

128



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFEECTO DE LA CICLOSPORINA A Y SU ANALOGO PSC-833 SOBRE *Entamoeba histolytica* Y EL DESARROLLO DEL ABSCESO HEPATICO AMIBIANO EN HAMSTER.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
B I O L O G A  
P R E S E N T A :  
VERONICA HAYDEE LUGO MARTINEZ



DIRECTOR: DR. JUAN CESAR PARRERO SANCHEZ

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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impresa el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: V. Haydée Lugo Martínez  
FECHA: 06. Nov. 02  
FIRMA: [Signature]

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: *Efecto de la Ciclosporina A y su análogo PSC-833 sobre Entamoeba histolytica y el desarrollo del absceso hepático amibiano en hámster.* realizado por *Verónica Haydée Lugo Martínez*

con número de cuenta 09122425-5 , quién cubrió los créditos de la carrera de: *Biología*

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

**Atentamente**

Director de Tesis  
Propietario

Dr. Julio César Carrero Sánchez.

[Signature]

Propietario

Dr. Daniel Guillermo Pérez Ishiwara.

[Signature]

Propietario

Dr. Luis Felipe Jiménez García.

[Signature]

Suplente

Dr. Juan Pedro Laclette San Román.

[Signature]

Suplente

M. en C. Laura del Carmen Vargas Parada.

[Signature]

**FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.**

**Consejo Departamental de Biología**

[Signature]

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez.



**DEPARTAMENTO**

Esta tesis se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Julio César Carrero Sánchez.

## ***Dedicatoria***

---

### ***A mis Padres:***

*María Eugenia y Pablo Ángel con todo mi amor y agradecimiento, porque con su ejemplo y cariño me enseñaron a amar, a soñar con un mundo mejor y a trabajar por conseguirlo.*

*La alegría de ver y entender es el más perfecto don de la naturaleza*  
***Albert Einstein.***

## ***Dedicatoria***

---

### ***A Federico:***

*Por la suerte de encontrarte en mi camino y coincidir en la vida y el amor; por el futuro que aguarda impaciente a nuestros caprichos, por ti y por mí.*

*Amar no es mirarse el uno al otro; es mirar juntos en la misma dirección*  
***Antonie de Saint-Exupery.***

## **Dedicatoria**

---

### **A mi familia:**

*A Pablo por la dicha de compartir a papá y mamá, por el espacio y el tiempo. Porque en el vacío de la diferencia siempre encontramos el regocijo mutuo del cariño entre hermanos.*

*A mi Bisabuela Jovita porque arrastro su cariño, sus cuentos y su canto al añorar el pasado.*

*A mis Abuelos Rafael, María, Franco y Guadalupe con un amor que trasciende la vida. Por ser pilares de la familia que guiaron mis primeros pasos cuando niña, por ser pasado, presente y futuro en la historia de esta vida, la mía.*

*A mis Tíos: Salvador, Rafael, Lourdes, Hugo, Bertha, Franco y Mónica por hacerme feliz al crecer junto a ustedes y a sus hijos.*

*A mis Primos: Gina, Jorge, Erika, Rafael, Claudia, Diana, Fernando, Christopher y Viridiana cómplices y compañeros en todo momento. A Mia Fernanda por el futuro.*

*A Jean por la esperanza...*

*A José Luis, Rosy y Francisco por formar parte de mi mundo.*

*A "Ringo" por arrancarme la risa y devolverme la paciencia.*

## ***Dedicatoria***

---

### ***A Todos Aquellos***

*Que luchan y han luchado por sus ideas, sus principios y por las innumerables injusticias de este mundo.*

*A los que han perdido la vida en esta empresa...*



## **Agradecimientos**

---

*A la Universidad Nacional Autónoma de México por la magnífica formación a lo largo de mi carrera y por brindarme la oportunidad de realizarme profesionalmente bajo su espíritu.*

*A la Facultad de Ciencias por la invaluable herencia: el conocimiento y el método científico, por las experiencias inolvidables y el amor a la vida que emana de sus aulas.*

*Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por la experiencia adquirida, la oportunidad de formar parte de su historia y el grato bocado de su árbol del conocimiento.*

*Al Instituto Politécnico Nacional (CICATA y CINVESTAV) por la oportunidad de hacer de la unión una fuerza que genera conocimiento.*

*A la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, por la colaboración con este proyecto.*

## **Agradecimientos**

---

*Al Dr. Juan Pedro Laclette por confiar en mi y permitirme trabajar en su grupo de investigación. Por su valiosa guía y observaciones en este trabajo y especialmente por ayudarme a culminar un sueño: SER BIÓLOGA.*

*Al Dr. Julio César Carrero por la dirección de este proyecto, el tiempo invertido y la desinteresada ayuda brindada.*

*Al Dr. Guillermo Pérez Ishiwara por abrirme las puertas de su laboratorio, por su tiempo y por todas las atenciones recibidas, pero muy sinceramente por su comprensión y amistad.*

*Al M. en C. Alfonso Olivos por las enseñanzas y los buenos momentos que compartimos al lado de los hámsteres.*

*A mis compañeros de laboratorio en Biomédicas: Dr. Pedro Ostoa, Patricia, Dayana, Laura, Carlos, Martín, Rimma, Fela, Anita, Celia, Guillermo y Jaime por su amistad, la ayuda brindada y por compartir la ciencia y sus secretos.*

*A la Dra. Consuelo Gómez, Francisco, Elvira, Olivia, Ricardo, Israel, Cecilia, Alma, Esther, Luis y Sandy por hacerme parte de su equipo, por su valiosa ayuda y su sincera amistad.*

*Al Dr. Ruy Pérez Tamayo por permitirme trabajar en su laboratorio, a Mario Nequiz y el Sr. Pedro Balderas por la ayuda en el procesamiento del material biológico.*

*A NOVARTIS-Suiza por el apoyo a esta investigación mediante la donación del análogo PSC-833.*

**Gracias**

---

**A mis amigas y amigos**

*Por las historias compartidas y los sentimientos enlazados; por los secretos, las confidencias, las risas y todos los momentos juntos y separados*

**Carlos, Erika, Gaby, Ana Lucia, Paty, Victor Hugo, Martha, Oscar, Rosaura, Olivia, Anita, Rocio, Gisella, Jessica, Miriam, Guillermo, Armando, Ricardo, Mario Alfredo, JL Caudillo, Alberto, Kin, Alejandro, Edgar, Pepe, Roberto, Jaime y René .**

*Las amistades que son ciertas nadie las puede turbar*  
**Miguel de Cervantes Saavedra.**

**Federico**

*Por tu ayuda y apoyo a este trabajo, por la paciencia y el respaldo en todo momento durante esta etapa que hoy culmina.*

# ÍNDICE

## I. INTRODUCCIÓN

1. <b>Amibiasis</b> .....	1
1.1 <i>Entamoeba histolytica</i> .....	1
1.2 Ciclo de Vida .....	2
1.3 Incidencia .....	4
1.4 Patología .....	4
1.4.1 Disentería Amibiana .....	
1.4.2 Absceso Hepático Amibiano .....	
1.5 Tratamiento .....	6
1.5.1 Emetina .....	
1.5.2 Metronidazol .....	
2. <b>Efecto de la Ciclosporina A sobre parásitos</b> .....	8
2.1 Ciclosporina A (CsA) .....	8
2.2 Efecto de CsA sobre <i>E. histolytica</i> .....	9
3. <b>Vía mediada por la inhibición de la calcineurina</b> .....	13
3.1 Ciclofilinas (CyP) .....	13
3.2 Calcineurina (CN) .....	14
4. <b>Vía mediada por la inhibición de la glicoproteína-P</b> .....	14
4.1 Glicoproteínas-P (Pgp) .....	14
4.2 Parásitos y Multidrug Resistance (MDR) .....	15
4.3 Clona C2 de <i>E. histolytica</i> .....	16
4.4 Inhibición de Pgp por CsA .....	17
5. <b>Análogos de CsA</b> .....	18
5.1 PSC-833 .....	18

II. JUSTIFICACIÓN .....	20
-------------------------	----

III. OBJETIVOS .....	21
----------------------	----

## IV. MATERIALES Y METODOS

1. <b>Cultivo axénico de <i>E. histolytica</i></b> .....	22
1.1 Cepa HM-1:IMSS .....	22
1.2 Clona C2 .....	22
2. <b>Cinéticas de Crecimiento</b> .....	22
3. <b>Absceso Hepático Amibiano (AHA)</b> .....	24
3.1 Inducción del AHA .....	24
3.2 Esquema de tratamiento con CsA y PSC-833 .....	24
4. <b>Procesamiento de Material Histológico</b> .....	25

## **V. RESULTADOS**

1. Efecto de CsA y PSC-833 sobre la cepa HM-1:IMSS ..... 26
2. Efecto de CsA y PSC-833 sobre la clona C2 ..... 27
3. Efecto de CsA sobre el desarrollo del AHA ..... 33
4. Efecto de PSC-833 sobre el desarrollo del AHA ..... 38

## **VI. DISCUSIÓN ..... 40**

## **VII. CONCLUSIONES ..... 45**

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA ..... 46**

## **IX. ANEXO ..... 54**

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1</b>	Micrografía electrónica de barrido in situ de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	<b>2</b>
<b>Fig. 2</b>	Quiste de <i>E. histolytica</i> teñido con yodo	<b>2</b>
<b>Fig. 3</b>	Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	<b>3</b>
<b>Fig. 4</b>	Efecto de la CsA sobre el porcentaje de proliferación de trofozoítos HM:1-IMSS de <i>E. histolytica</i>	<b>10</b>
<b>Fig. 5</b>	Esquema del mecanismo de acción de la CsA, vía la inhibición de la CN	<b>11</b>
<b>Fig. 6</b>	Esquema del mecanismo de acción de la CsA, vía la inhibición de la Pgp	<b>12</b>
<b>Fig. 7</b>	Esquema de tratamiento de cultivos de <i>E. histolytica</i> con CsA y PSC-833	<b>23</b>
<b>Fig. 8</b>	Esquema de tratamiento de hámsteres con CsA y PSC-833	<b>25</b>
<b>Fig. 9</b>	Cinética del efecto de PSC-833 (0.001-100 µg/ml) sobre la proliferación de trofozoítos de la cepa HM:1-IMSS de <i>E. histolytica</i> .	<b>27</b>
<b>Fig. 10</b>	Cinética del efecto de CsA sobre la proliferación de trofozoítos C2 de <i>E. histolytica</i>	<b>28</b>
<b>Fig. 11</b>	Cinética del efecto de la CsA sobre la proliferación de trofozoítos C2.	<b>30</b>
<b>Fig. 12</b>	Efecto de la CsA sobre la proliferación de trofozoítos C2 de <i>E. histolytica</i> en presencia de emetina	<b>30</b>
<b>Fig. 13</b>	Cinética del efecto de PSC-833 sobre la proliferación de trofozoítos C2	<b>31</b>
<b>Fig. 14</b>	Cinética del efecto de PSC-833 sobre la proliferación de trofozoítos C2 de <i>E. histolytica</i> en presencia de emetina	<b>31</b>
<b>Fig. 15</b>	Tejido hepático tratado con CsA y sin infección con <i>E. histolytica</i>	<b>33</b>
<b>Fig. 16</b>	Hígados de hámster infectados con <i>E. histolytica</i> . A) Sin tratamiento con CsA y B) Tratados con CsA	<b>35</b>
<b>Fig. 17</b>	Corte histológico de hígado de hámster sin tratamiento e infectado con <i>E. histolytica</i> . Aumento 10x	<b>36</b>
<b>Fig. 18</b>	Corte histológico de hígado de hámster sin tratamiento e infectado con <i>E. histolytica</i> . Aumento 40x	<b>36</b>
<b>Fig. 19</b>	Corte histológico de hígado de hámster tratado con CsA e infectado con <i>E. histolytica</i> . Aumento 10x	<b>37</b>
<b>Fig. 20</b>	Corte histológico de hígado de hámster tratado con CsA e infectado con <i>E. histolytica</i> . Aumento 40x	<b>37</b>
<b>Fig. 21</b>	Corte histológico de hígado de hámster sin tratamiento e infectado con <i>E. histolytica</i> . Aumento 10x	<b>38</b>
<b>Fig. 22</b>	Corte histológico de hígado de hámster tratado con PSC-833 e infectado con <i>E. histolytica</i> . Aumento 10x	<b>39</b>

---

## RESUMEN

La ciclosporina A (CsA) es un ciclopéptido hidrofóbico de 11 aminoácidos utilizado en medicina por sus potentes propiedades inmunosupresoras. Por otro lado, se le atribuye una fuerte y selectiva actividad antiparasitaria tanto *in vitro* como *in vivo* contra algunos protozoos y helmintos. Existen un sinnúmero de análogos de la CsA sintetizados artificialmente. Uno de estos análogos conocido como PSC-833 se ha probado en algunos parásitos mostrando una actividad antiparasitaria mayor que la propia CsA; este hecho, aunado a que no es un fármaco inmunosupresor como la ciclosporina A, lo hacen un candidato muy atractivo en la búsqueda de nuevos medicamentos contra las enfermedades parasitarias así como para la exploración de los mecanismos de acción del fármaco.

En el presente trabajo se exploró el efecto de la CsA y su análogo no inmunosupresor PSC-833 sobre la proliferación de trofozoítos de la cepa HM-1:IMSS de *Entamoeba histolytica* y el desarrollo del absceso hepático amibiano (AHA) en un modelo de hámsteres. La CsA mostró un claro efecto anti-proliferativo sobre la amiba, así como protegió a los animales del desarrollo del AHA. Sin embargo, PSC-833 no mostró efecto alguno en estos dos casos.

Para evaluar el probable mecanismo de acción de la CsA, se determinó el efecto de ambas drogas sobre la clona C2 de *E. histolytica* la cual sobreexpresa genes que codifican para la glicoproteína-P (Pgp). Estas proteínas de membrana que actúan como bombas de eflujo de metabolitos tóxicos y drogas, confieren resistencia a emetina y a otras drogas en dicha clona, presentando un fenotipo de *Multi Drug Resistance* (MDR). Esta parte del trabajo se sustentó en la base de que la CsA y el PSC-833 bloquean la función de las Pgp y son capaces de revertir el fenotipo MDR en aquellas células que lo posee. Para el caso de esta clona C2, la CsA inhibió su proliferación en ausencia y presencia de emetina, mientras que para PSC-833 solo lo hizo en presencia de emetina. En conjunto los resultados muestran que la CsA posee actividad anti-amibiana, y que esta actividad podría estar involucrada con un mecanismo de acción que no necesariamente involucra a las Pgp. Así, parecería que este efecto anti-amibiano este asociado a la capacidad inmunosupresora de la CsA y por lo tanto a través de la vía por la cual actúa en los linfocitos T.

Por otro lado, en cuanto a los ensayos *in vivo*, se discute la probable participación de la respuesta inmune en la extensión de las lesiones hepáticas amibianas en los hámsteres.

---

# I. INTRODUCCIÓN

Cientos de milenios han tenido que transcurrir en el planeta Tierra, para que en el devenir de la biología, diversas especies evolucionaran y adoptaran el parasitismo como forma de vida. Muchas especies de parásitos se han adaptado al ser humano ocasionándole múltiples enfermedades e incluso la muerte.

Las infecciones parasitarias se presentan frecuentemente como asintomáticas debido a que se establece un equilibrio en la relación huésped-parásito, lo cual permite la diseminación y persistencia de los agentes patógenos, facilitando así la perpetuación de estas especies; sin embargo, en ocasiones esta relación de equilibrio se rompe por múltiples causas como la existencia de parásitos muy virulentos, cargas parasitarias muy elevadas o alteraciones en los mecanismos naturales de defensa, como la inmunidad o la ruptura de barreras anatómicas, lo que conduce a la diseminación y proliferación de los parásitos, en algunos casos provocando la muerte del huésped.

## 1. Amibiasis

### 1.1 *Entamoeba histolytica*

Seis especies de amibas parásitas se pueden encontrar comúnmente en el tracto gastrointestinal del hombre, incluyendo cuatro especies del género *Entamoeba*: *E. histolytica*, *E. hartmanni*, *E. coli* y *E. dispar*, además de dos especies identificadas como *Iodamoeba butschlii* y *Endolimax nana* (Martínez-Palomo, 1998). De estas especies, solo *E. histolytica* es considerada de importancia médica, ya que es la causante de una enfermedad distribuida ampliamente en el mundo: la amibiasis.

Así pues, la amibiasis se define como la infección del tracto gastrointestinal humano por el parásito *E. histolytica*, el cual es capaz de invadir la mucosa intestinal y en algunos casos puede llegar a diseminarse a otros órganos, principalmente al hígado.



