



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO
CAMPUS CHAPULTEPEC

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
INCORPORADA A LA UNAM

**Evaluación de la actividad biológica “*in vitro*” de
compuestos híbridos del bencimidazol y del nitrotiazol
contra la fase sistémica (Larva Muscular) de *Trichinella
spiralis* mediante la técnica del MTT**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

ALEJANDRO NAVA MARTÍNEZ

DIR. DE TESIS: Q.F.B. GERARDO GARCÍA CAMACHO.
Dra. LILIAN YÉPEZ MULIA.

MÉXICO, D.F. 2007



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.

AGRADECIMIENTOS:

Primeramente quisiera agradecer a Dios, el de la sabiduría de arriba, por haberme concedido el milagro de la vida y de todo lo bueno que de ella he obtenido gracias a su bondad inmerecida, y de lo malo, por darme el ánimo para continuar adelante y no decaer.

Agradezco de manera muy especial al **CONACyT**, que por medio del proyecto **V-43629** me brindó una beca la cual me fue de gran apoyo durante la elaboración de esta tesis. Muchas gracias por el apoyo que nos brindan a los estudiantes y por creer y confiar en nosotros.

Hay tantas personas a quienes debo el haber llegado hasta donde ahora estoy, que necesitaría más espacio para expresar el agradecimiento que siento por todos ellos y ellas, sin embargo mencionaré a algunas personas, que has sido clave en mi vida y en micarrera, y a las que no mencione, de igual manera agradezco infinitamente.

Para comenzar, quiero decirte **Mamá** que estoy y estaré siempre muy agradecido contigo porque me trajiste al mundo y me has enseñado a valorar las cosas que realmente sirven para poder andar en este mundo; te has empeñado a hacer de mi un hombre de bien, y aunque no pudiste darme a mi y a mis hermanos lo que hubieras querido para nosotros en sentido económico, nos diste algo más importante y mucho más valioso que el dinero mismo: **educación y el deseo de superación**. Gracias mamita linda por todo y que Dios siempre te provea de lo necesario para que nada te haga falta, y si yo he de ser un instrumento para que Él logre su propósito, será un verdadero honor estar allí.

¡¡Qué orgullo ser tu hijo, Mamá!!

A ti papá, por que nunca permitiste que mis hermanos y yo dejáramos de estudiar, aunque tus métodos hayan sido un poco estrictos, lograste finalmente tu objetivo de convertirnos en las personas que ahora somos tus hijos, gracias por tu apoyo papá.

A todos mis hermanos, que los amo demasiado, y especialmente a ti **mi querido Toño**, que me tendiste la mano en el momento más crítico de mi carrera, apareciste como caído del cielo cuando pensé que no iba a poder terminar mis estudios. Gracias de verdad por tu apoyo económico, pero sobre todo, por tus sabios consejos y tu amor de hermano que no permitió que uno de mis sueños quedara truncado, y por tu afán de hacer de mí una persona mejor. Te quiero mucho y siempre te llevo conmigo, y el sólo pensar en ti cuando tengo problemas me ayuda a darles mejor solución. Gracias de verdad Toñito.

Y como pasarte por alto **mi querida hermana bruja, Betty**, que también pusiste tu granito de arena con lo que pudiste en sentido económico, a pesar de que tú también necesitabas ayuda, antepusiste mis necesidades primero que las tuyas y eso es algo que siempre llevo en mi mente y espero algún día pagártelo con creces. Y algo que espero que nunca pierdas es ese gran sentido del humor, pues muchas personas que te conocemos, con el sólo hecho de verte, alegras el momento y levantas los ánimos. Gracias Betty.

A mi hermana Angélica, Lupita y Elena quiero decirles que las amo y que siempre las llevo en mi corazoncito y, que con su sola presencia hacen feliz a cualquiera. Las amo.

A ti, mi pequeñita hermosa que llegaste en el momento en el que tan solo saber de tu llegada puso fin a las dudas que tenía a cerca de dejar mi carrera a medias; a ti que con tu llegada renovaste nuevamente mis ánimos y deseos de salir adelante; a ti que con sólo una sonrisita alegras el corazón más afligido y a mi me vuelves invencible; a ti mi amor te doy las gracias tan sólo por existir, eres la personita por quien la vida daría sin titubear un segundo, a ti Alana Fernanda, hija mía, te amo con todo mi corazón y espero que Dios me de la sabiduría y perspicacia para darte la mejor educación posible y sacarte adelante y que me permita estar siempre cerca de ti a pesar de quien desee lo contrario.

Doy gracias también a todos los profesores que fueron partícipes en mi formación académica, y en especial quiero agradecer al profesor **Gerardo García Camacho** que, por sus excelentes clases, me animaron a realizar mi trabajo de tesis en el campo de la parasitología, pues es un gran profesor y también ha sido un buen amigo al que siempre le estaré agradecido por las facilidades que brinda como profesor, por hacer sus clases más amenas, sólo por mencionar algunas de sus cualidades.

Al profesor **Javier Araiza Santibáñez** que contagia esa pasión por la micología que, a pesar de ser una materia difícil, la hace ver más sencilla; también por su gran amistad, su buen sentido del humor y gran optimismo que realmente contagia con mucha facilidad, gracias a Dios no tiene hongos en los pies, pues también los contagiaría.

A mi buen profesor **Agustín Palma** por su gran amistad, sencillez y esa gracia tan peculiar que hace que sus clases sean más amenas y sobre todo más digeribles, pues la Química Orgánica a pesar de ser una de las materias más difíciles, él la hace ver más fácil de lo que realmente es.

A los profesores **Eduardo del rey y Adolfo Benjamín Fernández** les agradezco infinitamente por el apoyo brindado durante la elaboración de mi tesis, por las facilidades y el buen ánimo con que me recibían las veces que requerí de su ayuda, de verdad, muchas gracias.

Agradezco de manera muy especial a la **Doctora Lilian Yépez Mulia** quien me brindó la oportunidad de colaborar con ella en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, en la Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, gracias a lo cual fue posible realizar este trabajo de tesis. Le agradezco enormemente por su buena disposición cuando requerí de su guía y apoyo. Muchas gracias Doctora, de corazón.

Agradezco también a Miguel y a su querida novia Claudia, de la UNAM, por haberme enseñado la metodología y proceso para la obtención de resultados reproducibles y confiables. Gracias por su apoyo y amistad también.

A mis estimadas Amparito y Rosy, que siempre estuvieron dispuestas a apoyarme con artículos y demás material que me era necesario para agilizar la investigación, pero sobre todo por su gran amistad y buen humor todo el tiempo. Gracias.

A mi querida amiga y colega Zaira Morón por todas las atenciones y ayuda brindadas durante el momento en que requerí de la ayuda de un verdadero amigo. Gracias Zaira, espero siempre contar con tu amistad y tener la suerte de encontrar amigos como tú.

Y, no menos importante, a ti, mi fiel amiga Jazmín Palma agradezco enormemente tu apoyo, pero sobre todo te doy gracias por tu bonita amistad y porque fuiste la personita que le dio un poco de sabor a la carrera, con tu peculiar sentido del humor y por esa sonrisa que contagia irremediabilmente a cualquiera.

Sé que me falta mencionar a muchas otras personas, pero de la misma manera les agradezco enormemente la confianza y apoyo desinteresado que tuvieron hacia mí. Por todo..... ¡¡mil gracias!!

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: M. en C. Agustín Palma de la Cruz

VOCAL: Q.F.B. Gerardo García Camacho.

SECRETARIO: Q.F.B. Benjamín Adolfo Fernández Fernández.

1er. SUPLENTE: M. en C. Eduardo del Rey Pineda.

2º. SUPLENTE: Q.F.B. Javier Araiza Santibañez.

Sitio donde se desarrolló la investigación:

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias,
Hospital de Pediatría
Centro Médico Nacional S XXI, IMSS.

Q.F.B. Gerardo García Camacho.
Director de Tesis

Alejandro Nava Martínez.
Autoría del Trabajo

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	MARCO TEÓRICO.....	3
2.1	GENERALIDADES.....	3
2.1.1.	TRIQUINOSIS.....	8
2.1.2.	TAXONOMÍA DEL GÉNERO <i>Trichinella</i>	9
2.1.3.	CICLO DE VIDA	11
	a) Fase entérica.....	12
	b) Fase parenteral.....	12
2.1.4.	CUADRO CLÍNICO DE LA TRIQUINOSIS.....	15
2.1.5.	EPIDEMIOLOGÍA.....	17
2.1.6.	TRATAMIENTO.....	18
2.2.	ALBENDAZOL.....	21
2.2.1.	FARMACOCINÉTICA DEL ALBENDAZOL.....	21
2.2.2.	METABOLISMO HEPÁTICO.....	22
2.2.3.	METABOLISMO GASTROINTESTINAL.....	22
2.2.4.	EXCRESIÓN.....	22
2.2.5.	MECANISMO DE ACCIÓN.....	22
	a) Inhibición del metabolismo energético.....	23
	b) Inhibición de la polimerización de la tubulina.....	23
	c) Resistencia a los BZD.....	25
2.3.	NITAZOXANIDA.....	26
2.3.1.	Mecanismo de acción de la NTZ.....	27
2.3.2.	VÍAS DE ADMINISTRACIÓN Y METABOLISMO DE LA NTZ	28
2.3.3.	FARMACOCINETICA DE LA NTZ	28
2.3.4.	TRATAMIENTO.....	30
1.3.5.	INTERACCIÓN MEDICAMENTOSA.....	30
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
4.	OBJETIVOS.....	32
5.	HIPÓTESIS.....	33
6.	MATERIALES Y MÉTODO.....	34
6.1.	EQUIPOS.....	34
6.1.1	REACTIVOS.....	35
6.2.	METODOLOGÍA.....	37
6.2.1.	MANTENIMIENTO DEL CICLO DE VIDA DE <i>T. spiralis</i>	37
6.2.2.	OBTENCIÓN DE LAS LARVAS MUSCULARES DE <i>T. spiralis</i>	37
7.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS HÍBRIDOS VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72 Y VMAS-74 CONTRA LA FASE SISTÉMICA (LM) DE <i>Trichinella spiralis</i>	39

8.	RESULTADOS.....	41
9.	DISCUSIÓN.....	48
10.	CONCLUSIONES.....	53
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	54

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias son un problema que aqueja no solamente a países en vías de desarrollo, sino también a los países desarrollados como Estados Unidos, Francia, Alemania, entre otros; y aunque en estos países se toman medidas higiénicas rigurosas, no quedan exentos de adquirir alguna enfermedad parasitaria.

Las parasitosis son un problema que no es fácil de erradicar, aún en países desarrollados, pues la constante emigración de personas de sus países de origen es un factor predisponente que facilita en gran medida la propagación de dichas enfermedades a nivel mundial.

La quimioterapia es, hasta la fecha, el método más efectivo con que se cuenta para el control de las helmintiasis. Los antihelmínticos más empleados actualmente son los compuestos bencimidazólicos (BZD), los cuales con diferentes sustituyentes en su molécula han proporcionado mejores fármacos para el tratamiento de infecciones helmínticas intra y extraintestinales. Los compuestos bencimidazol-metilcarbamatatos, como lo son el mebendazol (MBZ), albendazol (ABZ), oxfendazol, entre otros, son los compuestos BZD más utilizados, ya que tienen un amplio espectro de acción antiparasitaria. Sin embargo, el sustituyente 2-metilcarbamato de estos compuestos limita su solubilidad y, por ende, presentan una baja absorción a nivel intestinal y una pobre disponibilidad que limita su eficacia contra parásitos sistémicos. Aunado a lo anterior, debido al uso excesivo e indiscriminado de estos fármacos, se ha dado lugar a la aparición de cepas de parásitos helmintos (nematodos) resistentes (Campos, 1990; Wolstenhome *et al.*, 2004).

Otro antiparasitario de uso actual es la nitazoxanida (NTZ), que es un derivado nitrotiazol, con amplio espectro de actividad antiparasitaria. Sin embargo este fármaco, al igual que los BZD, no es 100% efectivo contra parasitosis sistémicas, del tipo de las neurocisticercosis o la triquinosis. Esta limitante pone de manifiesto la necesidad de contar con alternativas en el tratamiento de estas parasitosis.

Con la finalidad de contar con nuevos antihelmínticos que tengan mejores características fisicoquímicas, se requiere llevar a cabo el diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos compuestos. La evaluación de la actividad antihelmíntica de los nuevos compuestos inicialmente se realiza mediante ensayos *in vitro*, a partir de los cuales se seleccionan aquellos compuestos con actividad antiparasitaria, que posteriormente serán evaluados *in vivo* empleando modelos experimentales. Los resultados de actividad de nuevos compuestos pueden alimentar un banco de datos que permitan el modelado molecular a partir del cual se haga la predicción de nuevas estructuras con actividad antihelmíntica, la cual tendrá que ser posteriormente validada. Aunado a esto, con los resultados de la actividad biológica que se obtengan se podrán realizar estudios de estructura-actividad que permitan conocer los requerimientos de las moléculas para tener actividad antihelmíntica.

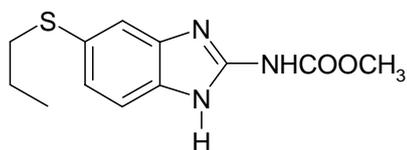
2. MARCO TEORICO

2.1. Generalidades

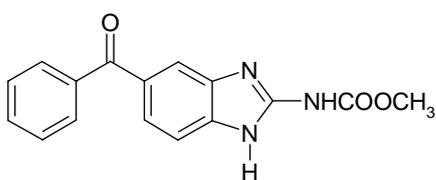
Las infecciones helmínticas son un grave problema de salud pública que afectan tanto a humanos como a animales domésticos. El control de estas parasitosis se realiza mediante el empleo de fármacos y, como consecuencia, éstos comprenden el sector más grande de la industria farmacéutica por volumen y valor. La investigación y desarrollo de antihelmínticos en el campo veterinario tiene, de esta manera, un gran apoyo y es probablemente un área de investigación en donde los esfuerzos y éxito exceden a los realizados en salud humana (Waller, 2003).

Para que un antiparasitario, que previamente haya mostrado efectividad terapéutica, se considere un candidato para ser utilizado en forma periódica en intervenciones poblacionales, necesita demostrar tener un amplio espectro de acción en la erradicación de los parásitos más frecuentes, tener un amplio margen de seguridad, contar con esquemas de fácil administración (dosis única) y tener un adecuado costo-beneficio (Morales-Espinosa *et al*, 2003).

