SIS) de la combinación PZQ+MBZ. Se observa fácilmente el efecto sinérgico presentado por las diferentes combinaciones. Las combinaciones con mayor interacción sinérgica se distinguen en la zona azul. Sólo una combinación presentó efecto antagónico (pico hacia abajo). Praziquantel (PZQ), mebendazol (MBZ).

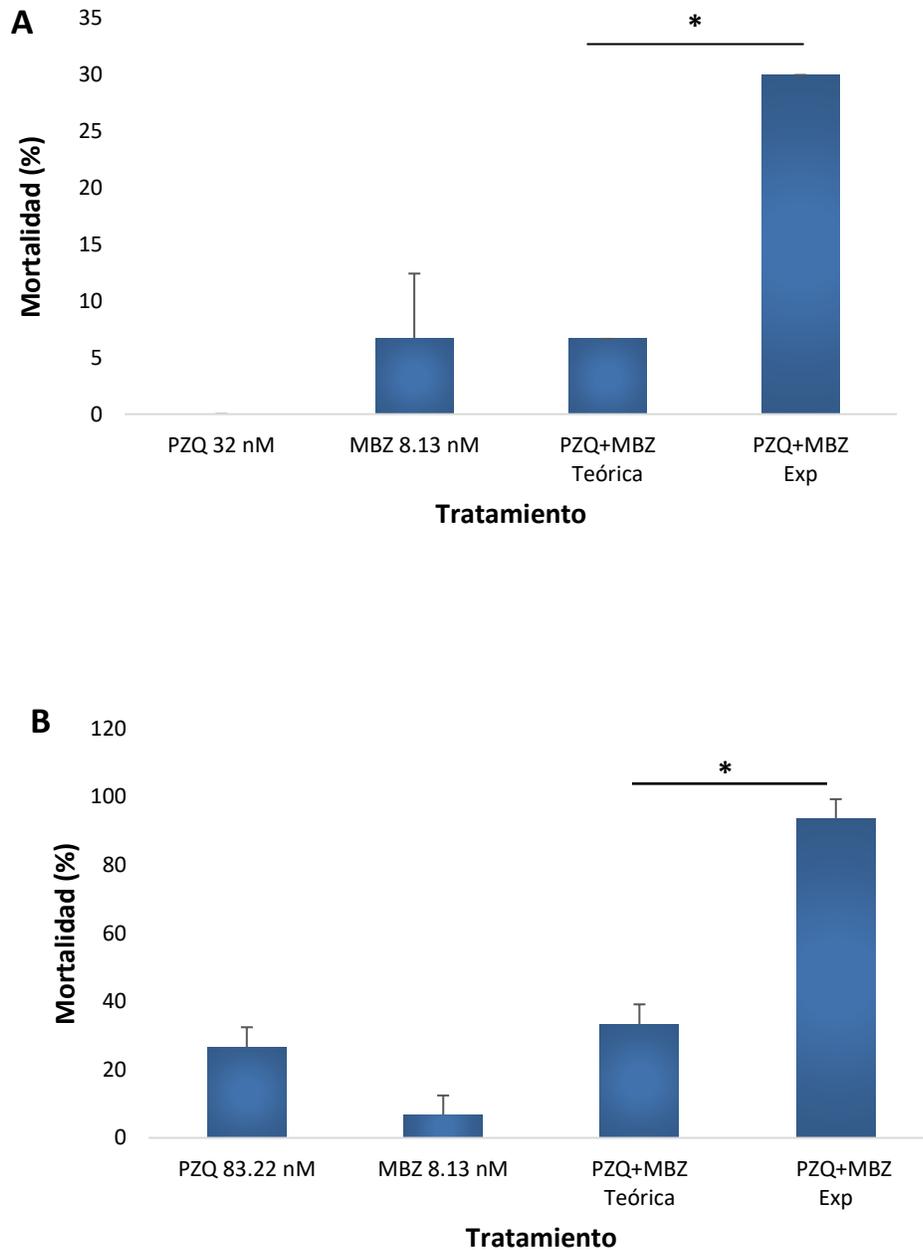


Figura 14. Combinaciones que presentaron el mayor efecto sinérgico en comparación con la suma teórica del efecto de cada fármaco por separado. (A) Combinación PZQ 32 nM + MBZ 8.13 nM (proporción 4:1) presentó una mortalidad (30%) 5 veces mayor en comparación con la suma de la mortalidad alcanzada por cada fármaco de forma individual (6.6%). (B) Combinación PZQ 83.22 nM + MBZ 8.13 nM (proporción 10:1) presentó una mortalidad (93.5%) 2.8 veces mayor a la suma de mortalidad alcanzada por cada fármaco de forma individual (33.3%). Estos incrementos fueron estadísticamente significativos $p < 0.05$ (*).

Los resultados de las combinaciones también mostraron que la actividad cisticida se presentó en un tiempo más corto en comparación con el que se requiere para cada fármaco solo. La Figura 15 muestra el porcentaje de mortalidad de los cisticercos en función del tiempo de las dos combinaciones que mostraron el mayor efecto sinérgico, así como del PZQ y el MBZ por separado a esas mismas concentraciones. En el caso de la combinación A: PZQ 32 nM + MBZ 8.13 nM se observó el efecto desde el día 3 y se observó el efecto máximo al día 5, mientras que con cada fármaco solo el efecto se presentó después de los 10 días (PZQ a 32 nM no presentó actividad a esa concentración). La combinación B: PZQ 83.2 nM + MBZ 8.3 nM también exhibió un marcado efecto (60%) desde los primeros 3 días de incubación en comparación con el efecto de PZQ solo (0%) o MBZ (0%) que exhibieron efecto a partir del día 5 y 10 respectivamente. También se observó que el efecto máximo de esta combinación fue alcanzado al día 5, mientras que para cada fármaco se requirió de mayor tiempo (PZQ 7 días y MBZ 10 días). Estos resultados muestran que con la combinación PZQ+MBZ se requiere un menor tiempo para que se presente la eficacia cisticida, lo cual, es un factor importante en la duración del tratamiento y representaría una ventaja en comparación con el uso de cada fármaco por separado.

