

003611



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO POR DROGAS  
NEUROLEPTICAS Y DERIVADOS DE LA FENOTIACINA  
SOBRE TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica  
HK9 y HM1

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRIA EN CIENCIAS  
P R E S E N T A :  
EVA HERNANDEZ MARQUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAUL N. ONDARZA VIDAURRETA

MEXICO, D.F.

2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **DEDICATORIAS**

**A mis padres** Fausto y Ma. de los Angeles por brindarme su apoyo y confianza para alcanzar mis metas.

A mis hermanos por el gran apoyo que siempre me han brindado.

**A mi hija**

**María Luisa** con todo mi amor. Agradezco lo valioso de su comprensión, paciencia y entusiasmo brindado para concluir esta meta, muchas gracias.

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Dr. Raúl N. Ondarza V.** por la dirección de esta tesis, pero lo más importante, por aportarme diariamente parte de esa energía radiante y entusiasmo que lo caracteriza, motivandome a concluir este trabajo. Muchas gracias.

A los señores sinodales Dr. JUAN PEDRO LACLETTE, Dr. EDMUNDO LAMOYI, Dr. ALEJANDRO ALAGON, Dr. HELIODORO CELIS, Dr. ABRAHAM LANDA, Dr. RUBEN LOPEZ y Dr. ALFONSO LUGO por la revisión, críticas y sugerencias al escrito final.

A los compañeros integrantes del laboratorio cinco planta alta del CISEI por el apoyo y colaboración.

Especialmente a la Bióloga Angélica Iturbe por su apoyo en todo momento y por su gran amistad.

Al Dr. Sergio Orozco R. Por su asesoría en las interpretaciones de los términos médicos y sus valiosas observaciones.

A los Drs. Kenneth Douglas y Omar Faruk K. por la donación de las drogas derivadas de la fenotiacina, sintetizadas en su laboratorio de la Universidad de Manchester.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica de Parásitos del Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública, bajo la dirección del Dr. Raúl N. Ondarza V. con apoyo del Proyecto No. 2029 "ACCION DE DROGAS SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR Y COMPUESTOS TIOLES DE AMIBAS PATOGENAS: *Entamoeba histolytica*, *Acanthamoeba polyphaga* y *Naegleria fowleri*.

El Análisis Fluorométrico con Sytox Green se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la asesoría del M.C. Alejandro Olvera.

## INDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. ANTECEDENTES	3
III. CARACTERISTICAS GENERALES DE <i>Entamoeba histolytica</i>	8
III.1 Síntomas y reconocimiento de la enfermedad	8
III.2 Ciclo de vida	9
III.3 Generalidades sobre la estructura celular y bioquímica	11
III.4 Organización genética	12
III.5 Mecanismos de invasividad	13
IV. TERAPIA ACTUAL DE LA AMIBIASIS	13
IV. 1 Agentes lumbinales	14
IV.2 Agentes sistémicos	15
IV.3 Agentes mixtos	17
V. JUSTIFICACION	19
VI. OBJETIVOS	20
VII. MATERIALES Y METODOS	21
VII.1 Cultivos celulares	21
VII.2 Medio de cultivo de <i>Entamoeba histolytica</i>	21
VII.3 Medio de cultivo de <i>Crithidia luciliae</i>	21
VII.4 Medio de cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
VII.5 Prueba de viabilidad celular por exclusión con azul de Tripano	22
VII.6 Análisis Fluorométrico para la cuantificación de Trofozoitos de amibas	23
VIII. DROGAS	25
VIII.1 Drogas derivadas de la fenotiacina	26
VIII.2 Drogas diseñadas contra la tripanotión reductasa	28
VIII.3 Drogas tricíclica neurolépticas	29
IX. METRONIDAZOL	32

	Página
X. RESULTADOS	34
X.1 Inhibición en la proliferación celular de <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Crithidia luciliae</i>	34
X.2 Inhibición en la proliferación celular de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> producida por 5 drogas derivadas de la fenotiacina y 5 drogas tricíclico neurolépticas	34
X.3 Efecto de 3 tipos de inhibidores, sobre trofozoítos de <i>E. histolytica</i> HK9	35 36
X.4 Viabilidad de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> HK9	
X.5 Cuantificación de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> HK9 y HM1 por medio del análisis fluorométrico con Sytox Green.	37
XI. DISCUSION	38
XII. CONCLUSIONES	40
XIII. REVISION BIBLIOGRAFICA	51

## **FIGURAS**

**Figura 1.** Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*

## **TABLAS**

**Tabla 1.** Efecto de un derivado de la fenotiacina (OFK006) y el tricíclico antidepresivo clomipramina (KD002) bajo condiciones microaeróbicas sobre el número de células de *Entamoeba histolytica* HK9, *Trypanosoma cruzi* y *Crithidia luciliae*.

**Tabla 2.** Efecto de las drogas derivadas de la fenotiacina y tricíclicos neurolépticos sobre la proliferación de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* HK9

## **GRAFICAS**

**Gráfica 1.** Efecto de tres tipos de inhibidores: uno derivado de la fenotiacina, la clomipramina y el metronidazol a diferentes concentraciones sobre trofozoítos de *Entamoeba histolytica* HK9

**Gráfica 2.** Efecto de 2 derivados de la fenotiacina, OFK001 y OFK043 sobre la proliferación de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* HK9

**Gráfica 3.** Efecto de 5 drogas tricíclico neurolépticas sobre la proliferación de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* HK9

**Gráfica 4 A-D.** Inhibición de la proliferación celular, medida como DNA con Sytox Green , de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* HK9, bajo condiciones anaeróbicas, por 3 periodos de tiempo.



**Gráfica 5 A-D.** Inhibición de la proliferación celular, medida como DNA con Sytox Green , de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* HM1, bajo condiciones anaeróbicas, por 3 periodos de tiempo.

## RESUMEN

Se ha demostrado que los compuestos tricíclicos neurolépticos como la clomipramina y la clorpromacina tienen efectos letales sobre *Leishmania donovani* y *L. major*. Por otra parte los derivados de la fenotiacina son inhibidores de la tripanotión reductasa, enzima característica de los tripanosomátidos. Es decir que tanto los compuestos tricíclicos neurolépticos como los derivados de la fenotiacina, pueden ser considerados como drogas potenciales antitripanosomales y antileishmaniales.

Tomando en cuenta lo anterior, así como que en la *Entamoeba histolytica* HK9, está presente el tripanotión, se procedió a probar los posibles efectos inhibitorios de los derivados de la fenotiacina y compuestos tricíclicos neurolépticos, sobre este parásito humano. Se encontró que la clomipramina, fué el más potente inhibidor de la proliferación celular, a una concentración 25  $\mu\text{M}$  durante 24 hrs. de cultivo. En estas condiciones se obtuvo un decremento sustancial en el número de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* HK9, desde aproximadamente  $14.5 \times 10^6$  en el normal hasta  $5.37 \times 10^6$  células (63% de inhibición) y a 100  $\mu\text{M}$  de  $0.8 \times 10^6$  células (94.5% de inhibición). Además se encontró un efecto inhibitorio del 100% a las concentraciones de 75 y 100  $\mu\text{M}$ , sobre la proliferación celular con el metronidazol, que se emplea clínicamente contra la amibiasis.

Bajo las mismas condiciones experimentales, se estudiaron otros compuestos tricíclicos (OFKs) sintetizados especialmente para inhibir a la tripanotión reductasa, encontrándose que tienen un efecto inhibidor sobre la *Entamoeba histolytica*, desde un 16% hasta un 95%.

Los mismos resultados obtenidos con las drogas clomipramina y el compuesto tricíclico OFK006 sobre *Entamoeba histolytica*, se obtuvieron con *Trypanosoma cruzi* y *Crithidia luciliae*, los cuales sirvieron como control.

Una observación interesante fue que la cepa HK9, crece más rápidamente que la HM1 en anaerobiosis, pero por su parte ésta es más resistente a las drogas.

En conclusión hemos demostrado que los compuestos tricíclicos como la clomipramina y la clorpromazina, así como los derivados de la fenotiazina, pueden ser considerados agentes potencialmente antiamebianos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## I. INTRODUCCIÓN

Mundialmente, hay un gran interés en el desarrollo de drogas y vacunas contra las enfermedades parasitarias como la amibiasis. Para esto se requiere la identificación de moléculas “blanco” propias del parásito para el tratamiento de la enfermedad, así como conocer la biología del organismo y las interacciones establecidas en la relación huésped-parásito.

Actualmente hay dos tendencias para la investigación de drogas antiparasitarias, la empírica y la racional. La ruta empírica para el descubrimiento de drogas está tradicionalmente asociada con la investigación fortuita de gran número de compuestos, tanto entidades discretas o como parte de mezclas complejas (usualmente de origen natural). En contraste a la llamada propuesta racional, esto no depende de la existencia de un gran cuerpo de información relacionado a la estructura y función de “blancos” macromoleculares bien definidos, puesto que en la actualidad la biotecnología apropiada, las metodologías analítica y computacional se han desarrollado suficientemente para proporcionar esta información, ya que, la mayoría de las drogas antiparasitarias usadas hoy en día, se obtuvieron de programas de investigación empírica (Hudson 1994).

Mucha de la quimioterapia antiparasitaria presente en la actualidad es derivada de prácticas y adelantos hechos en el siglo XIX. El uso empírico y tradicional de la corteza de las especies de *Cinchona* para la malaria, el rizoma y la raíz de *Cephaelis ipecacuanha* para la disentería amibiana y las flores de *Artemisa cina* como vermífugo, conducen al aislamiento de compuestos antiparasitarios como la quinina (1820), la emetina (1828) y la santonina (1830) respectivamente. Los orígenes empíricos de las drogas arsénicas orgánicas y antimoniales recomendadas actualmente para la

tripanosomiasis africana humana y leishmaniasis se encuentran también en tratamientos tradicionales contra enfermedades infecciosas (Croft 1994).

Calzado et al. (2000) mencionan que el aislamiento de compuestos activos de productos naturales de *Castela texana* que afectan la enquistación y/o desenquistación de los protozoarios *Entamoeba*, *Trichomonas* y *Giardia* ayudarían en el desarrollo de nuevas drogas para el tratamiento de la amibiasis y control de estrategias.

La estrategia racional consiste en el reconocimiento o diseño de un compuesto que tenga actividad antiparasitaria, para la cual el "blanco" específico sea reconocido, esta molécula sería usada como un molde para diseñar, por métodos computacionales, una molécula similar con mejores propiedades inhibitorias sobre la molécula "blanco", que es por lo general una enzima, cuya estructura tridimensional se conozca.

En la actualidad se utilizan dos técnicas para llegar al inhibidor de la proteína "blanco" (Verlinde et al. 1994). La primera de estas, es el uso de inmensos cocteles producidos por la tecnología combinatoria de moléculas en solución. Por ensayos y protocolos de selección, las moléculas con alta afinidad son retiradas del coctel y son sujetas a otras investigaciones. La segunda propuesta está basada en la estructura y el uso de programas computacionales sofisticados, probados para llegar al inhibidor de la proteína "blanco". Estos programas se basan en la estructura tridimensional conocida de una proteína "blanco".

El diseño racional de drogas ha sido posible debido al aumento en el conocimiento de la bioquímica de parásitos y de las interacciones entre el parásito y las células huésped, o sea las células "blanco" y células implicadas en la respuesta a esta interacción. En el perfeccionamiento de las

tecnologías bioquímicas para la purificación de proteínas, los ensayos enzimáticos, el conocimiento de la función enzimática y la determinación de las estructuras tridimensionales de las proteínas han permitido la comprensión detallada de moléculas “blanco” y sus probables ligandos (Douglas 1994).

Por otro lado, la tecnología recombinante de ADN permite la determinación de secuencias primarias de proteínas, su expresión y mutagénesis, las cuales han contribuido en algunos casos a la caracterización funcional de enzimas. Todos estos avances han contribuido a la aceleración en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra enfermedades parasitarias (Saavedra-Lira y Pérez 1996).

En años recientes ha aumentado el interés en el estudio de moléculas, particularmente de enzimas que existen exclusivamente en algunos parásitos y no en el humano u otros huéspedes, con el propósito de desarrollar drogas que afecten selectivamente al “blanco” sin afectar al huésped.

Para definir un “blanco” bioquímico en el parásito sobre el cual esté basado el diseño de la droga, es indispensable conocer el metabolismo y la bioquímica del parásito. Por ejemplo, el metabolismo del tripanotión en los tripanosomas y leishmanias representa un sistema molecular único para el parásito en relación al huésped mamífero. Otro ejemplo, es la dihidrofolato reductasa-timidilato sintetasa, una enzima multifuncional que se encuentra presente en *Plasmodium*, *Leishmania* y *Toxoplasma* pero en los mamíferos se encuentra como dos enzimas separadas (Douglas 1994). Con base en estos conocimientos, el siguiente paso en el diseño racional es el desarrollo del inhibidor de una enzima o receptor específico de la *Entamoeba histolytica*.

Actualmente las drogas disponibles para el tratamiento de la mayoría de las enfermedades están lejos de la perfección. Muchas de estas son altamente tóxicas y tienen numerosos efectos secundarios, por lo tanto drogas más efectivas y seguras se están necesitando urgentemente (Verlinde et al. 1994).

## II. ANTECEDENTES

Zilberstein et al. (1990) ha sugerido a los compuestos tricíclicos como drogas potenciales anti-leishmaniales con base en los estudios realizados sobre el efecto de las drogas tricíclicas en algunas funciones celulares de promastigotes de *Leishmania donovani*, en donde reportan que la imipramina, la clomipramina y la clorpromacina disminuyen el potencial membranal en éstos, habiendo una correlación directa entre la inhibición del transporte membranal de prolina y la medida del potencial de membrana a varias concentraciones de la droga.

Pearson et al. (1982) reportaron que las fenotiazinas, las cuales son muy utilizadas por sus efectos antipsicótico y ansiolítico, tienen efectos protozoocidas sobre el patógeno humano *Leishmania donovani* que es el agente causal de la leishmaniasis visceral.

Por otro lado, algunos investigadores (Pearson et al. 1982, Zilberstein y Dawyer 1984; Doyle y Weinbach 1989) mencionan que drogas tricíclicas neurolépticas como la clomipramina y la clorpromazina tienen actividad inhibitoria contra tripanosomas y leishmanias.

