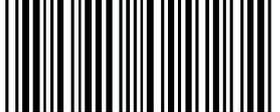




**FCM** Facultad de Ciencias  
Médicas · UNR

Tesis doctoral

**GMD** Facultad Cs. Médicas  
Biblioteca  
  
TDM 2398

**Estudio de la eficacia terapéutica de nuevas  
formulaciones microparticuladas de  
antihelmínticos en líneas del modelo murino CBi-  
IGE que difieren en la susceptibilidad a *Trichinella  
spiralis***

Lic. Ana Victoria Codina

Directora: Dra. Lucila Isabel Hinrichsen

Co-directora: Dra. María Celina Lamas

2023

Instituto de Genética Experimental  
Facultad de Ciencias Médicas  
Universidad Nacional de Rosario

---

## AGRADECIMIENTOS

---

*La presentación de esta tesis no hubiera podido realizarse sin la colaboración de una gran cantidad de personas. Quiero agradecer enormemente su aporte:*

*En primer lugar a mis directoras, la Dra. Lucila Hinrichsen, Luly, cuya dirección y motivación constante han hecho posible la realización de esta tesis, y en quien encontré siempre la ayuda y apoyo que necesité. A la Dra. María Celina Lamas, por abrirme las puertas de su laboratorio y acompañar este proyecto brindándome siempre sus conocimientos.*

*A Paula Indelman y María Delia Vasconi, grandes profesionales, que sin su ayuda no podría haber realizado este trabajo. Gracias por transmitir sus conocimientos, pero sobre todo, por su contención y amistad.*

*A Agus García, Josefina Priotti y Ariana Rosales, por su compañerismo y por estar siempre dispuestas a darme una mano. Gracias por todas las horas que pasamos en el bioterio, al microscopio y procesando muestras.*

*A todo el grupo del IGE, con quienes compartí el día a día, dentro y fuera del laboratorio. Gracias por el granito de arena que cada uno aportó, por el apoyo cuando las cosas no salían como uno deseaba y por las numerosas aventuras vividas durante estos años.*

*A todos los estudiantes de medicina, hoy muchos ya médicos, que pasaron por el IGE y me ayudaron con algún pedacito de esta tesis. En especial a Valeria, Alen, Rocío y Joaquín, con los que formamos un gran equipo.*

*A mis "viejos", Stella y Daniel por su amor, por su paciencia. A mi hermano Sebastián, a mis sobrinos Juana y Manuel, a mi abuela Chiquita, sin ellos esto no hubiera sido posible.*

*A Diego, mi compañero, por su apoyo, su paciencia, por acompañarme en cada paso que doy. Mi más profundo agradecimiento, respeto y amor.*

*A Dante, mi mayor felicidad. Gracias por haber revolucionado mi vida, ser tu mamá es una aventura maravillosa.*

*A todos...GRACIAS!!!*

---

## PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

---

Los resultados de este trabajo final dieron lugar a las siguientes publicaciones:

### Trabajos completos

- ◆ **Codina AV**, Priotti J, Leonardi D, Vasconi MD, Lamas MC, Hinrichsen LI (2021) Effect of sex and genotype of the host on the anthelmintic efficacy of albendazole microcrystals, in the CBi-IGE *Trichinella* infection murine model. ***Parasitology***, 148(13): 1545-1553.
- ◆ **Codina AV**, Priotti J, Leonardi D, Vasconi MD, Hinrichsen LI, Lamas MC (2020) Effect of Genotype and Sex of the Host on the Bioavailability of Novel Albendazole Microcrystals Based on Chitosan and Cellulose Derivatives. ***AAPS PharmSciTech***, 21: 1-8.
- ◆ García A, Priotti J, **Codina AV**, Vasconi MD, Quiroga AD, Hinrichsen LI, Lamas, MC (2019) Synthesis and characterization of a new cyclodextrin derivative with improved properties to design oral dosage forms. ***Drug Delivery and Translational Research***, 9(1): 273-283.
- ◆ **Codina A**, Priotti J, Leonardi D, Lamas MC, Vasconi MD, Hinrichsen L (2017) Estudio de la farmacocinética y eficacia antihelmíntica de formulaciones microcristalinas de albendazol en el modelo murino de trichinellosis CBi-IGE. ***XXV Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM***, Tomo VI, pp. 185-193 (ISBN: 978-99967-884-0-6).
- ◆ Priotti J, **Codina AV**, Leonardi D, Vasconi MD, Hinrichsen LI, Lamas MC (2017) Albendazole Microcrystal Formulations Based on Chitosan and Cellulose Derivatives: Physicochemical Characterization and *In Vitro* Parasitocidal Activity in *Trichinella spiralis* Adult Worms. ***AAPS PharmSciTech***, 18(4):947-956.

### Resúmenes

- ◆ **Codina AV**, Pistelli R, Rosales A, Indelman P, Lamas MC, Hinrichsen L (2022) Pharmacokinetics parameters and therapeutic efficacy of novel mebendazole formulations in resistance mice of the CBi-IGE murine model of trichinellosis. ***Medicina***, Vol 82 (Supl V).  
Trabajo presentado en la Reunión Anual de Biociencias 2022, realizadas en Mar del Plata del 16 al 19 de noviembre de 2022.
- ◆ **Codina AV**, Rosales A, Indelman P, Priotti J, Vasconi MD, Lamas MC, Hinrichsen L (2021) Therapeutic efficacy of novel mebendazole formulations administered during the parenteral stage of *Trichinella spiralis* infection to CBi-IGE mice susceptible to the parasite. ***Medicina***, Vol 81(Supl III).

Trabajo presentado en la Reunión Anual de Biociencias 2021, realizadas de manera virtual del 17 al 20 de noviembre de 2021.

- ◆ **Codina AV**, Rosales A, Marizza V, García P, Morri M, Lamas MC, Hinrichsen L (2021) Pharmacokinetics of novel mebendazole formulations for *Trichinella spiralis* infection treatment, in CBi- IGE mice.  
Trabajo presentado en la 6ta Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. RICiFa 2020+1, realizadas en Córdoba del 10 al 12 de noviembre de 2021.
- ◆ Marizza V, **Codina AV**, Priotti J, Rosales A, Vasconi MD, Leonardi D, Lamas MC, Hinrichsen L (2019) Estudio *in vitro* de la actividad antihelmintica de levamisol en parásitos adultos de *Trichinella spiralis*. **Libro de Resúmenes de la Sociedad de Biología de Rosario 2019**.  
Trabajo presentado en el XXI Congreso y XXXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, realizado en Rosario.
- ◆ **Codina AV**, Priotti J, Marizza V, Rosales A, Vasconi MD, Leonardi D, Lamas MC, Hinrichsen L (2019) *In vitro* study of the parasitocidal activity of novel mebendazole formuatioms on female adult forms of *Trichinella spiralis*. **Medicina**, Vol 79 (Supl IV).  
Trabajo presentado en la Reunión Anual de Biociencias 2019, realizadas en Mar del Plata del 20 al 23 de noviembre de 2019.
- ◆ **Codina AV**, Priotti J, Vasconi MD, Leonardi D, Lamas MC, Hinrichsen LI (2018) Pharmacokinetic parameters and therapeutic efficacy of albendazole (ABZ) microcrystal formulations in susceptible mice of the CBi-IGE murine model of trichinellosis. **Medicina**, Vol 78 (Supl III).  
Trabajo presentado en la LXIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, realizadas en Mar del Plata del 20 al 23 de noviembre de 2018.
- ◆ Marizza V, **Codina AV**, Priotti J, Vasconi MD, Leonardi D, Lamas MC, Hinrichsen LI (2018) Therapeutic efficacy of novel microcrystalline formulations of albendazole (ABZ) in the acute stage of infection with *Trichinella spiralis* (Ts), in mice with different susceptibility to the parasite. **Medicina**, Vol 78(Supl III).  
Trabajo presentado en la LXIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, realizadas en Mar del Plata del 20 al 23 de noviembre de 2018.
- ◆ **Codina AV**, Priotti J, Vasconi MD, Leonardi D, Lamas MC, Hinrichsen LI (2018) Pharmacokinetics and anthelmintic efficacy of albendazole microcrystalline formulations in CBi-IGE mice differing in susceptibility to *Trichinella spiralis* infection. **Book of abstracts: Drug Discovery for Neglected Diseases International Congress 2018**. ISBN 978-987-47034-0-8.  
Trabajo presentado en Drug Discovery for Neglected Diseases International Congress 2018, realizado en Buenos Aires del 4 al 6 de diciembre de 2018.
- ◆ Priotti J, **Codina AV**, Salomon C, Leonardi D, Vasconi MD, Lamas MC, Hinrichsen LI (2017) Evaluation of the Efficacy of ABZ Solid Formulations on Trichinellosis

Chronic Stage. Studies in Male and Female CBI Mice Different Susceptibility to the Infection.

Trabajo presentado en AAPS Annual Meeting and Exposition, realizado en San Diego (Estados Unidos) en diciembre de 2017.

- ◆ **Codina AV**, Priotti J, Vasconi MD, Leonardi D, Lamas MC, Hinrichsen LI (2016) Therapeutic efficacy of albendazole (ABZ) microcrystal formulations administered during the parenteral stage of *Trichinella spiralis* infection to CBI-IGE mice resistant to the parasite. *Medicina*, Vol 76 (Supl I).  
Trabajo presentado en LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, realizado en Mar del Plata del 16 al 19 de noviembre de 2016.

## **PREMIOS**

- ◆ **Mejor póster**  
El trabajo "THERAPEUTIC EFFICACY OF NOVEL MEBENDAZOLE FORMULATIONS ADMINISTERED DURING THE PARENTERAL STAGE OF *Trichinella spiralis* INFECTION TO CBI-IGE MICE SUSCEPTIBLE TO THE PARASITE" presentado en la sesión Agentes Antimicrobianos 1 en la **Reunión Anual de Sociedades de Biociencias 2021**, realizadas del 17 al 20 de noviembre 2021, de manera virtual, ha ganado el premio al mejor póster.

---

## ÍNDICE

---

<b>Abreviaturas</b> .....	<b>I</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>II</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1. Introducción .....	1
1.2. Trichinellosis .....	2
1.2.1. Características de la enfermedad .....	4
1.2.2. Estadísticas y situación actual .....	6
1.2.3. Resistencia del hospedero a la trichinellosis .....	9
1.3. <i>Trichinella spiralis</i> .....	11
1.3.1. Descripción taxonómica .....	11
1.3.2. Descripción morfológica .....	11
1.3.3. Ciclo biológico de <i>Trichinella spiralis</i> .....	13
1.3.3.1. Fase intestinal .....	13
1.3.3.2. Fase migratoria .....	14
1.3.3.3. Fase crónica .....	14
1.3.4. Hospederos .....	15
1.4. Benzimidazoles en la quimioterapia antihelmíntica .....	16
1.4.1. Mecanismos de acción .....	19
1.4.1.1. Inhibición del metabolismo energético .....	19
1.4.1.2. Inhibición de la polimerización de la tubulina .....	19
1.4.2. Farmacocinética de benzimidazoles .....	21
1.4.3. Estrategias para mejorar la solubilidad .....	23
1.4.4. Efecto del sexo en la farmacocinética de los medicamentos .....	26

1.4.5. Efecto del genotipo en la farmacocinética de los medicamentos .....	27
1.4.6. Farmacogenética: interacción hospedero/fármaco .....	28
1.5. Modelos animales para la comprensión de enfermedades humanas .....	30
1.5.1 Modelo experimental para el estudio de la trichinellosis y su terapia asociada .....	33
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>36</b>
2.1. Objetivos generales .....	36
2.2. Objetivos específicos .....	36
<b>3. Materiales y Métodos .....</b>	<b>37</b>
3.1. Animales .....	37
3.2. Parásito .....	38
3.3. Infección .....	38
3.4. Diseño y preparación de nuevas formulaciones de antihelmínticos .....	41
3.5. Evaluación de la actividad antihelmíntica <i>in vitro</i> de las nuevas formulaciones de benzimidazoles .....	41
3.5.1. Obtención de hembras adultas de <i>T. spiralis</i> .....	41
3.5.2. Ensayo <i>in vitro</i> .....	42
3.6. Ensayo <i>in vivo</i> . Análisis farmacocinético .....	43
3.6.1. Preparación y administración de los fármacos; obtención y procesamiento de las muestras .....	44
3.6.2. Parámetros farmacocinéticos .....	45
3.7. Ensayo <i>in vivo</i> . Evaluación de la eficacia terapéutica de las nuevas formulaciones de benzimidazoles .....	46
3.7.1. Análisis de la eficacia terapéutica. Etapa enteral .....	47
3.7.2. Análisis de la eficacia terapéutica. Etapa migratoria .....	48
3.7.3. Análisis de la eficacia terapéutica. Etapa parenteral .....	48
3.8. Albendazol .....	50

3.8.1. Ensayo <i>in vitro</i> .....	52
3.8.2. Análisis HPLC .....	52
3.8.3. Ensayo <i>in vivo</i> .....	53
3.9. Mebendazol .....	53
3.9.1. Ensayo <i>in vitro</i> .....	54
3.9.2. Análisis HPLC .....	54
3.9.3. Ensayo <i>in vivo</i> .....	55
3.10. Análisis estadístico .....	55
<b>4. Resultados .....</b>	<b>56</b>
<b>I. ALBENDAZOL .....</b>	<b>56</b>
4.1. Actividad antihelmíntica <i>in vitro</i> de microcristales de albendazol .....	56
4.2. Análisis farmacocinético .....	59
4.3. Actividad antihelmíntica <i>in vivo</i> de microcristales de albendazol .....	64
4.3.1. Eficacia terapéutica en la etapa enteral .....	64
4.3.2. Eficacia terapéutica en la etapa migratoria .....	66
4.3.3. Eficacia terapéutica en la etapa parenteral .....	67
<b>II. MEBENDAZOL .....</b>	<b>69</b>
4.4. Actividad antihelmíntica <i>in vitro</i> de la nanopartícula y complejo de inclusión de mebendazol .....	69
4.5. Análisis farmacocinético .....	70
4.6. Actividad antihelmíntica <i>in vivo</i> de NP y Comp de MBZ .....	74
<b>5. Discusión y Conclusiones .....</b>	<b>77</b>
<b>6. Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>98</b>

---

**ABREVIATURAS**

---

<b>ABZ</b>	albendazol
<b>ABZSO</b>	albendazol sulfóxido
<b>ABZSO2</b>	sulfona
<b>ADME</b>	absorción, distribución, metabolismo y excreción de fármacos
<b>ANOVA</b>	análisis de la varianza (por sus siglas en inglés: <u>A</u> nalysis <u>O</u> f <u>V</u> ariance)
<b>ATP</b>	adenosín trifosfato (por sus siglas en inglés: <u>A</u> denosine <u>T</u> riphosphate)
<b>AUC</b>	área bajo la curva (por sus siglas en inglés: <u>A</u> rea <u>U</u> nder the <u>C</u> urve)
<b>AUCr</b>	biodisponibilidad relativa
<b>BZD</b>	benzimidazoles
<b>C-β-CD</b>	citrato de beta-ciclodextrina
<b>CYP</b>	gen del citocromo P450
<b>C<sub>max</sub></b>	concentración plasmática máxima
<b>CMC</b>	carboximetilcelulosa
<b>Comp</b>	complejo de inclusión
<b>CPr</b>	carga parasitaria muscular relativa
<b>DMET</b>	enzimas y transportadores del metabolismo de fármacos
<b>DMSO</b>	dimetil sulfóxido
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>Fh</b>	fecundidad de la hembra de <i>Trichinella spiralis</i>
<b>Fig.</b>	Figura
<b>h</b>	hora
<b>HEC</b>	hidroxietilcelulosa
<b>HPMC</b>	hidroxipropilmetilcelulosa
<b>L1</b>	larva infectante
<b>LRN</b>	larva recién nacida
<b>MBZ</b>	mebendazol
<b>MDR1</b>	gen de resistencia múltiple a drogas
<b>MC</b>	metilcelulosa
<b>min</b>	minuto(s)
<b>n</b>	número
<b>NADPH</b>	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
<b>NPs</b>	nanopartículas poliméricas
<b>nPA</b>	número total de parásitos adultos intestinales
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>pi</b>	posinfección
<b>P338</b>	poloxámero 338
<b>PVA</b>	polivinilalcohol
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>RPMI</b>	Medio de cultivo del Instituto Parque Memorial de Roswell (por sus siglas en inglés: <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute)
<b>SENASA</b>	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
<b>SNP</b>	sustituciones de un solo nucleótido (por sus siglas en inglés: <u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism)
<b><i>T. spiralis</i></b>	<i>Trichinella spiralis</i>
<b>Th</b>	célula T “helper” o colaboradora
<b>T<sub>max</sub></b>	tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>Q</b>	qitosano

---

## RESUMEN

---

El albendazol y el mebendazol, antiparasitarios de amplio espectro, son los fármacos de elección para el tratamiento oral de la trichinellosis, enfermedad parasitaria causada por el helminto *Trichinella spiralis*. Sin embargo, ambos pertenecen a la Clase II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, por tener una solubilidad acuosa extremadamente pobre que limita su absorción oral. Actualmente estos benzimidazoles se consideran efectivos cuando son administrados en la fase aguda de la trichinellosis. Ya en la cronicidad, como consecuencia de la baja solubilidad en agua, solo pequeñas cantidades de fármaco logran alcanzar las larvas encapsuladas, limitando la efectividad antiparasitaria. Por ello, se propuso como objetivo de este trabajo obtener formulaciones con mayor solubilidad, que potencien la actividad antihelmíntica de estos fármacos y actúen sobre las distintas etapas del ciclo de *Trichinella spiralis*. Los nuevos sistemas terapéuticos de albendazol consistieron en 20 formulaciones microcristalinas obtenidas por precipitación controlada y secado por aspersión, empleando diferentes polímeros en la estabilización. Para mebendazol se prepararon un sistema nanoparticulado (NP) por secado por atomización y un complejo de inclusión con citrato de  $\beta$ -ciclodextrina (Comp). La evaluación de la eficacia terapéutica de las nuevas formulaciones se hizo en ratones de ambos sexos del modelo murino de trichinellosis CBi-IGE, utilizando las líneas CBi+ y CBi/L que muestran fenotipos extremos de susceptibilidad al parásito. El efecto de las formulaciones sobre la carga parasitaria se analizó en las fases intestinal, migratoria y crónica de la enfermedad, evaluándose también los posibles efectos adversos del tratamiento. Los protocolos de tratamiento consistieron en dosis bajas de antiparasitario, administradas por períodos cortos (3 días) cuando las formulaciones actualmente en uso se dan en dosis altas y/o por períodos más prolongados. En este modelo experimental y en las condiciones en que se hicieron los experimentos, no se observaron efectos adversos debidos a la infección o los tratamientos. Los microcristales de albendazol a base de hidroxietilcelulosa (S4A) y quitosano (S10A) mejoraron significativamente la actividad antiparasitaria del ingrediente farmacéutico activo. Si bien albendazol, S4A y S10A fueron igualmente efectivos cuando se administraron en la etapa aguda de la infección, en la etapa

migratoria los ratones macho tratados con S4A y S10A redujeron a la mitad la carga parasitaria muscular en comparación con los que recibieron albendazol puro. En la etapa crónica sólo los machos de la línea CBi/L tratados con S10A mostraron una eficacia terapéutica mejor que el albendazol. Asimismo, la nanopartícula y el complejo de inclusión de mebendazol desarrollados mejoraron las propiedades biofarmacéuticas del fármaco y, al ser administrados en la fase crónica de la trichinellosis, aumentaron significativamente la eficacia terapéutica en comparación con el mebendazol puro, tanto en machos como en hembras. El modelo murino de trichinellosis utilizado en esta tesis permitió examinar la compleja y dinámica relación entre hospedero – parásito – fármaco además de corroborar la influencia del genotipo y sexo sobre la respuesta farmacológica. Uno de los beneficios de un desempeño mejorado de una formulación es la posibilidad de usar dosis más bajas del ingrediente activo *in vivo*, que sería menos tóxico para el hospedero y permitiría tratamientos más prolongados. La mejora en las propiedades farmacocinéticas de las formulaciones desarrolladas se reflejó en una disminución significativa de la carga parasitaria muscular, en comparación con los grupos control y benzimidazol puro. Los resultados mostraron que las formulaciones serían sistemas adecuados para tratar la infección por *Trichinella spiralis* en la fase crónica.

---

## 1. INTRODUCCIÓN

---

### 1.1. Introducción

Las enfermedades desatendidas son un conjunto diverso de infecciones bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias. Son consideradas endémicas y afectan a más de mil millones de personas en 149 países. Prevalen en países subdesarrollados o económicamente desfavorecidos (Burgos *et al.*, 2020). La prevención y el control de estas enfermedades generalmente relacionadas con la pobreza, requieren un abordaje multidisciplinario, muchas veces basado en acciones dirigidas al control de los vectores, con el fin de reducir el impacto negativo sobre la salud y el bienestar social y económico.

Las enfermedades producidas por parásitos se caracterizan por ser crónicas. El parásito depende metabólicamente y evolutivamente del hospedador, tendiendo a un equilibrio complejo y durable entre ambas especies (Barriga, 1999). La agresión parasitaria es limitada por la respuesta inmune sin lograr, en la mayoría de los casos, la eliminación completa del agente extraño. Aunque raramente causan la muerte, los parásitos suelen estar asociados a niveles elevados de morbilidad e imponen una carga económica importante en las áreas donde la infección es endémica (Onah & Nawa, 2000).

La endemidad de las parasitosis es el resultado de un proceso dinámico, basado en infecciones repetidas, en el cual intervienen múltiples factores interrelacionados entre los que pueden mencionarse factores ecológicos, inmunológicos, genéticos, fisiológicos y nutricionales, todos ellos enmarcados en condiciones socioeconómicas y culturales que favorecen la presencia de dichas enfermedades. Por otra parte, los fenómenos migratorios amplían los límites geográficos de algunas enfermedades creando nuevos problemas de salud pública en áreas no afectadas previamente.

Las poblaciones más expuestas a las infecciones parasitarias son aquellas que viven en áreas donde carecen de acceso a los servicios básicos, agua, saneamiento, vivienda y transporte. Debido a que no representan un mercado económicamente atractivo, existe un escaso interés desde las industrias

farmacéuticas y biomédicas en lograr mejores tratamientos para combatir estas enfermedades. La quimioterapia disponible contra las parasitosis intestinales son albendazol, mebendazol, levamisol y pirantel. Estos antihelmínticos están actualmente en la lista modelo de la OMS (Organización Mundial de la Salud) de medicamentos esenciales para el tratamiento y control de estas enfermedades desatendidas.

Los brotes de estas enfermedades suelen ser frecuentes debido en gran parte a su naturaleza zoonótica, que no se reconoce al comienzo de la enfermedad, por lo que puede propagarse de forma inadvertida durante cierto tiempo.

Actualmente, la trichinellosis es una de las enfermedades desatendidas más prevalentes del mundo (Jin *et al.*, 2020). Es una enfermedad parasitaria de origen alimentario causada por nematodos del género *Trichinella*. Estos tienen la capacidad de infectar a más de 150 especies de mamíferos domésticos y silvestres y, si bien todas las especies son potencialmente patógenas para el ser humano, el principal agente etiológico causante de la enfermedad humana es *Trichinella spiralis*. La trichinellosis se considera la séptima parasitosis más importante a nivel mundial (Muñoz-Carrillo *et al.*, 2018). Su diagnóstico y tratamiento en estadios tempranos resulta difícil y aún no se han encontrado tratamientos lo suficientemente efectivos para limitar la infección.

Ante esta problemática terapéutica, la investigación científica en el desarrollo de tratamientos más eficaces es de relevancia directa para la salud humana y animal. La implementación de nuevas estrategias farmacéuticas, tales como fármacos más eficaces, evaluación optimizada de su eficacia y marcadores para posibles resistencias a antihelmínticos mejorados, serán necesarias para lograr la reducción de la morbilidad o eliminación de la infección.

## **1.2. Trichinellosis**

La trichinellosis es una enfermedad parasitaria de origen alimentario causada por nematodos del género *Trichinella* (Bruschi 2012; Krivokapich *et al.*, 2012). Esta zoonosis se produce por el consumo de carne o derivados cárnicos, crudos o mal cocidos, de diferentes especies infectados con larvas musculares de *Trichinella* (Murrell, 2016).

De todas las especies del género *Trichinella*, *T. spiralis* es la causante de la mayoría de las infecciones de trichinellosis en humanos en el mundo y, de las 32 especies de nematodos capaces de infectar al hombre, se ha señalado a ésta como la más peligrosa (Ramírez Valenzuela, 1981). Su patogenicidad es mayor que la del resto de las especies del género debido a su alto índice de capacidad reproductiva y a la intensidad de la reacción inmunológica que desencadena en el hospedador (Pozio *et al.*, 1992; Pasqualetti, 2014). A causa de su baja especificidad para reproducirse y mantenerse en distintos ambientes, *T. spiralis* es capaz de afectar a más de 100 especies de mamíferos, aunque también se la ha encontrado en pájaros, reptiles y artrópodos (Kapel, 2000), los cuales se comportan como reservorios y fuentes de infección para el hombre. Este amplio rango de vertebrados capaces de infectarse con el parásito es el responsable del mantenimiento de la infección en la naturaleza, actuando la especie humana como fondo de saco epidemiológico en el proceso de transmisión (Ramírez Valenzuela, 1981). Una importante adaptación del parásito es el metabolismo anaeróbico utilizado por las larvas musculares para promover su supervivencia en cadáveres en descomposición, facilitando así su transmisión (Despommier, 1990). Cuanto mayor sea la persistencia de larvas viables en la carne en descomposición, mayor es la probabilidad de ser ingerida por un animal carroñero.

Hasta el momento se han hallado vertebrados infectados en todos los continentes, con excepción de la Antártida. En Argentina, se la considera una enfermedad endémica con picos epidémicos, donde la endemicidad en el hombre se debe principalmente a las pautas culturales por las que el consumo de alimentos conteniendo carne cruda o semi-cocida es habitual. En nuestro país, la principal fuente de infección para el ser humano es el cerdo (Pozio, 2007; Murrell, 2016), aunque también existen otras, como el jabalí o el puma (Ribicich *et al.*, 2005; Cohen *et al.*, 2010). Con respecto a los cerdos domésticos, la parasitosis está estrictamente relacionada a las condiciones de crianza de los mismos, especialmente la alimentación y presencia de animales sinantrópicos en criaderos o basurales cercanos. La crianza sin las medidas de control adecuadas, el consumo domiciliario de cerdos, la elaboración y venta clandestina de subproductos crudos sin control en la faena, y la voluntad y

apetencia de los consumidores por estos productos, perpetúan la transmisión de esta parasitosis.

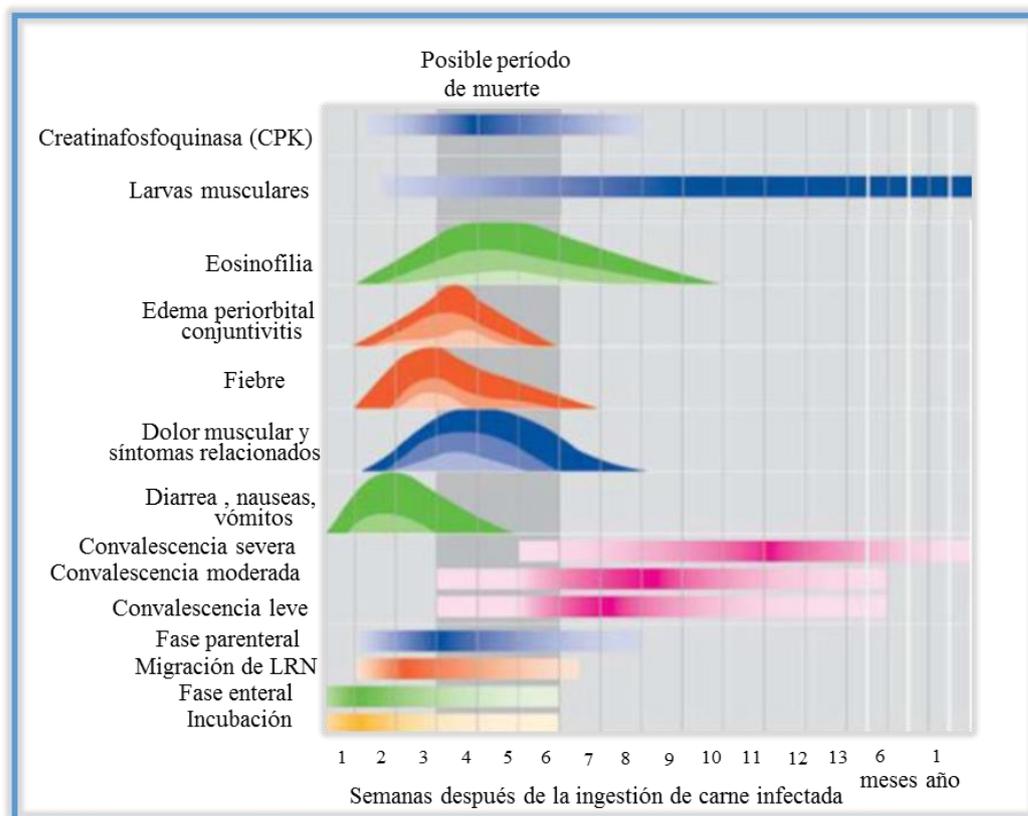
### **1.2.1. Características de la enfermedad**

Con la finalidad de mantener su ciclo de vida, los parásitos nematodos establecen infecciones crónicas que impactan de manera importante en la salud del hospedero (Zaph *et al.*, 2014). Asimismo, la evolución de la enfermedad está relacionada con la edad, sexo, estado inmunológico y salud general de la persona infectada (Capó & Despommier, 1996).

El curso clínico de la trichinellosis humana puede describirse en función de las fases del ciclo de vida del parásito: una fase enteral o intestinal y una fase parenteral o sistémica. La fase enteral o intestinal comienza con la liberación de las larvas musculares en el estómago y la posterior invasión de los parásitos adultos en el intestino, produciendo un proceso inflamatorio de intensidad variable. Generalmente, uno a dos días luego de la ingestión de carne de un animal infectado con el parásito pueden aparecer los primeros signos y síntomas bajo la forma de náuseas, diarreas, vómitos y dolor abdominal. A ellos se suman cefalea y astenia. Con menor frecuencia aparecen los signos oculopalpebrales, fundamentalmente el edema palpebral, bilateral, simétrico e indoloro, producto de los fenómenos toxialérgicos (Despommier, 2005). Dichas manifestaciones clínicas pueden confundirse con otras enfermedades. Al respecto, Gould (1945) señaló 49 enfermedades de la especie humana que tienen manifestaciones similares a la trichinellosis, entre ellas influenza, gastroenteritis, conjuntivitis, artritis, estados gripales e intoxicaciones alimentarias. Es por esto que, en general, los pacientes no consultan al médico, permitiendo que el ciclo evolutivo del parásito continúe y desarrolle la enfermedad (Pawlowski, 1983; Capó & Despommier, 1996; Dupouy-Camet & Bruschi, 2007).

La fase parenteral o sistémica comprende la etapa de migración de las larvas recién nacidas y la invasión de los músculos esqueléticos. Entre la segunda y sexta semana posinfección ambas fases ocurren al mismo tiempo; sin embargo, los signos y síntomas asociados a la fase intestinal decaen y

comienzan a desarrollarse aquellos relacionados con la migración de las larvas recién nacidas. Las manifestaciones clínicas se deben al proceso de invasión tisular que ocurre en dicho estadio y a la respuesta inmunológica que se desarrolla debido a esto. Los principales signos y síntomas que se observan son el edema facial y/o periorbital, mialgias, astenia severa, conjuntivitis, fiebre, dolor de cabeza, rash cutáneo, bronquitis, disnea, alteraciones de la visión y pérdida de peso. En el 75-90 % de los pacientes se detectan niveles elevados de las enzimas musculares creatina fosfoquinasa, lactato deshidrogenasa y aldolasa, debido a la invasión de la fibra muscular y, en la mayoría de casos, se encuentra una elevación anormal de eosinófilos (Fig. 1). Dentro de las complicaciones secundarias se ven involucrados órganos tales como el corazón, sistema nervioso central, pulmones y riñones. Las complicaciones más severas son neumonitis, edema agudo de pulmón, fallas ventilatorias, nefritis aguda, encefalitis y miocarditis (Pawlowski, 1983; Compton *et al.*, 1993; Capó & Despommier, 1996; Kocięcka, 2000; Dupouy-Camet & Bruschi, 2007; Neghina *et al.*, 2012).



**Figura 1.** Evolución esquemática de las diferentes etapas y signos biológicos de trichinellosis humana. Adaptada de Despommier, 2005.

La miocarditis y la encefalitis son infrecuentes y se deben al cuadro toxémico general y no a la acción directa del parásito, ya que el mismo no se enquistaba ni en el miocardio ni en el sistema nervioso (Atías, 1999a).

La variación en el tiempo de aparición y la severidad de las manifestaciones clínicas están directamente relacionadas al número de larvas ingeridas por kilogramo de peso del hospedero infectado. En general, se acepta que los síntomas de la enfermedad en el ser humano se ponen de manifiesto cuando el número de larvas ingeridas es igual o superior a 50-70 larvas infectantes (Calcagno *et al.*, 2005), aunque modelos matemáticos estiman que esta dosis infectiva podría ser menor (Teunis *et al.*, 2012). A diferencia del ser humano, los signos clínicos observados de forma natural o experimental en animales infectados son muy escasos y suelen depender de la especie de *Trichinella*, la carga de gusanos y la especie animal involucradas.

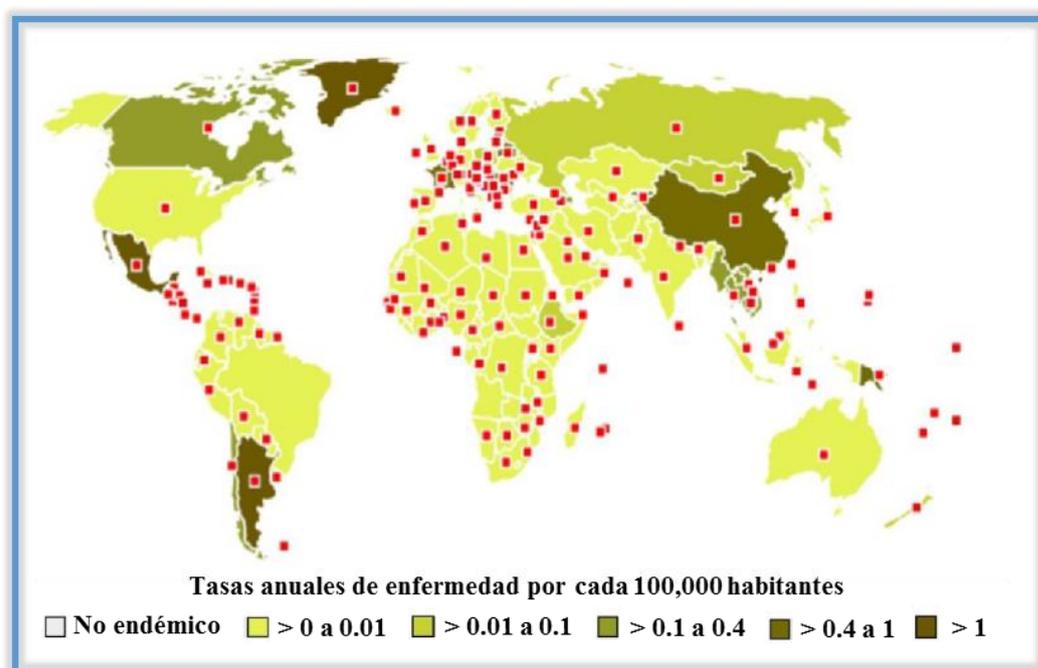
### 1.2.2. Estadísticas y situación actual

En el año 2014 la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) junto con la OMS publicaron una lista con los 10 principales parásitos transmitidos por los alimentos, que afectan a la salud de millones de personas cada año en todo el mundo, infectando tejidos musculares y órganos y causando serios problemas de salud. *T. spiralis* ocupó el séptimo lugar, por debajo de parásitos de importancia médica como *Taenia solium*, *Toxoplasma gondii* y *Entamoeba histolytica*. Actualmente la trichinellosis sigue siendo una enfermedad parasitaria transmitida por alimentos de gran importancia médica a nivel mundial (Muñoz-Carrillo *et al.*, 2018).

La incidencia de trichinellosis en seres humanos y su efecto sobre la salud fueron investigados entre 1986 y 2009 a través de una revisión sistemática de la literatura internacional (Murrell & Pozio, 2011). Según la OMS, durante ese período, se registraron más de 65.818 casos de trichinellosis en el mundo, con más de 42 casos fatales (Berger, 2017) en las regiones de América, África, sur de Asia y Europa debido a su alta infectividad (Pozio & Zarlenga, 2013; Pozio, 2014). No obstante, se estima que actualmente 11 millones de humanos en el

mundo están infectados por las especies de *Trichinella*, principalmente por *T. spiralis* (Berger, 2017).

La aparición de esta enfermedad en los seres humanos, así como la circulación del parásito en animales silvestres y domésticos, varía mucho de un país a otro (Fig. 2). Esto podría deberse al interés disímil mostrado por los veterinarios, biólogos, médicos y epidemiólogos en el estudio de las infecciones y/o brotes causados por este nematodo, a los diferentes hábitos alimentarios, algunos relacionados a prácticas religiosas, y a las distintas normativas nacionales relacionadas con el control de este patógeno zoonótico.

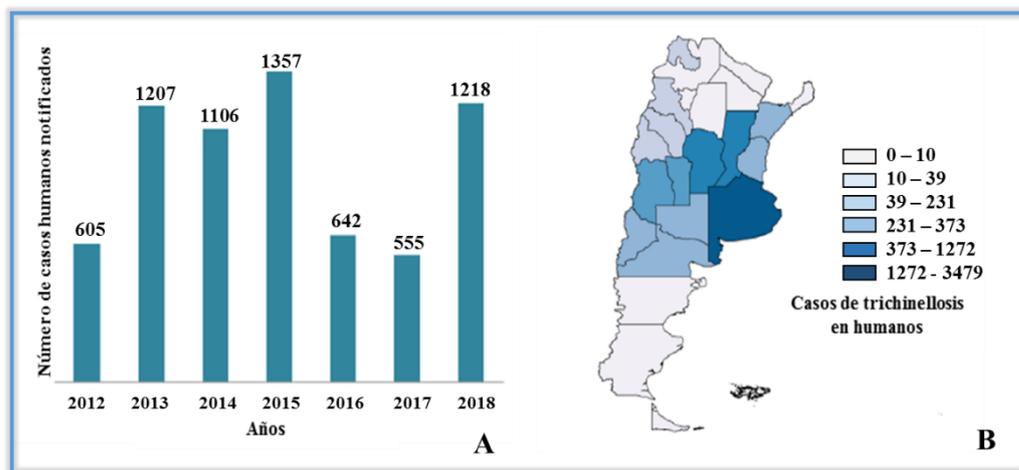


**Figura 2.** Distribución mundial de la trichinelosis. Los casos reportados fueron causados por las diferentes especies del parásito del género *Trichinella*. Adaptada de Berger, 2017.