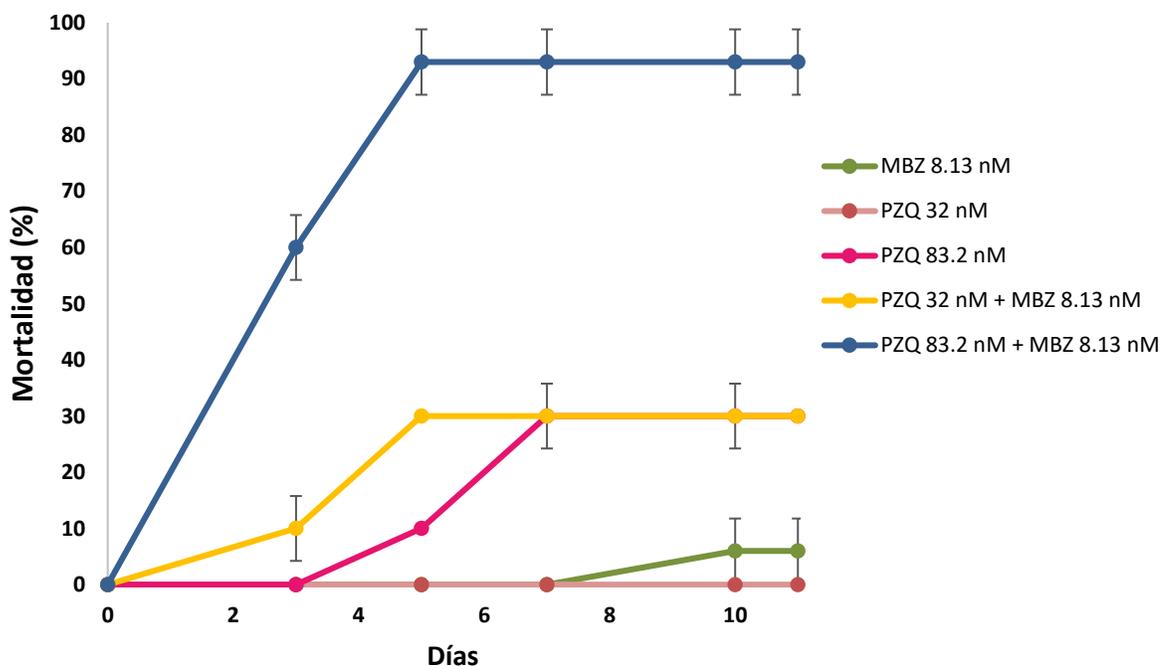


Figura 15. Curva temporal del efecto de las combinaciones que mostraron el mayor efecto sinérgico, así como de praziquantel (PZQ) y mebendazol (MBZ) solos. Combinación A: PZQ 32 nM + MBZ 8.13 nM y combinación B: PZQ 83.2 nM + MBZ 8.13 nM. Cada punto representa el promedio de parásitos muertos de tres diferentes experimentos \pm DE.

7.1.2 Determinación del metabolismo energético de cisticercos de *T. crassiceps* tratados con la combinación de PZQ+MBZ

7.1.2.1 Actividad de PGI

La actividad de PGI en cisticercos tratados con MBZ 8.13 nM se realizó tanto en medio de cultivo como en fluido vesicular, sin embargo, no se detectó cambio significativo en la actividad de esta enzima durante los tres días de incubación. Esto concuerda con reportes previos, en los que la actividad de la PGI no se ve alterada a concentraciones bajas de benzimidazoles.³⁵

En la Figura 16 se muestran los resultados de actividad de PGI tanto en medio de cultivo como en fluido vesicular en cisticercos tratados con PZQ 83.2 nM solo o en combinación con MBZ 8.13 nM.

En medio de cultivo (Figura 16 A) se observó un aumento en la actividad enzimática en relación al tiempo de incubación. En el día 1 y 2 la actividad enzimática después del tratamiento con PZQ solo o con la combinación PZQ+MBZ no tuvo un aumento significativo; sin embargo, en el día 3 de incubación se observó un incremento significativo en la actividad en los cisticercos expuestos a la combinación con respecto a los cisticercos tratados con PZQ, esta liberación probablemente es ocasionada por el sinergismo entre estos fármacos que provoca un daño en la membrana del parásito, ocasionando una rápida liberación de PGI al medio de cultivo sobrenadante. Estos resultados correlacionan con los resultados de mortalidad observada en los cisticercos después de 3 días de incubación con la combinación. Asimismo, se ha reportado que la liberación de esta enzima al medio de cultivo es indicativa de daño estructural en el tegumento del parásito ocasionado por la acción de los fármacos antihelmínticos, con lo que se produce pérdida de fluido vesicular y con ello se detecta la actividad de esta enzima en el medio de cultivo.³⁵