Actualmente las drogas disponibles para el tratamiento de la mayoría de las enfermedades están lejos de la perfección. Muchas de estas son altamente tóxicas y tienen numerosos efectos secundarios, por lo tanto drogas más efectivas y seguras se están necesitando urgentemente (Verlinde et al. 1994).

## II. ANTECEDENTES

Zilberstein et al. (1990) ha sugerido a los compuestos tricíclicos como drogas potenciales anti-leishmaniales con base en los estudios realizados sobre el efecto de las drogas tricíclicas en algunas funciones celulares de promastigotes de *Leishmania donovani*, en donde reportan que la imipramina, la clomipramina y la clorpromacina disminuyen el potencial membranal en éstos, habiendo una correlación directa entre la inhibición del transporte membranal de prolina y la medida del potencial de membrana a varias concentraciones de la droga.

Pearson et al. (1982) reportaron que las fenotiazinas, las cuales son muy utilizadas por sus efectos antipsicótico y ansiolítico, tienen efectos protozoocidas sobre el patógeno humano *Leishmania donovani* que es el agente causal de la leishmaniasis visceral.

Por otro lado, algunos investigadores (Pearson et al. 1982, Zilberstein y Dawyer 1984; Doyle y Weinbach 1989) mencionan que drogas tricíclicas neurolépticas como la clomipramina y la clorpromazina tienen actividad inhibitoria contra tripanosomas y leishmanias.



También se ha determinado que algunos derivados de la fenotiazina actúan específicamente contra la tripanotión reductasa de los tripanosomátidos como *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei*, *Critihidia fasciculata* y *Leishmania donovani* (Chan et al. 1998).

Walsh et al. (1991) mencionaron que las diferencias bioquímicas del humano y los tripanosomátidos identifican al tripanotión como único camino para un posible "blanco". Esta vía incluye la enzima tripanotión reductasa del parásito que es el análogo de la glutatión reductasa del huésped.

### **III. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Entamoeba histolytica***

La *Entamoeba histolytica* es el agente etiológico de la amibiasis (Romero 1993). La Organización Mundial de la Salud estima que entre 400 y 500 millones de personas, en todo el planeta, están infectadas de amibiasis invasiva. Esta última, tanto en su forma intestinal como extraintestinal es responsable de 11,000 a 40,000 muertes por año (Navarro y Reyes 2002).

La amibiasis es considerada la tercera causa de muerte en humanos provocada por parásitos después de la malaria y la esquistosomiasis (Walsh 1986). Es una enfermedad cosmopolita cuya incidencia es mayor en países en vías de desarrollo, donde las condiciones de salubridad inadecuadas, junto con la pobreza y la ignorancia se combinan para sostener una alta incidencia de amibiasis invasiva en niños y de abscesos hepáticos en adultos. Ambas formas de amibiasis pueden ser fatales si no existe un diagnóstico rápido y un tratamiento adecuado (Martínez-Palomo, 1982).

En las últimas dos décadas han surgido un gran número de investigaciones sobre la amibiasis debido a la necesidad de estudiar los aspectos básicos de la biología del parásito y, por otro lado, los avances de la biología molecular ocurridos en las últimas décadas ofrecen una alternativa valiosa para estudiar diversos aspectos de la fisiología amibiana.

#### **III.1 Síntomas y reconocimiento de la enfermedad**

La amibiasis varía desde un malestar leve y diarrea con sangre y moco, alternando con períodos de estreñimiento o remisión hasta una disentería aguda y fulminante, con fiebre, escalofríos y diarrea mucosanguinolenta (disentería amibiana). En la pared del intestino grueso de los enfermos de

disentería intermitente o colitis prolongada pueden presentarse granulomas amibianos (amebomas) que se pueden confundir con cáncer en el colon. Puede ocurrir diseminación de los parásitos a través del torrente sanguíneo y ocasionar abscesos hepáticos que se manifiestan con fiebre intensa, dolor en la espalda y abdomen, y crecimiento del hígado.

El reconocimiento de la enfermedad se hace mediante la demostración en el examen de heces en fresco, con el microscopio de luz de los trofozoítos del parásito. Se debe recurrir a un especialista para poder diferenciar una *E. histolytica* de una *E. dispar*. Para el absceso hepático se recurre a la radiología, la ultrasonografía y pruebas serológicas (Navarro y Reyes 2002).

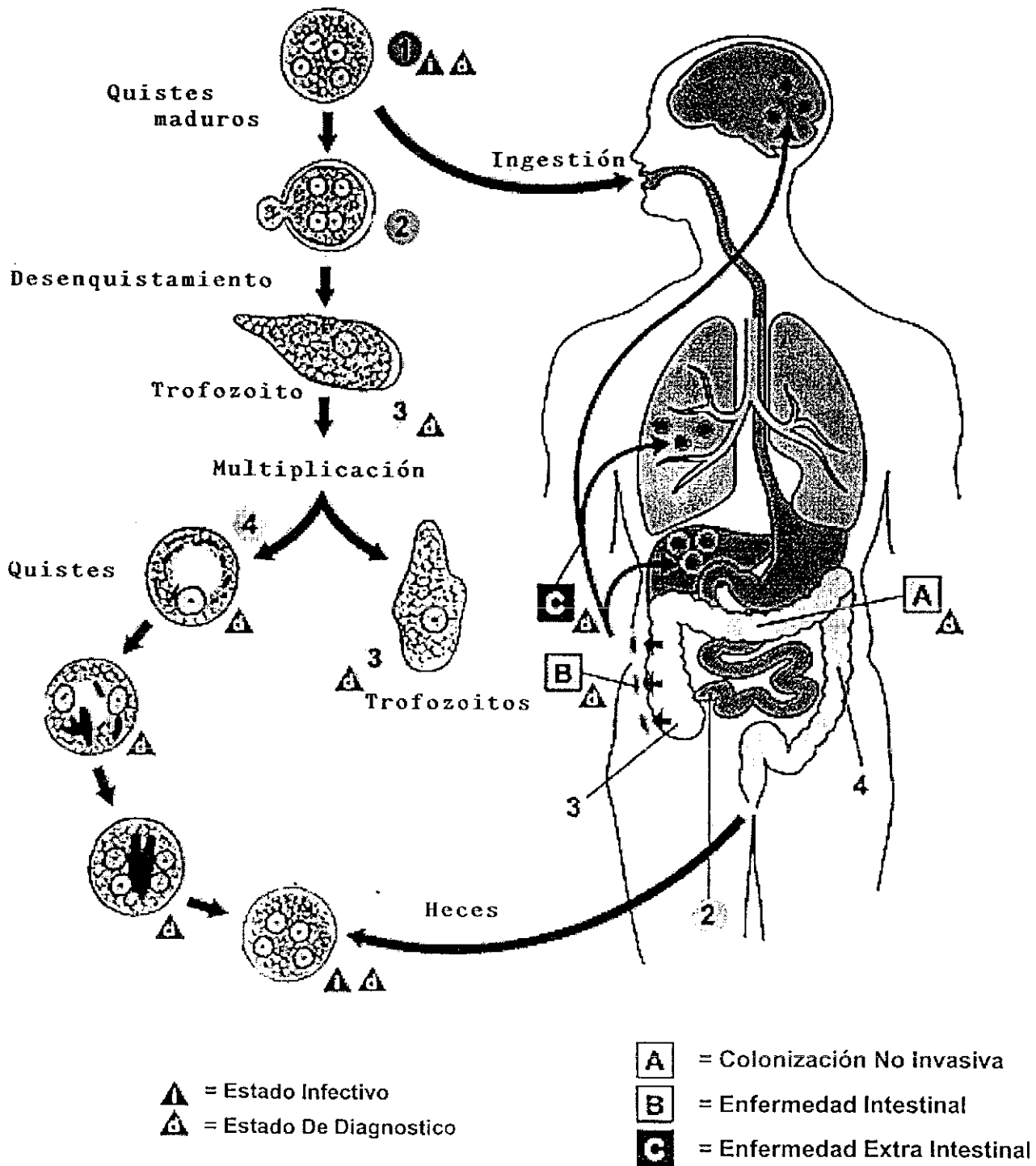
### III.2 Ciclo de vida

El único análisis detallado sobre el ciclo de vida de *E. histolytica* en el ser humano fué llevado a cabo por Dobell en 1928 mediante cultivos en una cepa amibiana de un mono en donde menciona que *E. histolytica* es un organismo microaeróbico. El tamaño de los trofozoitos varia de 10 a 60  $\mu\text{m}$  dependiendo de la cepa y estadio de desarrollo. El ciclo de vida de *E. histolytica* comprende cuatro estadios consecutivos: metaquiste, estadio intermedio entre el quiste y el trofozoíto; prequiste, estadio intermedio entre el trofozoíto y el quiste; trofozoítos, forma móvil, metabólicamente activa y replicativa; quiste, forma inmóvil y de resistencia.

La infección por *E. histolytica* se produce por ingestión de quistes maduros. Estos descienden a través del tubo digestivo hasta el intestino, donde previo al contacto con los jugos gástricos se inicia el proceso de desenquistamiento; esto es, la pared quitinosa de resistencia se reblandece, los núcleos se duplican a ocho y, finalmente, se liberan pequeñas formas del trofozoíto

# CICLO DE VIDA

FIGURA 1



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

llamadas amébulas metaquísticas que dan origen a trofozoítos maduros y que se multiplican por fisión binaria. El establecimiento o colonización de los trofozoítos se da en el intestino grueso (colon) y ataca al epitelio intestinal produciendo lesiones ulcerativas o penetran al hígado (abscesos hepáticos) u otros órganos. Cuando las condiciones de su ambiente no son favorables, los trofozoítos pasan a la fase de prequiste, el núcleo se divide en dos y luego en cuatro, quedando al final del ciclo un quiste maduro tetranucleado, que es expulsado al exterior con las heces. Los quistes inmaduros tienen la posibilidad de madurar en el ambiente externo y llegar a ser infecciosos. Los quistes sobreviven en suelo húmedo durante una semana si la temperatura fluctúa entre 28 y 34°C. Mueren por ebullición, sequedad, exposición a la luz solar y calor. El ciclo se reinicia cuando una persona ingiere agua o alimentos contaminados con quistes amibianos (Cohen y Sadum 1976; Youmans et al. 1982; Romero 1993) (Fig. 1)

### **III.3 Generalidades sobre la Estructura Celular y Bioquímica**

La *Entamoeba histolytica* es un organismo eucariote atípico. La organización submicroscópica del citoplasma está caracterizada por la ausencia de la mayoría de los organelos diferenciados y componentes citoplasmáticos localizados en células eucariotas típicas como son: un citoesqueleto estructurado, un sistema membranoso equivalente al retículo endoplásmico (RE) y un aparato de Golgi (AG), mitocondrias y peroxisomas.

Además estudios ultraestructurales realizados en *Entamoeba* sp. revelaron la ausencia de ribosomas libres o unidos a membranas; más bien parecen estar organizados en arreglos helicoidales, frecuentemente asociados a vacuolas digestivas y cisternas membranosas.

Por lo tanto, el citoplasma de *E. histolytica* carece de los componentes característicos del sistema de tráfico y exportación de proteínas en células eucariotas o, en el mejor de los casos, estos componentes están pobremente desarrollados.

Sin embargo, está bien documentado que ciertos productos amibianos son liberados hacia el ambiente extracelular. Por ejemplo: la fosfatasa ácida (Agrawal et al. 1989), la cisteína-proteasa (McKerrow et al. 1993), las proteínas formadoras de poros (Lynch et al. 1985), la Beta-D-glucosaminidasa (Warries et al. 1983) y la colagenasa (Muñoz et al. 1991). Algunas de las características metabólicas de *E. histolytica* son: ausencia de citocromos y ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ausencia de una vía biosintética del glutatión, falta de regulación alostérica de la glicólisis, glicógeno como fuente de energía, enzimas digestivas asociadas a membrana y piruvato citoplásmico: ferredoxina oxidorreductasa/ ferredoxina. Algunas enzimas involucradas en la degradación de la glucosa dependen del pirofosfato (Saavedra y Pérez 1996).

### III.4 Organización Genética

Existen estudios moleculares que indican que la cromatina de *Entamoeba histolytica* está organizada en partículas parecidas a nucleosomas (Torres-Guerrero et al. 1991). El DNA está organizado en 31-35 cromosomas de tamaños entre 0.3 y 2.2 Mb con una haploidía de  $\leq 20$  megabases (Willhoeft y Tannich 1999). Los RNAs ribosomales están codificados en secuencias extracromosomales circulares de 24.5 Kb, de las cuales existen aproximadamente 200 copias por célula y las evidencias sugieren que estas moléculas se replican de manera autónoma (Bhattacharya et al. 1989; Hubber et al. 1989).

### **III.5 Mecanismos de invasividad**

La adhesión de microorganismos patógenos a las células "blanco" es un evento importante para el establecimiento, colonización e invasión del tejido huésped (Rodríguez et al. 1994). En *E. histolytica* la adhesión de los trofozoítos a la célula blanco es un paso precedente a la fagocitosis y lisis celular (Ravdin 1986). La adhesión del parásito a la célula blanco se lleva a cabo por glicoproteínas específicas (adhesinas) como la lectina afín a galactosa (Gal) y N-acetilgalactosamina (Gal-Nac) presentes exclusivamente en la superficie del trofozoíto (Ravdin 1986; Rodríguez 1994). La secreción de mediadores líticos incluyendo proteasas (Luaces y Barret 1988; McKerrow et al. 1993; Tannich et al. 1991) fosfolipasas (Ravdin 1986) y amibaporo (Leippe 1992; Leippe et al. 1992), entre otros, lesionan directamente a los tejidos, permitiendo el acceso de los parásitos a la circulación mesentérica y con ello su diseminación en el organismo (Carrero and Laclette 1996).