En Argentina, desde 1960, la infección con este parásito está incluida dentro de las enfermedades alimentarias de notificación médica obligatoria por Ley Nacional (Ley n.º 15.465, 29 de septiembre de 1960). En el Ministerio de Salud hay registros de casos desde el año 1974. En el año 1993 se efectuó una revisión de estas enfermedades y se incluyó en el grupo de las que tienen posibilidad de control a través de acciones sobre el foco (Guanera *et al.*, 2006). Sin embargo, a pesar de ser un evento de notificación obligatoria, resulta difícil determinar la prevalencia en el país debido a la subestimación de los casos.

Cabe destacar que, si los brotes epidémicos ocurren durante el invierno, el caso puede confundirse con un estado gripal.

En nuestro país, en los últimos 15 años, más de 11.000 casos de trichinellosis fueron documentados por el consumo de carne de cerdos domésticos (Pozio, 2021). Durante el período 2012-2018, los casos sospechosos de trichinellosis en humanos ascendieron a 6.690 (Fig. 3). En 2018, el número de casos por 100.000 habitantes mostró que las provincias con mayor prevalencia fueron: San Luis (19,97), Córdoba (14,98), Mendoza (9,64), Santa Fe (2,70) y Buenos Aires (1,33) (Ministerio de Salud, 2019). Se debe destacar la comercialización de productos elaborados clandestinamente como factor de ampliación del número de casos humanos afectados en los brotes. También se han producido casos en la provincia de San Luis y La Pampa por consumo de carne de jabalí (Ministerio de Salud, 2021).



**Figura 3.** Trichinellosis en humanos durante el período 2012-2018 en Argentina. A) Número anual de casos notificados; B) distribución geográfica. Adaptadas de Ribicich *et al.*, 2020.

Según el informe del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA, 2019) entre los años 2010 y 2019 se registraron 509 protocolos emitidos para la enfermedad trichinellosis. El 82.3 % fue en relación al porcino doméstico, 16.7% al porcino silvestre y 0.99 % al puma. Del total de notificaciones, se registraron 476 focos (93.5 %), mientras que el resto de los 33 protocolos fueron contabilizados como sospechas no confirmadas o casos descartados (6.5 %). El gran número de casos sospechosos no concluyentes se

debe a la necesidad de contar con tres muestras seriadas de resultado negativo para descartar el caso; pero muchas veces no es posible acceder a una segunda o tercera muestra.

En la ciudad de Rosario, entre enero y julio de 2022 (Semana Epidemiológica - SE- 1 a 28) el Sistema Municipal de Epidemiología recibió 17 notificaciones de sospecha de trichinellosis en residentes de la ciudad. Del total de casos notificados, 3 fueron confirmados, 3 fueron clasificados como probables, y los 11 restantes fueron clasificados como sospechosos según los resultados de los correspondientes análisis bioquímicos (Sistema Municipal de Epidemiología. Secretaría de Salud Pública. Municipalidad de Rosario, 2022).

Desde su descubrimiento hasta ahora, esta parasitosis no ha podido ser erradicada, por lo que la prevención es clave. Actualmente, la prevención se basa en promover la crianza adecuada y responsable de cerdos, el control de las reses faenadas y la educación sanitaria a nivel del consumidor, agricultor y cazador. Estas medidas deben complementarse con otras que aseguren la rápida intervención de los servicios de salud y sanidad animal para contener los brotes. El diagnóstico y tratamiento temprano de las personas expuestas es fundamental para disminuir la probabilidad de desarrollo de formas graves de la enfermedad; así como también es necesario el decomiso y destrucción de los productos alimenticios posiblemente contaminados, para reducir el riesgo de trichinellosis en la población.

### **1.2.3. Resistencia del hospedero a la trichinellosis**

El término *resistencia* a nematodos ha sido definido como la habilidad de un hospedero para iniciar y mantener una respuesta que evite o reduzca el establecimiento de los parásitos (Albers & Gray, 1987). Los animales resistentes no son completamente refractarios a la enfermedad y muchas veces sólo albergan menos parásitos que los animales susceptibles.

Cuando un parásito logra ingresar a un ser viviente se establece una relación en la cual intervienen gran cantidad de factores, algunos dependientes del parásito (cepa, grado de virulencia, dosis infectiva, tropismo especial por determinados órganos y tejidos) y otros dependientes del hospedero (edad,

raza, sexo, estado inmunitario, estado nutricional). La combinación de estos factores es la que determina el desarrollo de una infección simple, en la cual el hospedero no presenta sintomatología clínica, o de una enfermedad, donde el huésped presenta signos y síntomas como consecuencia de la parasitosis. La susceptibilidad a infecciones parasitarias es, por tanto, el resultado de una ecuación compleja en la que interaccionan el ambiente, el genotipo del hospedero y el genotipo del parásito (Nino Incani *et al.*, 2001). Más aún, parásitos como los helmintos han adquirido la capacidad de atenuar la respuesta inmune del hospedero, protegiéndose de la expulsión y minimizando la patología del huésped (Maizels & Yazdanbakhsh, 2003); con el fin de asegurar su supervivencia y lograr la cronicidad.

Este concepto de inmunomodulación mediada por parásitos incluye supresión, desviación y/o conversión de la respuesta inmune del huésped para el propio beneficio del parásito, con el objetivo de evitar su expulsión del organismo (Maizels & McSorley, 2016). El nematodo *T. spiralis* se caracteriza, además, por tener un complejo ciclo evolutivo en el cual se alternan formas morfológicas extracelulares e intracelulares provocando amplios y variados mecanismos de defensa del huésped para resistir la invasión. Frente a una infección con *T. spiralis*, el sistema inmune del hospedero tiene por delante un gran desafío, ya que está bajo la influencia de los componentes antigénicos que se producen en cada una de las etapas del ciclo biológico del parásito (Gruden-Movsesijan *et al.*, 2011).

El grado de infección muscular alcanzado por el hospedero será una medida de su resistencia/susceptibilidad y está altamente influenciado por el número de larvas recién nacidas que hayan logrado migrar hasta el músculo (Bell, 1998). Una efectiva respuesta inmune buscará la expulsión rápida de parásitos intestinales, limitará la fecundidad de la hembra y tratará de dañar y/o destruir las larvas recién nacidas. Hay evidencia que sugiere que el genotipo del parásito (Wakelin *et al.*, 2002; Neghina *et al.*, 2012) y dosis de infección (Wassom *et al.*, 1984a, b), en combinación con el genotipo del huésped, pueden influir en el resultado general de la respuesta.

### 1.3. *Trichinella spiralis*

#### 1.3.1. Descripción taxonómica

Hasta la década del 60 se consideró que el género *Trichinella* estaba constituido por una sola especie, *Trichinella spiralis* (Pozio *et al.*, 2009). En 1972, tres nuevas especies fueron reconocidas para este género (*T. nativa*, *T. nelsoni*, *T. pseudospiralis*) y entre los años 1992 y 2020 se descubrieron 6 especies más (*T. britovi*, *T. murrelli*, *T. papuae*, *T. zimbabwensis*, *T. patagoniensis*, *T. chanchalensis*) y 3 genotipos que aún aguardan una definición taxonómica (*Trichinella* T6, T8 y T9) (Sharma *et al.*, 2020).

Hace más de siglo y medio del descubrimiento de *T. spiralis* y, desde entonces hasta nuestros días, el interés suscitado por este nematodo ha sido enorme, tanto desde el punto de vista sanitario, por la zoonosis que produce, como por su idoneidad como modelo de laboratorio.

#### 1.3.2. Descripción morfológica

*Trichinella spiralis*, como todo nematelminto, se caracteriza por ser cilíndrico, alargado y rodeado de una pared externa, la cutícula. En su ciclo de vida se presenta bajo tres estadios: adultos (macho y hembra), larva recién nacida y larva infectante (L1) (Reveles *et al.*, 1996).

Los machos miden entre 1.4 y 1.6 mm de longitud por 40  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 4A) y las hembras de 3 a 4 mm de largo por 60  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 4B) (Reveles *et al.*, 1996). Los machos caracterizan por presentar en su extremo posterior un par de mamelones copulatorios (Reveles *et al.*, 1996; Ash, 2010). En su parte anterior los adultos poseen un esófago musculoso que se continúa con una zona glandular (esticosoma) cuyas células poseen gránulos secretores altamente antigénicos.

Las larvas recién nacidas son pequeñas, miden de 80 a 120  $\mu\text{m}$  de longitud por 6  $\mu\text{m}$  de diámetro, y presentan forma de cigarro (Fig. 4C). Su tamaño no se modifica en su migración desde el intestino hasta el músculo (Ramírez Valenzuela, 1981). Aunque no tienen desarrollado su sistema interno (presentan un conjunto de células, quizás germinales, pero no órganos), en el

extremo anterior poseen un estilete con el cual perforan los vasos sanguíneos y/o linfáticos, ya que el sitio de penetración muestra rasgos de desorganización como si se tratara de un proceso mecánico (Moreno *et al.*, 2009).

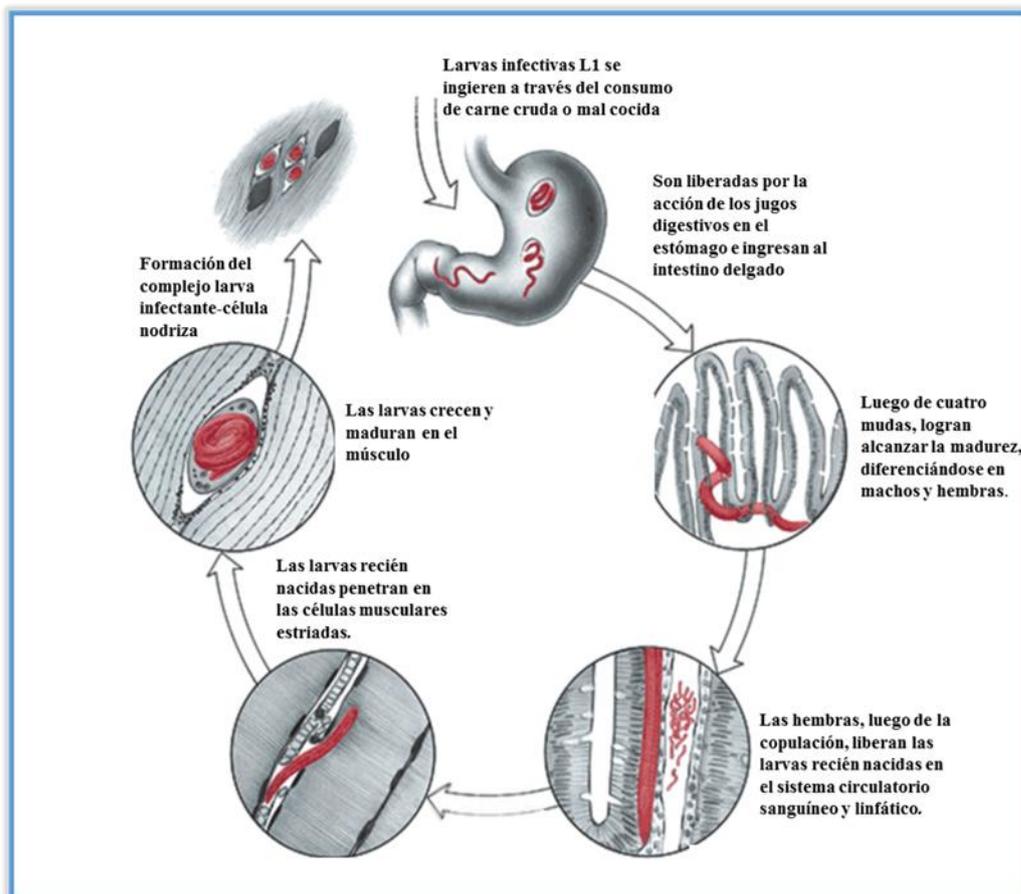


**Figura 4.** Microfotografía de las distintas formas morfológicas de *T. spiralis*. A) macho adulto (magnificación 200x); B) hembra adulta (magnificación 100x). En ambas figuras las flechas sólidas indican el extremo anterior del parásito y las punteadas el posterior. C) larva recién nacida (magnificación 400x); D) quistes con larvas L1 en su interior (magnificación 200x).

Las larvas infectantes L1 se encuentran en el interior de las fibras musculares. Una vez desarrolladas, alcanzan una longitud de un 1 mm, hallándose las enrolladas dos o tres veces en el interior de gruesos quistes (Fig. 4D). Allí, el parásito no permanece inmóvil, sino que realiza lentos movimientos anteroposteriores y su extremidad anterior oscila constantemente como explorando el microambiente que lo rodea. Las células que forman el esticosoma, al igual que en los adultos, poseen gránulos secretorios altamente antigénicos que descargan en la luz del esófago. El quiste larval empieza a formarse alrededor de los 21 días después de la infección. La forma y tamaño del quiste varía con la especie del hospedero.

### 1.3.3. Ciclo biológico de *T. spiralis*

*Trichinella spiralis* se caracteriza por presentar un complejo ciclo de vida (Fig. 5). En el transcurso de la infección un mismo huésped es capaz de albergar parásitos adultos, larvas recién nacidas y larvas infectantes para un nuevo hospedero (Caracostantogolo & Martinez, 2011). Según el estadio pueden encontrarse en intestino, circulando por sangre y/o linfa, o en músculo. Se corresponde con un ciclo autoheteroxeno, es decir el mismo hospedador actúa como hospedero definitivo, alojando al parásito adulto en un período corto de sólo unos cuantos días y como hospedero intermediario alojando la forma larvaria muscular por largos períodos de meses, incluso años.



**Figura 5.** Ciclo evolutivo de *T. spiralis*. Adaptado de Despommier, 2005.

#### 1.3.3.1. Fase intestinal

La infección comienza cuando el huésped consume carne cruda o mal cocida con larvas infectantes (L1) de *T. spiralis* (Murrell, 2016). Las enzimas

digestivas digieren el músculo y la pared quística dejando las larvas en libertad, las cuales son transportadas pasivamente por peristaltismo al intestino delgado. Luego de cuatro mudas, logran alcanzar la madurez en aproximadamente 30 horas, diferenciándose en machos y hembras adultos. La hembra se introduce dentro de las células epiteliales formando un sincicio y, luego de la copulación, libera las larvas recién nacidas. Esta larviposición se realiza en el epitelio, desde donde las larvas migran a vénulas y vasos linfáticos.

Los machos, cumplida su función fértil, son eliminados por una reacción de hipersensibilidad inmediata ayudada por la motilidad intestinal del huésped.

#### **1.3.3.2. Fase migratoria**

El comienzo de la fase migratoria depende de la especie hospedadora. Una vez que las larvas recién nacidas abandonan el útero de las hembras, son transportadas rápida y pasivamente a los músculos. Éstas atraviesan la mucosa intestinal, penetran a través de los capilares linfáticos y venosos llegando al corazón derecho, por la arteria pulmonar alcanzan los pulmones y desde allí invaden el corazón izquierdo para finalmente ingresar por la arteria aorta a la circulación general, diseminándose por todo el organismo con predilección por la musculatura esquelética de mayor actividad (Atías, 1999b). El pico de aparición de larvas migratorias en sangre oscila entre los días 9.º y 11.º posinfección (Harley & Gallicchio, 1971).

La fase migratoria es el único período, junto con el breve tiempo en el cual las L1 permanecen en el estómago tras la infección, en el que *Trichinella* se comporta como un parásito extracelular. Únicamente las células del tejido muscular estriado constituyen el nicho intracelular adecuado para que continúe el desarrollo de la larva. A partir de ese momento *Trichinella* se convierte de nuevo en un parásito intracelular.

#### **1.3.3.3. Fase crónica**

Las larvas que alcanzan las fibras musculares estriadas penetran activamente en su interior, crecen, maduran e inducen un sorprendente fenómeno de

adaptación con su célula huésped. Estudios experimentales *in vivo* han determinado que el parásito promueve una serie de modificaciones dentro del miocito. Estas modificaciones provocan una reprogramación genómica de la célula muscular que termina en la formación de una unidad morfofisiológica independiente y altamente especializada denominada "célula nodriza" (Wu *et al.*, 2013). El miocito cambia sus características de célula muscular estriada, adquiriendo una cápsula de colágeno, manifestando un alto grado de angiogénesis (Humes & Akers, 1952) y modificando la actividad de sus organelas a través de una serie de cambios anatómicos y fisiológicos que aseguran la nutrición y la eliminación de los desechos de su metabolismo (Polvere *et al.*, 1997).

Este complejo "larva infectante-célula nodriza" modula la respuesta inmune del hospedero y puede permanecer viable durante años o sufrir calcificación, lo que depende de la especie hospedadora. En el caso del hombre, el depósito de calcio en las paredes del quiste se inicia a los seis meses, alcanzando su totalidad en un año.

#### **1.3.4. Hospederos**

En la naturaleza se han diferenciado tres ciclos epidemiológicos: el silvestre, el doméstico y el sinantrópico (Pozio, 2000). En el primero de ellos, la infección ocurre entre carnívoros que se alimentan de presas vivas o de cadáveres infectados, ya que después de la muerte del hospedero, las larvas permanecen viables e infecciosas en los músculos en descomposición durante semanas. Jabalíes, pecaríes, armadillos, zorros, lobos, pumas, osos, ballenas, morsas, marsupiales, entre otros, juegan un rol importante en el mantenimiento de la infección, pero no poseen un papel determinante en la transmisión al hombre.

En el ciclo doméstico los hospedadores son animales, tales como el cerdo y el caballo, criados como fuente de alimento para el hombre. Los cerdos pueden infectarse cuando son alimentados con residuos sin cocción previa, con basura con restos de faena o cuando consumen carroña. En los países en que se consume carne de caballo, estos se infectarían al recibir un suplemento

alimentario basado en carne y grasa de cerdo en la etapa previa a su comercialización (Murrell *et al.*, 2004; Murrell, 2013).

En el ciclo sinantrópico participan las ratas y otros animales asociados a los asentamientos y actividades humanas como perros, gatos, comadrejas y armadillos. Los cadáveres de roedores infectados con el parásito pueden contaminar los cereales con que se alimentan animales criados en confinamiento, causando focos de trichinellosis aún en criaderos bien manejados y situados a mucha distancia del lugar en que se encuentran los roedores infectados (Oivanen, 2002).

Estos ciclos pueden interconectarse a través del tránsito de animales entre uno y otro ambiente. Cuando los animales silvestres se acercan a los poblados, se infectan con las especies de *Trichinella* propias del ciclo doméstico y esto ocurre porque se alimentan de animales sinantrópicos. De esta manera los animales del ciclo sinantrópico actúan como nexo para la infección de los animales del ciclo silvestre (Pozio, 2000).

En los humanos, las infecciones por *Trichinella* están generalmente relacionadas con prácticas alimentarias culturales, que incluyen platos elaborados con carne cruda o poco cocida procedente de diversos animales. La fuente más importante de esta infección es la carne de cerdo y sus productos relacionados, seguida por el jabalí y otros animales de caza. Estos adquieren el parásito principalmente por la ingestión de ratas con quistes de *T. spiralis*, lo que en el cerdo es posible cuando se cría en malas condiciones higiénicas o, simplemente cuando busca su propia fuente de alimentación en basurales.

Aunque la trichinellosis ha disminuido significativamente debido a un buen control del ciclo doméstico en los países desarrollados, sigue siendo un riesgo potencial a causa de la presencia continua de *Trichinella spp.* en la vida silvestre y su transmisión hacia los animales domésticos.

#### **1.4. Benzimidazoles en la quimioterapia antihelmíntica**

El benzimidazol es un heterociclo que se encuentra en diversos fármacos que tienen actividad antiparasitaria, antibacteriana, antitumoral y antidepresiva, entre otras (Babbar & Arora, 2020). Existe de manera natural en diversas

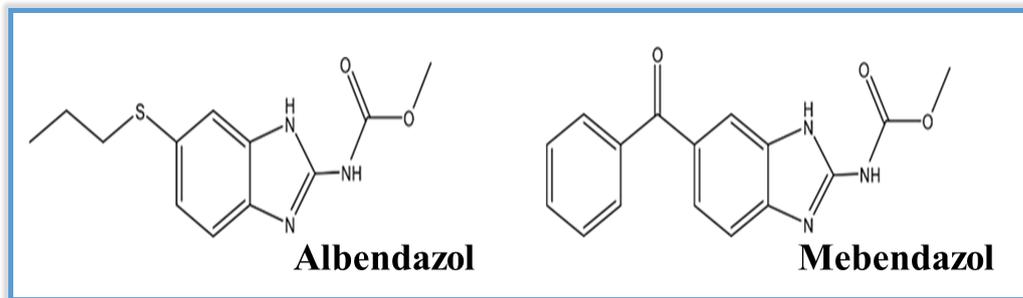
moléculas, como en las coenzimas de la vitamina B<sub>12</sub>, y fue sintetizado por primera vez por Hoebrecker en 1872 (Bansal & Silakari, 2012). Sin embargo, su potencial valor como antihelmíntico fue descubierto 80 años más tarde, impulsado por la búsqueda de nuevos antiparasitarios en el ámbito ganadero. Fue así que, en 1961, se descubrió el tiabendazol, primer antiparasitario derivado del benzimidazol. Este compuesto demostró tener una actividad efectiva contra parásitos gastrointestinales en ovejas, cabras, bovinos, equinos, porcinos, caninos y aves de corral. Era bien tolerado por los animales y podía ser administrado por vía oral (Brown *et al.*, 1961). Posteriormente fue utilizado para tratar parasitosis humanas, siendo el primer derivado benzimidazólico introducido en la medicina clínica (Cuckler & Mezey, 1966; Kapoor, 1987).

Con el hallazgo de los derivados benzimidazólicos se produjo un cambio drástico en la quimioterapia antihelmíntica (Rubira, 2008). Estos nuevos compuestos tenían menor toxicidad para el hospedero y mayor espectro de acción, atribuido a una vida media más larga. La sustitución del anillo tiazol por un grupo carbamato dio lugar a mebendazol, flubendazol, albendazol y triclabendazol, entre otros. Estos fármacos derivados del benzimidazol se incluyeron en el tratamiento de la mayoría de las helmintiasis, especialmente las producidas por nematodos (López-García, 2002).

Actualmente la terapia convencional para el tratamiento de la trichinellosis humana involucra a los derivados benzimidazólicos, albendazol y mebendazol (Gottstein *et al.*, 2009), siendo el albendazol el de primera elección (Fig. 6). La dosis recomendada de albendazol es de 800 mg (15 mg/kg) diarios durante 8 a 15 días. La dosis de mebendazol se ha fijado en 5 mg/kg diarios durante 10-15 días o 200-400 mg (3 veces/ día) durante 3 días, seguido de 400-500 mg (3 veces/ día) durante 10 días (Chai *et al.*, 2021).

Albendazol y mebendazol son antiparasitarios de amplio espectro y se encuentran en la Lista de Medicamentos Esenciales de la OMS (OMS, 2015). Sin embargo, pertenecen a la Clase II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, por tener una solubilidad acuosa extremadamente pobre que limita su absorción oral (Lindenberg *et al.*, 2004; Daniel-Mwambete *et al.*, 2004; Vogt *et*

*al.*, 2008). Actúan en forma local, expulsando a los parásitos adultos presentes en el tubo digestivo, o a nivel sistémico, eliminando a las formas intermedias encontradas en órganos y tejidos (Goodman *et al.*, 1996).



**Figura 6.** Estructuras químicas de los benzimidazoles albendazol y mebendazol

El albendazol es absorbido en el tracto gastrointestinal y se oxida rápidamente en el hígado originando el metabolito activo, albendazol sulfóxido. Posteriormente el albendazol sulfóxido se oxida aún más, a sulfona, producto que es inactivo (Delatour *et al.*, 1990; Lubega & Prichard, 1991). El mebendazol existe en tres formas polimórficas, A, B y C, que muestran solubilidades y efectos terapéuticos significativamente diferentes. El polimorfo A es terapéuticamente inactivo, B es considerado tóxico mientras que C es la forma terapéuticamente activa (Gutiérrez *et al.*, 2018).

Actualmente ambos benzimidazoles se consideran efectivos cuando son administrados en la fase aguda de la trichinellosis. Sin embargo, en la etapa inicial de la infección la sintomatología es gastrointestinal e inespecífica por lo que, sin un antecedente epidemiológico, rara vez se piensa en esta patología. En la mayoría de las personas infectadas el diagnóstico suele hacerse varias semanas después, cuando las larvas ya se han establecido y encapsulado en las células musculares. Ya en la cronicidad, como consecuencia de la baja solubilidad en agua de ambos compuestos, solo pequeñas cantidades del fármaco logran alcanzar las larvas encapsuladas, limitando la efectividad antiparasitaria (Siriya-satien *et al.*, 2003; Casulli *et al.*, 2006; Abuelenain *et al.*, 2021).

### **1.4.1. Mecanismos de acción**

Los antihelmínticos actúan alterando funciones que resultan clave para la supervivencia del parásito. Los benzimidazoles albendazol y mebendazol, ejercen su efecto interfiriendo en el metabolismo energético y en la función microtubular del helminto.

#### **1.4.1.1. Inhibición del metabolismo energético**

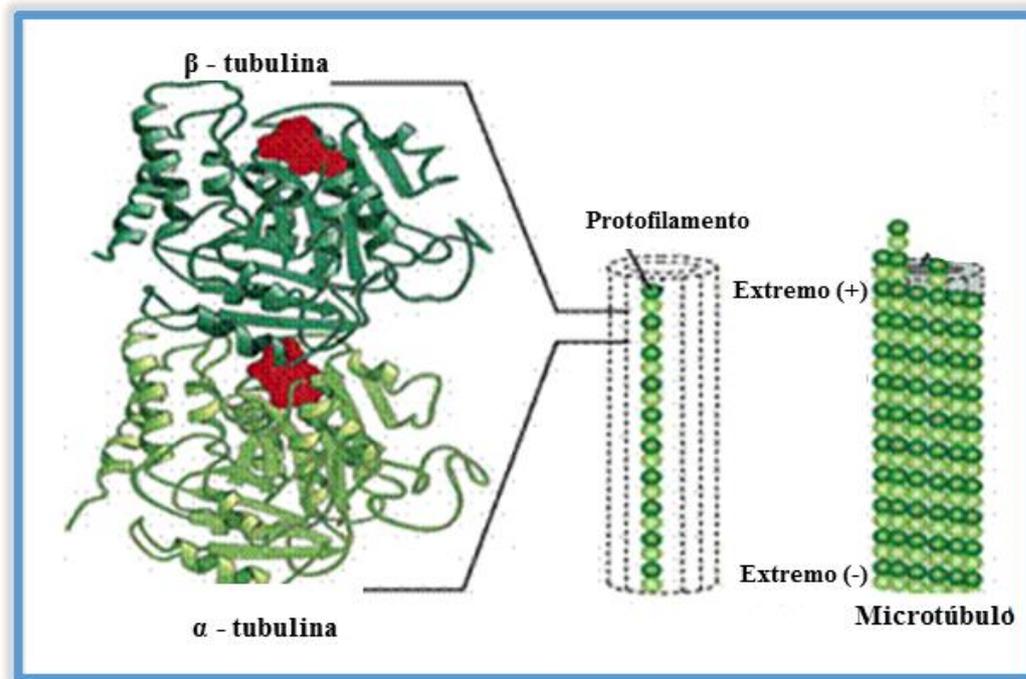
Los benzimidazoles tienen la capacidad de actuar sobre los sistemas enzimáticos y sobre la captación de las fuentes energéticas de los parásitos. Estos provocan una disminución en la disponibilidad de la energía necesaria para el funcionamiento normal de los órganos vitales de los parásitos, lo cual conduce a un agotamiento de sus fuentes energéticas provocando su muerte. Varios estudios han demostrado la acción de estos fármacos sobre la fumarato reductasa (Barrowman *et al.*, 1984; Criado-Fornelio *et al.*, 1990; de Andrade Picanço *et al.*, 2020) y sobre la malato deshidrogenasa (Tejada *et al.*, 1987; de Andrade Picanço *et al.*, 2019; Kayamba *et al.*, 2021), entre otras.

#### **1.4.1.2. Inhibición de la polimerización de la tubulina**

Los microtúbulos son organelas que forman parte del citoesqueleto de células eucariotas. Su homeostasis es de gran importancia debido a que están implicados en diversas funciones celulares, como la formación del huso mitótico y transporte intracelular de nutrientes. Están compuestos por 13 protofilamentos ensamblados alrededor de un núcleo hueco, formados por la polimerización de la tubulina, una proteína dimérica con dos subunidades denominadas  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina (Fig. 7) (Lanusse & Prichard, 1993).

Los benzimidazoles se unen a la  $\beta$ -tubulina por el extremo positivo (+) inhibiendo la elongación del microtúbulo que, sumado a la despolimerización del otro extremo, induce un acortamiento de estas organelas hasta su deterioro completo y, por lo tanto, produce la pérdida de la homeostasis celular (Martin, 1997; Lara, 2003). Como consecuencia del fallo en la función microtubular, los benzimidazoles alteran la captación de glucosa en las etapas larvales y adultas de los parásitos susceptibles, agotando sus reservas de

glucógeno. Debido a la disminución de la producción de energía, el parásito se inmoviliza y, finalmente, muere.



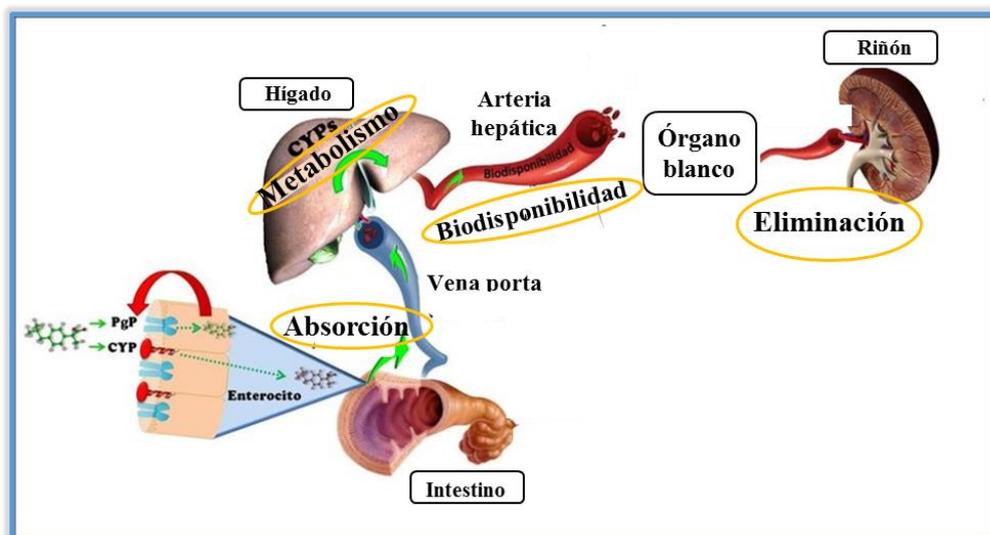
**Figura 7.** Estructura de un microtúbulo y sus subunidades. La subunidad de cada protofilamento es un heterodímero de tubulina, formado por un par de monómeros de  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina unidos. El microtúbulo es un tubo formado por 13 protofilamentos alineados en paralelo. Adaptada de Alberts, 2007.

El mecanismo de acción de los benzimidazoles como inhibidores de la polimerización de la tubulina sería poco tóxico en mamíferos y selectivo para la tubulina de los helmintos. Algunos autores suponen que esta selectividad se debe a diferencias estructurales entre las tubulinas del helminto y del huésped. Otros investigadores defienden que es consecuencia de diferencias farmacocinéticas entre el parásito y el mamífero hospedador (García Rodríguez, 2008). Aunque la afinidad por la tubulina de los parásitos se haya mostrado superior a la de la tubulina de los mamíferos, es a este mecanismo de acción al que se le atribuye el efecto teratógeno de los benzimidazoles (Navarro *et al.*, 1999).

### 1.4.2. Farmacocinética de benzimidazoles

Posterior a su administración, un fármaco debe ser absorbido y luego distribuido, generalmente a través de los vasos de los sistemas circulatorio y linfático. Además de atravesar las barreras de la membrana, el fármaco debe sobrevivir al metabolismo (principalmente hepático) y a la eliminación (por riñón, hígado e intestino). El compuesto originario tiene, habitualmente, una semivida corta y son sus metabolitos los que predominan en plasma, tejidos y excreciones (Fig. 8) (Gottschall *et al.*, 1990).

La vía oral constituye el medio más común para administrar medicamentos, dado que es la forma más cómoda y barata. Entre sus desventajas están la incapacidad de absorción de algunos fármacos por sus características físicas, tales como la solubilidad en agua, vómito por irritación de la mucosa gastrointestinal, destrucción por enzimas digestivas o por el pH del jugo gástrico, irregularidades en la absorción o aceleración de la evacuación en presencia de alimentos u otros medicamentos, y la necesidad de contar con la colaboración del paciente. Además, en el tracto gastrointestinal, los medicamentos pueden ser metabolizados por enzimas de la flora intestinal o el hígado, antes de que lleguen a la circulación general (Buxton, 2019).



**Figura 8.** Metabolismo de un fármaco después de su administración por vía oral. Adaptada de Reyes León Cachón, 2013.

Los estudios de biodisponibilidad permiten conocer la velocidad y la concentración con la que el fármaco (o su metabolito) alcanza la circulación sistémica. Estos parámetros están condicionados por la solubilidad y disolución del fármaco en medios fisiológicos y por su permeabilidad gastrointestinal (Khadka *et al.*, 2014).

El albendazol, luego de ser administrado vía oral, se absorbe muy escasamente en el tracto gastrointestinal, mostrando muy baja biodisponibilidad. Los epitelios gástrico e intestinal actúan como una barrera lipófila, limitando su solubilidad (Marriner *et al.*, 1986; Prieto *et al.*, 1991). La absorción, sin embargo, puede verse ligeramente aumentada cuando se lo administra conjuntamente con alimentos. La solubilidad del albendazol es mayor en medios ácidos, por lo que se encuentra solubilizado en mayor cantidad en el estómago. Si se administra con una dieta rica en grasas, se enlentece el vaciamiento gástrico, proporcionando una mayor permanencia en el estómago y así, una mayor absorción (Ochoa *et al.*, 2021).

La metabolización de albendazol ocurre, principalmente, en el hígado. El albendazol se metaboliza a albendazol sulfóxido por un proceso de sulfoxidación en el cual participan las enzimas microsomales NADPH dependientes del sistema flavino- monooxigenasa y del sistema citocromo P450. Esto fue observado en microsomas hepáticos de varias especies, incluidas el hombre (Galtier *et al.*, 1986; El Amri *et al.*, 1987; Moroni *et al.*, 1995; Rawden *et al.*, 2000; Virkel *et al.*, 2000). Otros estudios revelan que el albendazol también es metabolizado por los enterocitos intestinales (Lanusse & Prichard, 1993; Villaverde *et al.*, 1995). Tanto el albendazol sulfóxido, metabolito activo, como la sulfona, son los metabolitos predominantes en plasma (Lanusse & Prichard, 1990).

La excreción de los metabolitos de albendazol se realiza principalmente por vía renal y en menor grado, por vía biliar. Las proporciones de los metabolitos varían según la especie en la que se realiza el estudio (Delatour *et al.*, 1990), aunque todos los trabajos coinciden en que sólo existen trazas de albendazol sin metabolizar en sangre (Benoit *et al.*, 1992; Lanusse *et al.*, 1992; Okelo *et al.*, 1993; Bonato *et al.*, 2007; Fabbri *et al.*, 2020).

Para el mebendazol, la biodisponibilidad oral es de aproximadamente 20 % debido a su absorción deficiente y al rápido metabolismo de “primer paso” hepático (Dayan, 2003). La absorción insuficiente y errática, consolidando la baja biodisponibilidad sistémica, trae como consecuencia el hecho de que la concentración plasmática del mebendazol no refleja la dosis administrada. Al igual que con albendazol, una mayor absorción puede conseguirse si se administra junto con alimentos grasos. Cuando la administración es crónica, las concentraciones plasmáticas de mebendazol aumentan.

La pequeña cantidad de mebendazol absorbido se une intensamente a proteínas plasmáticas (95 %) y se metaboliza rápida y parcialmente por el hígado formando dos metabolitos principales; el metil-5-( $\alpha$ -hidroxibenzil)-2-benzimidazol carbamato y el 2-amino-5-benzoilbenzimidazol. Ambos presentan una tasa de depuración menor que el mebendazol. Tanto la forma activa como los metabolitos descarboxilados producidos son excretados por bilis (mayor parte) y por orina (cerca del 2 %) (Allan & Watson, 1983; Meco *et al.*, 2023).

Los niveles plasmáticos o sanguíneos que un fármaco es capaz de alcanzar están asociados a sus efectos terapéuticos y posibles reacciones adversas. La posibilidad de realizar un estudio de biodisponibilidad es de suma utilidad para evaluar tanto la eficacia terapéutica como la seguridad de un medicamento (Chow & Liu, 2008).

### **1.4.3. Estrategias para mejorar la solubilidad**

Como se mencionó anteriormente, existen fármacos, como albendazol y mebendazol, que presentan cierta tasa de fracaso terapéutico debido a su escasa solubilidad y absorción. A causa de esto, suelen administrarse en altas dosis por tiempos prolongados aumentando el riesgo de efectos adversos asociados.

Para mejorar las propiedades de solubilidad y disponibilidad de un fármaco, se puede recurrir a múltiples estrategias tecnológicas. Entre ellas, el desarrollo de sistemas nanocristalinos utilizando polímeros estabilizantes, el uso de tensioactivos (Dib *et al.*, 2011; García *et al.*, 2013), formulaciones nano y

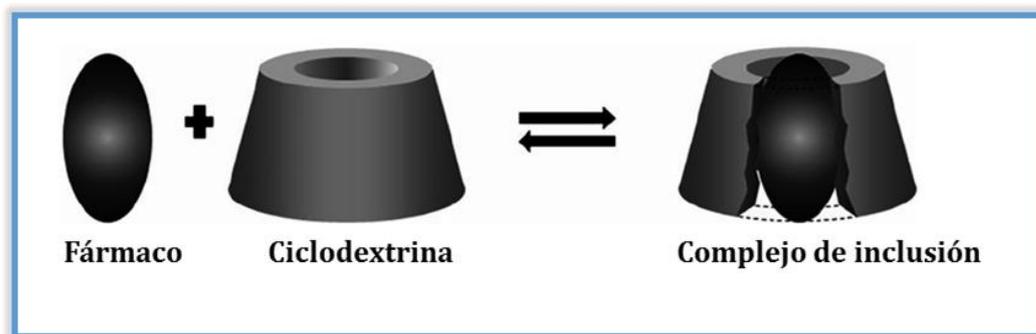
microparticuladas (Leonardi *et al.*, 2008; García *et al.*, 2013) y formación de complejos de inclusión utilizando ciclodextrinas (Palomares-Alonso *et al.*, 2010; García *et al.*, 2014; Codina *et al.*, 2015).