Así, los agentes terapéuticos con los que se cuenta actualmente se incluyen a los derivados bencimidazólicos del tipo del ABZ MBZ, oxfendazol, triclabendazol, entre otros (Fig. 1), las tetrahidropirimidinas (pyrantel y morantel) y prazicuantel. Estos fármacos se usan para el tratamiento de parasitosis intestinales y sistémicas (Cook, 1990; De Silva *et al.*, 1997).



Albendazol



Mebendazol

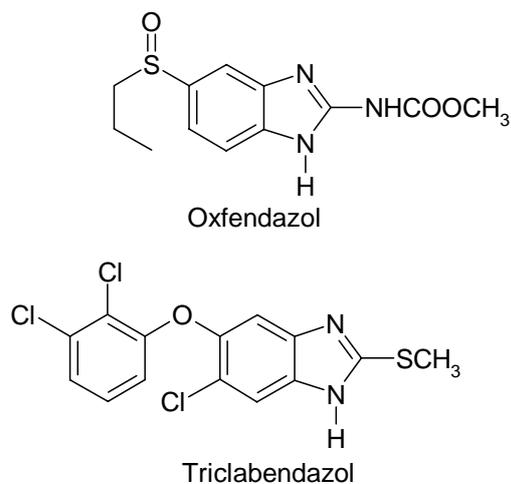


Figura 1. Algunos derivados del bencimidazol con actividad antiparasitaria.

De todos estos, los compuestos bencimidazol-metilcarbamatos son los que principalmente son empleados en el tratamiento de las helmintiasis. Sin embargo, su uso en el tratamiento de las parasitosis sistémicas se ve limitado, ya que debido a su baja solubilidad, alcanzan bajas concentraciones plasmáticas y su eficacia se ve reducida. Aunado a esto, su uso frecuente e indiscriminado en el campo veterinario ha propiciado el desarrollo de resistencia a ellos, debido a que en cada tratamiento sobrevive un porcentaje de parásitos resistentes al efecto de estos compuestos y al cabo de varias desparasitaciones, esta población se vuelve dominante y muestra una verdadera resistencia al antihelmíntico empleado (Kelly y Hall, 1983).

Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de contar con alternativas en el tratamiento de las helmintiasis, por lo que es importante el diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevas moléculas con potencial actividad antiparasitaria.

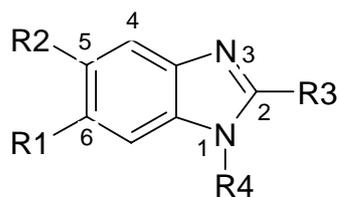
Cabe mencionar que para la evaluación *in vitro* de la actividad antihelmíntica de nuevos compuestos sintetizados se requiere contar con métodos que permitan realizar una selección inicial de los compuestos con potencial antiparasitario para su posterior evaluación *in vivo*.

A este respecto, el método del MTT es un método colorimétrico, que se basa en la reducción de la sal de tetrazolio (3(-4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil

bromuro de tetrazolio) a formazán por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenada, y ha sido muy útil para determinar la sobrevivencia y proliferación celular. La reducción sólo se realiza en células vivas y la cantidad de formazán reducido es proporcional al número de células presentes (Guerra, 2001). Este método aplicado a la evaluación de la actividad antihelmíntica de nuevos compuestos, ha permitido determinar el efecto de éstos en la actividad metabólica de los parásitos (Towson *et al.*, 1989; Navarrete *et al.*, 2001; Valdéz *et al.*, 2002). Por otro lado, el nematodo *T. spiralis* ha sido empleado como modelo de helminto para evaluar la actividad biológica *in vitro* e *in vivo* de nuevos compuestos, ya que el ciclo de vida de este parásito puede ser mantenido en animales de experimentación, e incluye las fases enteral y sistémica, las cuales pueden ser fácilmente obtenidas para su uso en los ensayos de la actividad *in vitro* de nuevos compuestos. Además, debido a su ciclo de vida, este parásito permite evaluar la actividad *in vivo* de los compuestos a estos niveles.

Con el interés de conocer los requerimientos estructurales de una molécula con actividad antihelmíntica, nuestro grupo de investigación ha sintetizado nuevos compuestos derivados BZD, cuya actividad *in vitro* ha sido evaluada contra la larva muscular (LM) de *Trichinella spiralis* (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad *in vitro* de nuevos derivados bencimidazólicos contra la LM de *T. spiralis*.



COMPUESTO	R1	R2	R3	R4	REDUCCION ACTIVIDAD METABOLICA (%)
8 ^a	H	Cl	SCH ₃	CH ₃	24
9 ^a	Cl	H	CH ₃	CH ₃	14
10 ^a	Cl	H	NH ₂	CH ₃	14
11 ^b	Cl	H	SCH ₃	H	15
16 ^a	Cl	Cl	SCH ₃	CH ₃	22
17 ^c	Cl	H	CF ₃	H	NR
19 ^c	H	H	CF ₃	H	12
20 ^c	Cl	H	CF ₃	CH ₃	39
ABZ					22

a) Sánchez-Díaz, 1999; b) Valdéz *et al.*, 2002; c) Navarrete *et al.*, 2001.

Los resultados obtenidos de la actividad de los nuevos compuestos bencimidazólicos contra *T. spiralis*, muestran que los compuestos 8, 16 y 20 fueron más activos que el ABZ a la misma concentración (1µg/mL). En el análisis de la estructura-actividad resulta que los sustituyentes CF₃ y SCH₃ en la posición 2, así como el CH₃ en posición 1 le confieren a la molécula bencimidazólica una mayor actividad antihelmíntica. De manera importante, se demostró en estos estudios que los compuestos 1-metilbencimidazólicos a diferencia de los 1-H-bencimidazoles no inhiben la polimerización de la tubulina.

Dentro de los métodos para la obtención de fármacos mediante modificación molecular, se encuentra el proceso de asociación molecular, el cual se basa en la unión de dos estructuras con actividad determinada, con el fin de potenciarla. La nueva molécula formada incorpora algunas o todas las características de los compuestos originales, cuando la asociación es de partes

distintas o mixtas por formación de enlace covalente, entonces, dicho proceso se denomina hibridación molecular.

Considerando que el ABZ y la NTZ son los fármacos que actualmente se emplean en el tratamiento de las helmintiasis, y los dos tienen mecanismos de acción diferentes, recientemente nuestro grupo de investigación generó compuestos híbridos que tienen los grupos farmacofóricos del ABZ y la NTZ, obteniéndose moléculas híbridas del bencimidazol con el 2-amino-5-nitrotiazol. En estos compuestos híbridos se conservaron los sustituyentes CF_3 y/o SCH_3 en posición 2 y el CH_3 ó H en la posición 1 de la molécula bencimidazólica, que con anterioridad mostraron buena actividad antihelmíntica.

Las moléculas híbridas se presentan en la tabla 2

Tabla 2. Moléculas híbridas sintetizadas.

No. de Compuesto	Clave	R1	R2	R3	R4	Peso Molecular
60	VMAS60	Nitrotia	H	H	CF_3	357.269 g/mol
62	VMAS62	Nitrotia	H	H	SCH_3	334.356 g/mol
72	VMAS72	Nitrotia	H	CH_3	CF_3	371.296 g/mol
74	VMAS74	Nitrotia	H	CH_3	SCH_3	349.390 g/mol

En este trabajo de tesis se evaluó la actividad antihelmíntica *in vitro* de estas moléculas híbridas empleando como modelo de helminto la LM de *T. spiralis*. La evaluación se realizó mediante el método colorimétrico del MTT.

2.1.1. TRIQUINOSIS

Dentro de las helmintiasis se encuentra la triquinosis, enfermedad causada por el nematodo del género *Trichinella*, que aunque no se encuentra dentro de las helmintiasis más comunes, es de importancia ya que esta parasitosis tiene una distribución mundial y no hay una población específica ni condición social a la cual infecte con mayor frecuencia, así lo demuestran los

brotos que se han presentado en países de primer mundo como Francia, Alemania, Italia y Estados Unidos entre otros (Murrell y Pozio, 2000).

Hay que tener presente que esta parasitosis no se adquiere por malos hábitos higiénicos de los consumidores, sino por las malas condiciones sanitarias en la crianza de los cerdos, que son la principal fuente de infección.

En México esta parasitosis ocupaba en 1990 el quinto lugar en cuanto a morbilidad (Alcántara *et al.*, 1992). La ausencia de reportes oficiales de triquinosis humana en nuestro país, puede no estar reflejando la situación real en áreas endémicas, ya que no es estrictamente obligatorio reportar la existencia de casos de triquinosis a las autoridades sanitarias (Ortega-Pierres *et al.*, 2000).

Este parásito fue identificado por primera vez en 1835 por Paget y Owen. La larva fue observada bajo el microscopio en un fragmento del diafragma infectado obtenido de un albañil de 51 años de edad quien murió de tuberculosis. (Capo *et al.*, 1996). La designación del nombre corresponde a Owen, 1835, y fue identificado en México como *T. spiralis* por Toussaint en 1893.

Desde el momento de su descubrimiento, hasta 1990, era común asumir que todas las triquinosis eran causadas por una misma especie, *T. spiralis*. Sin embargo actualmente se tiene conocimiento de la existencia de al menos 7 especies de trichinella.

Las infecciones por las diferentes especies de *Trichinella* están ampliamente distribuidas por todo el mundo, incluyendo el Ártico, climas templados y zonas tropicales. Prácticamente todos los mamíferos son susceptibles a infectarse por una o más especies de este parásito; aunque los humanos parecen ser especialmente propensos a desarrollar enfermedad clínica (Bruschi y Murrell, 2002).

2.1.2. Taxonomía del Género *Trichinella*

El género *Trichinella*, que está conformado por parásitos helmintos, infecta a un amplio número de especies animales tanto a carnívoros como a herbívoros, incluyendo al ser humano. La clasificación taxonómica de este parásito es la siguiente:

Reino:	Animal
Superphylum:	Aschelminthes
Phylum:	Nematoda
Clase:	Adenoforea
Orden:	Enoplida
Familia:	Trichinellidae
Género:	Trichinella

Clasificación taxonómica de *Trichinella* (Beaver, 1986).

En función de la comparación de patrones isoenzimáticos, secuencias de DNA repetitivo y algunas características biológicas que incluyen: número de larvas recién nacidas por hembra, tiempo de formación de la célula nodriza, índice de capacidad reproductiva en ratones y/o pollos y resistencia de la larva muscular a la congelación; diferentes aislados de *Trichinella* han sido clasificados en 7 especies y 3 genotipos como se muestra en la tabla 3 (Murrell y Pazio, 2000). Todas estas especies tienen la capacidad de infectar al ser humano, aunque la mayoría de los casos de triquinosis en humanos son causados por *T. spiralis*.

Tabla 3. Especies, genotipos y distribución geográfica de *Trichinella* (Murrell y Pozio, 2000)

Especies Y genotipos	Distribución geográfica
<i>T. spiralis</i>	Cosmopolita

<i>T. nativa</i>	Regiones árticas y subárticas
<i>T. britovi</i>	Áreas templadas de la región paleártica
<i>T. murrelli</i>	Estados Unidos
<i>T. nelson</i>	África del sur
<i>T. pseudospiralis</i>	Cosmopolita
<i>T. papuae</i>	Papua Nueva Guinea
<i>Trichinella</i> T6	Sur de Canadá, Norte de E.U.
<i>Trichinella</i> T8	Sur de África y Namibia
<i>Trichinella</i> T9	Japón

2.1.3. Ciclo de Vida

La ingestión de carne cruda infectada por este parásito constituye el mecanismo de transmisión de la triquinosis.

El ciclo de vida de este parásito (Fig. 2) presenta dos fases: una fase entérica, donde el parásito pasa por cuatro estadios larvarios y el adulto; y la fase parenteral, que incluye la larva recién nacida (LRN) y la larva muscular (LM).

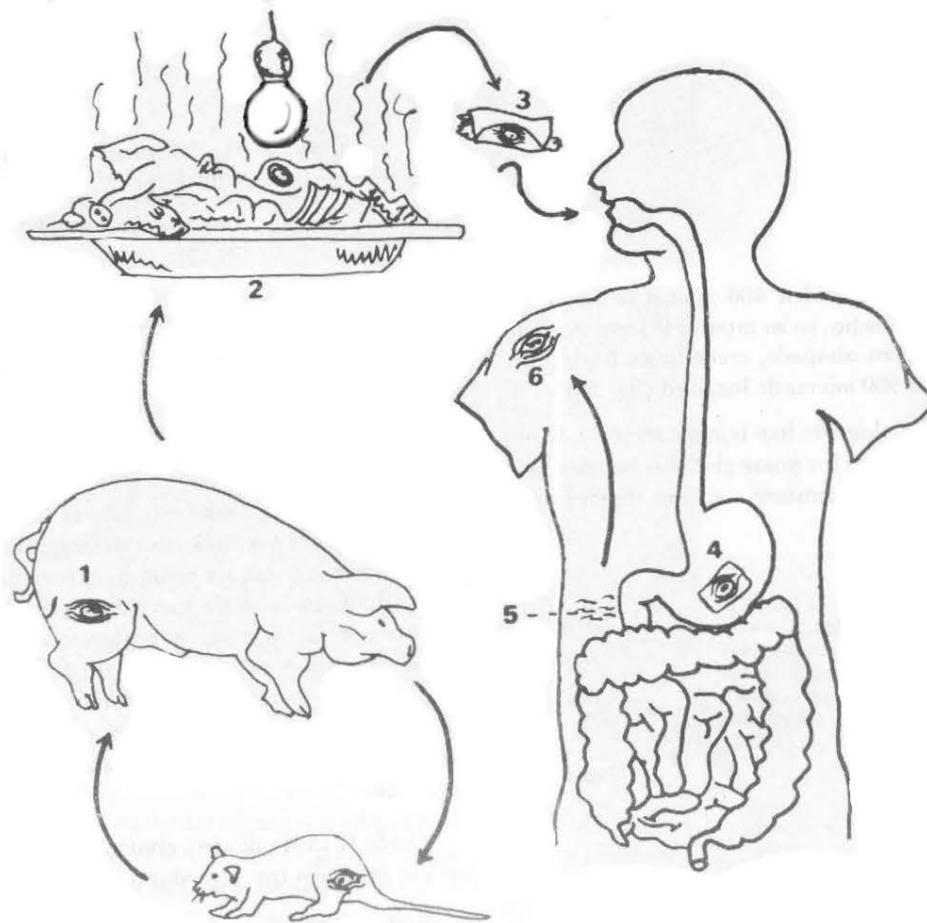


Figura 2. Ciclo biológico de *T. spiralis*. (Tay-Lara, 1993)

a) Fase Entérica

Durante la fase entérica, el hospedero potencial adquiere la triquinosis al ingerir carne de cerdo, caballo, animales silvestres, infectada con la LM enquistada. En el estómago las larvas son liberadas migrando e invadiendo el epitelio columnar y la lámina propia del intestino delgado, principalmente en duodeno (Sukhdeo, 1991).