## **IV. TERAPIA ACTUAL PARA LA AMIBIASIS**

La elección de una droga para el tratamiento de la amibiasis depende de la localización de la infección, por ejemplo, intestinal y extraintestinal. Así las drogas usadas para su tratamiento están divididas en aquellas con acción luminal, sistémica y mixta. Se puede notar que su mecanismo de acción es conocido en pocos casos. (Saavedra-Lira y Pérez 1996)

### **III.5 Mecanismos de invasividad**

La adhesión de microorganismos patógenos a las células "blanco" es un evento importante para el establecimiento, colonización e invasión del tejido huésped (Rodríguez et al. 1994). En *E. histolytica* la adhesión de los trofozoítos a la célula blanco es un paso precedente a la fagocitosis y lisis celular (Ravdin 1986). La adhesión del parásito a la célula blanco se lleva a cabo por glicoproteínas específicas (adhesinas) como la lectina afín a galactosa (Gal) y N-acetilgalactosamina (Gal-Nac) presentes exclusivamente en la superficie del trofozoíto (Ravdin 1986; Rodríguez 1994). La secreción de mediadores líticos incluyendo proteasas (Luaces y Barret 1988; McKerrow et al. 1993; Tannich et al. 1991) fosfolipasas (Ravdin 1986) y amibaporo (Leippe 1992; Leippe et al. 1992), entre otros, lesionan directamente a los tejidos, permitiendo el acceso de los parásitos a la circulación mesentérica y con ello su diseminación en el organismo (Carrero and Laclette 1996).

## **IV. TERAPIA ACTUAL PARA LA AMIBIASIS**

La elección de una droga para el tratamiento de la amibiasis depende de la localización de la infección, por ejemplo, intestinal y extraintestinal. Así las drogas usadas para su tratamiento están divididas en aquellas con acción luminal, sistémica y mixta. Se puede notar que su mecanismo de acción es conocido en pocos casos. (Saavedra-Lira y Pérez 1996)



#### IV.1 Agentes lumbinales

Una propiedad común de estos compuestos es su baja absorción por el intestino. Son usados para infecciones intestinales en las cuales no ha habido daño tisular. Estas drogas incluyen al furoato de diloxamide (Furamida), el grupo de halogenados 8-hidroxiquinolinas como diiodohydroxiquin (Iodoquinol) y iodochlorohydroxyquin (Clioquinol o Enterovioformo). Las últimas dos drogas tienen un importante efecto tóxico subagudo conocido como neuropatía por mielitis óptica. (Saavedra-Lira y Pérez 1996)

La paramomicina (Humatin) es un antibiótico aislado de *Streptomyces rizomus*. Su efecto amebicida es local. Se administra por vía oral y su absorción es casi nula. Se concentra principalmente en la luz del intestino es efectiva en la amibiasis intestinal, tanto en su forma aguda como crónica, pero no en la extraintestinal. (Perches et al. 1973)

La dosis recomendada es de 25 a 35 mg/Kg por día por vía oral en tres tomas divididas en las comidas durante 5 a 10 días. Después de la administración oral poca droga se absorbe dentro de la circulación sistémica. Los efectos secundarios se limitan principalmente a molestias gastrointestinales y diarreas durante el curso del tratamiento. También es útil en el tratamiento de infecciones por diversas tenias o lombrices. (Goodman et al. 1982)

En investigaciones recientes se propone el uso de la paramomicina en la terapia de leishmaniasis visceral (Thakur et al. 200), la tuberculosis (Donald et al. 2000) y giardiasis (Gardner y Hill 2001).

El estereato de eritromicina tiene acción local sobre las formas vegetativas de *Entamoeba histolytica*. Se administra por vía oral y su absorción es mínima, por lo que alcanza altas concentraciones en la luz intestinal. Es efectiva contra la amibiasis intestinal y no tiene efecto alguno en las formas extraintestinales. La eritromicina inhibe la síntesis de las proteínas sin la modificación de la síntesis de los ácidos nucleicos. Es producida por el *Streptomyces erythraeus*. La eritromicina oral se absorbe fácilmente, rápida y de manera confiable, se difunde a la mayoría de los líquidos del organismo, se excreta por la bilis, el 5 % de la dosis administrada. Cruza la barrera placentaria pero la concentración fetal es baja. Se contraindica cuando hay insuficiencia hepática o hipersensibilidad a la eritromicina. Los efectos secundarios reportados pueden ser: náuseas, vómito, malestar epigástrico, diarrea y se han reportado casos de pancreatitis aguda leve reversible. (Diccionario de Especialidades Farmacéuticas 1999)

#### **IV.2 Agentes sistémicos**

Esta categoría incluye la emetina, la cual fue usada en medicina natural como la raíz de la planta Ipecacuana. La emetina tiene acción letal directa sobre la *Entamoeba histolytica*, es mucho más efectiva contra las formas móviles que contra los quistes. Bloquea la síntesis de proteínas en el trofozoíto inhibiendo la translocación del peptidil tRNA transferasa en el ribosoma, del sitio aminoacil (donador) al sitio peptidil (aceptor) (Samuelson et al. 1992). La administración oral produce considerable irritación del tracto gastrointestinal, por lo tanto, la droga no debe administrarse por esta vía. Esta droga se distribuye en varios órganos pero se concentra mayormente en el hígado y tiene severos efectos adversos sobre el sistema cardiovascular (Saavedra-Lira y Pérez 1996). La prolongada persistencia del alcaloide en el organismo es la base de su toxicidad acumulativa. Los efectos

gastrointestinales incluyen diarrea, náuseas y vómito. Los efectos musculares consisten en debilidad, dolores, hipersensibilidad y rigidez de los músculos esqueléticos. Los efectos tóxicos más importantes de la emetina se relacionan con el sistema cardiovascular e incluyen hipotensión, dolor precordial, taquicardia y disnea. (Goodman et al. 1982)

Clorhidrato de emetina. Su acción amebicida es general sobre la amibiasis vegetativa de las amibas. En el parásito provoca degeneración del núcleo y variadas alteraciones en el citoplasma (Treviño-García et al. 1971). Al parecer parte de su efecto se debe a que interfiere sobre la síntesis proteínica de la amiba. Las manifestaciones sistémicas pueden aparecer en los aparatos digestivo, músculo-esquelético y cardiovascular, siendo éste el que mayor peligro representa por lo que la droga se debe suspender si se llega a desarrollar hipotensión arterial o taquicardia (Perches et al. 1973)

Dehidroemetina. Esta forma es idéntica a la emetina, con excepción de que no contiene átomos de hidrógeno en las posiciones 2 y 3. Permanece menos tiempo en los tejidos que la emetina y desaparece más rápido del corazón que del hígado, de ahí su menor toxicidad. También está contraindicada en cardiópatas y en sujetos con enfermedad renal. (Perches et al. 1973)

La cloroquina (Aralene) es otro compuesto cuya mayor acción está en el hígado porque se concentra en este órgano. Pertenece a una serie de compuestos llamados 4-aminoquinoleínas, estudiadas con relación al tratamiento del paludismo. Su acción es general sobre las formas vegetativas de la amiba. Se administra por vía oral y se absorbe casi por completo del tracto gastrointestinal. Se deposita en los tejidos en cantidades considerables. En los animales se ha encontrado que se deposita en el

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

hígado, bazo, riñones, pulmones, cerebro y médula espinal, así como en los leucocitos. (Thompson 1970)

Los efectos secundarios producidos por la cloroquina son: cefalea leve y transitoria, perturbaciones visuales, molestias gastrointestinales y prurito, y desaparecen cuando la droga deja de ser administrada. Debido a la elevada concentración que se produce en el hígado, la cloroquina debe usarse con cuidado en presencia de enfermedades hepáticas y/o en presencia de severas alteraciones gastrointestinales, neurológicas o sanguíneas (Goodman et al. 1982).

### **IV.3 Agentes mixtos**

Los derivados del nitroimidazol usados más frecuentemente en la terapia de la amibiasis son el tinidazol, ornidazol y metronidazol. El metronidazol es usado muy a menudo ya que es considerado como luminal y sistémico. Estos compuestos tienen actividad citotóxica cuando su grupo nitro está reducido a radicales nitro o a aniones superóxido. La activación intermedia del metronidazol aparentemente tiene su efecto por alteración de la estructura helicoidal del ADN cuando interactúa con guaninas y citocinas. (Saavedra-Lira y Pérez1996)

El metronidazol es un derivado del 2-nitroimidazol. Su acción es a nivel de la luz intestinal en las células intestinales y sobre las formas de la amibiasis extraintestinal. Los estudios *in vitro* han demostrado que el metronidazol a la concentración de un microgramo por mililitro durante 20 hrs, provoca en los trofozoítos disminución en su número, tamaño y movilidad. Por otra parte, cuando la dosis *in vitro* ha sido de 10 microgramos por mililitro es altamente amebicida. Se administra por vía oral, se absorbe por el tracto

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

gastrointestinal y se excreta por la orina. Se han llegado a encontrar pequeñas cantidades en la saliva y en la leche materna. (Perches et al. 1973)

La vida media del metronidazol en el plasma es de 8 horas aproximadamente, los efectos secundarios son rara vez lo bastante severos como para requerir la suspensión de la droga. Los más comunes se experimentan en el tracto gastrointestinal, en particular náuseas, anorexia, diarrea, molestias epigástricas, cólicos abdominales y ocasionalmente cefalea y vómitos, además de un sabor metálico y desagradable; se han observado efectos neurotóxicos producidos por el metronidazol como mareos, vértigo y muy rara vez incoordinación y ataxia; ocasionalmente se presenta hipoestesia o parestesia de una extremidad. La reversión de neuropatías serias puede ser lenta o incompleta. Urticaria, rubor, prurito, disuria, cistitis, sensación de presión pelviana y sequedad bucal, vaginal o vulvar también se han detectado. Aunque el metronidazol se ha administrado sin efectos adversos aparentes durante todas las etapas del embarazo, su uso en el primer semestre de éste se considera contraindicado (Goodman et al. 1982). La dosis propuesta para el tratamiento de la amibiasis es de 500 a 750 mg cada 8 horas de 5 a 10 días (Diccionario de Especialidades Farmacéuticas 1999).

En protistas anaerobios, la ferredoxina reducida por la acción del piruvato, puede actuar como donador de electrones al grupo de los nitroimidazoles, diversificándolos por la vía de la producción de energía (Müller 1988). El oxígeno es un competidor fuerte del metronidazol como un aceptor de electrones. No hay reducción de la droga en su presencia, por lo tanto, el compuesto es más efectivo contra los protistas anaeróbicos y bacterias tales como *Trichomonas* y *Giardia*. (Müller 1986)

## V. JUSTIFICACION

Todos los organismos requieren defensas contra el estrés oxidativo causado por las reacciones del oxígeno aumentadas por el metabolismo celular en un medio aeróbico. Entre esas defensas importantes están los tioles de bajo peso molecular como el glutatión y asociado a enzimas cíclicas como la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa (Meister y Anderson 1983). En contraste a los protozoarios aeróbicos mitocondriales como los tripanosomatidos o *Plasmodium* (Fairlamb 1989), los protozoarios amitocondriales como *Entamoeba histolytica*, *Giardia* y *Tricomonas* aparentemente carecen del metabolismo del glutatión (Fahey et al. 1984; Brown et al. 1998) y en su lugar contienen cisteína como su principal tiol de bajo peso molecular (McLaughlin y Aley 1985; Brown et al. 1993). Sin embargo, Ondarza et al. en 1997 declaran haber detectado tripanotión en trofozoítos de *E. histolytica*, un metabolito oxidoreductor encontrado unicamente en tripanosomatidos (Fairlamb et al. 1985; Fairlamb y Cerami 1992). Por lo tanto, la presencia de tripanotión en *E. histolytica* se hace interesante en términos de la posible función de este compuesto como un sistema antioxidante, porque este parásito es microaerofílico ya que tolera hasta un 5 % de oxígeno.

En 1999a, Ondarza et al. detectaron la presencia de la enzima tripanotión sintetasa en trofozoítos de *E. Histolytica* HK9, la cual a partir de los precursores glutatión y espermidina con ATP como donador de energía, puede sintetizar *in vitro* al tripanotión.

Por otro lado, Ondarza et al. (1999b) también demostraron que los trofozoítos de *E. histolytica* no pueden sintetizar tripanotión cuando se le suprime del medio de cultivo el glutatión por medio de la gamma glutamil

transpeptidasa, notándose que los trofozoitos pueden sobrevivir por algunas generaciones pero se dividen a una tasa 25% más baja que en condiciones normales.

La presencia de glutatión espermidina y tripanotión, así como la tripanotión sintetasa y una tripanotión reductasa putativa, que ha sido detectada por PCR (Ondarza et al. 1999b), abre la posibilidad de una relación entre *E. histolytica* y los tripanosomátidos.

En esta investigación se trata de demostrar si las drogas derivadas de la fenotiacina, las cuales inhiben a la tripanotión reductasa de los tripanosomátidos, también podrían tener un efecto in vivo sobre el crecimiento de los trofozoitos de *E. histolytica*.

Lo anterior sugiere la posibilidad de extender el uso de las drogas derivadas de la fenotiacina contra la amibiasis.

## VI. OBJETIVOS

- Determinar la inhibición en la proliferación de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HK9 y HM1 por drogas derivadas de la fenotiacina sintetizadas selectivamente contra la tripanotión reductasa.
- Medir el efecto de la inhibición sobre la proliferación celular de *Entamoeba histolytica* HK9 y HM1 por drogas tricíclicas neurolépticas.
- Comparar el efecto de inhibición en la proliferación celular de los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* con el metronidazol, droga usada clínicamente contra la amibiasis.

transpeptidasa, notándose que los trofozoitos pueden sobrevivir por algunas generaciones pero se dividen a una tasa 25% más baja que en condiciones normales.

La presencia de glutatión espermidina y tripanotión, así como la tripanotión sintetasa y una tripanotión reductasa putativa, que ha sido detectada por PCR (Ondarza et al. 1999b), abre la posibilidad de una relación entre *E. histolytica* y los tripanosomátidos.

En esta investigación se trata de demostrar si las drogas derivadas de la fenotiacina, las cuales inhiben a la tripanotión reductasa de los tripanosomátidos, también podrían tener un efecto in vivo sobre el crecimiento de los trofozoitos de *E. histolytica*.

Lo anterior sugiere la posibilidad de extender el uso de las drogas derivadas de la fenotiacina contra la amibiasis.