## 1.2 Ciclo de vida

*E. histolytica* es un protozoo unicelular que durante su ciclo de vida oscila entre dos fases: el trofozoito o fase invasora, que es uninucleado y mide de 20 a 40 micras (Fig.1), y el quiste o fase infectiva, que en su forma inmadura posee un solo núcleo mientras que al madurar es tetranucleado y mide de 8 a 20 micras de diámetro (Fig. 2) (Martínez-Palomo, 1998).



Fig.1 Micrografía electrónica de barrido *in situ* de trofozoitos de *Entamoeba histolytica*.

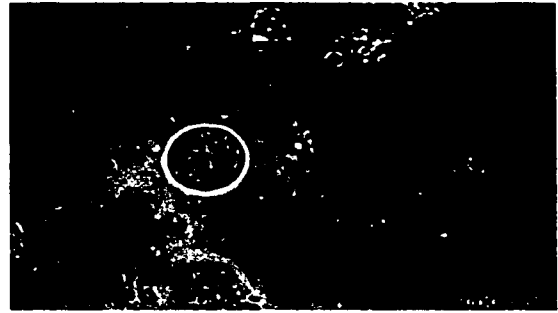


Fig. 2 Quiste de *E. histolytica* teñido con yodo

La infección con *E. histolytica* se adquiere por la ingestión de alimentos y agua contaminados con quistes maduros provenientes de la materia fecal y resistentes a los jugos gástricos. En el intestino delgado, el quiste pierde su cubierta de quitina liberando una ameba tetranucleada que duplica sus núcleos; después el citoplasma se fragmenta formando ocho pequeñas amebas, llamadas amébulas metaquísticas, las cuales al migrar al intestino grueso se transforman en trofozoitos maduros. Los trofozoitos invaden el colon donde se alimentan de bacterias y restos celulares. En el caso de infección por *E. dispar* (aproximadamente 90% de los casos), los trofozoitos viven como comensales en el colon sin ninguna manifestación sintomática (Fig. 3A). Por el contrario, en la infección por *E. histolytica* (10%), la mayoría de los pacientes presenta la clásica disentería amibiana por invasión de la mucosa colónica (Fig. 3B) y

en algunos casos (0.1%) desarrollan absceso hepático por migración de trofozoítos a través de la vena porta (Fig. 3C).

En cualquier caso, los trofozoítos que alcanzan la parte baja del intestino grueso se enquistan en un proceso estimulado por condiciones luminales poco conocidas, y son arrojados en las heces. Los quistes pueden permanecer viables a la intemperie por semanas o meses, y al ser ingeridos nuevamente, el ciclo de vida se completa (OMS, 1997).

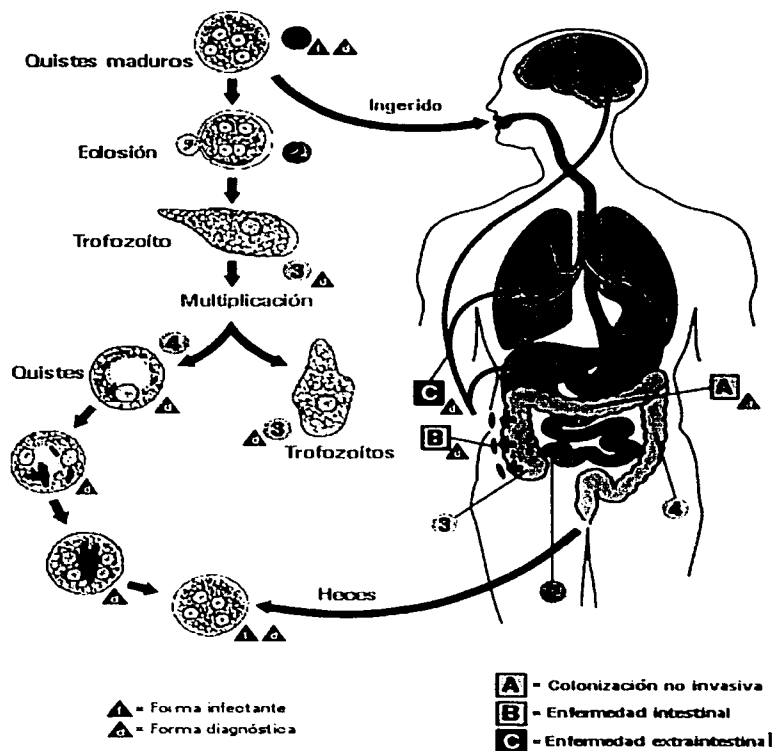


Fig. 3 Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* tomado de Amibiasis, CDC, Atlanta 1999.

### 1.3 Incidencia

La amibiasis es una infección cosmopolita que está presente en los cinco continentes con tasas de prevalencia variables de un lugar a otro; sin embargo debido a sus condiciones geográficas, económicas y sociales, las infecciones parasitarias, entre ellas la amibiasis, ocurren con mayor frecuencia en los países tropicales y subdesarrollados.

La incidencia y mortalidad anuales de las principales enfermedades parasitarias son estimadas por la Organización Mundial de Salud (OMS). A nivel mundial, la amibiasis es la infección por protozoarios más frecuente en el hombre y está catalogada como la segunda causa de muerte por parásitos protozoarios, colocándose justo detrás de la malaria (Boletín Epidemiológico OPS, 1997). Se estima que alrededor del 10% de la población mundial se encuentra infectada y de este porcentaje aproximadamente el 10% sufre los síntomas de la enfermedad, causando entre 40 y 110 mil muertes anuales (Conde-Bonfil y cols., 1992; Orozco y cols., 1995; Zambrano-Villa y cols., 2002).

En México se estima que el 20% de la población total es portador asintomático del parásito, de los cuales el 2% presenta síntomas lo que resulta en la muerte de 10,000 a 30,000 personas anualmente (Conde-Bonfil y cols., 1992). Estos datos ubican a la amibiasis entre las primeras causas de morbi-mortalidad por infecciones parasitarias en nuestro país. La enfermedad es muy común en áreas pobres y con condiciones higiénicas deficientes donde el hacinamiento, la deposición inadecuada de excretas y la contaminación de las aguas favorece su transmisión (OMS, 1997).

### 1.4 Patología

La virulencia de *E. histolytica* se debe a diferentes factores entre los que destacan: **a)** una proteína lectina de superficie, que interviene en la unión del parásito a las células del huésped y que puede contribuir a la resistencia de la amiba ante la respuesta inmune del complemento (Braga y cols., 1992), **b)** pequeños péptidos conocidos como amibaporo, similares al C9 del complemento y capaces de lisar las células, los cuales juegan un papel importante en la destrucción de células epiteliales, intestinales, hepatocitos y células del sistema inmune (Leippe y cols., 1991), **c)** una familia de

proteasas de cisteína las cuales se cree son la clave de la invasión de tejidos, evasión de la respuesta inmune del hospedero y colonización de diferentes órganos (Gadasi y Kessler, 1983; Hidalgo y cols., 1990) y **d)** otros compuestos como la fosfolipasa, el lipofosfoglicano y una amplia variedad de enzimas hidrolíticas (Long-Krig y cols., 1985; Ravdin, 1986; Bailey y cols., 1990). Todos estos factores contribuyen en la virulencia y patologías causadas por la amiba

Dos formas de amibiasis han sido reconocidas por los médicos: la amibiasis luminal en donde los síntomas son aparentes, y la amibiasis invasora en la cual los trofozoítos invaden la mucosa intestinal produciendo disentería y/o abscesos por migración de los trofozoítos a través del torrente sanguíneo hacia órganos extraintestinales (Martínez-Palomo, 1987).

#### **1.4.1 Disentería Amibiana**

La invasión de la mucosa colónica causa la disentería amibiana, que se caracteriza por la formación de úlceras frecuentemente en forma de botella acompañadas de hemorragias causando fiebre y dolor abdominal agudo. En la mayoría de los casos la infección con *E. histolytica* esta confinada al lumen intestinal; sin embargo, en algunas ocasiones aproximadamente el 10% de los casos puede resultar en la invasión de la mucosa colónica que se complica cuando los trofozoítos se diseminan a la cavidad peritoneal o al hígado por la perforación de las paredes intestinales y vía el sistema porta, resultando así en la formación de un absceso hepático ó en una peritonitis asociada a una fistula (Ravdin, 1988).

#### **1.4.2 Absceso Hepático Amibiano (AHA)**

Es causado por la migración de trofozoítos al hígado a través de la vena porta y es la causa de la mayoría de los casos letales por infección con *E. histolytica*. En el absceso, el parénquima hepático es completamente sustituido por restos necróticos de hepatocitos con la presencia de escasos trofozoítos y células inflamatorias (OMS, 1997). En casos extremos, la formación de un AHA de grandes dimensiones puede llegar a perforar la cavidad peritoneal, pericárdica y pleural. Cuando se perfora el

diafragma, la infección amibiana llega a invadir el parénquima pulmonar o los bronquios resultando en la formación de abscesos en pulmones, e incluso en algunos casos, esta diseminación alcanza órganos tan distales como el cerebro. Estos casos son solo ocasionales, así como aquellos en los cuales se han encontrado trofozoítos en otros tejidos como la piel y las mucosas asociadas a los órganos genitales.

## **1.5 Tratamiento**

Debido a que a la fecha no se ha tenido éxito en el desarrollo de una vacuna contra este parásito, el tratamiento farmacológico, es la única herramienta de combate de la infección. Este se administra sobre la base de medicamentos que pueden subdividirse en tres grupos: **a)** los que actúan en el lumen intestinal, como las quinoleínas, la diloxanida, el sulfato de paromicina y las quinifamidas; **b)** los amebicidas tisulares como: la emetina, la dehidroemetina y la cloroquina y **c)** los que actúan en ambos niveles como el metronidazol y sus derivados (Conde-Bonfil y cols., 1992). Los primeros tratamientos de la amibiasis se realizaban con la administración de emetina, sin embargo en la actualidad el medicamento de elección por su alta eficacia es el metronidazol.

### **1.5.1 Emetina**

Esta droga, pionera en el tratamiento de la amibiasis, es un alcaloide que se obtiene de la raíz de una planta conocida en América del Sur como ipecacuana (Schavenberg y Paris, 1977). En los eucariontes, la emetina inhibe la síntesis de proteínas al unirse irreversiblemente a la subunidad 60S de los ribosomas en el sitio de elongación de la cadena polipeptídica, resultando así en un efecto letal sobre los trofozoítos de *E. histolytica* (Orozco y cols., 1995) Se ha reportado que esta droga se acumula en el hígado, por lo cual fue ampliamente utilizada para el tratamiento de pacientes con absceso hepático (Martínez-Palomo, 1989). Sin embargo, la gran cantidad de efectos tóxicos colaterales como hipertensión, taquicardia y alteraciones gastrointestinales, limitaron en gran medida su uso. Se han sintetizado diferentes análogos de la emetina como la dehidroemetina, la cual tiene mayor potencial amebicida que la propia

emetina y además sus efectos tóxicos son menores, sin embargo el uso de estos análogos fue desplazado por la alta efectividad del metronidazol.

### 1.5.2 Metronidazol

El metronidazol (MTZ) [1-( $\beta$ -hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol], se desarrolló con el propósito de combatir infecciones por *Trichomonas vaginalis*. Poco después, su uso se diversificó para combatir las infecciones provocadas por *E. histolytica* y *Giardia lamblia*. Hoy en día el metronidazol es también considerado uno de los medicamentos más eficaces para combatir las infecciones por bacterias anaerobias tanto gram-negativas como gram-positivas ( Menéndez, 2002).

La eficacia de este compuesto se ha demostrado desde 1961. Sin embargo, la frecuencia de los efectos colaterales adversos que se producen en un buen número de pacientes (nausea, mareo, sabor metálico, dolor de cabeza, etc.) y sus efectos mutagénicos y cancerígenos en ratones a altas dosis (Conde-Bonfil y cols., 1992), ha generado interés por el desarrollo e identificación de sustitutos del metronidazol, igualmente eficientes pero con un mayor grado de tolerancia (García-Manzo, 1989).

El MTZ en su forma nativa es prácticamente inactivo hasta que es metabolizado dentro de los organismos susceptibles; entra a las células por difusión pasiva en donde, por la acción reductora de la enzima ferredoxina o flavodoxina, el grupo nitro es transformado y activado a un radical-nitro citotóxico resultando en la formación de N-hidroxietil del ácido oxámico y de acetamida. Así pues, se ha postulado que el mecanismo de acción del fármaco es a través de la eliminación del potencial reductor de los microorganismos, además de la formación de complejos con las proteínas y los ácidos nucleicos dañando a las células (Bendesky y cols., 2001).

Aunque este fármaco es muy efectivo, en los últimos años se ha incrementado el interés en el estudio de nuevas alternativas en el tratamiento de estas enfermedades, debido a la generación de resistencia al fármaco demostrada para tricomonas, giardia (Upcroft y cols., 1999) y en cultivos *in vitro* de trofozoítos de *E. histolytica* por exposición continua al MTZ (Samarawickerna y cols., 1997; Wassmann y cols., 1999, 2000; Upcroft et al. 1999). Al mismo tiempo, y probablemente debido al uso

indiscriminado del metronidazol para el tratamiento de varias parasitosis intestinales y en algunos casos por automedicación, muy recientemente se detectó un grupo de 19 pacientes con AHA que no respondieron al tratamiento usual con MTZ, sugiriendo la presencia de un fenotipo de resistencia a la droga (Hanna y cols., 2000).

En virtud de lo anterior y de que el fenómeno de resistencia a dicha droga ya se ha demostrado en parasitosis como giardiasis, tricomoniasis (Upcroft y cols., 1999) y amibiasis (Hanna y cols., 2001), el desarrollo de nuevas drogas anti-parasitarias además del metronidazol, se considera de suma importancia.

## **2 Efecto de la Ciclosporina A sobre parásitos.**

### **2.1 Ciclosporina A**

La Ciclosporina A (CsA) es un péptido cíclico de 11 aminoácidos extraído del hongo *Tolypocladium inflatum*. Posee poderosas propiedades inmunosupresoras, por lo que es ampliamente utilizado en el tratamiento y control de ciertas enfermedades autoinmunes, así como para la prevención del rechazo de transplantes de órganos y tejidos (Handschumacher y cols., 1984).

Sin embargo, en 1981 Tomen-Scott y colaboradores realizaron un experimento en el cual, casualmente descubrieron las propiedades antiparasitarias de la CsA. En este ensayo, se inyectó CsA a ratones que posteriormente se infectaron con *Plasmodium chabaudi* y *P. berghei* con el objeto de investigar el papel de las células T en el control de la infección. Contrario a lo que esperaban, la CsA redujo la parasitemia en los ratones en lugar de aumentarla, y por otro lado extendió significativamente el tiempo de vida de los ratones infectados. (Tomen-Scott, 1981; Nickell y cols., 1982). Esta propiedad antiparasitaria fue confirmada mas tarde en experimentos *in vitro* para *P. yoelii*, *P. falciparum* y *P. vivax* (Bell y cols., 1994; Dobson y cols., 1999; Kocken y cols., 1996) así como para algunos helmintos, céstodos y nematodos (Chappell y cols., 1992). A la fecha, el efecto antiparasitario de la CsA se ha documentado *in vitro* contra casi todos los grupos taxonómicos ensayados (Tabla 1) (Chappell y cols., 1992; Bell y cols., 1996). Sin embargo y debido

a su efecto inmunosupresor sobre las células T, en algunos grupos de parásitos la CsA exagera la infección *in vivo*. Tal es el caso de las infecciones por *Trypanosoma* y *Giardia*, y en algunas ocasiones en *Toxoplasma* y *Leishmania* en estos dos últimos con un efecto variable (Chappell y cols., 1992). Los resultados de la administración de la droga *in vivo* varían dependiendo de factores como la sincronización del tratamiento con respecto a la infección, la ruta de administración del fármaco, la dosis y el número de tratamientos aplicados.

