

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA

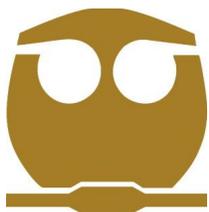
Actividad amebicida in vitro de compuestos híbridos
del 5-nitrofurano y del bencimidazol.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

ANA ERIKA HERNANDEZ GARCIA



MEXICO, D.F.

2011



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Prof. Abel Gutiérrez Ramos
VOCAL	Prof. Andrés Navarrete Castro
SECRETARIO	Prof. Lilian Yèpez Mulia
1er SUPLENTE	Prof. José Cordero Hernández
2do SUPLENTE	Prof. Jesús Pedroza Gómez

Sitio en donde se desarrollo el tema:

Laboratorio de Parasitología, Unidad de Investigación Medica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de pediatria, Centro Medico Nacional – Siglo XXI, IMSS.

ASESOR

Dra. Lilian Yèpez Mulia

SUSTENTANTE

Ana Erika Hernández García

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó bajo la dirección de la Dra. Lilian Yépez Mulia en el Laboratorio de Parasitología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, del Hospital de Pediatría. CMN SIGLO XXI, IMSS.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por su apoyo financiero a través del proyecto 80093.

Agradezco de manera especial a la Dra. Lilián Yépez Mulia; por haberme brindado la oportunidad de realizar mi tesis, por su amistad, comprensión, confianza para este trabajo y apoyo en aquellos momentos que más se requería.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por el espacio otorgado durante mi estancia en la carrera, porque lejos de ser una escuela fuiste mi segunda casa.

A todos los profesores que durante el desarrollo de mi carrera me formaron como estudiante y como ser humano.

Un agradecimiento muy especial a mi amigo Marco Gudiño (Hospital General/ Medicina Experimental. Facultad de Medicina) por las fotos digitales de trofozoitos tomadas bajo el microscopio en diferentes condiciones, así como sus ideas, ayuda y consejos, gracias.

DEDICATORIA

A MIS PADRES Gracias por darme la vida..... por su amor, por las caricias, por el dolor, por las sonrisas por el sufrimiento, por los regaños y por el aliento.....

Gracias por el ejemplo de la honradez, del entusiasmo y la calidez, por los regaños y desacuerdos, por las verdades y descontentos.....

PAPA te quiero mucho y no me cansare de darte las gracias por tus consejos y preocuparte por mí, yo se que no ha sido fácil pero estamos juntos. Te debo lo que soy ahora, y además sin ti no hubiera terminado mi carrera.

MAMA sabes que te quiero mucho y gracias por estar apoyándome durante toda esta travesía de la carrera, sin ti no lo hubiera logrado gracias. Y me da mucho gusto que tengas a tu lado a un gran hombre que te quiere mucho, y que conmigo se ha portado como un gran amigo.

A MI HERMANO CESAR sabes que te quiero mucho, y que ahora que eres padre me siento mucho mas orgullosa de ti porque eres un gran ser humano en todos los aspectos y me alegro mucho por ti. Te doy gracias por traer al mundo a ese muñequito precioso que es mi sobrino Santiago. GRACIAS

AMOR doy gracias a Dios por haberte conocido y que me hagas tan feliz, gracias por apoyarme para salir adelante, que siempre estés a mi lado para amarnos toda la vida.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DE LA CARRERA Alma, Berenice, Karla, Luz Elena, Miriam, Carlos, Gustavo, Isaac, Miguel, Ricardo Huitron, Ricardo Lopez, Andrés, Ángela, Itzel, Ma. Elena, David, Luis, Tania, Mónica, Carlos, por que sin ellos la estancia en la facultad hubiera sido muy pesada, los quiero mucho a todos y saben que siempre tienen a una amiga con quien tomarse una cerveza!!!

A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO Amparo, Rosita, Jesús, Samira, Joel, Ricardo, Chela, Katia, Berenice, Pablo, Argelia, Cinthia gracias por sus consejos y platicas que hacían mi estancia mas amena y ligera en las horas de laboratorio.

ÌNDICE

Introducción	1
1. Marco teórico	2
1.1. Amibiasis.....	2
1.1.1. Epidemiología de la amibiasis.....	3,4
1.1.2. Morfología de <i>Entamoeba histolytica</i>	5,6,7
1.1.3. Transmisión de <i>Entamoeba histolytica</i>	8
1.1.4. Medidas preventivas.....	9,10
1.1.5. Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	11,12
1.1.6. Fisiopatología de la amibiasis.....	13,14
1.1.7. Patología de la amibiasis.....	15,16,17,18
1.1.8. Diagnostico de la amibiasis.....	19,20
1.2. Tratamiento empleado en la amibiasis.....	21
1.2.1. Nitro-derivados.....	22,23
1.2.2. Derivados bencimidazólicos.....	24
2. Planteamiento del problema	25,26,27
3. Hipótesis	28
4. Objetivos	28
4.1. Objetivo general.....	28
4.2. Objetivos particulares.....	28

5. Procedimiento Experimental	29
5.1. Determinación de la curva de crecimiento de <i>E.histolytica</i>	29
5.2. Determinación de la actividad amebicida <i>in vitro</i> de los compuestos IVM-1 a IVM-8.....	30
6. Resultados y discusión	31
6.1. Curva de crecimiento de <i>E.histolytica</i>	31,32
6.2. Determinación de la actividad amebicida <i>in vitro</i> de los compuestos híbridos IVM-1 a IVM-8 contra <i>E. histolytica</i>	32 - 36
6.3. Relación estructura-actividad (SAR) actividad amebicida <i>in vitro</i> de los compuestos IVM-1 a IVM-8.....	36,37,38
7. Conclusiones	39
8. Bibliografía	40,41,42
<u>Anexo I.</u> Materiales y métodos.....	43, 44
Preparación medio TYI-S-33.....	45
Prueba de esterilidad.....	46
Mantenimiento del cultivo axenico de trofozoitos de <i>E. histolytica</i>	46
Determinación del número de trofozoitos/ml para el inóculo inicial. (CAMARA DE NEUBAUER)	47, 48
Preparación de las diluciones de los compuestos evaluados.....	49 - 52
<u>Anexo 2.</u> Tablas de resultados del número de trofozoitos vivos y muertos para cada compuesto evaluado.....	53 - 64

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos propuestos para la evaluación de la actividad biológica contra <i>E. histolytica</i> .*.....	26
Tabla 2. Número de trofozoitos de <i>E. histolytica</i> , obtenidos a diferentes tiempos de cultivo.....	31
Tabla 3. Actividad amebicida de los compuestos híbridos IVM-1 a IVM-8 y de los compuestos de referencia.....	33,34
Tabla 4. Compuestos que conforman los grupos A y B así como su actividad amebicida (CI ₅₀).....	35
Tabla 5. Diluciones seriadas de los compuestos evaluados.....	50
Tabla 6. Concentraciones finales de los compuestos para ser evaluados.....	52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Foto micrografía. Trofozoitos de <i>Entamoeba histolytica</i> en medio TYI-S-33. Magnificación 40X.....	5
Figura 2. Dibujo. Prequiste de <i>Entamoeba histolytica</i> . Original de Faust ⁽¹³⁾	6
Figura 3. Foto. Quiste de <i>Entamoeba histolytica</i> en examen coproparasitoscópico teñido con lugol. Magnificación 40X.....	7
Figura 4. Medidas preventivas para reducir la amibiasis en la población.....	10
Figura 5. Ilustración Ciclo Biológico de <i>Entamoeba histolytica</i> ⁽¹⁷⁾	12
Figura 6. Foto 1. Observación al microscopio de laminilla de examen Coproparasitoscópico teñido con lugol. Foto 2. Preparación de laminilla (Examen Directo).....	20
Figura 7. Fármacos utilizados en el tratamiento de la amibiasis.....	21
Figura 8 . Mecanismo de activación de fármacos heterocíclicos con un grupo nitro.....	23
Figura 9. Formación de las moléculas híbridas evaluadas en esta tesis.....	25
Figura 10. Fotomicrografía. Trofozoitos de <i>E. histolytica</i> en medio TYI-S 33. Magnificación 40X.....	29
Figura 11 . Curva de crecimiento de <i>E. histolytica</i> utilizando el promedio del número de trofozoitos/mL obtenido en tres ensayos.....	31

Figura 12. Cociente de potencia de los compuestos evaluados con respecto a Metronidazol.....	35
Figura 13. Cociente de potencia de los compuestos evaluados con respecto a Nitazoxanida.....	35
Figura 14. Cociente de potencia de los compuestos evaluados con respecto a Nifurtimox.....	36
Figura 15. Foto. Material de laboratorio.....	44
Figura 16. Foto. Cámara de Neubauer (MARIENFELD).....	47
Figura 17. Fotomicrografía. Trofozoitos de <i>E. histolytica</i> en cámara de Neubauer. Magnificación 40X.....	48
Figura 18. Diagrama. Diluciones realizadas con cada uno de los compuestos.....	49
Figura 19. Diagrama. Diluciones realizadas para las diferentes concentraciones de los compuestos evaluados.....	51

INTRODUCCIÓN

La amibiasis ha sido y continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial, sobre todo en países en vías de desarrollo. Esta infección causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*, se ha asociado a características sociodemográficas, económicas y culturales, tales como la pobreza, la infraestructura sanitaria inadecuada, el reducido acceso al agua potable, deficiente drenaje, etc. Su distribución es cosmopolita, pues aún en países desarrollados se presenta con mucha frecuencia, debido fundamentalmente a la migración de poblaciones procedentes de zonas altamente endémicas o viajeros que regresan de esas zonas. A pesar de que no es una de las principales causas de muerte o de incapacidad permanente como lo son la malaria y la esquistosomiasis, la amibiasis afecta a millones de individuos y en caso de no instituirse un tratamiento oportuno, da lugar a complicaciones potencialmente fatales como la amibiasis hepática, cerebral y pulmonar. ⁽¹⁾

La amibiasis constituye en México uno de los principales motivos de consulta con aproximadamente medio millón de casos al año ⁽²⁾. Estudios recientes demuestran que esta parasitosis se presenta con mayor frecuencia en comunidades con nivel socioeconómico bajo que practican el fecalismo al aire libre y que adolecen de condiciones higiénicas adecuadas, como algunas zonas tropicales y subtropicales que cuentan con regiones sumamente pobladas con malos hábitos higiénicos. Sin embargo, la amibiasis también se encuentra en estratos socioeconómicos altos, aunque en porcentajes mucho más bajos, siendo en todos los casos el grupo más afectado el pediátrico, en donde se han encontrado tasas de incidencia hasta del 60%. ^(1,3)

A pesar de la importancia de la amibiasis como problema de salud pública, se cuenta con un número relativamente reducido de medicamentos para su tratamiento. En la actualidad los fármacos de elección son el metronidazol, emetina y tinidazol y más recientemente la nitazoxanida. Los tres primeros fármacos tienen un margen terapéutico estrecho y con efectos secundarios severos ⁽⁴⁾. Además hay información de la presencia de parásitos resistentes a estos fármacos. Por lo que es necesaria la búsqueda de nuevos compuestos anti-amibianos, más eficientes y mejor tolerados por el hombre, con la finalidad de contar con métodos alternativos para el tratamiento de la amibiasis.

1. MARCO TEORICO

1.1. Amibiasis

La primera referencia de una amiba corresponde probablemente a la hecha por Rosel Van Rosenhof en 1755, quien describe un microorganismo que cambia de forma constantemente y al que le da el nombre de “pequeño proteo”. Transcurrieron más de 80 años para que Ehrenberg (1839) creara el género *Amoeba*. En 1925 Emilie Brumpt sugirió que había 2 especies de amibas, una de ellas causante de invasión, pero hasta 1997, en la Ciudad de México un comité de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), aceptó la existencia de 2 especies del género *Entamoeba* una patógena *E. histolytica* y una no patógena *E. dispar*.⁽⁵⁾ Actualmente se reconoce que *E. histolytica* es el agente causal de la amibiasis humana y responsable de hasta 100,000 muertes cada año a nivel mundial⁽⁶⁾, mientras que en *E. dispar*, es una especie morfológicamente indistinguible de *E. histolytica* y muy común en varias partes del mundo. Sin embargo, *E. histolytica* es la única amiba que se ha demostrado que causa enfermedad en humanos. Debido a que las técnicas tradicionales usadas para el diagnóstico del parásito no diferencian entre ambas especies, la mayoría de los datos epidemiológicos reportados incluyen a ambas especies de amiba, por lo que los valores de prevalencia de la amibiasis intestinal están sobreestimados⁽⁵⁾.

Se han desarrollado estudios para diferenciar a *E. histolytica* de *E. dispar*, no solamente en cepas de laboratorio sino en heces y suero de pacientes sintomáticos y asintomáticos, para esto se han empleado anticuerpos monoclonales específicos contra la lectina Gal/NacGal^(7,8).

La infección del intestino grueso causada por el protozooario *E. histolytica*, presenta dos modalidades distinguibles clínicamente: amibiasis intestinal invasora sintomática y la amibiasis intestinal luminal asintomática.

La prevención de la amibiasis radica principalmente en erradicar la contaminación fecal de los alimentos y del agua través de técnicas de sanitización, higiene y tratamiento de aguas residuales.

1.1.1.Epidemiología de la amibiasis

De acuerdo con la última notificación de la OMS ⁽⁵⁾, la amibiasis se define como la infección causada por *E. histolytica* y/o *E. dispar*, la cual cursa asintomática en el 90% de los individuos infectados. La infección se localiza en la mucosa del intestino grueso en donde solo la especie *E. histolytica* y en particular las cepas invasoras producen daño tisular y enfermedad intestinal o extraintestinal.

En la revisión realizada por Walsh (1986) sobre frecuencia de amibiasis, se menciona que aproximadamente el 10% de la población mundial se encuentra infectada por este parásito, de ella solo el 1% desarrolla la enfermedad y se calcula que aproximadamente 100,000 enfermos mueren a consecuencia de complicaciones de la enfermedad en su forma invasora ^(2,9).

En algunos países de América Central, Asia y África la amibiasis es una de las principales causas de mortalidad. En México como en otros países en desarrollo, la amibiasis está dentro de las 20 principales causas de enfermedad en la población ⁽¹⁰⁾, sin embargo la mortalidad por complicaciones de amibiasis invasora ha disminuido considerablemente en los últimos 40 años.

En un estudio seroepidemiológico realizado en nuestro país se reportó que el 8.41% de la población tiene anticuerpos anti-amibianos, lo que demuestra la alta frecuencia de infección por este parásito en nuestro medio ⁽¹¹⁾.

La tasa de morbilidad en México de la amibiasis intestinal en el periodo de 1995 a 2000 se ubicó entre 1000 y 5000 casos/100,000 habitantes con pocas variaciones anuales en la distribución por edad y género ^(12, 13).

Las poblaciones preferentemente afectadas son las menores de 15 años, con una franca elevación en los valores en niños entre los 5-9 años ⁽¹⁰⁾. De acuerdo al Boletín de Vigilancia Epidemiológica, en 2009 se reportaron 72,104 casos de amibiasis intestinal, siendo los estados de México, Oaxaca y Veracruz, en los que más casos se registraron (7,629, 6,014 y 5,497, respectivamente) ⁽¹⁴⁾. Desafortunadamente la información sobre las tasas de incidencia por absceso hepático amibiano en el país no van más allá del 2002, año en el cual se alcanzaron tasas de 3.8 casos/100,000 habitantes. El absceso hepático amibiano dejó de ser una de las enfermedades de notificación obligatoria a las autoridades de salud ⁽¹⁰⁾.