Treinta horas después de la infección, la LM pasa por cuatro mudas que se llevan a cabo durante este tiempo y sufre una morfogénesis extensa hasta desarrollar al estado adulto en donde ya existe diferenciación de sexos. La cópula se efectúa presumiblemente entre las 37-40 h posteriores a la infección; después de ella, los machos mueren y son expulsados; las hembras aumentan de tamaño penetrando más profundamente la mucosa intestinal. La

embriogénesis dura alrededor de 90 h., ya que LRN en el caso de *T. spiralis*, son liberadas hasta el quinto día después de la infección.

b) Fase Parenteral

Durante la fase parenteral, LRN se introducen en la lámina propia del intestino y entran a la circulación arterial vía conducto torácico, pasan por el corazón y los pulmones hasta llegar a invadir células del músculo esquelético y desarrollándose a LM. Los músculos que principalmente invade son diafragma, laringe, lengua, intercostales, bíceps y pectorales. La larva induce en la célula muscular cambios que culminan en una nueva unidad hospedera llamada célula nodriza (Fig. 3).



Figura 3. Célula nodriza aislada.

Tomada de http://www.trichinella.org/bio_nursecell.htm

El término célula nodriza es usado debido a que dicha célula funciona como una placenta, ayudando al parásito a obtener nutrientes y eliminar desechos. Cada célula nodriza tiene un plexo de vénulas, que ayudan al transporte de dichas sustancias (Fig. 4).

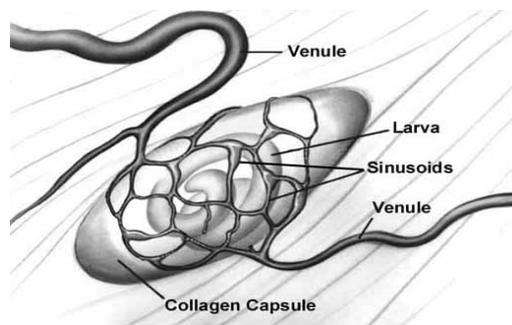


Figura 4. Célula nodriza rodeada por plexos de vénulas.

Tomada de http://www.trichinella.org/bio_nursecell.htm

La transformación de la célula muscular a célula nodriza involucra la reubicación de todos los componentes musculares específicos con espirales de membranas lisas y agregados de mitocondrias parcialmente disfuncionales, formación de varios núcleos, hipertrofia del glicocálix en un revestimiento externo de colágena y angiogénesis (Despommier, 1998). La transformación de célula muscular a célula nodriza-parásito se completa en veinte días (Fig. 5), desde el momento de entrada del nematodo al interior de la célula muscular (Despommier, *et al.*, 1975). Esta unidad infecciosa puede sobrevivir en algún huésped animal por toda la vida (ej. ratones o ratas). En otros como los humanos, eventualmente se llega a calcificar y en ese momento muere la célula y el parásito.

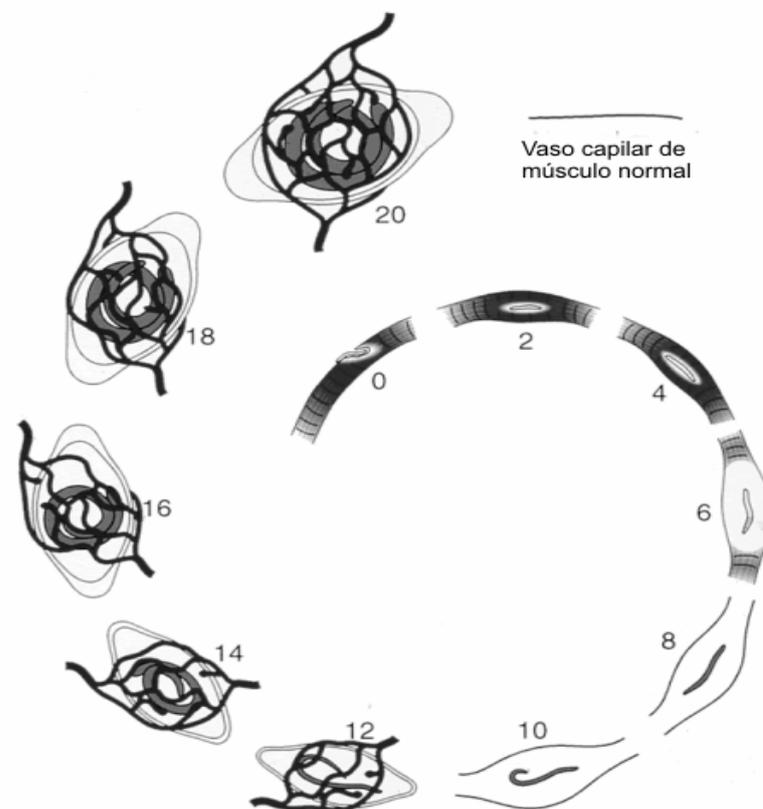


Figura 5. Angiogénesis en la célula nodriza

Tomada de http://www.trichinella.org/bio_nursecell.htm

Cuando el hospedero animal muere, la LM se mantiene en estado infeccioso que va desde algunos días hasta semanas más tarde e incluso por meses en el caso del ciclo ártico (Dick y Chadee, 1981).

El complejo LM-célula nodriza puede permanecer estable durante toda la vida del hospedero y no calcificarse; sin embargo, este proceso puede ocurrir a

partir de diferentes tiempos de la infección, dependiendo de la especie del hospedero. El ciclo se inicia nuevamente cuando la LM es transmitida a través del consumo de carne a otro hospedero de la misma especie o de otra diferente.

2.1.4. Cuadro Clínico de la Triquinosis

Las manifestaciones clínicas son sumamente variadas y se asemejan al de una intoxicación alimenticia aguda; el paciente presenta náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal tipo cólico localizado en mesogastrio, cefalea, diaforesis y postración general (Tay *et al.*, 1993). Una de las principales causas de esta variabilidad es el hecho de que el cuadro clínico que presenta el paciente es dependiente de la carga parasitaria con que se infecta (Yépez y Ortega, 1994).

Las infecciones leves suelen ser asintomáticas o cursar con datos inespecíficos. Es útil recordar que casi siempre existe el antecedente de ingesta de carne de cerdo, moronga, y embutidos (chorizo, longaniza).

Una de las manifestaciones más graves de la triquinosis es la miocarditis, que no es provocada por la invasión directa de la larva en el músculo cardíaco, sino por la respuesta inmune inflamatoria que provoca la larva recién nacida durante su transporte a través del torrente sanguíneo. La muerte por esta causa suele presentarse entre la cuarta y octava semanas de evolución de la enfermedad, en esta fase el paciente puede sufrir encefalitis y meningitis (Yépez y Ortega 1994).

En la Tabla 4 se presentan algunos signos clínicos relacionados con la fase de desarrollo del parásito. Tales signos clínicos están sujetos a muchas modificaciones en el comienzo y evolución de la enfermedad (Beaver, 1986).

Tabla 4. Fases biológicas de *T. spiralis* y cuadros clínicos correspondientes (Beaver *et al.*, 1986).

Fase biológica	Comienzo	Cuadros clínicos
Las larvas ingeridas se des-enquistan y penetran en el epitelio intestinal.	2-4 horas	Síntomas gastrointestinales (dolor abdominal, náuseas, diarrea, espasmos abdominales y vómito).
Los gusanos copulan y maduran.	30 horas	
Las hembras depositan las larvas recién nacidas que invaden músculo esquelético.	6 días	Edema de cara y fiebre
Invasión máxima de la fibra muscular.	7 días 10 días	Fiebre máxima (40-41°C)
Disminución de la larviposición.	11 días 14 días	Miositis y dolores "reumáticos" Eosinofilia y anticuerpos circulantes.
Larvas en los músculos totalmente diferenciadas.	17 días	
Encapsulación precoz.	20 días 21 días	Eosinofilia en su máximo. Miocarditis o encefalitis.
Intestinos prácticamente libres de formas adultas.	23 días	
Encapsulación prácticamente completa.	26 días	Síntomas respiratorios.
Vida máxima de los gusanos en el intestino.	1 mes 2 meses	Desaparece la fiebre.
	3 meses	Gran probabilidad de muerte por miocarditis o encefalitis.
Puede empezar la calcificación de la célula nodriza	6 meses	Convalecencia lenta.
	8 meses	Desaparecen los síntomas neurológicos y la miocarditis.
La calcificación de la célula nodriza puede ser completa.	1 año	
Las larvas pueden seguir siendo viables dentro de las cápsulas calcificadas.	6 años.	

2.1.5. Epidemiología

La característica más sobresaliente en la epidemiología de este parásito es la obligatoria transmisión a través de la ingesta de carne infectada. Una segunda característica cardinal es su existencia en dos sistemas ecológicos separados, el selvático y el doméstico (Pozio, 2000).

El género *Trichinella* está ampliamente distribuido alrededor del mundo, en un gran número de animales carnívoros (ej. zorro, jabalí, oso polar, mapache, etc.), humanos y hospederos incidentales (Yépez y Ortega, 1994).

La principal fuente de contagio en humanos es el consumo de carne porcina o equina de animales infectados con *T. spiralis*. Estos animales se infectan ya sea por consumo de desechos de comida infectados con la LM del parásito, por la ingesta de ratas infectadas e inclusive por la mordedura entre ellos mismos (Alcántara *et al.*, 1992).

En México, los primeros reportes de triquinosis en humanos fueron hechos por Olvera en 1896, estudiando 12 cadáveres en los que no fue diagnosticada la enfermedad (Ortega-Pierres *et al.*, 2000).

Entre 1952-1997, aproximadamente 758 casos de triquinosis humana fueron reportados oficialmente en México, en la mayoría de los casos, las epidemias ocurrieron por el consumo de carne porcina mal cocinada. La única manera en que el parásito puede introducirse a un huésped es, precisamente por la ingestión de carne infectada por dicho parásito y parcialmente cocida (Capó y Despommier, 1996). Los principales estados en que ocurrieron epidemias documentadas oficialmente son: Zacatecas, el Estado de México, Durango, Sonora, Chihuahua, Jalisco, Michoacán y en Distrito Federal.

A pesar de que la triquinosis en México ha sido poco estudiada, en estudios epidemiológicos obtenidos por histopatologías post mortem de diafragmas humanos, se han observado frecuencias que varían del 4 al 15%. Para el decenio de 1976 a 1985, se registraron brotes en Zacatecas, Durango, Estado de México, Guanajuato y Ciudad de México. En Chihuahua se registró el brote epidemiológico más grande de triquinosis con 166 casos, de los cuales 59 correspondían a casos hospitalizados; en este brote, la causa de la

infección fue la carne de cerdo que se presentó y consumió en forma de chorizo, a pesar de que las piezas anatómicas de los animales infectados presentaban los sellos de revisión sanitaria (Martínez-Barbabosa *et al.*, 2001)

La infección por *T. spiralis* en cerdos, ratones, caballos, gatos y perros ha sido reportada en algunos estados de la República Mexicana. (Ortega-Pierres *et al.*, 2000).

En el periodo correspondiente entre 1991-1995, en Europa fueron oficialmente reportados 282 casos en humanos en 7 epidemias diferentes (Murrell y Pozio, 2000). El número de pacientes que fallecieron fue muy bajo en comparación con el número de individuos que mostraron síntomas clínicos de la enfermedad.

Tomando en consideración los pobres estándares higiénicos en cuanto a la obtención, manejo, procesamiento y distribución de los productos derivados de carne tanto porcina como equina que se practican en México, es muy probable que se agudice este problema en los próximos años. Sin embargo, actualmente no se cuenta con registros oficiales de brotes y/o casos de triquinosis.

2.1.6. Tratamiento

Los principales fármacos que han sido utilizados en el tratamiento de la infección causada por el nematodo *T. spiralis* son en su mayoría derivados bencimidazólicos (Cook , 1990).

El primer fármaco utilizado para erradicar la triquinosis a nivel intestinal con resultados alentadores fue el tiabendazol (TBZ), sintetizado por los laboratorios Merck Sharp y Dohme a mediados de 1960 (Sharma y Anand, 1997; Cook , 1990). Desafortunadamente este BZD provocaba reacciones colaterales indeseables, entre ellas, anorexia, vértigo, diarrea, hipoglucemia, bradicardia e hipotensión. Además, el hecho de que el TBZ tiene descubiertas las posiciones 5 y 6 del anillo bencimidazólico, incrementa su metabolismo de primer paso, razón por la cual su tiempo de vida media era de 11 minutos en ratas. Por tales motivos, el TBZ tuvo un uso limitado (Sharma y Anand, 1997).

Con la introducción de este fármaco se inició una nueva generación de antiparasitarios, lo cual estimuló la investigación y síntesis en varias partes del mundo de diferentes compuestos derivados bencimidazólicos, hasta que los laboratorios Janssen lanzaron al mercado el mebendazol (MBZ), un nuevo fármaco ampliamente usado y que tuvo un enorme impacto en el tratamiento de infecciones intestinales causadas por helmintos (Cook, 1990). Sin embargo, indudablemente con el descubrimiento del albendazol (ABZ) en 1979 por los laboratorios Smith-Kline-French, se encontró al más efectivo agente antihelmíntico, de mayor espectro de acción y sobre todo, que combate con mayor eficacia las infecciones sistémicas causadas por helmintos, entre ellos, *T. spiralis* (Horton *et al.*, 1990).

McCracken (1978) demostró en un estudio comparativo de la eficacia del ABZ y MBZ contra *T. spiralis* en ratones, que ésta es directamente proporcional a la dosis administrada, además encontró que el ABZ era más activo que el MBZ contra la fase adulta, mientras que el MBZ fue más activo que el ABZ contra la larva migratoria (a una dosis de 50 mg/kg de peso). Este mismo estudio reveló, que para el tratamiento de la fase enteral es fundamental el momento en que se administra el fármaco; utilizando las mismas dosis pero a diferentes tiempos (2 h y 72 h post-infección respectivamente), la eficacia prácticamente se duplica (100% contra 45-56%) para ambos compuestos.