En la Figura 16 B se observa la actividad de PGI en el fluido vesicular de los cisticercos incubados con PZQ solo o con la combinación PZQ+MBZ. Desde el día 1 se puede observar un incremento significativo en la actividad enzimática tanto con PZQ solo como con la combinación, siendo la combinación la que presentó un incremento cuatro veces mayor en comparación al de PZQ solo. En el día 2 y 3 se observa que la actividad de la PGI fue menor con respecto al primer día, esto podría deberse a un daño acumulativo causado por los fármacos sobre la membrana de los parásitos que provocó que la enzima migrara al medio de cultivo sobrenadante, tal y como se observó en la Figura 16 A. En cisticercos de *T. crassiceps* expuestos a PZQ o ABZ *in vitro*, se ha reportado que ambos fármacos inhiben la captura de glucosa del medio, propiciando así la utilización de las reservas de glucógeno y otros ácidos orgánicos

para generar glucosa y así compensar la ausencia de la misma, este aumento de glucosa en el parásito podría estar correlacionado con un incremento en la actividad de la PGI.³⁶

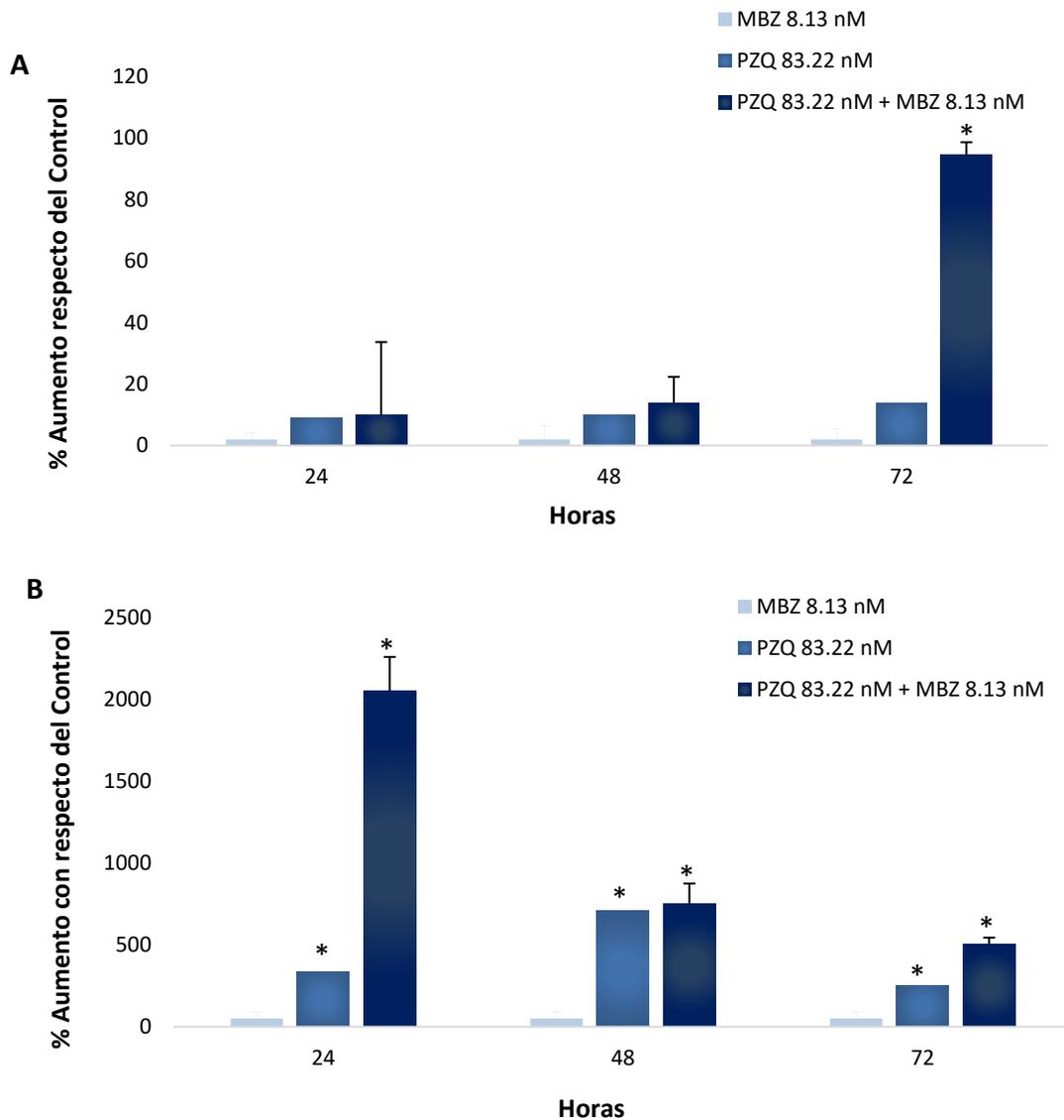


Figura 16. (A) Actividad de la PGI en el medio de cultivo al ser liberada debido a la acción del praziquantel (PZQ) y su combinación con mebendazol (MBZ) sobre cisticercos de *T. crassiceps*. (B) Actividad de la PGI en el fluido vesicular de cisticercos de *T. crassiceps* tratados con praziquantel (PZQ) y su combinación con mebendazol (MBZ). Cada barra representa el porcentaje promedio de aumento de la actividad enzimática con respecto al control \pm DE. Estos incrementos fueron estadísticamente significativos $p < 0.05$, $n = 3$ (*).