Las diferencias geográficas en prevalencia de infección y morbilidad en diferentes grupos poblacionales es una de las áreas de la epidemiología de la amibiasis en franco desarrollo, ya que se desconocen las causas de estas diferencias. La aplicación de las estrategias moleculares de que se dispone actualmente serán determinantes en la evaluación de dichos indicadores, no solo en nuestro país sino en todos aquellos considerados como endémicos de la amibiasis..

Cabe mencionar que la reciente secuenciación del genoma de *E. histolytica* ha facilitado el estudio de la epidemiología de esta enfermedad, una de cuyas prioridades es el estudio de los factores genéticos del parásito que determinan la evolución de la infección en el huésped (la infección asintomática o la enfermedad).

Los estudios epidemiológicos deberán contar con el diseño idóneo y utilizar las estrategias metodológicas y técnicas de punta de que se dispone, para realmente dar resultados confiables sobre la prevalencia de amibiasis intestinal o extra intestinal a nivel nacional, lo que permitirá tomar las decisiones adecuadas para el control de esta enfermedad. Actualmente el avance de las ciencias, ha creado la necesidad de abordar el estudio de la epidemiología de la amibiasis desde una perspectiva multidisciplinaria, en la que la utilización de la biología molecular tendrá sin duda un papel muy importante. ⁽¹⁵⁾

1.1.2. Morfología de *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica emite pseudópodos a base de material protoplásmico locomotor, se presenta en la naturaleza en tres estadios morfológicos: **trofozoíto, prequiste y quiste**.

El **trofozoíto** corresponde a la forma vegetativa y móvil y se encuentra en las materias fecales recién emitidas. (Figura 1).

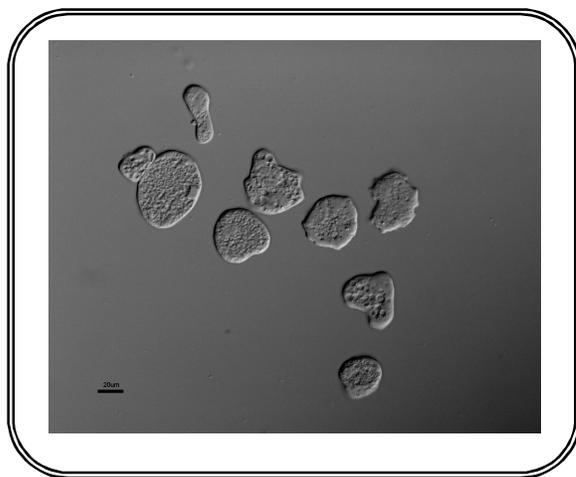


Figura 1. Fotomicrografía de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* en medio TYI-S-33. Magnificación 40X. Tomada por Marco Gudiño (Hospital General/Medicina Experimental).

El diámetro del trofozoíto fluctúa entre las 10 y 60 micras con movimientos característicos mediante la emisión de manera explosiva y rápida de pseudópodos digitiformes, alargados y anchos. Se observa una marcada diferencia entre el ectoplasma, el cual es hialino, y el endoplasma que contiene una gran cantidad de inclusiones, por lo que es granuloso y con aspecto de vidrio molido. En el endoplasma, además del núcleo, se pueden observar organelos como el retículo endoplásmico, los ribosomas y polirribosomas, el aparato de Golgi, pero no se observan mitocondrias. ⁽¹⁶⁾

Además, se encuentran vacuolas que contienen eritrocitos, bacterias, restos celulares, etc., elementos que le dan la apariencia granular cuando se le observa en fresco. El trofozoíto se reproduce por división binaria, aparentemente es arrítmica y no se ha precisado los factores que la precipitan. Exclusivamente en la luz del intestino, el trofozoíto puede enquistarse posterior a su multiplicación. Los trofozoitos no se enquistan cuando invaden tejidos, solo cuando están en la luz intestinal, viven en condiciones de anaerobiosis en las criptas intestinales, favorecida ésta por la presencia de bacterias.

Durante el proceso de enquistamiento ocurre la reproducción esquizogónica es decir la partición múltiple del núcleo antes de que ocurra la división del citoplasma. ⁽¹⁷⁾

El **prequiste** es una forma que se presenta cuando las condiciones del medio ambiente en que se mueve el trofozoito son poco favorables para su vida; este empieza a inmovilizarse, deja de emitir pseudópodos, el ectoplasma y el endoplasma, ya no se diferencian de manera que casi desaparece el primero, se pierde la forma irregular y se hace esférico, al tiempo que aparece una pared gruesa llamada pared quística, elimina todo el material intracitoplásmico que ha digerido, se redondea y se reviste de una doble membrana gruesa y refringente, la cual le confiere resistencia al exponerse al medio externo, al ser expulsado con las materias fecales. En este momento el prequiste presenta un solo núcleo, además puede presentar una masa de glucógeno dentro de una vacuola y unas estructuras en forma de salchicha con bordes romos llamados barras cromatoidales o cromidiales ⁽³⁾ (Figura 2).

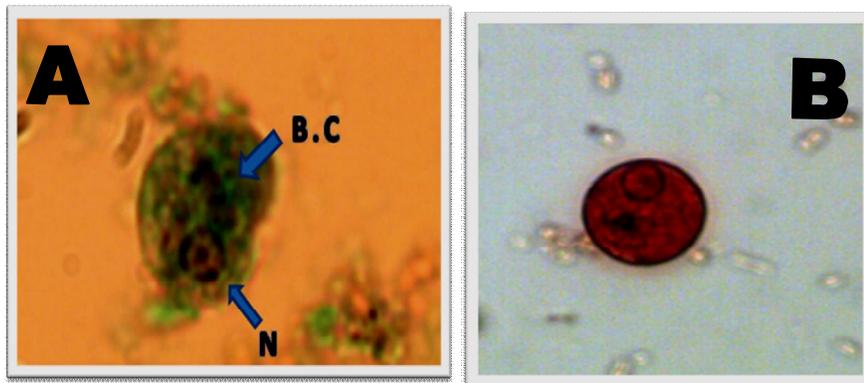


FIGURA 2. A). Prequiste de *E. histolytica* donde se observa un solo núcleo (N) y una estructuras rectangulares llamadas barras cromatoidales (B.C). Tinción de Gomori Magnificación 40X. B). Prequiste de *E. histolytica* de forma esférica con una doble membrana y un núcleo. Magnificación 40X. Fotografías tomadas en el Laboratorio de Referencia Internacional CARPERMOR.

El **quiste** es la forma infectante en la naturaleza; a medida que el tiempo transcurre, en el interior del quiste se presenta una gran actividad; el núcleo se divide en dos y luego en cuatro, quedando, al final del proceso de maduración, cuatro núcleos pequeños. Esta forma se recubre de una pared sumamente resistente llamada pared quística y mide de 5 a 20 micras de diámetro. El quiste sobrevive al suelo húmedo durante una semana por lo menos, si la temperatura fluctúa entre 28°C y 34°C y hasta un mes si la temperatura es de 10°C. ⁽¹⁷⁾

Los quistes son muy resistentes al ácido clorhídrico y no mueren con el tratamiento de cloración del agua. Los quistes mueren por ebullición, desecación, por exposición a la luz solar, calor y exposición al yodo. Al formarse los quistes en la luz intestinal, la persona infectada los elimina en la materia fecal, con una irregularidad variable, ya que los quistes no aparecen en todas las evacuaciones. No se conocen con precisión los factores que inducen la formación de quistes durante el proceso natural de infección. Durante la maduración del quiste, desaparece el glucógeno, ya que es consumido, las barras cromatoidales se hacen poco visibles o desaparecen. En raras ocasiones se pueden observar quistes maduros de *E. histolytica* con 8 núcleos.

Cuando los quistes se tiñen con lugol, el glucógeno se colorea de amarillo y en los núcleos se ve claramente el endosoma central y la cromatina periférica regularmente distribuida la que aparece con puntos brillantes de luz contra el fondo amarillo del nucleoplasma (Figura3). En las preparaciones teñidas con hematoxilina férrica de Heidenhein, la vacuola de glucógeno se observa vacía, ya que no se tiñe mientras que las barras cromatoidales y la cromatina nuclear se colorean de azul intenso. ⁽¹⁸⁾

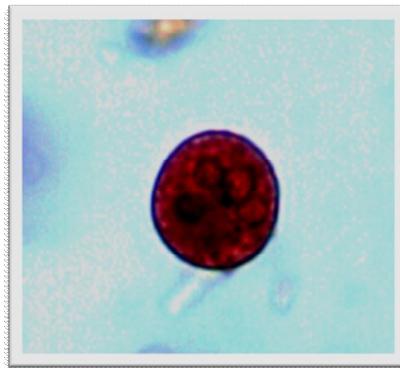


FIGURA 3. Quiste de *Entamoeba histolytica* en examen coproparasitoscópico teñido con lugol donde se observa de forma esférica y en su interior de 3 a 4 núcleos. Magnificación 40X. Fotografía tomada en el Laboratorio de Referencia Internacional CARPERMOR.

1.1.3. Transmisión de *Entamoeba histolytica*

Uno de los aspectos más importantes en la amibiasis es el mecanismo de transmisión ya que el parásito pasa de persona a persona principalmente por el fecalismo al aire libre y por la coprofagia humana. Se cuentan como reservorios los monos y los perros, pero su importancia como fuente de diseminación es mínima comparada con el hombre mismo.

El papel de los fómites contaminados con quistes es muy importante en la transmisión de *E. histolytica*; algunos de los fómites que se contaminan más frecuentemente con el parásito son:

1.- Objetos: como juguetes, ropa sucia, sanitarios, monedas, pasa manos de transportes o lugares públicos, picaportes, termómetros rectales, utensilios usados para la alimentación, etc.

2.- Agua: se ha comprobado la presencia de quistes del parásito en el agua en varias epidemias de amibiasis intestinal aguda. El uso de aguas negras insuficientemente tratadas para el riego de hortalizas, es costumbre que practican muchas comunidades de países en vías de desarrollo; el consumo de aguas frescas, raspados de hielo, paletas heladas, etc. Se han determinado como mecanismos muy eficientes de transmisión de infecciones intestinales, tanto por bacterias como por parásitos.

3.- Alimentos contaminados: se deben considerar como factores de alto riesgo para la transmisión de la parasitosis a los manejadores y preparadores de alimentos, sobre todo en restaurantes y sitios públicos de comida. En los hogares, la madre de familia o la persona encargada de preparar los alimentos, ya que si no tienen los conocimientos de las medidas higiénicas adecuadas o sino practican las mínimas reglas de sanidad serán los principales diseminadores de la infección al contaminar los alimentos con los quistes de *E. histolytica*.

Una vez que el quiste se encuentra en el medio ambiente, sobrevive y se mantiene viable por largo tiempo, que va de semanas a meses, mientras es diseminado por agua, aire, manos, alimentos, bebidas, objetos varios, utensilios para preparación o ingestión de alimentos, etc.⁽¹⁵⁾

1.1.4. Medidas preventivas.

En primer lugar, dado que la amibiasis es una protozoosis transmitida por fecalismo, las medidas deben ser dirigidas para romper el ciclo a este nivel. Toda acción tendiente a evitar la diseminación de formas infectantes a partir de las personas infectadas sintomáticas o asintomáticas, se dirige a evitar que la materia fecal contamine el medio ambiente, los alimentos, las bebidas y los utensilios para manejo e ingesta de comida. Es deseable que se establezcan medidas para control de las heces, mediante el uso de baños, fosas sépticas y contar con adecuado sistema de drenaje que garantice evitar el contacto directo con las evacuaciones; el lavado de manos antes de ingerir cualquier alimento, al igual que antes de manejar cualquier alimento, con lo que se garantiza la no ingestión de quistes por las personas. Otra medida útil es recortarse las uñas y mantener siempre limpio el área bajo la uña para que no quede material fecal contaminada y permanezca en los dedos, con el riesgo de infección personal y para la de individuos próximos a uno. La educación es fundamental para que se lleven a cabo estas medidas, ya que cuando se otorgan las facilidades, pero no se cambian las actitudes se fracasa, hay ejemplos de la instalación de sistemas de drenaje, baños, letrinas, etc; que no han tenido el impacto esperado por falta de educación de la población ⁽¹⁾ (Figura 4). Está demostrado que mejorar la higiene personal y doméstica repercute de forma que se presentan menos casos de gastroenteritis. Dado que la resistencia de los quistes en el medio ambiente es muy importante, con ciertas variaciones en función del clima, se recomienda que se apliquen medidas para control de la contaminación de los alimentos, bebidas y medio ambiental: ejemplo de estas el lavado de utensilios de contacto con alimentos y bebidas, el lavado mecánico de frutas y verduras y la cocción de productos en la preparación gastronómica de los mismos.

El agua de consumo contaminada es un mecanismo de transmisión de la infección amibiana, por esto el agua para consumo humano debe manejarse de manera que se destruyan los quistes del parásito, mismos que pueden sobrevivir por días o semanas.

Los hábitos de alimentación son importantes en lo individual, familiar y comunitario, la costumbre de comer en forma constante en sitios públicos o la necesidad por actividad laboral, educacional, recreativa, etc; también de alimentarse fuera de casa también es un factor de riesgo para adquirir esta parasitosis, si a esto sumamos a los vendedores ambulantes, a lo igual que los puestos callejeros de preparación y expendio de comida son fuente de infección ya que en estos sitios no se manejan las medidas higiénicas necesarias, ya que no cuentan con agua corriente para lavar trastes, no se lavan las manos, acumulan los desechos a un lado, etc.

En los negocios establecidos además de la aplicación de todas las medidas higiénicas, se debe tener un control de los manejadores de alimentos, mediante estudios clínicos y de laboratorio.

Las recomendaciones para viajeros que se trasladan a zonas endémicas de amibiasis son más que de quimioprofilaxis, de higiene y de mucho sentido común en la elección de los sitios para comer y beber ⁽¹⁵⁾.

La prevención específica es sin duda la mejor opción para prevenir cualquier proceso infeccioso, en el caso de la amibiasis se ha intentado la inmunización con diferentes productos, como la adhesina de 112 KDa, que al ser empleada en modelos animales redujo considerablemente la morbilidad y la mortalidad ocasionada por este parásito ⁽⁹⁾. Sin embargo, hasta la fecha no se ha desarrollado una vacuna que impida eficientemente la adherencia de la amiba a la superficie intestinal, de tal forma que el parásito al no fijarse no se replique y sea arrastrado con el tránsito intestinal y salga con la materia fecal.



FIGURA 4. Medidas preventivas para reducir la amibiasis en la población.

1.1.5.Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.

El hombre se infecta al ingerir quistes maduros que descienden por la parte alta del tubo digestivo, y a su paso por el estómago la pared quística se empieza a reblandecer, cuando llegan al intestino delgado y si las condiciones son favorables, caracterizadas por temperatura mayor que el exterior, presión parcial de oxígeno baja y pH neutro o alcalino; las enzimas pancreáticas disuelven la pared del quiste y se liberan los trofozoitos, en número de acuerdo a la cantidad de núcleos. Los trofozoitos se adhieren a la superficie del intestino grueso, donde se dividen y en la parte posterior del intestino grueso se enquistan y salen con las heces al medio ambiente.⁽¹⁹⁾ (Figura 5).