Las formulaciones nano y microparticuladas pueden aplicarse con varios fines, tales como la protección del contenido en la matriz, la reducción de efectos adversos en los pacientes, el aumento de la solubilidad y el control de la liberación del principio activo (Méndez *et al.*, 2012). Pueden obtenerse por “reducción de tamaño” o “precipitación controlada”. En este último caso, las moléculas del ingrediente farmacéutico activo en solución precipitan ante el agregado de un anti-solvente, de aquí el nombre de precipitación controlada o anti-solvente, sin intervención de reducción mecánica (Chen *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2011). Las tecnologías de precipitación controlada tienen ventajas tales como la producción de partículas más pequeñas y de mayor uniformidad, asimismo requieren un equipamiento más sencillo, con menores demandas de energía y menor costo (Wang *et al.*, 2017).

En relación a las nanopartículas poliméricas, un gran número de estudios han demostrado el potencial de su uso como sistemas de liberación para la administración oral de fármacos con baja absorción intestinal. Las nanopartículas poliméricas se definen frecuentemente como partículas coloidales sólidas cuyas dimensiones oscilan en un rango de 10 – 1000 nm. La mejora en la biodisponibilidad es atribuida a la disminución en el tamaño, que conlleva un incremento en el área superficial, aumentando la velocidad de disolución (Brough & Williams, 2013). En consecuencia, la velocidad de disolución puede optimizarse creando partículas con un área superficial elevada o aumentando la solubilidad aparente del fármaco (Swarbrick, 2007). Entre las principales características que tienen las nanopartículas poliméricas, está la habilidad para desarrollar interacciones bioadhesivas con la mucosa intestinal (Agüeros *et al.*, 2009); propiedad que posibilita aumentar el tiempo de permanencia de los fármacos en el sitio de absorción, lo que favorecería su biodisponibilidad.

Por su parte, las ciclodextrinas se emplean como formadores de complejos de inclusión de sustancias lipofílicas para transportar todo tipo de ingredientes

activos como fármacos, cosméticos, saborizantes, vitaminas; así como también desechos industriales y compuestos tóxicos, entre otras muchas aplicaciones. Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos de glucosa, que tienen una estructura de cono truncado con un interior hidrofóbico y un exterior hidrofílico. Cuando la cavidad de la ciclodextrina se ocupa con moléculas de otra sustancia, al sistema obtenido se lo llama complejo de inclusión (Fig. 9). La inclusión de una determinada molécula dentro de la cavidad de la ciclodextrina da como resultado la modificación de sus propiedades físicas y químicas. La inclusión de un fármaco huésped, o una porción del mismo, en la cavidad de las ciclodextrinas puede tener como consecuencia el aumento de la solubilidad aparente, la mejora de la estabilidad física y química, el incremento de la tasa de disolución y de la biodisponibilidad de los fármacos acomplejados con ellas. La solubilidad de los fármacos cambia debido a que los grupos hidrofóbicos del fármaco ya no se encuentran en contacto con el solvente sino con los átomos de la cavidad de la ciclodextrina y, por su parte, la superficie externa de las ciclodextrinas es la que interactúa con el solvente. Como resultado, la superficie externa de las ciclodextrinas contribuye a la solubilidad del complejo y no del fármaco en sí.



**Figura 9.** Interacción entre fármaco y ciclodextrina para formar un complejo de inclusión. Adaptada de Salústio *et al.*, 2011.

Las tres ciclodextrinas naturales son  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina y  $\gamma$ -ciclodextrina, con 6, 7 y 8 unidades de glucosa respectivamente, que difieren en el tamaño del anillo y en su solubilidad. La  $\beta$ -ciclodextrina es la más utilizada para aplicaciones farmacéuticas ya que es la más accesible por su bajo costo y porque su disponibilidad y tamaño de la cavidad son adecuados para un amplio rango de fármacos.

En muchos casos la contribución de la superficie externa de la ciclodextrina no es suficiente para obtener la solubilidad deseada. La modificación de los grupos hidroxilos de la superficie externa de la ciclodextrina puede aumentar la solubilidad en forma drástica. Se han sintetizado derivados de  $\beta$ -ciclodextrina más solubles, como por ejemplo: metil- $\beta$ -ciclodextrina, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, sulfobutil éter- $\beta$ -ciclodextrina, succinil- $\beta$ -ciclodextrina y citrato- $\beta$ -ciclodextrina (García *et al.*, 2014; 2016).

El principal propósito de los sistemas de liberación controlada de fármacos es administrar la cantidad de fármaco necesaria, en el lugar específico, durante un período de tiempo controlado, de forma precisa y efectiva. Esto permite mejorar el perfil terapéutico de numerosos medicamentos, favoreciendo la solubilidad de principios activos poco solubles y minimizando, muchas veces, los efectos tóxicos no deseados.

#### **1.4.4. Efecto del sexo en la farmacocinética de los medicamentos**

Es sabido que, para algunos medicamentos, las mujeres y los hombres responden de manera diferente (Regitz-Zagrosek, 2012). En la práctica clínica, negar el impacto del sexo en el tratamiento puede tener como consecuencia efectos secundarios inesperados o respuestas terapéuticas inadecuadas (Soldin & Mattison, 2009).

La disponibilidad de un fármaco depende de cómo se absorbe, distribuye, metaboliza y excreta, y se han documentado diferencias de sexo para cada fase (Gandhi *et al.*, 2004; Whitley & Lindsey, 2009). Las hormonas sexuales, las proteínas plasmáticas, los ácidos grasos, el agua corporal, y la composición de algunas enzimas pueden variar con el sexo. Estas variaciones pueden provocar cambios en el volumen de distribución, en la unión a proteínas plasmáticas y en el metabolismo hepático, causando variaciones en el perfil cinético del fármaco y de sus metabolitos (Mulder, 1986). También, las diferencias de conformación corporal entre sexos, reflejadas en el peso corporal, pueden influir en la composición muscular, flujo sanguíneo, cantidad de agua y grasa corporal, afectando los parámetros farmacocinéticos de muchos medicamentos (Harris *et al.*, 1995; Hanley *et al.*, 2010). Las mujeres

generalmente tienen un peso corporal y un tamaño de órganos menor y un mayor porcentaje de grasa corporal, lo que afecta la absorción y distribución de los medicamentos (Miller, 2001; Anthony & Berg, 2002; Zucker & Prendergast, 2020).

La caracterización de isoenzimas específicas involucradas en el metabolismo de fármacos permitió identificar sistemas enzimáticos que se ven afectados por el sexo. En el caso de los benzimidazoles, numerosos autores han encontrado que algunas isoenzimas del citocromo P450, que participan en el metabolismo hepático, pueden estar moduladas por hormonas sexuales (Kamataki *et al.*, 1983; Dannan *et al.*, 1986; Harris *et al.*, 1995; Cristófol *et al.*, 1998; Waxman & Holloway, 2009). Otros proponen que hormonas como la testosterona podrían actuar como inductores de ciertas vías metabólicas (Witkamp *et al.*, 1983).

El Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos recomendó la incorporación de animales de ambos sexos en los estudios preclínicos; sin embargo las publicaciones a menudo continúan ignorando la necesidad de una evaluación basada en el sexo para estos estudios (Afonso-Pereira *et al.*, 2018).

#### **1.4.5. Efecto del genotipo en la farmacocinética de los medicamentos**

La variación genética describe las diferencias genéticas que ocurren naturalmente entre individuos de la misma especie. Se sabe la variación genética que ocurre en las proteínas que intervienen en el metabolismo y transporte de fármacos influye en el perfil cinético de muchos medicamentos (Elewa & Wilby, 2017). Esta diversidad genética explicaría, por ejemplo, por qué un fármaco dado no tiene el efecto deseado en un paciente determinado o por qué se producen las reacciones adversas (Alarcón-Valdés *et al.*, 2017). La variación genética más común es el polimorfismo por sustitución de un solo nucleótido (también denominado polimorfismo de nucleótido único, o SNP), en el que la variante menos “común” está presente en al menos el 1 % de la población analizada (Gray *et al.*, 2000).

Comprender el papel de los polimorfismos genéticos en los genes que codifican proteínas y enzimas involucradas en la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de los fármacos es importante para entender mejor las diferencias interindividuales en la farmacocinética de los medicamentos. Dependiendo de los alelos que porta un individuo, el metabolismo del fármaco puede aumentar, disminuir o suprimirse (Relling, 1989).

En el caso del metabolismo de los fármacos antiparasitarios, sus respuestas interindividuales se modifican principalmente por variaciones en las enzimas del citocromo P450, donde aproximadamente la mitad de las enzimas son genéticamente polimórficas (Zanger *et al.*, 2008). La investigación en este campo abriría la puerta a nuevos enfoques de tratamiento en medicina (Alarcón-Valdés, 2017).

#### **1.4.6. Farmacogenética: interacción hospedero/fármaco**

El concepto de farmacogenética se ha definido como el estudio de la variabilidad en la respuesta a los fármacos debido a factores hereditarios (Pirmohamed, 2001). Si bien algunos proponen que la historia de la farmacogenética se remonta al año 510 a.C., cuando Pitágoras notó que la ingestión de habas resultó en una reacción potencialmente fatal sólo en algunos individuos, fue Friedrich Vogel quién acuñó el término en 1959 (Nebert, 1999). El propósito de la farmacogenética es poder definir la contribución de las diferencias genéticas sobre la respuesta farmacológica y, de esta manera, adaptar los tratamientos a las necesidades individuales de los pacientes (López-López *et al.*, 2004).

Los adelantos de la genética (Proyecto Genoma Humano, *microarrays*, bioinformática) permitieron identificar polimorfismos genéticos relacionados con la respuesta a los fármacos, determinar el perfil genético individual e integrar estos datos para facilitar la decisión clínica de un tratamiento adecuado, haciendo posible la terapia personalizada (Roden & George, 2002). Los beneficios asociados están relacionados a la posibilidad de seleccionar o excluir pacientes que podrían presentar reacciones adversas a medicamentos así como evaluar alteraciones genéticas que dan como resultado una

diversidad de respuestas, buscando en última instancia proporcionar un tratamiento eficaz y seguro, y por lo tanto, elegir una dosis adecuada para el paciente y la duración óptima del tratamiento (Alarcón-Valdés, 2017). Esto mejoraría el cuidado del paciente y también disminuiría costos. Además, podría identificarse al subgrupo genético de pacientes que tiene mayor riesgo de padecer un efecto adverso grave y evitar las pruebas del fármaco en este subgrupo de enfermos (Lesko & Woodcock, 2004).

En la actualidad la mayoría de las diferencias en la respuesta a los fármacos, tanto en términos de eficacia como de toxicidad, se han asociado a polimorfismos en genes implicados en el metabolismo de fármacos o en la desintoxicación de compuestos (Vidaillet *et al.*, 2003). Tal como el sistema enzimático citocromo P450, implicado en el metabolismo de más del 90 % de los fármacos terapéuticos actuales, incluidos los analgésicos, y cuya síntesis está controlada por una gran superfamilia de genes. Hasta el momento se han identificado 57 genes *CYP* en humanos, todos muy polimórficos (Ting & Schug, 2016). También el gen de resistencia múltiple a drogas *MDR1*, que codifica para la llamada glicoproteína- P, es altamente polimórfico, tiene 38 SNP identificados (Campa *et al.*, 2008). Es una glicoproteína transmembrana presente en una variedad de tejidos humanos, incluidos el tracto gastrointestinal, el riñón, el hígado y el cerebro. Funciona como una bomba dependiente de ATP que elimina hacia la luz diversos compuestos, entre ellos, una amplia gama de sustratos de fármacos, condicionando así la biodisponibilidad de los mismos. Estos son sólo algunos ejemplos de genes polimórficos claves que contribuyen a las grandes diferencias interindividuales en el metabolismo de los fármacos.

Si bien el campo de la farmacogenética está evolucionando rápidamente, con variaciones genéticas identificadas en casi todas las etapas de la cinética y la dinámica de los fármacos; rara vez se aplica en la clínica. El tratamiento farmacológico guiado por la genética debería ser recomendado (Lauschke *et al.*, 2018). Existe una necesidad creciente de incorporar este conocimiento en los programas educativos de médicos y farmacéuticos, para afrontar la nueva

práctica farmacológica y la investigación en el diseño y desarrollo de nuevos fármacos (Vizirianakis, 2002; Gurwitz *et al.*, 2003).

### **1.5. Modelos animales para la comprensión de enfermedades humanas**

En las ciencias biomédicas el animal de laboratorio es una pieza fundamental utilizada como modelo para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al humano y a los animales. Su utilización también implica importantes aportes en la docencia biológica y en el desarrollo, producción y control de medicamentos, alimentos y otros insumos, donde en muchos casos son, hasta la fecha, insustituibles (Von Hoosier, 1999; Zuñiga *et al.*, 2001).

Sin embargo, hay que considerar que el uso de animales para investigación se ha convertido en un tema ético de gran controversia. Por un lado, hay quienes consideran que los animales son y siguen siendo necesarios e irremplazables, mientras que para otros se deberían buscar nuevas alternativas (Vaquero Puerta, 1993). Como todo acto experimental o científico que entrañe al estado de bienestar del animal, se debe tratar de evitar o disminuir en lo posible causar dolor, sufrimiento, angustia o agravio (Lomónaco, 2012).

El ratón de laboratorio (*Mus musculus*) es una especie ampliamente utilizada como organismo modelo en diversos campos de la biología. Su importancia en la investigación de temas relacionados con la salud humana, como modelos espontáneos o inducidos de enfermedades genéticas congénitas o esporádicas, se encuentra profusamente documentada (Hinrichsen & Di Masso, 2010).

El ratón comparte con el ser humano el privilegio de ser la especie de mamífero mejor estudiada desde el punto de vista genético. Su genoma está totalmente secuenciado (Waterston *et al.*, 2002) y existe una gran cantidad de líneas genéticamente definidas, como las consanguíneas, además de miles portadoras de mutaciones y de reordenamientos cromosómicos específicos. Más aún, a pesar de que han pasado aproximadamente 75 millones de años desde que roedores y humanos divergieron en el proceso de la evolución, compartimos con el ratón de laboratorio la mayoría de los genes codificantes de proteínas. Esto lo convierte en el primer modelo para las investigaciones

biomédicas (Yue *et al.*, 2014). Si bien en este tipo de investigaciones existen métodos alternativos como modelos matemáticos de simulaciones de computación, cultivos celulares y estudios *in vitro* a nivel molecular, estos procedimientos no permiten predecir en su totalidad la acción de un producto químico o de un microorganismo patógeno sobre un sistema complejo de órganos combinados de un individuo. La más sofisticada tecnología no puede imitar las complicadas interacciones entre células, tejidos y órganos que se dan en humanos y animales (Rodríguez Yunta, 2007).

Las ventajas de esta especie sobre otros animales experimentales incluyen la facilidad de su cría, su corto ciclo reproductivo con camadas grandes, tamaño pequeño, manejable y resistente y bien caracterizado en cuanto a su biología. En comparación con otros animales experimentales su mantenimiento, aún en condiciones de alta seguridad, es relativamente sencillo. Otra ventaja fundamental es la posibilidad de extrapolar los resultados obtenidos al ser humano, si bien con ciertas limitaciones, ya que ambos presentan una estructura génica muy similar y la mayoría de las vías de señalización celular están altamente conservadas entre las dos especies.

La cría endogámica de especies animales de laboratorio tales como el ratón o la rata, permite trabajar con muestras de poblaciones de individuos, al menos en teoría, genéticamente idénticos. La selección artificial, por su parte, permite disponer de grupos experimentales que sólo se diferencian en un rasgo genético determinado o en un número concreto de ellos. Esta posibilidad se ha incrementado con la aparición de las técnicas de transgénesis, que posibilitan disponer de animales que, sobre un trasfondo genético determinado, sobreexpresan o tienen anulada la expresión de un determinado gen (Merino & Merino, 2008).

El trasfondo genético definido y consistente de los ratones endocriados ofrece ventajas en la consistencia y repetibilidad de los experimentos, al tiempo que presenta limitaciones en la diversidad genética. Esta falta de diversidad genética sería una razón importante para la falta concordancia entre los resultados de los ensayos preclínicos y los clínicos. Por el contrario, la población natural de ratones salvajes es rica en diversidad genética, incluidas

variaciones como polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), deleciones de secuencias y duplicaciones. La introducción de cromosomas de ratones salvajes en ratones endogámicos proporcionará nuevos recursos animales experimentales para el estudio de rasgos complejos (The Wild Mice Project, 2023).

La respuesta para resistir enfermedades parasitarias está bajo control genético y varía entre especies e individuos dentro de las especies (Hinrichsen & Di Masso, 2010). La búsqueda de genes que controlan las infecciones gastrointestinales a nematodos en ratones y la identificación de alelos que contribuyan a la resistencia, aunque han mostrado algún progreso en años recientes, no lograron hasta el presente identificar claramente genes específicos como los jugadores clave en modelos murinos de infección (Behnke *et al.*, 2010).

Un primer paso para aislar factores genéticos implicados en la resistencia/susceptibilidad a las infecciones parasitarias es la identificación y caracterización de cepas de ratones endocriados que difieran en su susceptibilidad al patógeno ya que constituyen una herramienta invaluable para analizar patrones genéticos complejos y permitir la identificación de loci “de resistencia” del hospedero que regulan la respuesta a la infección (Malo & Skamene, 1994).

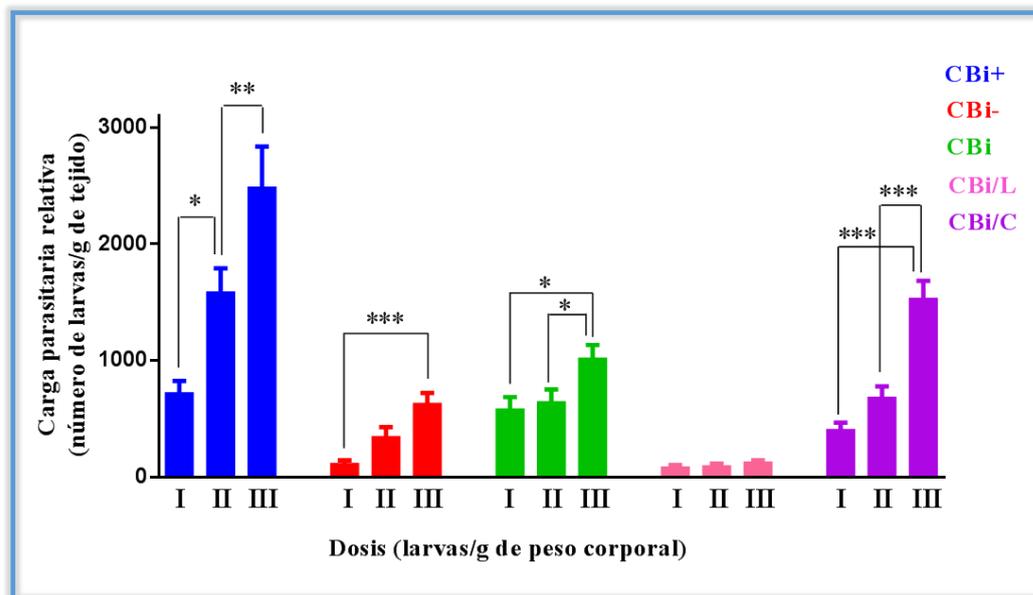
En los últimos años han surgido nuevos fármacos antiparasitarios que actúan esencialmente sobre helmintos. Los estudios pre-clínicos empleando modelos animales juegan un papel muy importante en la evaluación de la eficacia y seguridad de estos nuevos dispositivos farmacéuticos como alternativas terapéuticas de uso médico y veterinario. Si la investigación farmacológica no se puede hacer en los seres humanos por razones éticas y/o prácticas, los modelos animales constituyen un enfoque alternativo aceptable para comprender la relación parásito-fármaco-hospedero.

### 1.5.1 Modelo experimental para el estudio de la trichinellosis y su terapia asociada

El Instituto de Genética Experimental de la Facultad de Ciencias Médicas, UNR, cuenta actualmente con una colonia de ratones (colonia CBi-IGE) formada por cuatro líneas de ratones obtenidas en experimentos de selección artificial divergente por conformación corporal y una línea no seleccionada que se utilizó como control de selección (Di Masso, 1991). Se puede decir que cada línea constituye un genotipo singular, ya que debido a los efectos conjuntos de la cría selectiva por más de 150 generaciones, la respuesta correlacionada a la selección, los efectos no direccionales de la endocría y la deriva génica, y la aparición de nuevas mutaciones, han fijado diferentes combinaciones alélicas. Las líneas no sólo difieren en conformación corporal y en caracteres relacionados con el crecimiento sino también en caracteres no correlacionados como la respuesta inmune frente a distintos antígenos, la susceptibilidad a la carcinogénesis espontánea, la resistencia / susceptibilidad ante el desafío con un tumor de mama transplantable. El estudio de la enteroparasitosis natural, entendiéndose por tal los enteroparásitos que se han fijado naturalmente en las colonias en las condiciones del bioterio, de la enteroparasitosis experimental con *Heligmosomoides polygyrus* y de una parasitosis tisular y sanguínea por *Trypanosoma cruzi* mostró también diferencias atribuibles al genotipo en estas líneas (Vasconi *et al.*, 2008). Estos resultados indican que las líneas en cuestión, representan una fuente de variancia genética significativa para los caracteres analizados (Hinrichsen & Di Masso, 2010).

En experimentos anteriores se demostró que estas líneas diferían en la respuesta al desafío con dosis crecientes de *Trichinella spiralis*, durante la primoinfección (Fig.10). Aunque la carga parasitaria aumentó con el incremento de la dosis infectante en todas las líneas, la magnitud del incremento fue distinta para cada genotipo (Vasconi *et al.*, 2008; 2015). Los resultados obtenidos en esa experiencia mostraron que las líneas CBi-IGE presentan un comportamiento disímil frente a un mismo incremento de dosis larvas infectantes de *T. spiralis* e indican que habría diferencias genéticas en la

relación hospedero-parásito, ya que las líneas son criadas en un criadero convencional y comparten un hábitat común, con similar exposición a la infección. El análisis de algunas variables que estiman la resistencia/susceptibilidad del hospedero permitió calificar a la línea CBi/L como el genotipo resistente y a CBi+ como el más susceptible. Estas líneas representan un modelo experimental de gran utilidad para el estudio de la influencia del genotipo sobre la resistencia/susceptibilidad (R/S) a distintos parásitos y para la producción de poblaciones segregantes aptas para la localización de loci caracteres cuantitativos relacionados con las variables en estudio.



**Figura 10.** Efecto del aumento de la dosis infectante de *Trichinella spiralis* sobre la carga parasitaria muscular en ratones CBI-IGE (Vasconi *et al.*, 2015).

Partiendo de moléculas cuya actividad antihelmíntica es conocida, como lo son albendazol y mebendazol, se propuso realizar un estudio cuya finalidad sea la obtención de formulaciones con mayor solubilidad, que potencien la actividad antihelmíntica de estos fármacos, y actúen sobre las distintas etapas del ciclo de *T. spiralis*. El análisis comparativo de fenotipos extremos de respuesta resulta de suma utilidad en estudios de la relación huésped-parásito (Machado-Silva *et al.*, 2005); razón por la cual se eligió como modelo experimental las líneas CBi/L y CBi+ del modelo murino de trichinellosis CBI-IGE. La evaluación de la eficacia antiparasitaria de estos nuevos sistemas

terapéuticos radica en determinar la carga parasitaria en la fase intestinal y crónica de la enfermedad como también evaluar sus posibles efectos adversos. Puesto que el ratón es un hospedero natural de *T. spiralis*, el estudio del efecto de las nuevas formulaciones de los antihelmínticos en líneas del modelo murino CBi-IGE infectado con este parásito permitiría extrapolar los resultados a la especie humana por las similitudes del genoma hombre-ratón.

---

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. Objetivo general

Evaluar la eficacia antiparasitaria de nuevos sistemas terapéuticos y su interacción con la respuesta del hospedero en la infección con *Trichinella spiralis*, en dos líneas de ratones CBI-IGE, con fenotipos extremos de resistencia/susceptibilidad al parásito, como aporte para la comprensión de la relación parásito-fármaco-hospedero.

### 2.2. Objetivos específicos

\* Evaluar *in vitro* la efectividad parasiticida de los nuevos sistemas terapéuticos sobre las distintas formas morfológicas de *Trichinella spiralis* determinando:

- la viabilidad del parásito adulto,
- el efecto de los compuestos sobre el índice de larviposición de las hembras adultas de *T. spiralis*,
- la viabilidad de las larvas recién nacidas liberadas.

\* Determinar los parámetros farmacocinéticos del fármaco puro y compararlos con los de las nuevas formulaciones, en ratones de la colonia CBI-IGE, genéticamente definidos.

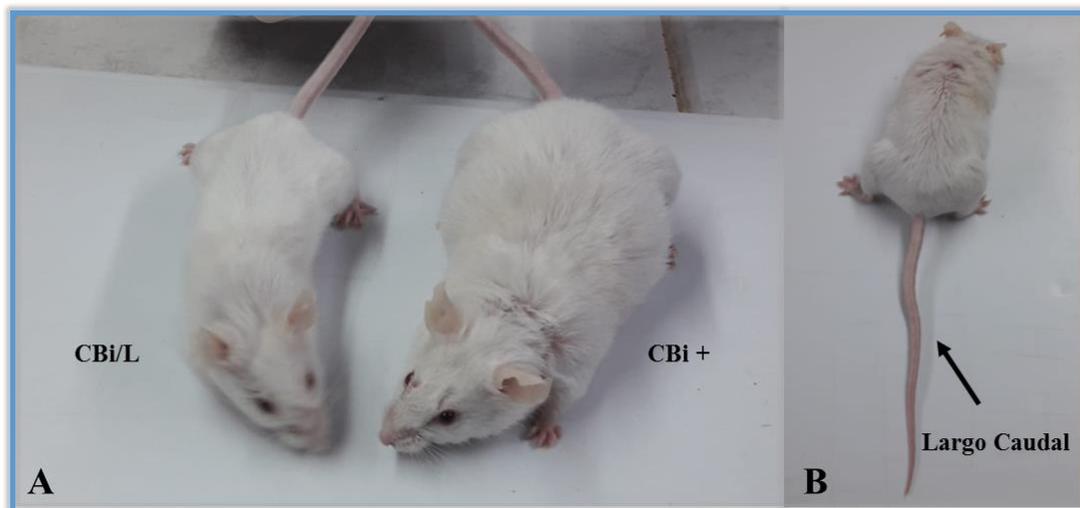
\* Estimar *in vivo* la eficacia antiparasitaria de las nuevas formulaciones determinando el grado de infección alcanzado por los animales de la línea CBI/L resistente y la línea CBI+ susceptible, cuando el tratamiento se inicia en las diferentes etapas del ciclo del parásito:

- comparar estos resultados con los de animales infectados y sin tratamiento,
- comparar estos resultados con los de animales infectados, tratados de la misma forma con el fármaco puro,
- analizar el posible efecto de genotipo y sexo del hospedero sobre la respuesta al tratamiento.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Animales

Se utilizaron ratones adultos de ambos sexos de líneas de la colonia CBI-IGE del Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, obtenidas en experimentos de selección divergente por conformación corporal (Di Masso *et al.*, 1991); actualmente estas líneas tienen más de 160 generaciones de cría selectiva y un coeficiente de endocría superior a 0.99. Se trabajó con animales de las líneas CBi/L (bajo peso-cola larga), resultante de una selección antagónica, y CBi+ (alto peso-cola larga), producto de una selección agonística. La figura 11 muestra los fenotipos característicos de hembras adultas jóvenes de ambas líneas.



**Figura 11.** Fotografía de ratones hembras de las líneas CBi/L y CBi+. A) Se observa la diferencia en conformación y tamaño corporal en adultos jóvenes. B) Los animales de ambas líneas tienen un largo caudal promedio de 11.8 cm.

Los ratones se alojaron en una habitación con temperatura constante de  $23\pm 2$  °C, una humedad relativa del  $50\pm 10$  % y un ciclo de luz-oscuridad de 12 h, en cajas plásticas con cama de viruta de madera, separados por sexo desde el destete. Los animales tuvieron acceso a alimento balanceado para roedores (Gepsa Feeds, Grupo Pilar S.A., Argentina) y agua *ad libitum*. Los experimentos que involucraron el uso de animales se realizaron durante la primera mitad del ciclo de luz.

Al finalizar el experimento se procedió a la eutanasia de los ratones por inhalación de CO<sub>2</sub> al 70 %, utilizando una cámara preparada *ad hoc*, o por dislocación cervical. Todos los experimentos con animales fueron realizados con la aprobación previa del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina (número de permiso C.S. 1398/2016). El manejo de los ratones se hizo de acuerdo a normas establecidas por el Institute for Laboratory Animal Resources, National Research Council, USA (2011), a los que adhiere el Comité de Bioética de la Institución.

### 3.2. Parásito

*Trichinella spiralis* fue generosamente proporcionado por la Dra. María Dalla Fontana (Laboratorio de Zoonosis, Laboratorio Central de la Red Provincial de Laboratorios, Dirección de Bioquímica y Farmacia, Santa Fe, Argentina). Se mantiene por pasajes sucesivos en ratones CBI desde el año 2006. Esta cepa se tipificó como *Trichinella spiralis* por PCR multiplex (Dr. Silvio Krivokapich, Departamento de Parasitología, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos Malbrán”, Buenos Aires, Argentina, comunicación personal).

### 3.3. Infección

Para la infección de los animales, las larvas infectivas L1 utilizadas fueron obtenidas por digestión artificial (Luebke, 2007) de los músculos de un ratón CBI infectado 2 a 3 meses antes para tal fin. Brevemente, el ratón infectado con una dosis de 300 larvas L1 fue sacrificado y se separaron piel, cabeza, patas, cola y vísceras. La masa muscular, en la que se incluyó la lengua, se procesó en un molinillo y se sometió a digestión artificial con pepsina (1 % p/v) y ácido clorhídrico (0.1N) para liberar las larvas. Para ello, la mezcla se colocó en un vaso sobre un agitador magnético y se incubó a 37 °C, aproximadamente una hora, con agitación suave, hasta su total digestión; la mezcla resultante se filtró y se dejó decantar durante 15 minutos. Las larvas desenquistadas se lavaron y resuspendieron en solución fisiológica estéril, determinando su número por unidad de volumen. A partir de esta suspensión, se preparó la dosis exacta para cada animal contando sólo los gusanos viables fuertemente enrollados (Stewart *et al.*, 1999).

Puesto que la respuesta del hospedero es dependiente de la cantidad de larvas infectantes ingerida (DeVos *et al.*, 1992; Hill *et al.*, 2007; Marian *et al.*, 2020) y que las líneas CBi/L y CBi+ muestran diferencias significativas de peso corporal (Tabla I), la dosis infectante equivalente para cada ratón se estandarizó y calculó como

**Tabla I.** Peso corporal de animales CBi/L y CBi+

Variable	CBi/L	CBi+
<b>Machos</b>		
<b>Peso corporal (g) #</b>	29.9 ± 0.23 <sup>a</sup>	48.3 ± 0.48 <sup>b</sup>
<b>Hembras</b>		
	27.2 ± 0.21 <sup>a</sup>	44.9 ± 0.55 <sup>b</sup>

# media ± SEM  
En cada fila, los grupos que no comparten el mismo superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas (P<0.0001).

número de larvas infectantes por gramo de peso corporal del hospedero (Muñoz *et al.*, 2007). La dosis utilizada en este trabajo fue de 2 larvas musculares por g de peso corporal del ratón, determinada en experimentos anteriores en los que se estudió el efecto una dosis única de 1, 2 o 4 larvas infectivas L1 sobre la carga parasitaria muscular (Vasconi *et al.*, 2015). La elección de este rango de dosis en progresión geométrica se basó en diferentes datos bibliográficos (Perrudet-Badoux *et al.*, 1975, 1978; Reiterová *et al.*, 2009; Martínez-Gómez *et al.*, 2011) y tuvo como objetivo determinar la dosis que permitiera detectar y destacar las posibles diferencias entre los genotipos.

La infección con *T. spiralis* se produce por la ingestión de larvas musculares del parásito. Para ello la mayoría de los investigadores utilizan una sonda gástrica, un procedimiento invasivo. En esta investigación se tuvo en cuenta lo establecido en el artículo 8.º de la Declaración Universal de los Derechos de los Animales del 15 de octubre de 1978. Este artículo 8.º advierte: a) *La experimentación animal que implique un sufrimiento físico o psicológico es incompatible con los derechos del animal, tanto si se trata de experimentos médicos, científicos, comerciales, como toda otra forma de experimentación.* b) *Las técnicas alternativas deben ser utilizadas y*

*desarrolladas*. Por lo tanto, se reemplazó la técnica de infección por sonda gástrica por el uso, como vehículo de las larvas infectivas, de una pequeña porción de un alimento, atractivo para el animal y no letal para la larva desnuda de *T. spiralis* (Vasconi, 2015). Aunque los ratones debieron dejarse en ayuno durante las 12 h previas a la infección para promover una ingestión más rápida del alimento, se evitó el sufrimiento causado por un procedimiento invasivo y se logró que el ratón se parasitara. Debe destacarse que esta metodología de infección también aseguró una dosificación más exacta pues permitió un mejor control del número de larvas ingeridas por cada animal.

A diferencia de lo informado por otros investigadores (Perrudet-Badoux *et al.*, 1975; Ishikawa *et al.*, 1998; Dehlawi & Goyal, 2003; Dvorožňáková *et al.*, 2012), la dosis infectiva utilizada en este estudio fue relativamente baja y ninguno de los ratones mostró signos clínicos de malestar asociados a la trichinellosis. Los animales fueron pesados durante el desarrollo de esta experiencia para determinar si la infección alteraba las variaciones normales en el peso corporal. Además, su condición física se monitoreó en busca de signos y síntomas de trichinellosis. Cambios en la actitud y en la apariencia del ratón como depresión, anorexia, respiración rápida o dificultosa, falta de acicalamiento, presencia de porfirina periocular y nasal, apariencia o postura anormal e inmovilidad son indicadores de dolor en los roedores, por lo que estas variables se controlaron 2 veces por semana.

*T. spiralis* es un patógeno humano clasificado por los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos como un patógeno de Clase 2; es decir, es de riesgo potencial moderado para el personal y el medio ambiente. Es capaz de causar la enfermedad después de la exposición accidental por ingestión, pero puede ser controlada bajo condiciones normales de laboratorio. El manejo seguro del organismo requiere un nivel de habilidad y sofisticación equivalente a la de los departamentos universitarios de Microbiología. Cuando se manipularon las larvas infectivas o se trabajó con animales infectados se utilizaron guantes de protección y barbijo, las mesadas se limpiaron con desinfectantes (alcohol etílico al 70 %), el acceso al bioterio fue limitado mientras el experimento estaba en curso, los cadáveres infectados se incineraron y se esterilizaron todos los líquidos sobrantes con larvas viables, antes de su eliminación.

### 3.4. Diseño y preparación de nuevas formulaciones de antihelmínticos

Los nuevos sistemas terapéuticos fueron diseñados y desarrollados por el grupo dirigido por la Dra. María Celina Lamas del Área Técnica Farmacéutica del Departamento de Farmacia dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR y el Instituto de Química de Rosario (IQUIR – CONICET).

### 3.5. Evaluación de la actividad antihelmíntica *in vitro* de las nuevas formulaciones de benzimidazoles

La actividad parasiticida de las nuevas formulaciones de benzimidazoles se evaluó sobre hembras adultas de *T. spiralis*. Como se muestra en la figura 12, se determinó el efecto de los distintos sistemas sobre la viabilidad del parásito adulto, analizando su motilidad y morfología interna y se registró a cada una como “viva” o “muerta”. También se examinó el índice de larviposición de las hembras de *T. spiralis* y la viabilidad de las larvas recién nacidas (LRN) liberadas.

Solo fue posible estudiar el efecto del fármaco en hembras porque los parásitos machos son, en su mayoría, eliminados con las heces luego de la copulación. Cabe aclarar que la cutícula de los nematodos, que ha sido considerada como una barrera limitante a la entrada de moléculas dentro del parásito, presenta igual composición proteica y lipídica en machos y hembras por lo que, en ambos, obstaculiza de igual manera el ingreso del fármaco.

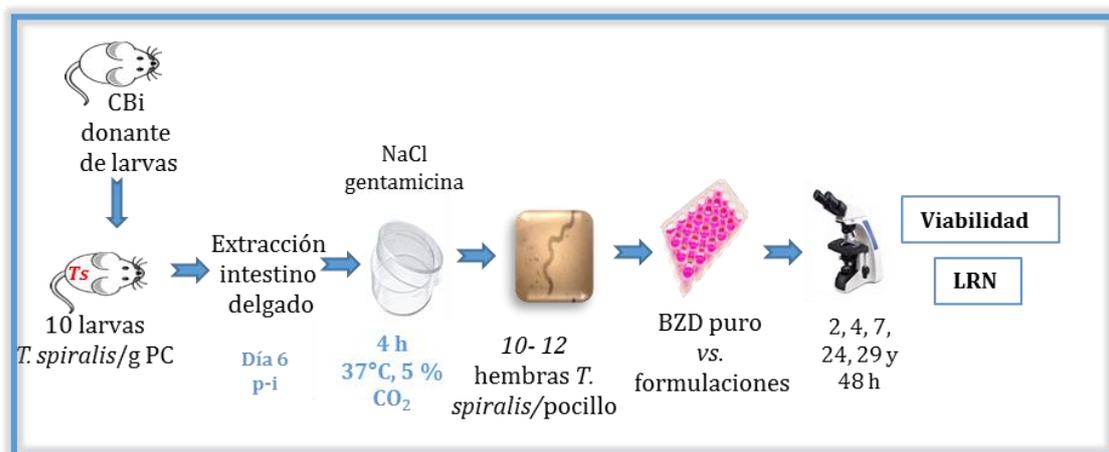
#### 3.5.1. Obtención de hembras adultas de *T. spiralis*

Los gusanos adultos se obtuvieron de ratones de la línea CBI de la colonia CBI-IGE, que se infectaron para tal fin con una dosis oral de 10 larvas L1 de *T. spiralis* por g de peso corporal. Los animales se sacrificaron a los 6 días posinfección (pi), en la fase enteral de la infección, y se extrajo su intestino delgado. Este se abrió longitudinalmente, se colocó en una placa de Petri conteniendo 15 mL de solución fisiológica con gentamicina (250 µg/mL) y se incubó durante 4 h a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Este procedimiento permite que las hembras que penetraron en el tejido intestinal migren desde la pared intestinal al líquido. Al finalizar la incubación se retiró el intestino y el líquido de incubación, que incluyó todo el contenido intestinal, se centrifugó a baja velocidad (1000 rpm) debido a la

fragilidad de las hembras adultas de *T. spiralis*. El sedimento se lavó y resuspendió nuevamente en solución fisiológica y se centrifugó, repitiéndose el proceso hasta obtener un sobrenadante límpido. Para aislar los parásitos adultos, el material sedimentado se examinó microscópicamente a una magnificación 40x; las hembras se recogieron con micropipetas estériles y se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) durante 18 h en estufa a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % hasta el inicio del ensayo *in vitro* de actividad antiparasitaria.