## VI. OBJETIVOS

- Determinar la inhibición en la proliferación de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HK9 y HM1 por drogas derivadas de la fenotiacina sintetizadas selectivamente contra la tripanotión reductasa.
- Medir el efecto de la inhibición sobre la proliferación celular de *Entamoeba histolytica* HK9 y HM1 por drogas tricíclicas neurolépticas.
- Comparar el efecto de inhibición en la proliferación celular de los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* con el metronidazol, droga usada clínicamente contra la amibiasis.



## **VII. MATERIAL Y METODOS**

### **VII.1 Cultivos Celulares**

Los trofozoítos de las cepas de *Entamoeba histolytica* HK9 y HM1:IMSS (donadas por el Dr. Alejandro Alagón del Instituto de Biotecnología, UNAM.) se cultivaron en medio axénico BI-S-33 de acuerdo con Diamond et al. (1978) a una temperatura de 37°C en matraces de 250 ml. con un volumen de 100 ml. de medio; o en tubos de 15 ml. con un volumen de 10 ml. de medio o en cajas Costar de 96 pozos con 200 µl de medio, dependiendo del tipo de experimento.

### **VII.2 Medio de cultivo de *Entamoeba histolytica***

El medio de cultivo para *Entamoeba histolytica* HK9 y HM1 se preparó de acuerdo con Diamond et al. (1978) BI-S-33 con los siguientes reactivos: Peptona de Biotriptasa 3.65%, Dextrosa 1.21%, Na Cl 1.243%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.073%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.121%, L-Cisteína hidrociorada 0.121%, Acido ascórbico 0.024%, Citrato de amonio férrico 0.0057% con un pH 6.8. Después de esterilizar se adiciona 15% de suero de ternera (inactivado), 3% de vitaminas Tween 80 y 0.02% de antibiotico penicilina/estreptomina.

### **VII.3 Medio de cultivo de *Crithidia luciliae***

Para la elaboración de este cultivo se prepararon dos fases; la fase acuosa con Na Cl 0.85% pH 7.2-7.4 y la fase sólida con infusión cerebro corazón 3.7%, dextrosa 1.0%, y agar 2.3%. Estas dos fases se esterilizaron por separado, para posteriormente unir las y preparar el medio con 3% de suero

fetal bovino inactivado. Tanto los organismos como el método de preparación del medio fueron proporcionados por el Dr. Víctor Monteón Padilla del Instituto Nacional de Cancerología, Méx. D.F.

#### **VII.4 Medio de cultivo de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi***

Fue preparado en el laboratorio de la Dra. Ramsey en el Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas INSP con los siguientes reactivos: Glucosa 0.2%, Bacto triptasa 1.5%, Extracto de hígado 0.5%, Hemina 0.002% y complementado con Suero Fetal de Bovino (inactivado) 10.0%. (Lambrecht 1966)

#### **VII. 5 Prueba de viabilidad celular por Exclusión con azul de tripano**

Para evaluar el efecto de las drogas sobre la viabilidad de los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HK9, se utilizó la técnica de azul de tripano al 5 % (Usubel 1989) disuelto en buffer PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 mM). El azul de tripano tiene gran afinidad por proteínas séricas y celulares.

Las células se centrifugaron a 1000 rpm. durante 10 min., el concentrado celular se resuspendió en 1 ml. de buffer PBS, de esta muestra se tomaron 100 µl y se añadieron 100 µl de azul de tripano al 5%, dejándose reaccionar de 5-15 min. Para posteriormente observar las células al microscopio. La cantidad de células viables y no viables (teñidas de azul) se contaron con un hematocitómetro usando un microscopio binocular.

Para este ensayo se utilizaron tubos de 15 ml. con 10 ml. de medio de cultivo con trofozoitos tratados con los diferentes derivados de la fenotiacina y

compuestos tricíclicos a concentraciones de 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ . Las drogas fueron añadidas al medio desde el inicio de la incubación, dejándolas actuar por 24 y 48 hrs.

### **VII.6 Análisis Fluorométrico para la cuantificación de trofozoítos de amibas**

Para medir la proliferación de trofozoítos por medio del ensayo fluorométrico, se incubaron células de *Entamoeba histolytica* de cepas HK9 y HM1 en fase logarítmica. Para cosechar los trofozoítos, los tubos se enfriaron durante 10 min. en hielo, las amibas se suspendieron y se centrifugaron durante 5 min. a 1500 rpm., se retiró el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 1ml. de medio BI-S-33.

Los trofozoítos fueron contados en un hematocitómetro y se incubaron 500 trofozoítos por pozo en un volumen de 200  $\mu\text{l}$ . de medio BI-S-33 en una placa de cultivo de 96 pozos. Se agregaron las drogas metronidazol, clomipramina, OFK008 y KD005 a las concentraciones de 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10 y 5  $\mu\text{M}$ , (a partir de una solución stock 2 mM) por cuadruplicado, las placas se incubaron a 37°C en una cámara anaeróbica. Las cuantificaciones se realizaron a las 24, 48 y 72 hrs., una placa cada 24 hrs.. El medio se reemplazó cuando las placas no eran cuantificadas, aspirando con un capilar cada 24 hrs., manteniendo la concentración de las drogas.

Al terminar el tiempo de cada experimento se aspiró el medio de los pozos con un capilar, añadiéndose 200  $\mu\text{l}$  de amortiguador permeabilizante (de lisis) con 1.5  $\mu\text{M}$  del reactivo Sytox Green dejándolo reaccionar durante 15 min. Posteriormente se midió la cantidad de DNA que se encontraba en el fondo del pozo.

El reactivo se intercala con los deoxyribonucleótidos de DNA después de que las células se han lisado. El reactivo es excitado a 485 nm y la emisión se midió a 523 nm usando un citofluorómetro 2300. Aproximadamente 1500 unidades de fluorescencia corresponden a  $3 \times 10^4$  células.

Los controles fueron 200  $\mu$ l de medio de cultivo BI-S-33 (Diamond et al.) a 37°C, medidos a las 24, 48 y 72 hrs., conteniendo 500 trofozoítos al inicio del ensayo. Los experimentos con las drogas fueron bajo las mismas condiciones que los controles.

Por medio de este ensayo se midió la cantidad de ADN en placas de 96 pozos, con el reactivo Sytox Green, el cual tiene las propiedades de no atravesar las membranas de células vivas; se intercala solo con ácidos nucleicos. La fluorescencia se midió en un citofluorómetro a una excitación de 485 nm y con una emisión de 523 nm. Debido a que el medio de amiba BI-S-33 tiene una altísima fluorescencia intrínseca, es necesario lavar las amibas con buffer PBS con un capilar para posteriormente añadir el buffer de lisis (tris HCl 100 mM pH 7.4, NaCl 154 mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM, NP40 0.1%) suplementado con 0.5  $\mu$ M de Sytox Green, para cuantificar sólo las amibas pegadas a los pozos. Normalmente se pueden cuantificar desde 1,000 hasta aproximadamente entre 12,000 y 16,000 células (lo que supone amibas a una concentración entre 60,000 y 90,000 células por mililitro, es decir, en fase logarítmica de crecimiento). La técnica, los reactivos y el citofluorómetro fueron proporcionados en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón, bajo la dirección del MC. Alejandro Olvera del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

## VIII. DROGAS

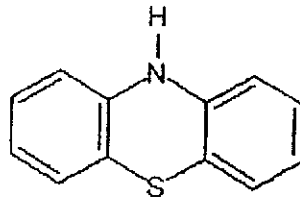
En este proyecto se utilizaron 5 drogas tricíclico neurolépticas derivadas de la fenotiacina: Clorpromacina HCl (KD001), Clomipramina HCl (KD002), Doxiciclina succinato (KDOO3), Triflupromacina HCl (KDOO4), Diphenydramina HCl (KDOO5) y el Metronidazol, que se emplea contra la amibiasis.

También se utilizaron 5 drogas sintetizadas como inhibidores selectivos de la tripanotión reductasa (OFK001, OFK006, OFK008, OFK027 y OFK043) por el Dr. Omar Faruk Khan en el laboratorio del Dr. Douglas en la Universidad de Manchester.

Todas estas drogas fueron obsequiadas por el Dr. K. T. Douglas.

### VIII.1 Drogas derivadas de la fenotiacina

La fenotiacina es la estructura básica de una serie de neurolépticos y antihistamínicos. Estos compuestos también inhiben la colinesterasa sérica. (<http://ourworld.compuserve.com/homepages/JDebordphenot.htm>.1999)



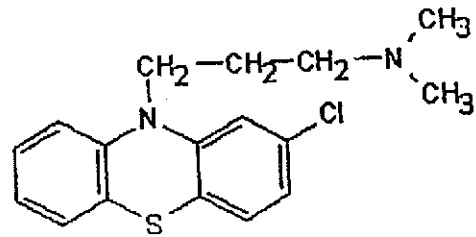
Las fenotiacinas han sido usadas como tranquilizantes, antiespasmódicos, antihistamínicos, antipsicóticos, sedativos, antitusivos, antieméticos, antiprurífticos, atarácnicos, anticolinérgicos, antisépticos urinarios, insecticidas y hasta como antihelmínticos. Las fenotiacinas pueden producir reacciones tóxicas en el hígado, reacciones fotodinámicas anemia hemolítica, calambres abdominales, taquicardia y otros problemas de salud hasta ahora no confirmados.

Los derivados de la fenotiacina usados en terapia son:

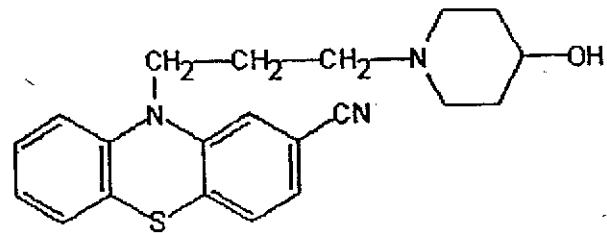
- Las fenotiacinas N-sustituidas
- Las fenotiacinas en las cuales el nitrógeno de la fenotiacina es reemplazado por un carbón etilénico.

Todas estas moléculas tienen una cadena lateral unida a un grupo alifático o alicíclico, el cual es protonado a pH fisiológico. (<http://ourworld.compuserve.com/homepages/JDebordphenot.htm>.1999)

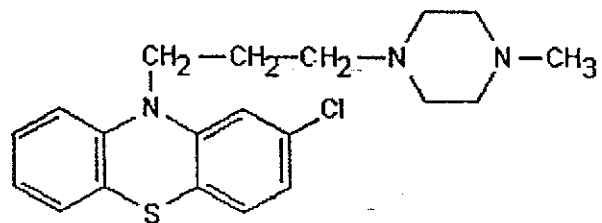
Derivados alifáticos  
Ejemplo: Perociacina



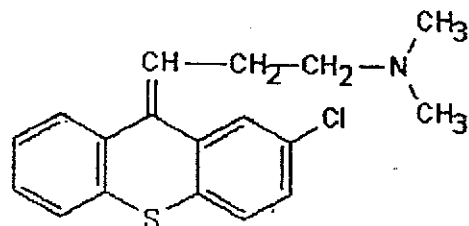
Derivados de la piperidina  
Ejemplo Clorpromacina



Derivado de la Piperazina  
Ejemplo: Proclorperacina



Tioxantenos  
Ejemplo: Clorprotixene

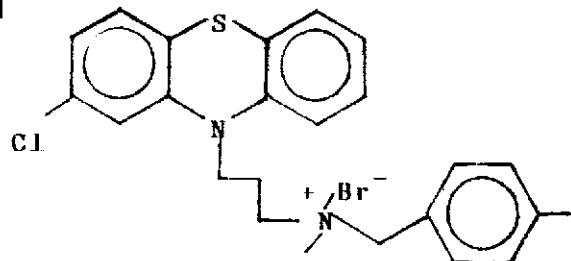


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

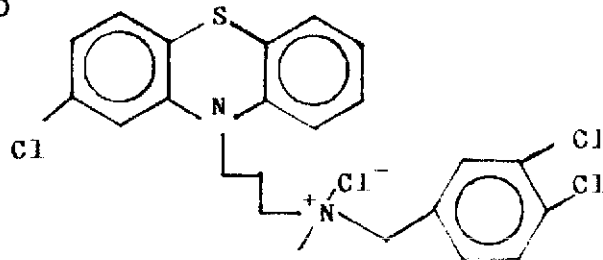
## VIII.2 Drogas diseñadas contra la tripanotión reductasa

Las drogas utilizadas fueron sintetizadas como inhibidores selectivos de la tripanotión reductasa por el Dr. Omar Faruk Khan en el laboratorio del Dr. Douglas, en la Universidad de Manchester. Las formulas de las drogas fueron elaboradas y enviadas por el Dr. Faruk.

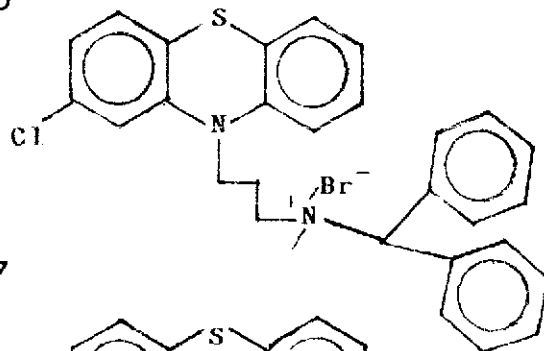
OFK001



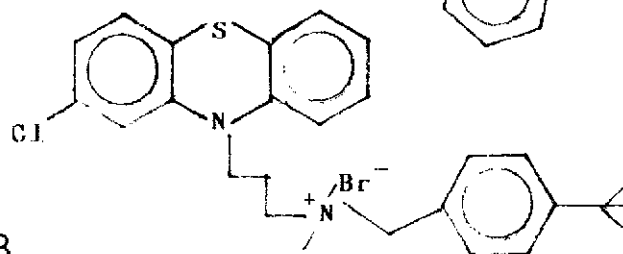
OFK006



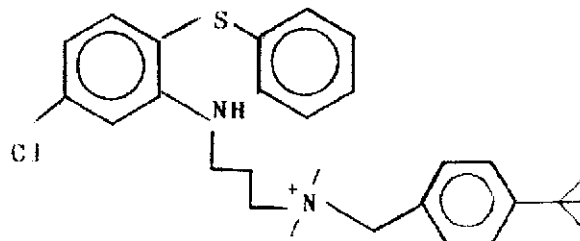
OFK008



OFK027



OFK043

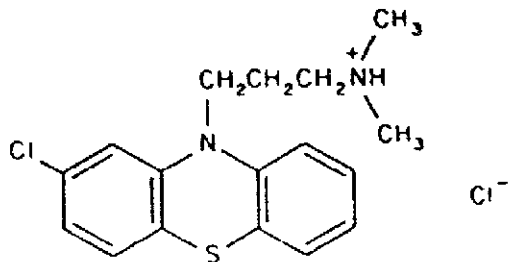


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### VIII.3 Drogas Tricíclico Neurolépticas

#### A. CLORPROMACINA HCl



La clorpromacina fué el primer antipsicótico puesto a la venta y es el prototipo de las fenotiacinas alifáticas. Este agente es usado principalmente para tratar esquizofrenia y otras psicosis o manías; es menos empleado en desórdenes esquizoafectivos o de mayor depresión con características psicóticas, paranoia, alteraciones de comportamiento asociados con retraso mental, náuseas y vómito. Es una de las drogas anti-psicóticas más sedativas. (Drug Evaluation Annual 1991).