Los trofozoitos al adherirse a la superficie del intestino grueso pueden, producir lesiones ulcerosas, que poco a poco van creciendo en profundidad y en extensión, facilitando a los trofozoitos pasar del intestino a las estructuras contiguas, pero también pueden llegar hasta los vasos sanguíneos del intestino con lo que se introducen a la circulación entero hepática, mediante la cual llegan hasta el hígado, donde pueden permanecer causar o no lesiones, pero también pueden salir mediante dos caminos posibles; el primero es por lisis de tejido hepático hasta romper la cápsula de Glisson y así invadir los tejidos más cercanos, como pueden ser los del diafragma, vísceras, pared abdominal, etc., y la otra posibilidad es que del hígado salgan con la circulación y se distribuyan a cualquier órgano, aparato o sistema mediante la sangre, de esta forma queda muy claro que este protozooario puede llegar a cualquier sitio ya sea por contigüidad, o por vía hematológica⁽²⁰⁾.

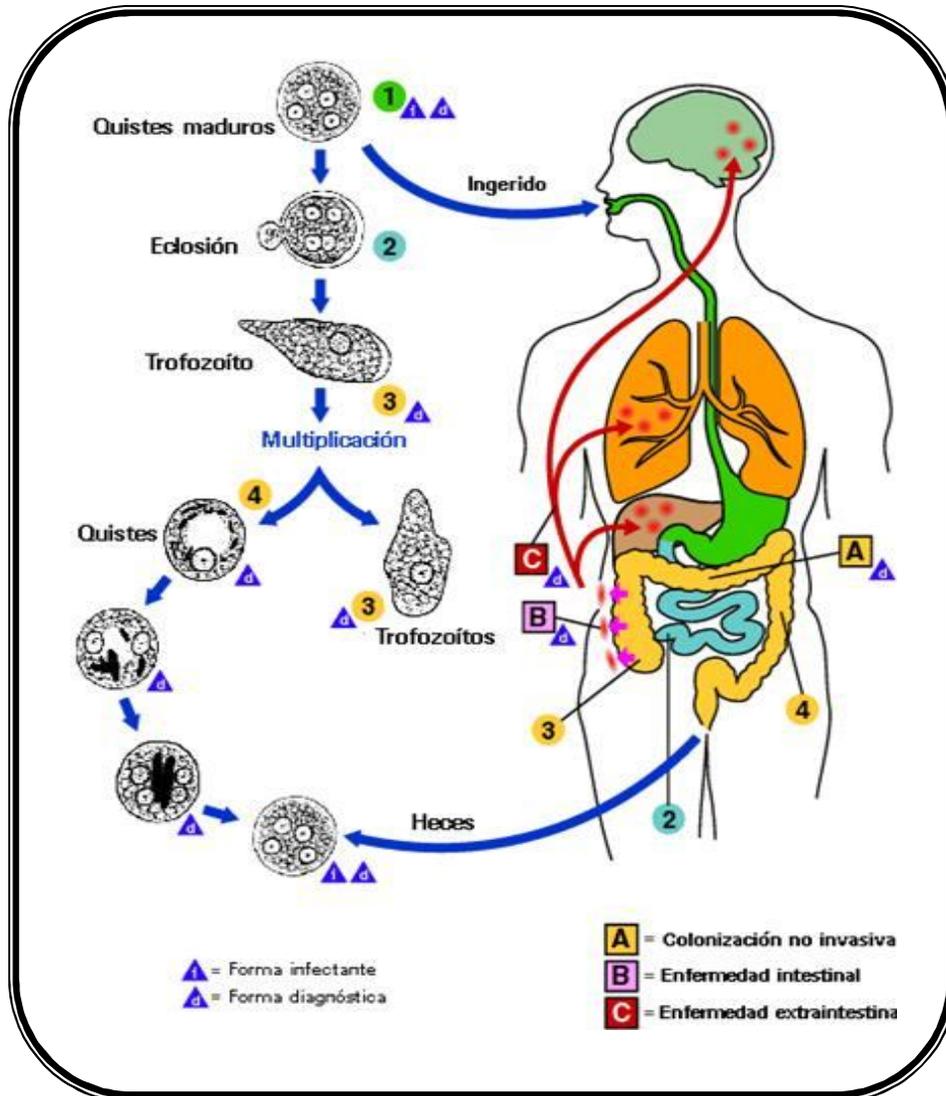


FIGURA 5. Ciclo Biológico de *Entamoeba histolytica*. Tomado de www.dpd.cdc.gov.

1.1.6.Fisiopatología de la amibiasis

La enfermedad intestinal amibiana se refiere a la presencia del parásito en el colon del huésped y la enfermedad extraintestinal amibiana es cuando el parásito provoca lesiones tisulares con repercusión clínica (amibiasis invasora).⁽²¹⁾

La invasión a la mucosa del intestino grueso se inicia con el contacto del parásito través de una adhesina, que es una lectina con gran afinidad por la galactosa. La penetración a la mucosa se ve favorecida por un péptido formador de canales iónicos, denominado ameboporo el cual induce a la lisis celular, además de la participación de otras proteasas del parásito como elastasas, colagenasas, etc., que destruyen el tejido. Los neutrófilos que se han acumulado en los puntos de penetración son destruidos por las proteasas del parásito liberando enzimas que contribuyen a la destrucción del tejido.⁽³⁾

Hay 4 tipos de amibiasis intestinal que se pueden diferenciar clínico patológicamente;

1) Amibiasis aguda disentérica: tiene manifestaciones que dependen de la localización de las lesiones, ya sean en el recto sigmoides o en las regiones superiores del colon. La rectosigmoidoscopia muestra ulceraciones superficiales en áreas limitadas del intestino grueso. La disentería se caracteriza por evacuaciones muco sanguinolentas en número de 3-5 al día, acompañadas de tenesmo rectal y dolor cólico. En la diarrea las evacuaciones son líquidas con materia fecal acompañada de estrías sanguinolentas, el cólico es moderado y no hay tenesmo. En cualquiera de las dos variantes descritas no hay fiebre ni manifestaciones sistémicas⁽²²⁾.

2) Colitis fulminante: se presentan lesiones ulcerosas necróticas, confluentes, que abarcan grandes áreas e incluso todo el colon y pueden afectar todo el espesor de la pared de éste. Las evacuaciones son en número de 20 o más, la materia fecal se mezcla con sangre o es pura sangre, hay cólico intenso, tenesmo rectal constante, anorexia, náuseas, malestar abdominal y fiebre de 39°C a 40°C, acompañado de una baja de presión arterial o bien cuadro de choque. Es posible encontrar peritonitis como complicación de la perforación intestinal⁽²²⁾.

3) Amebomas: son lesiones pseudotumorales constituidas por necrosis, ulceración, edema, fibrosis e infiltrado inflamatorio agudo y crónico, en mucosa y submucosa; en general son únicos pero se pueden presentar como lesiones múltiples, se localizan en el ciego, recto sigmoides, colon ascendente, o en los ángulos hepático y esplénico. Se manifiestan por disentería o diarrea, dolor abdominal y una masa abdominal que con frecuencia se confunde con cáncer⁽²³⁾.

4) Apendicitis amibiana: tiene síntomas similares a la apendicitis bacteriana; con dolor y rigidez en el cuadrante inferior derecho del abdomen, fiebre, taquicardia y náuseas, cuando se afecta el ciego puede haber además diarrea sanguinolenta. El examen histopatológico es particularmente útil en el diagnóstico de apendicitis amibiana y de ameboma⁽²³⁾.

No todos los individuos que tienen amibiasis, presentan manifestaciones clínicas, estas se observan en el 20% de los infectados⁽²²⁾. Esta diferencia entre el número de infectados y de enfermos por amibiasis, se debe a la patogenicidad del parásito y a factores del huésped. En los factores del huésped se encuentra: la edad, siendo la disentería aguda más frecuente en niños. En el caso del absceso hepático, este es más frecuente en adultos, entre 20 y 60 años y la mayor incidencia es en hombres. El estado nutricional también debe tomarse en cuenta, ya que la desnutrición es un factor para que se presente la amibiasis invasora. Otros factores que pueden favorecer la infección amibiana, pero que no son factores definitivos que predispongan a la invasión amibiana, son: la raza, el alcoholismo, la infección por otros parásitos y la acción sinérgica de la flora bacteriana intestinal^(22,23).

1.1.7. Patología de la amibiasis

La enfermedad amibiana se considera como un proceso de múltiples pasos y además con un comportamiento multifactorial. Los aspectos de la patogénesis que han sido investigados experimentalmente pueden ser categorizados en los mecanismos implicados como son: i) la flora bacteriana, ii) la adherencia, iii) la muerte celular dependiente de contacto, iv) la actividad proteolítica y v) la fagocitosis.

i) Flora bacteriana

El contacto entre *E. histolytica* y la flora bacteriana del colon, se ha sugerido que forma parte de importantes señales para dar comienzo a la enfermedad intestinal. Las bacterias representan una fuente de alimento para el parásito, pero además se sugiere que la flora bacteriana provee las condiciones anaeróbicas o potenciales redox, que son importantes para el crecimiento amibiano, por lo que influyen en el balance de la producción de trofozoitos. Estudios *in vitro* han señalado que el cultivo de la amiba, por tiempos prolongados, ocasiona la pérdida de su virulencia, siendo los trofozoitos incapaces de producir la enfermedad experimental, sin embargo, al cultivar trofozoitos de *E. histolytica* crecidos con bacterias patógenas, como *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *S. paratyphi* esta pérdida de la virulencia se puede revertir ⁽²⁴⁾. Las bases biológicas y moleculares de este fenómeno a la fecha no son completamente conocidas.

ii) Adherencia

El primer paso a la invasión intestinal por los trofozoitos de *E. histolytica*, es el contacto y la adherencia del parásito a células del epitelio intestinal del hospedero. En la adhesión participan moléculas específicas del parásito llamadas adhesinas, que juegan un papel importante en la patogénesis de la amibiasis. Una de las moléculas ampliamente caracterizadas es la lectina galactosa/N-Acetil D-galactosamina (Gal/GalNAc), Ravdin y Guerran ⁽²⁵⁾ en 1981 demostraron la inhibición de la adherencia de los trofozoitos amibianos a las células CHO, empleando galactosa o Gal/GalNAc pero no con otros monosacáridos, como N-acetilglucosamina, manosa o ácido siálico. La adherencia amibiana con otros tipos celulares como células epiteliales, eritrocitos, neutrófilos entre otros también fue inhibida.

La lectina Gal/GalNAc con peso molecular de 260kDa participa de manera importante en la colonización del intestino.

Otras moléculas implicadas en la adherencia también han sido descritas y aunque menos estudiadas también son importantes. Entre éstas se encuentran la proteína de superficie celular de 220kDa, caracterizada por su inhibición por polímeros de N-acetilglucosamina y la adhesina de 112KDa, descubierta mediante el uso de mutantes deficientes en la adherencia, y que posee además actividad de cisteín proteínasa. Estas dos últimas moléculas de adhesión y la Gal/GalNAc antes mencionadas participan en la unión de *E. histolytica* a la superficie de los glóbulos rojos y en la subsecuente eritrofagocitosis ⁽²⁶⁾.

iii) Muerte Celular dependiente de contacto

Una de las propiedades que caracteriza a *E. histolytica* y que denota su nombre es su habilidad para destruir tejidos. La adherencia de los trofozoitos a las células blanco es un prerrequisito necesario para llevar a cabo su citotoxicidad. La lectina Gal/GalNAc está implicada tanto en la adherencia como en la inducción de la muerte celular, ya que un anticuerpo monoclonal dirigido contra un epítipo de esta lectina disminuye la citotoxicidad ⁽²⁷⁾.

Existen diversas evidencias que indican que *E. histolytica* induce apoptosis y que la lectina Gal/GalNAc es transferida a la célula blanco seguida de la adherencia. Se ha sugerido que los trofozoitos de *E. histolytica* causan la muerte de la célula blanco por un mecanismo que involucra movimiento de calcio intracelular y la activación de una tirosina fosfatasa ⁽²⁸⁾.

La familia de péptidos formadores de poros, conocidos en su conjunto como ameboporos, con funciones similares a las proteínas formadoras de poros del sistema inmune, han sido considerados como factores de patogenicidad, por su actividad citolítica *in vitro*.

Los ameboporos existen en tres isoformas, todas con un tamaño de 77 aminoácidos y presentan una estructura secundaria de α -hélice. La respuesta inmune celular del hospedero puede contribuir a la destrucción del tejido local. En el modelo hepático del hámster, el reclutamiento de neutrófilos es la respuesta inmune inicial a la infección por *E. histolytica*, para después ser lisados cuando están en contacto directo con las amibas liberando productos tóxicos al tejido hepático ⁽²⁹⁾.

iv) Actividad proteolítica

Una variedad de proteasas secretadas por *E. histolytica* han sido implicadas en la invasión de los trofozoitos amibianos en el intestino. La primera evidencia de la patología amibiana es el agotamiento local del moco intestinal y la alteración de la barrera epitelial como resultado de la degradación de los componentes de la matriz extracelular, que ocurren en gran parte por la acción de las proteinasas. Las actividades *in vitro* reportadas para estas proteinasas purificadas, son la degradación de colagenasa, elastina, fibrinógeno y laminina, y sus niveles de la expresión han sido relacionados con la virulencia ⁽³⁰⁾. Las cistein proteinasas (CP) son responsables del desprendimiento de las monocapas celulares en cultivo, interfieren con la función del sistema inmune al hidrolizar anticuerpos del isotipo IgG e IgA así como C3 y a las anafilotoxinas, C3a y C5a, aspecto que puede explicar en parte la relativa lentitud en los mecanismos efectores de neutrófilos en el absceso hepático amibiano. Las CP pueden tener funciones importantes dentro del parásito en la digestión de las bacterias y glóbulos rojos, así como en la activación de otras enzimas; ya que su inhibición puede modificar la virulencia del parásito ⁽³¹⁾. Una de las diferencias entre *E. histolytica* y la especie no patógena *E. dispar*, es la secreción de CP, y de manera particular, el gen CP5 (tiene un papel en la destrucción tisular) está ausente en la amiba no patógena ⁽²⁸⁾. Las CP son atractivas moléculas blanco para el tratamiento de la amibiasis ya que constituyen un factor de patogenicidad en *E. histolytica*. Estudios recientes han sugerido que un considerable número de genes (un total de 86) ⁽³²⁾ que codifican para estas enzimas proteolíticas están presentes en el genoma de la amiba y el estudio de su expresión en diferentes condiciones de cultivo y de estrés, ayudarán a entender esta enfermedad.

v) Fagocitosis

Una de las propiedades biológicas de la amiba que más se ha estudiado *in vitro* es la fagocitosis, ésta se caracteriza por la ingestión de las células muertas, fragmentos celulares, partículas inertes o células vivas. La fagocitosis de glóbulos rojos (eritrofagocitosis) por los trofozoitos de *E. histolytica* es una característica muy común. La presencia de eritrocitos en el citoplasma de las amibas fue uno de los criterios biológicos que se usaron para el reconocer a las amibas de las heces disentericas y de las lesiones hepáticas. Sin embargo, en estudios más recientes se ha demostrado que amibas virulentas que son capaces de producir lesiones hepáticas amibianas en animales susceptibles no necesariamente muestra una gran actividad eritrofagocítica.

La fagocitosis consiste en una serie de pasos que incluyen la unión de la superficie celular a los ligandos específicos y a la actividad de diversas señales que llevan a la polimerización de actina. Además el tráfico vesicular tiene un papel esencial en la expresión de la virulencia de los trofozoitos de *E. histolytica* porque controlan la maduración del fagosoma ⁽³²⁾. Este proceso esta acompañado por la fusión secuencial con compartimentos endocíticos para formar el fagolisosoma, que son dirigidos por GTPasas y proteínas Rab, que actúan como moduladores en la regulación de la fusión vesicular con las membranas de la célula blanco ⁽³¹⁾.