Posteriormente, McCracken *et al.* (1982) utilizaron diferentes formas de dosificación del MBZ sobre la fase enteral de la triquinosis en ratones y obtuvieron resultados interesantes. Una dosis única de 150 mg/Kg de peso de MBZ administrada al tercer día post-infección o dividida en tres dosis diarias de 50 mg/Kg peso entre los días 3-5 post-infección, redujo la carga parasitaria en un 78% y 62% respectivamente.

De igual forma, cuando se comparó el efecto producido por 15 mg/Kg de peso de MBZ sobre la fase adulta de *T. spiralis* dosificados al tercer día post-infección, administrándose 3 dosis de 5 mg/Kg de peso ó 2 dosis de 7.5 mg/Kg de peso cada 8 horas respectivamente, se observó una eficacia terapéutica del 8% de reducción de la carga parasitaria con el primer método y un 51% con el segundo método.

Con estos estudios se pone de manifiesto la importancia del régimen de dosificación del fármaco.

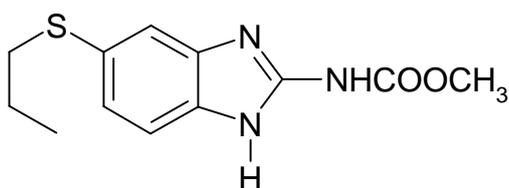
López-García *et al.* (1997) demostraron en ratones la mayor eficacia terapéutica del ABZ (94.7%) sobre su derivado sulfóxido, ricobendazol (65.5%) contra la fase larva muscular de *T. spiralis*.

Grzywinski y Karmanska (1993) mostraron en ratones la eficacia del luxabendazol sobre las diferentes fases de la triquinosis. Administrando una dosis diaria de 20 mg/Kg de peso de dicho fármaco entre los días 5-9 post-infección se obtuvo un 100% de reducción de los parásitos adultos. La misma dosis administrada diariamente entre los días 10-14 post-infección eliminó el 98.9% de las larvas recién nacidas y entre los días 35-39% post-infección redujo 99.9% la cantidad de larvas musculares del parásito.

Actualmente, los fármacos usados para combatir la fase enteral y parenteral de la triquinosis en humanos incluyen al MBZ (5 mg/Kg/día durante 7 días) , así como ABZ en adultos (400 mg/día por tres días) y en niños (5 mg/kg de peso por 4 días) pues es el fármaco de elección por ser menos tóxico, más barato y con una actividad similar a la del MBZ (Cook , 1990; Horton *et al.*, 1990; Capó y Despommier, 1996).

Estos fármacos presentan una buena actividad antihelmíntica frente a nematodos, cestodos y trematodos, gracias a su capacidad para inhibir la polimerización de la tubulina parasitaria durante la mitosis. También presenta un efecto inhibitor del metabolismo energético de los parásitos (Lacey, 1990) y han demostrado ser eficaces contra formas adultas y larvas de nemátodos, céstodos y tremátodos.

2.2. ALBENDAZOL



Albendazol

2.2.1. Farmacocinética del Albendazol

Recientes estudios han demostrado que esta molécula presenta una buena actividad antihelmíntica, pero al igual que los otros BZD, tiene la capacidad de desarrollar trastornos durante el desarrollo embrionario (Cristófol *et al.*, 1997; Delatour *et al.*, 1984). Sin embargo el ABZ es altamente insoluble, lo que influye enormemente en su absorción y, por lo tanto, en el caso de infecciones sistémicas se requieren dosis altas, ya que solo el 5% de ABZ administrado es absorbido a nivel intestinal.

Después de la administración oral, el ABZ es oxidado a albendazol sulfóxido (ABZSO) el cual es su principal metabolito *in vivo*. Parte de la eficacia del ABZ es atribuida a la acción de este metabolito, que presenta una actividad similar al ABZ. La formación de ABZSO está directamente asociado con dos diferentes enzimas del sistema microsomal: citocromo P-450 y Flavin-Monooxigenasa (FMO). Estudios previos de microsomas en intestino e hígado de rata, han demostrado que ambos sistemas están involucrados de manera muy similar (Redondo *et al.*, 1999).

El ABZ, así como otros BZD, posee un elevado grado de unión a las proteínas plasmáticas. Hennessy *et al.* (1989) observaron al administrar ABZ en ovejas, que la unión de sus metabolitos se modificaba con el tiempo postadministración, pudiendo alcanzar niveles desde un 47% en las primeras horas, hasta un 87% de unión pasada las 24 h.

La vida media plasmática del sulfóxido de albendazol es de 8,5 horas. Después de una administración oral única de 400 mg de albendazol tomado en el desayuno, se ha comunicado que el metabolito farmacológicamente activo alcanza concentraciones plasmáticas desde 1,6 a 6,0 mmol/L. El efecto farmacológico sistémico de albendazol aumenta si la dosis se administra con una comida rica en grasas, que aumenta aproximadamente 5 veces la absorción.

2.2.2. Metabolismo hepático

Varios estudios han demostrado que el ABZ es metabolizado a ABZSO en un proceso de sulfoxidación en el que participan las enzimas oxidativas microsomales NADPH dependientes del sistema Cit. P450. Esto fue observado

en microsomas hepáticos de terneras (Lanusse *et al.*, 1993b), ovejas (Galtier *et al.*, 1986), ratas (Solana *et al.*, 2000) y humanos (Rawden *et al.*, 2000).

2.2.3. Metabolismo gastrointestinal

A nivel intestinal también se ha podido observar el metabolismo del ABZ a ABZSO en los microsomas de enterocitos, con la participación de las enzimas FMO y del citocromo P-450 (Cit. P-450). En ratas se observó que el ABZ era captado por los enterocitos y era metabolizado a ABZSO (Villaverde *et al.*, 1995).

2.2.4. Excreción

La excreción de ABZ y sus metabolitos se lleva a cabo principalmente por vía renal y en menor grado por vía biliar. Por lo general, de los metabolitos resultantes, los más polares se excretan por vía renal (en rumiantes en una proporción del 60%) y los menos polares se excretan como conjugados en forma de sulfato o glucoronoconjugados por vía renal y biliar (Gyurik *et al.*, 1981).

2.2.5. Mecanismo de acción

El ABZ, ABZSO, así como otros BZD, actúan sobre los parásitos a través de dos mecanismos: inhibiendo el metabolismo energético del parásito e inhibiendo la polimerización de la tubulina de los microtúbulos de los parásitos (Lacey, 1988; 1990).

a) Inhibición del metabolismo energético

Los BZD inhiben el metabolismo energético de los parásitos gracias a la capacidad de actuar sobre los sistemas enzimáticos y sobre la captación de sus fuentes energéticas. Esta interferencia provoca una disminución en la disponibilidad de la energía necesaria para el funcionamiento normal de los órganos vitales de los parásitos, lo cual conduce a un agotamiento de sus fuentes energéticas y provoca su muerte.

Diferentes estudios han demostrado la acción de estos fármacos sobre ciertas enzimas parasitarias tales como la enzima fumarato reductasa (Criado-Fornelio *et al.*, 1990), la malatodeshidrogenasa (Tejada *et al.*, 1987), la succinato deshidrogenasa (Bokzon, 1976) y sobre las enzimas del ciclo fosfoenolpiruvato (Rahman y Bryant, 1977). También se ha observado que los BZD disminuyen la captación de la glucosa por parte del parásito (Criado-Fornelio *et al.*, 1990). La interferencia en el metabolismo energético de los parásitos también fue observada al incubar *Echinococcus granulosus* en presencia de ABZSO, el cual causaba una disminución de las reservas de glucógeno del parásito (Pérez-Serrano *et al.*, 1994).

b) Inhibición de la polimerización de la tubulina

Los microtúbulos son estructuras cilíndricas localizadas en células eucarióticas las cuales participan en diversos procesos celulares, incluyendo la mitosis, movimiento de cilios y flagelos así como transporte intracelular de vesículas y organelos y, en adición, son el componente más común del citoesqueleto, jugando un importante papel en la determinación de la morfología celular. Los microtúbulos flagelares y microtúbulos de otras fuentes consisten principalmente en las dos mismas proteínas, las cuales son similares en todos los microtúbulos y fueron designados α y β -tubulina. Ellos forman un dímero que es la principal estructura del microtúbulo (Campanati *et al.*, 2003).

Por muchos años se creyó que la tubulina α y β eran los únicos miembros de la familia de la tubulina hasta que se descubrió la γ -tubulina (Oakley y Oakley, 1989). Ciertamente parece ser que se encuentra en todos los eucariotas, aunque las familias de la γ -tubulina son más pequeñas que las familias de las α y β -tubulina. γ -tubulina está asociado usualmente con los centríolos organización- microtúbulos y con el proceso de mitosis. δ - ϵ y ζ -tubulina son otros miembros de la superfamilia de la tubulina cuyas funciones aún no están completamente comprendidas ya que recientemente fueron descubiertas (Oakley, 2000).

En la actualidad se sabe que los BZD se unen de forma irreversible a la subunidad- β de la tubulina, lo cual trae como resultado que no se puedan ensamblar más subunidades y que no se lleve a cabo la polimerización con la

subunidad- α , lo cual evita la formación de los microtúbulos, indispensables para el transporte y desecho de nutrientes en el parásito (Kwa *et al.*, 1993; Lacey, 1988).

El ABZ, así como otros BZD metilcarbamatos presentan una gran afinidad por la tubulina de las células de los parásitos, inhibiendo de esta forma la polimerización de la misma. Su unión a la tubulina durante el crecimiento de los microtúbulos provoca la inhibición de la mitosis (Lacey, 1990). La inhibición de la polimerización de la tubulina puede provocar una desaparición de los microtúbulos citoplasmáticos de los parásitos, provocando una interrupción de la migración de los orgánulos intracelulares, bloqueando de esta manera el transporte de los orgánulos secretores. En estudios realizados *in vitro* se ha observado que diferentes BZD (mebendazol, fenbendazol, oxibendazol, luxabendazol y albendazol) inhibían eficazmente la unión colchicina-tubulina en la fracción citosólica de *T. spiralis*, indicando que estas subunidades presentan afinidad por el mismo locus de unión de la colchicina a la tubulina (Criado-Fornelio *et al.*, 1990; Jiménez-González *et al.*, 1991). En incubaciones de tubulina de protoescoléx de *Echinococcus granulosus* en presencia de ABZ y ABZSO por separado o combinados se han observado alteraciones inmunohistoquímicas de dicha proteína (Pérez-Serrano *et al.*, 1995). Aunque en estudios realizados por Pérez-Serrano y cols. (1994) se observó que las mayores alteraciones a nivel estructural en protoescoléx ocurrían al incubar conjuntamente al ABZ y ABZSO, esto pone en evidencia que ambas moléculas producen un sinergismo al actuar conjuntamente. Aunque tanto el ABZ como el ABZSO inhiben la polimerización de la tubulina evitando el desarrollo del parásito, el ABZ es el que presenta mayor actividad antiparasitaria (Lacey *et al.*, 1987; Lubega y Prichard, 1991). La diferencia de actividad entre el ABZ y el ABZSO puede ser debida a que el ABZ presenta mayor afinidad por la tubulina de los parásitos en comparación con el ABZSO, aunque hay que tener en cuenta que las características lipofílicas de los fármacos afectan directamente su capacidad de penetración al interior de los parásitos a través de sus membranas y, en este caso el ABZ es más liposoluble que el ABZSO.

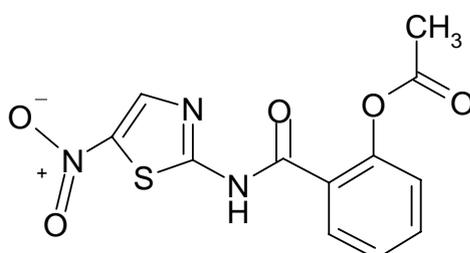
Estos fármacos también presentan afinidad por la tubulina de los mamíferos (Lacey *et al.*, 1987). Aunque la afinidad por la tubulina de los parásitos se haya encontrado superior a la de la tubulina de los mamíferos, es

a este mecanismo de acción al que se le atribuye el efecto teratogénico de los BZD. Por su mecanismo de acción que implica una perturbación de la estructura y de la función microtubular durante la división mitótica, se espera un desarrollo de anomalías embrionarias y fetales cuando se administra ABZSO a hembras gestantes, ya que en estas fases existe gran cantidad de divisiones mitóticas y migraciones celulares en las que interviene la tubulina como factor principal.

c) Resistencia a los BZD

En México, se notificó la presencia de una población de *Haemonchus contortus* resistente a los BZD (Campos, 1990). En 1992, en borregos se identificaron tres poblaciones más resistentes al ABZ, febendazol, oxfendazol y febantel (Campos *et al.*, 1992). El uso frecuente de estos fármacos es lo que ha propiciado el desarrollo de resistencia a ellos. Por esta razón, es de gran importancia iniciar una búsqueda de nuevas opciones alternas de quimioprevención poblacional usando fármacos que demuestren tener un amplio espectro de efectividad, fácil vía de administración, buen perfil de bioseguridad y que, además, el análisis costo-beneficio justifique su uso en el ámbito poblacional (Petri, 2003).

2.3. Nitazoxanida



La nitazoxanida (NTZ), 2-acetiloxi-N-(5-nitro-2-tiazol) benzamida, es un nuevo compuesto derivado nitrotiazol utilizado en el tratamiento de infecciones parasitarias producidas por protozoarios y helmintos.

La NTZ fue descrita por primera vez en 1975 por Jean Francois Rossignol en el Instituto Pasteur en Francia y fue inicialmente desarrollada para su uso como antihelmíntico a nivel veterinario con una muy buena actividad contra nemátodos intestinales, céstodos y tremátodos hepáticos. En humanos, se ha reportado que la NTZ tiene actividad contra un amplio rango de parásitos, incluyendo *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Taenia saginata*, *Himenolepis nana*, y *Fasciola hepatica* (Rossignol-Maisonneuve, 1984; Rossignol *et al.*, 1984; Rossignol *et al.*, 1998). En estudios *in vitro*, incluso se ha demostrado que NTZ tiene también actividad antibacteriana contra numerosas bacterias Gram positivos y bacterias anaerobias Gram negativas que afectan tanto a animales como a humanos (Fox y Saravolatz, 2005). Sin embargo, estudios clínicos en humanos han confirmado la efectividad de la NTZ, así como en estudios *in vitro* e *in vivo* con diversos animales dando como resultado un amplio espectro de actividad con tan solo una toma. En humanos la alta eficacia incluye protozoarios flagelados y ciliados, protozoarios coccidios como lo son *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*, microsporidios como lo son *Septata intestinales* y *Vittaforma cornae*, y las amibas. (Dubreuil *et al.*, 1996).