### 3.5.2. Ensayo *in vitro*

Las hembras de *T. spiralis* se colocaron en placas de cultivo de 24 pocillos (10 a 12 hembras por pocillo, tres pocillos por formulación) conteniendo las soluciones antiparasitarias a ensayar. Las soluciones, a las que se agregó 10 % v/v de suero fetal bovino (Klonal, Argentina) fueron previamente filtradas a través de filtros de acetato de celulosa de poro 0,2 µM (Minisart, Sartorius Stedim Biotech, USA) antes de su uso. Los gusanos se incubaron a 37 °C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %, durante 48 h y se observaron con un microscopio invertido a las 2, 4, 7, 24, 29 y 48 h (Fig. 12) para contar los gusanos “vivos” y “muertos” como se explicó en 3.5. Esta metodología permitió analizar el efecto del “tiempo en contacto con el fármaco” sobre la supervivencia del parásito.



**Figura 11.** Diseño experimental para evaluar *in vitro* la efectividad antihelmíntica de formulaciones de benzimidazoles.

Las soluciones de benzimidazoles se utilizaron como control positivo y el medio de cultivo con el disolvente empleado como control negativo. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado y los datos se corrigieron con el control negativo.

### 3.6. Ensayo *in vivo*. Análisis farmacocinético

La biodisponibilidad es la velocidad y cantidad con que un principio activo, liberado desde una forma farmacéutica, alcanza la circulación sistémica (Iannantuono & Tessler, 1994).

La biodisponibilidad de las nuevas formulaciones y del fármaco puro se determinó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, siglas del nombre en inglés del método "High Performance Liquid Chromatography") utilizando un detector UV-DAD (Agilent 1260 HPLC DAD).

Para ello, después de su administración, se midieron a distintos tiempos los niveles de concentración plasmática del metabolito de interés en los ratones que recibieron las formulaciones o el fármaco puro. Con los valores obtenidos se graficó una curva de concentración en función del tiempo y se estimaron los parámetros farmacocinéticos, concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ) y tiempo en el que se alcanza dicha concentración ( $T_{max}$ ), derivados de la curva de biodisponibilidad. Se calculó también el área bajo la curva (AUC) (Fig. 13).



**Figura 13.** Diseño experimental para determinar los parámetros farmacocinéticos de los BZD y sus nuevas formulaciones, por HPLC. ABZ y las formulaciones S4A y S10A se administraron por vía oral en una dosis única (30 mg de ABZ/kg de peso corporal). MBZ y las formulaciones NP y Comp se administraron por vía oral en una dosis única (15 mg de MBZ/kg de peso corporal).

### 3.6.1. Preparación y administración de los fármacos; obtención y procesamiento de las muestras

La preparación de las distintas formas farmacéuticas se detalla brevemente a continuación. El benzimidazol puro o la nueva formulación se mezcló con glicerina (50 mg) y se sonicó para homogeneizar. Alícuotas de esta suspensión con la concentración de benzimidazol correspondiente para cada ratón (mg BDZ/kg de peso corporal) se colocaron a microtubos de centrífuga de 1,5 mL tipo Eppendorf que se identificaron con el número del ratón. Por separado, se solubilizaron 2,6 g de gelatina en polvo en 10 mL de agua caliente (60 °C) y, antes de que la solución solidificara, se tomó una alícuota de 100 µL para agregar a cada tubo tipo Eppendorf con la suspensión del fármaco en glicerina. A continuación, la mezcla se sonicó en un baño de agua a 60 °C para lograr una correcta homogenización y se añadieron 40 mg de alimento comercial de los animales en forma de polvo, con el objetivo de incorporar un sabor familiar a la preparación y así facilitar la ingesta por parte de los ratones. El producto final obtenido contenía el benzimidazol puro o la formulación, junto con gelatina y polvillo de alimento. Estos se almacenaron a 4 °C hasta su administración.

Ratones machos y hembras CBi/L y CBi+ se dividieron aleatoriamente en grupos de tratamiento y se dejaron en ayuno de 12 horas (agua *ad libitum*) con el fin de lograr la ingesta voluntaria del medicamento obtenido. Durante este procedimiento, cada animal se alojó en jaula individual y recibió una dosis oral única del benzimidazol puro o de los distintos sistemas farmacéuticos. A distintos tiempos, se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca, para lo cual los animales fueron anestesiados 5 minutos antes de la punción con una inyección intraperitoneal de ketamina/xilacina 10:1. Las muestras de sangre se recogieron en viales heparinizados y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos para la obtención del plasma.

La decisión de realizar punción cardíaca para la obtención de las muestras sanguíneas derivó de la cantidad de plasma requerido para realizar las determinaciones por HPLC. Con esta técnica se extrae el volumen máximo de sangre del ratón y, por ende, un volumen de plasma suficiente. Al tratarse de un método de

eutanasia, en el que el ratón se sacrifica por exsanguinación, cada animal representa un único punto de la curva.

La presencia de proteínas en el plasma puede interferir en las determinaciones realizadas por métodos cromatográficos ya que presentan máximos de absorción en la región ultravioleta debido a las propiedades de los enlaces peptídicos y los residuos aromáticos de tirosina y triptófano. Ante la posibilidad de un solapamiento de las señales espectrales del fármaco en estudio y las proteínas presentes, es necesario desproteinizar las muestras de plasma antes de ser inyectadas al cromatógrafo. Para ello, cada muestra se procesó de la siguiente manera: 200  $\mu\text{L}$  de plasma de cada ratón se mezclaron con 1 mL de metanol y la mezcla se dejó reposar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos; luego se centrifugó a 15000 rpm a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 12 minutos. El sobrenadante se colocó en viales de vidrio para evaporarlo bajo vacío en un rotavapor Büchi. Los viales se conservaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta la determinación posterior del metabolito activo por HPLC.

### 3.6.2. Parámetros farmacocinéticos

Para estudiar la biodisponibilidad se recurrió a tres indicadores (Iannantuono & Tessler, 1994):

la concentración plasmática máxima ( $C_{\text{max}}$ ,  $\mu\text{g/mL}$ ), también conocida como “exposición puntual”, cuantifica la velocidad de absorción del principio activo y está determinada por el equilibrio de velocidades (velocidad de entrada y velocidad de salida);

el tiempo necesario para alcanzar  $C_{\text{max}}$  ( $T_{\text{max}}$ , h), es también función de la velocidad, pero además brinda información sobre cantidad absorbida. Estos indicadores derivan de la curva de concentración plasmática del metabolito activo en función del tiempo transcurrido desde su ingestión, luego de la administración de un fármaco;

el área bajo la curva (AUC), conocida como “exposición total” y representa la cantidad total de fármaco biodisponible. Esta variable es un valor numérico calculado por integración de las concentraciones plasmáticas comprendidas desde el momento de la administración del fármaco ( $t_0$ ) hasta el de la última concentración plasmática cuantificable ( $t_2$ ).

En esta experiencia se determinaron las áreas bajo la curva concentración- tiempo de 0 a 7 h ( $AUC_{0-7}$ ,  $\mu\text{g h/mL}$ ) y 0 a 24 h ( $AUC_{0-24}$ ,  $\mu\text{g h/mL}$ ). Las áreas bajo la curva fueron calculadas empleando el método de la regla del trapecio (GraphPad Prism 7.0, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Los resultados se expresaron como media  $\pm$  SEM. Además, se calculó la biodisponibilidad relativa de los sistemas ( $AUC_r$ ), según la ecuación:

$$AUC_r = AUC_{\text{sistema}}/AUC_{\text{BZD}} \cdot 100\%$$

donde  $AUC_{\text{sistema}}$  es el área bajo la curva del metabolito activo luego de la administración de la forma farmacéutica y  $AUC_{\text{BZD}}$  es el área bajo la curva del metabolito activo luego de la administración del benzimidazol puro.

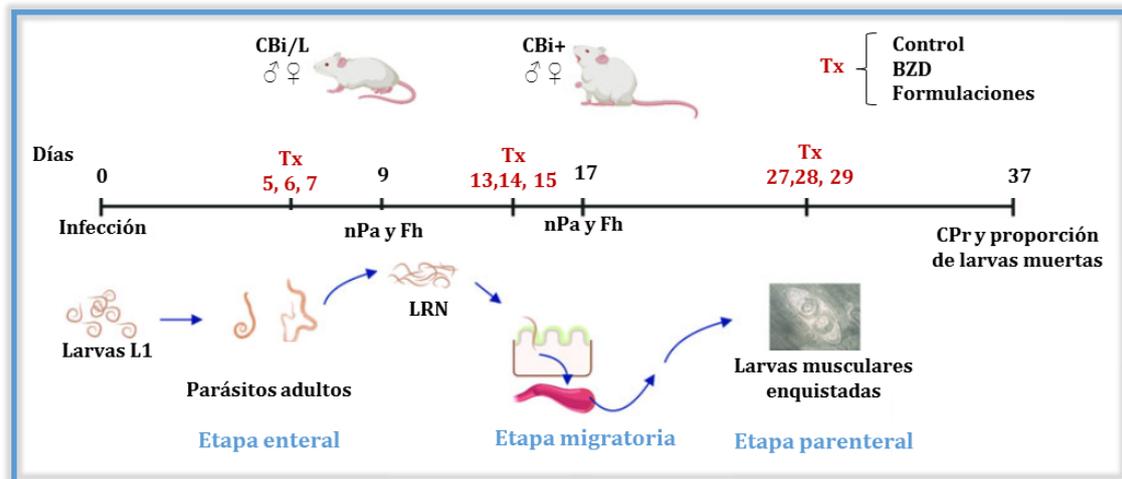
El procedimiento detallado de la técnica HPLC se describe más adelante en esta sección, en el ítem 3.8.2. para albendazol y 3.9.2. para mebendazol.

### 3.7. Ensayo *in vivo*. Evaluación de la eficacia terapéutica de las nuevas formulaciones de benzimidazoles

El protocolo de evaluación de la eficacia *in vivo* de las nuevas formulaciones antiparasitarias sobre las distintas formas morfológicas de *T. spiralis* se resume en la figura 14. El albendazol puro y sus nuevas formulaciones se evaluaron en las 3 etapas del ciclo del parásito (etapas enteral, migratoria y parenteral), mientras que los sistemas de mebendazol y el mebendazol puro se estudiaron sólo en la etapa parenteral.

Los ratones adultos CBi/L y CBi+ de ambos sexos se infectaron por vía oral con 2 larvas L1 de *T. spiralis* por gramo de peso corporal, como ya se describió en el apartado 3.3. de esta sección.

Para la evaluación de la efectividad antihelmíntica de albendazol y sus formulaciones, los animales infectados se dividieron en grupo control, que no recibió ningún tratamiento, y grupos tratados con una dosis oral diaria de albendazol o las formulaciones en la etapa enteral (**grupo E**, días 5, 6 y 7 pi), migratoria (**grupo M**, días 13, 14 y 15 pi) o parenteral (**grupo P**, días 27, 28 y 29 pi) de la infección. En los dos primeros grupos se evaluaron los efectos del tratamiento



**Figura 14.** Diseño experimental para evaluar *in vivo* la efectividad antihelmíntica de las formulaciones de BZD. ABZ y las formulaciones S4A y S10A se administraron por vía oral en una dosis única diaria (30 mg de ABZ/kg de peso corporal/día). MBZ y las formulaciones NP y Comp se administraron por vía oral en una dosis única (15 mg de MBZ/kg de peso corporal/día). Adaptada de Codina *et al.*, 2021.

sobre la carga parasitaria intestinal y muscular; en el grupo P sólo se investigó el efecto sobre la carga parasitaria muscular.

Para la evaluación de la efectividad antihelmíntica de mebendazol y sus formulaciones, los animales se dividieron en grupo control (sin tratamiento) o tratados con mebendazol o las formulaciones los días 27, 28 y 29 pi (**grupo P**). En este grupo se evaluó el efecto de los medicamentos sobre la carga parasitaria muscular.

Los preparados farmacéuticos de BZD puro o las formulaciones se elaboraron como se describió en detalle en el apartado **3.6.1**.

Durante el curso de esta experiencia, los animales fueron pesados y se evaluó su estado general frente a posibles signos y síntomas de trichinelosis y/o efectos adversos producto de los tratamientos como ya se explicó en el ítem **3.3**.

### 3.7.1. Análisis de la eficacia terapéutica. Etapa enteral

La mitad de los ratones del **grupo E** se sacrificaron 2 días después de la última administración del fármaco (día 9 pi) para estimar la carga parasitaria intestinal (nPA) y la fecundidad de la hembra de *T. spiralis* (Fh), como describiera Luebke (2007). Brevemente, se extrajo el intestino delgado, se abrió longitudinalmente y se

incubó en una placa de Petri con 15 mL de solución fisiológica conteniendo 250  $\mu$ /mL de gentamicina durante 4 horas, a 37 °C, en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Finalizada la incubación se retiró el intestino. Los gusanos adultos machos y hembras se recuperaron de la suspensión mediante centrifugación y se lavaron con solución fisiológica. El material sedimentado se resuspendió en aproximadamente 1 ml de solución salina y se colocó en una placa acrílica cuadrículada para contar los gusanos adultos con un microscopio con aumento 40x. nPA se expresó como número total de parásitos adultos presentes en el intestino, por ratón. Fh se determinó contando el número de larvas recién nacidas de cada hembra aislada. Usando una lupa microscópica, 8 a 10 hembras que migraron fuera del intestino se recolectaron con una pipeta Pasteur estéril y se colocaron (una por pocillo) en una policubeta conteniendo RPMI 1640 adicionado con 10 % de suero fetal bovino y 250  $\mu$ g/mL de gentamicina. Se incubaron 18 horas a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> y se contaron las larvas recién nacidas liberadas en cada pocillo. Los datos se expresaron como número promedio de larvas nacidas por parásito hembra, por ratón.

El resto de los animales tratados se sacrificaron a los 37 días pi para evaluar la eficacia del tratamiento sobre la carga parasitaria muscular, como se describe en 3.7.3.

### 3.7.2. Análisis de la eficacia terapéutica. Etapa migratoria

La mitad de los animales del **grupo M** se procesaron siguiendo el mismo protocolo que los animales del **grupo E**, excepto que la nPA y Fh se estudiaron en el día 17 pi, 2 días después de la última administración del fármaco.

El resto de los animales tratados se sacrificaron a los 37 días pi para evaluar la eficacia del tratamiento sobre la carga parasitaria muscular, como se describe en 3.7.3.

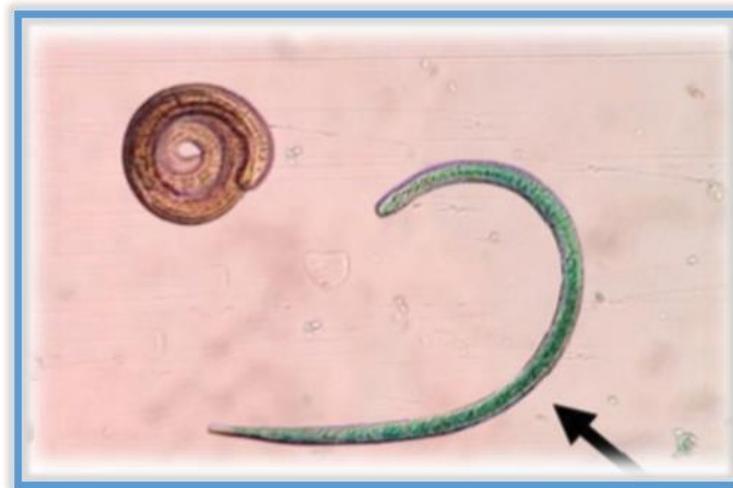
### 3.7.3. Análisis de la eficacia terapéutica. Etapa parenteral

Los animales del **grupo P** se sacrificaron a los 37 días pi, 7 días después de la última administración del fármaco. Como ya se explicó, en la misma fecha se sacrificaron también los ratones restantes de los **grupos E** y **M**. En todos ellos se examinó el efecto del tratamiento sobre el grado de infección alcanzado por cada animal, por

recuento de las larvas enquistadas en músculo. En este modelo animal el conteo se realizó en la lengua que es el sitio de predilección para el enquistamiento de las larvas de *Trichinella* en el ratón (Beiting *et al.*, 2007; Luebke, 2007; Vasconi *et al.*, 2015). Debe destacarse que este procedimiento permite la recuperación de las larvas enquistadas incluso cuando los niveles de infección son bajos (Leclair *et al.*, 2003; Picherot *et al.*, 2007).

Brevemente, la lengua se extirpó y pesó a la décima de gramo e inmediatamente después se procedió a su digestión con una solución de pepsina en HCl 0.1 N, como ya se describió en 3.3. Después de la incubación durante la noche a 37 °C, la digestión se detuvo agregando solución salina. Seguidamente, se enjuagaron las larvas con solución salina varias veces para eliminar los desechos, y el sobrenadante se eliminó luego de centrifugar durante 5 minutos a muy baja velocidad para evitar dañar las larvas. Finalmente, se lavó el sedimento con 2 mL de solución salina y el total de larvas musculares presentes en la suspensión se contó por observación microscópica con magnificación 40x. El resultado se expresó como carga parasitaria muscular relativa (CPr), que se calculó como número de parásitos por g de peso de tejido fresco.

El efecto de los tratamientos sobre la viabilidad de las larvas L1 también se utilizó



**Figura 15.** Microfotografía de larva L1 de *T.spiralis* (40x) recuperada luego de una digestión artificial de lengua. La flecha apunta una larva muerta que muestra la forma de “coma” característica, teñida con azul de metileno. Adaptada de Codina *et al.*, 2021.

como medida de su eficacia terapéutica, comparando la proporción de larvas musculares vivas/muertas recuperadas de los animales controles con la de los tratados. Para determinar el porcentaje de larvas muertas se utilizó la técnica de coloración supravital con azul de metileno descrita por Randazzo & Costamagna (2010) modificada por Codina *et al.* (2015), que permite identificar larvas muertas y moribundas por su coloración azulada. Brevemente, la suspensión de larvas obtenidas del músculo se puso en contacto con una solución de azul de metileno, se incubó durante 3 horas a 37 °C y luego se lavó y observó, bajo microscopio óptico, con una magnificación de 40x. La pérdida de viabilidad de las larvas se evidencia por la coloración de las mismas, producto de la retracción de las estructuras internas en relación con la capa quitinosa y por la fragmentación de esta última, lo que facilita la penetración del colorante. Además, la evaluación de viabilidad se corroboró por la falta de movimiento (ausencia de movimientos típicos de constante enrollamiento y desenrollamiento) y la forma de “coma” característica (Fig. 15).

Los animales tratados con mebendazol o sus formulaciones en la etapa parenteral del ciclo del parásito se procesaron de igual manera que los ratones tratados con los distintos sistemas de albendazol en esa etapa.

### 3.8. Albendazol

A continuación, se describen los sistemas terapéuticos y las características específicas de la metodología de trabajo utilizada para albendazol.

Los nuevos sistemas terapéuticos de albendazol consistieron en 20 formulaciones microcristalinas (Tabla II) obtenidas por precipitación controlada y secado por aspersión, empleando diferentes polímeros en la estabilización (Priotti *et al.*, 2017).

Brevemente, para la obtención de cada uno de los 20 sistemas microcristalinos de albendazol se disolvieron 400 mg de albendazol en ácido acético glacial (4 mL) y etanol absoluto (6 mL). La solución resultante se añadió sobre 100 mL de una solución acuosa conteniendo uno de los siguientes polímeros: hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxietilcelulosa (HEC), carboximetilcelulosa (CMC), metilcelulosa (MC) o quitosano (QS), en dos concentraciones distintas (0.1 y 0.5 % p/v), con o sin el agregado del poloxámero 338 (P338), a una concentración fija (0.02 % p/v). Esto se realizó bajo agitación magnética a 1000 rpm empleando

un equipo MSH300N (Boeco®, Alemania). Luego de la precipitación, la agitación se mantuvo constante durante 10 minutos y se procedió al secado por aspersión en un equipo Mini Büchi Spray Dryer B-290 (Flawil, Suiza). Las condiciones de secado fueron las siguientes: temperatura de entrada 130 °C, temperatura de salida 70 °C, flujo de aire de 30 m<sup>3</sup>/h, eficiencia de la bomba 12 % (caudal ~5 mL/min) y aspirador 100 %.

**Tabla II. Nomenclatura y composición de los sistemas microcristalinos de ABZ**

Sistema	Polímero	Concentración de Polímero (% p/v)	P338 (% p/v)
S1A	HPMC	0.5	-
S1B			0.02
S2A		0.1	-
S2B			0.02
S3A	HEC	0.5	-
S3B			0.02
S4A		0.1	-
S4B			0.02
S5A	CMC	0.5	-
S5B			0.02
S6A		0.1	-
S6B			0.02
S7A	MC	0.5	-
S7B			0.02
S8A		0.1	-
S8B			0.02
S9A	Q	0.5	-
S9B			0.02
S10A		0.1	-
S10B			0.02

### 3.8.1. Ensayo *in vitro*

Se prepararon soluciones madres de albendazol y de los 20 sistemas microcristalinos en dimetil sulfóxido (DMSO, 25 mg ABZ/mL). Estas soluciones se añadieron al medio RPMI 1640 con gentamicina (250 µg/mL) y se mantuvieron en agitación a 180 rpm por 24 horas, a 20°C. La concentración final de DMSO (2 %) fue la máxima concentración a la cual los parásitos se mantuvieron viables durante el tiempo del ensayo.

### 3.8.2. Análisis HPLC

Para graficar la curva de concentración plasmática en función del tiempo, el metabolito de interés medido en las formulaciones y en el fármaco puro fue el albendazol sulfóxido (primer metabolito activo del albendazol).

Las muestras de sangre se obtuvieron de ratones machos y hembras CBi/L y CBi+ (n= 63-69 por línea y por sexo) a los que se les administró una dosis oral única (30 mg ABZ/kg peso corporal) de albendazol puro o de los distintos sistemas. La toma de muestra se realizó a las 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 7 y 24 h postratamiento. Posteriormente, las muestras de plasma procesadas (ítem 3.6.1) se resuspendieron en 500 µL de fase móvil y se filtraron a través de microfiltros de di-fluoruro de polivinilideno con 0.2 µm de tamaño de poro. La fase móvil consistió en 0.05 M de buffer acetato de amonio/ acetonitrilo (85:15). Se inyectaron muestras de 50 µL, con un flujo de 1.2 mL/min, a través de una columna Zorbax Eclipse C-18 (150 x 4.6 mm; 5µm). El gradiente de elución se describe en la Tabla III. El tiempo de retención del analito fue de 7.6 ± 0.2 min.

Se construyó una curva de calibración con una concentración testigo de albendazol sulfóxido entre 0.25 y 3 µg/mL ( $R^2 = 0,99$ ). La absorbancia se midió a una longitud

**Tabla III.** Composición de la fase móvil en HPLC.

Tiempo (min)	Acetonitrilo (%)	Buffer (%)
0-4	15	85
04-12	50	50
12-14	15	85
14-17	15	85

de onda de 292 nm. La concentración de albendazol sulfóxido se determinó por comparación de los tiempos de retención con el patrón de referencia puro (Evrard *et al.*, 2002; Did *et al.*, 2011).

### 3.8.3. Ensayo *in vivo*

La eficacia terapéutica *in vivo* de los nuevos sistemas de albendazol se evaluó en las 3 etapas del ciclo del parásito. Se trabajó con 4-5 animales por línea, sexo, tratamiento y fecha de sacrificio.

## 3.9. Mebendazol

A continuación, se describen las nuevas formulaciones y las características específicas de la metodología de trabajo utilizada para mebendazol.

Para mejorar las propiedades biofarmacéuticas del mebendazol, se prepararon nanopartículas (NPs) por secado por aspersion y complejos de inclusión (Comp) con citrato de  $\beta$ -ciclodextrina (C- $\beta$ -CD). A continuación, se describen brevemente las preparaciones.

Para la preparación de las nanopartículas de mebendazol, 50 mg de mebendazol se disolvieron en ácido fórmico (2.4 mL) y se sonicaron hasta completar su disolución. Luego, esta solución de mebendazol se añadió una solución acuosa de polivinilalcohol (10 mL, al 0.5 % p/v) bajo agitación mecánica. Las nanosuspensiones resultantes se secaron por aspersion con el equipo Mini Büchi Spray Dryer B-290 (Flawil, Suiza). Las condiciones de secado fueron las siguientes: temperatura de entrada 130 °C, temperatura de salida 60 °C, flujo de aire de 30 m<sup>3</sup>/h, eficiencia de la bomba 12 % (caudal ~5 mL/min) y aspirador 100 %. De esta forma se obtuvieron nanopartículas de composición MBZ-PVA 1:1 (p/p).

La síntesis del citrato de  $\beta$ -ciclodextrina se realizó según lo descrito por García *et al.* (2014). Brevemente, el ácido cítrico y la  $\beta$ -ciclodextrina se sometieron a reflujo a 100 °C en una proporción molar 6:1. Luego de 4 horas, se añadió agua destilada y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió isopropanol para precipitar el producto y disolver el ácido cítrico que no reaccionó. Se filtró al vacío y el precipitado retenido se colocó en un cristizador para secar en estufa a 60 °C por

24 horas. Se mortereó y almacenó el citrato de  $\beta$ -ciclodextrina en frasco bien cerrado hasta su uso.

Los complejos de inclusión fueron preparados por el método de secado por aspersión. El mebendazol (0.56 moles) se disolvió en ácido fórmico (10 mL) y se añadió a la solución de citrato de  $\beta$ -ciclodextrina (0.56 moles) y agua (20 mL). La solución resultante se secó por atomización con el equipo Mini Büchi Spray Dryer B-290 (Flawil, Suiza). Las condiciones de secado fueron las siguientes: temperatura de entrada 130 °C, temperatura de salida 70 °C, flujo de aire de 38 m<sup>3</sup>/h, eficiencia de la bomba 12 % (caudal ~5 mL/min) y aspirador 100 %.

### 3.9.1. Ensayo *in vitro*

Se prepararon soluciones madres de mebendazol, de nanopartículas y de complejo de inclusión en dimetil sulfóxido (DMSO, 10 mg MBZ/mL). Estas soluciones se añadieron al medio RPMI 1640 con gentamicina (250  $\mu$ g/mL) y se mantuvieron en agitación a 180 rpm por 24 horas, a 20 °C. La concentración final de DMSO (2 %) fue la máxima concentración a la cual los parásitos se mantuvieron viables durante el tiempo del ensayo.

### 3.9.2. Análisis HPLC

Para realizar el gráfico de curva de concentración plasmática en función del tiempo, el metabolito de interés medido en las formulaciones y en el fármaco puro fue el mebendazol.

Las muestras de sangre se obtuvieron de ratones machos y hembras CBI/L y CBI+ (n= 93-99 por línea y por sexo) a los que se les administró una dosis oral única (15 mg MBZ/kg peso corporal) de mebendazol puro, nanopartícula o complejo de inclusión. La toma de muestra se realizó a las 0.3, 0.6, 1, 1.2, 2, 2.5, 3, 4, 5, 7 y 24 horas post tratamiento. Posteriormente, las muestras de plasma procesadas (ítem 3.6.1) se resuspendieron en 100  $\mu$ L de fase móvil y se filtraron a través de microfiltros de difluoruro de polivinilideno con 0.2  $\mu$ M de tamaño de poro. La fase móvil consistió en 0.05 M de buffer fosfato de potasio monobásico/metanol (40:60). Se inyectaron muestras de 25  $\mu$ L, con un flujo de 1.2 mL/min, a través de una

columna Zorbax Eclipse C-18 (150 x 4.6 mm; 5 $\mu$ M). El tiempo de retención del analito fue de 3.8  $\pm$  0.2 min.

Se construyó una curva de calibración con una concentración testigo de mebendazol entre 0.25 y 4  $\mu$ g/mL ( $R^2 = 0,99$ ). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 247 nm. La concentración de mebendazol fue determinada por comparación de los tiempos de retención con el patrón de referencia puro.

### 3.9.3. Ensayo *in vivo*

La eficacia terapéutica *in vivo* de la formulación nanopartículada y del complejo de inclusión se evaluó sólo en la etapa parenteral de la infección. Es decir, el efecto de las formulaciones se estudió sobre las larvas de *T. spiralis* ya enquistadas en músculo. La decisión de no evaluar la efectividad de las formulaciones sobre las etapas anteriores del ciclo del parásito se realizó en función de los resultados satisfactorios obtenidos en dicha etapa, ya que uno de los propósitos del proyecto es mejorar la eficacia terapéutica de los benzimidazoles en la fase crónica de la infección.

Se trabajó con 6 animales por línea, sexo y tratamiento.

### 3.10. Análisis estadístico

El estudio del significado estadístico de las diferencias entre grupos se realizó con pruebas paramétricas o no paramétricas, lo que dependió de la variable analizada y de los requerimientos de la prueba estadística (Sheskin, 2011).

La efectividad de la actividad antihelmíntica de las distintas formulaciones sobre la viabilidad de los gusanos en los ensayos *in vitro* se estudió con curvas de supervivencia, calculadas con el método de Kaplan-Meier; el significado estadístico de las diferencias entre las formulaciones se estimó con la prueba de log-rank.

En la sección RESULTADOS, en cada tabla o gráfico, se detallan las pruebas estadísticas usadas para cada variable. Las diferencias entre grupos se consideraron significativas si  $P < 0,05$ .

---

## 4. RESULTADOS

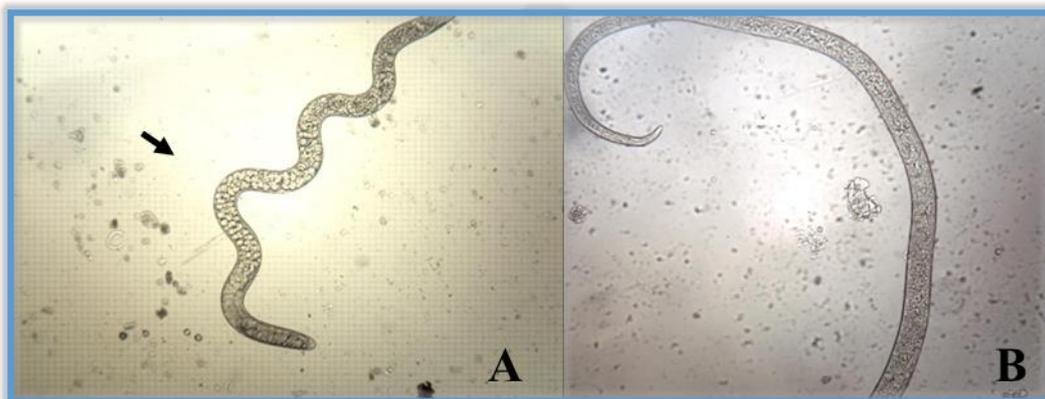
---

### I. ALBENDAZOL

#### 4.1. Actividad antihelmíntica *in vitro* de microcristales de albendazol

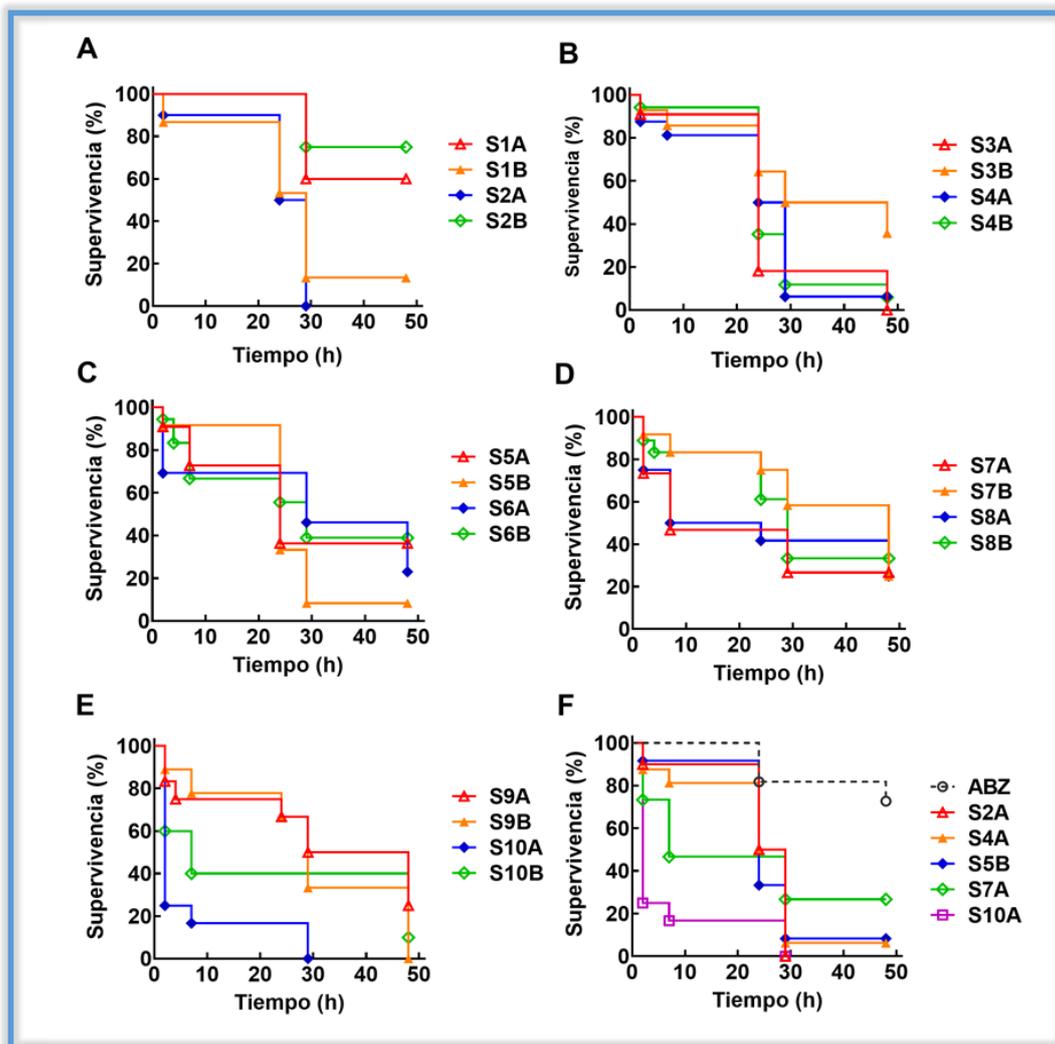
El efecto de las diferentes formulaciones microcristalinas de albendazol sobre la supervivencia de hembras adultas de *T. spiralis* se evaluó mediante curvas de supervivencia.

Para el conteo, se consideraron hembras viables aquellas que presentaban una morfología interna definida, con presencia de larvas y huevos en su interior, además de exhibir movimientos acentuados. Por el contrario, las hembras no viables (o muertas) mostraban una estructura interna alterada, indefinida, y carecían de movimiento (Fig. 16).



**Figura 16.** Microfotografía de hembras adultas de *T. spiralis*. A) hembra viable con morfología interna normal. La flecha indica los huevos en su interior; B) hembra no viable con morfología interna alterada. (Magnificación 100x).

La mayoría de las formulaciones mejoraron significativamente la actividad parasiticida del albendazol ( $P < 0.01$ ). Sólo S1A, S2B, S3B, S5A y S6B mostraron un comportamiento similar al del ABZ puro. Sus medianas de supervivencia fueron superiores a las 24 h, observándose gran cantidad de hembras viables al finalizar el experimento (Fig. 17 y Tabla IV).



**Figura 17.** Curvas de supervivencia de hembras de *T. spiralis* cultivadas con soluciones antiparasitarias conteniendo ABZ puro o los sistemas microcristalinos de ABZ estabilizados con diferentes polímeros, a los que se agregó o no el tensioactivo. A) Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), B) Hidroxiethylcelulosa (HEC), C) Carboximetilcelulosa (CMC), D) Metilcelulosa (MC) y E) Quitosano (Q). Sistemas con numeración impar: concentración polimérica 0.5 % p/v. Sistemas con numeración par: concentración polimérica 0.1 % p/v. La letra A identifica a los sistemas sin agregado de tensioactivos, la letra B la presentan los sistemas con 0.02 % de poloxámero 338 (P338). En la figura F) El mejor sistema de cada grupo polimérico se comparó frente al ABZ puro (ABZ).

Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se generaron con GraphPad Prism versión 7.0. El significado de las diferencias entre las curvas se calculó con la prueba de rango logarítmico.

En general, la concentración de polímero (0.5 o 0.1 % p/v) no cambió la actividad antihelmíntica de los sistemas. En algunos casos (4 de los 20 sistemas estudiados), el efecto fue significativo, pero al azar, observándose diferentes respuestas según el polímero empleado. Los sistemas formulados con HPMC, HEC o Q, en ausencia de P338, fueron significativamente más activos a bajas concentraciones. El sistema

HPMC con P338 mejoró su actividad cuando se incrementó la concentración del polímero.

**Tabla IV.** Efecto del ABZ y de las formulaciones de microcristales sobre los parámetros de supervivencia de hembras adultas de *T. spiralis*, después de 48 horas de incubación.

Solución antiparasitaria	Variables	
	Mediana de supervivencia (h)	Proporción de hembras viables (%)
ABZ	Indefinido	72.7
S1A <sup>a</sup>	Indefinido	60.0
S1B <sup>b</sup>	29	13.3
S2A <sup>b</sup>	26.5	0
S2B <sup>a</sup>	Indefinido	75.0
S3A <sup>a</sup>	24	0
S3B <sup>b</sup>	38.5	35.7
S4A <sup>a,b</sup>	26.5	6.3
S4B <sup>a</sup>	24	5.9
S5A <sup>a</sup>	24	36.4
S5B <sup>a</sup>	24	8.3
S6A <sup>a</sup>	29	23.1
S6B <sup>a</sup>	29	38.9
S7A <sup>a</sup>	7	26.7
S7B <sup>a</sup>	48	25.0
S8A <sup>a</sup>	15.5	25.0
S8B <sup>a</sup>	29	33.3
S9A <sup>a</sup>	38.5	25.0
S9B <sup>a</sup>	29	0
S10A <sup>b</sup>	2	0
S10B <sup>a</sup>	7	10.0

Los datos de la tabla derivan de las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier generadas con GraphPad Prism versión 7.0. El significado de las diferencias entre las curvas se calculó con la prueba de rango logarítmico.