1.1.8 Diagnóstico de la amibiasis

Se define el diagnóstico clínico como aquel, que con base al interrogatorio y exploración del paciente se recogen y ordenan los síntomas y signos que presenta el mismo para llegar a uno o varios diagnósticos presuntivos; estos se corroborarán o descartarán como consecuencia del uso adecuado de auxiliares del diagnóstico como son: laboratorio y/o gabinete ⁽³³⁾.

El diagnóstico parasitológico de la amibiasis

Puede llevarse principalmente a través de las siguientes técnicas:

Examen directo en fresco: esta técnica está indicada para la búsqueda del parásito a partir de materia fecal diarreica, moco y/o sangre (diarrea líquida y/o disentérica), contenido rectal obtenido por medio de cucharilla rectal en lactantes o muestras de lesiones intestinales obtenidas directamente mediante rectosigmoidoscopia, estas muestras deberán ser procesadas antes de dos horas de ser obtenidas para una identificación adecuada de los trofozoitos y/o los quistes, además se deberá realizar un frotis seguido de fijación y tinción con alguno de los colorantes para los protozoarios como el de hematoxilina férrica, Tricromica de Gomori o el colorante de Kohon⁽¹⁷⁾. Figura 6.

Coproparasitoscópico: cuando el examen directo en fresco es negativo, se realiza la búsqueda de quistes en heces mediante técnicas de concentración con flotación o sedimentación, si hubiera alguna duda en la identificación del quiste se recomienda realizar alguna tinción de las antes mencionadas ⁽¹⁸⁾.

Coproantígeno: en caso de que el examen directo y el de concentración resultaran negativos, se puede realizar una prueba en busca de coproantígenos, se trata de buscar antígenos de *E. histolytica* en las heces del paciente con sintomatología compatible con amibiasis ⁽¹⁸⁾.

Es importante que para la realización de cualquiera de estos estudios parasitológicos, el paciente no esté tomando medicamentos (antimicrobianos, antiprotozoarios, antihelmínticos, Bismuto, Bario, caolín, hidróxido de magnesio y enemas salinos hipertónicos), así como medios de contraste ya que interfieren con la posibilidad de encontrar trofozoitos y quistes en la materia fecal o tejidos de estos pacientes.



FIGURA 6. 1). Observación al microscopio de laminilla de examen coproparasitológico teñido con lugol. 2). Preparación de laminilla (Examen Directo). Tomado en Laboratorio de Referencia Internacional CARPERMOR

}

1.2. Tratamiento empleado en la amibiasis.

En el tratamiento de la amibiasis se han utilizado varios compuestos de naturaleza química muy diversa (Figura 7). Actualmente dentro de esa variedad, sobresalen los fármacos heterocíclicos con un grupo nitro como sustituyente común: derivados del 5-nitroimidazol (por ejemplo el metronidazol), derivados del 5-nitrofurano (Furazolidona) y derivados del 5-nitrotiazol (Nitazoxanida).

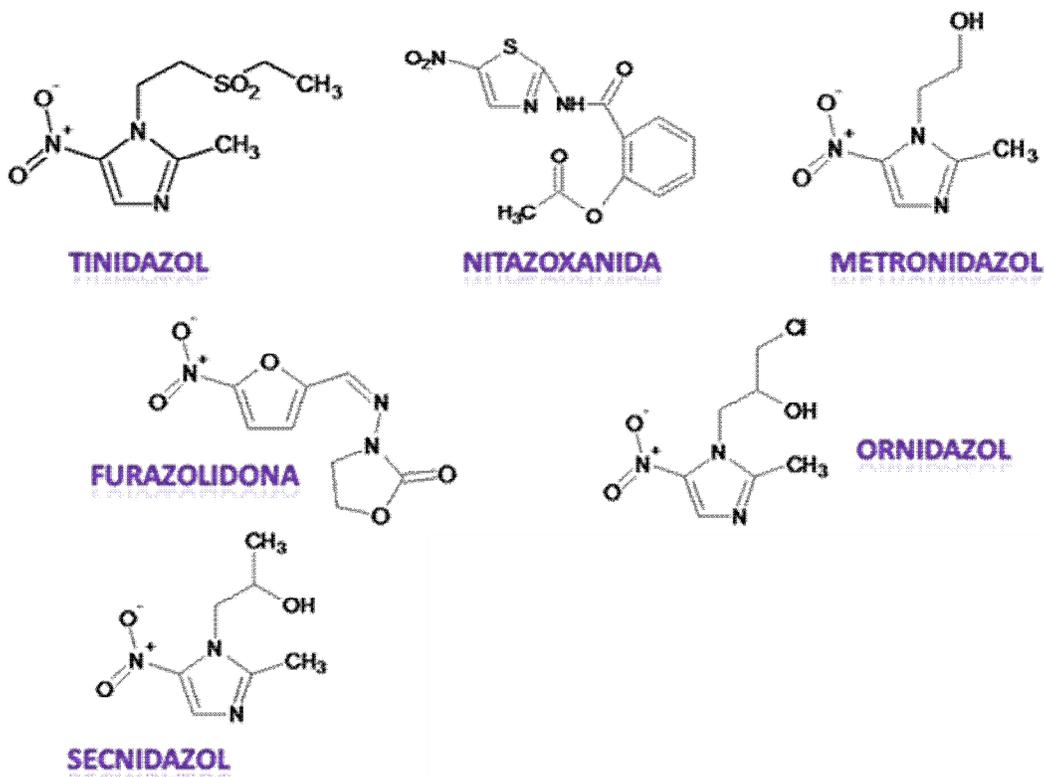


FIGURA 7. Fármacos utilizados en el tratamiento de la amibiasis.

1.2.1. Nitro-derivados

Dentro del grupo de los 5-Nitroimidazoles se encuentra el metronidazol, tinidazol, ornidazol y secnidazol, en general se manejan a dosis entre 30 y 50 miligramos por kilogramo de peso y el número de días varía de acuerdo al tipo de fármaco que se decida aplicar. El metronidazol es el fármaco de elección en el tratamiento de la amibiasis, tiene un margen de seguridad amplio, y su absorción se efectúa casi totalmente en el yeyuno. Sin embargo, este fármaco ocasiona efectos secundarios numerosos, entre los que se encuentran gastritis, náusea, vómito, diarrea, cefalea, mal sabor de boca, leucopenia transitoria y alergia ⁽³²⁾.

Actualmente se ha demostrado la actividad amebicida de la nitazoxanida, un derivado 5-nitrotiazol (Figura 7). Los estudios *in vitro* mostraron que la nitazoxanida y su metabolito activo –la tizoxanida– son al menos tan potentes como el metronidazol frente a cepas de *E. histolytica* sensibles a este agente y mantienen la actividad contra cepas resistentes o poco sensibles a metronidazol ⁽³⁴⁾. *In vitro*, la nitazoxanida demostró efectividad en el tratamiento de un amplio espectro de parásitos intestinales que incluyó nematodos y cestodos, y diversos protozoarios como *Cryptosporidium parvum*, *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia* ^(35,36).

El mecanismo de acción del metronidazol es a través de su reducción por la piruvato ferredoxin oxido reductasa (PFOR) del parásito (Figura 8) y la formación de intermediarios reactivos formados que interaccionan con varios componentes celulares como ADN, proteínas y membranas, provocando daño celular irreparable ⁽³⁷⁾. El mecanismo de acción de la nitazoxanida, está mediado por la inhibición de la PFOR, pero no depende de la Ferredoxina; la reducción del grupo nitro no es indispensable para la actividad de este fármaco y los productos formados durante la activación de la Nitazoxanida no inducen mutaciones en el ADN, a diferencia de lo observado con otros nitroheterociclos. El daño provocado por la nitazoxanida implica alteraciones en el citoplasma, la membrana plástica y el citoesqueleto del parásito, pero sin modificar la organización de los microtúbulos ⁽³⁸⁾.

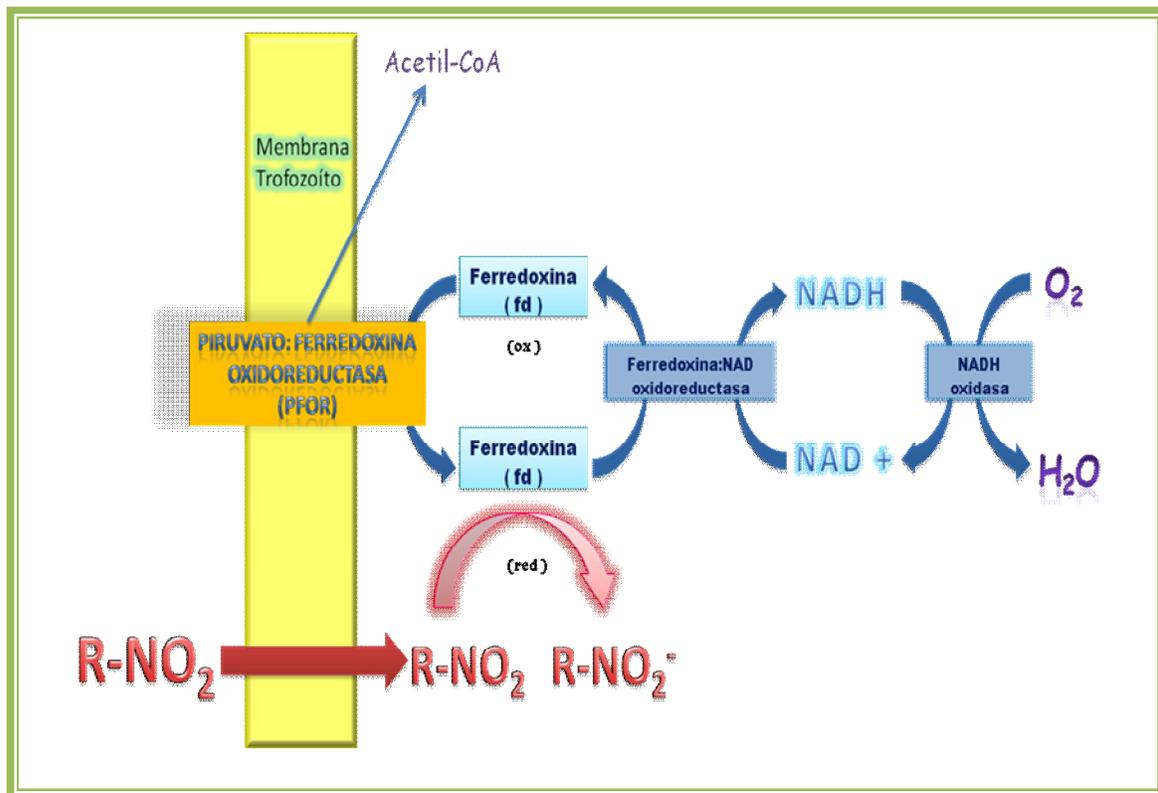


FIGURA 8. Mecanismo de activación de fármacos heterocíclicos con un grupo nitro. Tomado de Upcroft, P. Upcroft, J. *Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa*. *Clinical Microbiology Reviews* 2001, 14:150-164.

Es importante mencionar que hay evidencias de falla terapéutica con el empleo de derivados 5-nitroimidazoles, posiblemente debido por un lado al abandono del tratamiento ocasionado por las reacciones adversas que inducen y por otro a la presencia de cepas de parásitos resistentes a los mismos.

Ante estas circunstancias, es necesaria la búsqueda de nuevos compuestos que puedan ser usados en la quimioterapia de la amibiasis.

1.2.2. Derivados bencimidazólicos

Los derivados bencimidazólicos son un grupo de compuestos ampliamente utilizados como fungicidas, herbicidas, antiparasitarios y antibacterianos ⁽³⁹⁾. Debido a la diversidad en su actividad biológica y sus aplicaciones clínicas, el anillo bencimidazólico ha sido utilizado como estructura prototipo (líder) en la búsqueda y optimización de principios quimioterapéuticos.

El uso de los derivados bencimidazólicos como agentes antiparasitarios inició con el descubrimiento del tiabendazol en 1961. No obstante que este compuesto poseía un amplio espectro de actividad antiparasitaria tenía la desventaja de ser rápidamente biotransformado a su metabolito inactivo, el 5-Hidroxitiabendazol ⁽⁴⁰⁾. Para evitar la inactivación metabólica se desarrollaron análogos del tiabendazol con diferentes sustituyentes en la posición 5; posteriormente se llevó a cabo el diseño y la síntesis de nuevos derivados sustituidos también en la posición 2, dando origen a los bencimidazol-2-carbamatos de metilo. De este grupo destacan el Albendazol y el Mebendazol fármacos utilizados actualmente en el tratamiento de diversas helmintosis a nivel gastrointestinal y sistémico.

Estos bencimidazoles muestran afinidad selectiva por la β -tubulina de los parásitos helmintos. La interferencia con la polimerización y, por lo tanto, el bloqueo de la formación de los microtúbulos provocan cambios en la estructura y las funciones normales de los parásitos ⁽⁴¹⁾.

El Albendazol ha sido utilizado con buenos resultados como agente giardicida pero no así como amebicida. Esto se debe a que el citoesqueleto de *E.histolytica* está formado principalmente por actina en lugar de tubulina ⁽⁴²⁾.

2. Planteamiento del problema

Nuestro grupo de investigación está interesado en el desarrollo de nuevas moléculas que puedan ser empleadas como alternativa en el tratamiento de la amibiasis.

Dentro de los métodos generales para la obtención de nuevos fármacos se considera la modificación molecular a través del proceso de asociación molecular, el cual se basa en la unión de dos estructuras con una determinada actividad, con el fin de potenciarla. La nueva molécula formada incorpora algunas o todas las agrupaciones de los compuestos originales; cuando la asociación es de partes distintas o mixtas por formación de enlace covalente entonces dicho proceso se denomina hibridación molecular.⁽⁴³⁾ La importancia de la evaluación de este tipo de moléculas radica en el interés por conocer qué efecto sobre la actividad biológica tendrá la unión de la parte farmacofórica proveniente de moléculas que han presentado buena actividad antiparasitaria.

Por tal motivo se consideró el diseño y síntesis de moléculas híbridas del bencimidazol y el grupo nitrofurano que forma parte del Nifurtimox, fármaco utilizado en el tratamiento de Tripanosomiasis (Enfermedad de Chagas causada por *Trypanosoma cruzi*) (Figura 9). El anillo bencimidazólico tiene en posición 1 un -H o un -CH₃ y en posición 2 se incluyeron como sustituyentes los grupos -CH₃, -CF₃ y -SCH₃, los compuestos híbridos sintetizados se presentan en la Tabla 1.