2.3.1. Mecanismo de acción de la NTZ

En protozoarios y bacterias anaerobias se ha demostrado que la NTZ inhibe la enzima piruvato-ferrodoxin oxidoreductasa (PFOR), la cual es una enzima esencial en el metabolismo energético anaerobio. La interferencia con la PFOR enzima-dependiente de la reacción de transferencia de electrones puede no ser la única ruta por la cual la NTZ demuestra actividad antiprotozoaria, y el mecanismo de la actividad de la NTZ contra helmintos es desconocida (Fox y Saravolatz, 2005).

En ensayos *in vitro*, la NTZ ha mostrado actividad contra *C. parvum* inhibiendo el crecimiento de los esporozoitos. También se ha demostrado actividad *in vitro* combinado con azitromicina y rifampicina, suprimiendo el crecimiento de *C. parvum* en un 83.9% y 79.8% respectivamente, comparado con 56.1% cuando se usa sola. Del mismo modo, en estudios *in vitro* de la NTZ y su derivado Tizoxanida (TZD) han manifestado mayor eficacia que el

metronidazol contra *G. intestinalis*. Específicamente, TZD ha demostrado ser 8 veces más activo que el metronidazol contra cepas susceptibles de *G. intestinalis* al metronidazol y dos veces más activo contra cepas resistentes (Fox y Saravolatz, 2005).

En otros ensayos realizados *in vitro*, la NTZ (100 µM) mostró una actividad muy baja contra *C. elegans* y no tuvo efecto alguno sobre la fase embrionaria en los huevos de *H. polygyrus*, además en ratones, la NTZ a una concentración de 1 g/kg demostró ser inactivo contra los preadultos de *T. spiralis* mientras que el MBZ a una concentración de 10 mg/kg redujo la carga de las larvas por arriba del 83% (Fonseca-Salamanca *et al.*, 2003).

2.3.2. Vías de Administración y Metabolismo de la NTZ

NTZ está disponible en suspensión oral a dosis de 100 mg por 5 mL o en formulación de tabletas a dosis de 500 mg. La suspensión oral al ser reconstituida con agua toma un color rosa con sabor fresa. La dosis recomendada para niños con edad entre 12 y 47 meses es de 100 mg diarios por tres días, y para niños en edades que van de los 4 y 11 años la dosis recomendada es de 200 mg diarios por tres días. La dosis recomendada en adultos es de 500 mg diarios por tres días. La biodisponibilidad de la NTZ aumenta casi el doble cuando se administra con los alimentos.

2.3.3. Farmacocinética de la NTZ

Estudios de la farmacocinética de la NTZ en humanos han demostrado que es absorbida en el tracto gastrointestinal, sufriendo una rápida metabolización por oxidación de la cadena acetil en 2-hidroxi 1-N-(5-nitro 2-tiazol/benzamida). La concentración máxima ($C_{m\acute{a}x.}$ de 1.9 µg/mL) de NTZ puede ser detectada en sangre 2 h después de la administración de una dosis única de 500 mg por vía oral. El principal metabolito se excreta sin cambios por orina en las siguientes 24 h, aproximadamente una tercera parte de la dosis oral, las dos terceras partes restantes son excretadas en las heces. En sangre,

NTZ es rápidamente hidrolizada por esterasas presentes en el plasma hacia su derivado desacetil TZD (desacetil-nitazoxanida). La TZD es el metabolito activo *in vivo* y la única especie cuantificable en el plasma. Después de la administración oral de NTZ, se puede encontrar una concentración máxima de TZD de 2 mg/L dentro de 1 - 4 h. La TZD es distribuida por todo el organismo por medio de proteínas plasmáticas (>99%), y su eliminación urinaria con un tiempo de vida media de 7.3 h. Después, la TZD pasa a la fase II de la biotransformación en la cual ocurre una glucoronidación dando lugar al glucorónido-tizoxanida (Fig. 6). La NTZ no es, a diferencia de la TZD, detectada en plasma, orina, bilis o heces; de igual forma el glucorónido-tizoxanida es encontrado en plasma, orina y bilis (Fox y Saravolatz, 2005).

Aunque estudios del metabolismo *in vitro* han demostrado que TZD no tiene un efecto inhibitorio significativo en enzimas del Cit. P-450, la farmacocinética de NTZ en pacientes con función renal y hepática comprometidos no ha sido estudiada, y NTZ debe ser administrada a estos pacientes con precaución. Por añadidura, la seguridad de NTZ en mujeres embarazadas o en lactancia no se ha probado, ya que no se han realizado los estudios adecuados para su administración a esta población (Fox y Saravolatz, 2005).

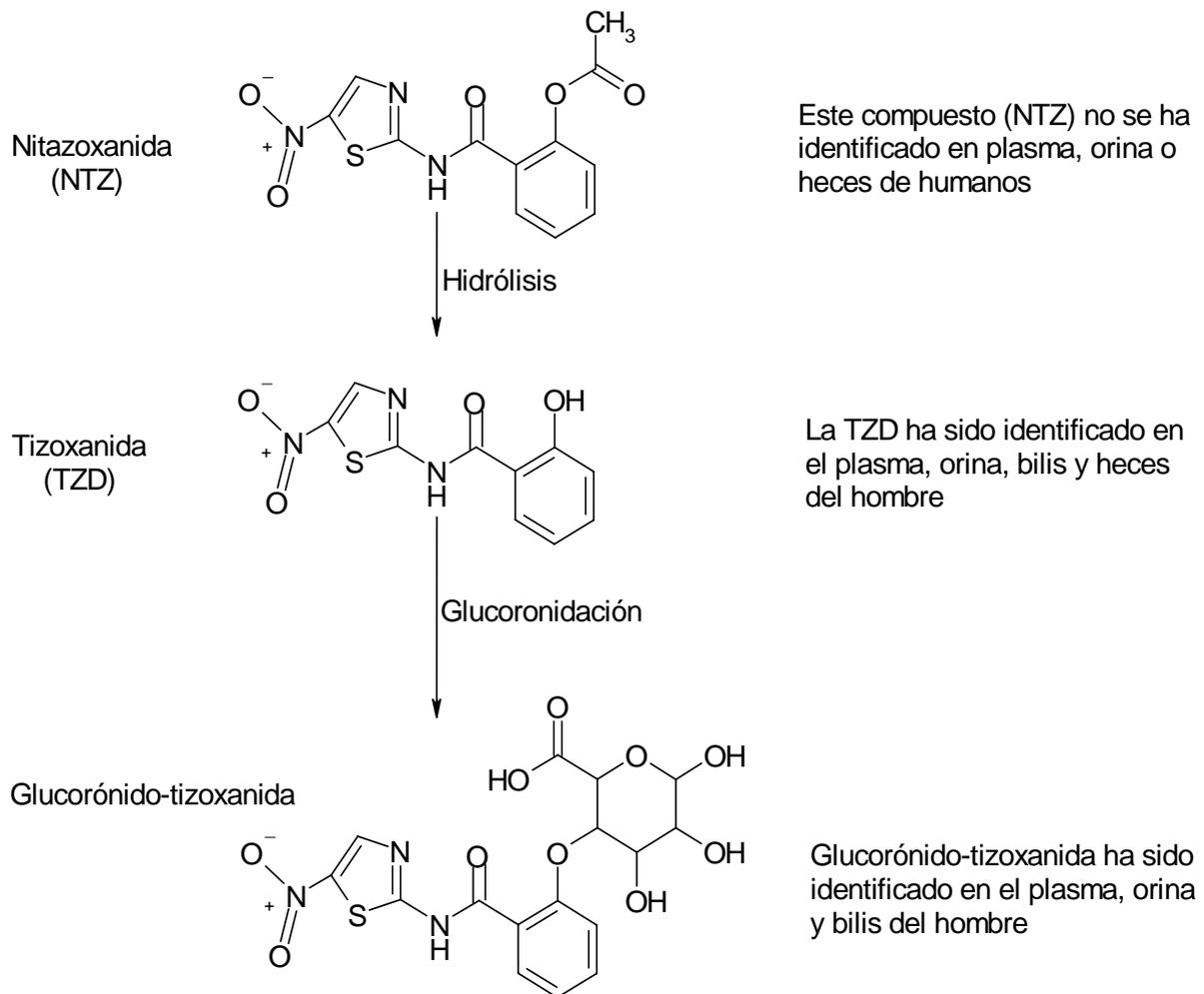


Figura 6. Metabolismo de la Nitazoxanida.

2.3.4. Tratamiento

La dosis adecuada de tratamiento de la NTZ es de 200-400 mg/día divididos en dos tomas por tres días consecutivos. Aunque, existe evidencia de que en dosis única la NTZ puede ser eficaz como tratamiento de erradicación de ciertos parásitos, tales como *Taenia saginata* e *Himenolepis nana* (50 mg/kg) (Rossignol y Maisonneuve, 1984). No obstante, se carece de reportes poblacionales de quimiopreención en masa cuyo estudio sea la efectividad de la NTZ administrada en dosis única.

2.3.5. Interacción Medicamentosa

Hasta el momento, no se han conducido estudios sobre la interacción droga-droga con NTZ *in vivo*. Más del 99% de TZD está ligado a proteínas plasmáticas, por lo que se debe tener precaución cuando se administra NTZ al mismo tiempo que otro medicamento que de la misma manera es acarreado por proteínas plasmáticas. Se recomienda monitorear el tiempo de protrombina a los pacientes que, al mismo tiempo están tomando warfarina y NTZ.

3. Planteamiento del Problema

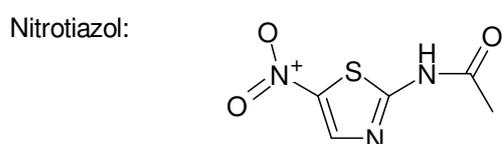
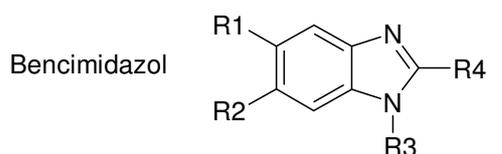
En México, el control de las helmintosis se lleva a cabo mediante el empleo de la quimioterapia. Los fármacos empleados son principalmente el ABZ y recientemente la NTZ. El ABZ es muy eficaz en el tratamiento de helmintos intestinales, sin embargo, a nivel sistémico su eficacia se ve limitada, esto debido a una pobre biodisponibilidad (sólo el 5% administrado por vía oral), ocasionada principalmente por su baja solubilidad y absorción.

Con la finalidad de contar con nuevos compuestos antiparasitarios, recientemente nuestro grupo de investigación, sintetizó moléculas híbridas del bencimidazol con el nitrotiazol, conservando los sustituyentes CF_3 y/o SCH_3 en posición 2 y el CH_3 o H en posición 1 de la molécula bencimidazólica (tabla 5), los cuales le confieren mayor actividad antihelmíntica (compuestos VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72 y VMAS-74).

En este trabajo de tesis se analizó si la unión de los dos grupos farmacofóricos potencia la actividad *in vitro* de estas moléculas híbridas contra la LM de *T. spiralis*.

Tabla 5. Moléculas híbridas sintetizadas.

No. de Compuesto	Clave	R1	R2	R3	R4	Peso Molecular
60	VMAS60	Nitrotia	H	H	CF_3	357.269 g/mol
62	VMAS62	Nitrotia	H	H	SCH_3	334.356 g/mol
72	VMAS72	Nitrotia	H	CH_3	CF_3	371.296 g/mol
74	VMAS74	Nitrotia	H	CH_3	SCH_3	349.390 g/mol



4. Objetivos

4.1. Objetivo General

- Evaluar la actividad biológica “*in vitro*” de compuestos híbridos del bencimidazol y nitrotiazol contra la larva muscular de *T. spiralis*.

4.2. Objetivos Particulares

- Determinar la actividad biológica de cuatro compuestos híbridos (VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72 Y VMAS-74) derivados del bencimidazol y nitrotiazol contra la fase sistémica (larva muscular) del nematodo *T. spiralis*, mediante el método colorimétrico del MTT.
- Comparar la actividad biológica de los compuestos híbridos con la actividad del albendazol y la nitazoxanida contra la larva muscular de *T. spiralis*

5. Hipótesis

Los compuestos híbridos tienen el grupo farmacofórico del ABZ y de la NTZ, por lo que tendrán mayor y/o similar actividad *in vitro* que el albendazol y la nitazoxanida contra la larva muscular de *Trichinella spiralis*.