Los grupos que no comparten el mismo superíndice dentro de los sistemas formulados con el mismo polímero presentan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.01$ ).

Se observaron resultados similares cuando se agregó el surfactante P388 a la formulación. La formulación de microcristales con HPMC fue el único sistema que mostró más actividad con la adición de P388 (S1, Fig. 17A; Tabla IV).

De cada grupo polimérico, se seleccionaron aquellas formulaciones microcristalinas que presentaron la mejor actividad parasiticida (Fig. 17F). Los sistemas elegidos se compararon frente al fármaco puro y, en todos los casos, tuvieron una actividad significativamente mejor que ABZ ( $P < 0.01$ ). El sistema S10A fue considerablemente más efectivo que los otros ( $P < 0.01$ ).

También se examinó el efecto de las formulaciones sobre las larvas recién nacidas liberadas por las hembras de *T. spiralis*. La movilidad de las larvas recién nacidas se vio afectada en diversos grados por las formulaciones, mostrando pérdida completa de movimiento después de 2 horas y hasta el final del experimento, en los pocillos que contenían S4A, S5B y S10A. En los demás sistemas se observaron tanto larvas móviles como inmóviles en el período estudiado.

En base a los resultados obtenidos en este ensayo *in vitro* y a la caracterización fisicoquímica realizada previamente por Priotti *et al.* (2017), los sistemas S4A y S10A se consideraron los más eficaces y se seleccionaron para continuar el estudio de sus características farmacocinéticas y actividad antihelmíntica *in vivo*.

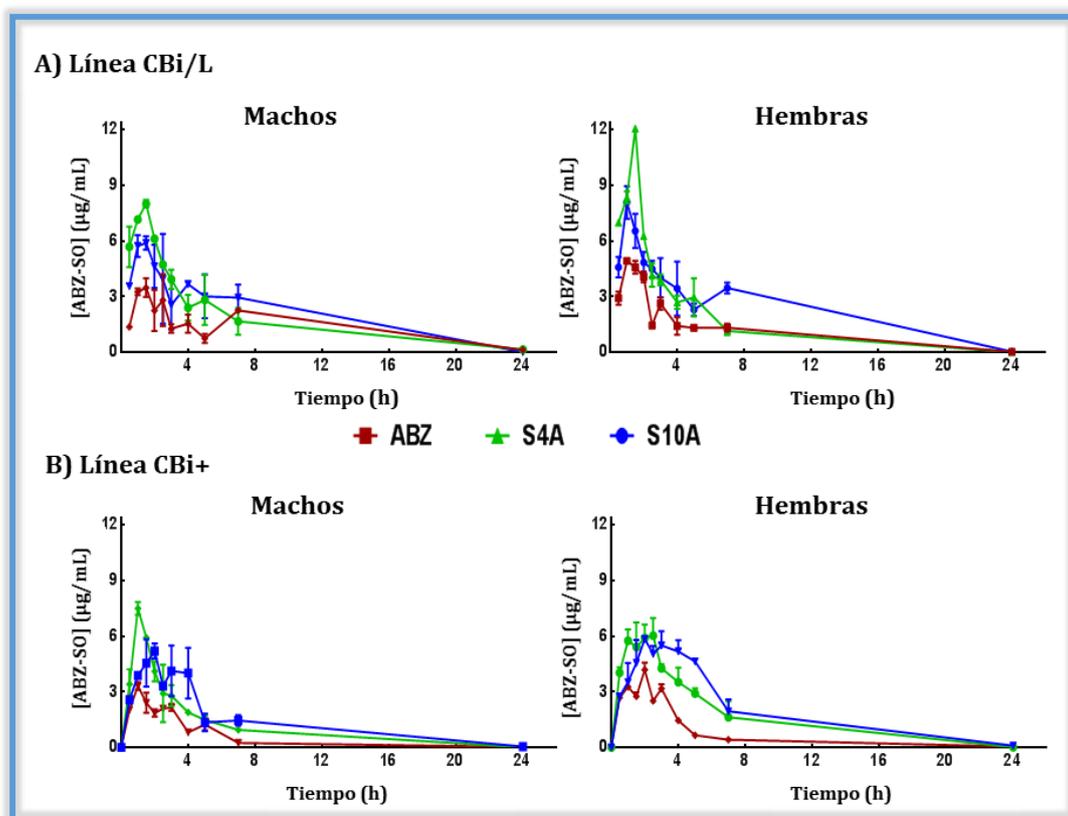
#### 4.2. Análisis farmacocinético

La biodisponibilidad de los sistemas S4A y S10A se evaluó midiendo los niveles de concentración plasmática de albendazol sulfóxido (ABZSO), principal metabolito activo, y se la comparó con la de ABZ puro (Fig. 18).

Los parámetros farmacocinéticos derivados de la curva de biodisponibilidad se resumen en las tablas V y VI. Los valores de  $C_{max}$  y  $T_{max}$  para ABZ puro obtenidos en este trabajo fueron similares a los reportados previamente por otros autores, en estudios realizados en ratones (Rodríguez *et al.*, 2009; Paredes *et al.*, 2018).

Los ratones que recibieron las formulaciones S4A y S10A mostraron una mayor concentración plasmática de albendazol sulfóxido y un aumento significativo en los valores de  $C_{max}$  comparados con aquellos que recibieron ABZ puro ( $C_{Bi}/L$ : ♂  $P = 0.003$ , ♀  $P = 0.005$ ;  $C_{Bi+}$ : ♂  $P = 0.010$ , ♀  $P = 0.009$ ). En machos y hembras de ambos

genotipos, S4A fue significativamente mejor que ABZ (C*Bi*/L:  $P < 0.005$ ; C*Bi*+:  $P < 0.010$ ). S4A también mostró una mejora significativa en la  $C_{max}$  en comparación con S10A, en los ratones C*Bi*/L ( $\sigma P = 0.038$ ;  $\text{♀} P = 0.024$ ; Tabla V); esta diferencia entre formulaciones no se observó en los animales C*Bi*+ (Tabla VI). La  $C_{max}$  mostró un efecto de sexo en el genotipo C*Bi*/L: las hembras alcanzaron valores mayores que los machos, siendo esta diferencia significativa en el grupo que recibió S4A ( $P = 0.004$ ). Esta variable también presentó un efecto de genotipo, ya que los ratones C*Bi*/L tuvieron valores de  $C_{max}$  más altos que C*Bi*+; sin embargo, la diferencia alcanzó el significado estadístico solo en hembras tratadas con S4A ( $P = 0.001$ ).



**Figura 18.** Curvas de concentración plasmática de albendazol sulfóxido en función del tiempo después de la administración oral de una única dosis de albendazol puro, S4A o S10A (dosis: 30 mg ABZ/kg de peso corporal), en ratones de las líneas C*Bi*/L (A) y C*Bi*+ (B) machos y hembras.

Los valores de  $T_{max}$  variaron entre los grupos. Los machos C*Bi*/L tratados con ABZ o S10A tuvieron un  $T_{max}$  más alto que las hembras del mismo genotipo (Tabla V). Los ratones C*Bi*+, en cambio, mostraron un claro efecto de sexo en  $T_{max}$  ya que la concentración máxima se alcanzó antes en los machos, independientemente del tratamiento (Tabla VI).

**Tabla V.** Parámetros farmacocinéticos de ABZSO obtenidos después de la administración de ABZ o sistemas microcristalinos de ABZ (dosis oral única de 30 mg ABZ/kg) a ratones CBI/L machos y hembras.

Parámetros farmacocinéticos	Sexo	Solución antiparasitaria		
		ABZ	S4A	S10A
C <sub>máx</sub> (μg/mL)#	♂	3.8 ± 0.38 <sup>a</sup>	8.0 ± 0.21 <sup>b</sup>	6.3 ± 0.03 <sup>c</sup>
	♀	5.1 ± 0.01 <sup>a</sup>	12.1 ± 0.11 <sup>b</sup>	8.1 ± 0.88 <sup>c</sup>
T <sub>máx</sub> (h)	♂	1.5	1.5	1.5
	♀	1	1.5	1
AUC <sub>(0-7h)</sub> (μg.h/mL)#	♂	11.6 ± 1.67 <sup>a</sup>	25.7 ± 2.65 <sup>b</sup>	23.3 ± 0.74 <sup>b</sup>
	♀	15.4 ± 0.28 <sup>a</sup>	28.4 ± 2.00 <sup>b</sup>	26.5 ± 0.83 <sup>b</sup>
AUC <sub>(0-24h)</sub> (μg.h/mL)#	♂	32.4 ± 2.55 <sup>a</sup>	41.2 ± 3.50 <sup>a</sup>	49.3 ± 4.37 <sup>a</sup>
	♀	27.3 ± 1.60 <sup>a</sup>	38.3 ± 0.15 <sup>a</sup>	56.3 ± 3.40 <sup>b</sup>
Aumento AUC <sub>r(0-7h)</sub> (%)	♂	-	122	101
	♀	-	84	72
Aumento AUC <sub>r(0-24h)</sub> (%)	♂	-	27	52
	♀	-	40	106

#media ± SEM

Las diferencias entre los grupos de tratamiento se estimaron mediante un ANOVA paramétrico seguido de un test de Tukey para comparaciones múltiples. En cada fila, los grupos que no comparten el mismo superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas (P<0.025).

Como se muestra en las tablas V y VI, la biodisponibilidad, estimada calculando el AUC a partir de la curva de concentración plasmática versus tiempo de ABZSO, fue mayor en los ratones a los que se administró las formulaciones S4A y S10A que en

los que recibieron ABZ puro. En esta variable también se observaron diferencias atribuibles a efectos de genotipo y sexo. Los machos y hembras CBi/L tratados con S4A o S10A aumentaron el  $AUC_{0-7}$  en comparación con ABZ ( $\sigma P = 0.024$ ;  $\text{♀} P = 0.010$ ) pero no hubo diferencias significativas entre las formulaciones ( $P > 0.05$ ; Tabla V). Esta variable no mostró un efecto significativo de sexo ( $P > 0.05$ ) aunque las hembras CBi/L tendieron a tener valores más altos que los machos. El  $AUC_{0-24}$  también fue mayor para las formulaciones y se observó un efecto del sexo: la diferencia fue significativa en las hembras ( $P = 0.006$ ) pero no en los machos ( $P = 0,096$ ). Las hembras CBi/L que recibieron S10A tuvieron un  $AUC_{0-24}$  significativamente mayor que las que tomaron ABZ ( $P = 0.005$ ) o S4A ( $P = 0.020$ ).

La tabla VI muestra los resultados obtenidos en ratones CBi+. Este genotipo también mostró un  $AUC_{0-7}$  más alto para las formulaciones, pero la diferencia fue significativa sólo en las hembras ( $\text{♀} P = 0.0040$ ;  $\sigma P = 0.1229$ ); no hubo diferencias significativas entre las formulaciones.  $AUC_{0-7}$  mostró un efecto de sexo ya que las hembras CBi+ presentaron valores más altos que los machos ( $P < 0.05$ ). Los valores de  $AUC_{0-24}$  también fueron más altos para las formulaciones, aunque las diferencias no fueron significativas. Dado que, en los ratones CBi+,  $AUC_{0-24}$  no tuvo un efecto significativo de sexo, fue posible analizar juntos machos y hembras. El análisis mostró que esta variable fue similar para ambas formulaciones ( $P > 0.05$ ) y significativamente mayor que para ABZ ( $P = 0.008$ ).

La variable AUC expresa bastante bien la cinética de absorción y abarca cuantitativamente los términos tasa de absorción y cantidad de fármaco que llega a la sangre. Curiosamente, en este trabajo el efecto del genotipo sobre esta variable se observó sólo para el fármaco puro, aunque, en general, los ratones CBi/L tuvieron un AUC más alto que CBi+. Esta diferencia fue significativa en hembras para  $AUC_{0-7}$  ( $P = 0.013$ ) y en ambos sexos para  $AUC_{0-24}$  ( $\sigma P = 0.021$ ;  $\text{♀} P = 0.030$ ).

La biodisponibilidad relativa ( $AUC_r$ ), que estima el rendimiento de los sistemas en comparación con ABZ puro, mostró diferencias entre las formulaciones. S4A y S10A tuvieron un aumento promedio similar en  $AUC_{r0-7h}$ , aunque S4A resultó mejor en animales CBi/L (Tabla V) y S10A en CBi+ (Tabla VI).  $AUC_{r0-24h}$  mostró valores más altos para S10A en ambas líneas.

**Tabla VI.** Parámetros farmacocinéticos de ABZSO obtenidos después de la administración de ABZ o sistemas microcristalinos de ABZ (dosis oral única de 30 mg ABZ/kg) a ratones CBI+ machos y hembras.

Parámetros farmacocinéticos	Sexo	Solución antiparasitaria		
		ABZ	S4A	S10A
$C_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) #	♂	3.3 ± 0.21 <sup>a</sup>	7.5 ± 0.34 <sup>b</sup>	5.3 ± 0.51 <sup>a,b</sup>
	♀	4.2 ± 0.38 <sup>a</sup>	6.9 ± 0.12 <sup>b</sup>	6.1 ± 0.15 <sup>b</sup>
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	♂	1	1	2
	♀	2	2	2.5
$AUC_{(0-7h)}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ) #	♂	10.4 ± 0.56 <sup>a</sup>	19.1 ± 1.58 <sup>b</sup>	20.3 ± 4.05 <sup>a,b</sup>
	♀	12.9 ± 0.06 <sup>a</sup>	26.3 ± 1.92 <sup>b</sup>	29.1 ± 0.40 <sup>b</sup>
$AUC_{(0-24h)}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ) #	♂	12.7 ± 1.47 <sup>a</sup>	27.3 ± 0.07 <sup>a</sup>	33.1 ± 6.49 <sup>a</sup>
	♀	16.8 ± 0.94 <sup>a</sup>	40.3 ± 9.28 <sup>a,b</sup>	46.5 ± 5.81 <sup>b</sup>
Aumento $AUCr_{(0-7h)}$ (%)	♂	-	84	95
	♀	-	104	127
Aumento $AUCr_{(0-24h)}$ (%)	♂	-	115	161
	♀	-	140	177

#media ± SEM

Las diferencias entre los tres grupos de tratamiento se estimaron mediante un ANOVA paramétrico seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. En cada fila, los grupos que no comparten el mismo superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

### 4.3. Actividad antihelmíntica *in vivo* de microcristales de albendazol

Para evaluar la eficacia antihelmíntica *in vivo* de S4A y S10A, los sistemas se administraron en las diferentes etapas del ciclo del parásito. En la etapa enteral y migratoria se determinó el efecto de las formulaciones sobre los parásitos adultos de *T. spiralis* en el intestino y las larvas L1 enquistadas en músculo. En la etapa parenteral sólo se evaluó el efecto sobre las larvas enquistadas. Los resultados se compararon con los de los animales que recibieron ABZ puro como tratamiento.

Cabe destacar que, durante todo el curso de esta experiencia, los animales presentaron buen estado general de salud y no mostraron cambios significativos en su peso corporal. Los ratones no presentaron signos ni síntomas de trichinellosis y/o efectos adversos producto de los tratamientos.

#### 4.3.1. Eficacia terapéutica en la etapa enteral

La efectividad de los tratamientos en la etapa aguda del ciclo de *T. spiralis* se evaluó luego de administrar una dosis diaria de ABZ, S4A o S10A los días 5, 6 y 7 pi. La mitad de los ratones se sacrificaron 2 días después de la última dosis del fármaco y la eficacia terapéutica se estimó por su efecto sobre la carga parasitaria intestinal (nPA) y fecundidad de la hembra (Fh; Tabla VII).

En el día 9 pi, no se observaron diferencias significativas en el número de parásitos adultos entre los grupos tratados y el control, en ninguno de los genotipos o sexos. La fecundidad de las hembras solo pudo determinarse en hembras de *T. spiralis* recuperadas de ratones del grupo control ya que las provenientes de ratones tratados con albendazol o las formulaciones estaban muertas o presentaban su morfología interna alterada.

El efecto de las diferentes formulaciones de ABZ sobre el número de larvas enquistadas se analizó el día 37 pi (Tabla VIII). La carga parasitaria muscular fue significativamente menor en los animales tratados (CBi/L, ♂ P=0.01, ♀ P=0.0001; CBi+, ♂ P=0.0002, ♀ P=0.02) que en los ratones del grupo control respectivo. No hubo diferencias significativas entre las formulaciones; todas redujeron la CPr en un 90% respecto de su control, independientemente del genotipo y sexo del hospedero. Este hallazgo es notable en el hospedero susceptible CBi+ ya que estos ratones,

cuando no se tratan, alcanzan una carga muscular parasitaria de 5 a 7 veces mayor que los ratones CBi/L resistentes.

**Tabla VII.** Efecto del tratamiento durante la etapa enteral de la infección sobre la carga parasitaria intestinal del hospedero y la fecundidad de la hembra de *T. spiralis*.

Variable Tratamiento	CBi/L		CBi+	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
	<b>nPA*</b>			
<b>Control</b>	6.5 (2-17) <sup>a</sup>	2.0 (0-5) <sup>a</sup>	13.5 (9-19) <sup>a</sup>	22.0 (10-27) <sup>a</sup>
<b>ABZ</b>	7.0 (3-8) <sup>a</sup>	1.5 (0-3) <sup>a</sup>	13.5 (10-17) <sup>a</sup>	8.0 (3-17) <sup>a</sup>
<b>S4A</b>	6.5 (1-8) <sup>a</sup>	2.0 (0-10) <sup>a</sup>	19.5 (13-24) <sup>a</sup>	17.0 (14-20) <sup>a</sup>
<b>S10A</b>	7.0 (3-14) <sup>a</sup>	0 (0-3) <sup>a</sup>	15.0 (5-23) <sup>a</sup>	21.0 (20-23) <sup>a</sup>
	<b>Fh<sup>#</sup></b>			
<b>Control</b>	29 ± 15.2	34 <sup>♦</sup>	50 ± 25.0	46 ± 16.6
<b>ABZ</b>	---	---	---	---
<b>S4A</b>	---	---	---	---
<b>S10A</b>	---	---	---	---

\*mediana (rango)      #media ± SEM      ♦ sólo se recuperó una hembra de *T. spiralis*

**nPA:** número total de parásitos adultos intestinales

**Fh:** fecundidad de las hembras de *T. spiralis*

Las diferencias entre tratamientos dentro de genotipo y sexo se evaluaron con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn para la comparación entre grupos.

Los grupos que no comparten el mismo superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

La proporción de larvas muertas fue similar en los grupos tratados y control (datos no mostrados), lo cual era de esperar dado que el antihelmíntico se administró en la fase enteral de la infección. Cuando la LRN llega al músculo para enquistarse, el ingrediente farmacéutico activo ya se ha metabolizado y excretado.

Los resultados del tratamiento en esta fase de la infección indican que el tratamiento con ABZ, S4A o S10A fue igualmente efectivo para reducir el número de larvas enquistadas.

**Tabla VIII.** Efecto del tratamiento durante la etapa enteral de la infección sobre el número de larvas L1 de *T. spiralis* enquistadas.

Variable Tratamiento	CBI/L		CBI+	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
	<b>CPr<sup>#</sup></b>			
<b>Control</b>	247 ± 97.1 <sup>a</sup>	250 ± 54.2 <sup>a</sup>	1132 ± 221.7 <sup>a</sup>	1463 ± 672.0 <sup>a</sup>
<b>ABZ</b>	20 ± 10.1 <sup>b</sup>	27 ± 6.4 <sup>b</sup>	83 ± 28.0 <sup>b</sup>	117 ± 42.9 <sup>b</sup>
<b>S4A</b>	12 ± 9.5 <sup>b</sup>	9 ± 4.2 <sup>b</sup>	66 ± 10.2 <sup>b</sup>	189 ± 117.2 <sup>b</sup>
<b>S10A</b>	19 ± 13.7 <sup>b</sup>	16 ± 6.8 <sup>b</sup>	225 ± 119 <sup>b</sup>	232 ± 76.7 <sup>b</sup>

#media ± SEM

**CPr:** carga parasitaria muscular relativa

Las diferencias entre tratamientos dentro de genotipo y sexo se evaluaron con un ANOVA a un criterio, seguida de la prueba de Bonferroni para la comparación entre grupos.

Los grupos que no comparten el mismo superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas (P&lt;0.01).

#### 4.3.2. Eficacia terapéutica en la etapa migratoria

No se encontraron parásitos adultos en los intestinos de los ratones tratados con ABZ o las formulaciones S4A y S10A los días 13, 14 y 15 pi y sacrificados 48 horas después. La disminución en el número de parásitos adultos está estrechamente relacionada con el complejo ciclo evolutivo que presenta *T. spiralis*. Se ha demostrado, en ratas, que la expulsión del parásito adulto de *T. spiralis* del intestino delgado comienza entre los días 8 y 10 pi, en que aproximadamente una tercera parte de los nematodos es eliminada. En el día 12 pi sólo el 20 % de los gusanos adultos aún está presente en el intestino, mientras que en el día 16 la expulsión se considera completa (Love *et al.*, 1975). En el modelo CBI-IGE de infección por *T. spiralis*, la fase migratoria comienza en los días 5 a 6 pi y, dependiendo de la línea hospedera, en el día 13 pi, se recuperan pocos o ningún gusano del intestino (Vasconi *et al.*, 2015).

Dado que no existe un método directo para medir la eficacia terapéutica en la fase migratoria, el efecto del tratamiento se evaluó por el número de larvas que lograron llegar a los músculos para enquistarse. El efecto del tratamiento en esta fase sobre el número de larvas enquistadas en músculo se evaluó el día 37 pi (Tabla IX).

**Tabla IX.** Efecto del tratamiento durante la etapa migratoria de la infección sobre el número de larvas L1 de *T. spiralis* enquistadas.

Variable Tratamiento	CBi/L		CBi+	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
	CPr <sup>#</sup>			
<b>Control</b>	258 ± 76.7 <sup>a</sup>	197 ± 33.9 <sup>a</sup>	1268 ± 462.4 <sup>a</sup>	1168 ± 287.5 <sup>a</sup>
<b>ABZ</b>	159 ± 36.2 <sup>a</sup>	151 ± 37.7 <sup>a</sup>	1107 ± 300.1 <sup>a</sup>	1081 ± 287.7 <sup>a</sup>
<b>S4A</b>	113 ± 47.8 <sup>a</sup>	142 ± 30.9 <sup>a</sup>	669 ± 499.5 <sup>a</sup>	1596 ± 476.2 <sup>a</sup>
<b>S10A</b>	137 ± 42.9 <sup>a</sup>	141 ± 31.2 <sup>a</sup>	669 ± 118.0 <sup>a</sup>	869 ± 206.2 <sup>a</sup>

#media ± SEM

**CPr:** carga parasitaria muscular relativa

Las diferencias entre tratamientos dentro de genotipo y sexo se evaluaron con un ANOVA a un criterio, seguida del test de Bonferroni para la comparación entre grupos. Los grupos que no comparten el mismo superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

Los microcristales mostraron una mejor respuesta terapéutica, aunque no estadísticamente significativa, que el ABZ puro. Los machos de ambos genotipos tratados con S4A o S10A redujeron a la mitad la carga parasitaria muscular en comparación con los controles; sin embargo, esta respuesta no se observó en las hembras.

#### 4.3.3. Eficacia terapéutica en la etapa parenteral

Para evaluar la efectividad de los tratamientos en la etapa crónica del ciclo de *T. spiralis*, se administró ABZ, S4A o S10A los días 27, 28 y 29 pi. Los animales se sacrificaron el día 37 pi. Se determinó la CPr y la proporción de larvas musculares muertas. Los resultados se muestran en la tabla X.

La tabla X muestra el efecto de la administración de ABZ puro o en formulaciones microcristalinas en la fase crónica de la infección, días 27, 28 y 29 pi, sobre la carga parasitaria muscular y la proporción de larvas muertas. Los ratones tratados, del mismo genotipo y sexo, sacrificados en el día 37 pi, tuvieron una CPr similar. El número de larvas muertas fue, en general, mayor en los ratones tratados que en los controles. Los hospederos CBi/L tratados, independientemente del sexo, mostraron una mayor proporción de larvas muertas que sus controles, siendo esta diferencia

significativa para los machos CBi/L que recibieron S10A ( $P = 0,0385$ ). Los machos y hembras CBi+ no mostraron la misma respuesta al tratamiento ( $P < 0,05$ ): los machos tratados se comportaron de manera similar a los ratones CBi/L y tendieron a aumentar el porcentaje de larvas muertas, en tanto que las hembras tratadas no se diferenciaron de sus controles.

**Tabla X.** Efecto del tratamiento durante la etapa crónica de la infección sobre el número de larvas L1 de *T. spiralis* enquistadas.

Variable Tratamiento	CBi/L		CBi+	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
	<b>CPr<sup>#</sup></b>			
<b>Control</b>	240 ± 45.5 <sup>a</sup>	173 ± 75.5 <sup>a</sup>	998 ± 74.8 <sup>a</sup>	752 ± 157.9 <sup>a</sup>
<b>ABZ</b>	268 ± 71.6 <sup>a</sup>	283 ± 94.9 <sup>a</sup>	1084 ± 201.8 <sup>a</sup>	794 ± 144.9 <sup>a</sup>
<b>S4A</b>	266 ± 46.7 <sup>a</sup>	172 ± 45.7 <sup>a</sup>	1177 ± 154.8 <sup>a</sup>	662 ± 197.0 <sup>a</sup>
<b>S10A</b>	338 ± 57.6 <sup>a</sup>	130 ± 26.1 <sup>a</sup>	1172 ± 287.8 <sup>a</sup>	883 ± 210.9 <sup>a</sup>

Variable Tratamiento	<b>Proporción de larvas musculares de <i>T. spiralis</i> muertas (%)<sup>◇</sup></b>			
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
<b>Control</b>	20 (8-29) <sup>a</sup>	9 (0-25) <sup>a</sup>	24 (14-33) <sup>a</sup>	7 (4-14) <sup>a</sup>
<b>ABZ</b>	28 (0-37) <sup>a</sup>	37 (0-68) <sup>a</sup>	30 (15-60) <sup>a</sup>	7 (5-21) <sup>a</sup>
<b>S4A</b>	29 (14-37) <sup>a</sup>	33 (0-96) <sup>a</sup>	38 (7-93) <sup>a</sup>	13 (6-20) <sup>a</sup>
<b>S10A</b>	64 (18-88) <sup>b</sup>	50 (6-100) <sup>a</sup>	54 (13-74) <sup>a</sup>	12 (5-22) <sup>a</sup>

#media ± SEM

**CPr:** carga parasitaria muscular relativa

Las diferencias entre tratamientos dentro de genotipo y sexo se evaluaron con un ANOVA a un criterio, seguida de la prueba de Bonferroni para la comparación entre grupos.

◇ mediana (rango)

Las diferencias entre tratamientos dentro de genotipo y sexo se evaluaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn para la comparación entre grupos.

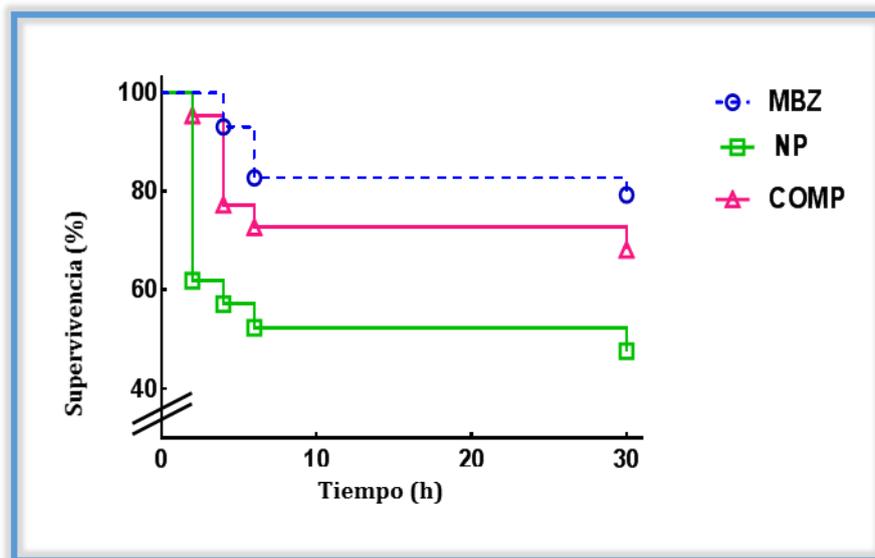
Los grupos que no comparten el mismo superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

En esta etapa del ciclo del parásito, el sistema de microcristales S10A mostró una mejor eficacia terapéutica que S4A.

## II. MEBENDAZOL

### 4.4. Actividad antihelmíntica *in vitro* de las formulaciones de mebendazol

Para mejorar la solubilidad y lograr una mayor absorción del MBZ, se desarrollaron un sistema nanoparticulado (NP) y un complejo con  $\beta$ -ciclodextrina (Comp). El efecto de estas formulaciones sobre la supervivencia de hembras adultas de *T. spiralis* se evaluó *in vitro*, mediante una curva de supervivencia (Fig. 19).



**Figura 19.** Curva de supervivencia de hembras de *T. spiralis* en contacto con las distintas soluciones antiparasitarias de MBZ. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se generaron con GraphPad Prism versión 7.0. El significado de las diferencias entre las curvas se calculó con la prueba de rango logarítmico.

Los resultados mostraron que los nuevos sistemas de MBZ mejoraron la actividad parasiticida del fármaco puro ( $P=0.0232$ ). La formulación nanoparticulada fue significativamente superior al MBZ puro ( $P=0.0093$ ), con una mediana de supervivencia de 30 horas y una proporción de larvas vivas a las 30 h de 47.6 % (Tabla XI). Por el contrario, la actividad del Comp no difirió respecto al fármaco puro.

En el lapso estudiado, las larvas recién nacidas en contacto con las soluciones presentaron una movilidad normal. Sin embargo, se observó que el número de larvas recién nacidas fue menor en el sistema nanoparticulado (datos no mostrados).

**Tabla XI.** Efecto de las diferentes soluciones antiparasitarias sobre parámetros de supervivencia de *T. spiralis*.

Solución antiparasitaria	Variables	
	Mediana de supervivencia (h)	Proporción de hembras viables (%)
MBZ <sup>a</sup>	Indefinido	79.3
NP <sup>b</sup>	30	47.6
Comp <sup>a</sup>	Indefinido	68.2

Los datos de la tabla derivan de las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier generadas con GraphPad Prism versión 7.0. El significado de las diferencias entre las curvas se calculó con la prueba de rango logarítmico.

Los grupos que no comparten el mismo superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

El efecto de las formulaciones de mebendazol en la supervivencia de las hembras de *T. spiralis* indicó que la metodología para su obtención mejora la actividad antihelmíntica del mebendazol. En función de estos resultados, se decidió continuar con las siguientes etapas: determinar su perfil farmacocinético y probar su eficacia terapéutica *in vivo*.

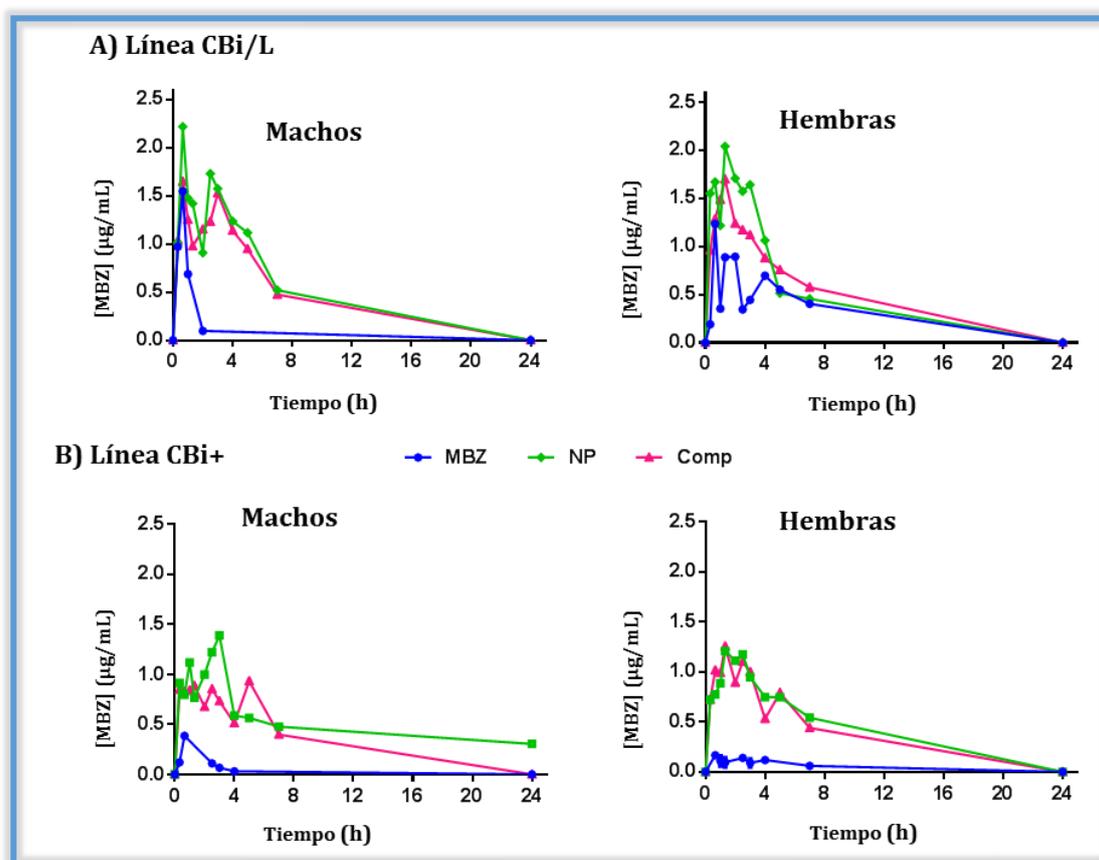
#### 4.5. Análisis farmacocinético

La biodisponibilidad de los sistemas NP y Comp se evaluó midiendo los niveles de concentración plasmática de MBZ y comparándola con la del fármaco puro (Fig. 20). Los parámetros farmacocinéticos derivados de la curva de biodisponibilidad se resumen en las tablas XII y XIII.

Los ratones CBi/L que recibieron la formulación NP mostraron una mayor concentración plasmática de MBZ y un aumento significativo en los valores de  $C_{max}$  comparados con aquellos que recibieron MBZ puro ( $\sigma P = 0.04$ ;  $\text{♀} P = 0.01$ ). Esto no se observó en aquellos a los que se les administró Comp ( $P > 0.05$ ).

Los ratones CBi+ que recibieron NP o Comp presentaron una  $C_{max}$  significativamente mayor que los animales que recibieron MBZ puro ( $\sigma P = 0.0002$ ;  $\text{♀} P < 0.0001$ ). Los machos CBi+ también mostraron diferencias en  $C_{max}$  entre formulaciones: NP produjo una mejora significativa en la variable en comparación con Comp

( $P=0.0029$ ; Tabla XIII); esta diferencia entre formulaciones no se observó en hembras CBi+ ni en animales CBi/L (Tabla XII).



**Figura 20.** Curvas de concentración plasmática de MBZ en función del tiempo después de la administración oral de una única dosis de MBZ puro, NP o Comp (dosis: 15 mg MBZ/kg de peso corporal), en ratones de las líneas CBi/L (A) y CBi+ (B) machos y hembras.

La variable  $C_{max}$  mostró efecto de genotipo y sexo. Las hembras CBi+ alcanzaron valores mayores que los machos, siendo esta diferencia significativa en el grupo que recibió Comp ( $P = 0.0111$ ). Los ratones de genotipo CBi/L tuvieron valores de  $C_{max}$  más altos que CBi+ cuando recibieron el fármaco puro o la formulación nanoparticulada ( $\sigma C_{max MBZ}, P=0.0437$ ;  $C_{max NP}=0.0325$ ;  $\sigma C_{max MBZ}, P= 0.0066$ ,  $C_{max NP}, P= 0.0014$ ). No se observó diferencia entre genotipos, para esta variable, en machos y hembras que recibieron Comp como tratamiento ( $\sigma P= 0.1041$ ;  $\sigma P= 0.1104$ ).

$T_{max}$  también mostró efectos de genotipo y sexo. Las hembras tratadas con NP o Comp tuvieron un  $T_{max}$  más alto que las hembras tratadas con MBZ, independientemente del genotipo. Por el contrario, los machos del genotipo: los CBi/L que recibieron NP o Comp alcanzaron una concentración máxima antes que

los CBi+. En todos los animales, la concentración máxima de MBZ puro se alcanzó al mismo tiempo (0.66 horas).

**Tabla XII.** Parámetros farmacocinéticos de MBZ obtenidos después de la administración de MBZ, NP o Comp (dosis oral única de 15 mg MBZ/kg) a ratones CBi/L machos y hembras

Parámetros farmacocinéticos	Sexo	Solución antiparasitaria		
		MBZ	NP	Comp
C <sub>máx</sub> (µg/mL)#	♂	1.3 ± 0.31 <sup>a</sup>	2.3 ± 0.28 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.42 <sup>a, b</sup>
	♀	1.3 ± 0.26 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.20 <sup>a, b</sup>
T <sub>máx</sub> (h)	♂	0.66	0.66	0.66
	♀	0.66	1.33	1.33
AUC <sub>(0-7h)</sub> (µg.h/mL)#	♂	2.7 ± 0.82 <sup>a</sup>	8.2 ± 0.34 <sup>b</sup>	5.1 ± 1.00 <sup>a, b</sup>
	♀	3.9 ± 0.63 <sup>a</sup>	7.4 ± 1.16 <sup>a</sup>	6.4 ± 1.24 <sup>a</sup>
AUC <sub>(0-24h)</sub> (µg.h/mL)#	♂	8.4 ± 3.37 <sup>a</sup>	12.6 ± 0.69 <sup>a</sup>	14.1 ± 2.30 <sup>a</sup>
	♀	7.2 ± 1.53 <sup>a</sup>	11.3 ± 2.29 <sup>a</sup>	11.1 ± 1.10 <sup>a</sup>
Aumento AUC <sub>r(0-7h)</sub> (%)	♂	-	204	88
	♀	-	90	64
Aumento AUC <sub>r(0-24h)</sub> (%)	♂	-	50	67
	♀	-	57	54

#media ± SEM

Las diferencias entre los tres grupos de tratamiento se estimaron mediante un ANOVA paramétrico seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. En cada fila, los grupos que no comparten el mismo superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

A partir de la curva de concentración plasmática MBZ vs. tiempo se calculó AUC, que estima la biodisponibilidad del ingrediente activo (Tablas XII y XIII). Los ratones que

recibieron las formulaciones NP y Comp presentaron un AUC mayor que aquellos que recibieron MBZ puro ( $P > 0.05$ ).