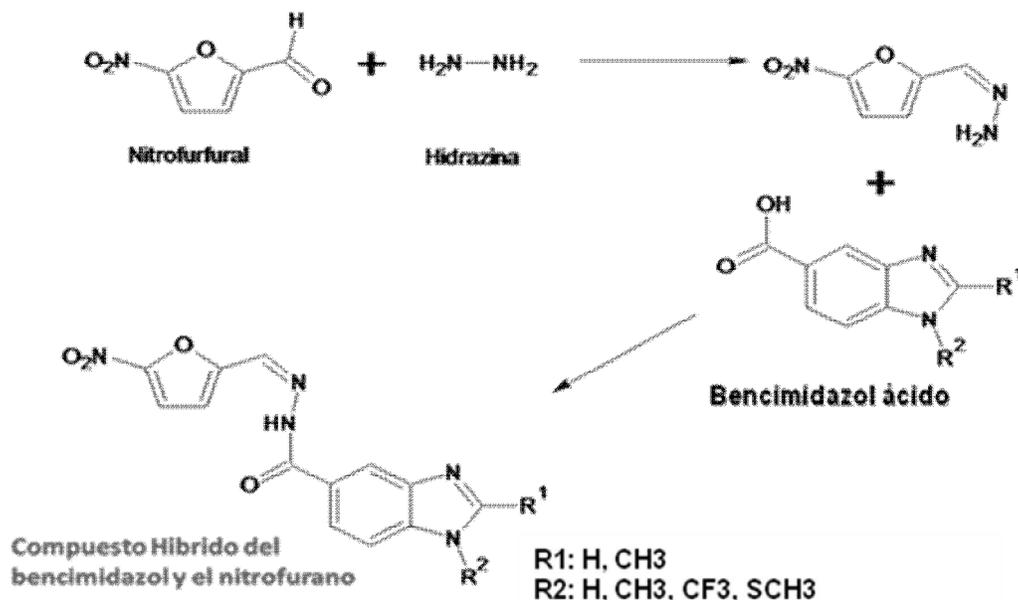
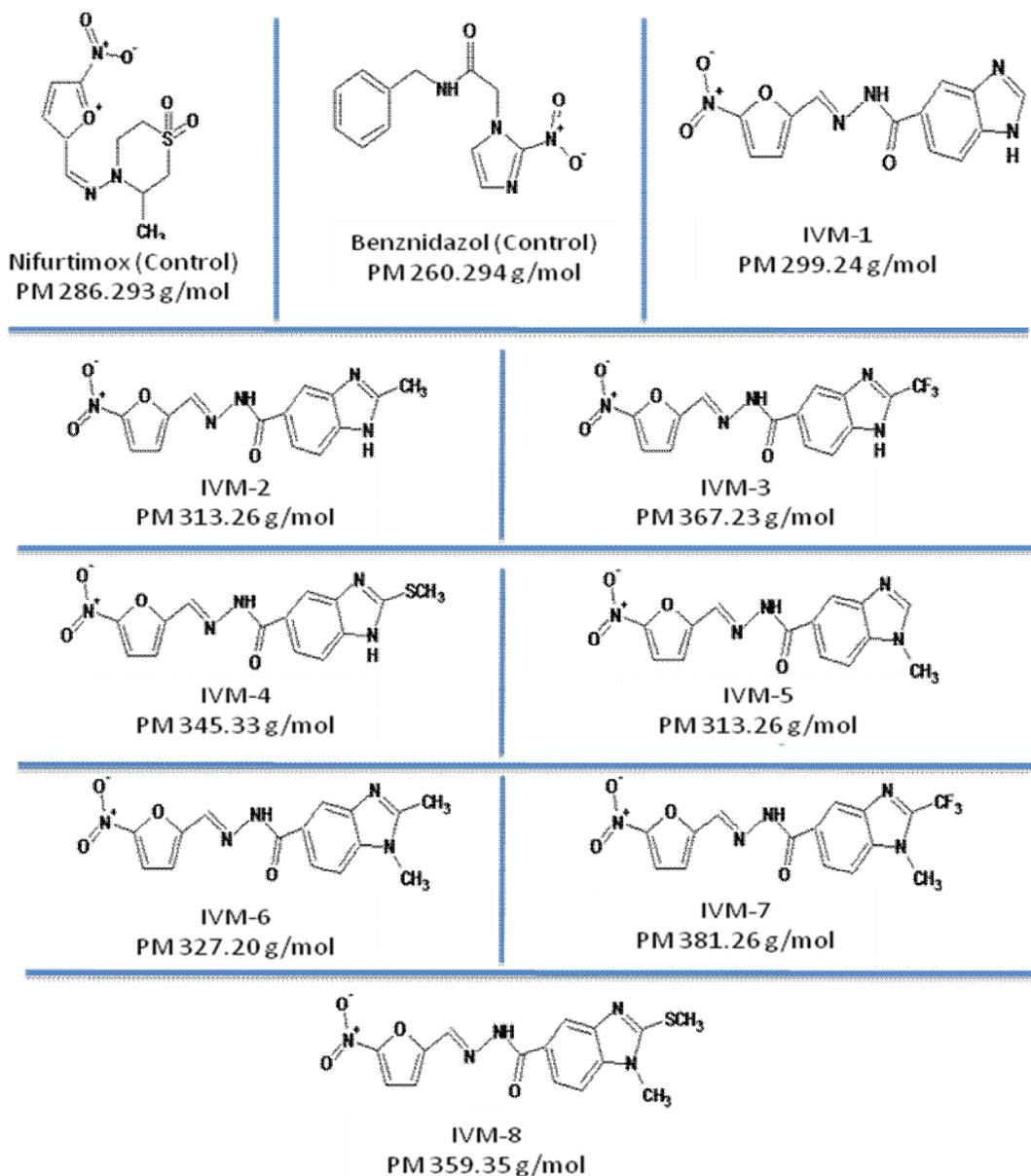


FIGURA 9. Formación de las moléculas híbridas evaluadas en este trabajo de tesis.

Tabla 1. Compuestos híbridos del bencimidazol con el nitrofurano (IVM-1 a IVM-8)*, Nifurtimox y Benznidazol.



* Los compuestos IVM-1 a IVM-8 fueron sintetizados por Israel Velázquez Martínez, en el laboratorio 122 del Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.

COMPUESTO	R1	R2	NOMBRE
IVM - 1	H	H	<i>N'</i> -[(<i>E</i>)-(5-nitrofurán-2-il)metiliden]-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carbohidrazida
IVM - 2	H	CH3	2-metil- <i>N'</i> -[(<i>E</i>)-(5-nitrofurán-2-il)metiliden]-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carbohidrazida
IVM - 3	H	CF3	<i>N'</i> -[(<i>E</i>)-(5-nitrofurán-2-il)metiliden]-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carbohidrazida
IVM - 4	H	SCH3	2-(metilsulfanil)- <i>N'</i> -[(<i>E</i>)-(5-nitrofurán-2-il)metiliden]-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carbohidrazida
IVM - 5	CH3	H	1-metil- <i>N'</i> -[(<i>E</i>)-(5-nitrofurán-2-il)metiliden]-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carbohidrazida
IVM - 6	CH3	CH3	1,2-dimetil- <i>N'</i> -[(<i>E</i>)-(5-nitrofurán-2-il)metiliden]-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carbohidrazida
IVM - 7	CH3	CF3	1-metil- <i>N'</i> -[(<i>E</i>)-(5-nitrofurán-2-il)metiliden]-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carbohidrazida
IVM - 8	CH3	SCH3	1-metil-2-(metilsulfanil)- <i>N'</i> -[(<i>E</i>)-(5-nitrofurán-2-il)metiliden]-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carbohidrazida

Este trabajo de tesis se propone llevar a cabo la evaluación *in vitro* de la actividad amebicida de los compuestos híbridos IVM-1 a IVM-8. Los resultados que se obtengan permitirán determinar si las moléculas híbridas son más eficientes que los fármacos de elección en el tratamiento de la amibiasis.

3. Hipótesis

Los compuestos híbridos del bencimidazol y el 5-nitrofurano con diferentes sustituyentes en posición 1 y 2 presentarán actividad amebicida y ésta será mayor que la Nitazoxanida, el Metronidazol y el Nifurtimox.

4. Objetivos

4.2. Objetivo general

Evaluar la actividad amebicida *in vitro* de los compuestos IVM-1 a IVM-8.

4.3. Objetivos Particulares

4.3.2. Determinar la CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de los compuestos IVM-1 a IVM-8 contra *E. histolytica*, mediante el método de subcultivo y análisis Probit.

4.3.3. Analizar la relación estructura – actividad amebicida (SAR) de IVM-1 a IVM-8.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1. Determinación de la curva de crecimiento de *Entamoeba histolytica*.

Trofozoitos de *E. histolytica*, cepa HM1/IMSS se mantuvieron en medio de cultivo TYI-S-33 modificado suplementado con suero de ternera al 10% de acuerdo a lo descrito con anterioridad ⁽³⁵⁾. La preparación del medio TYI-S-33, así como el mantenimiento del cultivo axénico y la determinación del número de trofozoitos/mL se indica en el ANEXO 1.

A partir de cultivos axénicos de trofozoitos de *E. histolytica*, cepa HM1/IMSS se llevaron a cabo las curvas de crecimiento correspondientes.

A partir de un cultivo axénico de trofozoitos de *E. histolytica* se inocularon 6×10^3 / tubo en 1mL de medio de cultivo. Los trofozoitos se incubaron a $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ y se contaron a las 24, 48, 72, 96h de cultivo empleando una cámara de Newbauer. El ensayo se realizó por triplicado.

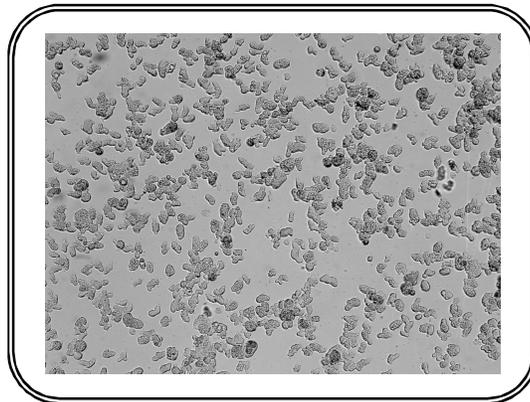


FIGURA 10. Fotomicrografía. Trofozoitos de *E. histolytica* en confluencia del 80% medio TYI-S -33. Magnificación 40X.

El número de trofozoitos/mL se graficó en función del tiempo (h), determinándose la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria de los trofozoitos en el cultivo.

5.2. Determinación de la actividad amebicida *in vitro* de los compuestos IVM-1 a IVM-8.

Para determinar la actividad de los compuestos híbridos, se empleó el método previamente descrito por Cedillo y Muñoz, (1992) ⁽⁴⁴⁾.

Se procedió a preparar, una solución stock de 10 mg/mL de cada uno de los compuestos empleando como disolvente dimetilsulfóxido (DMSO) a partir de la cual se realizó una serie de diluciones para la obtención de concentraciones finales de 0.01, 0.005, 0.1, 0.5 y 1 $\mu\text{g/mL}$ (Diagramas en ANEXO 1). El Metronidazol y la Nitazoxanida se incluyeron como controles positivos así como el Nifurtimox y Benznidazol a las mismas concentraciones y como control negativo se cultivaron los parásitos en medio libre de compuestos.

Para la evaluación de la actividad biológica a 6×10^3 trofozoitos de *E. histolytica*/ mL, se les añadieron las diferentes concentraciones de los compuestos. Los tubos se incubaron a $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ por 48h.

Después de este tiempo, los tubos se enfriaron a 4°C por 30min para promover el desprendimiento de los trofozoitos de la pared del tubo y se determinó el número de trofozoitos vivos/mL en cada una de las concentraciones empleadas observando la movilidad y refringencia de los trofozoitos al observarlos al microscopio y con la ayuda de la cámara de Neubauer. El ensayo se realizó por triplicado.

Una vez determinado el número de trofozoitos vivos, se calculó el número de trofozoitos muertos, considerando la diferencia entre el número de trofozoitos presentes en el control negativo y el número de trofozoitos en cada uno de los tubos con las diferentes concentraciones de los compuestos. . El número de trofozoitos muertos, obtenidos en cada una de las concentraciones empleadas ($\mu\text{g/mL}$) se empleó para el cálculo de la concentración que inhibe el crecimiento del 50% de los trofozoitos ($\text{CI}_{50, \mu\text{g/mL}}$) mediante un análisis PROBIT de concentración-respuesta con el programa de cómputo PROBIT (C.U.I.D.A).

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Curva de crecimiento de *Entamoeba histolytica*.

El número de trofozoitos obtenido a los diferentes tiempos de incubación se presentan en la Tabla 2. La curva de crecimiento de *E. histolytica* se muestra en la Figura 11.

Tabla 2. Número de trofozoitos de *E. histolytica*, obtenidos a diferentes tiempos de cultivo.

Tiempo (h)	No. de Trofozoitos/mL (Ensayo 1)	No. de Trofozoitos/mL (Ensayo 2)	No. de Trofozoitos/mL (Ensayo 3)	Promedio
0	6000	6000	6000	6000
24	22500	14166	23333	19999
48	27500	19166	30833	25833
72	26666	27500	26666	26944
96	13333	22500	16666	17499

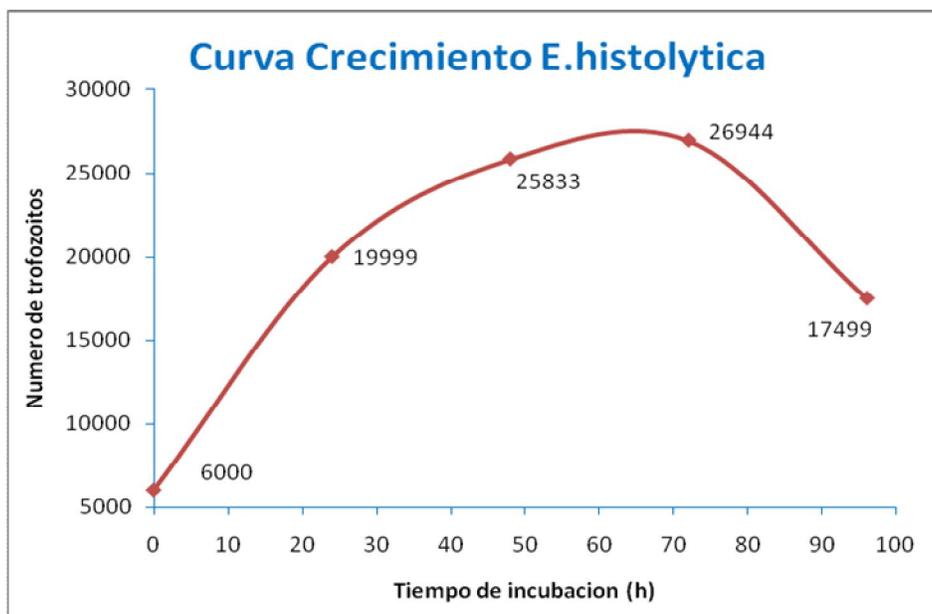


Figura 11. Curva de crecimiento de *E. histolytica* utilizando el promedio del número de trofozoitos/mL obtenido en tres ensayos.

En la Figura 11 se observa que entre las 15h y 48h, los trofozoitos se encuentran en una fase de crecimiento exponencial o logarítmica, la fase estacionaria se observa entre las 50h y las 72h y la fase de muerte se presentó a partir de las 72h. Considerando la curva de crecimiento, se estableció 48h como un tiempo óptimo de incubación de los trofozoitos en presencia de cada uno de los compuestos ya que durante esta fase de crecimiento del parásito, se puede determinar el efecto de un compuesto, siendo este exclusivo de los compuestos que se evalúan y no debido a un sobre-crecimiento de los trofozoitos, que generaría una deficiencia de nutrientes en el medio de cultivo y como consecuencia su muerte.

6.2. Determinación de la actividad amebicida *in vitro* de los compuestos híbridos IVM-1 a IVM-8.

Los datos obtenidos de trofozoitos vivos y muertos para cada ensayo, se muestran en el ANEXO 2. En la Tabla 3 se muestra la actividad amebicida *in vitro* de los compuestos evaluados, representada por la CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$). Los compuestos híbridos **IVM-3** e **IVM-7** resultaron ser los más activos contra *E. histolytica*, con valores de CI_{50} de 0.007 y 0.002 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Por otro lado, los compuestos **IVM-1** e **IVM-8** presentaron la menor actividad (CI_{50} = 0.022 $\mu\text{g/mL}$). Con respecto al compuesto **IVM-7** sería importante hacer nuevos ensayos con concentraciones más bajas del compuesto para confirmar la CI_{50} .