6. MATERIALES Y MÉTODO

6.1. EQUIPOS

- Agitador Gerhardt RO5 (Gerhardt. Bonn, Alemania)
- Aparato modificado de Bearman
- Balanza analítica digital peso máx.: 210g, d= 0.0001g (Scientech)
- Balanza de 2 platillos, capacidad 2 Kg (Ohaus)
- Campana de extracción tipo FG2P (Squarred)
- Campana de flujo laminar (Class II, Type A2. Nuaire, Alemania)
- Cánulas de 1.7mm diámetro
- Centrífuga Clínica Sorvall RT 6000D (Ohio, USA)
- Centrífuga de tubos eppendorf (5415C, Brinkmann Instruments)
- Cubre objetos de 22 X 22 mm (Madesa)
- Equipo de disección
- Espátula de acero inoxidable (Fisher Stainless)
- Frascos de vidrio graduados de 100, 250, 500, y 1000 mL (Schott)
- Gasas estériles secas cortadas de 10 X 10 cm (Curity)
- Guantes desechables de nitrilo (High Five)
- Invertoscopio (Olympus CK2)
- Incubadora de CO₂ (Water/Jacketed, NU2500E. Nuaire, Alemania)
- Lector para placas de ELISA (Multiscan Ascent, Labsystems)
- Matraz Erlenmeyer de vidrio para 4000 mL (Pyrex)
- Mezcladora digital para matraces (Gerhardt)
- Micropipetas (Gilson) de 20, 200, 1000 µL
- Microscopio óptico (Nikon 119)
- Papel parafilm "M"



- Picadora de carne Moulinex
- Pinza metálica de un diente (Atco)
- Pipetas graduadas de vidrio de 5 y 10 mL (Brand)
- Pizeta de plástico para 500 mL
- Placas con 24 pozos de poliestireno estériles (Corning)
- Placas con 96 pozos fondo plana de poliestireno (Corning)
- Pipetas Pasteur
- Porta objetos pulidos de 25.4 X 76.2 mm, espesor \pm 1-1.2 mm (Crisa)
- Probetas graduadas de vidrio de 100, 500 y 1000 mL (Pyrex)
- Puntas plásticas de 200 y 1000 μ L (Biological)
- Rack reversible para 96 tubos de 1.5 mL
- Refrigerador a temperatura 4 – 8° C
- Tamiz metálico malla # 40
- Tubos eppendorf de 1.5 y 2.0 mL
- Tubos falcón de 15 mL (Corning)
- Vaso de precipitados de plástico de 1000 mL (Nalgene)
- Vortex-2 Modelo G-560 (Genie)

6.1.1. REACTIVOS

- Ácido clorhídrico concentrado (Merck, México)
- Agua bidestilada
- Albendazol (Smithkline Beecham, México)
- Bacto agar al 0.2% (0140-01, Difco laboratories. Michigan, USA)
- Cloroformo (J.T. Baker)
- Cloruro de sodio (Merck, México)
- Dimetilsulfóxido (J.T. Baker)
- Éter etílico(J.T. Baker)



- Fosfato monobásico de potasio (Baker, México)
- Fosfato dibásico de sodio (Baker, México)
- Medio RPMI-1640 con L-Glutamina, sin bicarbonato de sodio
- Metasulfato de Fenacina (PMS) FW= 306.3 (Sigma)
- Mezcla de Penicilina-Estreptomicina 10,000 U/μg/mL en solución salina de NaCl al 0.85%
- MTT (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), aprox. 98% (TLC) (Sigma)
- Nitazoxanida (Laboratorios Columbia)
- Pepsina. 1:2500, 140U/mg; sólido 920 U/mg de proteína obtenida de mucosa estomacal porcina. Lote 45H0867 (Sigma)
- Solución PBS 1X
- Suero de ternera (Gibco)

6.2. METODOLOGÍA

6.2.1. Mantenimiento del ciclo de vida de *T. spiralis*

Ratas machos de la cepa Sprague-Dawley fueron infectados con 5000 LM de *T. spiralis*, por vía oral, con la ayuda de una sonda gástrica.

Los animales se mantuvieron bajo condiciones normales de alimentación en el bioterio durante un mínimo de 28 días, tiempo en el cual se completa el ciclo de vida del parásito.

6.2.2. Obtención de las larvas musculares de *T. spiralis*

Se siguió el procedimiento descrito por Martí *et al.* (1987), con algunas modificaciones.

Ratas machos de la cepa Sprague-Dawley infectados con larvas de *T. spiralis* fueron sacrificados a los 28 días después de la infección. Se les despojó de la piel, cabeza, cola, extremidades y vísceras (se trabaja sólo con músculo esquelético y diafragma). El músculo esquelético y el diafragma se cortaron en pequeños trozos, se trituraron en una picadora y se vertieron en una solución de pepsina al 1% (P/V) y HCl al 1% (V/V) en agua destilada, durante 3 h a 37°C, esto con el fin de digerir el músculo para liberar las LM.

Se montó un aparato de Baerman modificado, que consistió en un embudo plástico con una manguera en el tallo que tenía adaptado un tubo Falcon de 15 mL; transcurridas 3 h se pasó el digerido de músculo a través de un tamiz # 40 (para eliminar restos de músculo no digerido) que se colocó por encima del embudo, se dejó que las LM sedimentaran durante 20 min.

Las LM sedimentadas en el tubo Falcon se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X) pH 7.4 con antibióticos (200 U.I. de penicilina y 200 µg de estreptomina), tratando de retirar la mayor cantidad posible de desechos musculares. Las LM obtenidas se resuspendieron en 4-5 mL de solución básica de fosfatos (PBS) y posteriormente se contaron. Para este fin, se realizó una dilución 1:10 de la suspensión de parásitos (10 µL de la suspensión de parásitos y 90µL de bactoagar al 0.2%). En un portaobjetos

limpio y desengrasado, se colocaron de la dilución, 5 gotas de 5 μ L cada una. Se contaron los parásitos con el objetivo seco débil (10 x), se determinó el promedio de parásitos contabilizados por gota (5 μ L) y se calculó el número de parásitos totales en la muestra inicial (4-5 mL).

Ejemplo:

Volumen total (larvas + sol. PBS) = 5 mL

Gota 1 = 15 LM

Gota 2 = 18 LM

Gota 3 = 14 LM

Gota 4 = 17 LM

Gota 5 = 16 LM

$\Sigma = 80$ LM

Promedio = 16 LM por cada 5 μ L

Si el volumen total de la muestra es de 5 mL, entonces:

$$\begin{array}{r} 16 \text{ LM} \text{ ----- } 5 \mu\text{L} \\ X \quad \text{----- } 5000 \mu\text{L} \end{array}$$

X = 16 000 LM. Esta cantidad se multiplica por 10, ya que es el factor de dilución de la muestra, por lo tanto:

16 000 (10) = 160 000 LM existentes en los 5 mL de la muestra.

7. Evaluación de la actividad biológica de los compuestos híbridos VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72 Y VMAS-74 contra la fase sistémica (LM) de *T. spiralis*

Para evaluar la actividad de los compuestos sobre el parásito se empleó el método colorimétrico del MTT, de acuerdo a lo descrito por Towson *et al.* (1989).

La reducción de la sal de tetrazolio (3-(4,5 dimetilazol-2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio) (MTT) a formazán por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, ha sido muy útil para ensayar la sobrevivencia y proliferación celular. La conversión solo se realiza en células vivas y la cantidad de formazán producido es proporcional al número de células presentes (Guerra, 2001).

Se preparó una solución stock de 10 mg/mL de cada uno de los compuestos híbridos empleando DMSO, a partir de la cual se realizaron diluciones para obtener los compuestos a diferentes concentraciones (0.001, 0.005, 0.01, 0.05 y 0.1 µg/mL).

En este ensayo se colocaron 1000 LM por pozo en una placa de cultivo de 16 pozos, se añadieron 20 µL de los compuestos a las diferentes concentraciones y se ajustó el volumen a 2 mL en medio RPMI-1640 complementado con suero de ternera al 10% y penicilina-estreptomicina (10,000 U/µg/mL). Como controles positivos se incluyeron al ABZ y a la NTZ a las mismas concentraciones empleadas con los compuestos híbridos.

Una vez montados los ensayos, las placas se incubaron a 37° C en una atmósfera al 5% de CO₂ durante tres días (72 h), realizando un cambio de medio y compuestos cada 24 h.

Transcurridos los tres días de incubación, el contenido de cada pozo se colocó en tubos eppendorf de 2 mL y se centrifugaron a 2500 rpm por 3 min. El sobrenadante se desechó cuidando que no se fueran larvas al retirar el líquido y se realizó un lavado con 1 mL de PBS 1X a cada tubo, se centrifugaron nuevamente a 2500 rpm por 3 min. Lo anterior se realizó 2 veces y finalmente se retiró el sobrenadante quedando en el fondo únicamente las larvas a las

cuales se le adicionó 1 mL de MTT, 20 μ L de metasulfato de fenacina (PMS) como catalizador y finalmente 100 μ L de DMSO. Una vez completados estos pasos, se homogenizó el contenido de cada tubo y posteriormente se incubaron durante 1 hora a 37° C en una atmósfera al 5% de CO₂.

Concluida la incubación, el sobrenadante se retiró y al paquete de larvas se le realizó un lavado con 1 mL de PBS 1X, se centrifugaron a 2500 rpm durante 3 min y se desechó el sobrenadante. Al paquete de larvas se le adicionaron 500 μ L de DMSO y se incubaron a temperatura ambiente por 1 h y posteriormente se centrifugaron nuevamente a 2500 rpm durante 3 min.

De cada uno de los sobrenadantes se tomaron 200 μ L y se depositaron en una placa de ELISA de 96 pozos. La absorbancia de los sobrenadantes se determinó en un lector de ELISA Multiscan Ascent a 492 nm usando DMSO como blanco.

Se realizaron 3 experimentos independientes por triplicado a cada uno de los compuestos híbridos, incluyendo al ABZ y la NTZ.

El porcentaje de reducción de la actividad metabólica se calculó con respecto al control.

8. Resultados

Se determinó la actividad biológica *in vitro* de los híbridos derivados del bencimidazol y nitrotiazol (VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72 Y VMAS-74) contra la fase sistémica (LM) de *T. spiralis*, incluyendo de manera comparativa al ABZ y NTZ mediante el método colorimétrico del MTT.

El método se estandarizó primeramente empleando al ABZ a diferentes concentraciones.

En las tablas 6 y 7 se presentan los resultados de dos ensayos independientes y por triplicado cada uno de ellos. Como puede observarse, en ambas tablas, la actividad del ABZ se incrementa a partir de 0.005 µg/mL, alcanzando la máxima actividad a 0.1 µg/mL, reduciendo 79 y 80% la actividad metabólica de la LM de *T. spiralis*. De manera importante se muestra que el ensayo es reproducible empleando al ABZ.

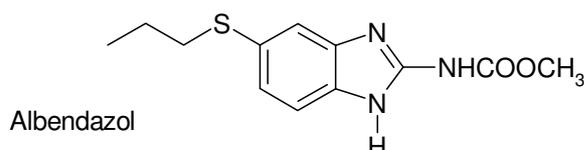


Tabla 6. Actividad del Albendazol contra la LM de *T. spiralis* empleando el método del MTT.

CONCENTRACIÓN DEL FÁRMACO [µg/mL]	ABSORBANCIA 492 nm*	ACTIVIDAD METABÓLICA (%)	REDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA (%)
Control	0.407 ± 0.004	100	0
0.001	0.401 ± 0.005	98	2
0.005	0.094 ± 0.004	23	77
0.01	0.080 ± 0.003	20	80
0.05	0.079 ± 0.004	19	81
0.1	0.080 ± 0.003	20	80

*Promedio de la D.O.

Tabla 7. Actividad del Albendazol contra la LM de *T. spiralis* empleando el método del MTT.

CONCENTRACIÓN	ABSORBANCIA	ACTIVIDAD	REDUCCIÓN DE
---------------	-------------	-----------	--------------

DEL FÁRMACO [µg/mL]	492 nm*	METABÓLICA (%)	LA ACTIVIDAD METABÓLICA (%)
Control	0.415 ± 0.004	100	0
0.001	0.393 ± 0.005	95	5
0.005	0.099 ± 0.006	24	76
0.01	0.088 ± 0.003	21	79
0.05	0.087 ± 0.004	21	79
0.1	0.089 ± 0.004	21	79

*Promedio de la D.O.

Se procedió a evaluar el efecto larvicida de la NTZ contra *T. spiralis* bajo el mismo procedimiento que el ABZ. En las tablas 8 y 9 se presentan los resultados obtenidos. Es evidente que la NTZ presentó menor actividad que el ABZ contra la LM de *T. spiralis*, aún con la concentración más alta evaluada (0.1 µg/mL); la reducción metabólica fue de 25%. En los dos ensayos se obtuvieron resultados similares.

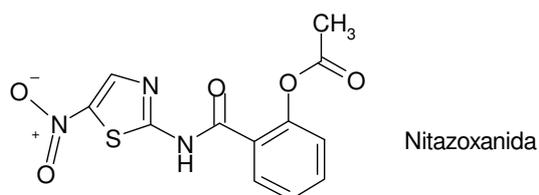


Tabla 8. Actividad de la Nitazoxanida contra la LM de *T. spiralis* empleando el método del MTT.

CONCENTRACIÓN DEL FÁRMACO [µg/mL]	ABSORBANCIA 492 nm*	ACTIVIDAD METABÓLICA (%)	REDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA (%)
Control	0.286 ± 0.003	100	0
0.001	0.269 ± 0.004	94	6
0.005	0.228 ± 0.006	80	20
0.01	0.220 ± 0.004	77	23
0.05	0.218 ± 0.003	76	24
0.1	0.215 ± 0.004	75	25

*Promedio de la D.O.

Tabla 9. Actividad de la Nitazoxanida contra la LM de *T. spiralis* empleando el método del MTT.

CONCENTRACIÓN DEL FÁRMACO [µg/mL]	ABSORBANCIA 492 nm*	ACTIVIDAD METABÓLICA (%)	REDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA (%)
Control	0.276 ± 0.004	100	0
0.001	0.258 ± 0.004	94	7
0.005	0.217 ± 0.005	79	21
0.01	0.216 ± 0.003	78	22
0.05	0.210 ± 0.004	76	24
0.1	0.208 ± 0.003	75	25

*Promedio de la D.O.

Una vez estandarizado el método se procedió a la evaluación de la actividad de los compuestos híbridos VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72 Y VMAS-74.

En la tabla 10 se presentan los resultados del compuesto VMAS-60. Es evidente que la actividad del compuesto es prácticamente insignificante, ya que aún en la concentración más alta evaluada (0.1 µg/mL) sólo se observó una reducción metabólica máxima del 4%.

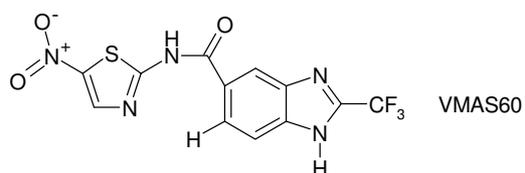


Tabla 10. Actividad del compuesto híbrido VMAS-60 contra la LM de *T. spiralis*.

CONCENTRACIÓN DEL FÁRMACO [µg/mL]	ABSORBANCIA 492 nm *	ACTIVIDAD METABÓLICA (%)	REDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA (%)
Control	0.314 ± 0.003	100	0
0.001	0.310 ± 0.004	99	1
0.005	0.312 ± 0.006	99	1
0.01	0.314 ± 0.005	100	0
0.05	0.309 ± 0.003	98	2
0.1	0.301 ± 0.004	95	4

*Promedio de la D.O. obtenida en tres ensayos por triplicado cada uno.