**Tabla XIII.** Parámetros farmacocinéticos de MBZ obtenidos después de la administración de MBZ, NP o Comp (dosis oral única de 15 mg MBZ/kg) a ratones CBI+ machos y hembras.

Parámetros farmacocinéticos	Sexo	Solución antiparasitaria		
		MBZ	NP	Comp
$C_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )#	♂	0.3 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.04 <sup>c</sup>
	♀	0.2 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.09 <sup>b</sup>	1.4 ± 0.08 <sup>b</sup>
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	♂	0.66	3	5
	♀	0.66	1.33	1.33
$AUC_{(0-7h)}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ )#	♂	0.4 ± 0.20 <sup>a</sup>	5.4 ± 0.18 <sup>b</sup>	4.7 ± 0.50 <sup>b</sup>
	♀	0.6 ± 0.08 <sup>a</sup>	5.7 ± 0.35 <sup>b</sup>	5.3 ± 0.63 <sup>b</sup>
$AUC_{(0-24h)}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ )#	♂	0.7 ± 0.33 <sup>a</sup>	9.8 ± 2.54 <sup>b</sup>	8.1 ± 1.13 <sup>b</sup>
	♀	1.8 ± 0.40 <sup>a</sup>	10.1 ± 0.62 <sup>b</sup>	9.0 ± 1.98 <sup>b</sup>
Aumento $AUCr_{(0-7h)}$ (%)	♂	-	1250	1175
	♀	-	850	783
Aumento $AUCr_{(0-24h)}$ (%)	♂	-	1300	1057
	♀	-	461	400

#media ± SEM

Las diferencias entre los tres grupos de tratamiento se estimaron mediante un ANOVA paramétrico seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. En cada fila, los grupos que no comparten el mismo superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

Se observaron diferencias atribuibles al genotipo: los machos y hembras CBI+ que recibieron NP o Comp aumentaron significativamente  $AUC_{0-7}$  en comparación con MBZ puro (♂  $P = 0.0155$ ; ♀  $P = 0.0057$ ) aunque no hubo diferencia significativa entre

las formulaciones ( $P > 0.05$ ; Tabla XIII). Por el contrario, solo los ratones macho CBi/L que recibieron NP alcanzaron un  $AUC_{0-7}$  significativamente mayor que MBZ puro. No obstante, se observó un aumento de esta variable, reflejado también en la biodisponibilidad relativa ( $AUC_r$ ), en todos los grupos de este genotipo.

Aunque no se observó efecto de sexo en las variables  $AUC_{0-7}$  y  $AUC_{0-24}$  en ninguna de las formulaciones en ambos genotipos, las biodisponibilidades relativas ( $AUC_r$ ) mostraron diferencias entre sexos. Los machos que recibieron NP y Comp tuvieron un aumento promedio en  $AUC_{r0-7}$  superior al de las hembras del mismo genotipo y grupo de tratamiento.  $AUC_{r0-24}$  de ambas formulaciones mostró valores considerablemente más altos en los animales machos CBi+.

#### 4.6. Actividad antihelmíntica *in vivo* de NP y Comp de MBZ

Para evaluar la efectividad de los tratamientos en la etapa crónica del ciclo de *T. spiralis*, los ratones recibieron una dosis diaria de MBZ, NP o Comp los días 27, 28 y 29 pi. Los animales se sacrificaron el día 37 pi para determinar la carga parasitaria muscular relativa y la proporción de larvas L1 muertas. Los resultados se muestran en la Tabla XIV.

Al igual que en el ensayo *in vivo* de albendazol, durante el curso de esta experiencia, los animales presentaron buen estado general de salud y no mostraron cambios significativos en su peso corporal. Los ratones no presentaron signos ni síntomas de trichinellosis y/o efectos adversos producto de los tratamientos.

La variable CPr fue, como se esperaba, significativamente menor en los ratones CBi/L que en los animales CBi+ ( $P < 0.05$ ). Este efecto del genotipo está directamente relacionado con las características de las líneas. CBi/L se comporta como una línea resistente frente a la infección con *T. spiralis* y tiene una carga parasitaria muy baja en comparación con CBi+, el genotipo altamente susceptible (Vasconi *et al.*, 2015).

Independientemente del genotipo y sexo, los animales tratados con NP y Comp presentaron una CPr total significativamente menor que los animales de los grupos control o tratados con MBZ puro (CBi/L: ♂  $P = 0.0104$ ; ♀  $P < 0.0001$ ; CBi+: ♂  $P = 0.0002$ ; ♀  $P = 0.0065$ ). Las hembras CBi/L tratadas con MBZ tuvieron una CPr significativamente mayor que los animales de la misma línea control o tratados con

las formulaciones ( $P < 0.0001$ ). Este resultado podría deberse al pequeño número de animales con el que se trabajó y a la gran variancia de este tipo de medición.

**Tabla XIV.** Efecto de MBZ o sus formulaciones sobre el número de larvas L1 de *T. spiralis* enquistadas, luego de ser administradas en la etapa crónica de la infección.

Variable Tratamiento	CBI/L		CBI+	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
	<b>CPr#</b>			
<b>Control</b>	95 ± 27.6 <sup>a</sup>	101 ± 29.5 <sup>a</sup>	554 ± 104.2 <sup>a</sup>	952 ± 266.7 <sup>a</sup>
<b>MBZ</b>	102 ± 40.2 <sup>a</sup>	222 ± 29.2 <sup>b</sup>	807 ± 179.5 <sup>a</sup>	800 ± 243.7 <sup>a</sup>
<b>NP</b>	10 ± 4.9 <sup>b</sup>	42 ± 11.8 <sup>c</sup>	121 ± 20.8 <sup>b</sup>	180 ± 79.7 <sup>b</sup>
<b>Comp</b>	15 ± 5.5 <sup>b</sup>	32 ± 5.4 <sup>c</sup>	118 ± 16.4 <sup>b</sup>	122 ± 43.1 <sup>b</sup>
Variable Tratamiento	<b>Proporción de larvas musculares de <i>T. spiralis</i> muertas (%)<sup>◇</sup></b>			
<b>Control</b>	0 (0-3) <sup>a</sup>	0 (0-4) <sup>a</sup>	9 (6-12) <sup>a</sup>	7 (3-10) <sup>a</sup>
<b>MBZ</b>	27 (7-75) <sup>b</sup>	15 (6-25) <sup>b</sup>	11 (7-75) <sup>a</sup>	5 (5-11) <sup>a</sup>
<b>NP</b>	100 (0-100) <sup>b</sup>	82 (38-100) <sup>c</sup>	82 (66-96) <sup>b</sup>	100 (92-100) <sup>b</sup>
<b>Comp</b>	67 (0-100) <sup>b</sup>	88 (50-100) <sup>c</sup>	84 (64-100) <sup>b</sup>	100 (98-100) <sup>b</sup>

#media ± SEM

**CPr:** carga parasitaria muscular relativa

Las diferencias entre tratamientos dentro de genotipo y sexo se evaluaron con un ANOVA a un criterio, seguida de la prueba de Bonferroni para la comparación entre grupos.

◇ mediana (rango)

Las diferencias entre tratamientos dentro de genotipo y sexo se evaluaron con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn para la comparación entre grupos.

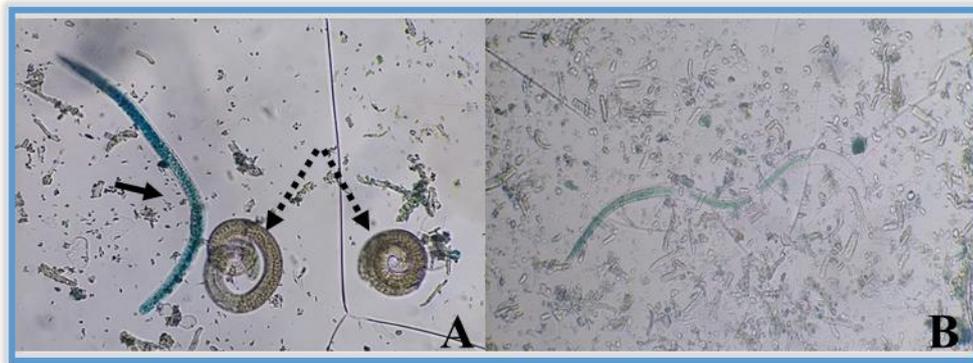
Los grupos que no comparten el mismo superíndice presentan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

Al comparar machos y hembras, se observó efecto de sexo en la línea CBI/L: las hembras tuvieron una cantidad de larvas significativamente mayor que los machos, en los grupos que recibieron tratamientos ( $P_{MBZ} = 0.037$ ;  $P_{NP} = 0.0309$ ;  $P_{Comp} = 0.049$ ). Esta diferencia no se observó en la línea CBI+. La proporción de larvas musculares muertas entre animales CBI/L y CBI+ sólo mostró diferencias significativas en el

grupo control ( $\sigma$   $P=0.0159$ ;  $\text{♀}$   $P=0.0043$ ). Los grupos que recibieron tratamiento no mostraron efecto del genotipo ( $P > 0.05$ ).

Las hembras de ambos genotipos y los machos CBi+ tratados con NP o Comp presentaron una proporción de larvas muertas significativamente mayor que los animales de los grupos control o tratados con MBZ (CBi/L:  $\text{♀}$   $P=0.0122$ ; CBi+:  $\sigma$   $P=0.0043$ ;  $\text{♀}$   $P=0.0005$ ). Los machos CBi/L tratados con las formulaciones también mostraron una proporción de larvas muertas mayor que las de los grupos control y MBZ que no alcanzó el significado estadístico. Esta falta de significado podría deberse a que 3 de los 6 machos tratados con NP y 1 de los tratados con Comp tuvieron una CPr nula porque no se recuperaron larvas L1 de su lengua.

Como se observa en la figura 21, las larvas muertas recuperadas de los ratones de ambos sexos y genotipos tratados con NP o Comp se caracterizaron por mostrar una estructura interna muy alterada. Además, se tiñeron levemente de un color celeste, casi transparente, y se localizaron sobre la superficie de la solución (Fig. 21 B). Por el contrario, las larvas muertas obtenidas de los animales tratados con MBZ se tiñeron de azul oscuro, mantuvieron una estructura interna reconocible y se hallaron en el fondo de la placa (Fig. 21 A).



**Figura 21.** Microfotografía de larvas L1 de *T. spiralis* (40x) recuperadas luego de una digestión artificial de la lengua de animales que recibieron mebendazol o sus formulaciones en la etapa crónica de la infección. A) Larva muerta obtenida de un ratón tratado con MBZ. Se observa la forma de “coma” característica, teñida con azul de metileno (flecha sólida). Las flechas punteadas indican L1 vivas, sin teñir; B) Larva L1 no viable, proveniente de un ratón tratado con NP. Muestra su morfología interna alterada y tinción de color celeste claro.

---

## 5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

---

*Trichinella spiralis*, el nematodo causante de la trichinellosis, fue la primera especie descubierta del género *Trichinella* y la mejor caracterizada por su importancia como causa de una enfermedad humana.

Según la OMS, la gravedad de la trichinellosis depende de una serie de variables que a menudo están interrelacionadas y que incluye la dosis infectante o cantidad de larvas ingeridas, las especies de *Trichinella* involucradas ya que la cantidad de larvas recién nacidas que liberan las hembras difiere según la especie y la susceptibilidad individual, que depende de la raza además del sexo, la edad y el estado inmunitario del huésped (Dupouy-Camet & Bruschi, 2007), o la historia del paciente con respecto a la infección por *Trichinella*.

El objetivo principal del tratamiento de la trichinellosis es reducir el número de parásitos del tracto gastrointestinal y, en consecuencia, evitar la diseminación de las larvas. Está relacionado con el fármaco recomendado y con la duración de su administración. Este objetivo sólo se puede lograr con el inicio muy temprano del tratamiento, en los primeros días posinfección. Sin embargo, esto rara vez es posible a menos que se confirme un brote, ya que el diagnóstico a menudo se retrasa y el tratamiento se inicia 2-3 semanas después de la infección (Cretu, 2021).

Los antihelmínticos actualmente recomendados para el tratamiento de la trichinellosis humana son los derivados benzimidazólicos albendazol y mebendazol (Gottstein *et al.*, 2009). Si bien el tiabendazol fue la primera molécula que se utilizó (Brown *et al.*, 1961), debido a su actividad limitada sobre las larvas musculares y a sus efectos secundarios graves y frecuentes, ya no se recomienda. Por otra parte, el análisis de la eficacia terapéutica de otros antiparasitarios como el pirantel, derivado de las tetrahidropirimidinas, mostró que este es efectivo sólo en la fase intestinal de la trichinellosis, contra los parásitos adultos. No sólo no muestra efecto sobre las larvas recién nacidas ni sobre las larvas musculares sino que, además, el 77 % de los pacientes tratados con pirantel se quejaron de mialgia 10 días después del inicio del tratamiento (Dupouy-Camet *et al.*, 2002). En otro estudio, Basyoni y El-Sabaa (2013) encontraron que la ivermectina, derivado macrocíclico de la lactona, era activa contra *T. spiralis* en ratones, ya que reducía el recuento de larvas

enquistadas. Administrada el día 0 y 5 pi, disminuyó la carga parasitaria muscular entre 98.5 % y 80 %. En los días 15 y 35 pi su eficacia sobre las larvas enquistadas fue del 76.5 % y el 54 %. Sin embargo, este fármaco no se aconseja para el tratamiento de la trichinellosis humana debido a que tiene el potencial de afectar negativamente las funciones hepáticas y renales (Basyoni & El-Sabaa, 2013).

Como ya mencionamos en la introducción (1.4.), albendazol y mebendazol son fármacos poco solubles en agua, lo cual dificulta su absorción y acción sistémica. Este hecho puede ser beneficioso para el tratamiento de infecciones por parásitos localizados a nivel intestinal que, como consecuencia de una pobre absorción, quedan expuestos durante largo tiempo a la acción del fármaco, mejorando así su efectividad. Sin embargo, frente a parásitos tisulares y sistémicos, los resultados terapéuticos son insatisfactorios. Estudios donde se evalúa la eficacia de estos fármacos en la fase crónica de la infección con *T. spiralis*, cuando las larvas musculares están completamente encapsuladas, han arrojado resultados diversos (López-García *et al.*, 1997; Siriyasatien *et al.*, 2003; de la Torre-Iglesias *et al.*, 2014; Codina *et al.*, 2015). Como lo afirman Shimoni y Froom (2015), concentraciones adecuadas de fármacos o de sus metabolitos activos necesitan llegar hasta las larvas que han invadido el músculo para ser efectivos. Por lo general, estas concentraciones se alcanzan con períodos prolongados de tratamiento y dosis antihelmínticas altas, lo que aumenta los posibles efectos secundarios, tales como toxicidad hepática, reacciones alérgicas, y mielosupresión grave, en particular, neutropenia (Chai *et al.*, 2021).

Recientemente se notificó la aparición de farmacorresistencia al albendazol y al mebendazol con fracaso del tratamiento en infecciones por anquilostomiasis, trichuriasis, ascariasis y filariasis linfática, lo que se ha convertido en un importante problema emergente (Chai *et al.*, 2021).

Debido a la baja solubilidad y absorción de los benzimidazoles y a la aparición de resistencias, se consideró necesario plantear nuevas alternativas farmacéuticas. Como estrategia, se recurrió al uso de la tecnología farmacéutica con el fin de incrementar la actividad farmacológica de compuestos de eficacia ya conocida. Partiendo de albendazol y mebendazol, el objetivo fue obtener formulaciones con mayor solubilidad, que potencien la actividad antihelmíntica de estos fármacos, y

actúen sobre las distintas etapas del ciclo de *T. spiralis*. El éxito terapéutico de las nuevas formulaciones estaría asociado con su capacidad para actuar sobre las larvas ya enquistadas en músculo.

La evaluación de la eficacia antiparasitaria de estos nuevos sistemas terapéuticos requiere la elección de un modelo animal adecuado. Esto implica conocer las características inmunológicas, fisiológicas, anatómicas y metabólicas de la especie, ya que todas pueden influir sobre los resultados experimentales. En general, el modelo *Trichinella*/ratón ha sido ampliamente utilizado para analizar la efectividad de los antihelmínticos carbamatos de benzimidazol (McCracken, 1978; López-García *et al.*, 1997; Chung *et al.*, 2001; Casulli *et al.*, 2006; García *et al.*, 2013; Codina *et al.*, 2015). La principal ventaja es que permite, en poco tiempo, probar medicamentos contra las diferentes etapas del ciclo del parásito.

Por otra parte, si existe una concordancia entre las concentraciones del fármaco en plasma y la magnitud del efecto farmacológico, a través de un estudio farmacocinético se puede evaluar el rendimiento de los nuevos sistemas y compararlos con el fármaco puro. Sin embargo, es sabido que la farmacocinética y la farmacodinamia de un fármaco pueden verse afectadas por la variabilidad genética en diferentes niveles (Alarcón-Valdés *et al.*, 2017). El análisis comparativo de fenotipos extremos de respuesta resulta de suma utilidad en estudios de la relación huésped-parásito (Nagy *et al.*, 2002) y se propuso como procedimiento de elección en farmacogenómica debido a la naturaleza “mendeliana” del fenotipo (Gurwitz & McLeod, 2013). Las líneas CBI/L y CBI+ (colonia CBI-IGE) con las que se trabajó en esta tesis, mostraron diferencias atribuibles al genotipo en la enteroparasitosis natural y experimental, lo que indicaría que son una fuente de variancia genética significativa en los caracteres analizados (Hinrichsen *et al.*, 2010). La tipificación del complejo mayor de histocompatibilidad (*H2* en ratón), cuya variación se ha implicado como determinante de la respuesta del hospedero a parásitos gastrointestinales (Kennedy *et al.*, 1991; Behnke *et al.*, 2003; Meyer-Lucht & Sommer, 2003; Axtner & Sommer, 2012), en las líneas CBI-IGE permitió explicar, en parte, variación en la respuesta a la infección con *T. spiralis* (Codina *et al.*, 2020a). El haplotipo de CBI/L, resistente a *T. spiralis*, caracterizado por tener una carga parasitaria muy baja y respuesta inmune orientada hacia Th2, protectora para el

hospedero, fue  $H2^{p/j}$  mientras que CBI+, susceptible a *T. spiralis*, con una carga parasitaria significativamente más alta que CBI/L y tendencia a una respuesta tipo Th1 en todas las etapas del ciclo del parásito, tuvo un haplotipo  $H2^{b/j}$ .

En los seres humanos, casi todos los fenotipos de rasgos complejos y enfermedades muestran diferencias de distinto grado debidas al sexo, incluidas las diferencias en la prevalencia, la edad de inicio, la gravedad o progresión de la enfermedad y la disposición de fármacos en el cuerpo (Capece *et al.*, 2000; Afonso-Pereira *et al.*, 2018; Moyer *et al.*, 2019; Valodara & Sr, 2019). La estructura genética (genotipo) marca una gran diferencia en la expresión génica entre hombres y mujeres, lo que a su vez introduce diferencias basadas en el sexo en los genes implicados en la absorción, distribución, metabolismo y excreción de fármacos (genes ADME). La variación en estos genes puede influir en la respuesta individual a un tratamiento terapéutico. Si un fármaco no se transforma a la velocidad prevista (modulado por las enzimas que metabolizan el fármaco) o no se absorbe/expulsa a la velocidad prevista (modulada por los transportadores), puede producirse una exposición elevada y/o prolongada. Cuando el fármaco tiene una ventana terapéutica estrecha en relación con el margen de seguridad, tal diferencia farmacocinética podría precipitar reacciones adversas a medicamentos (Yang *et al.*, 2012). Entre los mecanismos postulados, se cree que las hormonas sexuales y las hormonas del crecimiento son los factores más importantes que regulan la expresión génica sexualmente dimorfa (Yang *et al.*, 2012; Gavins *et al.*, 2023; Huang *et al.*, 2023).

La inclusión de ambos sexos en los estudios de investigación ha sido consistentemente baja en un intervalo de más de 100 años (Zucker *et al.*, 2022). Las investigaciones que tienen como objetivo estudiar diferencias dependientes del sexo aumentaron significativamente en la última década, encontrándose diferencias significativas en la prevalencia de enfermedades, así como en los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de los tratamientos utilizados (Soldin & Mattison, 2009; Waxman & Holloway, 2009; Soldin *et al.*, 2011). Este cambio fue consecuencia de las nuevas directivas de los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU. que propusieron aumento de la participación femenina en los protocolos de investigación, aunque el análisis de los resultados por sexo sigue siendo poco frecuente. Tomando en cuenta estas directivas, Huang *et al.* (2023) analizaron, en

cada sexo por separado, la arquitectura genética de rasgos complejos humanos en una colección de genes de enzimas y transportadores del metabolismo de fármacos (genes DMET). Identificaron genes DMET expresados diferencialmente en el hígado a los que vincularon con la evidencia reportada en la literatura sobre las diferencias por efecto del sexo en la respuesta a los medicamentos. Sus resultados mostraron la presencia de efectos genéticos diferenciados por sexo en la regulación de los genes DMET, a nivel de genoma y en las regiones génicas DMET, que se manifiestan en varios rasgos fenotípicos, incluidos los riesgos de enfermedades y las respuestas a los medicamentos.

La opinión de larga data de que los rasgos de las ratas y los ratones hembra son más variables que los de los machos está desacreditada, lo que respalda la representación equitativa de ambos sexos en la mayoría de los estudios. Sin embargo, hasta el momento existen pocos estudios en ratones que analicen el efecto del sexo y el genotipo sobre la efectividad de albendazol y mebendazol como antihelmínticos. El modelo murino CBI-IGE permitió evaluar la eficacia de las nuevas formulaciones antihelmínticas en machos y hembras así como también analizar la interacción sexo y genotipo del hospedero con la respuesta al fármaco. Este modelo genéticamente definido tendría un uso potencial para estudios farmacogenéticos/farmacogenómicos que permitiría evaluar no solo la disposición de un fármaco sino también la seguridad de medicamentos, en caso de poder establecer correlaciones entre animales y humanos.

**En adelante, discutiré separadamente los resultados de los estudios de albendazol y mebendazol.**

El primer objetivo específico planteado fue la evaluación *in vitro* de la efectividad parasiticida de los nuevos sistemas terapéuticos de albendazol y mebendazol sobre las distintas formas morfológicas de *Trichinella spiralis*.

Las 20 formulaciones microcristalinas de albendazol mejoraron significativamente la actividad antiparasitaria en comparación con el albendazol puro. La exposición de las formas adultas del parásito a las formulaciones afectó su viabilidad, y fue dependiente del tiempo y del polímero utilizado. La combinación de los polímeros con el surfactante P338 no impactó en la mejora de la eficacia de albendazol. En este análisis los microcristales S4A y S10A, elaborados respectivamente con

hidroxietilcelulosa y quitosano, resultaron la mejor opción para optimizar la efectividad parasiticida del ingrediente farmacéutico activo.

Se sabe que cuanto menor es el tamaño de una partícula, mayor es la superficie de contacto con el medio de disolución y más rápido es el proceso de solubilización del ingrediente farmacéutico activo, siendo la obtención de partículas más pequeñas un enfoque eficaz para mejorar la velocidad de disolución y la biodisponibilidad de fármacos poco solubles. De acuerdo a lo publicado por Priotti *et al.* (2017), los microcristales elaborados con hidroxietilcelulosa y quitosano, proveyeron cristales de menor tamaño y mejores perfiles de disolución que el albendazol.

Una de las mayores ventajas de obtener nuevos sistemas terapéuticos optimizados es posibilitar la administración de dosis menores a las recomendadas, resultando por ello menos severos los posibles efectos adversos. Administrar dosis más bajas del ingrediente activo sería menos tóxico para el huésped y permitiría tratamientos más prolongados (Codina *et al.*, 2015). Los resultados del ensayo *in vitro* indican que la concentración efectiva de albendazol es importante para aumentar la mortalidad de los parásitos y podría proporcionar la base para establecer una terapia eficaz para el tratamiento de la trichinellosis con dosis bajas.

El segundo objetivo específico de esta tesis consistió en determinar los parámetros farmacocinéticos de las nuevas formulaciones y compararlos con el fármaco puro. Dado el bajo nivel de albendazol detectado en sangre, la actividad antiparasitaria se debe al albendazol sulfóxido (ABZSO). La biodisponibilidad después de la administración oral, estimada calculando el AUC de la curva de concentración plasmática de ABZSO frente al tiempo, fue mayor en los ratones que recibieron las formulaciones S4A y S10A que en los que tomaron ABZ puro. En esta variable se observaron diferencias atribuibles a efectos de genotipo y sexo. Curiosamente, sólo se observó un efecto significativo del genotipo para el fármaco puro (AUC<sub>(0-24h)</sub>, Tablas V y VI, págs. 61 y 63) aunque, en general, los ratones CBi/L tuvieron mayor concentración plasmática de albendazol sulfóxido que los ratones CBi+. Cuando el albendazol se administró en forma de microcristales estabilizados con los polímeros hidroxietilcelulosa (S4A) o quitosano (S10A), su absorción se incrementó. El rendimiento de los sistemas, estimado a través de la biodisponibilidad relativa (AUC<sub>r0-24h</sub>), mostró diferencias entre las formulaciones. El sistema S10A tuvo un

mejor rendimiento que S4A en ambas líneas de ratones. Esta diferencia puede estar relacionada con las características de los polímeros utilizados para estabilizar los microcristales en suspensión. El quitosano, utilizado para el sistema S10A, muestra bioadhesividad a las membranas, razón por la cual podría retardar la disolución y absorción de albendazol a través de la mucosa intestinal (Barbosa *et al.*, 2017). Estos resultados concuerdan con los valores de  $T_{max}$  observados en ambos sistemas de microcristales. Los ratones CBI+ que recibieron S10A mostraron valores de  $T_{max}$  más altos que S4A.

Dado que los estudios de farmacocinética en humanos indican que las variables concentración plasmática máxima y área bajo la curva para ABZSO son más altas en mujeres que en hombres (Mirfazaelian *et al.*, 2002) y que, por lo general, los ratones hembra pesan menos que los machos, las dosis administradas se calcularon para el peso promedio de cada sexo y línea. Por lo tanto, las diferencias entre sexos observadas en este estudio no son atribuibles a una diferencia de peso.

Las diferencias en los parámetros farmacocinéticos entre líneas o entre machos y hembras pueden deberse a la variabilidad en los genes que codifican proteínas involucradas en los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación (ADME), enzimas del metabolismo oxidativos de fármacos y proteínas plasmáticas y transportadores (Alarcón-Valdés *et al.*, 2017). El citocromo P450 (codificado por los genes *CYP*) comprende una familia de enzimas responsables de alrededor de las tres cuartas partes de todas las reacciones metabólicas de fármacos. Si bien existen muchas isoformas, la mayoría de las reacciones son realizadas por los productos de los genes *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* y *CYP3A4* (Waring, 2020). Además de estar presentes en el hígado también se expresan en muchos otros tejidos, incluida la mucosa intestinal que es, probablemente, el tejido extrahepático más importante para el metabolismo de los fármacos que se administran por vía oral. Por ello, las enzimas CYP influyen, no solo en el metabolismo hepático de albendazol y aparición de albendazol sulfóxido en plasma (Waxman & Holloway, 2009) sino también, en la degradación de albendazol en el epitelio intestinal por *CYP3A4* (McCarthy & Moore, 2015). La gran superfamilia de genes cuyo producto son las enzimas del citocromo P450 es altamente polimórfica, lo que lleva a diferencias en la eficiencia funcional de sus enzimas (Waring, 2020). Esto puede traducirse en diferentes fenotipos

dentro de una población y, en base a eso, los individuos pueden ser clasificados de acuerdo a su capacidad de metabolización de fármacos (Gaedigk *et al.*, 2017). Por tanto, estos polimorfismos contribuyen a las diferencias en la biodisponibilidad de los medicamentos sustratos de CYP administrados por vía oral (Tornio & Backman, 2018). Sumado a esto, los excipientes, supuestamente “inertes”, pueden afectar la actividad de los transportadores intestinales alterando la biodisponibilidad del fármaco, la eficacia terapéutica y los efectos secundarios adversos de manera diferente en machos y hembras (Mai *et al.*, 2017). Investigaciones recientes determinaron que, en los machos, los excipientes aumentaron la biodisponibilidad de un fármaco sustrato de la glicoproteína-P al disminuir la expresión intestinal de dicho transportador. Esta asociación se debería a que los excipientes modulan los niveles de testosterona, en este caso, aumentándolos (Mai *et al.*, 2022). Comprender el rol los excipientes en la fisiología intestinal y los niveles hormonales puede, por lo tanto, mejorar el diseño farmacéutico, la eficacia clínica y promover el desarrollo de formulaciones de última generación personalizadas, específicas de sexo.

Los excipientes utilizados para preparar las formulaciones microcristalinas (hidroxietilcelulosa y quitosano) demostraron ser seguros. La hidroxietilcelulosa se usa ampliamente en formulaciones farmacéuticas y está incluida en la **Lista de ingredientes inactivos** de la FDA para productos farmacéuticos aprobados (US Food and Drug Administration, 2019). El quitosano se utiliza actualmente en diferentes vías de administración y se puede modificar químicamente para satisfacer diversas necesidades biológicas y médicas. Tiene buena biocompatibilidad, biodegradabilidad, mucoadhesividad y baja toxicidad (Ahmad *et al.*, 2017). Además, los microcristales desarrollados tuvieron un contenido de albendazol del 80 %, utilizando un método simple y rápido, sin equipo especializado, facilitando la traslación a la clínica.

Cabe destacar que en esta tesis se administraron fármacos sin utilizar solventes como etanol o soluciones ácidas como ocurre en la mayoría de los estudios con animales, que no reproducen las condiciones reales de la terapéutica humana. Se desarrolló y ajustó un procedimiento para administrar formulaciones en forma sólida, como sustituto de la administración a través de una sonda buco-gástrica

donde la formulación debe ser solubilizada o suspendida al momento de la administración.

La modificación de las propiedades de los compuestos sólidos a través de la microcristalización de albendazol nos permitió obtener formulaciones con mejores propiedades biofarmacéuticas y una eficacia potencialmente mejorada. El siguiente paso fue probar la eficacia terapéutica *in vivo* de las formulaciones albendazol en las tres fases de la infección con *T. spiralis*: enteral, migratoria y parenteral.

La eficacia de albendazol y de las formulaciones S4A y S10A se investigó inicialmente en la fase enteral de la infección, como estadio más susceptible del ciclo biológico de *T. spiralis*. La carga parasitaria intestinal de los animales tratados no se modificó comparada con la de los ratones control, pero sí se observó una disminución en la viabilidad de las hembras de *T. spiralis*. Estas presentaron alteraciones en su morfología interna que también se vieron en los gusanos hembra durante el ensayo *in vitro*. Estas alteraciones morfológicas condujeron, muy probablemente, a una alteración de la fecundidad y a la consiguiente reducción de larvas enquistadas en músculo. La disminución significativa de la carga parasitaria muscular en la fase crónica sugiere que el tratamiento en la fase aguda provocó una inhibición reproductiva, ya que es poco probable que las formulaciones administradas en los días 5–7 posinfección afecten a las larvas migratorias. Un resultado similar fue reportado por Campbell y Cuckler (1964) después de alimentar a ratones infectados con una dieta que contenía 0.05 % de tiabendazol durante los días 4 a 11 posinfección: el tratamiento no erradicó los gusanos del intestino, pero suprimió su reproducción. También apoya esta idea el hallazgo de de-la-Rosa *et al.* (2007) en ratones infectados experimentalmente y tratados con una dosis insuficiente de albendazol o mebendazol en el día 5 posinfección: la capacidad reproductiva de las hembras de *T. spiralis* recuperadas mostró una disminución significativa, que desapareció cuando el fármaco se eliminó del sistema.

Notablemente, albendazol y las formulaciones administradas en la fase enteral fueron igualmente efectivas en ambas líneas y sexos: la carga parasitaria muscular relativa se redujo un 90 %, comparados con sus controles respectivos, en animales resistentes y susceptibles a pesar de que estos últimos tienen una carga parasitaria intestinal y muscular significativamente mayor que los ratones resistentes. Aunque

como ya se explicó, el diagnóstico de la trichinellosis en estadios tempranos es dificultoso, se sabe que albendazol es efectivo contra *T. spiralis* cuando se administra en la primera etapa del ciclo del parásito. Por tanto, nuestros resultados confirmaron este hecho.

La fase migratoria de la infección (Mitreva & Jasmer, 2006) comienza cuando las larvas recién nacidas atraviesan la mucosa intestinal, penetran a través de los capilares linfáticos y venosos para alcanzar la circulación general a través del conducto torácico y se abren paso a través de las fibras musculares para iniciar la fase muscular de la infección. El tiempo que dura esta etapa depende de la rapidez con que los parásitos son expulsados, lo que está determinado, en parte, por el genotipo del hospedero (Vallance *et al.*, 1997; Steel *et al.*, 2019). La fase migratoria es refractaria al tratamiento, probablemente debido a que esta fase implica siempre estados en distinto nivel de desarrollo, a diferencia de las fases intestinal y muscular, en las que en un período corto de tiempo se produce la maduración a un estado morfológico determinado y la consiguiente estabilidad en el mismo. En la etapa migratoria existe un período de tiempo en el que pueden coexistir larvas recién nacidas con otras que están en fase de pre-enquistamiento y, en consecuencia, su susceptibilidad a fármacos puede ser muy diferente al encontrarse en una situación metabólica distinta. En este contexto, a pesar de diferencias atribuibles al hospedero, la longevidad de los adultos en el nicho intracelular intestinal, el número de larvas recién nacidas por hembra y su supervivencia durante la migración, el número de larvas L1 recuperadas en la fase crónica ha sido utilizado por numerosos investigadores como un índice de éxito para un tratamiento dado (Denham & Martínez, 1970; Bell *et al.*, 1985; García-Rodríguez *et al.*, 2001; García *et al.*, 2003; Eid *et al.*, 2020).

Aunque no se alcanzó el significativo estadístico, las formulaciones administradas durante la fase migratoria redujeron a la mitad la carga parasitaria muscular, lo que sugiere que los microcristales mejoran la eficacia de albendazol en esta etapa. Esta tendencia a presentar una mejor eficacia terapéutica se observó solo en machos, independiente del genotipo del hospedero. Las formulaciones pueden haber afectado a las larvas recién nacidas o larvas pre-enquistadas, como sugiere la disminución en el número de larvas enquistadas y los resultados del experimento *in*

*vitro* realizado previamente. En dicho ensayo, la movilidad de las larvas recién nacidas se vio afectada en diversos grados por las formulaciones S4A y S10A, mostrando pérdida completa de movimiento después de 2 h y hasta el final del experimento (24 h).

El tratamiento de la fase crónica de la trichinellosis es crítico, ya que es posible que los tratamientos existentes no eliminen el parásito una vez que las larvas se han establecido en las células musculares. Estos casos suelen requerir tratamientos repetidos o más prolongados que conllevan una mayor probabilidad de sufrir efectos secundarios. Por tanto, el éxito terapéutico de las formulaciones en esta fase estaría relacionado con su capacidad de entrar en el quiste para matar las larvas. Los estudios de efectividad del tratamiento en la fase crónica de la infección han arrojado resultados mixtos cuando las larvas musculares están completamente encapsuladas (López-García *et al.*, 1997; Siriyasatien *et al.*, 2003; de la Torre-Iglesias *et al.*, 2014); de hecho, ni albendazol ni mebendazol son igualmente eficaces contra todos los estadios larvarios (Knopp *et al.*, 2012). Como afirman Shimoni y Froom (2015), las concentraciones adecuadas de los fármacos o sus metabolitos activos deben llegar a las larvas que han invadido el músculo para que sean efectivos sistémicamente. Las concentraciones adecuadas generalmente se logran con períodos de tratamientos más prolongados y dosis antihelmínticas más altas o desarrollando formulaciones que mejoren la solubilidad acuosa del fármaco para mejorar la biodisponibilidad (García-Rodríguez *et al.*, 2001; Casulli *et al.*, 2006; Codina *et al.*, 2015). Los protocolos de tratamiento en este estudio utilizaron una dosis baja de ABZ por períodos cortos que, en la fase parenteral de la infección, no fue suficiente para reducir el número de larvas enquistadas, pero sí afectó su viabilidad. Los machos y hembras CBi/L tratados con S10A mostraron un aumento en la proporción de larvas L1 muertas en comparación con ABZ, significativo en los machos. Se observó un efecto similar en los machos CBi+, mientras que las hembras no respondieron a ninguna formulación. Como ya se explicó, las enfermedades parasitarias difieren en prevalencia, curso y gravedad entre hombres y mujeres; el sexo biológico influye en la fisiología, las respuestas inmunitarias, el metabolismo de los fármacos, afectando así la progresión de la enfermedad (Nava-Castro *et al.*, 2012; Dkhil, 2015; Hegazy *et al.*, 2019; Lockard *et al.*, 2019). Este efecto de sexo solo se observó en la línea resistente: los machos CBi/L tuvieron, generalmente, cargas

parasitarias musculares más altas que las hembras. Por el contrario, machos y hembras de la línea CBi+ susceptible presentaron cargas parasitarias similares. Estos resultados resaltan la importancia de considerar las características del huésped en respuesta al tratamiento y la necesidad de incorporar el sexo y el genotipo como variables en la evaluación de la eficacia terapéutica en estudios preclínicos (Clayton & Collins, 2014).

Como mencionamos anteriormente, el análisis farmacocinético reveló un aumento significativo en la biodisponibilidad de albendazol cuando se administró como formulaciones microcristalinas. Sin embargo, el genotipo y el sexo del huésped influyeron en los parámetros farmacocinéticos medidos: las hembras CBi/L alcanzaron una  $C_{max}$  significativamente mayor que los machos; pero no se observó efecto del sexo en los ratones CBi+. Por esto, cuando las formulaciones se administraron en hembras, en las fases migratoria o parenteral de la infección, la baja o nula efectividad terapéutica observada en este sexo fue un resultado inesperado. Una posible explicación es que el metabolismo y la excreción de albendazol podrían ser mayores en hembras que en machos. El metabolito activo, sulfóxido de albendazol (ABZSO), responsable de la actividad antiparasitaria frente a diferentes nematodos, se biotransforma en el metabolito inactivo, albendazol sulfona (ABZSO<sub>2</sub>) principalmente por CYP3A4, que se expresa más en mujeres que en hombres, lo que resulta en una mayor tasa de eliminación (Wolbold *et al.*, 2003). Fuscoe *et al.* (2020) informaron un efecto de sexo en la expresión del gen *Cyp3a2*, el ortólogo de rata del gen humano *CYP3A4*.