Tabla 3. Actividad amebicida de los compuestos híbridos IVM-1 a IVM-8 y de los compuestos de referencia.

Compuesto	CI ₅₀ (µg/mL)	Promedio CI ₅₀ (µg/mL)	Intervalo de Confianza 95%
IVM – 1	0.022	0.022	0.022 – 0.023
	0.022		
	0.022		
IVM – 2	0.018	0.018	0.017 – 0.020
	0.019		
	0.018		
IVM – 3	0.006	0.007	0.006 – 0.009
	0.009		
	0.008		
IVM – 4	0.019	0.020	0.019 – 0.022
	0.020		
	0.021		
IVM – 5	0.014	0.013	0.012 – 0.014
	0.012		
	0.013		
IVM – 6	0.015	0.015	0.015 – 0.016
	0.016		
	0.015		
IVM - 7	0.002	0.002	0.001 – 0.003
	0.003		
	0.001		
IVM - 8	0.023	0.022	0.020 – 0.023
	0.023		
	0.020		

Compuesto	Cl ₅₀ (μg/mL)	Promedio Cl ₅₀ (μg/mL)	Intervalo de Confianza 95%
Nitazoxanida (NTZ)	0.016	0.015	0.011 – 0.020
	0.011		
	0.019		
Metronidazol (MTZ)	0.034	0.035	0.032 – 0.041
	0.040		
	0.032		
Benznidazol	0.058	0.051	0.044 – 0.059
	0.045		
	0.050		
Nifurtimox	0.027	0.027	0.026 – 0.030
	0.026		
	0.030		

Todos los compuestos híbridos del bencimidazol con el nitrofurano fueron más activos que el Metronidazol contra *E. histolytica* (Cl₅₀=0.035), que es el fármaco de elección en el tratamiento de la amebiasis (Figura 12). **IVM-3** e **IVM-7** fueron 5 y 17.5 veces más potentes que el Metronidazol, respectivamente. En el caso del Benznidazol (Cl₅₀= 0.051 μg/mL) todos los híbridos fueron más activos contra *E. histolytica*, destacando **IVM-7**, que fue 25 veces más potente que el benznidazol. Con respecto a la Nitazoxanida (Cl₅₀= 0.015 μg/mL) los compuestos **IVM-3** e **IVM-7** fueron 2.1 y 7.5 veces más potentes que ésta, además, **IVM-5** e **IVM-6** tuvieron una actividad amebicida similar a este fármaco (Figura 13). Todos los compuestos híbridos, con excepción del **IVM-1**, fueron más activos que el Nifurtimox, sobresaliendo **IVM-3** e **IVM-7**, con una potencia 3.8 y 13.5 veces mayor que este fármaco (Figura 14).

Los resultados obtenidos indican que en las moléculas híbridas se potenció la actividad del nitrofurano al unirse con el bencimidazol.

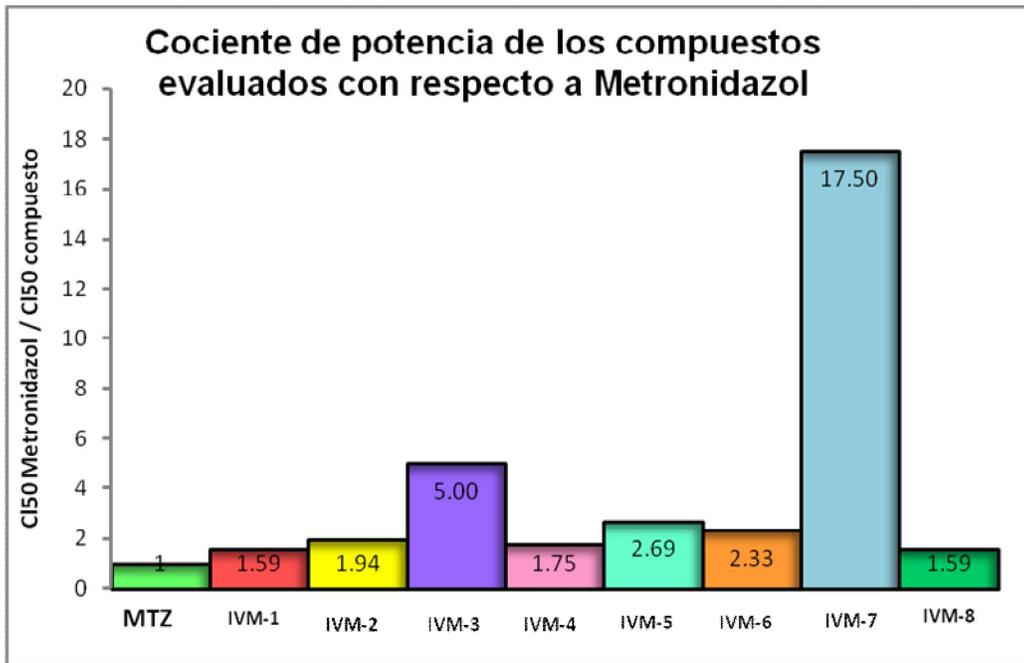


Figura 12. Cociente de potencia de los compuestos evaluados con respecto a Metronidazol.

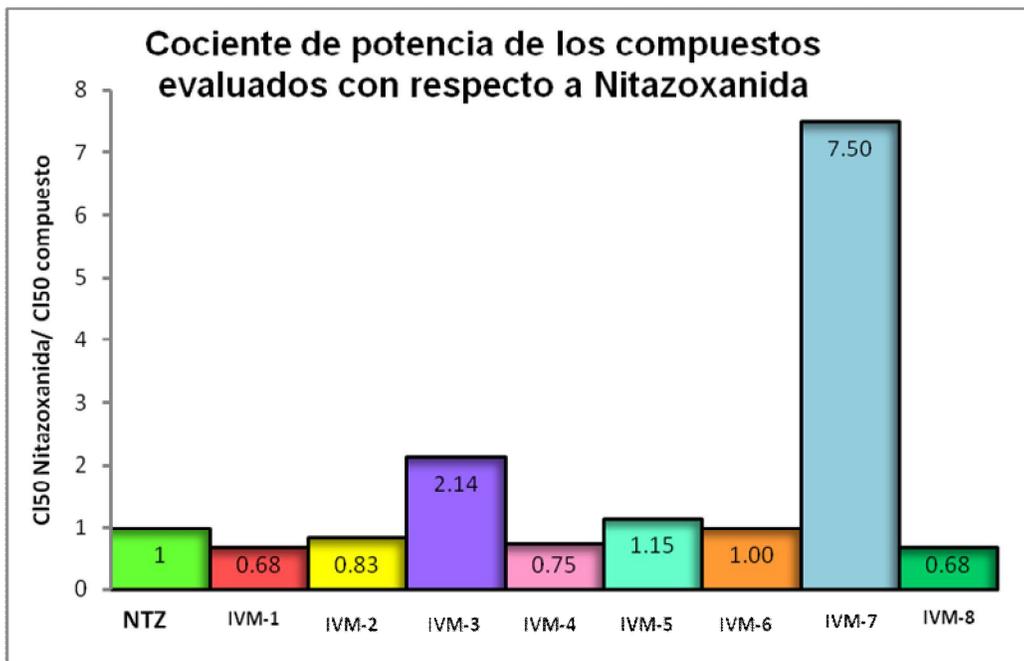


Figura 13. Cociente de potencia de los compuestos evaluados con respecto a Nitazoxanida.

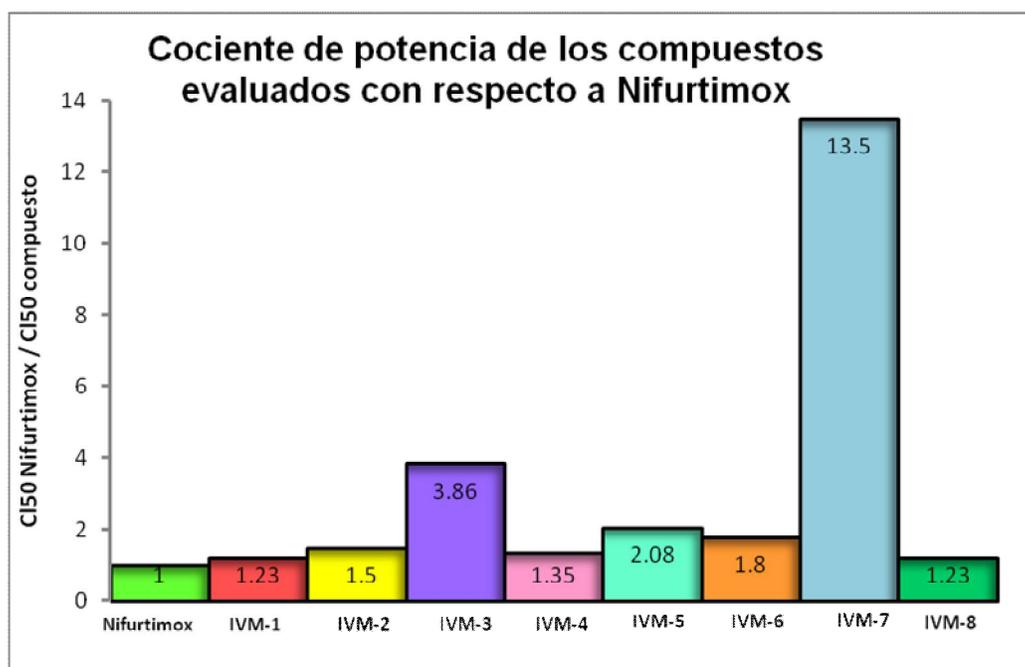


Figura 14. Cociente de potencia de los compuestos evaluados con respecto a Nifurtimox.

6.3. Relación estructura-actividad (SAR) actividad amebicida *in vitro* de los compuestos IVM-1 a IVM-8.

Para llevar a cabo el análisis SAR de los compuestos híbridos estos se dividieron en dos grupos A y B de acuerdo al sustituyente (H o CH₃, respectivamente) en posición 1. De esta forma en el **grupo A** se incluyeron los compuestos **IVM-1 a IVM-4** y en el **grupo B** los compuestos **IVM-5 a IVM-8**. (Tabla 4.)

Tabla 4. Compuestos que conforman los grupos **A** y **B** así como su actividad amebicida (CI_{50}).



COMPUESTO	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	R1	R2
GRUPO A			
IVM - 1	0.022	H	H
IVM - 2	0.018	H	CH3
IVM - 3	0.007	H	CF3
IVM - 4	0.020	H	SCH3
GRUPO B			
IVM - 5	0.013	CH3	H
IVM - 6	0.015	CH3	CH3
IVM - 7	0.002	CH3	CF3
IVM - 8	0.022	CH3	SCH3

Con respecto a la relación estructura - actividad se obtuvieron los siguientes resultados:

Del **Grupo A**, el compuesto menos activo fue **IVM-1**, con un sustituyente H en posición 2, mientras que **IVM-3** con un sustituyente CF₃ en posición 2 del anillo bencimidazólico fue el más activo dentro de este grupo, con un valor de CI₅₀= 0.007 µg/mL. Del análisis SAR, resulta evidente que el grupo CF₃ confiere una mayor actividad amebicida a la molécula. Los sustituyentes SCH₃ y CH₃ confirieron a la molécula una actividad intermedia.

Con respecto al **Grupo B**, se observó que el compuesto menos activo fue **IVM-8**, con un grupo SCH₃ en posición 2 del anillo bencimidazólico, mientras que el más activo fue el compuesto **IVM-7**, con un sustituyente CF₃ en la misma posición. Es importante resaltar que la sustitución del H por un grupo CH₃ en posición 1 del compuesto **IVM-7** incrementó más de 3 veces la actividad en comparación con **IVM-3** (CI₅₀= 0.007 µg/mL vs 0.002 µg/mL). El mismo aumento de actividad se observó en **IVM-5** en comparación con **IVM-1** (CI₅₀=0.022 y 0.013 µg/mL, respectivamente). Sin embargo, esta sustitución no afectó la actividad de los compuestos **IVM-6** e **IVM-8** con sustituyentes CH₃ y SCH₃ respectivamente. De lo anterior se concluye que el grupo CH₃ en posición 1 confiere mayor actividad a la molécula cuando ésta tiene sustituyentes H o CF₃ en posición 2 del anillo bencimidazólico.

El análisis SAR de los compuestos híbridos muestra que el grupo CF₃ confiere la mayor actividad amebicida a la molécula y que ésta se ve aumentada cuando el anillo bencimidazólico tiene un sustituyente CH₃ en posición 1.

7. CONCLUSIONES

- ✓ De los 8 compuestos híbridos evaluados **IVM-3** (*N'*-[(*E*)-(5-nitrofurano-2-il)metilideno]-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carbohidrazida) y **IVM-7** (1-metil-*N'*-[(*E*)-(5-nitrofurano-2-il)metilideno]-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-carbohidrazida) fueron más activos contra *E. histolytica* que los fármacos de referencia Metronidazol, Nitazoxanida y Nifurtimox.
- ✓ El grupo CF₃ le confirió mayor actividad a la molécula y ésta se ve aumentada cuando hay un grupo CH₃ en posición 1 del anillo bencimidazólico.
- ✓ La actividad amebicida del nitrofurano se potenció en los compuestos de la serie IVM al estar en asociación molecular con el bencimidazol.

8. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Sánchez JT, Tay J, Robert L, Romero R, Ruiz D, Rivas C. *Frecuencia de parasitosis intestinales en asentamientos humanos irregulares*. Rev Fac Med. 2000; 43(3):80-83.
- 2.- Bernal SG, Rebollo VFJ. *Estado actual de la amibiasis*. Cir & cir. 1999; 67(6): 218-221.
- 3.- Anzurez LB. *Pediatría General*. Rev med Hosp Gen Mex. 2005; 68(2): 106-114.
- 4.- Sociedad Mexicana de Parasitología, A.C. *Amibiasis en el siglo XXI*. Idisa México 2008.
- 5.- World Health Organization. Amoebiasis. Weekly Epidemiological Record.1997; 72: 97-99.
- 6.- Organización Panamericana de la Salud. Informe de la OMS/OPS/UNESCO. Consulta con expertos en amibiasis. Boletín Epidemiológico.1997; 18(1):13-14.
- 7.- Haque R, Neville I, Hahn P, Petri A Jr. Rapid diagnosis of Entamoeba infection by using Entamoeba and Entamoeba histolytica stool antigen detection kits. J Clin Microbiol.1995; 33: 2558-2561.
- 8.- Abd-Alla M.D, Jackson T.F, Gathiram V, El-Awey A.M, Ravdin J.I. *Differentiation of pathogenic Entamoeba histolytica infections from non-pathogenic infections by detection of galactose-inhibitable adherence protein antigen in sera and feces*. J Clin Microbiol.1993; 31:2845-2850.
- 9.- Petri A Jr, Haque R, Lyerly D, Vines RR. Estimating the impact of amebiasis on health. Parasitol Today .2000; 16:320-321.
- 10.- Disponible en: [URL:http://www.salud.mx](http://www.salud.mx)
- 11.- Caballero A, Viveros M, Salvatierra B, Tapia R, Sepúlveda J, Gutiérrez G, Ortiz L. *Seroepidemiology of amebiasis in México*. Am J Trop Med Hyg. 1994; 50:412-419.
- 12.- Ximénez C. Parasitosis intestinal en México. Cuadernos FunSalud (34). Fundación Mexicana para la Salud Ed. México DF, México. 2000.
- 13.- Ximénez C. Parasitosis intestinales en México. Cuadernos FunSalud (36). Fundación Mexicana para la Salud Ed. México DF, México. 2002.
- 14.- Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica 2009. Disponible en: [URL:http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2009/sem27/pdf/edit2709.pdf](http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2009/sem27/pdf/edit2709.pdf)
- 15.- Pearce N. Tradicional epidemiology, modern epidemiology and public health. Am J Public Health .1996;86:678-683.