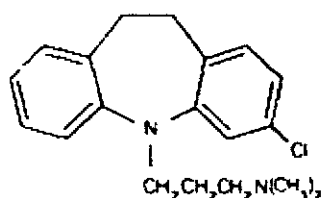
Las fenotiacinas alifáticas como la clorpromacina tienen fuerte actividad bloqueadora adrenérgica alfa y puede causar hipertensión. Además tienen actividad anticolinérgica moderada manifestada ocasionalmente como boca seca, visión borrosa, retención urinaria y constipación. ([http://www.mentalhealth.com/drug/p30\\_c01.html](http://www.mentalhealth.com/drug/p30_c01.html))

También incrementa la secreción de la prolactina debido a su acción bloqueadora del receptor de la dopamina en la pituitaria y el hipotálamo.

Originalmente la clorpromacina es un compuesto empleado para el tratamiento de la psicosis, pero recientemente se ha encontrado que tiene

una amplia actividad antibacterial e inhibe el crecimiento de *Salmonella typhimurium* (Amaral et al. 2000), además presenta propiedades anti-tuberculosis *in vitro* (Amaral et al. 2001) y ha sido probado con relativa frecuencia en el control de ataques epilépticos o producidos por daño cerebral (Pisani et al. 2002)

## B. CLOMIPRAMINA HCl



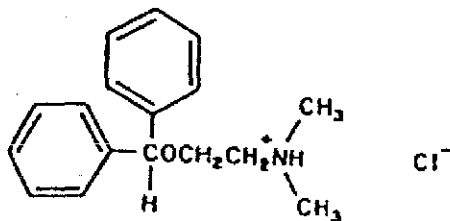
La clomipramina es un antidepresivo tricíclico relacionado con la imipramina; ha sido muy usado como antidepresivo en Europa por muchos años. Algunos estudios demuestran que la imipramina tiene una acción antiobsesional. Es efectiva en el tratamiento de desordenes depresivos, pánico, fobia y desorden compulsivo obsesivo. Las reacciones adversas que se podrían presentar son: Sedación, hipotensión y anomalías cardíacas. (Drug Evaluation Annual 1991)

Es un eficiente inhibidor de la serotonina en células de mamíferos, actúa como desacoplador de la fosforilación oxidativa y a altas concentraciones como inhibidor de la H<sup>+</sup>adenosintrifosfatasa en mitocondrias de mamíferos, también inhibe el transporte de la L-prolina en promastigotes de *Leishmania donovani* y *L. major* (Zilberstein y Dwyer 1984).

Se ha comprobado que también inhibe la motilidad de los epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* dependiendo de la dosis (Barioglio et al. 1987).

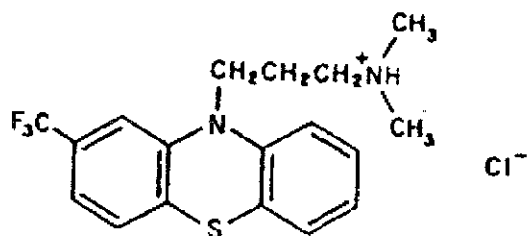
Recientemente se ha demostrado que la clomipramina afecta el ciclo celular de *Candida albicans* a través de la síntesis de ADN (fase S) y las fases de la división celular las cuales están gobernadas por calmodulin y Ca<sup>+</sup>/calmodulin. (Sharma et al. 2001). También ejerce efectos tripanocidas en epimastigotes in vitro con actividad anti-calmodulin. (Rivarola 2001)

### C. DIFENIDRAMINA HCl



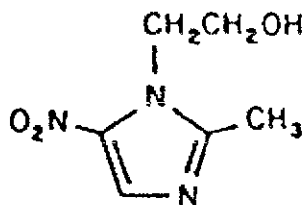
La difenidramina es efectiva en la prevención y tratamiento de vértigo, náuseas y vómito durante el embarazo. Más comúnmente usada como anti-histamina en tratamientos anafilácticos. Aplicada tópicamente (contacto con la piel) puede causar sensibilidad. Esta droga no debe usarse en prematuros ni en recién nacidos (Drug Evaluation Annual 1991)

#### D. TRIFLUOPROMACINA



La trifluopromacina tiene la misma acción que la clorpromacina y es igualmente efectiva. (Drug Evaluation Annual 1991)

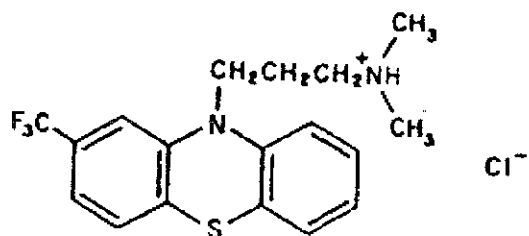
#### IX. METRONIDAZOL



El metronidazol es una droga usada ampliamente para el tratamiento de infecciones causadas por organismos anaeróbicos; tanto para protozoarios, tales como *Trichomonas vaginalis*, la cual provoca flujo vaginal y *Entamoeba histolytica* que causa disenteria amibiana; así como para bacterias, por ejemplo abscesos o necrosis de tejidos causados por *Bacteroides fragilis* y colitis pseudomembranosa inducida por antibióticos (Molecular Mechanisms of Drug Action 1988).

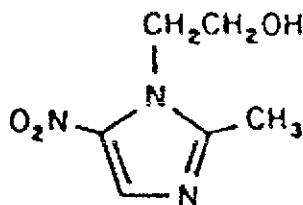
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### D. TRIFLUOPROMACINA



La trifluopromacina tiene la misma acción que la clorpromacina y es igualmente efectiva. (Drug Evaluation Annual 1991)

#### IX. METRONIDAZOL



El metronidazol es una droga usada ampliamente para el tratamiento de infecciones causadas por organismos anaeróbicos; tanto para protozoarios, tales como *Trichomonas vaginalis*, la cual provoca flujo vaginal y *Entamoeba histolytica* que causa disenteria amibiana; así como para bacterias, por ejemplo abscesos o necrosis de tejidos causados por *Bacteroides fragilis* y colitis pseudomembranosa inducida por antibióticos (Molecular Mechanisms of Drug Action 1988).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Es uno de los medicamentos más usados contra Trichomoniasis, Giardiasis y Amibiasis. Sin embargo, debido a sus efectos sobre el ADN es considerado un químico carcinógeno potencial por la Agencia Internacional de Enfermedades de Cáncer. (Cruz-Vega et.al. 1997).

También es usado para tratar una variedad de enfermedades producidas por protozoarios, así como para infecciones causadas por bacterias anaeróbicas. Es una pro-droga que es activada en parásitos trichomonales por un organelo especializado REDOX conocido como hidrogenosoma (Kirkwood 1999)

Nequiz et al. (2000) basado en estudios previos, propone que la asociación del metronidazol con el zinc podría potenciar la actividad antiamebica.

Además de los usos mencionados, actualmente el metronidazol se usa terapéuticamente en el tratamiento de colitis pseudomembranosa, infección producida por *Clostridium difficile*. (Portillo-López et al. 2002)

## X. RESULTADOS

### X.1 Inhibición en la proliferación celular de *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi* y *Crithidia luciliae*

Se realizaron dos tipos de ensayos preliminares, el primero fue probando dos drogas sobre tres parásitos: una droga derivada de la fenotiazina (OFK006) y la otra la clomipramina (KD002) sobre trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HK9, epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y epimastigotes de *Crithidia luciliae*, a una concentración de 100  $\mu$ M. Se determinó esta concentración debido a que no se tenía conocimiento previo del efecto de estas drogas sobre amibas y *Crithidia* ya que solo se habían utilizado como antipsicóticos y antitripanosomales, este experimento ayudó a observar con claridad el efecto sobre estos microorganismos.

En el cultivo de *Entamoeba histolytica* y de *Crithidia luciliae* las drogas fueron añadidas a las 48 hrs de incubación dejandolas reaccionar por un periodo de 12 hrs. En el caso del cultivo de *Trypanosoma cruzi*, las drogas se añadieron a los 7 días de incubación, dejandolas actuar durante 48 hrs.

Se obtuvo como resultado una clara inhibición en la proliferación celular de *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi* y *Crithidia luciliae*. (Tabla 1)

### X.2 Inhibición en la proliferación celular de los trofozoitos *Entamoeba histolytica* HK9 producida por 5 drogas derivadas de la fenotiacina y 5 drogas tricíclico neurolépticas.

Como segundo experimento se incubaron trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HK9 (100 ml.) y se añadieron las 5 drogas, por separado, derivadas de la fenotiacina (OFK001, OFK006, OFK008, OFK027, OFK043) y las 5 drogas tricíclico neurolépticas: Clorpromacina HCl, Clomipramina HCl,

Doxiciclina succinato Trifluopromacina HCl, Difenidramina HCl, a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  para determinar el grado de inhibición en la proliferación celular de los trofozoitos de cada una de las drogas.

Ya que de acuerdo a estudios previos (Ondarza et al. 1999) se ha demostrado que la obtención óptima de compuestos tiales en *Entamoeba histolytica* HK9 es a las 60 hrs. de incubación, durante la fase logarítmica tardía, la droga se añadió a las 48 hrs. de incubación dejandola actuar sobre los trofozoitos durante 12 hrs. Cada uno de los experimentos tuvo un cultivo control al cual no se le añadió ninguna droga. Se obtuvo como resultado que las drogas OFK008, OFK027, OFK043 y la clomipramina produjeron lisis celular y las drogas que tuvieron el mayor efecto sobre la proliferación celular fueron la OFK008 y la clomipramina .(Tabla 2)

### **X.3 Efecto de tres tipos de inhibidores sobre trofozoitos de *E. histolytica***

Con base en los resultados anteriores se probaron las siguientes drogas: OFK008, la cual fue diseñada como un inhibidor de la tripanotión reductasa; la clomipramina la cual es usada como un antidepresivo y el metronidazol que es utilizado comúnmente para el tratamiento de la amibiasis; en cultivos de 100 ml. de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HK9 a las concentraciones de 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{M}$  para determinar el efecto dependiente de la dosis.

En este experimento las drogas fueron añadidas a las 36 hrs de incubación y se dejaron actuar por 24 hrs. Los resultados muestran que las tres drogas tienen un efecto inhibitorio dependiente de la dosis. La droga OFK008 a la concentración de 25  $\mu\text{M}$  disminuye el número de trofozoitos en un 65% con respecto al control, la clomipramina a 25  $\mu\text{M}$  disminuye los trofozoitos en un



61% y el metronidazol a la misma concentración los disminuye en un 84%. Con respecto a la dosis más alta (100  $\mu\text{M}$ ) la droga OFK008 produce una inhibición en la proliferación del 95%, la clomipramina del 95% y el metronidazol a las concentraciones de 75 y 100  $\mu\text{M}$  produce una inhibición total de los trofozoitos, siendo el metronidazol la droga más potente. (Graf. 1).

#### **X.4 Viabilidad de los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HK9**

Para la determinación de la viabilidad de los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HK9, se utilizó la técnica de tinción de azul de tripano, en cultivos de 10 ml de medio BI-S-33. En este experimento se probaron dos drogas derivadas de la fenotiacina (OFK001 y OFK043) y las cinco drogas tricíclico neurolépticas: Clorpromacina HCl, Clomipramina HCl, Doxiciclina succinato, Trifluopromacina HCl, Difenidramina HCl a las concentraciones de 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ . Estas drogas fueron añadidas al inicio de la incubación del cultivo dejandolas actuar durante 24 y 48 hrs.

Se obtuvo como resultado que la clomipramina considerada como el más potente inhibidor *in vitro* de la tripanotión reductasa, produjo una disminución sustancial en el número de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HK9, tanto a las 24 como a las 48 hrs. de incubación. En este caso también se pudo observar que a las 24 hrs. las drogas doxiciclina succinato, trifluopromacina y la difenidramina produjeron lisis celular a todas concentraciones. A las 48 hrs., la lisis celular se observó en los cultivos tratados con las drogas OFK001, OFK043, doxiciclina succinato, trifluopromacina y la difenidramina también a las concentraciones 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$  (Graf. 2 y 3).

### **X.5 Cuantificación del efecto inhibitorio sobre trofozoítos de *Entamoeba histolytica* HK9 y HM1 por medio del Análisis Fluorométrico SYTOX GREEN**

Para observar los efectos de las drogas sobre la proliferación celular en los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* HK9 y HM1, por medio del ensayo fluorométrico con el intercalante Sytox Green, se probaron las drogas metronidazol, clomipramina, difenidramina y el derivado de la fenotiacina OFK008, a cuatro concentraciones 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{M}$  y a tres periodos de tiempo 24, 48 y 72 hrs. en donde las drogas se añadieron al inicio del experimento. Los resultados indican que ambas cepas fueron inhibidas por las cuatro drogas, especialmente por el metronidazol y la clomipramina y en menor grado por la difenidramina y la OFK008. Los experimentos con metronidazol y clomipramina tuvieron que ser repetidos a las concentraciones de 5, 10, 15 y 20  $\mu\text{M}$ , durante 24, 48 y 72 hrs. de incubación, para obtener una mejor relación de la dependencia de la dosis. (Graf. 4A-D y 5A-D)

Una observación importante fue que los trofozoítos de la cepa HK9 crecieron a mayor velocidad que los de la cepa HM1 ya que se obtuvieron 4,200 unidades fluorescentes para HK9 a las 72 hrs de incubación y 3,400 para HM1 al mismo periodo de tiempo. También se observó que los trofozoítos de la cepa HK9 fueron más susceptibles a los efectos inhibitorios del metronidazol y la clomipramina que los de la cepa HM1, siendo esta más resistente, pero no se determinó si esto está relacionado con el grado de virulencia.