**Tabla 1.** Parásitos susceptibles al tratamiento con CsA (Page y cols., 1995).

<b>Parásitos susceptibles a CsA</b>	
<b>PROTOZOA</b>	<b>HELMINTOS</b>
<b>Haemosporina</b>	<b>Nematoda</b>
<i>Plasmodium berghei</i>	<i>Trichinella spiralis</i>
<i>Plasmodium yoelii</i>	<i>Litomosoides carinii</i>
<i>Plasmodium chabaudi</i>	<i>Acanthocheilonema viteae</i>
<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Strongyloides ratti</i>
<b>Trypanosomatina</b>	<b>Trematoda</b>
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	<i>Paragonimus miyazakii</i>
<i>Leishmania major</i>	<i>Fasciola hepatica</i>
<i>Leishmania tropica</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
<b>Eimeriina</b>	<b>Cestoda</b>
<i>Eimeria tenella</i>	<i>Hymenolepis microstoma</i>
<i>Eimeria vermiformis</i>	
<i>Eimeria mitis</i>	
<i>Toxoplasma gondii</i>	

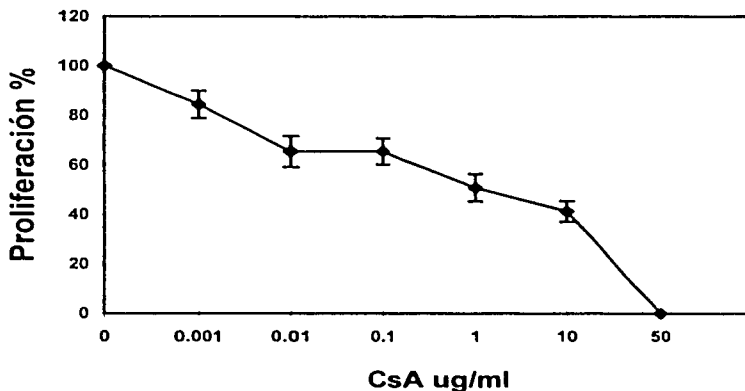
## 2.2 Efecto de la CsA sobre *E. histolytica*.

Recientemente nuestro grupo de investigación describió la primera ciclofilina (CyP) de *E. histolytica* (Ostoa y cols., 2000). En este contexto la importancia de esta proteína recae en el hecho de que en algunos grupos de parásitos donde la CsA ejerce un efecto, se demostró que la CyP es el blanco intracelular de la droga inmunosupresora (Bell y cols., 1994; Clipstone y cols., 1994; Dobson y cols., 1999; Khattab y cols., 1999). Sin embargo no se conocía el efecto de la CsA sobre la amiba, por lo que nuestro grupo se avocó a determinarlo, para lo cual se diseñó un primer ensayo.



El tratamiento de cultivos de trofozoítos ( $5 \times 10^4$ /ml) de la cepa HM-1:IMSS de *E. histolytica* con concentraciones de CsA entre 0.001 y 50  $\mu\text{g/ml}$  demostraron una inhibición en la proliferación dosis-dependiente a las 72 h de exposición al fármaco (Fig. 4). Así mismo los resultados mostraron el 50% de inhibición ( $IC_{50}$ ) de la proliferación con una dosis de 1  $\mu\text{g/ml}$  y un efecto letal a dosis  $\geq 50 \mu\text{g/ml}$  (Carrero y cols., 2000).

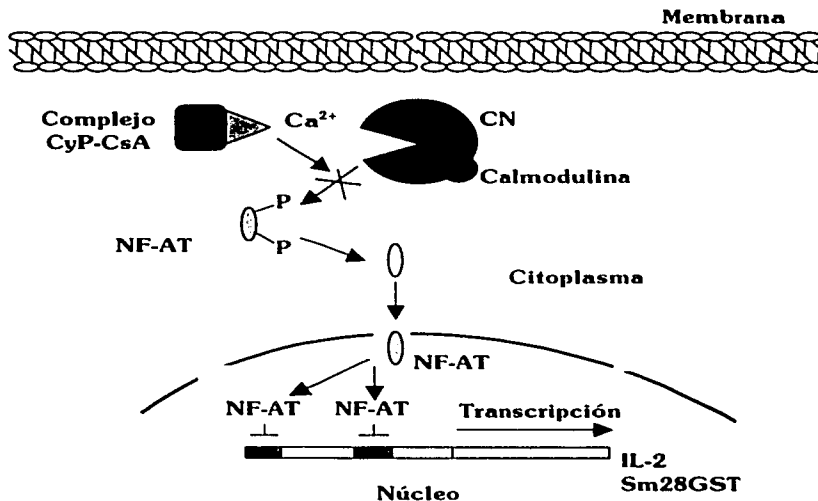
En comparación con lo reportado acerca del efecto de CsA sobre otros parásitos, los datos obtenidos colocan a la amiba como un parásito altamente susceptible a la CsA. Estos antecedentes son la base del presente trabajo de investigación, dirigido a determinar el mecanismo de la actividad anti-amibiana por CsA.



**Fig. 4** Efecto de la CsA sobre la proliferación de la cepa HM-1:IMSS de *E. histolytica*.  $IC_{50}=1 \mu\text{g/ml}$  a las 72 h. de cultivo.

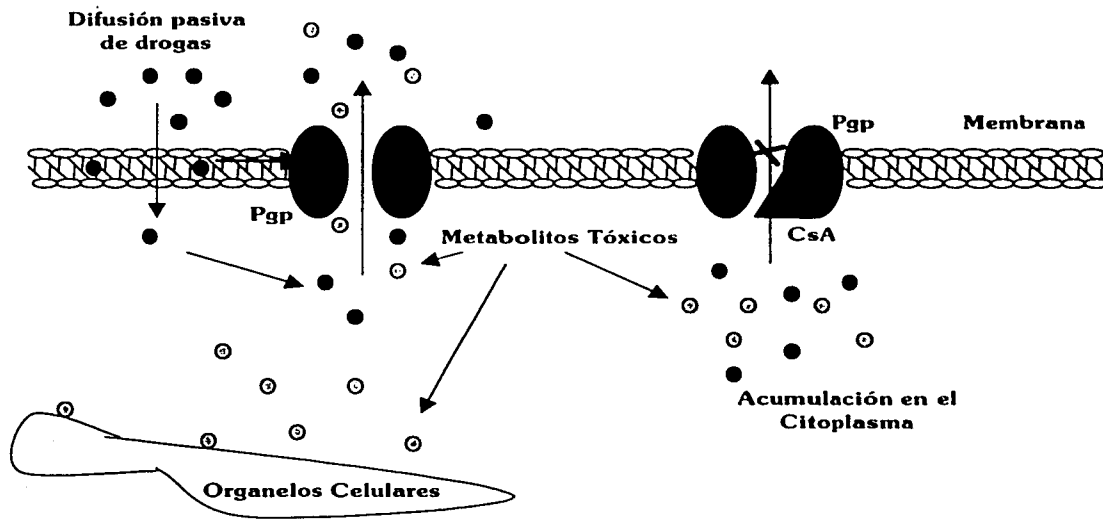
El mecanismo de acción de esta actividad anti-amibiana de la CsA es aún desconocido. Sin embargo, en el presente trabajo y en base a la literatura se proponen dos posibilidades mediante las cuales la droga podría estar ejerciendo su efecto antiparasitario.

a) La primera propuesta se soporta precisamente en el mecanismo por el cual la CsA suprime al sistema inmune (Neil y cols., 1992); al igual que como lo hace con los linfocitos T (Fig 5) se ha propuesto que en los parásitos, la CsA forma complejos proteicos con las CyP de las células, los cuales a su vez podrían interferir con la actividad de una fosfatasa dependiente de calcio y calmodulina denominada calcineurina (CN) o con una molécula similar existente en los parásitos (Clipstone y cols., 1994; Dobson y cols., 1999). En el caso de los linfocitos T, en una de las vías de señalización celular, la CN defosforila factores de transcripción, como el NF-AT permitiendo su translocación al núcleo y como resultado la expresión de genes como el de IL-2 involucrados en la replicación celular (Fig 5); de tal forma que la inhibición de la CN en los linfocitos T impide la expresión de IL-2 y por lo tanto inhibe su proliferación (Neil y cols., 1992). En el caso de algunos parásitos como *Schistosoma mansoni*, se ha demostrado que la inhibición de la CN por los complejos CsA-CyP inhibe la expresión de genes como *Sm28GST* asociados al crecimiento y diferenciación del parásito (Serra y cols, 1999).



**Fig. 5** Vía mediada por la inhibición de la CN. Esta inhibición es mediada por el bloqueo de la transcripción de genes involucrados en la replicación celular o en el desarrollo de los parásitos por acción del complejo CyP-CsA.

**b)** Por otra parte, existen reportes de que este efecto antiparasitario también podría estar mediado por la inhibición de las funciones de las glicoproteínas-P (Pgp), proteínas transmembranales a las que se les atribuyen diferentes funciones. En este sentido, la CsA se puede unir de manera irreversible a la Pgp impidiendo funciones tales como la eliminación de metabolitos tóxicos que pueden llevar a las células a la muerte y/o la inhibición del flujo de algunos fármacos (Fig.6) (Foxwell y cols., 1989; Archinal-Mattheis y cols., 1995; Di Pietro y cols., 1999).



**Fig. 6** Vía mediada por la inhibición de las funciones de la Pgp. La inhibición se da mediante el bloqueo del eflujo de metabolitos tóxicos o fármacos, también puede ser por la inhibición de otras funciones asociadas a la Pgp.

A continuación se describen las principales moléculas involucradas en los dos mecanismos de acción propuestos y descritos anteriormente.

### 3. Vía mediada por la inhibición de la CN.

Debido a que postulamos que la inhibición de la CN en *E. histolytica* es una vía indirecta en la cual se involucran los complejos proteicos formados entre la CsA y las CyP de la amiba, hablaremos un poco de estas moléculas.

#### 3.1 Ciclofilinas

Las ciclofilinas son una familia de proteínas que se han identificado en varios compartimentos celulares como el retículo endoplásmico, el núcleo, las mitocondrias y el citoplasma; así mismo, se han encontrado en una gran variedad de organismos incluyendo mamíferos, bacterias, hongos, plantas e incluso en algunos parásitos como *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni* y *Leishmania major*. Aunque la función específica que desempeñan en estos organismos no se conoce completamente todas las isoformas de ciclofilinas poseen una actividad enzimática de peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa (Anexo 1) inhibible por la CsA.

La primera ciclofilina se describió en timocitos de ternera, es una proteína citoplásmica de 18 kDa con un punto isoelectrico alcalino mayor a 9. (Handschumacher, y cols., 1984). Posteriormente se encontró su equivalente en humanos con un alto grado de identidad (Harding MW, y cols., 1986).

El estudio de las ciclofilinas como blanco de la CsA ha tomado gran importancia en algunos parásitos debido principalmente, al hallazgo antes mencionado sobre la actividad antiparasitaria de CsA (Tomen-Scott y cols., 1981) y a estudios subsecuentes en otros parásitos tanto protozoarios como helmintos (Chapell y cols., 1994; Carrero y cols., 2000). Recientemente nuestro grupo de investigación reportó el primer gene identificado en *E. histolytica* que codifica para una proteína tipo ciclofilina (*EhCyP*) el cual posee una identidad del 68-72% con otras CyP ya reportadas, una masa molecular de 18,152 Da y un punto isoelectrico de 8.8 pH (Ostoa y cols., 2000). La identificación de este gen en *E. histolytica* cobra importancia al relacionarlo con el efecto anti-amibiano de la CsA, ya que podría ser uno de sus blancos intracelulares, mediante el cual pudiere estar ejerciendo su efecto anti-amibiano.

### **3.2 Calcineurina.**

Al mismo tiempo y debido a que la formación de complejos CsA-CyP inhiben la función de la calcineurina (CN), esta enzima también es importante dentro de este mecanismo de acción propuesto para la CsA en contra de la amiba.

En general, las fosfoferinas-treoninas fosfatasas, están formadas por dos familias de metalo-enzimas: las fosfoferinas fosfatasas M (PPM) y las fosfoferinas fosfatasas P (PPP). La CN es una fosfatasa citoplásmica perteneciente a esta última familia, estas pueden ser de varios tipos: las fosfatasas 1 y 2 (PP1 y PP2) las cuales se inhiben por acción del ácido okadaico (Khattab y cols., 1999), la fosfatasa 2C (PP2C) dependientes de  $Mg^{+2}$ , y la fosfatasa 2B (PP2B) llamada también calcineurina, la cual es dependiente de  $Ca^{+2}$  y calmodulina para llevar a cabo su función defosforilante de factores de transcripción del tipo NF-AT, una vez que estos factores son defosforilados, entran al núcleo y promueven la transcripción de ciertos genes (Neil y cols., 1992), es precisamente esta actividad defosforilante de la CN la que se inhibe por la acción de los complejos formados entre la CsA y la CyP (Fig. 5). Otro inhibidor específico de la actividad fosfatasa es el EGTA, un quelante específico de calcio (Clipstone y cols., 1994; Khattab y col., 1999).

## **4. Vía mediada por la inhibición de la Pgp.**

El segundo mecanismo de acción planteado en las hipótesis, se basa en la inhibición de la o las funciones de la Pgp en los trofozoítos de *E. histolytica*, a continuación se presentan las principales características e implicaciones de esta proteína en el parásito.

### **4.1 Glicoproteínas P**

Las Pgp son proteínas transmembranales que pertenecen a la superfamilia ABC (ATP-Binding-Casette), implicadas en diversas funciones tales como la detoxificación celular, la translocación de moléculas orgánicas (lípidos), el transporte de algunas citocinas (Van Helvoort, y cols. 1996) y el movimiento de iones durante la regulación osmótica actuando como canales de cloro (Higgins, 1995; Delgadillo y cols., 2002), también se

les ha relacionado de alguna manera con la diferenciación celular y la apoptosis (Bunting, y cols. 1998). Finalmente se ha descrito que funcionan como bombas de eflujo expulsando compuestos o fármacos citotóxicos al exterior celular y en contra de un gradiente de concentración mediante un transporte dependiente de ATP.

Por otro lado, aquí cabe mencionar que existe un fenómeno de resistencia a fármacos conocido como *Multi Drug Resistance* (MDR), el cual ha sido ampliamente documentado. Este fenómeno es multifactorial, debido a que los mecanismos celulares y moleculares implicados en el mismo son muy variables, e incluso en algunas ocasiones pueden coexistir. Los mecanismos descritos son: modificaciones en la entrada del fármaco, inactivación de las drogas, mutaciones en los genes y en las proteínas blanco de acción, modificaciones en la capacidad de reparación del daño celular, y un incremento en los niveles de expresión de moléculas involucradas en la eliminación de los fármacos. Es precisamente este último mecanismo el que se involucra directamente con las glicoproteínas P ya que se sabe que la sobreexpresión de estas proteínas en las células confieren un fenotipo MDR

Esta condición confiere a las células la capacidad de resistir el efecto de una droga que funciona como agente selectivo y al mismo tiempo confiere resistencia cruzada a un amplio espectro de fármacos diferentes estructural y bioquímicamente (Gros, y cols. 1996). Las únicas características que frecuentemente comparten estas drogas es que son anfífilas, poseen anillos aromáticos en sus estructuras y pesan entre 100 y 2000 Da. La habilidad de las células para desarrollar el fenotipo MDR, recientemente ha cobrado gran importancia en el estudio sobre el desarrollo y persistencia de enfermedades causadas por parásitos.

#### **4.2 Parásitos y MDR**

Existe una amplia evidencia de que la sobreexpresión de las glicoproteínas-P son frecuentemente un mecanismo responsables del fenotipo MDR. En células cancerosas, la sobreexpresión de las glicoproteínas-P se ha relacionado precisamente con su característico fenotipo de resistencia hacia las drogas anticancerígenas utilizadas durante el tratamiento (Shustik y cols. 1995; Di Pietro y cols., 1999). Por otro lado, en

algunos parásitos como *P. falciparum*, *L. major*, *T. vaginalis*, *G. lamblia* y *E. histolytica* ya se ha descrito una resistencia a los fármacos empleados en el tratamiento mediante diferentes procesos moleculares (Gamarró y cols., 1997).

Por ejemplo, la resistencia al metronidazol en la mayoría de los casos reportados hasta ahora, se debe a una mutación en la enzima piruvato-ferredoxina oxidoreductasa que usualmente aporta un electrón para la activación del MTZ (Wassmann y cols., 1999; 2000). En el caso de *E. histolytica* se ha reportado la inducción *in vitro* de resistencia a metronidazol en condiciones microaerófilas debido a la sobreexpresión de las enzimas superóxido dismutasa y la peroxirredoxina, las cuales inactivan al metronidazol (Samarawickrema, y cols., 1997; Wassman y cols., 1999). Sin embargo, también existen clones de *E. histolytica* resistentes a emetina, cuya resistencia se relaciona con la sobreexpresión de Pgp, tal es el caso de la clona C2 de *E. histolytica*.