- 16.- Martínez PA. *Las amibas Enemigos Invisibles*. 3^oed. México. FCE.SEP; 2002.
- 17.- Tay J, Lara AR, Velasco CO, Gutiérrez QM. *Parasitología Médica*. 7^oed. México. Méndez Ed; 2000.
- 18.- Sepúlveda B, Treviño MN. *Cuadro clínico y diagnóstico de la amibiasis*. México. Medica Panamericana; 1989.
- 19.- Shore A, *Diagnóstico parasitológico, Manual de Laboratorio Clínico*, 2^o ed. México. Panamericana; 1983.
- 20.- Meléndez E, Sánchez J. *Parasitología Médica Básica. Protozoarios*. 2^oed. México. Ediciones Fundaeducó;1999.
- 21.- Atías A. *Características Generales de las Enteroparasitosis*. 3^oed. Chile. Mediterraneo; 1991.
- 22.- Arroyo R, Orozco E. *Localization and identification of an Entamoeba histolytica adhesion*. Mol Biochem Parasitol. 1987; 23:151-158.
- 23.- Tsutsumi V, Mena R, Anaya F, Martínez A. Cellular basis of experimental amebic liver abscess formation. Am J Pathol. 1984; 117:81-91.
- 24.- Mirelman D. *Ameba-bacterium relationship in amebiasis*. Microbiol Rev. 1987; 51:272-284.
- 25.- Pacheco J, Shibayama M, Campos R, Beck L, Houpt E, Petri A Jr, Tsutsumi V. In vitro and in vivo interaction of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin with various target cells: an immunocytochemical analysis. Parasitol Int, 2004; 53: 35-47.
- 26.- Saffer D, Petri A Jr. Role of the galactose lectin of *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. Infect Immun.1991; 59: 4681 – 4683.
- 27.- Jacobs T, Bruchhaus I, Dandekar T, Tannich E, Leippe M. Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. Mol Microbiol.1998; 27: 269-276.
- 28.- Okada M, Huston C, Mann J, Petri A Jr, Kita K, Nozaki T. Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Eukaryot Cell.2005; 4: 827-831.
- 29.- Tsutsumi V, Shibayama M. *Experimental amebiasis: a selected review of some in vivo models*. Arch Med Res.2006; 37: 210-220.

- 30.- Tillack M, Biller L, Irmer H, Freitas M, Gomes M.A, Tannich E, Bruchhaus I. The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics*.2007; 8: 170-184.
- 31.- Reer S.L, Keene W.E, McKerrow J.H. Thiol proteinase expression correlates with pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2772-2777.
- 32.- Keene W.E, Hidalgo M.E, Orozco E, Mckerrow J.H. *Entamoeba histolytica: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase*. *Exp Parasitol*.1990; 71: 199-206.
- 33.- Reed L. Harrison principios de medicina interna.16 ed. México. McGraw-Hill Interamericana editores. 2006.
- 34.- Johnson P. *Metronidazole and Drug Resistance*. *Parasitology Today*.1993; 9:183-186.
- 35.- Cedillo R, Chávez B, González A, Tapia A, Yépez L. *In vitro effect of Nitazoxanide Against Entamoeba histolytica, Giardia Intestinalis and Trichomonas vaginalis Trophozoites*. *J Eukaryotic Microbiol*. 2002; 49: 201-208.
- 36.1- Fonseca F, Martínez MM, Martínez AR. *Nematocidal activity of nitazoxanide in laboratory models*. *Parasitol Res*.2003; 91(4):321-324.
- 37.- Gilles H, Hoffman P. *Treatment of intestinal parasitic infections: a review of Nitazoxanide*. *Trends in Parasitology*. 2002; 18: 95-97.
- 38.- Wang CC. *Basic Principles of Antiparasitic Chemotherapy*. 8 ed. USA. Basic & Clinic Pharmacology.2001.
- 39.- Lacey E. *Mode of action of benzimidazoles*. *Parasitology Today*.1990; 6:112-115.
- 40.- Reynoldson J, Thompson R, Horton R. Albendazole as a Future Antigiardial Agent. *Parasitology Today*.1992; 8:412-414.
- 41.- Avendaño MC. Introducción a la Química Farmacéutica.España. Interamericana McGraw-Hill.1993.
- 42.- Cedillo R, Muñoz O. In-vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J Med Microbiol*. 1992; 37:221-224.

ANEXO I. Materiales y métodos.

Materiales

Fármacos de Referencia

- ◆ Benznidazol (proporcionado por el Dr. Castillo. Fac. Química, UNAM)
- ◆ Metronidazol (Sigma)
- ◆ Nifurtimox (proporcionado por el Dr. Castillo. Fac. Química, UNAM)
- ◆ Nitazoxanida (proporcionado por el Dr. Castillo. Fac. Química, UNAM)

Reactivos.

- ◆ Bilis (Sigma)
- ◆ Biosate (tripticasa BBL / extracto de levadura BBL)
- ◆ Citrato ferrico (Sigma)
- ◆ Cloruro de Sodio (NaCl) (Merck)
- ◆ D-(+)-glucosa (Sigma)
- ◆ Dimetilsulfóxido DMSO (J.T. Baker)
- ◆ Etanol Industrial
- ◆ Fosfato de potasio dibasico (KH_2PO_4)(J.T. Baker)
- ◆ Fosfato de potasio monobásico (KHPO_4)(J.T. Baker)
- ◆ L- ácido ascórbico (Sigma)
- ◆ L-cisteina (ICN Biochemicals)
- ◆ Medio de cultivo Gelosa-Sangre
- ◆ Mezcla de vitaminas Tween 80 Diamond (In vitro)
- ◆ Suero fetal de ternera (Invitrogen Corporation)

Equipos e Instrumentos.

- ◆ Autoclave
- ◆ Balanza analítica (Sartorius)
- ◆ Cámara de Nuebauer Superior Marienfield (profundidad: 0.100 mm, 0.0025m²)
- ◆ Charola de plástico
- ◆ Congelador (Thermo Forma)
- ◆ Espátula
- ◆ Filtro de nitrocelulosa (0.22 μm y 0.45 μm de diámetro de poro) marca Millipore.
- ◆ Frascos Schott con capacidad de 50 mL, 100mL y 1000mL
- ◆ Gabinete de seguridad biológica clase II (UN-425-400 Nuaire)
- ◆ Gasas
- ◆ Gradilla de plástico
- ◆ Incubadora (REVCO)
- ◆ Micropipetas 100μL, 200μL y 1000μL.
- ◆ Microscopio invertido (Axiovert 25, Carl Zeiss)
- ◆ Pinzas
- ◆ Pipeta graduada de 10ml
- ◆ Puntas amarillas y azules
- ◆ Refrigerador (LG)
- ◆ Tubos de ensayo con rosca
- ◆ Tubos eppendorf
- ◆ Vaso de precipitados de plástico



Figura 15. Foto. Material de laboratorio

Métodos.

❖ Preparación del medio de cultivo TYI-S-33 para *Entamoeba histolytica*. (Diamond, 1978)

COMPUESTO	CANTIDAD
Cloruro de Sodio (NaCl)	2.0 g
Fosfato de potasio dibásico (KH ₂ PO ₄)	1.0 g
Fosfato de potasio monobásico (K ₂ HPO ₄)	1.0 g
D-(+)-glucosa	10.0 g
Biosate, peptona	30.0 g
L- cisteína	1.0 g
L-acido ascórbico	0.2 g
Citrato férrico	0.022 g
Agua bidestilada	Cbp 1L
	pH final 7.0 – 7.2

Se disolvieron con agitación cada uno de los compuestos en 900mL de agua bidestilada. Se ajustó el pH de la mezcla y posteriormente esta se transfirió a un matraz aforado de 1L para llevar a volumen con agua bidestilada. El medio se esterilizó por filtración (filtros Millipore de 0.22 y 0.45 µm) y recolectó en frascos Schcott de 500mL previamente estériles. Finalmente, el medio se sometió a prueba de esterilidad.

El medio TYI-S-33 se complementó con 10% v/v suero de ternera descomplementado (56°C por 30min) y 3% v/v de mezcla de vitaminas – agente tensoactivo Tween 80.

❖ Prueba de esterilidad

Se tomaron alícuotas de 4 μ L de cada uno de los medios de cultivo y sembraron en placas de agar sangre, las cuales se incubaron a 37°C \pm 0.5°C por 48 horas junto con los frascos que contenían los medios de cultivo, adecuadamente sellados y etiquetados. Transcurrido el tiempo de incubación, se verificó que tanto en las placas como en los frascos no se observara crecimiento bacteriano o fúngico, indicador de contaminación. Finalmente, los medios de cultivo se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

❖ Mantenimiento de cultivo axenico de trofozoitos de *E.histolytica*.

La cepa de trofozoitos de *E. histolytica*, cepa HM1/IMSS se mantuvo en el medio de cultivo TYI-S-33 en tubos de ensayo de vidrio con capacidad de 8mL. La resiembra de la cepa se realizo regularmente cada 72 horas, de acuerdo al crecimiento observado al microscopio con una confluencia del 100%(presencia de una monocapa).

Tubos con confluencia del 100% se trataron de dos formas:

1. Se decantó el medio contenido en los tubos, para eliminar los trofozoitos sin adherir, se añadió 6mL de medio nuevo, se etiqueta como tubo listo para realizar ensayo y se pone a incubar a 37°C \pm 0.5°C por 24h.
2. O bien si no se iba a realizar ensayo los tubos se colocaban en un baño de hielo durante 10 min para promover el desprendimiento de los trofozoitos de la pared del tubo. Transcurrido el tiempo, un volumen de 30 μ L de inóculo se transfirió a un tubo de ensayo de vidrio con 6mL de medio nuevo, se etiquetó y se incubó a 37°C \pm 0.5°C por 72h.

En caso de no observarse el 90-100% de confluencia, únicamente se llevó a cabo el cambio de medio a los tubos con el cultivo, sin previa incubación en baño de hielo.

❖ Determinación del número de trofozoitos/mL

CAMARA DE NEUBAUER

En las investigaciones realizadas en el campo de la biología celular, con frecuencia se llega a la necesidad de conocer con exactitud la cantidad de células utilizadas en los experimentos.

La cámara de Neubauer es una cámara de conteo adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. También es conocida como hemocitometro o cámara cuenta glóbulos.

Consta de un cubreobjetos grosor mucho mayor que los portaobjetos de uso común. En la cara superior del portaobjetos, se encuentran cuatro canales longitudinales y un canal transversal central, a cuyo lado superior e inferior existen grabados dos cuadros de 9mm^2 de superficie, subdivididos a su vez en una cuadrícula mas fina. Al colocar el cubreobjetos encima de la superficie donde se encuentra grabada la cuadrícula, existe entre ellos una distancia fija de 0.1mm . Las marcas del portaobjetos se han marcado con la ayuda de un diamante.



FIGURA 16. Foto. Cámara de Neubauer (MARIENFELD).

La cuenta de trofozoitos de *E. histolytica* se llevó a cabo utilizando una cámara de Neubauer y un microscopio invertido. Para realizar la cuenta de trofozoitos se llevaron a cabo los siguientes pasos;

1.- La cámara de Neubauer se limpió perfectamente con la ayuda de una gasa y alcohol. Los tubos se enfriaron con un baño de hielo durante 30min.

2.- Se colocó una alícuota de 12 μ L de trofozoitos, proveniente de los tubos en baño de hielo, en una de las cámaras del hemocitómetro.

3.- Con la ayuda del microscopio en un aumento 10X se contaron los trofozoitos presentes en cada cuadrante siguiendo la numeración de la Figura 17.

4.- Para saber la concentración real de trofozoitos/mL en el tubo, se llevó a cabo la siguiente operación:

$$\text{Concentración (trofozoitos/mL)} = (X/4) * 10,000$$

Que básicamente es el número de trofozoitos totales dentro de los cuatro cuadrantes, se dividió entre cuatro y se multiplicó por el factor de corrección (10,000), este último considera el volumen de la cámara así como la profundidad.

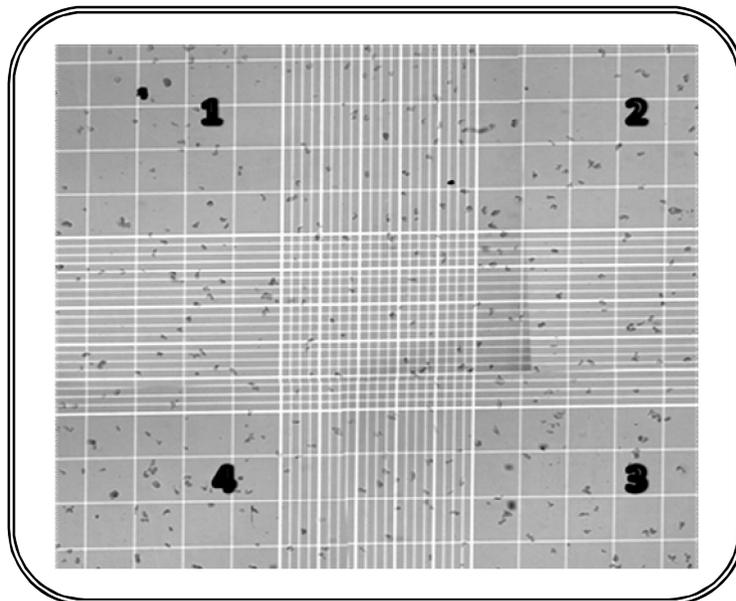


Figura 17. Fotomicrografía. Trofozoitos de *E. histolytica* en cámara de Neubauer. Magnificación 40X

❖ Preparación de las diluciones de los compuestos evaluados

Para la preparación de las diluciones de Nitazoxanida, Metronidazol, Benznidazol, Nifurtimox, IVM-1, IVM-2, IVM-3, IVM-4, IVM-5, IVM-6, IVM-7 e IVM-8 se procedió de la siguiente forma;

Se pesaron 10mg del compuesto, disolviéndose en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A partir de esta solución de concentración $[10\text{mg/mL}]$, se realizaron diluciones consecutivas 1:10, hasta obtener una solución final de concentración $[1 \times 10^{-4} \text{ mg/mL}]$ como se muestra en la Figura 18. Obteniendo soluciones consecutivas de cada compuesto como se ilustra con la Tabla 5.