Sin embargo, el metronidazol es un inhibidor más efectivo que la clomipramina sobre los trofozoítos de HK9 y HM1 a las concentraciones de 5, 10, 15 y 20  $\mu\text{M}$  durante un periodo de tiempo de 72 hrs. de incubación.

## XI. DISCUSION

Los resultados de los estudios preliminares llevados a cabo con las drogas OFK006 y la clomipramina sobre los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HK9 y los organismos *Trypanosoma cruzi* y *Crithidia luciliae* a una concentración de 100  $\mu$ M, indican que tanto la primera droga, diseñada como inhibidor de la tripanotión reductasa, como la clomipramina, usada como antidepresivo, produce un efecto inhibitorio del 100% en *T. cruzi*; del 41.67% con la OFK006 y del 8.34% con la clomipramina en *C. luciliae*; de 36.9% con OFK006 y 57.7% con la clomipramina sobre *E. histolytica*, en relación con sus normales. Demostrando así que las drogas que tienen un efecto inhibitorio sobre los tripanosomátidos (Chan et al. 1998 y Pearson et al. 1984) también lo tuvieron sobre los trofozoitos de *E. histolytica*.

En la serie de experimentos en donde se probaron tanto las drogas derivadas de la fenotiacina diseñadas para inhibir a la tripanotión reductasa como las cinco drogas tricíclico neurolépticas, sobre los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HK9, se demuestra que todas tuvieron un efecto inhibitorio, siendo éste desde el 28.55% producido por la OFK001 hasta el 96.97% producido por la OFK008 en el primer caso. Con respecto al efecto producido por la drogas tricíclico neurolépticas se observó un efecto inhibitorio desde el 67.59% producido por la clorpromacina hasta un 94.42% producido por la clomipramina. Observándose un claro efecto inhibitorio.

Con las drogas OFK008, clomipramina y metronidazol a diferentes concentraciones se comprobó el efecto inhibitorio dependiente de la dosis.

La viabilidad de los trofozoitos medida con azul de tripano indicó que tres de las cinco drogas tricíclico neurolépticas y las dos derivadas de la fenotiacina produjeron lisis celular a las tres concentraciones tratadas.

Por último en el caso del análisis fluorométrico con el intercalante Sytox Green, muestra que ambas cepas fueron inhibidas por las cuatro drogas utilizadas: el metronidazol, la clomipramina, la difenidramina y el derivado de la fenotiazina OFK008. En donde el metronidazol y la clomipramina fueron las drogas que mayor grado de inhibición tuvieron.

Los trofozoitos de la cepa HK9 son más susceptibles a los efectos inhibitorios del metronidazol y la clomipramina que los de la cepa HM1 siendo ésta más resistente pero no se determinó la relación con el grado de virulencia.

Es muy probable que los efectos inhibitorio y lítico de los derivados de la fenotiacina y los compuestos tricíclicos neurolépticos sobre los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HK9 y HM1 no se deban a un efecto directo sobre algunas enzimas y proteínas membranales, ya que se ha reportado que la imipramina y la clomipramina son eficientes inhibidores del transporte de la serotonina (Hamberg and Truck 1973); son letales para promastigotes y amastigotes intracelulares de especies de *Leishmania* (Pearson et al. 1982; Zilbertstein y Dwyer 1984) lisan los tripomastigotes y amastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Barioglio et al. 1987) y además son desacopladores de la fosforilación oxidativa en células de mamíferos.

Estos resultados, indican que estas drogas tricíclicas no son específicas, sin embargo, actualmente se están efectuando algunas investigaciones dirigidas al diseño racional de drogas para descubrir estructuras moleculares tricíclicas

neurolépticas como inhibidores selectivos de la tripanotión reductasa (Chan et al. 1998).

Ha sido claramente comprobado que la *Entamoeba histolytica* carece de actividad de glutatión reductasa y no tiene capacidad de sintetizar glutatión. Sin embargo, Ondarza et al. (1999) reporta que *Entamoeba histolytica* presenta un metabolismo de tripanotión similar al de los tripanosomátidos abriendo la posibilidad de establecer un diseño racional de drogas contra el parásito *Entamoeba histolytica* parecido al de los tripanosomátidos.

## XII. CONCLUSIONES

Se puede concluir que tanto las drogas tricíclicas neurolépticas, las cuales fueron originalmente utilizadas por tener actividad antipsicótica, y los compuestos derivados de la fenotiacina diseñados para inhibir específicamente a la tripanotión reductasa de los tripanosomátidos y leishmanias, tuvieron un efecto inhibitorio en la proliferación de los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HK9 y HM1.

Las drogas más potentes fueron: la OFK008, la clomipramina y el metronidazol, observandose que los trofozoitos de la cepa HM1 fueron más resistentes a la clomipramina y a la OFK008. Esto podría estar relacionado con la alta virulencia de la cepa.

El metronidazol produjo un efecto inhibitorio casi total en la proliferación de los trofozoitos de *Entamoeba histolytica*.

La actividad inhibitoria sobre la proliferación celular y el efecto lítico sobre los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* por los compuestos tricíclicos

neurolépticos clomipramina y clorpromazina, así como, por los derivados de la fenotiazina diseñados contra la tripanotión reductasa, indican que pueden ser considerados agentes potenciales antiamebianos.

**Tabla 1.** Efecto de un derivado de la fenotiacina (OKK006) y el tricíclico antidepresivo clomipramina (KD002) bajo condiciones microaeróbicas sobre el número de células de *Entamoeba histolytica* HK9, *Trypanosoma cruzi* y *Crithidia luciliae*.

MUESTRA	CONTROL	OFK006	KD002
<i>Entamoeba histolytica</i> HK9 Número de células X 10 <sup>6</sup>	13	8.2	5.5
<i>Trypanosoma cruzi</i> Número de células X 10 <sup>6</sup>	247	R	R
<i>Crithidia luciliae</i> D <sub>600</sub>	1.2	0.7	1.1

R. La mayoría de los epimastigotes fueron completamente inmovilizados

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

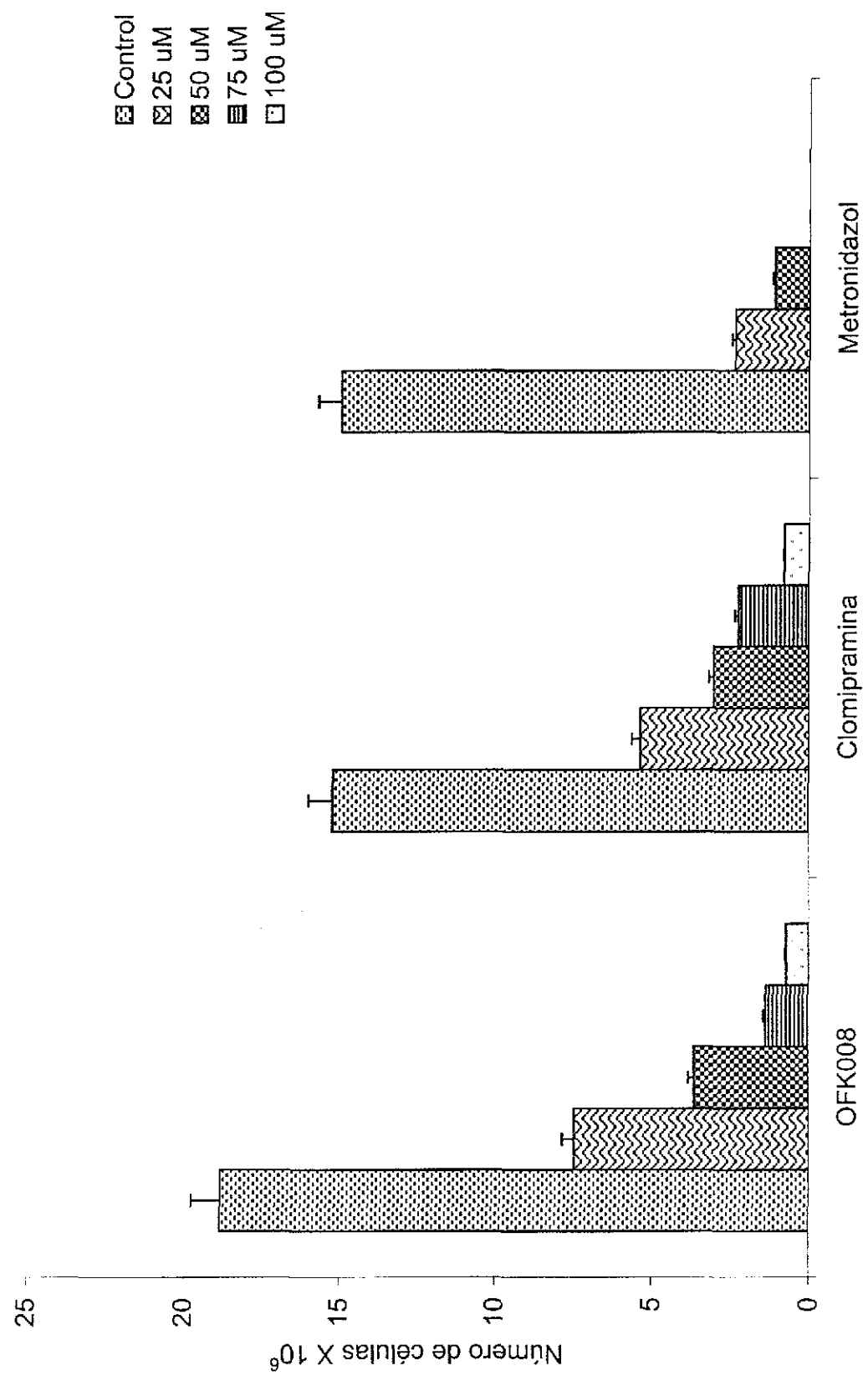
TABLA 2.- Efecto de las drogas derivadas de la fenotiazina y tricíclicas neurolépticas sobre la proliferación de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HK9

<i>Entamoeba histolytica</i> HK9		DERIVADOS DE LA FENOTIAZINA				TRICICLICAS NEUROLEPTICAS					
Número de células x 10 <sup>6</sup>	Normal	OFK001	OFK006	OFK008	OFK027	OFK043	KD001	KD002	KD003	KD004	KD005
	14.5	10.36	10.33	0.44*	8.18*	7.58*	4.7	0.81*	2.8	1.8	4.1

Los derivados de la fenotiazina y las drogas tricíclicas actuaron a una concentración de 100 uM por 12 hrs. Cada valor es la media aritmética obtenida por duplicado.

\* Lisis celular





Grafica 1. Efecto de tres tipos de inhibidores: uno derivado de la fenotiacina, la clomipramina y el metronidazol a diferentes concentraciones sobre trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HK9. Las barras muestran la desviación estándar.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



**Grafica 2.** Efecto de dos drogas derivadas de la fenotiacina (diseñadas para inhibir a la tripanotión reductasa) sobre la proliferación de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HK9. Las barras muestran la desviación estándar

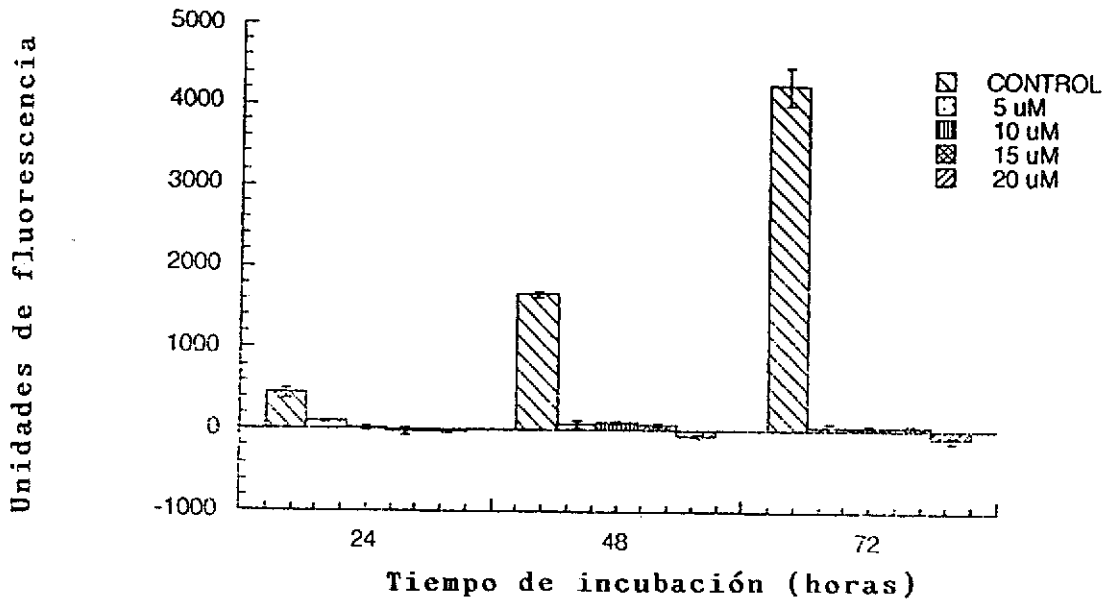
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Grafica 3.** Efecto de cinco drogas tricíclico neurolépticas sobre la proliferación de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HK9. Las barras muestran la desviación estándar.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