El compuesto VMAS-62 (Tabla 11), no presentó actividad larvica contra la LM de *T. spiralis*.

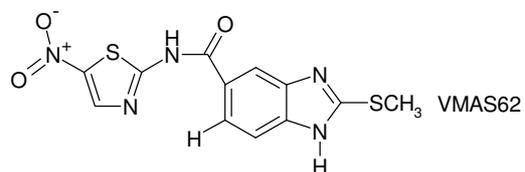


Tabla 11. Actividad del compuesto híbrido VMAS-62 contra la LM de *T. spiralis*.

CONCENTRACIÓN DEL FÁRMACO [µg/mL]	ABSORBANCIA 492 nm*	ACTIVIDAD METABÓLICA (%)	REDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA (%)
Control	0.308 ± 0.003	100	0
0.001	0.312 ± 0.006	101	-1
0.005	0.338 ± 0.004	109	-9
0.01	0.317 ± 0.005	103	-3
0.05	0.331 ± 0.006	107	-7
0.1	0.310 ± 0.006	101	-1

*Promedio de la D.O. obtenida en tres ensayos por triplicado cada uno.

En la tabla 12 se muestran los resultados obtenidos con el compuesto VMAS-72, en la cual se observa que la máxima reducción de la actividad metabólica se obtuvo a la concentración de 0.005 µg/mL (13%), a partir de la cual, la actividad del compuesto se redujo. Este comportamiento se repitió de forma similar en los tres ensayos realizados con este compuesto.

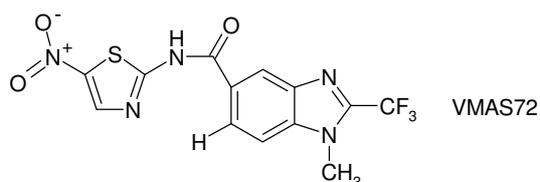


Tabla 12. Actividad del compuesto híbrido VMAS-72 contra la LM de *T. spiralis*.

CONCENTRACIÓN DEL FÁRMACO [µg/mL]	ABSORBANCIA 492 nm*	ACTIVIDAD METABÓLICA (%)	REDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA (%)
Control	0.399 ± 0.003	100	0
0.001	0.401 ± 0.005	101	-1
0.005	0.346 ± 0.006	87	13
0.01	0.379 ± 0.004	95	5
0.05	0.362 ± 0.004	91	9
0.1	0.390 ± 0.003	98	2

*Promedio de la D.O. obtenida en tres ensayos por triplicado cada uno.

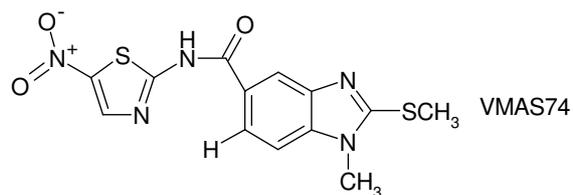


Tabla 13. Actividad del compuesto híbrido VMAS-74 contra la LM de *T. spiralis*.

CONCENTRACIÓN DEL FÁRMACO [µg/mL]	ABSORBANCIA 492 nm*	ACTIVIDAD METABÓLICA (%)	REDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA (%)
Control	0.245 ± 0.004	100	0
0.001	0.238 ± 0.005	97	3
0.005	0.227 ± 0.004	93	7
0.01	0.225 ± 0.003	92	8
0.05	0.223 ± 0.004	91	9
0.1	0.226 ± 0.003	92	8

*Promedio de la D.O. obtenida en tres ensayos por triplicado cada uno.

Los resultados obtenidos del compuesto VMAS-74 (tabla 13) muestran que aún a las concentraciones de 0.5 y 0.1 µg/mL, no se obtuvo una reducción importante de la actividad metabólica del parásito.

Al comparar la actividad de los compuestos híbridos con la del ABZ y la NTZ, es evidente que ninguno de los compuestos, incluyendo la NTZ, fue más activo que el ABZ.

9. Discusión

En este estudio se evaluó la actividad de cuatro moléculas (VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72 y VMAS-74), que fueron sintetizadas empleando el método de hibridación molecular. Con estas moléculas híbridas que presentan el grupo farmacofórico del ABZ y de la NTZ se consideró potenciar la actividad de los fármacos de origen.

Para evaluar la actividad *in vitro* de los compuestos híbridos VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72 y VMAS-74 se empleó a la LM del nematodo *T. spiralis* como modelo del helminto y el método colorimétrico del MTT para determinar el efecto de los compuestos sobre la actividad metabólica del parásito. Se eligió a la LM del parásito como modelo tanto por su fácil obtención a partir de animales infectados, como por representar la fase sistémica de la infección causada por *T. spiralis*. En cuanto al método del MTT, éste fue fácil de realizarse y en este trabajo los resultados obtenidos fueron reproducibles.

Los resultados de la actividad del ABZ y de la NTZ contra la LM de *T. spiralis* mostraron 80 y 25% de la reducción de la actividad metabólica del parásito respectivamente. La baja actividad mostrada por la NTZ contra la LM de *T. spiralis* fue algo sorprendente, ya que en la actualidad se considera que este fármaco tiene amplio espectro de acción antihelmíntica y es actualmente incluido en el tratamiento de este tipo de infecciones. Sin embargo, nuestros resultados, aunque obtenidos *in vitro*, se ven reforzados por estudios *in vivo* realizados por Fonseca-Salamanca *et al.* (2003). Estos autores evaluaron la actividad biológica *in vivo* de la NTZ y el MBZ contra la fase pre-adulta de *T. spiralis* y *Helixomoides polygyrus*, encontrando que para *T. spiralis* en dosis única, la NTZ a diferentes concentraciones (50 y 100 mg/kg) no fue activa contra el parásito, la mayor actividad se observó a una dosis de 1,000 mg/kg del fármaco obteniéndose una reducción del 16.4%; mientras que para la fase adulta de *H. polygyrus*, la NTZ a una concentración de 1,000 mg/kg por tres días consecutivos redujo la carga parasitaria en sólo un 21%. Para comparar los resultados obtenidos se usaron dos controles, MBZ para *T. spiralis* y levamisol (LVM) para *H. polygyrus*, obteniendo con MBZ una reducción de la carga parasitaria del pre-adulto de *T. spiralis* del 83%, mientras que el LVM

mostró una reducción del 89.9% contra el adulto de *H. polygyrus* a una concentración de 10 mg/kg y dosis única para ambos controles. Estos resultados ponen de manifiesto la mayor eficacia que tienen los compuestos bencimidazólicos con respecto a los anteriores, esto sugiere que la NTZ no debe considerarse en el tratamiento de infecciones por helmintos como antihelmíntico (López, 1999).

Estos resultados ponen de manifiesto la mayor potencia que tienen los BZD con respecto a la NTZ. Otro estudio *in vivo* que le da soporte a estos resultados, es el realizado por López (1999). En este estudio se comparó la actividad del ABZ y la NTZ en un modelo murino de triquinosis, obteniéndose una reducción de la LM del parásito del 87 y 60% respectivamente. Los resultados anteriores indican que la NTZ no debe considerarse como candidato particularmente en el tratamiento de infecciones por nematodos, siendo de gran importancia evaluar su actividad *in vitro* e *in vivo* contra parásitos cestodos y trematodos.

En relación a la actividad antihelmíntica de los cuatro compuestos híbridos VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72 y VMAS-74 sobre la LM de *T. spiralis*, fue evidente que todas las moléculas presentaron una actividad muy baja o nula (13% la mayor actividad). Un aspecto que puede afectar la evaluación de la actividad de los compuestos híbridos es la baja solubilidad de éstos, ya que en el caso de los híbridos VMAS-72 y VMAS-74, su disolución no fue total, dificultando obtener diluciones homogéneas, pues éstos formaron una suspensión la cual, al dejar en reposo formaba pequeños precipitados.

En estudios anteriores se han sintetizado derivados bencimidazólicos, que tienen un grupo CF₃ en posición 2 de la molécula, H y/o CH₃ en posición 1, y un grupo Cl o H en posición 5 y/ó 6 (Navarrete *et al.*, 2001).

Así mismo se han sintetizado otros derivados bencimidazólicos con un sustituyente SCH₃ en posición 2, H y/o CH₃ en posición 1 y un grupo Cl o H en posición 5 y/ó 6 de la molécula (Valdéz *et al.*, 2002) (Tabla 14). La actividad de estos compuestos contra la LM de *T. spiralis* se determinó al igual que en este trabajo de tesis, empleando el método colorimétrico del MTT. Los resultados obtenidos se muestran en la misma tabla 12 a manera de comparación.

Bencimidazol

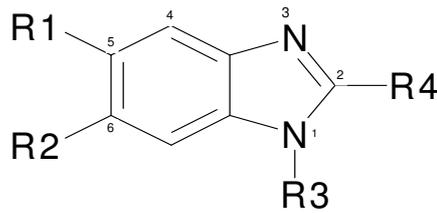


Tabla 14. Porcentaje de la reducción de la actividad biológica de *T. spiralis*.
(Valdéz *et al.*, 2002)

COMPUESTO	R1	R2	R3	R4	REDUCCIÓN (%)
17 ^a	Cl	H	H	CF ₃	NR ^{**}
VMAS-60	Nitrotiazol	H	H	CF ₃	4 [*]
20 ^a	Cl	H	CH ₃	CF ₃	39 ^{**}
VMAS-72	Nitrotiazol	H	CH ₃	CF ₃	2 [*]
11 ^b	Cl	H	H	SCH ₃	15 ^{**}
VMAS-62	Nitrotiazol	H	H	SCH ₃	NR [*]
8 ^c	Cl	H	CH ₃	SCH ₃	24 ^{**}
VMAS-74	Nitrotiazol	H	CH ₃	SCH ₃	3 [*]

^a Navarrete *et al.*, 2001; ^b Valdez *et al.*, 2002; ^c Sánchez-Díaz, 1999.

* [0.1ug/mL]

** [1.0 ug/mL]

De acuerdo a estos resultados, es evidente que los compuestos **8** y **20** presentaron la mejor actividad contra el parásito (24 y 39% de reducción de la actividad metabólica respectivamente). El compuesto **8** tiene en su molécula un grupo CH₃ en posición 1, un grupo SCH₃ en posición 2 y un Cl en posición 5; comparativamente con el compuesto híbrido VMAS-74, la diferencia en sus sustituyentes es únicamente la presencia de un grupo Cl en lugar del nitrotiazol. De igual manera, si comparamos el compuesto bencimidazólico **20**, con el compuesto híbrido VMAS-72, ambas moléculas tienen los mismos sustituyentes, con excepción del Cl en posición 5 presente en **20** y el grupo nitrotiazol en la misma posición del compuesto híbrido.

En el caso de los derivados bencimidazólicos **11** y **17**, ambos tienen un H en posición 1, siendo diferente únicamente el sustituyente en posición 2, SCH₃ y CF₃ respectivamente. El compuesto **11** presentó una actividad baja

contra *T. spiralis* (15%), sin embargo, ésta fue mayor que la presentada por el compuesto híbrido VMAS-62, el cual tiene el grupo nitrotiazol en lugar del grupo Cl en posición 5. Con respecto a los compuestos 17 y VMAS-60 ambos no tuvieron actividad contra el parásito. Lo anterior indica que el cambio de un sustituyente Cl por un grupo nitrotiazol no le confiere mayor actividad antiparasitaria a la molécula bencimidazólica presente en los híbridos VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72 y VMAS-74. Así mismo, se pone de manifiesto que el sustituyente CH₃ en posición 1 le confiere mayor actividad antihelmíntica a la molécula bencimidazólica.

Cabe mencionar que la actividad obtenida con los derivados bencimidazólicos (**8**, **11**, **17** y **20**) se determinó a la concentración de 1 µg/mL, a diferencia de la actividad obtenida con los híbridos, que fue a 0.1 µg/mL. Sin embargo, si analizamos la actividad de los diferentes híbridos en relación con las concentraciones empleadas, es difícil considerar que a mayor concentración mayor actividad de éstos. Esto se observa, por ejemplo en el compuesto VMAS-60, a 0.001 µg/mL tuvo la misma actividad que a la máxima concentración empleada en este ensayo. Lo mismo es cierto para los demás compuestos, con excepción de VMAS-72 que, como ya mencionamos, a medida que aumenta la concentración, su actividad decrece. En el caso del ABZ, desde la concentración de 0.005 µg/mL se observó la máxima actividad antiparasitaria, no sufriendo cambios importantes a mayores concentraciones. Lo mismo sucede con la NTZ. Por lo que a pesar de que el análisis de las actividades de los compuestos bencimidazólicos y de los híbridos, involucra diferentes concentraciones, es evidente la baja ó nula actividad de los compuestos híbridos.

Por otro lado, la participación del nitrotiazol en la baja actividad antiparasitaria mostrada por los híbridos resultó sorprendente, si consideramos que la parte farmacofórica de la NTZ es precisamente este grupo, aunado a que la NTZ es actualmente indicada en el tratamiento de infecciones por helmintos. Sin embargo, como ya se mencionó, existen evidencias de la baja actividad *in vitro* e *in vivo* de la NTZ contra nematodos del tipo de *H. polygyrus* y *T. spiralis* (Nayeli tesis; Fonseca-Salamanca *et al.*, 2003). Todo lo anterior indica que efectivamente el grupo nitrotiazol no es activo contra *T. spiralis*.

De manera general, podemos decir que la actividad antiparasitaria de los compuestos VMAS-60, VMAS-62, VMAS-72 y VMAS-74 no se potenció con respecto al ABZ y la misma NTZ.

Por otro lado, la participación del nitrotiazol en la baja actividad antiparasitaria mostrada por los híbridos, siendo éste el grupo farmacofórico de la NTZ, es otra evidencia que hace notar de manera importante la baja eficacia de la NTZ contra *T. spiralis* y muy probablemente de manera general contra parásitos nematodos.

De miles de nuevas moléculas sintetizadas con actividad parasitaria potencial, sólo una de ellas llega a ser considerada como candidato en el tratamiento de infecciones parasitarias, por lo que la búsqueda de nuevos antiparasitarios debe continuar, apoyándose en una investigación interdisciplinaria que permita contar a largo plazo con alternativas en el tratamiento de infecciones por helmintos.