#### **4.3 Clona C2 de *E. histolytica*.**

Esta clona fue desarrollada en 1985 por el grupo de la Dra. Esther Orozco en el IPN-CINVESTAV como un modelo para el estudio de la resistencia a fármacos en *E. histolytica* (Orozco y cols., 1985). La clona C2 presenta resistencia a diversas concentraciones de emetina, a partir de la cepa HM-1:IMSS por clonación se extrajo una clona sensible a emetina denominada clona A, la cual fue sometida a un proceso de mutagénesis química con *etilmetanosulfonato* (EMS). Posterior a la mutación, se realizó una selección de los trofozoítos capaces de crecer en presencia de emetina, obteniéndose dos tipos diferentes de clones resistentes: la C9 resistente a 35  $\mu\text{M}$  de emetina y que resultó ser sensible a otras drogas, y la C2 resistente a concentraciones mayores a 90  $\mu\text{M}$  de emetina y que además mostró resistencia cruzada con otras drogas no relacionadas como colchicina, iodoquinol y diloxanida, presentando así un fenotipo MDR. (Samuelson J y cols., 1990; Ayala y cols., 1990).

Mientras que la clona C9 aparentemente se encuentra alterada en la maquinaria de síntesis proteica, la clona C2 resultó tener modificaciones en el transporte de la droga. Años más tarde se realizó un estudio fisiológico para determinar el proceso de

resistencia a emetina. Los resultados mostraron una menor acumulación intracelular de la emetina en la clona resistente (C2) en comparación con la sensible (CA) como resultado del transporte de emetina mediado por la Pgp (Gómez y cols., 1996). Al mismo tiempo se demostró que el Verapamil, un bloqueador de canales de calcio, revertía el fenotipo MDR de los trofozoítos de la clona C2 mediante la inhibición de la Pgp, corroborando que su resistencia se debía al transporte y a la sobreexpresión de esta bomba de superficie. Actualmente la clona C2 es capaz de crecer a 225  $\mu$ M de emetina (Samuelson y cols., 1992).

Estudios recientes han demostrado que *E. histolytica* posee 2 pseudogenes y 4 genes de Pgp, de los cuales el gene *EhPgp1* se expresa constitutivamente (Gómez y cols., 1998) y el *EhPgp5* con una expresión inducible por emetina, confieren esta resistencia frente a la droga (Pérez y cols., 1998). Debido a que codifican para proteínas tipo Pgp, éstas actúan como bombas de eflujo expulsando la emetina fuera de la célula permitiéndole a la ameba crecer a concentraciones elevadas de emetina (Descoteaux y cols., 1992; Gómez y cols., 2000; Pérez y cols., 2000).

#### **4.4 Inhibición de la Pgp por CsA**

La CsA y algunos de sus análogos son capaces de revertir el fenotipo MDR que generalmente desarrollan las células cancerígenas al tratamiento farmacológico debido a la sobreexpresión de Pgps; es decir actúan como efectivos quimio-sensibilizadores (Foxwell y cols., 1989). Al mismo tiempo existen estudios en células de mamífero (CH<sup>R</sup>C5) que demuestran una clara interacción molecular entre la CsA y las Pgp (Demule y cols., 1997). Incluso, en parásitos como *Toxoplasma gondii* y *Cryptosporidium parvum*, se ha demostrado la unión irreversible de la CsA y algunos análogos como el PSC-833, con las Pgp bloqueando su capacidad de bombeo e impidiendo el eflujo de metabolitos tóxicos. Se ha sugerido que este proceso puede ser parcialmente responsable del efecto antiparasitario de las drogas (Silverman y cols., 1997 y Perkins y cols., 1998).



## **5. Análogos de CsA**

A la fecha se han descrito cientos de análogos de la CsA sintetizados artificialmente por introducción, delección y sustitución de grupos funcionales en la molécula original (Archinal-Mattheis y cols., 1995). La mayoría de ellos fueron diseñados para incrementar la susceptibilidad de las células cancerígenas a las drogas utilizadas en el tratamiento de la enfermedad, debido a que como se ha mencionado antes, la CsA y sus análogos además de unirse a las ciclofilinas, también lo hacen a las glicoproteínas P (Pgp) inhibiendo su función y algunas veces revirtiendo el fenotipo de multiresistencia a estas drogas (Shustik y cols., 1995; Twentyman, 1992).

Gran parte de estos análogos muestran también actividad antiparasitaria, en algunos casos con una eficacia superior a la lograda con la CsA (Silverman y cols., 1997; Perkins y cols., 1998). La importancia de estos análogos recae en el hecho de que no son inmunosupresores, lo que abre la posibilidad de que puedan llegar a ser utilizados como agentes antiparasitarios confiables en humanos. La identificación de los mecanismos de acción de estas drogas, también posibilitan la identificación de blancos específicos mediante los cuales los fármacos ejercen efecto y por ende en el futuro desarrollo de drogas específicas contra los parásitos, evitando su efecto sobre las células del hospedero. Sin embargo, es claro que su uso en este sentido requiere de muchos estudios adicionales.

### **5.1 PSC-833.**

Es un análogo de CsA ([3'-keto-Bmt1]-Val2]-cyclosporin), no inmunosupresor ni nefrotóxico, también conocido como Valspodar ó Amdray. PSC-833 se une con alta afinidad a las Pgp y es un inhibidor no competitivo pobremente transportado por esta bomba de eflujo (Archinal-Mattheis y cols., 1995; Sikic, 1997). Se ha reportado que es de 5 a 30 veces más potente que CsA en la inhibición de la expulsión de drogas citotóxicas en células resistentes, incrementando así, la acumulación de drogas en el interior celular.

En el caso de parásitos, PSC-833 mostró un efecto antimalaria 10 veces mas potente que el de la CsA (Bell y cols., 1994) e inhibió la actividad de las Pgp de *Cryptosporidium parvum* y *Toxoplasma gondii*, bloqueando la eliminación de sustancias tóxicas producto del metabolismo, así como la incorporación de nutrientes críticos lo que resultó en la muerte de los parásitos (Perkins et al., 1998; Silverman et al., 1997).

Además de PSC-833 se han reportados otros análogos con actividad antiparasitaria como: SDZ 033-243, SDZ 215-918, SDZ 216-070 y SDZ 217-383. De ellos, PSC-833 por sus características no inmunosupresoras y su potente actividad antiparasitaria se vislumbra como una poderosa herramienta de investigación y a la vez como un potente y seguro fármaco antiparasitario y anticancerígeno.

---

## II. JUSTIFICACIÓN

La principal forma de defensa contra enfermedades como la amibiasis se basa en la quimioterapia sin embargo se ha demostrado la existencia de un fenotipo de resistencia en *E. histolytica* y otros parásitos frente a los fármacos utilizados en el tratamiento de las parasitosis. Por lo tanto el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento y control de dichas enfermedades así como la determinación de sus mecanismos de acción es de suma importancia.

En el presente trabajo nos propusimos determinar el efecto de la CsA en el desarrollo del absceso hepático y al mismo tiempo probar el efecto del fármaco PSC-833 no inmunosupresor sobre *E. histolytica*. Finalmente tratamos de determinar el mecanismo de acción mediante el cual los fármacos actúan.

---

---

### **III. OBJETIVOS**

#### **1. Objetivo**

- Evaluar el efecto *in vivo* e *in vitro* de la ciclosporina A y su análogo no inmunosupresor PSC-833 sobre *Entamoeba histolytica*.

#### **2. Metas**

- Establecer el mecanismo de acción de la ciclosporina A sobre *E. histolytica*.
  - Determinar el efecto *in vitro* del análogo PSC-833 sobre la proliferación de trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM-1:IMSS y la clona C2.
  - Explorar el efecto de la ciclosporina A y su análogo PSC-833 en el desarrollo del absceso hepático amibiano en un modelo de hámster.
-

---

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cultivo axénico de *E. histolytica*

#### 1.1 Cepa HM-1:IMSS

Trofozoítos de *E. histolytica* ( $7 \times 10^5$ ) de la cepa HM-1:IMSS se cultivaron en 50 ml de medio TYI-S-33 estéril suplementado con 15% de suero bovino adulto, 3% de la mezcla de vitaminas de Diamond, 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g/ml}$  de sulfato de estreptomicina (Diamond, et al., 1978) a 37°C por 72 horas. Una vez transcurrido este tiempo los trofozoítos se cosecharon por enfriamiento en hielo durante 5 min y centrifugación a 1500 rpm durante 5 min. La pastilla se lavó dos veces en amortiguador de fosfatos PBS: $\text{Na}_2\text{PO}_4$  (15 mM pH 7.2, NaCl 0.15 M) centrifugándolos a 1500 rpm durante 5 min a 4°C.

#### 1.2 Clona C2

Esta clona se cultivó también en medio TYI-S-33 estéril, adicionado con 14% de suero bovino adulto (Biofluids), 6% de la mezcla de vitaminas de Diamond (JRH, Biosciences), 1.2 U/ml de penicilina y 1.4  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomicina (Lakeside). Los cultivos se hicieron en tubos de ensayo con 12 ml de medio en ausencia y en presencia de emetina a concentraciones de 40  $\mu\text{M}$  (clona C2-40) y 225  $\mu\text{M}$  (clona C2-225).

### 2. Cinéticas de Crecimiento

Para registrar las curvas de proliferación de la cepa HM-1:IMSS y de la clona C2 de *E. histolytica*, se cultivaron  $1.4 \times 10^4$  trofozoítos/ml en medio de cultivo TYI-S-33 manteniéndolos a 37°C en ausencia o presencia de CsA entre 1 y 100  $\mu\text{g/ml}$  y de PSC-833 entre 0.001 a 100  $\mu\text{g/ml}$ . Las cinéticas de crecimiento se determinaron evaluando

el número de trofozoítos cada 24 h con la ayuda de una cámara de Neubauer y azul de tripano (una tinción vital) para determinar viabilidad celular. En el caso de las clonas C2-40 y C2-225 de *E. histolytica*, la cinética se realizó en presencia de emetina a una concentración final de 40 $\mu$ M y 225 $\mu$ M respectivamente (Fig. 7) (Pérez DG y cols., 1998).

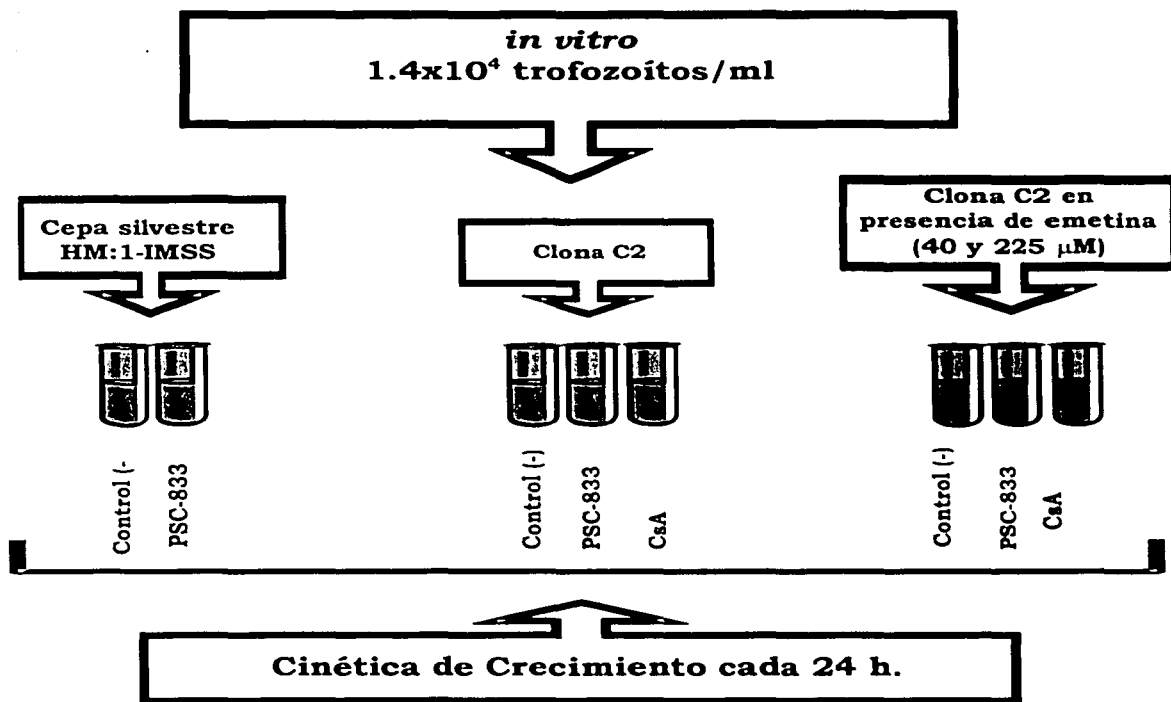


Fig. 7 Esquema del tratamiento de cultivos de *E. histolytica* HM:1-IMSS, clona C2 en presencia y ausencia de emetina con diferentes concentraciones de CsA y PSC-833.

### **3. Absceso Hepático Amibiano**

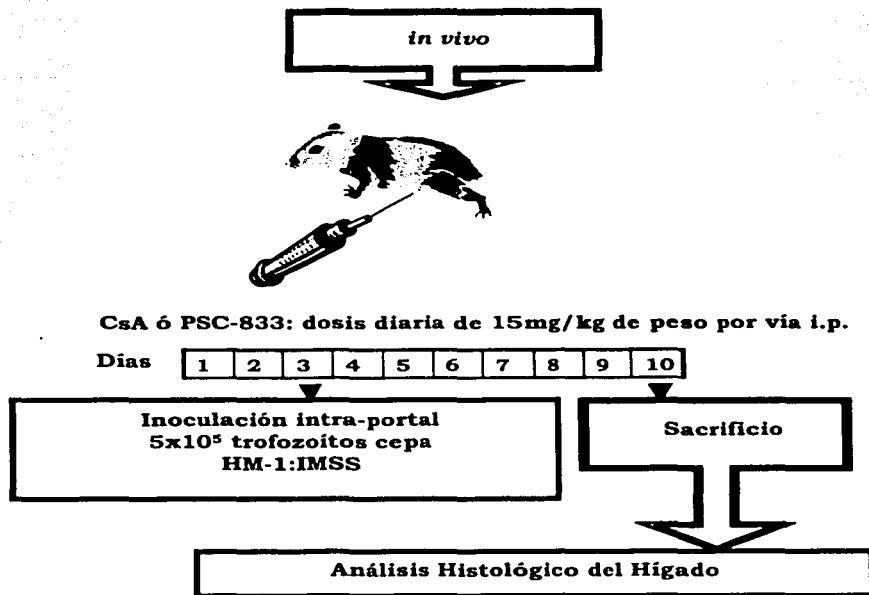
#### **3.1 Inducción del AHA**

La inducción del absceso hepático amibiano en el modelo de hámster dorado *Mesocricetus auratus* se realizó mediante una laparotomía en hembras de 8 semanas de edad y de aproximadamente 100 g de peso.

Los animales fueron sedados con Anestosal (pentobarbital sódico) a dosis de 63 mg/kg de peso por vía intraperitoneal, se rasuraron ventralmente, se hizo asepsia con alcohol y se realizó una incisión con la ayuda de un bisturí, primero sobre la piel y después sobre el tejido muscular. Una vez expuesto el hígado, se inyectaron directamente en la vena porta  $5 \times 10^5$  trofozoítos axénicos de la cepa HM-1:IMSS resuspendidos en 200  $\mu$ l de PBS estéril. Inmediatamente después y para evitar una hemorragia, se cubrió el sitio de la inyección con Gelfoam, una esponja sintética y estéril que es absorbida por los tejidos del cuerpo. Finalmente, los tejidos se suturaron en dos planos con hilo de seda 4-0 (Vicryl) y el área se limpió con peróxido de hidrógeno ( Tsutsumi y cols., 1984).

#### **3.2 Esquema de tratamiento con CsA y PSC-833.**

La CsA y su análogo PSC-833 se administraron en experimentos por separado, a grupos de 6 hámsteres hembras de 8 semanas, vía intra-peritoneal en dosis diarias de 15 mg/kg de peso en 150  $\mu$ l de solución oleosa (aceite de ricino). La administración de las drogas se hizo dos días previos a la inoculación intraportal y se mantuvo por siete días más (Fig. 8). Transcurrido este tiempo los animales fueron sacrificados y se extrajo el hígado, el cual fue revisado macroscópicamente y comparado con los órganos de animales controles no infectados, animales no infectados pero tratados con la droga y animales infectados pero no tratados. Posteriormente los hígados se fijaron en una solución de Formol al 10% en PBS. Estos experimentos se repitieron 2 veces para cada droga.



**Fig. 8** Representación esquemática del tratamiento de hámsteres con CsA y PSC-833 durante la inducción y el desarrollo del AHA.