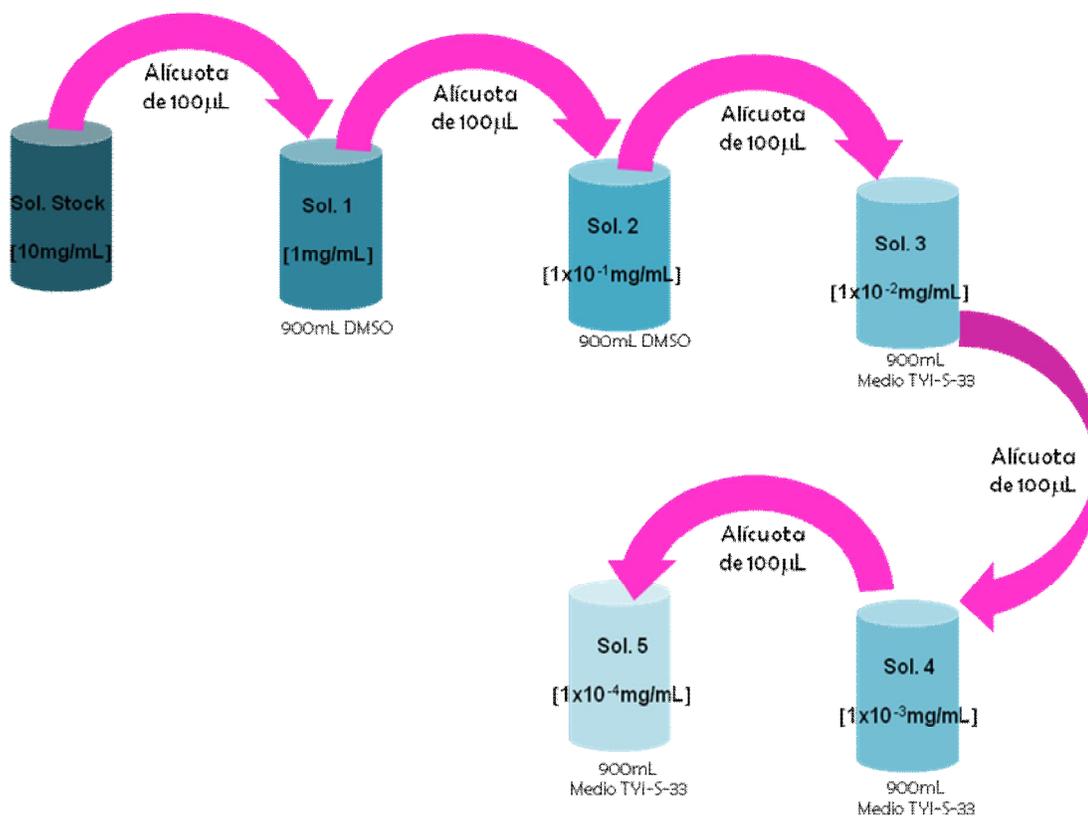


Figura 18. Diagrama. Diluciones realizadas con cada uno de los compuestos.

Obteniendo soluciones consecutivas de cada compuestos como se ilustra con la siguiente Tabla.

Tabla 5. Diluciones seriadas de los compuestos evaluados.

Solución	Concentración (mg/mL)	Dilución
Stock	10	-----
1	1	1:10
2	0.1	1:100
3	0.01	1:1000
4	0.001	1:10000
5	0.0001	1:100000

El rango de concentraciones empleadas de los compuestos de referencia y de las moléculas híbridas en el ensayo de actividad fue: 0.005, 0.01, 0.05, 0.10 y 0.50 ($\mu\text{g/mL}$). La Figura 19 muestra el volumen de las alícuotas tomadas de las soluciones 3, 4, 5, con aforo de 1mL de medio de cultivo para obtener las concentraciones finales de los compuestos evaluados. Obteniendo las concentraciones finales de los compuestos para realizar el ensayo como se ilustra con la Tabla 6.

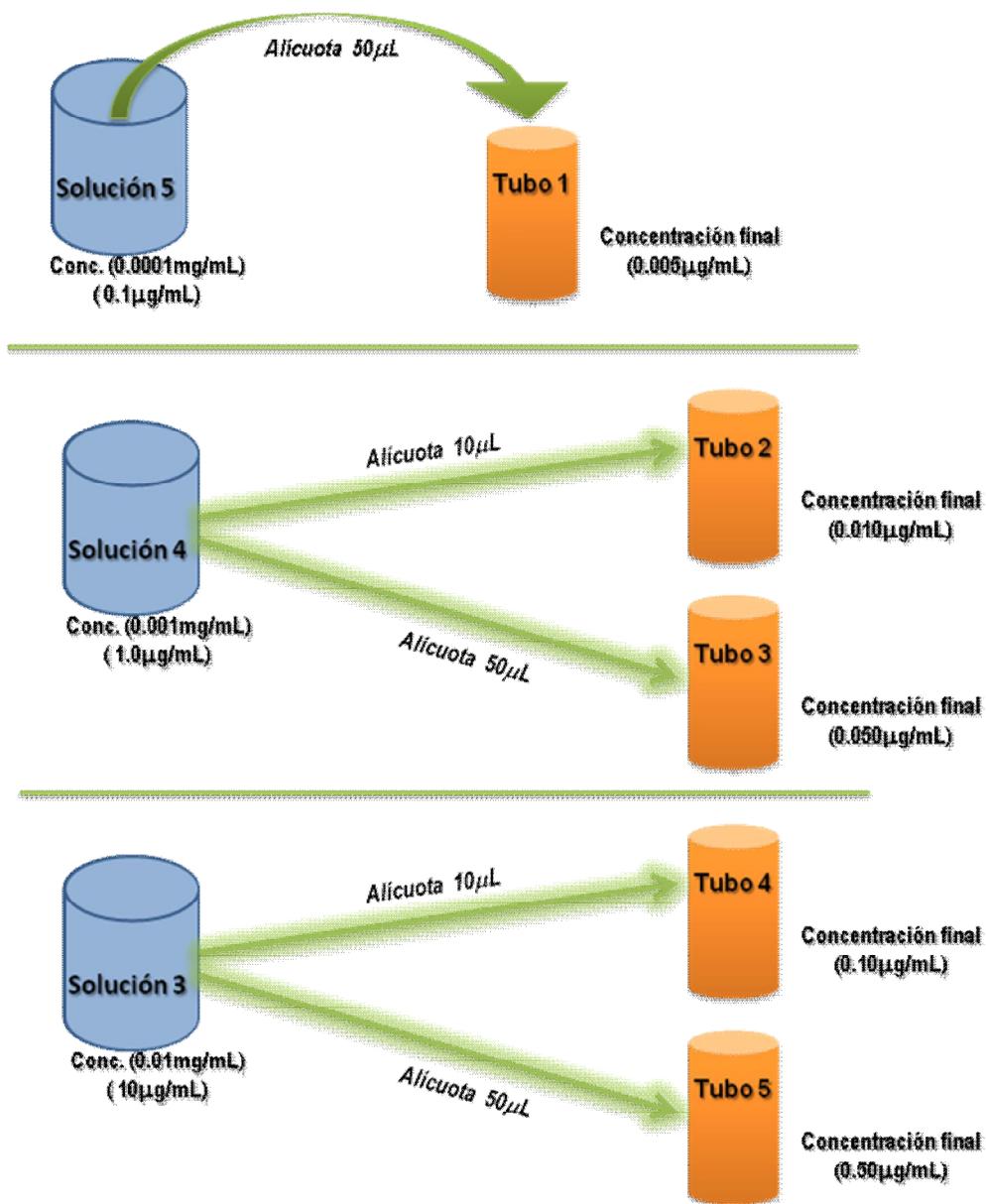


Figura 19. Diagrama. Diluciones realizadas para las diferentes concentraciones de los compuestos evaluados.

Tabla 6. Concentraciones finales de los compuestos para ser evaluados.

Tubo	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	0.005
2	0.010
3	0.050
4	0.10
5	0.50

ANEXO 2. Tablas de resultados del número de trofozoitos vivos y muertos para cada compuesto evaluado.

Compuesto **Nitazoxanida**

Ensayo 1

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	37500	8333	0.016
2	0.01	21666	24166	
3	0.05	14166	31666	
4	0.10	7500	38333	
5	0.50	0	42000	

Tubo Control: 45833 trofozoitos

Ensayo 2

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	30000	14166	0.011
2	0.01	21666	22500	
3	0.05	10833	33333	
4	0.10	4166	40000	
5	0.50	1666	42500	

Tubo Control: 44166 trofozoitos

Ensayo 3

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	25583	1833	0.019
2	0.01	15333	12083	
3	0.05	6666	20750	
4	0.10	2166	25250	
5	0.50	1583	25833	

Tubo Control: 27416 trofozoitos

Compuesto **Metronidazol**

Ensayo 1

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	40000	8333	0.034
2	0.01	35833	12500	
3	0.05	20800	27533	
4	0.10	15833	32500	
5	0.50	2500	45833	

Tubo Control: 48333 trofozoitos

Ensayo 2

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	30000	4200	0.040
2	0.01	24166	10034	
3	0.05	18333	15867	
4	0.10	11666	22534	
5	0.50	1666	325334	

Tubo Control: 34200 trofozoitos

Ensayo 3

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	22500	8333	0.032
2	0.01	21666	9167	
3	0.05	15833	15000	
4	0.10	9166	21667	
5	0.50	3300	27533	

Tubo Control: 30833 trofozoitos

Compuesto **Benznidazol**

Ensayo 1

Tubo	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
1	0.005	38333	1	0.058
2	0.01	21666	16667	
3	0.05	11600	26733	
4	0.10	35833	2500	
5	0.50	833	37500	

Tubo Control: 38333 trofozoitos

Ensayo 2

Tubo	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
1	0.005	10000	3300	0.045
2	0.01	9160	4140	
3	0.05	7500	5800	
4	0.10	5800	7500	
5	0.50	1650	11640	

Tubo Control: 13300 trofozoitos

Ensayo 3

Tubo	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Nº Trofozoitos vivos2083	Nº trofozoitos muertos	CI₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
1	0.005	26666	3334	0.050
2	0.01	19166	10834	
3	0.05	15833	14167	
4	0.10	9166	20834	
5	0.50	6666	23334	

Tubo Control: 30000 trofozoitos

Compuesto Nifurtimox

Ensayo 1

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	36000	11500	0.027
2	0.01	31600	15900	
3	0.05	19100	28400	
4	0.10	15000	32500	
5	0.50	3300	44200	

Tubo Control: 47500 trofozoitos

Ensayo 2

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	25000	5000	0.026
2	0.01	15833	14167	
3	0.05	15000	15000	
4	0.10	6666	23334	
5	0.50	5833	24167	

Tubo Control: 30000 trofozoitos

Ensayo 3

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	30000	4166	0.030
2	0.01	24166	10000	
3	0.05	14166	20000	
4	0.10	6666	27500	
5	0.50	1666	32500	

Tubo Control: 34166 trofozoitos

Compuesto IVM-1

Ensayo 1

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	27500	3333	0.022
2	0.01	14166	16667	
3	0.05	11666	19167	
4	0.10	9166	21667	
5	0.50	833	30000	

Tubo Control: 30833 trofozoitos

Ensayo 2

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	22500	5833	0.022
2	0.01	16600	11733	
3	0.05	10834	17499	
4	0.10	7500	20833	
5	0.50	833	27500	

Tubo Control: 28333 trofozoitos

Ensayo 3

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	31666	3334	0.022
2	0.01	18333	16667	
3	0.05	10833	24167	
4	0.10	7500	27500	
5	0.50	1666	33334	

Tubo Control: 35000 trofozoitos

Compuesto IVM-2

Ensayo 1

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	11666	4994	0.018
2	0.01	8333	8327	
3	0.05	7500	9160	
4	0.10	4160	12500	
5	0.50	1666	14994	

Tubo Control: 16660 trofozoitos

Ensayo 2

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	10833	3333	0.019
2	0.01	7500	6666	
3	0.05	5833	8333	
4	0.10	2500	11666	
5	0.50	1666	12500	

Tubo Control: 14166 trofozoitos

Ensayo 3

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	12300	1950	0.018
2	0.01	8000	6250	
3	0.05	3400	10850	
4	0.10	2000	12250	
5	0.50	166	14090	

Tubo Control: 14250 trofozoitos

Compuesto IVM-3

Ensayo 1

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	14500	7300	0.006
2	0.01	4600	17200	
3	0.05	2500	19300	
4	0.10	2000	19800	
5	0.50	250	21550	

Tubo Control: 21800 trofozoitos

Ensayo 2

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	16666	8334	0.009
2	0.01	10000	15000	
3	0.05	5833	19167	
4	0.10	2500	22500	
5	0.50	10	24990	

Tubo Control: 25000 trofozoitos

Ensayo 3

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	10400	4850	0.008
2	0.01	5400	9850	
3	0.05	2080	13170	
4	0.10	580	14670	
5	0.50	160	15090	

Tubo Control: 15250 trofozoitos

Compuesto IVM-4

Ensayo 1

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	62500	11666	0.019
2	0.01	43333	30833	
3	0.05	16666	57500	
4	0.10	15000	59166	
5	0.50	3333	70833	

Tubo Control: 74166 trofozoitos

Ensayo 2

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	65833	8333	0.020
2	0.01	29166	45000	
3	0.05	27500	46666	
4	0.10	17500	56666	
5	0.50	10000	64166	

Tubo Control: 74166 trofozoitos

Ensayo 3

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	50000	21666	0.021
2	0.01	47500	24166	
3	0.05	27500	44166	
4	0.10	17500	54166	
5	0.50	2500	69166	

Tubo Control: 71666 trofozoitos

Compuesto IVM-5

Ensayo 1

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	15000	8333	0.014
2	0.01	14000	9333	
3	0.05	6667	16666	
4	0.10	5000	18333	
5	0.50	1667	21666	

Tubo Control: 23333 trofozoitos

Ensayo 2

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	19166	3334	0.012
2	0.01	8333	14167	
3	0.05	6666	15834	
4	0.10	833	21667	
5	0.50	416	22084	

Tubo Control: 22500 trofozoitos

Ensayo 3

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	12500	2500	0.013
2	0.01	6666	8334	
3	0.05	3333	11664	
4	0.10	2500	12500	
5	0.50	833	15833	

Tubo Control : 15000 trofozoitos

Compuesto IVM-6

Ensayo 1

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	9166	3334	0.015
2	0.01	6666	5834	
3	0.05	4166	8334	
4	0.10	1666	10834	
5	0.50	833	11667	

Tubo Control: 12500 trofozoitos

Ensayo 2

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	10833	5000	0.016
2	0.01	8333	7500	
3	0.05	6666	22499	
4	0.10	3333	12500	
5	0.50	1660	14173	

Tubo Control: 15833 trofozoitos

Ensayo 3

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	18000	5583	0.015
2	0.01	13000	10583	
3	0.05	69100	45517	
4	0.10	2830	20753	
5	0.50	500	23083	

Tubo Control: 23583 trofozoitos

Compuesto IVM-7

Ensayo 1

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	4660	6506	0.002
2	0.01	1580	9586	
3	0.05	580	10586	
4	0.10	500	10666	
5	0.50	83	11083	

Tubo Control: 11166 trofozoitos

Ensayo 2

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	3160	5840	0.003
2	0.01	2830	6170	
3	0.05	750	8250	
4	0.10	330	8670	
5	0.50	83	8917	

Tubo Control: 9000 trofozoitos

Ensayo 3

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	1660	16940	0.001
2	0.01	910	17690	
3	0.05	410	18190	
4	0.10	166	18434	
5	0.50	83	18517	

Tubo Control: 18600 trofozoitos

Compuesto IVM-8

Ensayo 1

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	12500	5000	0.023
2	0.01	10833	6667	
3	0.05	7500	10000	
4	0.10	5000	12500	
5	0.50	833	16667	

Tubo Control: 17500 trofozoitos

Ensayo 2

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	17500	4500	0.023
2	0.01	14000	8000	
3	0.05	7410	14590	
4	0.10	3250	18750	
5	0.50	1330	20670	

Tubo Control: 22000 trofozoitos

Ensayo 3

Tubo	Concentración (µg/mL)	Nº Trofozoitos vivos	Nº trofozoitos muertos	CI ₅₀ (µg/mL)
1	0.005	23000	7000	0.020
2	0.01	18300	11700	
3	0.05	8300	21700	
4	0.10	5000	25000	
5	0.50	3300	26700	

Tubo Control: 30000 trofozoitos