También hay que señalar que ABZSO tiene un centro de asimetría que da lugar a dos enantiómeros (+) y (-), los cuales presentan diferencias conocidas en su perfil farmacocinético y actividad frente a otros helmintos (Cristofol *et al.*, 2001). Capece y colaboradores (2000) encontraron diferencias en la farmacocinética de los enantiómeros de ABZSO en ovejas de ambos sexos pero no en el total de ABZSO o ABZSO<sub>2</sub>; también observaron una diferencia de sexo en la  $T_{max}$  de los enantiómeros; los valores de  $C_{max}$  para (-) ABZSO fueron similares en ambos sexos, pero las concentraciones máximas difirieron. Por lo tanto, estos datos sugieren otro posible efecto de sexo en el metabolismo ABZSO.

El efecto de la infección en curso sobre la biodisponibilidad de albendazol podría descartarse ya que los resultados reportados por García Rodríguez y colaboradores (2009) sugieren que, aunque la infección intestinal por *T. spiralis* induce una inflamación aguda transitoria, ésta se anula casi por completo después de la expulsión del gusano del intestino. Esta situación impulsa la recuperación de la capacidad de absorción y biodisponibilidad oral de fármacos cuando se administra en las fases sistémicas de la infección. Los microcristales S10A, a base de quitosano, mostraron una mejor eficacia terapéutica en comparación con albendazol o S4A cuando se administra en la fase crónica de la infección. Este aumento de efectividad, significativa en machos CBi/L, probablemente esté relacionado con las interacciones conocidas del quitosano con el sistema inmunológico. Se ha encontrado que el quitosano es activo contra una variedad de enfermedades y que posee propiedades antimicrobianas y anticancerígenas. Ha mostrado actividad contra *Cryptosporidium parvum* *in vitro* e *in vivo* (Mammeri *et al.*, 2018), ha reducido los síntomas de colitis ulcerosa inducida en un modelo murino, mejorando la función de la barrera mucosa intestinal y modificando la microflora intestinal (Wang *et al.*, 2019), y ha mejorado la eficacia de las vacunas como adyuvante (Sun *et al.*, 2018). Además, las propiedades mucoadhesivas del quitosano demostraron mejorar la absorción de fármacos (Khan *et al.*, 2019). De hecho, en un período de 24 h, se observó una mayor biodisponibilidad de albendazol en ratones que recibieron S10A en comparación con albendazol puro o S4A (Codina *et al.*, 2020b). Las actividades biológicas de los quitosanos dependerían tanto del peso molecular como de la solubilidad en agua de la molécula de este compuesto que se utilice como excipiente (Zeng *et al.*, 2008) y del genotipo del huésped, como muestran nuestros resultados (Fig. 18, Tablas V y VI, págs. 60, 61 y 63).

Los resultados obtenidos con la formulación a base de quitosano concuerdan con los de una publicación reciente donde portadores de lípidos nanoestructurados se recubrieron con quitosano y fueron administrados a ratones en las tres fases de la infección por *T. spiralis* (Eid *et al.*, 2020). Los autores informaron que el número de larvas enquistadas viables se redujo a la mitad al ser tratadas con nanoportadores recubiertos de quitosano en comparación con la suspensión albendazol. En este estudio, el microcristal a base de quitosano (S10A) aumentó de 1.4 a 2.3 veces el porcentaje de larvas muertas en comparación con albendazol. Es importante señalar

que mientras los nanotransportadores se preparan con una alta proporción de excipiente (aproximadamente 92%), los microcristales requieren menor cantidad del polímero (aproximadamente 20%). Esta diferencia hace que la formulación microcristalina sea prometedora para la traslación a un producto final.

En resumen, los microcristales a base de quitosano mostraron una mejor eficacia terapéutica en la fase crónica de la infección cuando las formulaciones actualmente en uso no son efectivas o necesitan ser administrados en dosis más altas o por períodos más prolongados. Las formulaciones microcristalinas serían sistemas adecuados para tratar la infección de *T. spiralis* en la fase crónica.

En la segunda parte de esta tesis, se utilizó al mebendazol como ingrediente farmacéutico activo con el que se prepararon nuevos sistemas que aumentarían su solubilidad. Los objetivos específicos planteados siguieron el mismo esquema que con albendazol: evaluar *in vitro* la efectividad de las nuevas formulaciones de mebendazol, determinar sus parámetros farmacocinéticos y estimar *in vivo* su eficacia antiparasitaria.

Los nuevos sistemas de mebendazol ensayados *in vitro* mostraron una mejora en su actividad antihelmíntica en comparación con mebendazol puro. Sin embargo, la diferencia en la actividad fue significativa solo para la formulación nanoparticulada; la actividad del complejo de inclusión de citrato de  $\beta$ -ciclodextrina no difirió respecto al fármaco puro. Aunque la movilidad de las larvas recién nacidas liberadas por las hembras de *T. spiralis* no se vio afectada por las formulaciones, se observó una menor cantidad de larvas en los pocillos que contenían el sistema nanoparticulado. Se sabe que el aumento de solubilidad de un ingrediente farmacéutico activo puede obtenerse por "reducción de tamaño" de las partículas, lo que conlleva a un incremento en el área superficial y a un aumento de la velocidad de disolución (Brough & Williams, 2013). El tamaño de las nanopartículas de esta formulación fue lo suficientemente pequeño para favorecer el pasaje rápido del fármaco a través de la cutícula de la hembra de *T. spiralis*, por lo que fue capaz de perturbar la capacidad reproductiva de los gusanos hembra y producir cierto grado de infertilidad en el lapso del ensayo *in vitro*.

Como mencionamos en la introducción (1.4.2), la baja biodisponibilidad del mebendazol a dosis terapéuticas se debe a una combinación del rápido metabolismo

de “primer paso” hepático y a la muy baja solubilidad del compuesto (Dawson *et al.*, 1985). Modificar la forma galénica, en lugar de administrar dosis mayores, puede ser un método eficaz para aumentar sus niveles plasmáticos. La administración de mebendazol en forma de nanopartículas o acompañado con citrato de  $\beta$ -ciclodextrina produjo un aumento de la concentración plasmática del fármaco. Los parámetros derivados del estudio de biodisponibilidad mostraron efecto de genotipo y sexo del hospedero. Los ratones C<sub>Bi</sub>/L tratados con mebendazol puro tuvieron valores de  $C_{max}$  y AUC significativamente mayores que C<sub>Bi</sub>+ pero no difirieron en  $T_{max}$  (Fig. 20, Tablas XII y XIII, págs. 71, 72 y 73). Esta diferencia entre genotipos, aunque en grado menor, se observó en los animales a los que se administró cualquiera de las formulaciones. En estos grupos también hubo diferencias en  $T_{max}$ , tanto entre genotipos dentro de sexos como entre sexos dentro de genotipos.  $T_{max}$  es una medida indirecta y aproximada de la duración del proceso de absorción y su valor es proporcional a la velocidad a la cual se produce la misma (Errecalde *et al.*, 2012), por lo que su valor junto con el de  $C_{max}$ , que está en parte determinado por el equilibrio de velocidades (velocidad de entrada y velocidad de salida), estima la velocidad de absorción del principio activo que, en este experimento, se vio afectada por el sexo y el genotipo del hospedero.

Como se discutió anteriormente en esta sección, el sexo biológico juega un papel preponderante en la variabilidad de las respuestas a tratamientos farmacológicos por su efecto sobre los genes que intervienen tanto en el metabolismo y transporte del principio farmacéutico activo como de los compuestos usados como excipientes; la magnitud de las diferencias de sexo dependen de los sustratos y las vías metabólicas implicadas (Kato & Kamataki, 1982). A esto debe agregarse que revisiones recientes han enfatizado el rol del sexo como variable biológica que influye significativamente sobre la eficacia y toxicidad de nanomateriales utilizados en terapéutica (Hajipour *et al.*, 2021; Sharifi *et al.*, 2021). Hay evidencia reciente convincente de que las diferencias de sexo pueden alterar la eficacia de las nanopartículas a nivel celular. Entre otros, el nivel y la vía de captación de nanopartículas y el tráfico intracelular en ciertas células humanas dependen en gran medida del sexo; además, la composición de la corona biomolecular/proteica (es decir, una capa de diversas biomoléculas que se forma en la superficie de las nanopartículas al entrar en contacto con un fluido biológico) se ve afectada por

factores paracrinos específicos del sexo (Hajipour *et al.*, 2021). Las variaciones anatómicas y fisiológicas entre sexos afectan los cuatro pasos principales por los que pasan los nanomedicamentos administrados: absorción, distribución, metabolismo y eliminación (Sharifi *et al.*, 2021). Hay algunas diferencias en el funcionamiento del sistema gastrointestinal en hombres y mujeres. Las hormonas sexuales femeninas, los receptores de hormonas gástricas y el óxido nítrico tienen efectos sobre la motilidad gástrica, lo que probablemente resulte en una disminución de la frecuencia de las contracciones y un vaciado gástrico lento, como se ha observado en ratas. La diferencia de composición corporal dependiente del sexo también puede influir en la distribución de formulaciones farmacológicas o no medicinales. Por ejemplo, los machos y las hembras tienen una distribución total de agua distinta, así como una distribución de músculo y grasa.

Las diferencias observadas también podrían involucrar a las enzimas del citocromo P450. Como ya se explicó previamente, los genes *CYP* son muy polimórficos y constituyen una fuente importante de variabilidad en la farmacocinética y la respuesta a los fármacos. Además, se ha documentado que varios *CYP* tienen expresión o actividad dependiente del sexo. *CYP3A4* en particular es un citocromo hepático crítico que metaboliza hasta el 50 % de todos los fármacos y es la isoenzima *CYP* más abundante en el hígado humano. Hay una mayor expresión de ARN mensajero y proteína *CYP3A4* en biopsias de hígado de mujeres que de hombres. La mayoría de los estudios clínicos indican que las mujeres metabolizan los medicamentos más rápido que los hombres (Zanger & Schwab, 2013). Reconocer las fuentes y comprender los factores que contribuyen a la variabilidad farmacocinética y farmacodinámica dentro y entre individuos sigue siendo un desafío de particular importancia, en especial para los medicamentos con un índice terapéutico estrecho (Lin, 2007).

El siguiente paso fue la evaluación de la eficacia terapéutica *in vivo* de las dos formulaciones y compararla con la del fármaco puro, en la etapa crónica de la infección con *Trichinella spiralis*, en el modelo murino de trichinellosis CBI-IGE.

El grado de infección alcanzado por cada animal, medido a través de la carga parasitaria muscular relativa (CPr), mostró diferencias significativas entre las líneas. CBI+ presentó una alta CPr a mientras que CBI/L mostró baja CPr,

corroborando las diferencias en la capacidad de resistencia a la infección con *T. spiralis* en estos genotipos (Vasconi *et al.*, 2015). El tratamiento con mebendazol en los días 27, 28 y 29 posinfección no causó reducción en el número de larvas respecto a los animales control. Otros autores han obtenido, en ratones, efectividad antihelmíntica contra larvas enquistadas usando mebendazol puro como tratamiento. Tal es el caso Rodríguez Caabeiro y colaboradores que administraron mebendazol a ratones previamente infectados con *T. spiralis*, los días 45, 46 y 47 posinfección y los sacrificaron a los 15 días postratamiento, obteniendo un porcentaje de reducción del 89 %. Sin embargo, fue con una dosis de mebendazol de 60 mg/kg, cuatro veces más grande a la utilizada en este trabajo.

La administración de las formulaciones NP o Comp redujo significativamente la carga parasitaria muscular en ambos genotipos y sexos. Las hembras CBi/L tuvieron una reducción del 60-70 % mientras que en los machos CBi/L y machos y hembras CBi+ la disminución fue de 80-90 %, a pesar de que los animales susceptibles tienen una carga parasitaria muscular 8 a 9 veces mayor que los ratones resistentes. Con un protocolo de administración y dosis similares, Martínez Fernández (1991) obtuvo resultados semejantes a los nuestros. En sus ensayos utilizó una disolución sólida de mebendazol en polivinilpirrolidona, administrada en una única dosis de 10 mg/kg el día 30 posinfección o en dosis repetidas, de 5 mg/kg, los días 30, 31 y 32 posinfección. Los animales se sacrificaron 10 días después de haber finalizado el tratamiento. La eficacia de reducción fue del 90 % para el primer caso y del 100 % en el segundo.

Durante la fase parenteral las larvas de *T. spiralis* que penetran en las células musculares las modifican, generando un nicho protector denominado célula nodriza o quiste larval. Sobre la superficie del quiste se genera una red capilar nueva a partir de vasos sanguíneos preexistentes que se requiere para la nutrición de las larvas y la eliminación de desechos (Ock *et al.*, 2013). Ese complejo larva infectante – célula nodriza se caracteriza por establecer una inflamación crónica en el sitio de la infección, la cual es sustentada por la “invasión” de células del sistema inmune del huésped al tejido muscular infectado con el objetivo de destruirlo. Ésta reacción inflamatoria es responsable de la patología denominada miositis.

El quiste ejerce un papel esencial contra las defensas inmunológicas del organismo hospedador. Estudios histológicos realizados por otros autores (De Nollin *et al.*, 1974; Rodríguez Caabeiro *et al.*, 1978) concluyeron que el mebendazol actuaría principalmente sobre el tejido que rodea a la larva, haciendo que los metabolitos de la larva junto con sus antígenos entren a la circulación del hospedero, desencadenando una respuesta inmune e inflamatoria más intensa. El mebendazol provocaría marcados cambios degenerativos sobre los quistes, lo que permitiría el paso de células inflamatorias que terminarían destruyendo al parásito. La acción del antihelmíntico al desorganizar el componente celular de la matriz quística, convertiría a cada larva en un foco antigénico desnudo sobre el que se desencadenaría la inmunidad mediada por células (Martínez-Fernández *et al.*, 1980). Este efecto no ha sido descrito en la terapia con albendazol. De hecho, el mebendazol mostró mejores efectos sobre las larvas musculares que el albendazol en ratones (McCracken, 1978). Así pues, albendazol y mebendazol no son igualmente efectivos contra todos los estadios larvales (Knopp *et al.*, 2012).

Es importante destacar que, en este trabajo, 80 a 100 % de las larvas recuperadas de los animales tratados con NP y Comp, s estaban muertas. Esto ocurrió en ratones de ambos sexos y genotipos. Además, las larvas muertas recuperadas presentaron su estructura interna destruida. Por el contrario, las pocas larvas muertas recuperadas de los animales tratados con mebendazol conservaban su conformación interna. Si la acción antihelmíntica del mebendazol en la fase muscular fuera el resultado de un efecto farmacológico combinado con un efecto inmunológico, se podría especular que un mayor número de larvas muertas desencadenaría una mayor respuesta inmune, que derivaría en la destrucción de su estructura interna, pudiendo llegar a la desintegración total de la larva. Esto explicaría los resultados obtenidos en machos CBi/L, en los que no se logró recuperar larvas musculares.

Si bien el mebendazol ha demostrado poseer, en ratones tratados con dosis altas, un efecto considerable en todas las fases del ciclo biológico de *T. spiralis*, su uso estaría limitado en la clínica humana. Pozio y colaboradores (2001) demostraron que el mebendazol sólo fue efectivo contra las larvas recién nacidas presentes en los vasos sanguíneos y linfáticos, pero no sobre las larvas encapsuladas en las células

musculares: una vez iniciada la encapsulación en humanos, las larvas de *T. spiralis* son resistentes al tratamiento con mebendazol. Es importante señalar que no es recomendable el uso del mebendazol para el tratamiento de trichinellosis humana en su fase muscular, ya que por exacerbar el proceso inmunitario generado por la presencia del quiste larvario, puede provocar un cuadro similar a un choque anafiláctico peligroso (Martínez-Fernández *et al.*, 1980).

En resumen, el notorio aumento de la eficacia antihelmíntica del mebendazol contra parásitos de *T. spiralis* ya enquistados, sería una consecuencia directa del aumento de su absorción al ser administrado en forma de nanopartícula o complejo de inclusión. Estas formulaciones podrían proporcionar un sistema farmacológico más seguro para fármacos orales poco solubles en agua, ya que no sólo aumentan la concentración del principio activo, aún a dosis bajas, sino que además son totalmente inocuas al ser administradas vía oral.

Para finalizar, los nuevos sistemas de albendazol y mebendazol desarrollados para este trabajo de tesis nos permitieron obtener mejores propiedades biofarmacéuticas y mejoraron potencialmente la eficacia terapéutica en la fase crónica de la trichinellosis. En nuestro modelo experimental y en las condiciones en que se hicieron los experimentos, las formulaciones de mebendazol mostraron una mejor performance que las de albendazol en la etapa crónica de la infección. Nuestros hallazgos indican que el genotipo y el sexo del hospedero influyen en la respuesta de las formulaciones y deben ser considerados en estudios preclínicos. Asimismo, corroboran que la eficacia terapéutica en las diferentes fases de la infección con *T. spiralis* depende de varios factores, como la respuesta inmunitaria del huésped, la susceptibilidad al estadio de *T. spiralis*, la biodisponibilidad del fármaco y los componentes de las formulaciones.

## CONCLUSIONES

Se realizaron ensayos *in vitro* e *in vivo* con albendazol puro, mebendazol puro y los nuevos sistemas terapéuticos de ambos fármacos, con el fin de evaluar su eficacia antiparasitaria contra *Trichinella spiralis*, en dos líneas de ratones CBi-IGE, con fenotipos extremos de resistencia/susceptibilidad al parásito. Los resultados obtenidos nos permitieron concluir que:

- la metodología utilizada para obtener microcristales de albendazol fue efectiva ya que mejoró significativamente la actividad antiparasitaria *in vitro* e *in vivo* del ingrediente farmacéutico activo.
- el estudio farmacocinético reveló que los sistemas S4A y S10A optimizaron la biodisponibilidad del albendazol puro.
- las experiencias *in vivo* demostraron que albendazol, S4A y S10A fueron igualmente efectivos cuando se administran en la etapa aguda de la infección. Los tratamientos produjeron un cambio en la morfología interna de las hembras de *Trichinella spiralis* que se vio reflejado en una menor carga parasitaria muscular.
- el tratamiento con albendazol o las formulaciones S4A y S10A en la etapa migratoria de la infección, mostró una mejor respuesta terapéutica de los microcristales, aunque no estadísticamente significativa, en comparación con albendazol sin procesar. Los machos de ambos genotipos que recibieron S4A y S10A redujeron a la mitad la carga muscular de las larvas en comparación con los controles; sin embargo, esta respuesta no se observó en las hembras.
- en la etapa crónica sólo la formulación con quitosano (S10A) mostró una eficacia terapéutica significativamente mejor en machos de la línea CBi/L.
- la nanopartícula (NP) de mebendazol y el complejo de inclusión (Comp), citrato de  $\beta$ -ciclodextrina, mostraron una mejoría en la actividad antihelmíntica *in vitro* en comparación con mebendazol puro, siendo la nanopartícula la más eficaz.

- el análisis farmacocinético indicó que NP y Comp optimizan la biodisponibilidad de mebendazol en ratones machos y hembras del modelo murino de trichinellosis CBi-IGE.
- el ensayo *in vivo* mostró que tanto la NP como el Comp son efectivos cuando se administran en la fase crónica de la trichinellosis. El aumento de las variables farmacocinéticas de estas formulaciones se vio reflejado en una disminución significativa de la carga parasitaria muscular, comparados con los grupos control y tratado con mebendazol puro.

El modelo murino de trichinellosis utilizado en esta tesis fue adecuado para el estudio de la compleja y dinámica relación entre hospedero – parásito – fármaco. Nos permitió corroborar el rol del genotipo y sexo del hospedero sobre el desarrollo de esta parasitosis así como su influencia sobre la respuesta farmacológica.

---

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Abuelenain GL, Fahmy ZH, Elshennawy AM, Fahmy AM, Ali EM, Hammam O, Abdel-Aziz A (2021) The potency of *Lepidium sativum* and *Commiphora molmol* extracts on *Trichinella spiralis* stages and host interaction. ***Advances in Animal and Veterinary Sciences***, 9(9): 1376-1382.

Ahmad M, Manzoor K, Singh S, Ikram S (2017) Chitosan centered bionanocomposites for medical specialty and curative applications: a review. ***International Journal of Pharmaceutics***, 529(1-2): 200-217.

Agüeros M, Areses P, Campanero MA, Salman H, Quincoces G, Peñuelas I, Irache JM (2009) Bioadhesive properties and biodistribution of cyclodextrin-poly (anhydride) nanoparticles. ***European Journal of Pharmaceutical Sciences***, 37(3-4): 231-240.

Afonso-Pereira F, Dou L, Trenfield SJ, Madla CM, Murdan S, Sousa J, Veiga F, Basit AW (2018) Sex differences in the gastrointestinal tract of rats and the implications for oral drug delivery. ***European Journal of Pharmaceutical Sciences***, 115: 339-344.

Alarcón-Valdés P, Ortiz-Reynoso M, Santillan-Benitez J (2017) Perspective on the genetic response to antiparasitics: a review article. ***Iranian Journal of Parasitology***, 12(4): 470.

Alberts B (2007) El citoesqueleto. En: ***Biología Molecular de la Célula***, 5ta edición, New York, Garland Science, pp. 843-923.

Albers GAA & Gray GD (1987) Breeding for worm resistance: a perspective. ***International journal for parasitology***, 17(2): 559-566.

Allan RJ & Watson TR (1983) The metabolic and pharmacokinetic disposition of mebendazole in the rat. ***European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics***, 8: 373-381.

Anthony M & Berg MJ (2002) Biologic and molecular mechanisms for sex differences in pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics: Part I. ***Journal of Women's Health & Gender-Based Medicine***, 11(7): 601-615.

Ash L (2010) *Trichinella spiralis* y especies de *Trichinella*. En Ash L & Orihel, T ***Atlas de Parasitología humana***, 5ta edición, Buenos Aires (Argentina), Editorial Médica Panamericana, pp. 232-235.

Atías A (1999a) Triquinosis. En Atías A. (ed.) ***Parasitología Médica***, 3ra edición, Santiago (Chile), Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda., pp. 318-324.

Atías A (1999b) El Hospedero. La relación Hospedero-Parásito. En Atías A (ed.) ***Parasitología Médica***, 3ra edición, Santiago (Chile), Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda, pp. 49-53.

Atías A (1999b) El parásito. En Atías A (ed.) ***Parasitología Médica***, 3ra edición, Santiago (Chile), Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda, pp. 21-38.

Axtner J & Sommer S (2012) The functional importance of sequence versus expression variability of MHC alleles in parasite resistance. ***Genetica***,140(10-12):407-20.

Babbar R & Arora S (2020) A Comprehensive Review on Therapeutic Potential of Benzimidazole: A Miracle Scaffold. ***Journal of Pharmaceutical Technology, Research and Management***, 8(1): 23-29.

Bansal Y & Silakari O (2012) The therapeutic journey of benzimidazoles: A review. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry***, 20(21): 6208-6236.

Barbosa MA, Gonçalves IC, Moreno PMD (2017) ***Chitosan. Comprehensive Biomaterials***. 2nd ed. Oxford: Elsevier; 279-305.

Barriga O (1999) Inmunología de las infecciones parasitarias. En Atías A, ***Parasitología Médica***, 3ra edición, Santiago (Chile), Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda., pp. 66-101.

Barrowman MM, Marriner SE, Bogan JA (1984) The fumarate reductase system as a site of anthelmintic attack in *Ascaris suum*. ***Bioscience Reports***, 4: 879-883.

Basyoni MM & El-Sabaa AAA (2013) Therapeutic potential of myrrh and ivermectin against experimental *Trichinella spiralis* infection in mice. ***The Korean Journal of Parasitology***, 51(3): 297-304.

Behnke JM, Iraqi F, Menge D, Baker RL, Gibson J, Wakelin D (2003) Chasing the genes that control resistance to gastrointestinal nematodes. ***Journal of Helminthology***, 77(2):99-110.

Behnke JM, Menge DM, Nagda S, Noyes H, Iraqi FA, Kemp SJ, Mugambi RJM, Baker RL, Wakelin D, Gibson JP (2010) Quantitative trait loci for resistance to *Heligmosomoides bakeri* and associated immunological and pathological traits in mice: comparison of loci on chromosomes 5, 8 and 11 in F2 and F6/7 inter-cross lines of mice. ***Parasitology***, 137(2): 311-320.

Beiting DP, Gagliardo LF, Hesse M, Bliss SK, Meskill D and Appleton JA (2007) Coordinated control of immunity to muscle stage *Trichinella spiralis* by IL-10, regulatory T cells, and TGF-beta. ***The Journal of Immunology***, 178: 1039-1047.

Bell RG, Wang CH, Ogden RW (1985) *Trichinella spiralis*: nonspecific resistance and immunity to newborn larvae in inbred mice. ***Experimental Parasitology***, 60: 101-110.

Bell RG (1998) The generation and expression of immunity to *Trichinella spiralis* in laboratory rodents. ***Advances in Parasitology***, 41:149-217.

Benoit E, Besse S, Delatour P (1992) Effect of repeated doses of albendazole on enantiomerism of its sulfoxide metabolite in goats. ***American Journal of Veterinary Research***, 53(9): 1663-1665.

Berger SA (2017) Trichinosis: Global Status, 2017 edition, GIDEON Informatics Inc, pp. 1-114.

Bonato PS, De Oliveira ARM, De Santana FJM, Fernandes BJD, Lanchote VL, Gonzalez AE, García HH, Takayanagui OM (2007) Simultaneous determination of albendazole metabolites, praziquantel and its metabolite in plasma by high-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, 44(2): 558-563.

Brough C & Williams Iii RO (2013) Amorphous solid dispersions and nano-crystal technologies for poorly water-soluble drug delivery. ***International Journal of Pharmaceutics***, 453(1): 157-166.

Brown HD, Matzuk AR, Ilves I, Peterson LH, Harris SA, Sarett LH, Egerton JR, Yaksti JJ, Campbel WC, Cuckler AC (1961) Antiparasitic drugs. IV. 2-(4'-thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. ***Journal of the American Chemical Society***, 83(7): 1764-1765.

Bruschi F (2012) Trichinellosis in developing countries: is it neglected? ***The Journal of Infection in Developing Countries***, 6(03): 216-222.

Burgos LM, Farina J, Liendro MC, Saldarriaga C, Liprandi AS, Wyss F, Mendoza I, Baranchuk A (2020) Neglected Tropical Diseases and Other Infectious Diseases Affecting the Heart. The NET-Heart Project: Rationale and Design. ***Global Heart***, 15(1):60.

Buxton IO (2019) Farmacocinética: dinámica de la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de fármacos. En: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. eds. ***Goodman & Gilman: Las Bases Farmacológicas De La Terapéutica***, 13ava edición, McGraw Hill, pp. 1-39.

Calcagno M, Teixeira C, Forastiero MA, Costantino SN, Venturiello SM (2005) Aspectos clínicos, serológicos y parasitológicos de un brote de triquinosis humana en Villa Mercedes, San Luis, Argentina. ***Medicina***, 65 (4): 302-306.

Campa D, Gioia A, Tomei A, Poli P, Barale R (2008) Association of ABCB1/MDR1 and OPRM1 gene polymorphisms with morphine pain relief. ***Clinical Pharmacology & Therapeutics***, 83(4): 559-566.

Campbell WC & Cuckler AC (1964) Effect of thiabendazole upon the enteral and parenteral phases of trichinosis in mice. ***The Journal of Parasitology***, 50: 481–488.

Capece BP, Castells G, Pérez F, Arboix M, Cristòfol C (2000) Pharmacokinetic behaviour of albendazole sulphoxide enantiomers in male and female sheep. ***Veterinary Research Communications***, 24: 339–348.

Capó V & Despommier DD (1996) Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp. ***Clinical Microbiology Reviews***, 9(1): 47-54.

Caracostantogolo J & Martinez ML (2011) Epidemiología de la trichinellosis y situación en la Argentina. ***Revista Veterinaria Argentina***, 18: 281-283.

Casulli A, Morales MA, Gallinella B, Turchetto L, Pozio E (2006) 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin improves the effectiveness of albendazole against encapsulated larvae of *Trichinella spiralis* in a murine model. ***Journal Antimicrobial Chemotherapy***, 58(4):886-90.

Chai JY, Jung BK, Hong SJ (2021) Albendazole and mebendazole as anti-parasitic and anti-cancer agents: an update. ***The Korean Journal of Parasitology***, 59(3): 189.

Chen H, Khemtong C, Yang X, Chang X, Gao J (2011) Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. ***Drug Discovery Today***, 16(7-8): 354-360.

Chow SC & Liu JP (2008) Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies, 3ra edition, Boca Raton, USA: Chapman and Hall/CRC, pp. 3-20.

Chung MS, Joo KH, Quan FS, Kwon HS, Cho SW (2001) Efficacy of flubendazole and albendazole against *Trichinella spiralis* in mice. ***Parasite***, 8(2 Suppl): S195–S198.  
Clayton JA & Collins FS (2014) NIH To balance sex in cell and animal studies. ***Nature***, 509: 282–283.

Codina AV, García A, Leonardi D, Vasconi MD, Di Masso RJ, Lamas MC, Hinrichsen LI (2015) Efficacy of albendazole:  $\beta$ -cyclodextrin citrate in the parenteral stage of *Trichinella spiralis* infection. ***International Journal of Biological Macromolecules***, 77: 203-206.

Codina AV, Indelman P, Perez JP, Benavides FJ, Vasconi MD, Hinrichsen LI (2020a) Diferentes haplotipos H2 en ratones endocriados CBI-IGE con distinta susceptibilidad a la infección con *Trichinella spiralis*. ***Journal of Basic and Applied Genetics***, Vol XXXI Suppl. 1 : 115.

Codina AV, Priotti J, Leonardi D, Vasconi MD, Hinrichsen LI, Lamas MC (2020b) Effect of genotype and sex of the host on the bioavailability of novel albendazole microcrystals based on chitosan and cellulose derivatives. ***AAPS PharmSciTech***, 21: 149–157.

Codina AV, Priotti J, Leonardi D, Vasconi MD, Lamas MC, Hinrichsen LI (2021) Effect of sex and genotype of the host on the anthelmintic efficacy of albendazole microcrystals, in the CBI-IGE *Trichinella* infection murine model. ***Parasitology***, 148(13): 1545-1553.

Cohen M, Costantino SN, Calcagno MA, Blanco GA, Pozio E, Venturiello SM (2010) Trichinella infection in wild boars (*Sus scrofa*) from a protected area of Argentina and its relationship with the presence of humans. *Veterinary Parasitology*, 169(3-4): 362-366.

Compton SJ, Celum CL, Lee C, Thompson D, Sumi SM, Fritsche TR, Coombs RW (1993) Trichinosis with ventilatory failure and persistent myocarditis. *Clinical Infectious Diseases*, 16(4): 500-504.

Cretu CM (2021) Treatment. *En Trichinella and Trichinellosis*, Fabrizio Bruschi (ed.), 1<sup>st</sup> edition, Academic Press, Elsevier, London, pp. 417-429.

Criado-Fornelio A, De Armas-Serra C, Jimenez-Gonzalez A, Casado-Escribano N, Rodriguez-Caabeiro F (1990) Biochemical effects of luxabendazole on *Trichinella spiralis*. *Parasitology Research*, 76(6): 518-520.

Cristófol C, Navarro M, Franquelo C, Valladares JE, Arboix M (1998) Sex differences in the disposition of albendazole metabolites in sheep. *Veterinary parasitology*, 78(3): 223-231.

Cristofol C, Virkel G, Alvarez L, Sanchez S, Arboix M, Lanusse C (2001) Albendazole sulphoxide enantiomeric ratios in plasma and target tissues after intravenous administration of ricobendazole to cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 24(2): 117-124.

Cuckler AC & Mezey KC (1966) The therapeutic efficacy of thiabendazole for helminthic infections in man; a literature review. *Arzneim Forsch*, 16 (3): 411-428.

Daniel-Mwambete K, Torrado S, Cuesta-Bandera C, Ponce-Gordo F, Torrado JJ (2004) The effect of solubilization on the oral bioavailability of three benzimidazole carbamate drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 272(1-2): 29-36.

Dannan GA, Guengerich FP, Waxman DJ (1986) Hormonal regulation of rat liver microsomal enzymes. Role of gonadal steroids in programming, maintenance, and suppression of delta 4-steroid 5 alpha-reductase, flavin-containing monooxygenase, and sex-specific cytochromes P-450. *Journal of Biological Chemistry*, 261(23): 10728-10735.

Dayan AD (2003) Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*, 86 (2-3): 141-159.

Dawson M, Braithwaite PA, Roberts MS, Watson TR (1985) The pharmacokinetics and bioavailability of a tracer dose of [<sup>3</sup>H] - mebendazole in man. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 19(1): 79-86.

de Andrade Picanço G, de Lima NF, Gomes TC, Fraga CM, Alves DDSMM, Castillo R, Costa TL, Lino Junior RS, Ambrosio J, Vinaud MC (2019) Partial inhibition of the main energetic pathways and its metabolic consequences after *in vivo* treatment with

benzimidazole derivatives in experimental neurocysticercosis. *Parasitology*, 146(12): 1578-1582.

de Andrade Picanço G, de Lima NF, Alves DS, Fraga CM, Costa TL, Junior RDSL, Fraga CM, Costa TL, Lino Junior RS, Castillo R, Hernández – Campos A, Ambrosio J, Vinaud MC (2020) Partial inhibition of the tricarboxylic acid cycle in *Taenia crassiceps* cysticerci after the in vitro exposure to a benzimidazole derivative (RCB15). *Acta Tropica*, 202: 105254.

de-la-Rosa JL, Alvarez N, Gomez-Priego A (2007) Study of the reproductive capacity of *Trichinella spiralis* recovered from experimentally infected mice under-dosed with albendazole or mebendazole. *Tropical Biomedicine*, 24: 93–97.

de la Torre-Iglesias PM, García-Rodríguez JJ, Torrado G, Torrado S, Torrado-Santiago S, Bolás-Fernández F (2014) Enhanced bioavailability and anthelmintic efficacy of mebendazole in redispersible microparticles with low-substituted hydroxypropylcellulose. *Drug Design, Development and Therapy*, 8: 1467–1479.

Declaración Universal de los Derechos de los Animales (1977) <http://www.filosofia.org/cod/c1977ani.htm>.

Dehlawi MS & Goyal PK (2003) Responses of inbred mouse strains to infection with intestinal nematodes. *Journal of Helminthology*, 77: 119-121.

Delatour P, Benoit E, Caude M, Tambute A (1990) Species differences in the generation of the chiral sulfoxide metabolite of albendazole in sheep and rats. *Chirality*, 2(3): 156-160.

Denham DA & Martinez AR (1970) Studies with methyridine and *Trichinella spiralis* 2. The use of the drug to study the rate of larval production in mice. *Journal of Helminthology*, 44: 357–363.

De Nollin S, Borgers M, Vanparijs O, Van Den Bossche H (1974) Effects of mebendazole on the encysted phase of *Trichinella spiralis* in the rat: an electron-microscope study. *Parasitology*, 69(1): 55-62.

Despommier DD (1990) *Trichinella spiralis*: the worm that would be virus. *Parasitology Today*, 6(6): 193-196.

Despommier DD (2005) *Trichinella spiralis*. En Despommier DD, Gwadz RG, Hotez P, Knirsch C (eds.) *Parasitic Diseases*, 5<sup>th</sup> edition, New York Apple Trees Productions, LLC Pub, pp. 135-142.

DeVos T, Danell G, Dick TA (1992) *Trichinella spiralis*: dose dependence and kinetics of the mucosal immune response in mice. *Experimental parasitology*, 75(1): 99-111.

Dib A, Palma S, Suárez G, Farías C, Cabrera P, Castro S, Allemandi D, Moreno L, Lanusse C, Sanchez Bruni S (2011) Albendazole sulphoxide kinetic disposition after

treatment with different formulations in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 34(2): 136-141.

Di Masso RJ, Abdala S, Sanchez SM, Font MT (1991) Respuesta a la selección divergente por conformación corporal en el ratón. *Mendeliana*, 9: 79-92.

Dkhil MA (2015) Sex-determined susceptibility and differential MUC2 mRNA expression during the course of murine intestinal eimeriosis. *Parasitology Research*, 114: 283-288.

Dvorožňáková E, Kolodziej- Sobocińska M, Hurníková Z (2012) *Trichinella spiralis* reinfection: changes in cellular and humoral immune response in BALB/C mice. *Helminthologia*, 49: 201-210.

Dupouy-Camet J, Kociecka W, Bruschi F, Bolas-Fernández F, Pozio E (2002) Opinion on the diagnosis and treatment of human trichinellosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 3(8): 1117-1130.

Dupouy-Camet J & Bruschi F (2007) Management and diagnosis of human trichinellosis. En J. Dupouy-Camet and K. D. Murrell (ed.), *FAO/WHO/OIE guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis*. World Organization for Animal Health Press, Paris, France, pp 37-68.

Dupouy-Camet J, Raffetin A, Rosca EC, Yera H (2021) Clinical picture and diagnosis of human trichinellosis. En Bruschi F (ed.) *Trichinella and Trichinellosis*, Academic Press (Elsevier), pp. 333-352.

Eid RK, Ashour DS, Essa EA, El Maghraby GM, Arafa MF (2020) Chitosan coated nanostructured lipid carriers for enhanced in vivo efficacy of albendazole against *Trichinella spiralis*. *Carbohydrate Polymers*, 232: 115826.

Elewa H & Wilby KJ (2017) A review of pharmacogenetics of antimalarials and associated clinical implications. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 42(5): 745-756.

El Amri HS, Fargetton X, Delatour P, Batt AM (1987) Sulphoxidation of albendazole by the FAD-containing and cytochrome P-450 dependent mono-oxygenases from pig liver microsomes. *Xenobiotica*, 17(10): 1159-1168.

Errecalde J, Etchegoyen M, Formentini E, Francia C, Ostermann W, Sánchez Bruni S, Sbordi L, Turic E (2012) Guía para la realización de estudios de bioequivalencia para medicamentos veterinarios. Fundación Prosaia.

Evrard B, Chiap P, DeTullio P, Ghalmi F, Piel G, Van Hees T, Crommen J, Losson B, Delattre L (2002) Oral bioavailability in sheep of albendazole from a suspension and from a solution containing hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Controlled Release*, 85(1-3): 45-50.

Fabbri J, Espinosa JP, Pensel PE, Medici SK, Gamboa GU, Benoit JP, Elissondo MC (2020) Do albendazole-loaded lipid nanocapsules enhance the bioavailability of albendazole in the brain of healthy mice?. *Acta Tropica*, 201: 105215.