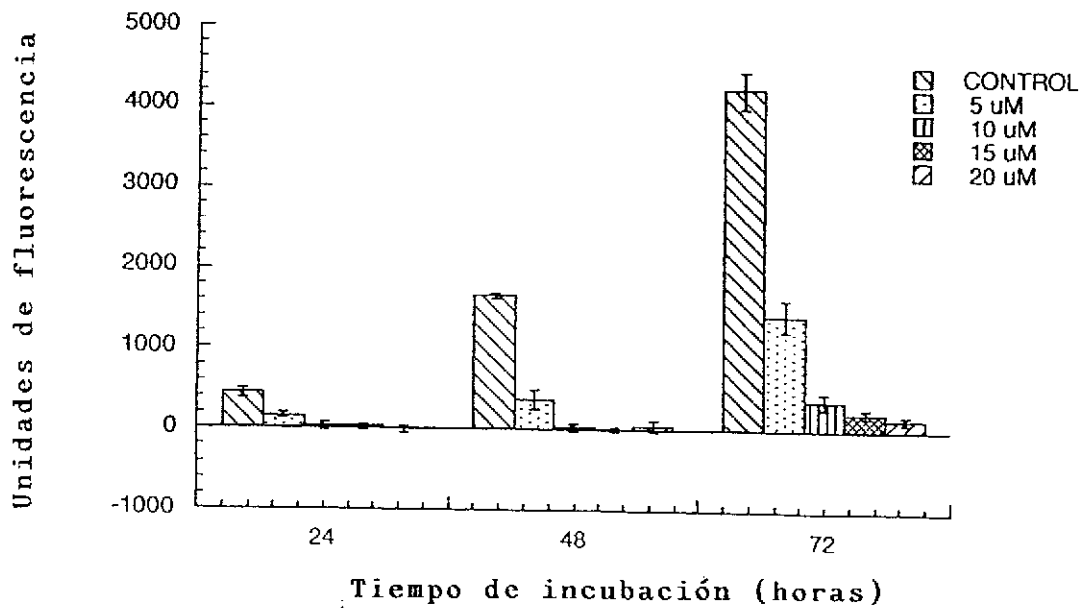
GRAFICA 4A



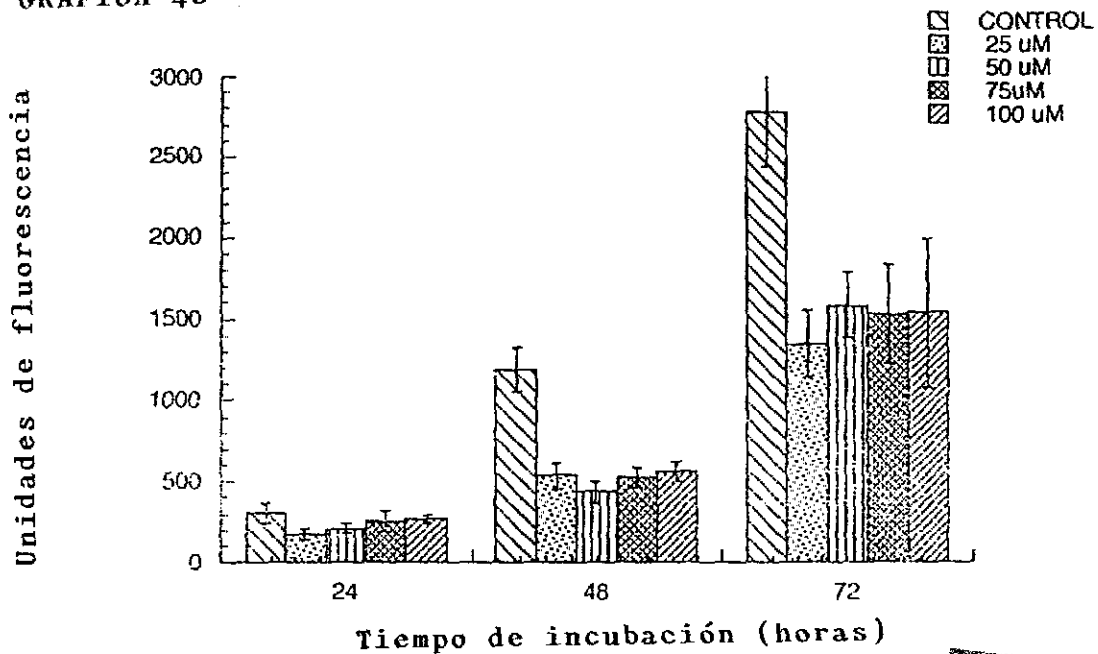
Entamoeba histolytica HK9  
CLOMIPRAMINA (KD002)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

GRAFICA 4B



GRAFICA 4C



Entamoeba histolytica HK9  
OFK008

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

GRAFICA 4D

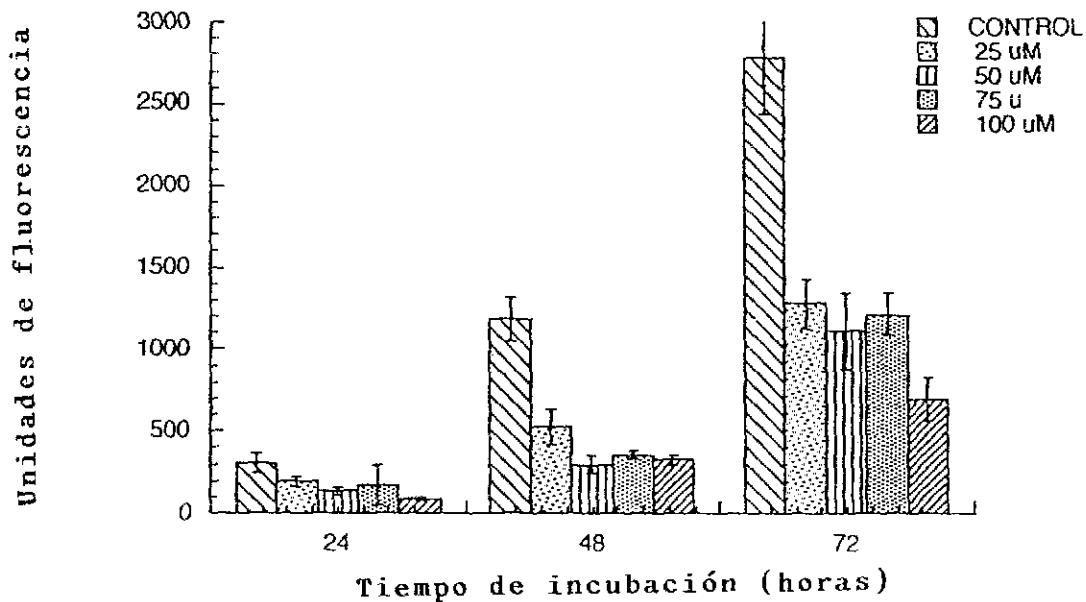
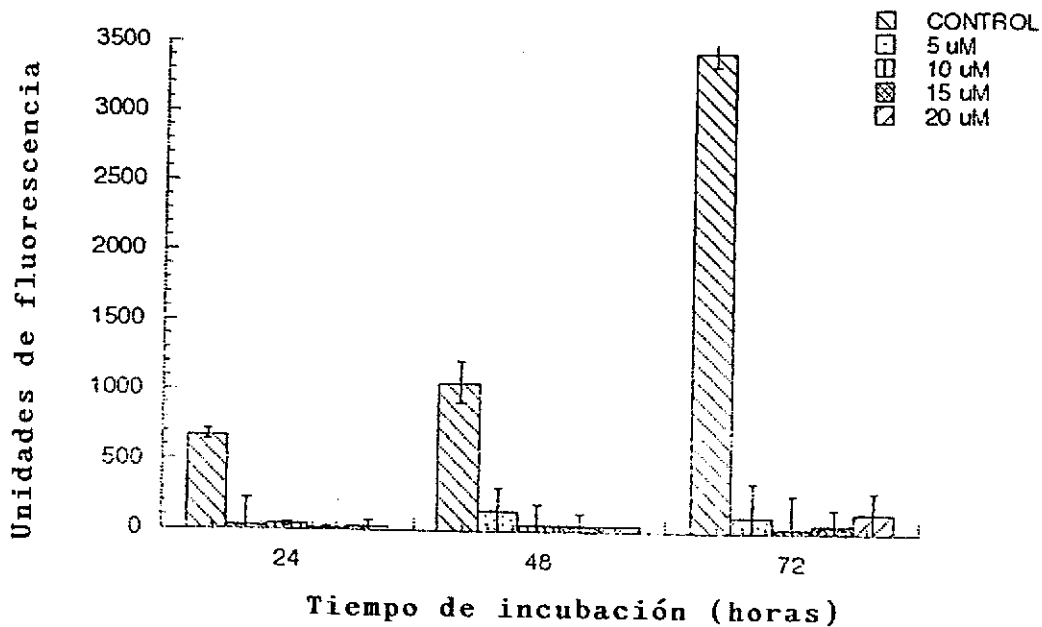


Fig. 4 Inhibición de la proliferación celular, medida como ADN con Sytox Green, de trofozoitos de Entamoeba histolytica HK9, bajo condiciones anaerobicas, por tres periodos de tiempo. Las barras muestran la desviación estandar.

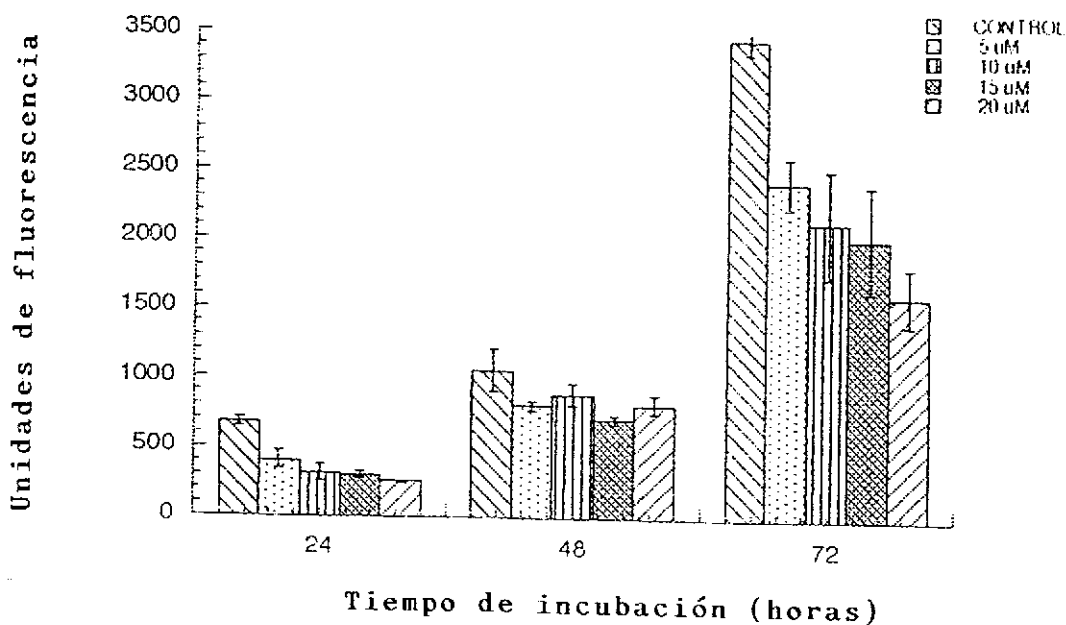
GRAFICA 5A



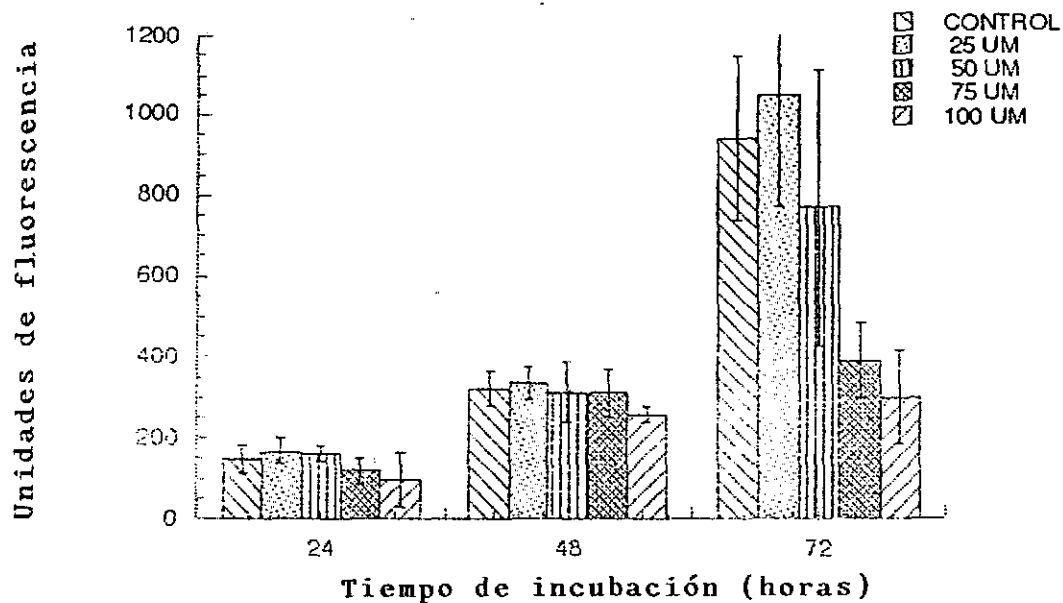
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Entamoeba histolytica HMI  
CLOMIPRAMINA (KDO02)

GRAFICA 5B



GRAFICA 5C



Entamoeba histolytica HM1  
OFK008

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

GRAFICA 5 D

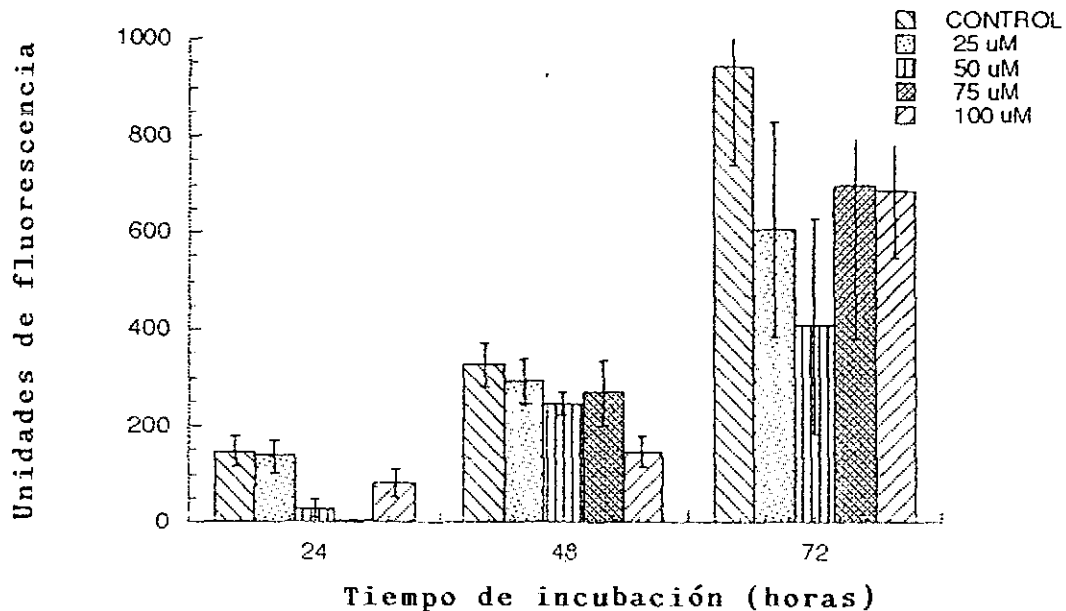


Fig. 5 Inhibición de la proliferación celular, medida como ADN con Sytox Green, de trofozoitos de Entamoeba histolytica HM1 bajo condiciones anaerobias, por tres periodos de tiempo. Las barras muestran la desviación estandar.