7.1.2.2 Actividad de ALP

La Figura 17 muestra los resultados de la actividad de la ALP en medio de cultivo como en fluido vesicular de cisticercos expuestos a PZQ 83.2 nM, MBZ 8.13 nM y su combinación. En medio de cultivo (Figura 17 A) en el día 1 el PZQ 83.2 nM no inhibió la actividad enzimática, mientras que el MBZ y la combinación de PZQ+MBZ inhibieron la actividad de un 60-80%. Para el día 2 el PZQ solo ya presentó una inhibición importante (30%); sin embargo, la inhibición del MBZ es mucho mayor al ser cercana al 95%. La combinación mostró una inhibición del 75% aproximadamente, ligeramente mayor que el día 1. En el día 3 de incubación la inhibición de la actividad de la ALP se vio disminuida en aproximadamente 80% en los diferentes tratamientos.

En el fluido vesicular (Figura 17 B) en el día 1 se observó una disminución en la actividad de la ALP en los cisticercos tratados con PZQ solo cercana al 50%, la inhibición del MBZ sigue siendo mayor (70%). En este caso, la combinación PZQ+MBZ no mostró una disminución significativa en la actividad de la enzima. En el día 2 el MBZ mantuvo la inhibición sin cambios importantes con respecto al día 1. El PZQ continuó inhibiendo la actividad enzimática y la combinación comenzó a mostrar inhibición de la ALP. Para el día 3 en el caso del MBZ la inhibición fue menor que en los primeros días mientras que el tratamiento con PZQ continuó aumentando el porcentaje de inhibición hasta el 90% con respecto al control y la combinación de los fármacos, de igual forma, aumentó la inhibición enzimática hasta llegar al 80%.

Se ha reportado que la ALP se encuentra casi exclusivamente en la membrana del cisticerco, por ello es posible detectar su actividad en el sobrenadante de medio de cultivo; sin embargo, también se encuentra, aunque en menor cantidad, en el fluido vesicular y se ha utilizado anteriormente para detectar los efectos de los fármacos cisticidas *in vitro*.³⁷ Al ser una proteína importante en el transporte activo de sustancias a través de la membrana, la disminución en su actividad puede relacionarse con un daño estructural significativo en la membrana del cisticerco.³⁷ La medición de esta enzima se ha utilizado para evaluar los efectos de algunos antihelmínticos tanto en *T. crassiceps* y *T. solium*, como en otros géneros (*E. granulosus* y *E. multilocularis*).^{35, 38} Sin embargo, no se ha reportado la actividad en fluido vesicular.