#### **4. Procesamiento de Tejido Hepático para Análisis Histológico.**

El tejido hepático fijado en formol se embebió en parafina, se realizaron cortes transversales con un microtomo y se elaboraron laminillas que se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE), una coloración mixta (ácido-base) mediante la cual las estructuras nucleares se tiñen de azul o púrpura oscuro y prácticamente todas las estructuras citoplásmicas, las sustancias intercelulares y el tejido conectivo de rosa (Leeson y cols., 1990). Las laminillas fueron analizadas bajo el microscopio óptico para determinar el grado de daño causado por el absceso y el efecto de los fármacos en el desarrollo del mismo. Por último se tomaron fotografías de las áreas representativas de cada corte histológico.



---

## V. RESULTADOS

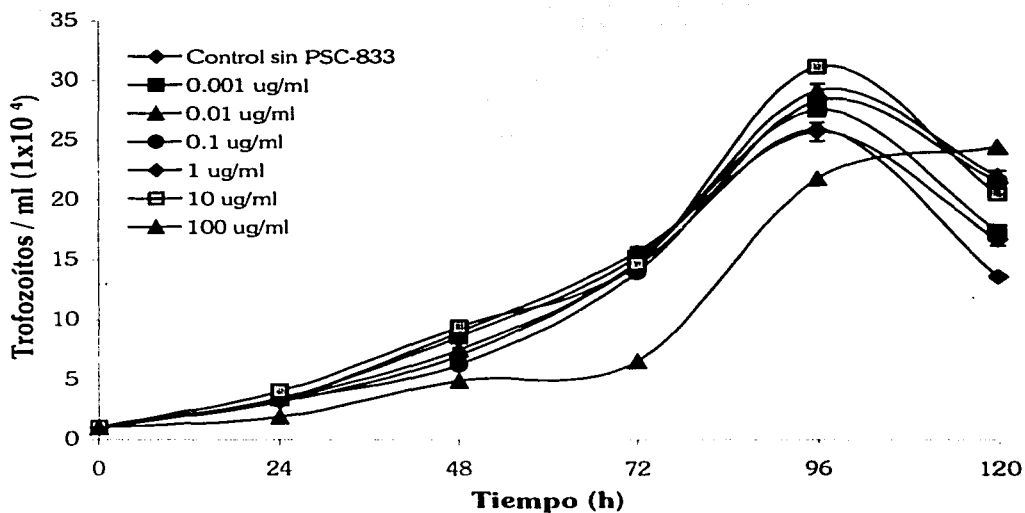
### 1. Efecto de CsA y PSC-833 sobre la cepa HM:1-IMSS.

#### 1.1 Efecto de CsA.

Este es un resultado obtenido y reportado previamente en el laboratorio (Carrero y cols., 2000) pero que en esta tesis es importante debido a que contribuye al planteamiento de las conclusiones, así como aporta una visión global al lector sobre el efecto del inmunosupresor CsA y de su análogo no inmunosupresor PSC-833 sobre *E. histolytica*. En breve podemos decir que los trofozoítos HM:1-IMSS tratados con concentraciones de CsA entre 0.001 y 10  $\mu\text{g/ml}$  mostraron una clara inhibición en la proliferación de una manera dosis-dependiente presentando un  $\text{IC}_{50}$  igual a 1  $\mu\text{g/ml}$ , así mismo concentraciones iguales o mayores a 50  $\mu\text{g/ml}$  provocaron la muerte de los parásitos (Fig. 4).

#### 1.2 Efecto de PSC-833.

En este trabajo lo primero que se hizo fue determinar el efecto de diferentes concentraciones del análogo PSC-833 sobre la proliferación de esta cepa silvestre. El efecto se determinó, al igual que con la CsA, a concentraciones entre 0.001 y 10  $\mu\text{g/ml}$  agregando una última concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ . Se monitoreo la cinética de crecimiento de los cultivos cada 24 h; y a diferencia de la CsA, el PSC-833 no mostró efecto sobre la proliferación de los trofozoítos en ningún tiempo ensayado a concentraciones entre 0.001 y 10  $\mu\text{g/ml}$ , esto con respecto a la curva de crecimiento de los cultivos no tratados (Fig. 9). Únicamente en la concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$  se observó un ligero retraso en la velocidad de crecimiento de los trofozoítos a partir de las 48 y hasta las 72 h de cultivo. Sin embargo, al cabo de 96 h, la cinética de crecimiento se recuperó y se mantuvo similar al resto de las concentraciones ensayadas y al control no tratado (Fig. 9).



**Fig. 9** Cinética del efecto de PSC-833 (0.001-100  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre la proliferación de la cepa HM-1:IMSS de *E. histolytica*.

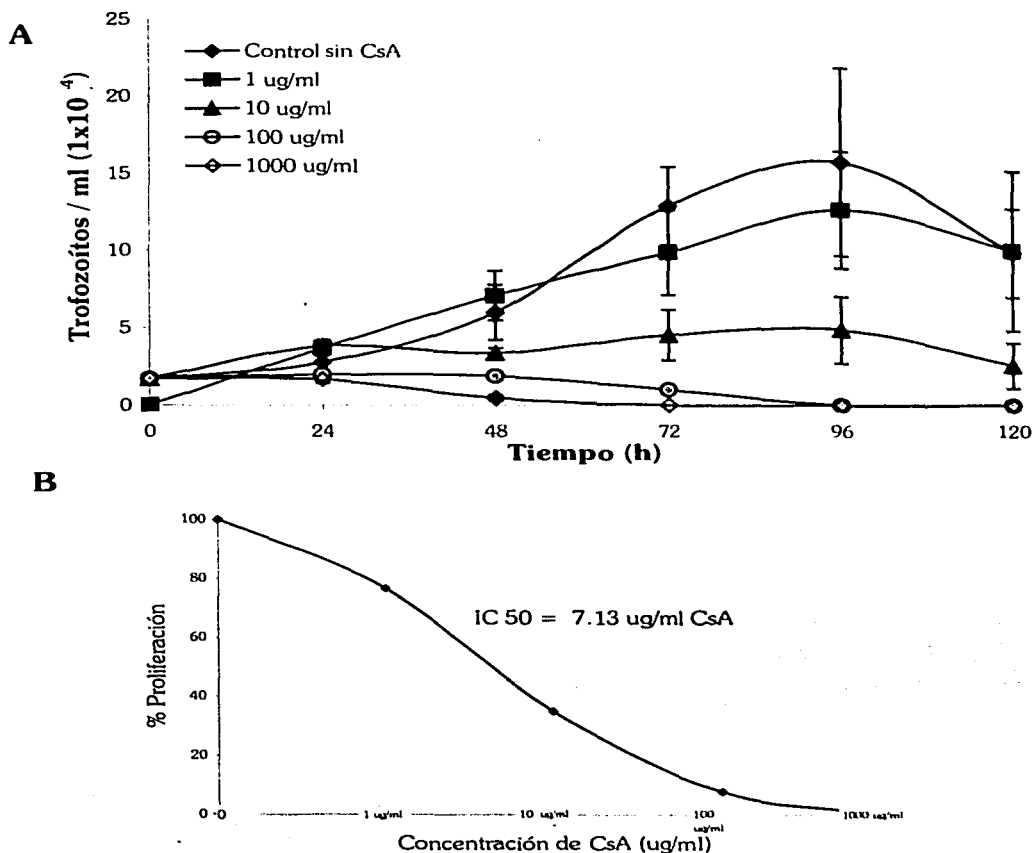
## 2. Efecto de CsA y PSC-833 sobre la clona C2.

Los ensayos con la clona C2 se realizaron tanto en ausencia como en presencia de emetina, en el primer caso con la finalidad de comparar la susceptibilidad de la cepa silvestre HM1:IMSS con respecto a esta clona C2 proveniente de la misma cepa pero que sobreexpresa Pgp. Y en el segundo caso, la finalidad fue analizar el efecto de ambos fármacos sobre la actividad de la Pgp sobreexpresada.

### 2.1 Efecto de CsA.

Al igual que como ocurrió con la cepa silvestre, el tratamiento de la clona C2 con CsA en ausencia de emetina mostró un efecto anti-amibiano dosis-dependiente a las concentraciones ensayadas de 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 10A). Sin embargo, se puede observar que de las cuatro concentraciones solamente 1  $\mu\text{g/ml}$  no mostró

diferencias significativas con el control cultivado sin droga y al mismo tiempo, el efecto sobre la proliferación de 10  $\mu\text{g/ml}$  fue muy evidente. A partir de esta concentración los trofozoítos vistos bajo el microscopio se mostraron redondeados y poco móviles. Por su parte, concentraciones iguales o superiores a 100  $\mu\text{g/ml}$  mataron a los trofozoítos desde tiempos tempranos (Fig. 10A). El  $\text{IC}_{50}$  determinado para la CsA en la clona C2 fue de 7.13  $\mu\text{g/ml}$  en cultivos de 72 h (Fig. 10B).



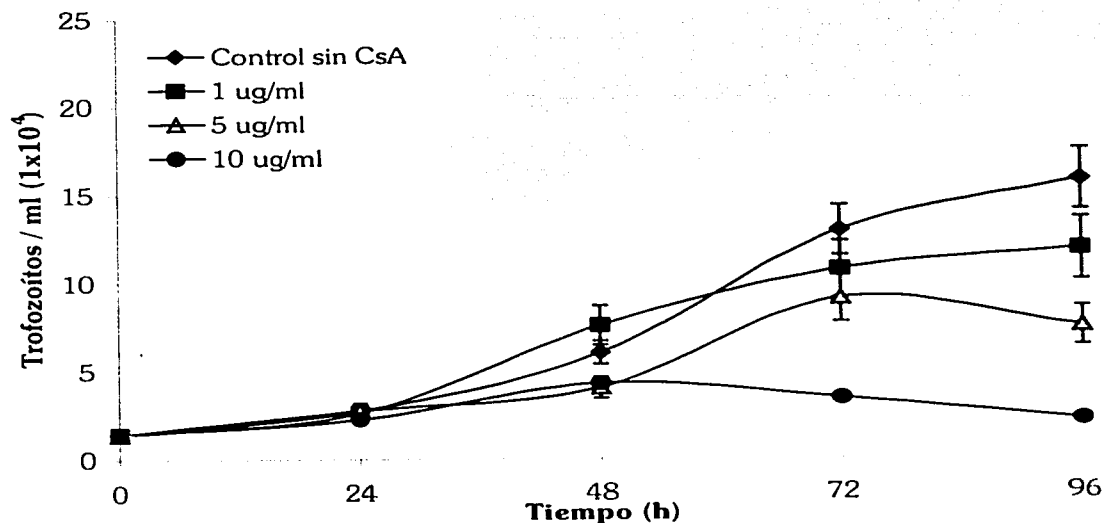
**Fig. 10. A)** Cinética del efecto de la CsA (1-1000  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre la proliferación de trofozoítos de la clona C2 de *E. histolytica* en ausencia de emetina. **B)** Determinación de  $\text{IC}_{50}$  en cultivos de 72 h tratados con CsA.

Para determinar el efecto de la CsA sobre la resistencia a emetina de la clona C2 sin afectar su crecimiento y tomando como base el experimento anterior, se hizo un monitoreo con concentraciones de CsA por debajo de 10  $\mu\text{g/ml}$ . La cinética se realizó durante 96 h, utilizando tres concentraciones de CsA 1, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ . Las cinéticas de proliferación mostraron al igual que el experimento anterior que 10  $\mu\text{g/ml}$  resultó ser una dosis que afectaba significativamente la proliferación, mientras que concentraciones de 5 y 1  $\mu\text{g/ml}$  no presentaron un efecto inhibitorio a las 72 h de cultivo con respecto al control crecido sin droga. (Fig. 11). Por lo tanto obtuvimos dos concentraciones que no afectaron la proliferación de los trofozoítos C2 cuando se cultivan sin emetina, mismas que más adelante utilizamos para evaluar su efecto sobre la función de la Pgp de los trofozoítos cuando se crecen con emetina.

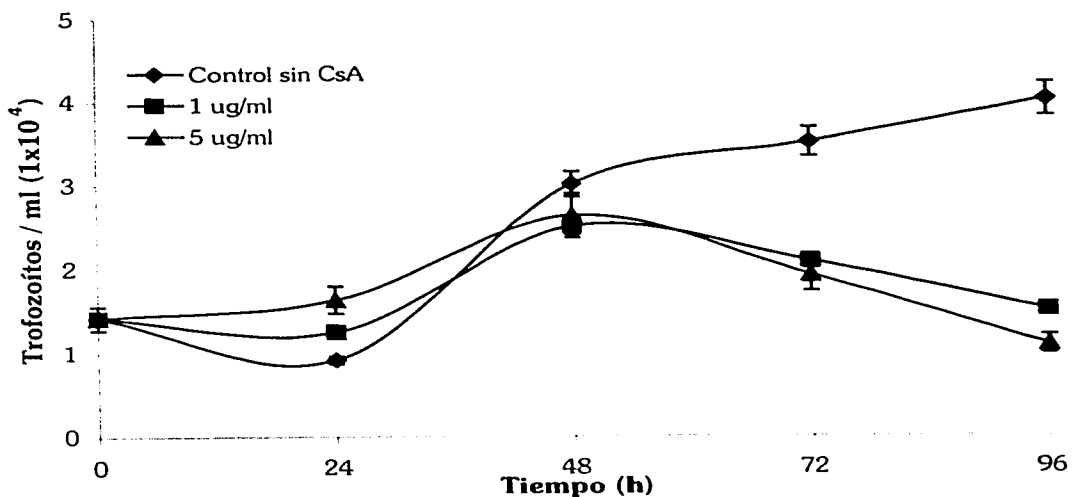
Al realizar las cinéticas de proliferación con la clona C2 con estas dos concentraciones de CsA (1 y 5  $\mu\text{g/ml}$ ) pero ahora en presencia de la concentración de emetina (225  $\mu\text{M}$ ) en la cual los trofozoítos crecen cotidianamente, se observó que la proliferación de los trofozoítos disminuyó considerablemente con respecto al control crecido con emetina pero no tratado con CsA, a tal grado de llevar a los cultivos a la muerte al cabo de 96 h (Fig. 12) revirtiendo el fenotipo de resistencia a emetina de la clona C2.

## **2.2 Efecto de PSC-833**

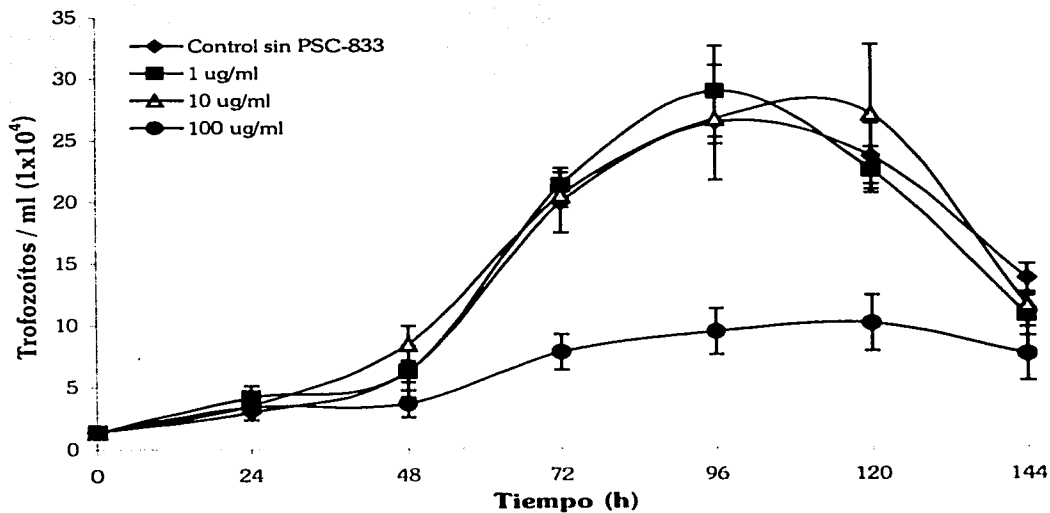
En base a los antecedentes que sugieren una modulación de Pgp por PSC-833, se decidió evaluar su efecto sobre la clona C2 que sobreexpresa Pgp en ausencia de emetina, de la misma manera que con la CsA. La cinética obtenida a 144 h de cultivo con concentraciones de 1, 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$ , mostro al igual que como ocurrió con la cepa silvestre, que en la clona C2 en ausencia de emetina, el tratamiento con PSC-833 a concentraciones de 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$  no inhibió la proliferación significativamente con respecto al control no tratado. De igual forma, sólo la concentración mas elevada de 100  $\mu\text{g/ml}$  inhibió el crecimiento a partir de las 48 h (Fig. 13).