10. Conclusiones

- La actividad de los compuestos híbridos no se potenció con respecto al ABZ y la NTZ
- La actividad de la NTZ contra *T. spiralis* es menor que la del ABZ, por lo que no debe emplearse como una alternativa en el tratamiento de la triquinosis.
- El grupo nitrotiazol le restó actividad antihelmíntica a los compuestos híbridos.
- Los compuestos híbridos metilados en la posición 1 (VMAS-72 y VMAS-74), tuvieron problemas de solubilidad.
- El grupo nitrotiazol le resta actividad antihelmíntica al compuesto bencimidazólico.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Alcántara, P., De la Rosa, J. y Correa, B. (1992) Triquinelosis, una parasitosis fuera de serie. *Publicación Técnica INDRE # 16*; México, D.F. 1-10.
- Beaver P., Jung R. y Cupp E. (1986) Parasitología Clínica. 2ª edición. Salvat editores. Barcelona, España: 251-260.
- Bokson, K. (1976) Bioenergetics of *Trichinella spiralis* larvae and effect of some anthelmintics on succinate dehidrogenase of *Trichinella spiralis* mitocondria. In: van der Bossche, H. (ed) Biochemistry of parasites host parasite relationships. North Holland Publishing, Amsterdam: 589-597.
- Bruschi, F. and Murrell, K. (2002) New aspects of human trichinellosis: The impact of new *Trichinella* species. *Postgraduate Medical Journal* **78**:15-22.
- Campanati, L., Troester, H., Monteiro-Leal, L.E., Spring, H., Trendelenburg, M.F., De Sousa, W. (2003) Tubulin diversity in trophozoites of *G. lamblia*. *Histochemistry and Cell Biology* **119**:323-331.
- Campos, R. R. (1990) Resistencia de *Haemonchus contortus* a bencimidazoles en ovinos de México. *Tec. Pecu. Méx.* **28**:30-34.
- Campos, R. R., Herrera, R. D., Quiroz, R. H. (1992) Diagnóstico *in vitro* de *Haemonchus contortus* resistente al albendazol, febendazol, oxfendazol y febantel en tres rebaños de ovinos Tabasco o Pelibuey. *Vet Mex* **23**: 51-56.
- Capó, V., Despommier, D. (1996) Clinical Aspects of Infection with *Trichinella* spp. *Clinical Microbiology Reviews.* **9**(1): 47-54.
- Cook G. (1990). Use of benzimidazole Chemoterapy in human helminthiases: indications and efficacy. *Parasitology Today*; **4**(6): 853-864.
- Criado-Fornelio, A., Armas-Serra, C., Jiménez-González, A., Casado-Escribano, N., Rodríguez-Caaberio, F. (1990) Biochemical effects of luxabendazole on *Trichinella spiralis*. *Parasitology Research* **76**: 518-520.
- Cristófol, C., Navarro, M., Franquelo, C., J.E., V., Carretero, A., Ruberte, J., Arboix, M. (1997) Disposition of netobimin, albendazole and its metabolites in the pregnant rat: Developmental toxicity. *Toxicology an Applied Pharmacology* **144**: 56-61.
- De Silva N., Guyatt H. and Bundy D. (1997). Anthelmintics. A comparative reviews of their clinical pharmacology. *Drugs* **53**(5):769-788.

- Delatour, P., Garnier, F., Benoit, E., C.H., L. (1984) A correlation of toxicity of albendazole and oxfendazole with their free metabolites and bound residues. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **7**: 139-145.
- Despommier D. (1998) How does *Trichinella spiralis* make itself at home. *Parasitology Today*; **14**(8):318-323.
- Despommier, D.D., Aron, L. and Turgeon, L. (1975) *Experimental Parasitology* **37**: 108-116.
- Dick, T.A. and Chadee, E. (1981) *In Trichinellosis* (Kim, C., Ruitenberg, E.J. and Teppema, T.S., eds) 23-27, Reedbooks.
- Dubreuil, L., Houcke, I., Mouton, Y., Rossignol, J. F. (1996) In vitro evaluation of activities of nitazoxanide and tizoxanide against anaerobes and aerobic organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**(10):2266-2270.
- Fonseca-Salamanca, F., Martínez-Grueiro, M., Martínez-Fernández, A. (2003) Nematocidal activity of nitazoxanide in laboratory models. *Parasitology Research* **91**(4):321-324.
- Fox, L. M. and Saravolatz, L. D. (2005) Nitazoxanide: A New Thiazolide Antiparasitic agent. *Clinical Infectious Diseases* **40**:1173-1180.
- Galtier, P., Alvinerie, M., elatour, P. (1986) In vitro sulphoxidation of albendazole by ovine liver microsomes: assay and frequency of various xenobiotics. *American Journal of Veterinary Research* **47**: 447-450.
- Grzywinsky L. and Karmanska K. (1993). Efficacy of luxabendazole against different stages of *Trichinella spiralis*. Eight International Conference of Trichinellosis. Ed. by Cambell W., Pozio E. and Bruschi F. 484-489.
- Guerra, M. (2001) Ensayos Farmacológicos *in vitro* para Evaluar Actividad Antigiardiásica (Artículo de revisión). *Rev Cubana Farm* **35**(1): 66-73.
- Gyurik, R. J., Chow, A. W., Zaber, B., Brunner, E. L., Miller, J. A., Villani, A. J., Petke, L. A., Parish, R. C. (1981) Metabolism of Albendazole in cattle, Sheeps, rats and mice. *Drug Metabolism and Predisposition* **9**: 503-508.
- Hennessy, D.R., Steel, J.W., Lacey, E., Eagleson, G.K., Prichard, R.K. (1989) The disposition of albendazole in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **12**:421-429.
- Horton R., Gottschall D., Lacey E., Townsed L. and Vanden Bosche H. (1990). Benzimidazole in a wormy world. *Parasitology Today* **4**(2):106-109.

- Jiménez-González, A., Armas-Serra, C., Criado-Fornelio, A., Casado-Escribano, N., Rodríguez-Caabeiro, F., Díez, J. C. (1991) Preliminary Characterization and interaction of tubulin from *Trichinella spiralis* larvae with benzimidazole derivatives. *Veterinary Parasitology* **39**: 89-99.
- Kelly, J. D., Hall, C. A. (1983) Resistance of animal helminthes to anthelmintics. *Advances in Pharmacology Chemotherapy* **16**:89-127.
- Kwa M., Kooyman F., Boerseman J. and Roos M. (1993). Effect of selection for benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* on β -tubulin isotype 1 and isotype 2 genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **191**:413-419.
- Lacey E. (1988). The role of cytoskeletal protein, tubulin in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazole. *International Journal for Parasitology*; **18**:908-915.
- Lacey, E. (1990) Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today* **6**: 112-114.
- Lacey, E., Brady, R. L., Prichard, R. K., Watson, T. R. (1987) Comparison of inhibition of polymerization of mammalian tubulin and helminth ovicidal activity by benzimidazole carbamates. *Veterinary Parasitology* **23**: 105-119.
- Lanusse, C.E., Nare, B., Prichard, R. K., (1993b) Comparative Sulphoxidation of albendazole by sheep and cattle liver microsomes and the inhibitory effect of methimazole. *Xenobiótica* **23**: 285-295.
- López-García, M. L., Torrado-Duran, S., Torrado-Duran, J., Ripoll S., Bolas-Fernández F. and Martínez-Fernández A. R. (1997). Albendazole versus ricobendazole (albendazole sulphoxide) against enteral and parenteral stages of *Trichinella spiralis* in mice. *International Journal for Parasitology* **27**:781-785.
- López Ramírez, N. (1999) "Evaluación Biológica de la Actividad de Derivados del 1-Metilbencimidazol sobre *Trichinella spiralis*" México, Facultad de Química, UNAM (Tesis de Licenciatura).
- Lubega, G. W., Prichard, R. K. (1991) Interaction of benzimidazole anthelmintics with *Haemonchus contortus* tubulin: binding affinity and anthelmintic efficacy. *Experimental Parasitology* **73**:203-213.
- Martínez-Barbabosa, I., Vázquez-Tsuji, O., Romero-Cabello, R., Gutiérrez, M., García, Y., Fernández, A. M., Campos, T. (2001) Búsqueda de *Trichinella spiralis* en carne de cerdo que se expende en carnicerías del Distrito Federal. *Vet Méx* **32**(2):141-144.

- Martí, P., Murrell, K. and Gamble, R. (1987). *Trichinella spiralis*: immunization of pigs with newborn larva antigens. *Experimental Parasitology* **63**:68-73.
- McCracken R. (1978). Efficacy of mebendazole and albendazole against *Trichinella spiralis* in mice. *Journal of Parasitology* **64**(29):214-219.
- McCracken R., García A., and Robins, H. (1982). Mebendazole therapy of enteral trichinellosis. *Journal of Parasitology* **68**(2):259-262.
- Morales-Espinoza, E., Sánchez-Pérez, H., García-Gil, M. *et al.* (2003) Intestinal Parasites in Children, in Highly Deprived Areas in the Border Region of Chiapas, Mexico. *Salud pública Méx* **45**(5):.379-388.
- Murrell K. and Pozio E. (2000) Trichinellosis: of zoonosis that won't go quietly. *International Journal for Parasitology* **30**(3):1339-1349.
- Navarrete-Vázquez, G., Cedillo, R., Hernández-Campos, A., Yépez, L., Hernández-Luis, F., Valdez, J., Morales, R., Cortez, R., Hernández, M., Castillo, R. (2001) Synthesis and Antiparasitic Activity of 2-(Trifluoromethyl)-benzimidazole Derivates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **11**:187-190.
- Oakley, B.R. (2000) An abundance of tubulins. *Trends in Cell Biology* **10**: 537-542.
- Oakley, C.E., Oakley, B.R. (1989) Identification of g-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mip A gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* **338**: 662-664.
- Ortega-Pierres, M. G., Arriaga, C., Yépez-Mulia, L. (2000) Epidemiology of trichinellosis in Mexico, Central and South America. *Veterinary Parasitology* **93**(3-4): 201-225.
- Pérez-Serrano, J., Casado, N., Denigri, G., Rodríguez-Caabeiro, F. (1994) The effects of albendazole and albendazole sulphoxide combination-therapy on *Echinococcus granulosus* in vitro. *International Journal for Parasitology* **24**: 219-224.
- Pérez-Serrano, J., Denegri, G., Casado, N., Bodega, G., Rodríguez-Caabeiro, F. (1995) Anti-tubulin Immunohistochemistry study of *Echinococcus granulosus* protoscolices incubated with albendazole and albendazole sulphoxide in vitro. *Parasitology Research* **81**: 438-440.
- Petri, W. A. (2003) Therapy of intestinal protozoa. *Trends in Parasitology* **19**(11):523-526.

- Pozio, E. (2000) Factors affecting the flow among domestic, synanthropic and sylvatic cycles of trichinella. *Veterinary Parasitology* **93**:241–62.
- Rahman, M. S., Bryant, C. (1977) Studies of regulatory metabolism in *Moniezia expansa*: effects on cambendazole and mebendazole. *International Journal for Parasitology* **7**: 403-409.
- Rawden, H. C., Kokwaro, G. O., Ward, S. A., Edwards, G. (2000) Relative contribution of cytochromes P450 and flavin-containing monooxygenases to the metabolism of albendazole in human liver microsomes. *British Journal of Clinical pharmacology* **49**: 313-322.
- Redondo, P. a., Álvarez, A. I., García, J. L., Larrodé, O. M., Merino, G., Prieto, J. G. (1999) Presystemic Metabolism of Albendazole: Experimental Evidence of an Efflux Process of Albendazole Sulfoxide to Intestinal lumen. *Drug Metabolism and Disposition* **27**(6):736-740.
- Rossignol, J.F., Maisonneuve, H. (1984) Nitazoxanide in the treatment of *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana* infections. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **33**(3):511-512.
- Rossignol, J.F., Maisonneuve, H., Cho, YW. (1984) Nitroimidazoles in the treatment of trichomoniasis, giardiasis and amoebiasis. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **22**:63-72.
- Rossignol, J.F., Abaza, H., Friedman, H. (1998) Successful treatment of human fascioliasis with nitazoxanide. *Trans. R. Soc. Trop Med Hyg* **92**:103-4.
- Sánchez-Díaz, R. (1999) Síntesis de derivados híbridos del 1-metilbencimidazol con actividad antihelmíntica potencial. Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM.
- Sharma S. and Anand N. (1997). Approaches to design and synthesis of antiparasitic drugs. Elsevier Science. Amsterdam, Netherlands:195-238.
- Solana, H. D., Sallovitz, J. M., Najle, R., Rodríguez, J. A., Lanusse, C. E. (2000) Liver sulphoxidative metabolism of albendazole in rat: enantioselectivity and effect of methimazole. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* **22**: 83-88.
- Sukhdeo M. (1991) The relationship between intestinal location and fecundity in adult *Trichinella spiralis*. *International Journal for Parasitology* **21**(7):855-858.
- Tay, J., Velasco, O., Lara, R., Gutiérrez, M. (1993) Parasitología Médica. Quinta edición, Méndez Editores. 365-375.

- Tejada, P., Sánchez-Moreno, M., Monteoliva, M., Gómez-Banqueri, H. (1987) Inhibition of malate dehydrogenase enzymes by benzimidazole anthelmintics. *Veterinary Parasitology* **24**: 269-274.
- Townson, D. H. (1989) *Echinococcus granulosus*: *in vitro* maintenance of whole cyst and the assessment of effects of Albendazole sulphoxide and praziquantel on the germinal layer. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **83**:664-669.
- Valdez, J., Cedillo, R., Hernández-Campos, A., Yépez, L., Hernández-Luis, F., Navarrete-Vázquez, G., Tapia, A., Cortez, R., Hernández, M., Castillo, R., (2002) Synthesis and Antiparasitic Activity of 1H-Benzimidazole Derivates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **12**:2221-2224.
- Villaverde, C., Alvarez, A. I., Redondo, P., Voces, J., Del Estal, J. L., Prieto, J. G. (1995) Small intestinal sulphoxidation of albendazole. *Xenobiotica* **25**: 433-441.
- Waller, P.J. (2003) The future of anthelmintics in sustainable parasite control programs for livestock. *Helminthology* **40**: 97-102.
- Wolstenholme, A., Fairweather, I., Prichard, R., Samson-Himmelstjerna, G., and Sangster, N. (2004) Drug resistance in veterinary helminthes. *Trends in Parasitology* **20**(10):469-476.
- Yépez L. y Ortega G. (1994) Aspectos actuales sobre el diagnóstico de la triquinelosis. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **36**:127-138.
- <http://www.trichinella.org>