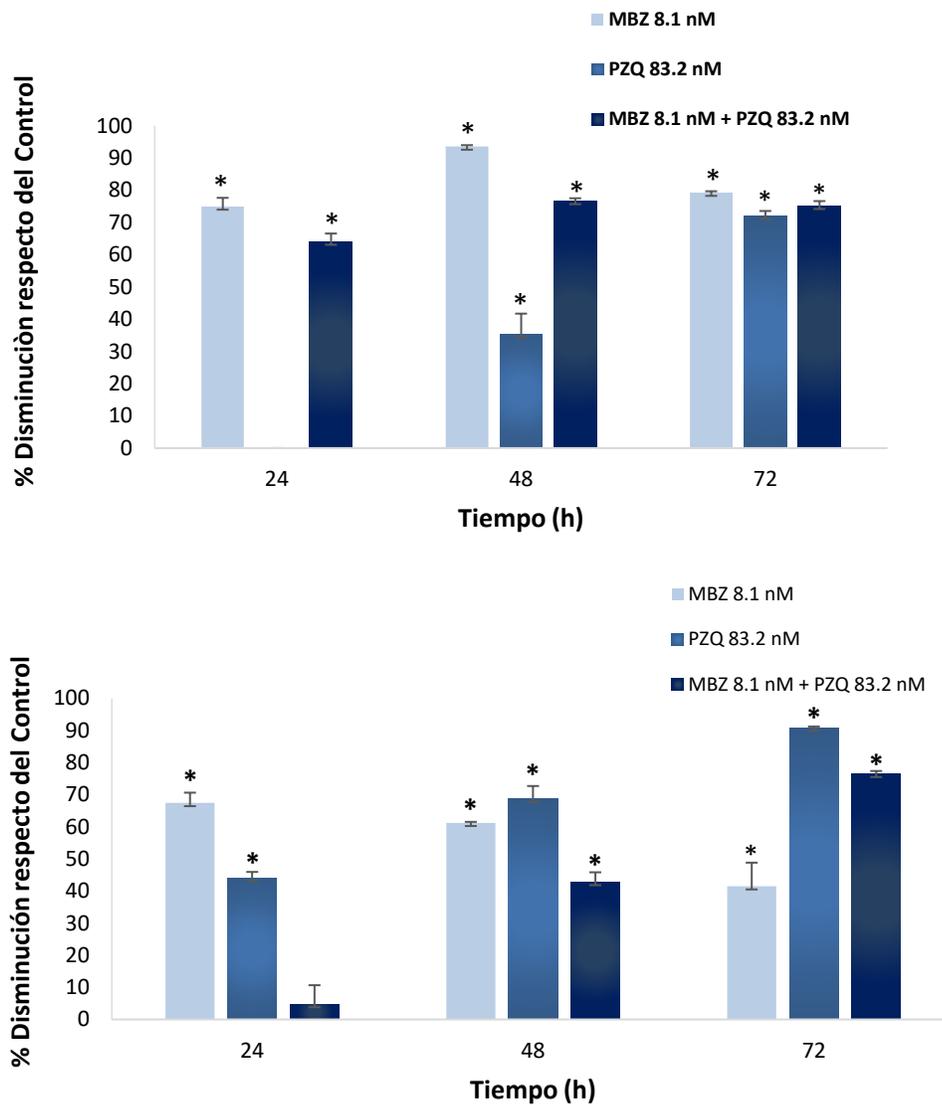


Figura 17. (A) Actividad de la ALP en medio de cultivo al ser liberada debido a la acción del praziquantel (PZQ) y su combinación con mebendazol (MBZ) sobre cisticercos de *T. crassiceps*. (B) Actividad de la ALP en fluido vesicular de cisticercos de *T. crassiceps* tratados con praziquantel (PZQ) y su combinación con mebendazol (MBZ). Cada barra representa el porcentaje promedio de disminución de la actividad enzimática respecto al control \pm DE. Estas disminuciones fueron estadísticamente significativas $p < 0.05$, $n = 3$ (*).

7.1.2.3 Cuantificación de ATP

No fue posible cuantificar ATP en medio de cultivo sobrenadante ni en fluido vesicular de cisticercos tratados tanto con la combinación PZQ+MBZ como con cada fármaco solo. Sin embargo, sí se logró la detección y cuantificación de ATP en liofilizado de membranas de cisticercos (Figura 18). Se observa que PZQ 83.2 nM aumentó la concentración de ATP con respecto al control, esto probablemente se deba al mecanismo de acción del fármaco, el cual causa una alteración en el metabolismo energético del parásito, esta alteración se vio reflejada en el incremento en la actividad de PGI.³⁶ En el caso de los cisticercos tratados con MBZ 8.1 nM no hay diferencia en la concentración de ATP con respecto al control; esto puede ser atribuido al hecho de que el efecto del MBZ sobre los cisticercos es más lento y la dosis es muy baja, lo que no genera un cambio importante en el metabolismo del parásito ya que no es suficiente para bloquear totalmente la captación de glucosa y afectar de manera significativa su metabolismo. En el caso de la combinación PZQ+MBZ la concentración de ATP se vio disminuida con respecto al control, a diferencia del tratamiento con PZQ, esta diferencia podría deberse al efecto conjunto de los fármacos que provocan un estrés metabólico mayor.

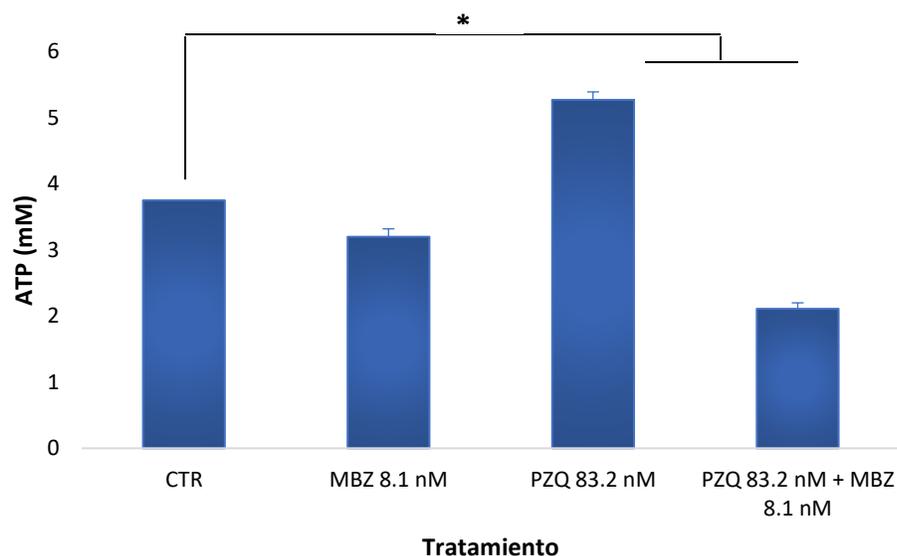


Figura 18. Concentración de ATP en liofilizado de membranas de cisticercos de *T. crassiceps* tratados con praziquantel (PZQ), mebendazol (MBZ) y su combinación (PZQ+MBZ), CTR es cisticercos control (medio de cultivo con 0.2% DMSO y 0.02% EtOH). Cada barra representa la concentración (mM) de ATP \pm DE. Diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$, $n=3$. (*).

7.2 Resultados in vivo

7.2.1 Efecto individual de PZQ y MBZ en el modelo de cisticercosis murina

En la Figura 19 se muestra el efecto de del PZQ y el MBZ en la reducción de parásitos en el modelo de cisticercosis murina. Los resultados muestran que existe una relación entre la dosis y la reducción de parásitos con cada uno de los fármacos. El PZQ presentó una mayor actividad cisticida que el MBZ. Podemos observar que a una dosis de 50 mg/Kg PZQ exhibió una reducción de la carga parasitaria del 50.7%, mientras que MBZ, a esta misma dosis, sólo presentó una reducción del 23%. En ningún caso se logró obtener un 100% de eficacia con las dosis evaluadas.