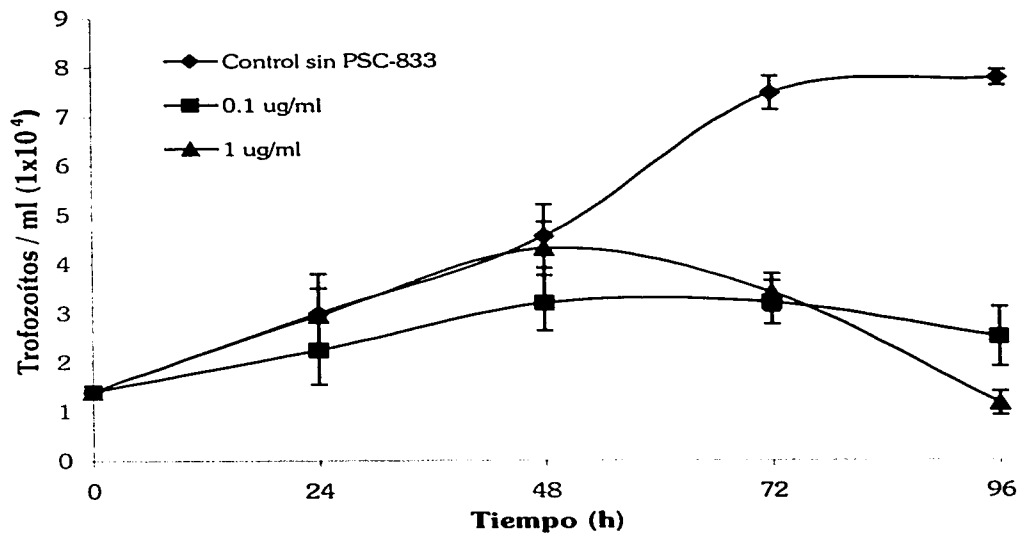
**Fig. 11.** Cinética del efecto de la CsA (1-10 µg/ml) sobre la proliferación de trofozoítos de la clona C2 de *E. histolytica* cultivados sin emetina. ( $1 \times 10^4$ ).



**Fig. 12.** Cinética del efecto de la CsA (1 y 5 µg/ml) sobre la proliferación de trofozoítos de la clona C2 de *E. histolytica* en presencia de 225 µM de emetina.



**Fig. 13.** Cinética del efecto de PSC-833 (1, 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre la proliferación de trofozoítos de la clona C2 de *E. histolytica* en ausencia de emetina.



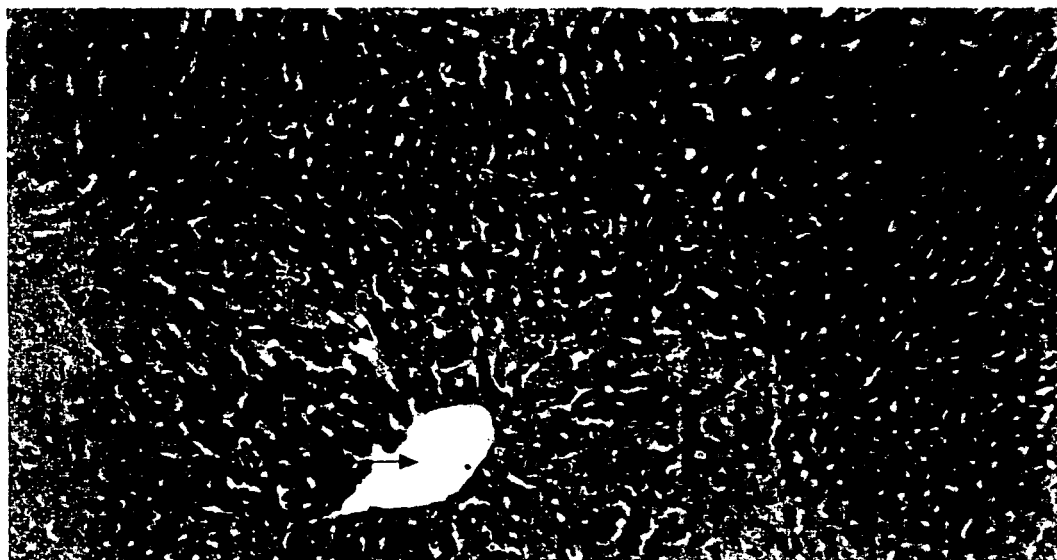
**Fig. 14.** Cinética del efecto de PSC-833 (0.1 y 1  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre la proliferación de trofozoítos de la clona C2 de *E. histolytica* en presencia de 40  $\mu\text{M}$  de emetina.

Posteriormente, para evaluar el efecto de las concentraciones del PSC-833 determinadas en el experimento anterior, pero ahora sobre la resistencia a emetina de la clona C2, a cultivos que se encontraban creciendo cotidianamente en 40  $\mu\text{M}$  de la droga se le agregó 1  $\mu\text{g/ml}$  del análogo que como se describió antes, no mostró efecto sobre la proliferación de dicha clona en ausencia de la emetina, además se abrió el rango utilizando 0.1  $\mu\text{g/ml}$  del PSC-833. A diferencia de la falta de efecto en ausencia de emetina, en este caso las dos concentraciones de PSC-833 revirtieron el fenotipo de resistencia a emetina a partir de las 48 h matando a los trofozoítos al cabo de 96 h (Fig.14).

Este interesante resultado junto con el obtenido para la CsA, sugirieron un bloqueo funcional de las glicoproteínas-P de la clona C2 por acción de ambas drogas (CsA y PSC-833) dicho bloqueo conlleva a la acumulación intracelular de la emetina llevando a los trofozoítos a la muerte.

### 3. Efecto de la CsA sobre el desarrollo del AHA.

En la figura 15 se muestra un corte histológico del tejido hepático de un hámster control tratado con CsA (como se describe en materiales y métodos) y no infectado con *E. histolytica*. Por comparación con cortes de hígado de hámsteres no tratados, se observa que el tejido no sufrió ninguna alteración por efecto de la administración diaria de CsA. En el corte se distinguen los núcleos de los hepatocitos teñidos en púrpura y el resto de las estructuras celulares en rosa.



**Fig. 15** En esta fotografía se observa el tejido hepático de un hámster tratado con CsA y sin infección con *E. histolytica*. La estructura tisular no es alterada por el tratamiento con CsA. **NH**: Núcleos de Hepatocitos, **H**: Hepatocitos, **ES**: Espacios Sinusoidales o Vasculares y **V**: Vena Central. Aumento 10x. Tinción HE.

En las figuras 16, 17 y 18 se muestra el daño hepático siete días después de la inducción del AHA en hámsteres sin tratamiento con CsA. A nivel macroscópico (Fig. 16 A) podemos observar una fuerte hepatomegalia y la presencia de zonas y puntos

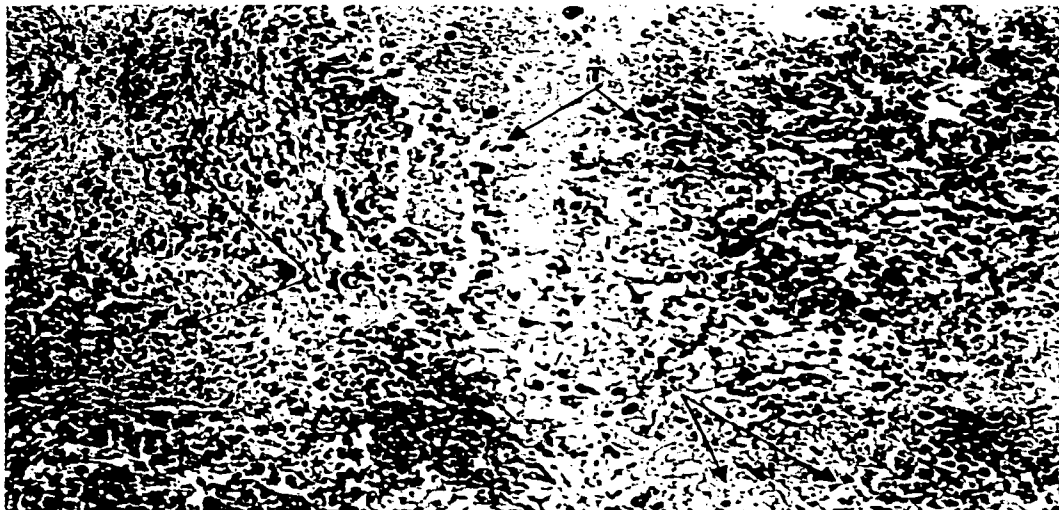


blancos producto de la destrucción del tejido por la formación de los abscesos hepáticos. Mientras que a nivel microscópico (Fig. 17 y 18) existe una clara pérdida de la estructura del tejido, una lisis celular extensa y un severo infiltrado de células inmunes, principalmente polimorfonucleares y algunas células mononucleares (Ravdin, 1988). Estas fotografías se pueden comparar con las figuras 19 y 20 en donde se muestran cortes histológicos representativos de los hígados de hámster infectados con *E. histolytica* y tratados diariamente con 15 mg/kg de peso de CsA. A nivel macroscópico, los hígados de los animales tratados se mostraron similares en peso y color a los hígados de animales no infectados ni expuestos a la droga, con la excepción de diminutos puntos blancos (~ 1 mm de diámetro) extendidos por toda la superficie (Fig. 16 B). El análisis microscópico reveló que estos puntos eran cúmulos de trofozoítos bien delimitados que causaron destrucción del tejido solo en el centro de los mismos (Fig. 19 y 20). El tejido circundante a éstos cúmulos se asemeja a una cubierta de fibroblastos en formación que recuerda a un proceso inicial de cicatrización. El resto del tejido hepático se mostró sano a pesar de que los trofozoítos estaban vivos, lo cual se demostró mediante su recuperación en medio de cultivo TYI-S-33.

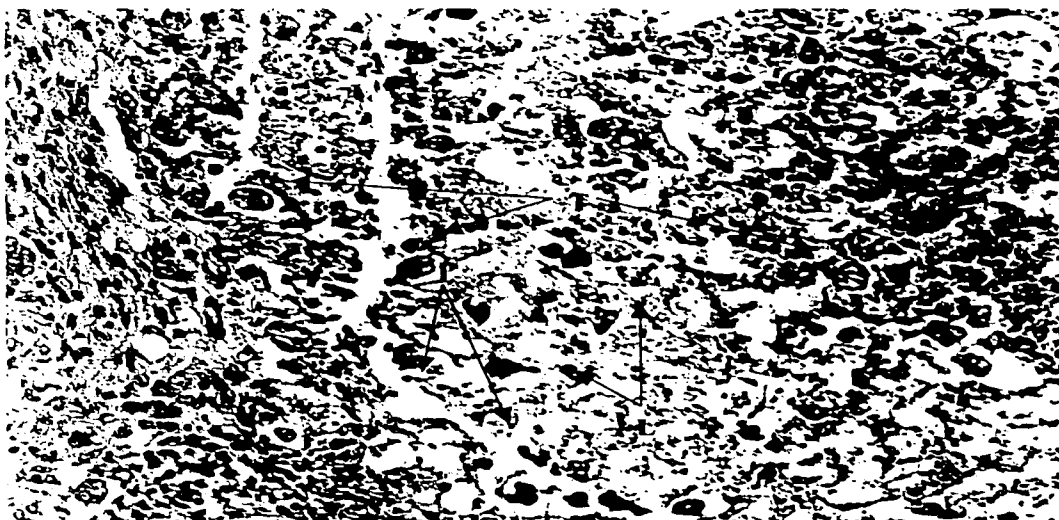
Como era de esperarse, el tratamiento con CsA resultó en una inmunosupresión concomitante con la protección contra el AHA, lo que se demostró por el conteo de células blancas en sangre periférica así como por la incorporación de timidina tritiada (Carrero y cols., 2000).



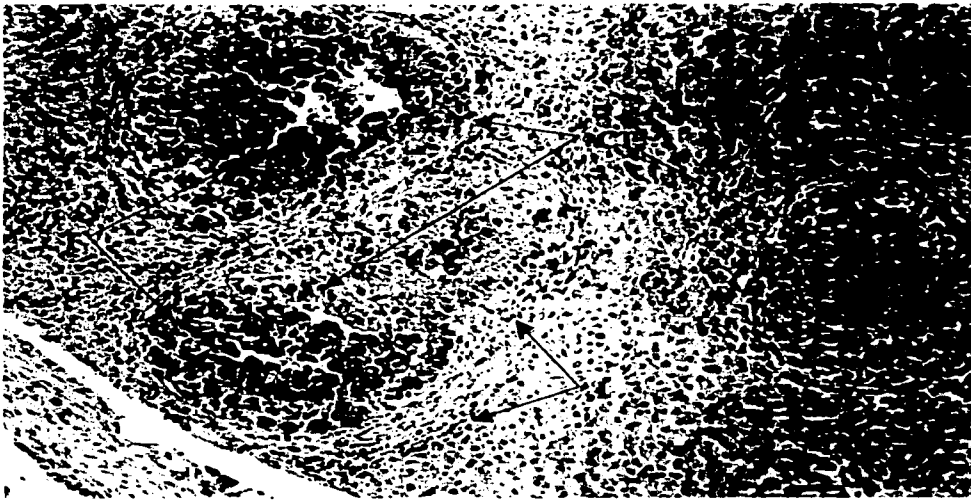
**Fig. 16 A)** Hígados de hámster infectados con *E. histolytica*. Se observa la hepatomegalia en relación a la fotografía B y los abscesos hepáticos como zonas o puntos blancuzcos distribuidos en la mayor parte del tejido. **B)** Hígados de hámster infectados con *E. histolytica* y tratados con 15 mg/kg de peso de CsA. Además de la ausencia de hepatomegalia, la mayoría del tejido no fue afectado y se observan solo algunos pequeños puntos blancos. Es evidente la diferencia entre los animales tratados con la droga y los que no fueron sometidos al tratamiento.



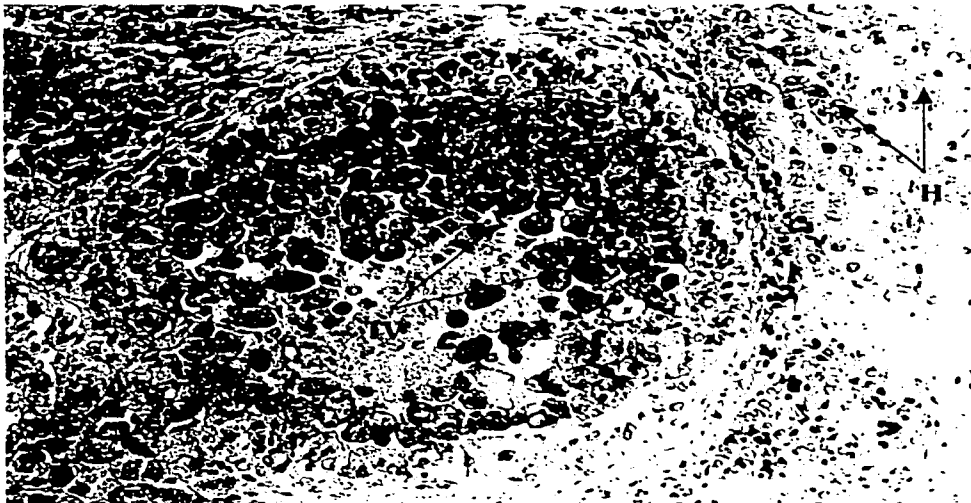
**Fig. 17** Corte histológico del hígado de un hámster infectado con *E. histolytica* y no tratado con CsA. Se observan algunos trofozoítos **T** teñidos en púrpura, un severo infiltrado celular **IC** y la liquefacción del tejido **L**. Aumento 10x. Tinción HE.



**Fig. 18** En una fotografía a mayor aumento (40x), se pueden ver claramente los trofozoítos **T**, la degradación de la estructura, la liquefacción del tejido **L** e incluso la completa pérdida de las estructuras celulares **P**. Tinción HE.