Fuscoe JC, Vijay V, Hanig JP, Han T, Ren L, Greenhaw JJ, Beger RD, Pence LM, Shi Q (2020) Hepatic transcript profiles of cytochrome P450 genes predict sex differences in drug metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, 48: 447–458.

Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl – Carrillo M, Klein T, Leeder JS (2017) Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genetics in Medicine*, 19(1): 69-76.

Galtier P, Alvinerie M, Delatour P (1986) *In vitro* sulfoxidation of albendazole by ovine liver microsomes: assay and frequency of various xenobiotics. *American Journal of Veterinary Research*, 47(2): 447-450.

Gandhi M, Aweeka F, Greenblatt RM, Blaschke TF (2004) Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44: 499-523.

García A, Barrera MG, Piccirilli G, Vasconi MD, Di Masso RJ, Leonardi D, Hinrichse LI, Lamas MC (2013) Novel albendazole formulations given during the intestinal phase of *Trichinella spiralis* infection reduce effectively parasitic muscle burden in mice. *Parasitology International*, 62(6): 568-570.

García A, Leonardi D, Salazar MO, Lamas MC (2014) Modified  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex to improve the physicochemical properties of albendazole. Complete *in vitro* evaluation and characterization. *PloS One*, 9(2): e88234.

García A, Leonardi D, Piccirilli GN, Mamprin ME, Olivieri AC, Lamas MC (2015) Spray drying formulation of albendazole microspheres by experimental design. *In vitro-in vivo* studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41(2): 244-252.

García A, Leonardi D, Lamas MC (2016) Promising applications in drug delivery systems of a novel  $\beta$ -cyclodextrin derivative obtained by green synthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(2): 602-608.

García JJ, Bolás F, Torrado JJ (2003) Bioavailability and efficacy characteristics of two different oral liquid formulations of albendazole. *International Journal of Pharmaceutics*, 250: 351–358.

García-Rodríguez JJ, Torrado J, Bolás F (2001) Improving bioavailability and anthelmintic activity of albendazole by preparing albendazolecyclodextrin complexes. *Parasite*, 8: S188–S190.

García-Rodríguez JJ (2008) Estudio Biofarmacéutico Y Parasitológico De Una Formulación De Albendazol En Hidroxipropil –  $\beta$  - Ciclodextrina. *Tesis Doctoral*. Facultad de Farmacia, Departamento de Parasitología, Universidad Complutense de Madrid, España.

García-Rodríguez JJ, De Prada I, Torrado Durán JJ, Bolás Fernández F (2009) The effect of intestinal trichinellosis on oral bioavailability of albendazole in mice. *Parasitology Research*, 105: 65–70.

Gavins FK, Dou L, Qin Y, Madla CM, Murdan S, Basit AW, Mai Y, Orlu M. (2023) Prandial state and biological sex modulate clinically relevant efflux transporters to different extents in Wistar and Sprague Dawley rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 160: 114329.

Gray IC, Campbell DA, Spurr NK (2000) Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Human Molecular Genetics*, 9(16):2403–2408.

Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Colic M, Majstorovic I, Vasilev S, Radovic I, Sofronic-Milosavljevic LJ (2011) The impact of *Trichinella spiralis* excretory–secretory products on dendritic cells. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34(5): 429-439.

Goodman LS, Gilman AG, Hardman JG, Limbird LE (1996) *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9na edición; McGraw-Hill, Nueva York.

Gottschall DW, Theodorides VJ, Wang R (1990) The metabolism of benzimidazole anthelmintics. *Parasitology Today*, 6(4): 115-124.

Gottstein B, Pozio E, Nöckler K (2009) Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1): 127-145.

Gould SE (1945) Pathology. En SE Gould (ed.) *Trichinosis*, 1st edition, Springfield, Illinois, U.S.A, Charles C. Thomas Publisher, pp. 73-152.

Guanera E, Krivokapich S, Peralta J, Trabattoni E, Paoletti C, Baravalle A, Bono F, Molina V (2006) Sistema de Diagnostico inmunológico de trichinellosis porcina Ante-Mortem. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1-8.

Gutiérrez EL, Souza MS, Diniz LF, Ellena J (2018) Synthesis, characterization and solubility of a new anthelmintic salt: Mebendazole nitrate. *Journal of Molecular Structure*, 1161: 113-121.

Gurwitz D, Weizman A, Rehavi M (2003) Education: teaching pharmacogenomics to prepare future physicians and researchers for personalized medicine. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(3): 122-125.

Gurwitz D & McLeod HL (2013) Genome-wide studies in pharmacogenomics: harnessing the power of extreme phenotypes. *Pharmacogenomics*, 14(4): 337-339.

Hajipour MJ, Aghaverdi H, Serpooshan V, Vali H, Sheibani S, Mahmoudi M (2021) Sex as an important factor in nanomedicine. *Nature Communications*, 12(1): 2984.

Hanley MJ, Abernethy DR, Greenblatt DJ (2010) Effect of obesity on the pharmacokinetics of drugs in humans. *Clinical Pharmacokinetics*, 49: 71-87.

Harley JP & Gallicchio V (1971) *Trichinella spiralis*: migration of larvae in the rat. *Experimental Parasitology*, 30(1): 11-21.

Harris DL, Chang YT, Loew GH (1995) Molecular dynamics simulations of phenylimidazole inhibitor complexes of cytochrome P450 cam. *Molecular Engineering*, 5: 143-156.

Hegazy MM, Elmehankar MS, Azab MS, El-Tantawy NL, Abdel-Aziz A (2019) Sex dichotomy in the course of experimental latent toxoplasmosis. *Experimental Parasitology*, 202: 15-21.

Hill DE, Forbes L, Kramer M, Gajadhar A, Gamble HR (2007) Larval viability and serological response in horses with long-term *Trichinella spiralis* infection. *Veterinary Parasitology*, 146(1-2): 107-116.

Hinrichsen LI & Di Masso RJ (2010) Empleo de un modelo murino original de Argentina en la caracterización de fenotipos complejos. *Journal of Basic and Applied Genetics*, 21: 1-12.

Hinrichsen L, Di Masso R, Vasconi MD, Giudici C (2010) Animal models suitable to study complex polygenic processes. En LaMann GV (ed) *Veterinary Parasitology*, Nova Science Publishers Inc., New York, pp. 289-302.

Huang Y, Shan Y, Zhang W, Lee AM, Li F, Stranger BE, Huang RS (2023) Deciphering genetic causes for sex differences in human health through drug metabolism and transporter genes. *Nature Communications*, 14(1): 1-15.

Humes AG & Akers RP (1952) Vascular changes in the cheek pouch of the golden hamster during infection with *Trichinella spiralis* larvae. *The Anatomical Record*, 114: 103-113.

Iannantuono R & Tessler J (1994) Biodisponibilidad y Bioequivalencia. *Revista Argentina de Farmacología Clínica*, 1: 5-226.

Ishikawa N, Goyal PK, Mahida YR, Li KF, Wakelin D (1998) Early citoquine responses during intestinal parasitic infections. *Immunology*, 93: 257-263.

Jin X, Liu X, Ding J, Zhang L, Yang Y, Wang X, Yang Y, Liu M (2020) Lentinan improved the efficacy of vaccine against *Trichinella spiralis* in an NLRP3 dependent manner. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(9): e0008632.

Kamataki T, Maeda K, Yamazoe Y, Nagai T, Kato R (1983) Sex difference of cytochrome P-450 in the rat: purification, characterization, and quantitation of constitutive forms of cytochrome P-450 from liver microsomes of male and female rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 225(2): 758-770.

Kayamba F, Faya M, Poee OJ, Kushwaha B, Kushwaha ND, Obakachi VA, Nyamori VO, Karpoormath R (2021) Lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase: Potential antiparasitic targets for drug development studies. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry***, 50: 116458.

Kapel CM (2000) Host diversity and biological characteristics of the *Trichinella* genotypes and their effect on transmission. ***Veterinary Parasitology***, 93(3-4): 263-278.

Kapoor VK (1987) Thiabendazole. En Klaus Florey (eds) ***Analytical Profiles of Drug Substances***, Academic Press, Vol. 16, pp. 611-639.

Kato R & Kamataki T (1982) Cytochrome P-450 as a determinant of sex difference of drug metabolism in the rat. ***Xenobiotica***, 12(11):787-800.

Kennedy MW, Wassom DL, McIntosh AE, Thomas JC (1991) H-2 (I-A) control of the antibody repertoire to secreted antigens of *Trichinella spiralis* in infection and its relevance to resistance and susceptibility. ***Immunology***, 73(1):36-43.

Khadka P, Ro J, Kim H, Kim I, Kim JT, Kim H, Cho JM, Yun G, Lee J (2014) Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. ***Asian Journal of Pharmaceutical Sciences***, 9: 304-316.

Khan MIH, An X, Dai L, Li H, Khan A, Ni Y (2019) Chitosan-based polymer matrix for pharmaceutical excipients and drug delivery. ***Current Medicinal Chemistry***, 26: 2502-2513.

Kocięcka W (2000) Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. ***Veterinary Parasitology***, 93(3-4): 365-383.

Knopp S, Steinmann P, Keiser J, Utzinger J (2012) Nematode infections. Soil-transmitted helminths and *Trichinella*. ***Infectious Disease Clinics of North America***, 26: 341-358.

Krivokapich SJ, Pozio E, Gatti GM, Prous CL, Ribicich M, Marucci G, La Rosa G, Confalonieri V (2012) *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. ***International Journal for Parasitology***, 42: 903-910.

Lanusse CE, Nare B, Gascon LH, Prichard RK (1992) Metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by ruminal and intestinal fluids of sheep and cattle. ***Xenobiotica***, 22(4): 419-426.

Lanusse CE & Prichard RK (1990) Pharmacokinetic behaviour of netobimin and its metabolites in sheep. ***Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics***, 13(2): 170-178.

Lanusse CE & Prichard RK (1993) Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Veterinary Parasitology*, 49(2-4): 123-158.

Lara DM (2003) Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 4(1): 55-71.

Lauschke VM, Milani L, Ingelman-Sundberg M (2018) Pharmacogenomic biomarkers for improved drug therapy—recent progress and future developments. *The AAPS Journal*, 20(1): 1-16.

Leclair D, Forbes LB, Suppa S, Gajadhar AA (2003) Evaluation of a digestion assay and determination of sample size and tissue for the reliable detection of *Trichinella* larvae in walrus meat. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15: 188-191.

Leonardi D, Lamas MC, Olivieri AC (2008) Multiresponse optimization of the properties of albendazole-chitosan microparticles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(3): 802-807.

Lesko LJ & Woodcock J (2004) Translation of pharmacogenomics and pharmacogenetics: a regulatory perspective. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(9): 763-769.

Ley n.º 15.465, Salud Pública, Notificación Obligatoria de los casos de enfermedades infecciosas. Sancionada: septiembre 29 de 1960. Disponible en: <http://www.infoleg.gov.ar/infolegInternet/anexos/195000-199999/195093/norma.htm>

Lin JH (2007) Pharmacokinetic and pharmacodynamic variability: a daunting challenge in drug therapy. *Current Drug Metabolism*, 8(2): 109-136.

Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB (2004) Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58(2): 265-278.

Lockard RD, Wilson ME, Rodríguez NE (2019) Sex-related differences in immune response and symptomatic manifestations to infection with *Leishmania* species. *Journal of Immunology Research*, 2019: 4103819.

Lomónaco MF (2012) Utilización de modelos animales en investigación del cáncer. *Salud Militar*, 31: 55-58.

López-García ML, Torrado-Durán S, Torrado-Durán J, Martínez-Fernández AR and Bolás-Fernández F (1997) Albendazole versus ricobendazole (albendazole-sulphoxide) against enteral and parenteral stages of *Trichinella spiralis* in mice. *International Journal for Parasitology*, 27: 781-785.

López-García ML (2002) Potenciación de la actividad antihelmíntica del albendazol mediante modificaciones en su biodisponibilidad y metabolismo. **Tesis Doctoral**. Facultad de Farmacia, Departamento de Parasitología, Universidad Complutense de Madrid, España.

López-López M, Guerrero-Camacho JL, Familiar-López IM, Jung-Cook H, Corona-Vázquez T, Alonso-Vilatela ME (2004) Farmacogenómica: búsqueda de la terapia personalizada. **Revista de Neurología**, 39(11): 1063-1071.

Love RJ, Ogilvie BM, McLaren DJ (1976) The immune mechanism which expels the intestinal stage of *Trichinella spiralis* from rats. **Immunology**, 30 (1): 7- 15.

Lubega GW & Prichard RK (1991) Interaction of benzimidazole anthelmintics with *Haemonchus contortus* tubulin: binding affinity and anthelmintic efficacy. **Experimental Parasitology**, 73(2): 203-213.

Luebke RW (2007) Nematodes as host resistance models for detection of immunotoxicity. **Methods**, 41: 38-47.

MacCallum CJ (2010) Reporting animal studies: good science and a duty of care. **PLoS biology**, 8(6): e1000413

Machado-Silva JR, Neves RH, da Silva LO, de Oliveira RMF, da Silva AC (2005) Do mice genetically selected for resistance to oral tolerance provide selective advantage for *Schistosoma mansoni* infection? **Experimental Parasitology**, 111(1): 1-7.

Mai Y, Afonso-Pereira F, Murdan S, Basit AW (2017) Excipient-mediated alteration in drug bioavailability in the rat depends on the sex of the animal. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 107: 249-255.

Mai Y, Madla CM, Shao H, Qin Y, Merchant HA, Murdan S, Basit AW (2022) Sex-specific effects of excipients on oral drug bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**, 629: 122365.

Maizels RM, Yazdanbakhsh, M (2003) Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nature Reviews Immunology**, 3: 733-744.

Maizels RM & McSorley HJ (2016) Regulation of the host immune system by helminth parasites. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 138(3): 666-675.

Mammeri M, Chevillot A, Thomas M, Polack B, Julien C, Marden JP, Auclair E, Vallée I, Adjou KT (2018) Efficacy of chitosan, a natural polysaccharide, against *Cryptosporidium parvum* in vitro and in vivo in neonatal mice. **Experimental Parasitology**, 194: 1-8.

Malo D & Skamene E (1994) Genetic control of host resistance to infection. **Trends in Genetics**, 10(10): 365-371.

Marian I, Ionică AM, Deak G, Ursache T, Lefkaditis M, Gherman CM, Mihalca AD (2020) The effect of *Trichinella spiralis* on muscular activity of experimentally infected mice. ***Parasitology International***, 76:102032.

Marriner SE, Morris DL, Dickson B, Bogan JA (1986) Pharmacokinetics of albendazole in man. ***European Journal of Clinical Pharmacology***, 30(6): 705-708.

Martin RJ (1997) Modes of action of anthelmintic drugs. ***The Veterinary Journal***, 154(1): 11-34.

Martínez-Gómez F, Fuentes-Castro BE, Bautista-Garfias CR (2011) The intraperitoneal inoculation of *Lactobacillus casei* in mice induces total protection against *Trichinella spiralis* infection at low challenge doses. ***Parasitology Research***, 109(6):1609-17.

Martínez-Fernández AR, Sanmartín Durán ML, Toro Rojas M, Rodríguez Caabeiro F (1980) Effect of mebendazole on encysted larvae of *Trichinella spiralis*. II. Histopathological modifications caused by prednisone. ***Revista Ibérica de Parasitología***.

Martínez-Fernández AR (1991) Actividad antihelmíntica de una nueva formulación de mebendazol. ***Revista Ibérica de Parasitología***, 50 (3-4):353-358.

McCarthy JS & Moore TA (2015) Drugs for Helminths. En Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (Eds), ***Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases***, 8<sup>th</sup> edition, Elsevier Saunders: Philadelphia, pp. 519-527.

McCracken RO (1978) Efficacy of mebendazole and albendazole against *Trichinella spiralis* in mice. ***Journal of Parasitology***, 64: 214-219.

Meco D, Attinà G, Mastrangelo S, Navarra P, Ruggiero A (2023) Emerging perspectives on the antiparasitic mebendazole as a repurposed drug for the treatment of brain cancers. ***International Journal of Molecular Sciences***, 24(2): 1334.

Méndez JF, Rodríguez TYA, Marín CFC, Ruiz SBL, Medina JC, Vázquez HV, Barreda MC, Rojas RR (2012) En V Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB 2011, ***Sustainable Technologies for the Health of All, Habana*** (Cuba), Springer Science & Business Media, vol. 33.

Merino J & Merino R (2008) Aportación de los modelos animales al estudio y el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias sistémicas. ***Reumatología Clínica***, 4: 6-10.

Meyer-Lucht Y & Sommer S (2005) MHC diversity and the association to nematode parasitism in the yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*). ***Molecular Ecology***, 14(7):2233-43.

Miller MA (2001) Gender-based differences in the toxicity of pharmaceuticals—the Food and Drug Administration's perspective. *International Journal of Toxicology*, 20(3), 149-152.

Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación, Boletín Epidemiológico Anual (2019) <https://www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologia/boletines>. 2019.

Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación, Guía para la prevención y el control de triquinosis/trichinellosis en la República Argentina (2021) Primera edición. [https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2021-05/Guia\\_Triquinosis\\_14-5.pdf](https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2021-05/Guia_Triquinosis_14-5.pdf)

Mirfazaelian A, Dadashzadeh S, Rouini M (2002) Effect of gender in the disposition of albendazole metabolites in humans. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 58: 403-408.

Mitreva M & Jasmer DP (2006) Biology and genome of *Trichinella spiralis*. In Hodgkin J (ed.), The *C. elegans* Research Community, WormBook. Pasadena, CA, pp 123–134.

Moreno García MA, Maldonado Tapia C, García Mayorga EA, Reveles Hernandez RG, Muñoz Escobedo JJ (2009) Fase intestinal de *Trichinella spiralis* en modelo murino. *Acta Biológica Colombiana*, 14: 203-210.

Moroni P, Buronfosse T, Longin-Sauvageon C, Delatour P, Benoit E (1995) Chiral sulfoxidation of albendazole by the flavin adenine dinucleotide-containing and cytochrome P450-dependent monooxygenases from rat liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 23(2): 160-165.

Moyer AM, Matey ET, Miller VM (2019) Individualized medicine: sex, hormones, genetics, and adverse drug reactions. *Pharmacology Research & Perspectives*, 7: e00541.

Mulder GJ (1986) Sex differences in drug conjugation and their consequences for drug toxicity. Sulfation, glucuronidation and glutathione conjugation. *Chemical and Biological Interactions*, 57(1): 1-15.

Müller RH, Gohla S, Keck CM (2011) State of the art of nanocrystals—special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(1): 1-9.

Murrell KD, Djordjevic M, Cuperlovic K, Sofronic LJ, Savic M, Damjanovic S (2004) Epidemiology of *Trichinella* infection in the horse: the risk from animal product feeding practices. *Veterinary Parasitology*, 123(3-4): 223-233.

Murrell KD & Pozio E (2011) Worldwide occurrence and impact of human trichinellosis, 1986–2009. *Emerging Infectious Diseases*, 17(12): 2194.

Murrell KD (2013) Zoonotic foodborne parasites and their surveillance. *Rev Sci Tech*, 32(2): 559-569.

Murrell KD (2016) The dynamics of *Trichinella spiralis* epidemiology: out to pasture? *Veterinary Parasitology*, 231: 92-96.

Muñoz-Carrillo JL, Maldonado-Tapia C, López-Luna A, Muñoz-Escobedo JJ, Flores-De La Torre JA, Moreno-García A (2018) Current aspects in trichinellosis. En *Parasites and Parasitic Disease*, London, UK: IntechOpen, pp. 175-216.

Muñoz J, Saldivar S, Reveles G, Muñoz Y, Moreno MA (2007) Characteristics of the nurse cell in different experimental models infected by *Trichinella spiralis*. *REDVET, Revista Electrónica de Veterinaria*, VIII.  
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010107/010712.pdf>

Nagy J, Schipper HG, Koopmans RP, Butter JJ, Van Boxtel CJ, Kager PA (2002) Effect of grapefruit juice or cimetidine coadministration on albendazole bioavailability. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(3): 260-263.

National Research Council (2011) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8<sup>th</sup> edition, Washington, DC. The National Academies Press.

Nava-Castro K, Hernández-Bello R, Muñiz-Hernández S, Camacho-Arroyo I, Morales-Montor J (2012) Sex steroids, immune system, and parasitic infections: facts and hypotheses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1262: 16–26.

Wassom Neghina R, Moldovan R., Marincu I, Calma CL, Neghina AM (2012) The roots of evil: the amazing history of trichinellosis and *Trichinella* parasites. *Parasitology Research*, 110(2): 503-508.

Navarro M, Canut L, Carretero A, Cristofol C, Pérez-Aparicio FJ, Arboix M, Ruberte, J (1999) Developmental toxicity in rat fetuses exposed to the benzimidazole netobimin. *Reproductive Toxicology*, 13(4): 295-302.

Nebert DW (1999) Pharmacogenetics and pharmacogenomics: why is this relevant to the clinical geneticist?. *Clinical Genetics*, 56(4): 247-258.

Nino Incani R, Morales G, Cesari IM (2001) Parasite and vertebrate host genetic heterogeneity determine the outcome of infection by *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, 87: 131-137.

Ochoa D, Saiz-Rodríguez M, González-Rojano E, Román M, Sánchez-Rojas S, Wojnicz A, Ruiz-Nuño A, García-Arieta A, Abad-Santos F (2021) High-fat breakfast increases bioavailability of albendazole compared to low-fat breakfast: Single-dose study in healthy subjects. *Frontiers in Pharmacology*, 12: 664465.

Ock MS, Cha HJ and Choi YH (2013) Verifiable hypotheses for thymosin  $\beta$ 4-dependent and independent angiogenic induction of *T. spiralis*-triggered nurse cell formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(12): 23492–23498.

Okelo GB, Hagos B, Ng'ang'a JN, Ogeto JO (1993) Pharmacokinetics of albendazole in children with hydatid disease. *East African Medical Journal*, 70(10): 643-645.

Oivanen L, Mikkonen T, Haltia L, Karhula H, Saloniemi H, Sukura A (2002) Persistence of *Trichinella spiralis* in rat carcasses experimentally mixed in different feed. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43: 203-210.

Onah DN & Nawa Y (2000) Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. *The Korean Journal of Parasitology*, 38: 209-236.

Organización Mundial de la Salud (2015) Model Lists of Essential Medicines. Disponible en: <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>

Palomares-Alonso F, González CR, Bernad-Bernad MJ, Montiel MDC, Hernández GP, González-Hernández I, Castro-Torres N, Pinzón-Estrada E, Jung-Cook H (2010) Two novel ternary albendazole-cyclodextrin-polymer systems: Dissolution, bioavailability and efficacy against *Taenia crassiceps* cysts. *Acta Trópica*, 113(1): 56-60.

Paredes AJ, Bruni SS, Allemandi D, Lanusse C, Palma SD (2018) Albendazole nanocrystals with improved pharmacokinetic performance in mice. *Therapeutic Delivery*, 9(2): 89-97.

Pasqualetti MI, Acerbo M, Abas M, Rosa AB, Fariña FA, Cardillo NM, Degregorio O, Ribicich MM (2014) Nuevos aportes al conocimiento de *Trichinella* y trichinellosis. *Revista de Medicina Veterinaria*, 95: 12-21.

Pawlowski ZS (1983) Clinical aspects in man. En: Campbell, W.C. (Ed.), *Trichinella and Trichinosis*, 1st edition, Plenum Press, New York, USA, pp. 367-402.

Perrudet-Badoux A, Binaghi RA, Biozzi G (1975) *Trichinella* infestation in mice genetically selected for high and low antibody production. *Immunology*, 29: 387-390.

Perrudet-Badoux A, Binaghi RA, Boussac - Aron Y (1978) *Trichinella spiralis* infection in mice. Mechanism of the resistance in animals genetically selected for high and low antibody production. *Immunology*, 35(3):519-22.

Picherot M, Oswald IP, Cote M, Noeckler K, Le Guerhier F, Boireau P, Vallée I (2007) Swine infection with *Trichinella spiralis*: comparative analysis of the mucosal intestinal and systemic immune responses. *Veterinary Parasitology*, 143: 122-130.

Pirmohamed M (2001) Pharmacogenetics and pharmacogenomics. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 52(4): 345.

Polvere R, Kabbash C, Capó V, Kadan I, Despommier D (1997) *Trichinella spiralis*: synthesis of type IV and type VI collagen during nurse cell formation. *Experimental Parasitology*, 86: 191-199.

Pozio E, La Rosa G, Rossi P, Murrell KD (1992) Biological characterization of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. ***The Journal of Parasitology***, 78: 647-653.

Pozio E (2000) Factors affecting the flow among domestic, synanthropic and sylvatic cycles of *Trichinella*. ***Veterinary Parasitology***, 93: 241-262.

Pozio E, Sacchini D, Sacchi L, Tamburrini A, Alberici F (2001) Failure of mebendazole in the treatment of humans with *Trichinella spiralis* infection at the stage of encapsulating larvae. ***Clinical Infectious Diseases***, 32: 638-642.

Pozio E (2007) World distribution of *Trichinella* spp. infections in animals and humans. ***Veterinary Parasitology***, 149: 3-21.

Pozio E, Hoberg E, La Rosa G, Zarlenga D (2009) Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. ***Infection, Genetics and Evolution***, 9: 606-616.

Pozio E & Zarlenga DS (2013) New pieces of the *Trichinella* puzzle. ***International Journal for Parasitology***, 43(12-13): 983-997.

Pozio E (2014) Searching for *Trichinella*: not all pigs are created equal. ***Trends in Parasitology***, 30(1): 4-11.

Pozio E (2021) Epidemiology. En: Bruschi, F (ed.) ***Trichinella and Trichinellosis***, Academic Press, London, pp.185-263.

Prieto JG, Justel A, Del Estal JL, Barrio JP, Alvarez AI (1991) Comparative study on gastric absorption of albendazole and mebendazole in rats. ***Comparative Biochemistry and physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology***, 100(3): 397-400.

Priotti J, Codina AV, Leonardi D, Vasconi MD, Hinrichsen LI, Lamas MC (2017) Albendazole microcrystal formulations based on chitosan and cellulose derivatives: physicochemical characterization and in vitro parasitocidal activity in *Trichinella spiralis* adult worms. ***AAPS PharmSciTech***, 18(4): 947-956.

Ramírez Valenzuela M (1981) Epidemiología de la Triquinelosis. ***Ciencia Veterinaria***, (3):278-334.

Randazzo VR & Costamagna SR (2010) Methylene blue test for the determination of viability of free larvae of *Trichinella spiralis*. ***Revista Argentina de Microbiología***, 42: 95-97.

Rawden HC, Kokwaro GO, Ward SA, Edwards G (2000) Relative contribution of cytochromes P-450 and flavin-containing monooxygenases to the metabolism of albendazole by human liver microsomes. ***British Journal of Clinical Pharmacology***, 49(4): 313-322.

Regitz-Zagrosek V (2012) Sex and gender differences in health: Science & Society Series on Sex and Science. *EMBO Reports*, 13(7): 596-603.

Reiterová K, Antolová D, Hurníková Z (2009) Humoral immune response of mice infected with low doses of *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Veterinary Parasitology*, 159(3-4):232-5.

Relling MV (1989) Polymorphic drug metabolism. *Clinical Pharmacy*, 8(12): 852-863.

Reveles RG, Villalobos R, Saldívar S, Moreno A (1996) Histologic experimental implant of *Trichinella spiralis*. *Parasitology Research*, 21: 79-85.

Reyes León Cachón, RB (2013) Aplicación de la farmacogenómica en la predicción de la respuesta a fármacos de alta variabilidad farmacocinética. *Tesis Doctoral*. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, México, pp 29.

Ribicich M, Gamble HR, Rosa A, Bolpe J, Franco A (2005) Trichinellosis in Argentina: an historical review. *Veterinary Parasitology*, 132(1-2):137-142.

Ribicich MM, Fariña FA, Aronowicz T, Ercole ME, Bessi C, Winter M, Pasqualetti MI (2020) A review on *Trichinella* infection in South America. *Veterinary Parasitology*, 285: 109234.

Roden DM & George Jr AL (2002) The genetic basis of variability in drug responses. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(1): 37-44.

Rodríguez JJG, de Prada I, Durán JJT, Fernández FB (2009) The effect of intestinal trichinellosis on oral bioavailability of albendazole in mice. *Parasitology Research*, 105(1): 65-70.

Rodríguez Caabeiro F, Martínez FA, Sanmartín DM, Toro RM (1978) The anthelmintic action of benzimidazole carbamates on *Trichinella spiralis*. I. Mebendazole. *Revista Ibérica de Parasitología*, 38: 249-258.

Rodríguez Yunta E (2007) Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta Bioethica*, 13: 25-40.

Rubira E (2008) Medicamentos: Un viaje a lo largo de la evolución histórica del descubrimiento de fármacos. Santiago de Compostela, Universidad de Santiago de Compostela, vol. 1.

Salústio PJ, Pontes P, Conduto C, Sanches I, Carvalho C, Arrais J, Marques HMC (2011) Advanced technologies for oral controlled release: cyclodextrins for oral controlled release. *AAPS PharmSciTech*, 12(4): 1276-1292.

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa). Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Presidencia de la Nación (2019) [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/informe\\_trichinellosis\\_2010\\_2019.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/informe_trichinellosis_2010_2019.pdf)

Sharifi S, Caracciolo G, Pozzi D, Digiacomio L, Swann J, Daldrup-Link HE, Mahmoudi M (2021) The role of sex as a biological variable in the efficacy and toxicity of therapeutic nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 174: 337-347.

Sharma R, Thompson PC, Hoberg EP, Scandrett WB, Konecni K, Harms NJ, Kukka PM, Jung TS, Elkin B, Mulders R, *et al.* (2020) Hiding in plain sight: discovery and phylogeography of a cryptic species of *Trichinella* (Nematoda: Trichinellidae) in wolverine (*Gulo gulo*). *International Journal for Parasitology*, 50(4): 277-287.

Sheskin DJ (2011) Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures, 5<sup>th</sup> edition, Boca Raton, USA: Chapman and Hall/CRC.

Shimoni Z & Froom P (2015) Uncertainties in diagnosis, treatment and prevention of trichinellosis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 13: 1279–1288.

Sistema Municipal de Epidemiología. Secretaría de Salud Pública. Municipalidad de Rosario (2022) – Última exportación de datos: 19/07/2022.  
<https://www.rosario.gob.ar/mr/epidemiologia/sala-de-situacion/curvas-epidemicas-y-canales-endemicos/triquinosis/triquinosis-ano-2022/informe-triquinosis-ano-2022>

Siriyasatien P, Yingyoud P, Nuchprayoon S (2003) Efficacy of albendazole against early and late stage of *Trichinella spiralis* infection in mice. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 86 (Suppl 2):S257-62.

Soldin OP & Mattison DR (2009) Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clinical Pharmacokinetics*, 48(3): 143-157.

Soldin OP, Chung SH, Mattison DR (2011) Sex differences in drug disposition. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2011.

Steel N, Faniyi AA, Rahman S, Swietlik S, Czajkowska BI, Chan BT, Hardgrave A, Steel A, Sparwasser TD, Assas MB, Grecis RK, Travis MA, Worthington JJ (2019) TGF $\beta$ -activation by dendritic cells drives Th17 induction and intestinal contractility and augments the expulsion of the parasite *Trichinella spiralis* in mice. *PLoS Pathogens*, 15: e1007657.

Stewart GL, Na H, Smart L, Seelig LL Jr (1999) The temporal relationship among anti-parasite immune elements expressed during the early phase of infection of the rat with *Trichinella spiralis*. *Parasitology Research*, 85: 672-677.

Sun B, Yu S, Zhao D, Guo S, Wang X, Zhao K (2018) Polysaccharides as vaccine adjuvants. *Vaccine*, 36: 5226–5234.

Swarbrick J (2007) Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 3rd edition, Boca Raton, USA, Taylor & Francis.

Tejada P, Sanchez-Moreno M, Monteoliva M, Gomez-Banqueri H (1987) Inhibition of malate dehydrogenase enzymes by benzimidazole anthelmintics. *Veterinary Parasitology*, 24(3-4): 269-274.

Teunis PFM, Koningstein M, Takumi K, Van Der Giessen JWB (2012) Human beings are highly susceptible to low doses of *Trichinella* spp. ***Epidemiology & Infection***, 140(2): 210-218.

The Wild Mice Project – GemPharmatec - Último acceso: 03/2023.  
(<https://www.gempharmatech.us/en/the-wild-mice-project/>)

Ting S & Schug S (2016) The pharmacogenomics of pain management: prospects for personalized medicine. ***Journal of Pain Research***, 9: 49.

Tornio A & Backman JT (2018) Cytochrome P450 in Pharmacogenetics: An Update. ***Advances in Pharmacology***, 83:3-32.

Toutain PL & Bousquet-Mélou A (2004) Bioavailability and its assessment. ***Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics***, 27(6): 455-466.

US Food and Drug Administration (2019) ***Drug Databases***. 12 de abril – 15 de mayo ; Available from: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.Cfm?event=browseByLetter.page&Letter=H>.

Vallance BA, Blennerhassett PA, Collins SM (1997) Increased intestinal muscle contractility and worm expulsion in nematode-infected mice. ***American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology***, 272:G321–G327.

Valodara AM & Sr KJ (2019) Sexual dimorphism in drug metabolism and pharmacokinetics. ***Current Drug Metabolism***, 20: 1154–1166.

Vaquero Puerta C (1993) Manual de Experimentación Animal, 1ra edición, Manual y textos universitarios, Ediciones Universidad de Valladolid, España.

Vasconi MD, Malfante P, Bassi A, Giudici C, Revelli S, Di Masso R, Font MT, Hinrichsen L (2008) Phenotypic differences on the outcome of the host-parasite relationship: behaviour of mice of the CBI stock in natural and experimental infections. ***Veterinary Parasitology***, 153: 157-163.

Vasconi MD (2015) Análisis de la resistencia / susceptibilidad al desafío con *Trichinella spiralis* en ratones con diferente genotipo. ***Tesis doctoral***. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario, Argentina, pp 51-52.

Vasconi MD, Bertorini G, Codina AV, Indelman P, Di Masso RJ, Hinrichsen LI (2015) Phenotypic characterization of the response to infection with *Trichinella spiralis* in genetically defined mouse lines of the CBI-IGE stock. ***Open Journal of Veterinary Medicine***, 5(05): 111-122.

Vidaillet AB, Quevedo SPT, Álvarez MV, Pérez AG, Quiala MT (2003) Impacto de la genómica en la Medicina. ***Revista Información Científica***, 40(4).

Villaverde C, Alvarez AI, Redondo P, Voces J, Del Estal JL, Prieto JG (1995) Small intestinal sulphoxidation of albendazole. *Xenobiotica*, 25(5): 433-441.

Virkel G, Lifschitz A, Soraci A, Sansinanea A, Lanusse C (2000) Enantioselective liver microsomal sulphoxidation of albendazole in cattle: effect of nutritional status. *Xenobiotica*, 30(4): 381-393.

Vizirianakis IS (2002) Pharmaceutical education in the wake of genomic technologies for drug development and personalized medicine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(3): 243-250.

Vogt M, Kunath K, Dressman JB (2008) Dissolution improvement of four poorly water soluble drugs by cogrinding with commonly used excipients. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(2): 330-337.

Von Hoosier G (1999) The age of biology: opportunities and challenges for Laboratory Animal Medicine. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*, 26: 176-184.

Wakelin D, Farias SE, Bradley JE (2002) Variation and immunity to intestinal worms. *Parasitology*, 125(7): S39-S50.

Wang L, Du J, Zhou Y, Wang Y (2017) Safety of nanosuspensions in drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(2): 455-469.

Wang J, Zhang C, Guo C, Li X (2019) Chitosan ameliorates DSS-induced ulcerative colitis mice by enhancing intestinal barrier function and improving Microflora. *International Journal of Molecular Sciences*, 20: 5751.

Waring RH (2020) Cytochrome P450: genotype to phenotype. *Xenobiotica*, 50(1): 9-18.

Wassom DL, Wakelin D, Brooks BO, Krco CJ, David CS (1984 a) Genetic control of immunity to *Trichinella spiralis* infections of mice. Hypothesis to explain the role of H-2 genes in primary and challenge infections. *Immunology*, 51(4): 625.

Wassom DL, Dougherty DA, Krco CJ, David CS (1984 b) H-2-controlled, dose-dependent suppression of the response that expels adult *Trichinella spiralis* from the small intestine of mice. *Immunology*, 53(4): 811.

Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, *et al.* (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420: 520-562.

Waxman DJ & Holloway MG (2009) Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Molecular Pharmacology*, 76(2): 215-228.

Whitley HP & Lindsey W (2009) Sex-based differences in drug activity. *American Family Physician*, 80(11): 1254-1258.

Witkamp RF, Nijmeijer SM, Mennes WC, Rozema AW, Noordhoek J, Van-Miert AS (1983) Regioselective O-demethylation of scoparone (6,7-methoxycoumarin) to assess cytochrome P450 activities *in vitro* in the rat. Effect of gonadal steroids and the involvement of constitutive P450 enzymes. *Xenobiotica*, 23: 401-410.

Wolbold R, Klein K, Burk O, Nüssler AK, Neuhaus P, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM (2003) Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology*, 38: 978-988.

Wu Z, Nagano I, Takahashi Y (2013) *Trichinella*: What is going on during nurse cell formation? *Veterinary Parasitology*, 194: 155-159.

Yang L, Li Y, Hong H, Chang CW, Guo LW, Lyn - Cook B, Shi L, Ning B (2012) Sex differences in the expression of drug-metabolizing and transporter genes in human liver. *Journal of Drug Metabolism & Toxicology*, 3(3): 1000119.

Yue F, Cheng Y, Breschi A, Vierstra J, Wu W, Ryba T, Sandstrom R, Ma Z, Davis C, Pope BD, *et al.* (2014) A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature*, 515: 355-364.

Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M (2008) Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(6): 1093-1108.

Zanger UM & Schwab M (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(1): 103-141.

Zaph C, Cooper PJ, Harris NL (2014) Mucosal immune responses following intestinal nematode infection. *Parasite Immunology*, 36(9): 439-452.

Zeng L, Qin C, Wang W, Chi W, Li W (2008) Absorption and distribution of chitosan in mice after oral administration. *Carbohydrate Polymers*, 7: 435-440.

Zucker I & Prendergast BJ (2020) Sex differences in pharmacokinetics predict adverse drug reactions in women. *Biology of Sex Differences*, 11(1): 1-14.

Zucker I, Prendergast BJ, Beery AK (2022) Pervasive neglect of sex differences in biomedical research. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 14(4):a039156.

Zuñiga J, Tur M, Milocco S, Piñeiro R (2001) *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*. McGraw-Hill Interamericana, México, pp. 682-684.