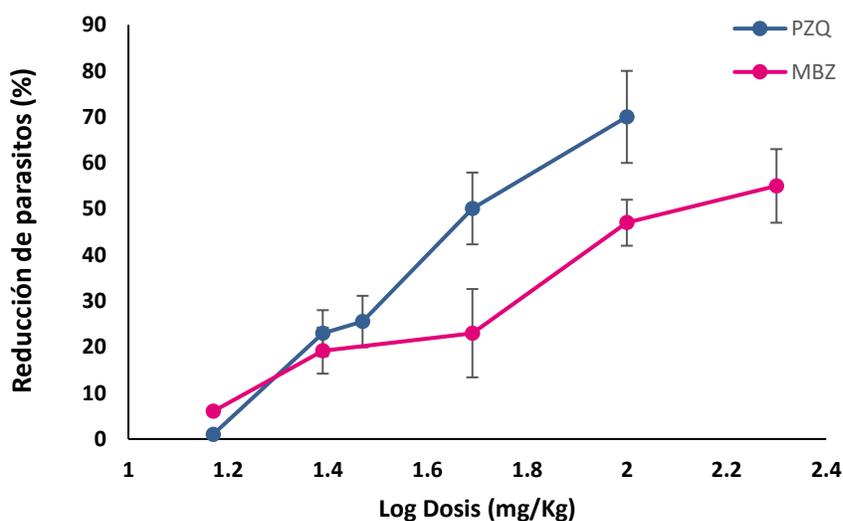


Figura 19. Curvas dosis-respuesta de praziquantel (PZQ) y mebendazol (MBZ) en el modelo de cisticercosis murina. Cada punto representa el porcentaje de reducción de parásitos obtenido respecto a un control \pm DE.

7.2.2 Efecto de la combinación PZQ+MBZ en el modelo de cisticercosis murina

La figura 20, muestra la carga parasitaria expresada como el peso seco de los parásitos obtenidos de ratones con cisticercosis después del tratamiento con la combinación PZQ+MBZ y de cada fármaco por separado, así como el del grupo control (CMC 0.5%). El porcentaje de reducción de la carga parasitaria se calculó en base al grupo control. Se observa que el efecto individual de PZQ y MBZ no mostró diferencia estadísticamente significativa contra el grupo control, mientras que con los fármacos en

combinación se logró obtener un 49.7% de reducción en la carga parasitaria, la cual sí mostró diferencia significativa con respecto al grupo control (Tabla 1). Estos resultados muestran que el tratamiento en combinación fue mejor que la monoterapia usando las mismas dosis y el mismo periodo de tratamiento. Con el PZQ sólo se obtuvo una disminución del 23.41% y con el MBZ una del 17.91%, esto muestra que *in vivo* los fármacos también presentaron un efecto sinérgico, reflejado en el aumento de la eficacia por encima del efecto aditivo teórico.

Existen reportes del uso de PZQ+MBZ como tratamiento terapéutico en pacientes con hidatidosis, con resultados acordes a los obtenidos en este trabajo, pues la terapia conjunta de ambos antihelmínticos fue más efectiva que el MBZ individual, sugiriéndose como una alternativa farmacológica en el tratamiento de esta infección.³⁹ Otro estudio concluyó que la administración de estos fármacos en combinación para el tratamiento de *Schistosoma mansoni* y otros geohelminthos en niños no provoca efectos adversos serios y es generalmente bien tolerado, por lo que se sugiere como tratamiento alternativo.⁴⁰

Los resultados del presente trabajo muestran que esta combinación podría representar una alternativa para una terapia en combinación en el tratamiento de la NCC, disminuyendo tanto la dosis administrada como la duración del tratamiento cuando se usan estos fármacos de forma individual.

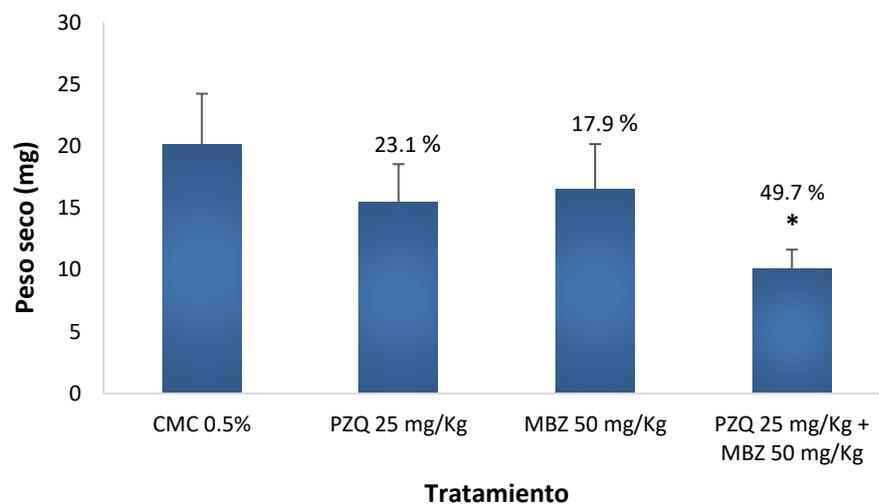


Figura 20. Peso seco de los cisticercos obtenidos después del tratamiento con praziquantel 25 mg/Kg, mebendazol 50 mg/KG y su combinación. Cada barra representa el promedio de parásitos obtenidos en peso seco (mg) \pm DE. Se observa también el porcentaje de disminución de la carga parasitaria con respecto al grupo control. Praziquantel (PZQ), mebendazol (MBZ), carboximetilcelulosa (CMC). Diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto al control (*).