## REFERENCIAS

Adagu, IS., Nolder, D., Warhurst, DC., Rossignol, JF., (2002) In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolate of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. J. Antimicrob. Chemother 49(1):103-111

Agrawal, A., Pandey, VC., Kumar, S. and Sagar, P. (1989). Secretion of acid phosphatase by axenic *Entamoeba histolytica* NIH-200 and properties of the extracellular enzyme. J. Protozool. 36:90-92

Amaral, L. Ktistiansen, J.E., Frolund, T.V. and Markovich, B. (2000) The effect of chlorpromazine on the outer cell wall of *Salmonella typhimurium* in ensuring resistance to the drug. Int. J. Antimicrob. Agents. 14(3):225-229

Amaral, L. Ktistiansen, J.E., Viveiros M. and Atouguia, J. (2001) Activity of phenothiazine against antibiotic-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a review supporting further studies that may elucidate the potential use of thioridazine as anti-tuberculosis therapy. J. Antimicrob. Chemother. 47(5):505-511

Barioglio, S.R., Lacuara, J.L. and Oliva, P.P. (1987) Effects of clomipramine upon motility of *Trypanosoma cruzi*. J. Parasit. 73(2):451-452

Bhattacharya, S. Bhattacharya, A., Diamond, L.S. and Soldo, A.E. (1989). Circular DNA of *Entamoeba histolytica* encodes ribosomal RNA. J. Protozool. 36:455-458.



Brown, DM., Upcroft, JA. and Upcroft P. (1993) Cysteine is the major low-molecular weight thiol in *Giardia duodenalis*. Mol. Biochem. Parasitol. 61:155-158

Brown, DM., Upcroft, JA., Edwards MR. and Upcroft P. (1998) Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. Int. J. Parasitol. 28: 149-164

Calzado, F. C., Verde S. J., Morales V. M. And Segura L. J. J. (2000) Possible inhibition of *Entamoeba invadens* encystation by *Castela texana*. Arch. Med. Res. 31; S196 – S197.

Carrero, J. and Lacleite, J. (1996). Molecular biology of *Entamoeba histolytica*: a review. Arch. Med. Res. 27:403-412.

Chan, C., Yin, H., Garforth, J., Mckie, J. H., Jaouhari, R., Speers, P., Douglas, K. T., Rock, P.J., Yardloey, V., Croft, S.L. and Fairlamb, A. H. (1998) Phenothiazine inhibitors of trypanothione reductase as potential antitrypanosomal and antileishmanial drugs. J. Med. Chem. 41, 148 – 156.

Cohen,S. and Sadum, E. (1976) Immunology of parasitic infections. Ed. Blacwell Scientific Publications. Great Britain. 470-471

Croft, SL. (1994) A rationale for antiparasite drug discovery. Parasitology Today 10(10):385-386

Cruz-Vega D.E., Campos G.E., Said F.S. and González G.M.T. 1997. Determination of the Antiamebic effect of a metronidazole/Gossypol Blend. Arch. Med. Res. 28 (Suppl.) S300-S301

Diamond, LS., Harlow, DR. and Cunnick , CC. (1978). A new method for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:413-432.

Diccionario de Especialidades Farmacéuticas (1999) Publicado por Ediciones PLM S.A. de C.V. Mexico 2326p.

Dobell, C. (1928) Researches on the intestinal prozoa of monkeys and man. I. General Introduction II. Description of the whole life-history of *Entamoeba histolytica* in cultures. Parasitology 20:357.

Donald, PR., Sirgel, FA., Kanyok, TP., Danziger, LH., Venter, A., Botha, FJ., Parkin, DP., Seifart HI., Van De Wal, BW., Maritz, JS. and Mitchson, DA. (2000) Early bactericidal activity of paramomycin (aminosidine) in patients with smear-positive pulmonary tuberculosis. Antimicrob. Agents. Chemother 44(12):3285-3287

Douglas K.T. (1994) Rational drug design in parasitology. Parasitology today. 10 (10):389

Doyle P.S. and Weinbach E.C. (1989) The activity of Antidepressant drug against *Trypanosoma cruzi*. Experimental Parasitology 68; 230-234

Drug Evaluations Annual (1991) American Medical Association USA.

Fahey R.C., Newton G.L. Arrick B., Overdank B.T. and Aley S.B. (1984) *Entamoeba histolytica*: A eukaryote without glutathione metabolism. Science 224: 70-72

Fairlamb, AH., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, BT. and Cerami, A. (1985) Trypanothione: a novel bis(glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* 227:1485-1487

Fairlamb, AH. (1989) Novel biochemical pathways in parasitic protozoa. *Parasitology* 99:93-112

Fairlamb, AH. and Cerami, A. (1992) Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:695-729

Gardner, TB., and Hill, DR., (2001) Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(1):114-128

Goodman GA., Goodman LS. and Gilman (1982) *Las bases farmacológicas de la terapéutica 6ª. Ed. Editorial Médica Panamericana* pp 1041-1051

Hudson, (1994) The contribution of empiricism to antiparasite drug discovery. *Parasitology Today* 10(10):387-389

Hubber, M., Koller, B., Gitler, C., Mirelman, D., Ravel, M., Rozenblatt, S. and Garfinkel, L. (1989) *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules. *Mol. Biochem. Parasitol.* 32:285-296.

Kirkwood M.L. (1999) Focus on drug resistance. *Trends in microbiology* Vol 7(8):344-345

Lambrecht, FL. (1966) Notes on the growth curve of *Trypanosoma cruzi* chagas 1909 as determined by optical density. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 8(6):249-254

Leippe, M. (1992). Membrane perforation by *Entamoeba histolytica*; structural implications derived from the sequence of the pore-forming peptide. Arch. Med. Res. 23:35-37.

Leippe, M., Tannich, E., Nickel, R., Vander-Goot, G., Pattus, F., Horstmann, R. and Muller-Eberard, H. (1992) Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica* EMBO. J. 11:3501-3506.

Luaces, A. and Barret, A. (1988) Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. Biochem. J. 250: 903-909.

Lynch, EC. Rosenberg, IM. and Gitler, C. (1985) An ion-channel protein produced by *Entamoeba histolytica*. EMBO Journal 7:801-804.

Martínez-Palomo, A. (1982) The biology of *Entamoeba histolytica*. Research Studies Press. pp. 161

McKerrow, JH., Sun, E., Rosenthal, PJ. (1993) The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. Annu. Rev. Microbiol. 47: 821-853.

McLaughlin, J. and Aley, S. (1985) The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. J. Protozool 32:221-240

Meister, A. and Anderson, ME. (1983) Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52:711-760

Molecular Mechanisms of Drug Action (1988) Taylor & Francis Inc. Pp.55-60

Muñoz, ML. Moreno, MA., Pérez-García, JN., Tovar, GR. and Hernández VI. (1991) Possible role in calmodulin in the secretion of *Entamoeba histolytica* Electron-dense granules. *Mol. Microbiol.* 5:1707-1714.

Müller, M. (1986) Reductive activation of nitrimidazoles in anaerobic microorganisms. *Biochem. Pharmacol.* 35(1):37-41

Müller, M. (1988) Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Annu. Rev. Microbiol.* 42:465-488

Navarro, RP. and Reyes, RH. (2002). Amibiasis y Giardiasis. Aventis Pharma-Venezuela. <http://www.aventispharma.com>

Nequíz M., Polo A., Santos P.J.I. and Vega R.G.B. (2000) Antiamebic activity of the metronidazole-Zinc Association. *Arch. Med. Res.* 31:S19-S20

Ondarza R.N., Tamayo E.M. Hurtado G., Hernández E. and Iturbe A. (1997) Isolation and purification of Glutathionyl-Spermidine and Trypanothione from *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* Vol 28 Suppl. S73-S75

Ondarza R.N., Hernández E., Iturbe A., Hurtado G. and Tamayo E.M. (1999a). Detection by HPLC of a trypanothione synthetase activity in vitro from *Entamoeba histolytica* *Biotech. Appl. Biochem.* 30; 41-45

Ondarza R.N., Iturbe E., Hurtado G., Tamayo E.M., Ondarza M. and Hernández E. (1999b) *Entamoeba histolytica*: A eukaryote with Trypanothione metabolism instead of glutathione metabolism. *Biotech. Appl. Biochem.* 30; 47-52

Pearson RD., Manian A.A., Marcus J. L., Hall D., Hewlett E.L. (1982) Lethal Effect of Phenothiazine Neuroleptics on the Pathogenic Protozoan *Leishmania donovani* *Science* 217; 369 – 371.

Pisani, F., Orteri, G., Costa, C., Di Raimondo, G. and Di Perri R. (2002) Effects of psychotropic drugs on seizure threshold. *Drug. Saf.* 25(2):91-110

Perches, A., Stoopan, M., Segovia, G., De León A. (1973) Estado actual del tratamiento médico de la amibiasis invasora. *Archivos de Inv. Med.* 4(Supl. 1)S245-S250

Portillo-López, Ml., Castellanos, UMA., Cortés, NE., Chiprut, R. (2002) Infección por *Clostridium difficile*. *Gac. Med. Mex.* 138(1):57-66

Ravdin, J. (1986) Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytolysis. *Rev. Infect. Dis.* 8: 247-260.

Rivarola, HW., Fernández AR., Enders JE., Fretes, R., Geas. and Paglini-Oliva P. (2001) Effects of clomipramine on *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95(5):529-533

Rodríguez, M., Orozco, E. and Arroyo, R. (1994) Proteins of *Entamoeba histolytica* trophozoites involved in the adhesion to target cells. Arch. Med. Res. 25:205-210.

Romero, R. (1993) Microbiología y parasitología humana. Panamericana. México. pp. 502-508.

Saavedra-Lira E. and Perez-Montfort R. (1996) Energy production in *Entamoeba histolytica*: new perspectives in rational drug design. Arch. Med. Res. 27: 257-264.

Samuelson J.C., Burke A. and Couval J.M. (1992). Susceptibility of an Emetine-Resistant mutant of *Entamoeba histolytica* to multiple drugs and to channel blockers. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 36(1):2392-2397

Sharma, S., Hardeep K. And Khuller G.K. (2001) Cell cycle effects of the phenothiazines: trifluoperazine and chlorpromazine in *Candida albicans*. FEMS Microbiology letters 199; 185-190

Tannich, E., Scholze, H., Nickel, R. and Horstmann, R. (1991) Homologous cysteine proteinases of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. J. Biol. Chem. 266: 4798-4803.

Thakur, CP., Kanyok TP., Pandey AK., Sinha, GP., Zaniewski, AE., Houlihan, HH. and Olliaro, P. (2000) A prospective randomized, comparative trial of the safety and efficacy of paramomycin (aminosidine) plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone for the treatment of visceral leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 94(4):429-431

Thompson, PE. (1970) Pharmacology of antiamebic drugs. Arch. Invest. Med. (Supl. 1) 165-

Torres –Guerrero, H., Peattie, DA. and Meza, I. (1991) Cromatin organization in *Entamoeba histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol. 45: 121-130.

Treviño-García, MN., Ruiz de Chávez I. y De la Torre M. (1971) Cambios morfológicos en el trofozoito de *Entamoeba histolytica* cultivada en medio axénico, bajo el efecto de drogas antiamebianas. Estudio con el microscopio electrónico. Arch. Invest.Med. 2(Supl 1) 187-

Usubel, FMA. (1989) Shirt protocols in molecular biology 2da. Ed. Harvard Medical School.

Verlinde C. L. M. J., Merrit, E. A., Akker F. V. D., Kim H., Feil I., Delboni L. P., Mande S.C., Sarfaty S., Petra P. H. and Hol W. G. J. (1994) Crystallography and infeccious diseases. Protein Science 3: 1670 – 1686.

Walsh, JA. (1986) Problems in recognition and diagnosis of amibiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev. Inf. Dis. 8: 228-238

Walsh C., Bradley M. and Nadeau K. (1991) Molecular studies on trypanothione reductase, a target for antiparasitic drugs. TIBS 16

Warries, E., Nebinger, P. and Franz, A. (1983). Degradation of biogene oligosaccharides by *Entamoeba histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol. 7: 127-140.



Willhoeft, V. and Tannich, E. (1999) The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochem. Parasitol.* 99: 41-53.

Youmans, G., Paterson, P. and Sommers, H. (1982). *Manual de Infectología* Ed. Americana. pp. 502-508.

Zilberstein, D. and Dwyer D.M. (1984) Antidepressants cause lethal disruption of membrane function in the human protozoan parasite *Leishmania*. *Science* 226; 977-979

Zilberstein, D., Liveanu V., Gepstein A. (1990) Tricyclic drugs reduce proton motive force in *Leishmania donovani* promastigotes. *Bioche. Pharmacol.* 1; 39 (5): 935 – 940.