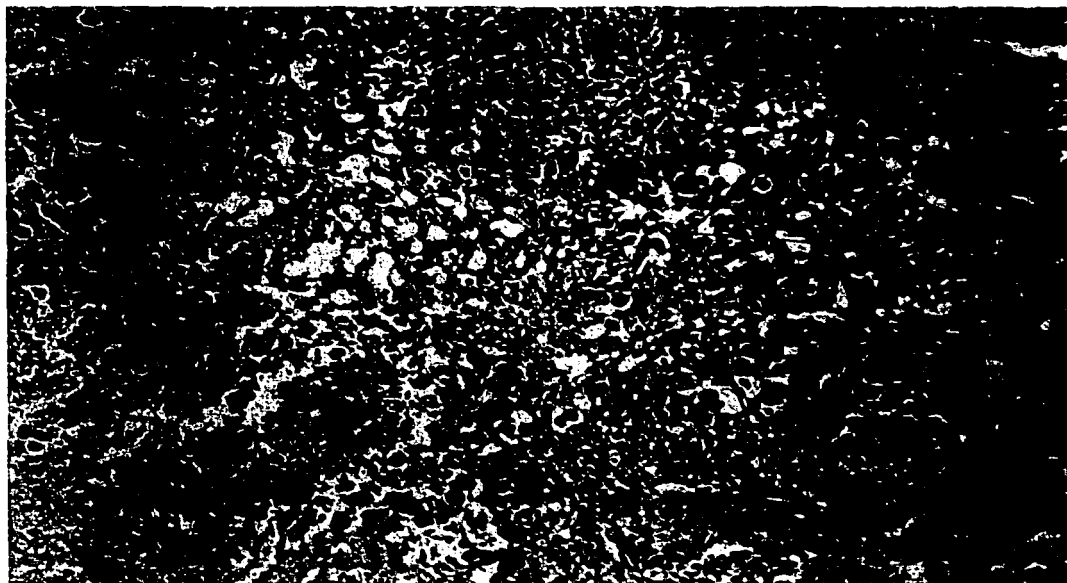
**Fig. 19** Corte histológico de tejido hepático de un hámster infectado con trofozoítos (**T**) de *E. histolytica* y tratado con CsA. (15 mg/kg). Se observa claramente la formación de cúmulos de trofozoítos (**CT**), y alrededor un moderado infiltrado celular (**I**) Tinción HE (10X).



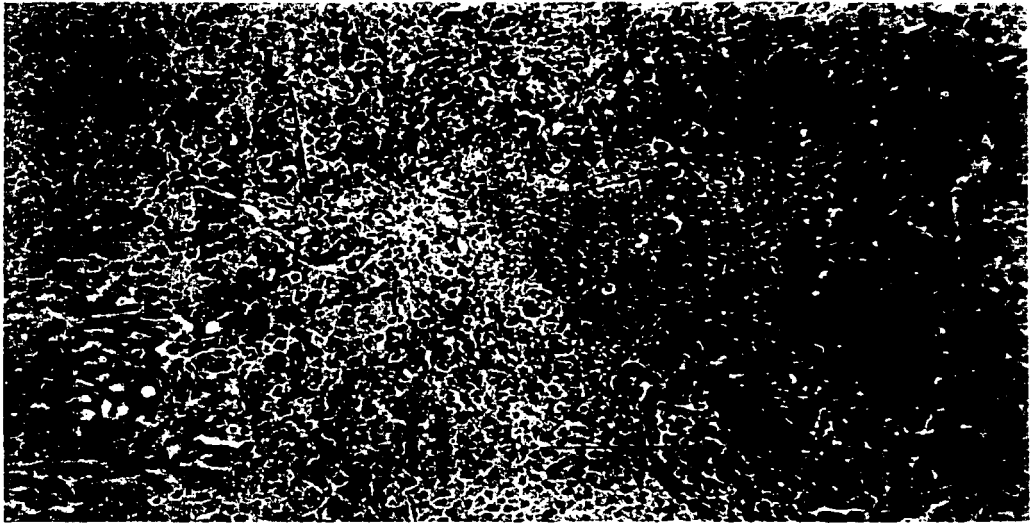
**Fig. 20** En un aumento mayor (40x) se observan los trofozoítos viables (**TV**) dentro de los cúmulos y muy cercanos a este cúmulo se pueden apreciar los hepatocitos (**H**) intactos en su estructura. Tinción HE.

#### 4. Efecto de PSC-833 sobre el desarrollo del AHA.

A diferencia de la CsA, y en concordancia con su nulo efecto *in vitro* sobre la proliferación de *E. histolytica*, PSC-833 no mostró efecto alguno sobre el desarrollo del AHA bajo las condiciones estudiadas. En la figura 21 se muestra un corte histológico representativo de una porción del hígado de un hámster infectado con *E. histolytica*, mientras en la figura 22 se observa parte del tejido hepático de un animal infectado con trofozoítos y tratado con dosis diarias de 15 mg/kg de PSC-833. En ambos casos, se observó una destrucción extensiva del tejido hepático con liquefacción del mismo, infiltrado celular difuso en el borde de las lesiones y presencia de un número moderado de trofozoítos dentro del área de la lesión y en los bordes.



**Fig. 21** Corte histológico del hígado de un hámster control infectado con *E. histolytica* y no tratado con PSC-833. En este caso al igual que con los animales controles de CsA, la liquefacción del tejido (**L**) así como el infiltrado celular (**I**) son severos, con múltiples trofozoítos teñidos en rosa (**T**). Aumento 10x. Tinción HE .



**Fig. 22** En la fotografía se muestra el tejido hepático de un hámster infectado con *E. histolytica* y tratado con 15 mg/kg de peso de PSC-833. A diferencia del claro efecto de la CsA, PSC-833 no mostró efecto alguno sobre el desarrollo del AHA. Como en el control no tratado, se observa la destrucción del tejido (**L**), un severo infiltrado celular (**I**) y múltiples trofozoitos (**T**). Aumento 10x. Tinción HE.

---

## VI. DISCUSIÓN

Partiendo del hecho de que la CsA posee un efecto antiparasitario ampliamente reconocido y debido a que en un estudio anterior a éste, nuestro grupo de trabajo demostró un claro efecto inhibitorio de la CsA en contra de la proliferación de la cepa HM-1:IMSS de *E. histolytica* (Fig. 4: Carrero y cols., 2000), en el presente trabajo se realizaron una serie de ensayos dirigidos a caracterizar este efecto, así como tratar de determinar el mecanismo de acción por el cual la CsA actúa sobre la amiba.

Dado que la CsA es un fármaco inmunosupresor por excelencia, su uso para el tratamiento de las infecciones parasitarias, incluyendo la amibiasis, no es viable. Sin embargo, existen algunos fármacos derivados de la CsA que no son inmunosupresores, tales el caso del PSC-833. Se ha descrito que en algunos parásitos, este análogo tiene un efecto antiparasitario incluso más potente que la propia CsA. Por ejemplo en *T. gondii* el  $IC_{50}$  para la CsA es de 4.5  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que el valor determinado para el análogo PSC-833 es de 2.7  $\mu\text{g/ml}$  (Silverman y cols., 1997). Otro parásito en el que se ha contrastado el efecto de estos dos fármacos es *C. parvum* en el que se obtuvo para la CsA un  $IC_{50}$  de 1.6  $\mu\text{M}$  y para el análogo de 1  $\mu\text{M}$  (Perkins y cols., 1998). Este efecto lo han atribuido en ambos casos, a un posible bloqueo de las glicoproteínas-P de los parásitos ya que a diferencia de la CsA, PSC-833 no se une a las ciclofilinas y por lo tanto no tiene capacidad inmunosupresora (Archinal-Mattheis y cols., 1995). Es precisamente esta característica la que se aprovechó en este trabajo para explorar el mecanismo de acción de la CsA, como lo veremos más adelante.

En cuanto a la cepa HM-1:IMSS y contrario a lo que se había observado previamente para la CsA, el tratamiento de los trofozoítos con el análogo PSC-833 no mostró efecto inhibitorio sobre la proliferación (Fig. 10). Debido a que existe evidencia suficiente de que el análogo inhibe la función de bombeo de las glicoproteínas-P

(Archinal-Mattheisy cols., 1995; Demule y cols., 1997; Di Pietro y cols., 1999), este resultado nos llevó a plantear dos posibilidades **1)** PSC-833 no es capaz de inhibir la Pgp amibiana y por lo tanto no afecta la proliferación de los trofozoitos y **2)** PSC-833 si inhibe la función de bomba de la Pgp, pero esta función no es crucial para la proliferación de los trofozoitos de *E. histolytica*, al menos en las condiciones de cultivo ensayadas *in vitro*. Para determinar cual de estas hipótesis era la correcta, decidimos probar el efecto tanto de la CsA como del PSC-833 en la clona C2, la cual como ya se mencionó en la introducción es capaz de crecer en ciertas concentraciones de emetina dada la sobreexpresión de los genes que codifican para las glicoproteínas-P. (Orozco y cols., 1999). Al mismo tiempo, estos ensayos nos permitirían discernir entre los dos mecanismos de acción propuestos para el efecto de la CsA. El primero de ellos podría ser similar al mecanismo por el cual la CsA suprime al sistema inmune, inhibiendo la proliferación de los linfocitos T, mediante la formación de los complejos proteicos CsA-CyP, los cuales indirectamente y por medio de la inhibición de la actividad defosforilante de la CN inhiben la replicación celular del parásito (Fig. 6) (Bell y cols., 1996; Silverman y cols., 1997). La segunda posibilidad tiene que ver con la inhibición de la función de bomba de la Pgp y por lo tanto de la detoxificación celular (Fig. 7) (Foxwell y cols., 1989).

La disposición de la clona C2 de *E. histolytica* que sobreexpresa Pgp permitió por una parte, demostrar que el análogo PSC-833 utilizado en los ensayos, estaba activo; esto en base a su capacidad ampliamente conocida de unirse a las glicoproteínas-P e inhibirlas funcionalmente; además de permitirnos analizar directamente la segunda vía propuesta y así deducir cual de ellas era el blanco del efecto anti-amibiano registrado para la CsA. Los resultados mostraron que, al igual que la cepa HM-1:IMSS, la clona C2 es susceptible a la CsA con un  $IC_{50}$  igual a 7.13  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 11B), sin embargo el análogo no tuvo efecto sobre dicha clona (Fig. 14).

Por otro lado, para evaluar el efecto de la CsA y el análogo no inmunosupresor sobre el fenotipo de resistencia a emetina de la clona C2, primero se determinaron las concentraciones de ambas drogas que no ejercieron efecto sobre el crecimiento de los trofozoitos C2 en ausencia de emetina (Fig. 11A, 12 y 14). Concentraciones de 1 y 5



$\mu\text{g/ml}$  fueron las elegidas para la CsA y de 0.1 y 1  $\mu\text{g/ml}$  para el PSC-833. Posteriormente estas mismas concentraciones se administraron pero ahora a cultivos con trofozoítos C2 crecidos con emetina. Los resultados obtenidos demostraron que en estas condiciones las concentraciones de CsA y PSC-833 que no afectaron el crecimiento de C2 en ausencia de emetina, inhibieron la proliferación del cultivo significativamente en presencia de emetina a partir de las 48h. (Fig. 13 y 15). Estos hallazgos sugieren una inhibición de la función de detoxificación de la emetina llevada a cabo por la Pgp amibiana. En este caso cuando los trofozoítos tienen la presión de la emetina, los resultados muestran que ambas drogas matan a las amibas debido a la acumulación de emetina intracelular, como resultado de la inhibición de bombeo de la Pgp, revirtiendo así el fenotipo de resistencia.

Estos resultados ponen en evidencia la actividad de las drogas CsA y PSC-833 sobre la actividad de las glicoproteínas-P de la amiba coincidente con lo que se ha reportado en otros sistemas. Sin embargo, el hecho de que la CsA ejerza un efecto antiproliferativo sobre la cepa HM-1:IMSS y la clona C2 en ausencia de emetina, pero PSC-833 no tenga efecto en ninguna de las dos, sugiere que el mecanismo de acción de la CsA sobre *E. histolytica* es mediado preferencialmente por la vía de la inhibición en la replicación celular a través de la enzima CN (CsA-CyP). Sin embargo, la demostración de esta sugerencia requiere de experimentos específicos para esta vía, como por ejemplo la demostración de la existencia de una CN en *E. histolytica* y del bloqueo de sus funciones por la interacción con los complejos proteicos de CsA con las CyP citosolicas, por otro lado, la demostración de la translocación al núcleo de un factor tipo NF-AT en la amiba sería definitiva.

Finalmente, el hecho de que los trofozoítos de la clona C2 solo fueran afectados en su crecimiento por PSC-833 en presencia de emetina, sugiere que la actividad de Pgp es probablemente esencial para la sobrevivencia de la amiba en aquellos casos que amerite la eliminación de drogas potencialmente tóxicas y a altas concentraciones. En ausencia de éstas la sobrevivencia de la amiba no parece ser afectada por el bloqueo de sus glicoproteínas-P.

En cuanto al efecto de la CsA sobre el desarrollo del AHA en hámsteres, se observó una inhibición en la extensión de los abscesos hepáticos en los animales tratados con respecto a los hámsteres sin tratamiento. Inesperadamente por efecto del tratamiento se observó una gran cantidad de trofozoítos viables agrupados en cúmulos. Es notable que a pesar de que el número de trofozoítos en los animales no tratados (controles) y que desarrollaron extensivos AHA fue menor que en los tratados, sin embargo estos mostraron un daño muy extenso con poco tejido sano y presencia de severos infiltrados celulares y liquefacción en la mayor parte del tejido hepático. Por el contrario, la presencia de cúmulos de trofozoítos viables en los animales tratados con CsA, contrasta con un infiltrado muy pobre y un daño en la estructura del tejido casi imperceptible. Estos resultados nos llevaron a postular algunas hipótesis:

**a)** Debido a que la administración de CsA mantiene a los hámsteres inmunosuprimidos al mismo tiempo que los protege de las lesiones hepáticas, se sugiere un posible papel de los linfocitos T y de las células T ayudadoras en la diseminación del daño hepático. La participación de la respuesta inmune en el daño hepático producido por la amiba es apoyada por trabajos del grupo de Martínez-Palomo (Tsustsumi y cols, 1984), en los que se sugiere que la lisis del parénquima hepático no es resultado del contacto directo de las amibas con los hepatocitos puesto que dicho contacto es poco frecuente, además de que trofozoítos fijados e inyectados en animales provocan el mismo daño hepático que los trofozoítos viables. Sus trabajos sugieren que el establecimiento del AHA en el modelo de hámster podría iniciarse por la lisis de PMN y la consecuente liberación de sus enzimas líticas que destruirían el tejido del hospedero. Este fenómeno ya ha sido descrito anteriormente para otros agentes patógenos como *Mycobacterium tuberculosis*, en el que el establecimiento de la infección es mediada por la participación de las células T CD4<sup>+</sup> del sistema inmune del hospedero (Van-Crevel y cols., 2002). Lo anterior da pauta a que un mecanismo similar pudiera estar interviniendo en el establecimiento del AHA.

**b)** Por otro lado, la presencia de una gran cantidad de trofozoítos viables en cúmulos, sugiere que la CsA podría estar inhibiendo algún mecanismo de liberación

de los productos líticos de la amiba que normalmente utiliza para su diseminación y destrucción del tejido, confinándola en un área reducida del tejido hepático. La proliferación *in situ* de los trofozoítos en este caso, no parece haber sido afectada por el tratamiento con CsA.

A diferencia de CsA y de acuerdo con los resultados obtenidos *in vitro*, PSC-833 no ejerció ningún efecto sobre el desarrollo de las lesiones hepáticas. Debido a que tampoco posee un efecto *in vitro* sobre los trofozoítos de *E. histolytica*, no se puede aseverar que el daño observado en los hámster tratados con PSC-833 este dado por la intervención de las células del sistema inmune; sin embargo, el hecho de que PSC-833 no ejerza ningún efecto sobre la amiba, a excepción de cuando ésta depende de la funcionalidad de sus Pgp's para eliminar emetina y probablemente otras drogas, sugiere que bajo condiciones libres de drogas la amiba es altamente susceptible por la vía de la CN y la inhibición de la replicación, dejando abierta la posibilidad del uso de esta vía como blanco para el desarrollo de agentes antiamibianos mejor tolerados por el humano que la CsA.

Ahora el reto en esta parte del trabajo consiste en determinar el papel de las células del sistema inmune en el desarrollo del AHA, para lo cual es necesario trabajar con fármacos que posean actividad anti-amibiana y que al mismo tiempo no sean inmunosupresores, como podría ser el caso de la Rapamicina.

---

## VII. CONCLUSIONES

- 1.** A diferencia de CsA, PSC-833 no ejerce efecto sobre la proliferación de *Entamoeba histolytica* ni sobre el desarrollo del AHA en hámster.
- 2.** Tanto la CsA (1-5  $\mu\text{g/ml}$ ) como el PSC-833 (0.1-1  $\mu\text{g/ml}$ ) inhiben la función de la Pgp de *Entamoeba histolytica*, revirtiendo el fenotipo MDR de la clona C2 resistente a emetina.
- 3.** Ya que PSC-833 parece unirse a la Pgp de la amiba pero no a la CyP, se puede especular que el efecto anti-amibiano *in vitro* de la CsA podría ejercerse a través de la vía mediada por la inhibición de la calcineurina mediante los complejos Cyp-CsA.
- 4.** Basados en algunas sugerencias previamente reportadas acerca de la respuesta inmune en el AHA y al hecho de que había gran cantidad de trofozoítos vivos en los hígados protegidos del absceso por la CsA, se sugiere que el efecto de la CsA sobre el desarrollo del AHA podría estar mediada a través de la vía inmunosupresora en el huésped .