Comparaciones múltiples

Ta

up

P > Variable dependiente: pesoseco
HSD de Tukey

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
cmc	pzq	4.65714	1.78091	.067	-.2415	9.5558
	mbz	3.61095	1.67905	.165	-1.0075	8.2294
	pzq+mbz	10.01929*	1.85362	.000	4.9206	15.1179
pzq	cmc	-4.65714	1.78091	.067	-9.5558	.2415
	mbz	-1.04619	1.67905	.924	-5.6647	3.5723
	pzq+mbz	5.36214*	1.85362	.037	.2635	10.4608
mbz	cmc	-3.61095	1.67905	.165	-8.2294	1.0075
	pzq	1.04619	1.67905	.924	-3.5723	5.6647
	pzq+mbz	6.40833*	1.75600	.006	1.5782	11.2385
pzq+mbz	cmc	-10.01929*	1.85362	.000	-15.1179	-4.9206
	pzq	-5.36214*	1.85362	.037	-10.4608	-.2635
	mbz	-6.40833*	1.75600	.006	-11.2385	-1.5782

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

8. CONCLUSIONES

- MBZ exhibió efecto cisticida sobre cisticercos de *Taenia crassiceps* tanto *in vitro* como *in vivo*.
- La combinación PZQ+MBZ exhibió un efecto *in vitro* en su mayoría de sinergismo, incrementado la eficacia cisticida de los fármacos.
- La combinación PZQ+MBZ mostró también un efecto sinérgico en el metabolismo del parásito, alterando de forma significativa la actividad enzimática de PGI y ALP, asimismo altero la concentración de ATP en el parásito. Estas alteraciones fueron directamente proporcionales a la muerte de los parásitos.
- La combinación PZQ+MBZ *in vivo* en una proporción 1:2 mostró un efecto sinérgico, en la actividad cisticida en comparación con el efecto de cada fármaco por separado.
- La combinación PZQ+MBZ podría ser una alternativa prometedora para el tratamiento de la cisticercosis y se continuará con su evaluación a fin de explorar su utilidad terapéutica.

9. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- García, H., González, A., Evans, C. & Gilman, R. (2011). *Taenia solium* cysticercosis. Europe PMC, 362 (9383), 547-546.
- 2.- Meza-Lucas, A. & Rebolledo, F. (2002). Teniasis humana por *Taenia solium*. Revista Mexicana de Patología Clínica, 49 (2), 92-99.
- 3.- Willms, K., Vargas-Parada, L. & Laclette, J. (2006). Cap 1 Biología del parásito. En Cisticercosis (pp 19-41). México, D.F: Fondo de cultura económica.
- 4.- Flisser, A., Vargas-Parada, L. & Laclette, J. (2006). *Taenia solium*: un parásito cosmopolita. Investigación y Ciencia, 1 (356), 24-33.
5. - Vinaud, M., Ferreira, C., Souza, R. & Barreto, j. (2008). *Taenia crassiceps*: Energetic and respiratory metabolism from cysticerci exposed to praziquantel and albendazole *in vitro*. Experimental Parasitology, 120 (1), 221-226.
6. - Vinaud, M., Fraga, C., Costa, T., Barreto, J. & Souza, R. (2012). *Taenia crassiceps*: Host treatment alters glycolysis and tricarboxilic acid cycle in cysticerci. Experimental Parasitology, 130 (2), 146-151.
7. - Corbin, R., Simcoff, M., Novak, B. & Blackburn, J. (1998). Metabolism of [3-¹³C]-piruvate by cysticerci of *Taenia crassiceps*. Parasitology Research, 84 (6), 516-518.
8. – Fraga, C., Costa, T., Castro, A., Reynoso-Ducoing, O., Ambrosio, J., Hernández-Campos, A., Castillo, R. & Vinaud, M. (2017). A benzimidazole derivative (RCB20) *in vitro* induces an activation of energetic pathways on *Taenia crassiceps* (ORF strain) cysticerci. Experimental Parasitology, 172 (1), 12-17.
9. – Falcón, N. (2006). Efecto de la edad en un modelo de infección experimental de cisticercosis porcina. Tesis de maestría. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
10. – Willms, K. & Zurabian, R. (2010). *Taenia crassiceps in vitro* and *in vivo* models. Parasitology, 137 (3), 335-343.
11. – Romano, M., Valdéz, R., Cartas, A., Gómez, Y. & Larralde, C. (2003). Steroid hormone production by parasites: the case of *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 85 (2), 221-225.
12. – Maillard, H., Marionneau, J., Prophette, B., Boyer, E. & Célerier, P. (1998). *Taenia crassiceps* cysticercosis and AIDS. An official International AIDS Society Journal, 12 (12), 1551-1552.

13. – Agueldo, S., Botero, E., Restrepo, G. & Florez, J. (2013). Cutivo de lavras de *Taenia crassiceps* en ratones BALB/c para la obtención de antígeno para inmunodiagnóstico. Universidad de Antioquia, 51 (62), 17-23.
14. - Alarcón, F. (2006). Neurocisticercosis: etiopatogenia, manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento. Revista de Neurología, 43 (1), 93-100.
15. – Polanco, N. (2016). Neurocisticercosis en enfermedad renal crónica: a propósito de un caso. Revista Mexicana de Neurociencias, 17 (1), 105-113.
16. – Gómez-Piña, J. & Fleury, A. (2017). Situación actual de los factores de riesgo para el complejo teniosis/cisticercosis en México. Revista Mexicana de Neurociencias, 18 (3), 34-48.
17. – Secretaría de Salud (2016). Foro: Prevención y Control de la Teniasis/Cisticercosis en México. Subdirección de Zoonosis CENAPRECE. México. Recuperado el 3 de Abril de 2018, de http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/zoonosis/descargas/pdf/CENAPRECE_CisticercosisMERCK.pdf
18. - Singhi, P., Singhi, S. (2009). Neurocysticercosis in Children. Indian Journal of Pediatrics, 76 (2), 537-545.
19. - Singh, G. (2002). *Taenia solium* Cysticercosis: From Basic to Clinical Science. London, UK: CABI Publishing.
20. - Imirizaldu, L., Miranda L., García-Gurtubay, I., Satón, I., Urriza, J., Quesada, P. (2004). Neurocisticercosis: una enfermedad emergente. Anales del Sistema Sanitario de Navarra, 27 (2), 201-209.
21. – Serpa, J., Graviss, E., Kass, J. & White, C. (2011). Neurocysticercosis in Houston, Texas: An Update. Medicine Journal, 90 (1), 81-86.
22. - Dayan, A. (2003). Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. Acta Tropica, 86 (2), 141-159.
23. – Romo, M., Carpio, A. & Kelvin, E. (2014). Routine Drug and Food Interactions During Antihelminthic Treatment of Neurocysticercosis: a Reason for the Variable Efficacy of Albendazole and Praziquantel. The Journal of Clinical Pharmacology, 54 (4), 361-367.
24. – Bahmani, M., Rafieian-Kopaei, M., Hassanzadazar, H., Saki, K., Karamati, S. & Delfan, B. (2014). A review on most important herbal and synthetic antihelminthic drugs. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 7 (1), 29-33.
25. – Rodriguez, E. (2013). Parasitología Médica. México. Editorial El Manual Moderno.

26. - Bittencourt, P., García, C., Gorz, A., Mazer, S., Oliveira, T. (1990). High-Dose Praziquantel for Neurocysticercosis: Efficacy and Tolerability. *European Neurology*, 30 (4), 229-234.
27. - Olliaro, P., Delgado-Romero, P., Keiser, J. (2014). The little we know about the pharmacokinetics and pharmacodynamics of praziquantel (racemate and R-enantiomer). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64 (4), 863-870.
28. - Herrera, L., Benítez-Bribiesca, L., Sotelo, J., Ostrosky-Wegman, P. (2000). La quimioterapia de la cisticercosis. Revisión acerca de su farmacocinética y toxicología. *Gaceta Médica de México*, 136 (5), 477-490.
29. - García, H., Lescano, A., Gonzáles, I., Bustos, J., Petrell, J., Horton, J., Saavedra, H., Gonzalez, A., Gilman, R. (2016). Cysticidal Efficacy of Combined Treatment with Praziquantel and Albendazole for Parenchymal Brain Cysticercosis. *Clinical Infectious Diseases*, 62 (11), 1375-1379.
30. – Chai, J. (2013). Praziquantel Treatment in Trematode and Cestode Infection: An Update. *Korean Medical Journal*, 45 (1), 32-43.
31. - Kogien, M., Teixeira, C. (2011). Mebendazol no tratamento de helmintíases intestinais – revisão de literatura e considerações de Enfermagem. *Enfermería Global*, 15 (24), 233-245.
32. – Bai, R., Staedtke, V., Wanjiku, T., Rudek, M., Joshi, A., Gallia, G. & Riggins, G. (2015). Brain Penetration and Efficacy of Different Mebendazole Polimorphs in a Mouse Brain Tumor Model. *Clinical Cancer Research*, 21 (15), 3462-3470.
33. – Pawluk, S., Wilby, K. & Ensom, M. (2015). A Review of Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions with the Anthelmintic Medications Albendazole and Mebendazole. *Clinical Pharmacokinetics*, 15 (2).
34. - Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J. C., Moro, M. A., Portolés, A. (2009). *Farmacología Básica y Clínica* (18). Madrid: Editorial Médica Panamericana.
35. - Mahanty, S., Madrid, E. & Nash, T. (2013). Quantitative Screening for Anticestode Drugs Based on Changes in Baseline Enzyme Secretion by *Taenia crassiceps*. *American Society for Microbiologist*, 57 (2), 990-995.
36. – Vinaud, M., Ferreira, C., Junior, R. & Barreto, J. (2008). *Taenia crassiceps*: Energetic and respiratory metabolism from cysticerci exposed to praziquantel and albendazole *in vitro*. *Experimental Pathology*, 120 (1), 221-226.
37. – Mahanty, S., Paredes, A., Marzal, M., González, E., Rodriguez, S., Dorny, P., Guerra-Giraldez, C., García, H. & Nash, T. (2011). Sensitive *In Vitro* System to Assess Morphological and Biochemical Effects of Praziquantel and Albendazole on *Taenia solium* Cyst. *American Society for Microbiologist*, 55 (1), 211-217.

38. – Stadelman, B., Scholl, S., Müller, J. & Hemphill, A. (2010). Application of an *in vitro* drug screening assay based on the released of phosphoglucose isomerase to determine the structure-activity relationship of thiazolides against *Ecchinococcus multilocularis* metacestodes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65 (1), 512-519.
39. – Salto, E., Juárez, E., Roiz, M. & Abad, J. (1991). [Combined chemotherapy (mebendazole plus praziquantel) in patients with hydatidosis]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 9 (9), 527-529.
40. – Nmawanje, H., Kabatereine, N. & Olsen, A. (2011). The acceptability and safety of praziquantel alone and in combination with mebendazole in the treatment of *Schistosoma mansoni* and soil-transmitted helminthiasis in children aged 1-4 years in Uganda. *British Society for Parasitology*, 138 (12), 1586-1592.