---

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- **Archinal-Mattheis** A, Rzepka RW, Watanabe T (1995). Analysis of the interaction of SDZ PSC 833 ([3'-keto-Bmt1]-Val2]-cyclosporine), a multidrug resistance modulator, with P-glycoprotein. *Oncol. Res.* **7**, 603-610.
- **Ayala** P, Samuelson J, Wirth D, Orozco E (1990). *Entamoeba histolytica*: physiology of multidrug resistance. *Exp. Parasitol.* **71**, 169-175
- **Ayala** P, Samuelson J, Wirth D, Orozco E (1990). Multidrug resistance in *Entamoeba histolytica*. *Arch. Inv. Med (Mex)*. **21**, S103-S107.
- **Bañuelos** C, Pérez DG, Gómez C, Orozco E. (2000). Expresión and Inmunodetection of a P-glycoprotein in emetine-resistant trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* **31**, S288-S290.
- **Bayley** GB, Nudelman DE, Day DB, Harper CF, Gilmour JR. (1990). Specificity of glicosphingolipids recognition by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.* **58**, 43-48.
- **Bell** A, Robert HC, Chappell LH (1996). The antiparasite effects of cyclosporin A: possible drug target and clinical applications. *Gen. Pharmac.* **27**,963-971.
- **Bell** A, Wemli B, Franklin R (1994). Role of peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase and calcineurin in the mechanisms of antimalarial action of cyclosporin A, FK506, and rapamicin. *Bioch. Pharmacol.* **48**,495-503.

- **Bendesky** A, Menéndez D (2001) Metronidazol: una visión integral. *Rev. Fac. Med. UNAM.* **44**, 255-259.
  
- **Braga** L, Ninomiya H, McCoy J, Eacker S, Wiedmer T, Pham C, Wood S, Sims P, Petri WA. (1992). Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* **90**, 1131-1137.
  
- **Carrero** JC, Petrossian P, Olivos A, Sánchez-Zerpa M, Ostoa-Soloma P, Lalette JP (2000). Effect of cyclosporin A on *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* **31**,S8-S9.
  
- **Chappell** LH, Wastling JM (1992). Cyclosporin A: antiparasite drug, modulator of the host-parasite relationship and immunosuppressant. *Parasitol.* **105**,S25-S40.
  
- **Clipstone** NA, Fiorentino DF, Crabtree GR (1994). Molecular analysis of the interaction of calcineurin with drug-immunophilin complexes. *J. Biol. Chem.* **269**, 26431-26437.
  
- **Conde-Bonfil** MC, De la Mora-Zerpa C (1992). *Entamoeba histolytica*: un desafío vigente. *Salud Publica de México.* **34**, 335-341.
  
- **Delgadillo** DM, Pérez DG, Gómez C, Ponce A, Paz F, Bañuelos C, Mendoza L, López C, Orozco E. (2002). The *Entamoeba histolytica* EhPgp5 (MDR like) protein induce swelling of the trophozoites and alters chloride-dependent currents in *Xenopus laevis* oocytes. *Microbial Drug. Resist.* **8**, 15-25.
  
- **Demule** M, Wenger RM, Béliveau R (1997). Molecular Interactions of Cyclosporin A with P-glycoprotein. *Jorn. Biol. Chem.* **272**, 6647-6652.
  
- **Descoteaux** S, Shen PS, Ayala P, Orozco E, Samuelson J (1992). P-glycoprotein genes of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* **23**:23-25.
  
- **Diamond** LS, Harlow DR, Cunnick CC (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**, 431-432.

- **Di Pietro** A, Dayan G, Conseil G, Steinfels E, Krell T, Trompier D, Baubichon-Cortay H, Jault JM (1999). P-glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells: using recombinant cytosolic domains to establish structure-function relationships. *J. Brazilian.* **32**, 925-939.
- **Dobson** S, May T, Berriman M, Del Vecchio C, Fairlamb A, Chakrabarti D, Barik S (1999). Characterization of protein Ser/Thr phosphatases of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: inhibition of the parasitic calcineurin-cyclophilin-cyclosporin complex. *Mol. Biochem. Parasitol.* **99**, 167-181.
- **Foxwell** B, Mackie A, Ling V, Ryffel B (1989). Identification of the Multidrug Resistance-Related P-glycoprotein as a Cyclosporine Binding Protein. *Mol. Pharmacol.* **36**, 543-546.
- **Gadasi** H, Kessler E. (1983). Correlation of virulence and collagenolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 1403-1411.
- **Gamarro** F, Castanys S (1997). Molecular Mechanism of drug resistance in parasites. *Ars Pharmaceutica.* **38**, 137-149.
- **García-Manzo** TN (1989). Amibiasis Tratamiento Medico ¿Hay algo mejor que el metronidazol? *Gastroenterol. Mex.* **54**, 181-184.
- **Gómez** C, Pérez DG, Guzmán-Sánchez, Merchat L, Paz F (2000). Cis-elements upregulate the activity of *Entamoeba histolytica* EhPgp1 Gene Promoter. *Ach. Med. Res.* **31**, S275-S276.
- **Gómez** C, Pérez DG, López-Bayghen E, Orozco E. (1998). Transcriptional análisis of the EhPgp5 promoter of *E. histolytica* multidrug-resistant mutant. *J. Biol. Chem.* **27**, 7277-7282.
- **Gómez** C, Pérez-Ishiwara DG, Ayala P, Samuelson J, Orozco E (1996). Physiology and Molecular Biology of Multidrug Resistance in *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* **27**:421-425.

- **Handschumacher** RE, Hardin MW (1984). Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein of Cyclosporin A. *Science* **226**, 544-547
- **Hanna** RM, Dahniya MH, Badr SS, El-Betagy A (2000). Percutaneous catheter drainage in drug-resistant amoebic liver abscess. *Trop. Med. Int. Health.* **5**, 578-581.
- **Hardin** MW, Handschumacher RE, Speicher DW (1986). Isolation and aminoacid sequence of cyclophilin. *The Journl Biol. Chem.* **261**, 8547-8555.
- **Hidalgo** ME, Hernández R, Keene WE, McKerrow JH, Orozco E. (1990). Direct relationship between secretion of proteolytic enzymes and virulence of *E. histolytica*. *Ach. Invest. Med.* **21**, 133-139.
- **Higgins** CF (1995). Volume-activated chloride currents associated with the multidrug resistance P-glycoprotein. *J. Physiol.* **428**, S31-S36.
- **Khattab** A, Pica-Mattoccia L, Wenger R, Cioli D, Klinkert MQ (1999). Assay of *Schistosoma mansoni* calcineurin phosphatase activity and assessment of its role in parasite survival. *Mol. Biochem. Parasitol.* **99**, 269-273.
- **Kocken** CHM, Van Der Wel A, Rosenwirth B, Thomas AW (1996). *Plasmodium vivax*: in vitro antiparasitic effect of cyclosporins. *Exp. Parasitol.* **84**, 439-443.
- **Leeson** TS, Leeson CR, Paparo A Texto / Atlas de Histología. Ed. Interamericana McGraw-Hill. México DF, 1990. pp.12-14.
- **Long-Krug** SA, Fisher KG, Hysmith RM, Ravdin JI. (1985). Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica* description and subcellular localization. *J. Infect. Dis.* **152**, 536-540.
- **Martínez-Palomo** A. (1988). Biology of Amebiasis: Progress and Perspectives. *Biol. Parasitism.* 61-76.



- **Martínez-Palomo A** (1987). The Patogenesis of Amoebiasis. *Parasitol. Tod.* **3**, 111-118.
- **Marínez-Palomo A**, Tsutsumi V, Ayala-Velazquez F, González R (1989). Ultrastructure of experimental intestinal invasive amoebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **41**, 273-279.
- **Martínez-Palomo A** (2000). *Intestinal amoebae*. En: Amibiasis Obra Seleccionada. Ed. El Colegio Nacional. México, D.F; Vol. III. pp. 315-335.
- **Menéndez-Rendón D** (2002). Tesis Doctoral: La susceptibilidad a los efectos genotóxicos del Metronidazol. UNAM. Instituto de Investigaciones Biomédicas.
- **Neil A**, Crabtree G (1992). Identification of calcineurin as key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature.* **357**, 695-697.
- **Nickell SP**, Scheibel LW, Cole GA (1982). Inhibition by cyclosporin A of rodent malarial *in vitro*. *Infec. Inmun.* **37**:1093-1100.
- **Orozco E**, Cruz-Hernández F, Rodríguez MA (1985). Isolation and characterization of *E. histolytica* mutant resistant to emetine. *Mol. Biochem. Parasitol.* **15**, 49-59.
- **Orozco E**, Pérez DG, Gómez MC, Ayala P. (1995). Multidrug Resistance in *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Today.* **11**, 473-475.
- **Orozco E**, Gómez C, Pérez DG. (1999). Physiology and Molecular genetics of Multidrug Resistance in *Entamoeba histolytica*. *Drug Resist. Updat.* **2**, 188-197.
- **Organización Mundial de la Salud**. Amoebiasis, an expert consultation. Weekly Epidemiological Record No. 14, Ginebra, Abril 1997.
- **Organización Panamericana de la Salud**. Boletín Epidemiológico. Vol. 18, No.1; Marzo 1997.

- **Ostoa-Saloma P**, Carrero JC, Petrossian P, Hérión P, Landa A, Laclette JP (2000). Cloning, characterization and functional expresión of a cyclophilin of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Bioch. Parasitol.* **107**, 219-225.
- **Page AP**, Kumar S, Carlow CKS (1995). Parasite cyclophilins and antiparasite activity of cyclosporin A. *Parasitol. Tod.* **11**, 385-388
- **Pérez DG**, Gómez C, Paz F, Orozco E (2000). The multidrug-resistance phenotype of *Entamoeba histolytica*-transfected trophozoites with the *EhPgp5* gene. *Arch. Med. Res.* **31**, S277-S278.
- **Pérez DG**, Gómez C, López-Bayghen E, Tannich E, Orozco E. (1998). Transcriptional análisis of the *EhPgp5* promoter of *Entamoeba histolytica* multidrug-resistant mutant. *J. Biol. Chem.* **27**, 7285-7292.
- **Perkins M**, Wu T, Le Blancq S (1998). Cyclosporin analogs inhibit *in vitro* growth of *Cryptosporidium parvum*. *Antimicrob. Agts. Chemother.* **42**, 843-848.
- **Ravdin JI**. (1988). Amoebiasis, Human Infection by *Entamoeba histolytica* Ed. Churchill Livingstone, New York, United States of America, pp.838.
- **Samarawickerna NA**, Brown DM, Upcroft JA, Thammapalerd N, Upcroft P (1997). Involvement of superoxide dismutase and pyruvate: ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**, 833-840
- **Samuelson J**, Ayala P, Orozco E, Whirth D (1990). Emetine resistance mutants of *Entamoeba histolytica* overexpress mRNAs for multidrug resistance. *Arch. Invest. Med.* **21**, Sup.1:183-189.
- **Samuelson J**, Burke A, Courval JM (1992). Susceptibility of an emetine-resistant mutant of *Entamoeba histolytica* to multiple drugs and to channel blockers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:2392-2397.

- **Serra E, Lardans V, Dissous C.** (1999). Identification of NF-AT-like transcription factor in *S. manssoni* it's possible involment in the antiparasitic action of cyclosporin A. *Mol. Bioch.Parasitol.* **101**, 33-41.
- **Shustik C, Dalton W, Gros P** (1995). P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells: biochemistry, clinical relevance and modulation. *Molec. Aspects Med.* **16**, 71-78
- **Sikic BL** (1997). Pharmacologic approaches to reversing multidrug resistance. *Semin. Hematol.* **34**, 40-47
- **Silverman J, Hayes M, Luft B, Joiner, K** (1997). Characterization of anti-*Toxoplasma* activity of SDZ 215-918, a cyclosporin derivative lacking immunosuppressive and peptidyl-prolyl-isomerase-inhibiting activity: possible role of a P-glycoprotein in *Toxoplasma* physiology. *Antimicrob. Agent. Chemoter.* **41**, 1859-1866.
- **Tomen-Scott K** (1981). Antimalarial activity of cyclosporin A. *Agents and Actions.* **11**, 770-773.
- **Tsutsumi V, Mena-López R, Anaya F, Martínez\_palomo A** (1984). Cellular bases of experimental liver abscess formation. *Am. J. Phatol.* **117**, 81-91.
- **Twentyman P** (1992). Cyclosporins as drug resistance modifiers. *Bioche. Pharmacol.* **43**,109-117.
- **Upcroft JA, Campbell RW, Benakli K, Upcroft P. Vanelle P** (1999). Efficacy of new 5-nitroimidazoles against metronidazole-susceptible and resistant *Giardia*, *Trichomonas*, and *Entamoeba spp.* *Antimicrob. Agent.Chemother.***43**,73-76.
- **Van-Crevel R, Ottenhoff TH, Van der Meer JW** (2002). Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 294-309.

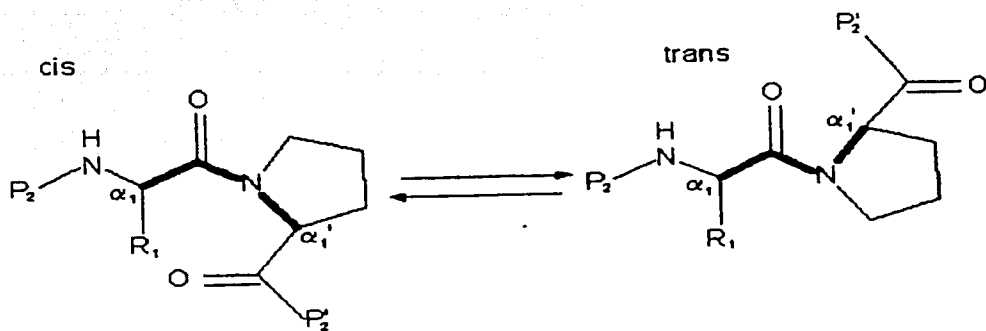
- **Van-Helvoort** A, Smith AJ, Spornig H, Fritzsche I, Schinkel AH, Borst P, Van-Meer G (1996). MDR 1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR 3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell*. **87**, 507-517.
- **Wassmann** C, Hellberg A, Tannich E, Bruchhaus I (1999). Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. *J Biol Chem*. **10**, 274, 37.
- **Wassmann** C y Bruchhaus, I (2000). Superoxide dismutase reduces susceptibility to metronidazole of the pathogenic protozoan *E. histolytica* under microaerophilic but not under anaerobic conditions. *Archives of Biochemistry and biophysics*. **376**, 236-238.
- **Zambrano-Villa** S, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Ortiz-Ortiz L (2002). How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasit Review*. **18**, 272-278.

---

## IX. ANEXO

### Actividad de peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa

Cuando dos aminoácidos forman un enlace peptídico, los carbonos  $\alpha$  ( $C_{\alpha_1}-C_{\alpha_1}$  en la figura) de cada uno de los aminoácidos involucrados pueden quedar en posición *cis* o en posición *trans* uno con respecto al otro. Sin embargo, la gran mayoría de los enlaces peptídicos presentan la posición *trans* debido a que la posición *cis* origina conflictos estéricos en la cadena de aminoácidos. Los enlaces peptídicos que involucran a la prolina como segundo aminoácido son la excepción debido a que las fuerzas repulsivas de la cadena de aminoácidos son similares en ambos isómeros, aunque sigue predominando la conformación *trans*. De esta forma, se calcula que mientras un 10 al 30 % de los isómeros que involucran a la prolina como segundo aminoácido del enlace peptídico se encuentran en conformación *cis*, para los enlaces peptídicos formados por el resto de los aminoácidos se piensa que menos del 0.1% de los isómeros se encuentran en dicha conformación. Ambos porcentajes son calculados en péptidos lineares. En las proteínas de las que se conoce la estructura terciaria, aproximadamente el 7% de los enlaces peptídicos que involucran a la prolina en la segunda posición se encuentran en conformación *cis*. Normalmente cada uno de estos enlaces peptidil-prolil presentan una conformación única, ya sea *cis* o *trans* cuando forman parte de proteínas. Esto es impuesto por la estructura terciaria que adquiere la proteína. Sin embargo en algunos casos los enlaces peptidil-prolil se comportan como los de oligopéptidos pequeños y permiten la existencia de ambos isómeros. En estos casos particulares es donde participan las enzimas con actividad de peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa para ayudar al plegamiento de algunas proteínas.



Actividad de peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa