



# **INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

## **Evaluación de los mecanismos de acción de derivados de quinoxalina-7-carboxilato 1,4 di-*N*-óxido con actividad antiamebiana**

### **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS EN  
BIOTECNOLOGÍA

**P R E S E N T A:**

M.en.C Jacqueline Soto Sánchez

### **DIRECTORES**

D.en C. María Esther Ramírez Moreno  
D.en C. Gildardo Rivera Sánchez



**Ciudad de México, enero 2020.**

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	XIV
<b>Índice de tablas</b> .....	XVI
<b>Índice de figuras</b> .....	XVIII
<b>RESUMEN</b> .....	XXI
<b>ABSTRACT</b> .....	XXIII
<b>1.0 INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 Definición y epidemiología</b> .....	1
<b>1.2 Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i></b> .....	3
<b>1.3 Formas clínicas de la amebiasis</b> .....	6
<b>1.4 Mecanismos de defensa de <i>E. histolytica</i></b> .....	8
<b>1.5 Tratamiento farmacológico contra <i>E. histolytica</i></b> .....	10
1.5.1 Metronidazol.....	10
1.5.2 Resistencia a metronidazol <i>in vitro</i> .....	11
1.5.3 Resistencia a metronidazol <i>in vivo</i> .....	11
1.5.4 Otros compuestos sintéticos contra la amebiasis.....	12
<b>1.6 Búsqueda de nuevos compuestos de origen sintético activos         contra <i>E. histolytica</i></b> .....	12
1.6.1 Quinoxalinas 1,4-di- <i>N</i> -óxido.....	13
<b>1.7 Actividades biológicas de los derivados de quinoxalina</b> .....	16
1.7.1 Actividad antitumoral.....	16
1.7.2 Actividad antibacteriana.....	16
1.7.3 Actividad de los QdNOs contra parásitos protozoarios que afectan la salud humana .....	17

1.7.3.1 Actividad antimalaria.....	17
1.7.3.2 Actividad antitripanosoma.....	19
1.7.3.3 Actividad antileishmania.....	21
1.7.3.4 Actividad antitrichomonas.....	22
<b>1.8 ANTECEDENTES.....</b>	<b>24</b>
1.8.1 Actividad antiamebiana de derivados de metilo y etilo QdNOs-7-carboxilato.....	24
1.8.2 Mecanismos de acción de QdNOs en parásitos.....	26
1.8.2.2 Inhibidores de la Poli (ADP-Ribosa) polimerasa.....	27
1.8.2.3 Inhibidores de la tripanotión reductasa.....	28
1.8.2.4 Inhibidores de la peroxirredoxina.....	28
1.8.2.5 Inductores de muerte celular.....	29
1.8.3 Otros posibles mecanismos de acción.....	30
1.8.3.1 Mecanismo de acción antibacteriana.....	30
1.8.3.1.1 Inhibidores de la síntesis de ADN e inductores de radicales.....	30
1.8.3.2 Mecanismo de acción antitumoral.....	30
1.8.3.2.1 Inductores de radicales libres e ihibidores de la topoisomerasa II.....	30
1.8.3.2.2 Inhibidores de la regulación del ciclo celular.....	31
<b>2.0 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>34</b>
<b>3.0 OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
3.1 Objetivo general.....	35
3.2 Objetivos específicos.....	35

<b>4.0 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	36
<b>4.1 Compuestos</b> .....	36
<b>4.2 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antiparasitaria</b> .....	36
4.2.1 Condiciones de crecimiento de <i>E. histolytica</i> .....	36
4.2.2 Preparación de las soluciones stock.....	36
4.2.3 Evaluación del efecto de los QdNOs-7-carboxilato sobre los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	36
<b>4.3 Evaluación de la citotoxicidad de QdNOs-7-carboxilato en células Vero</b> .....	37
4.3.1 Ensayo de citotoxicidad en células Vero .....	38
4.3.2 Índice de selectividad.....	39
<b>4.4 Efecto de los QdNOs-7-carboxilato sobre la morfología de trofozoítos de <i>E. histolytica</i></b> .....	39
4.4.1 Microscopia óptica.....	39
4.4.2 Citometría de flujo.....	40
4.4.3 Microscopia electrónica de transmisión.....	40
<b>4.5 Determinación del perfil proteómico después del tratamiento con los QdNOs-7-carboxilato en trofozoítos de <i>E. histolytica</i></b> .....	42
4.5.1 Obtención de extractos totales de <i>E. histolytica</i> .....	42
4.5.2 Purificación de extractos proteicos de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> tratados con QdNOs-7-carboxilato.....	43
4.5.3 Cuantificación de proteínas totales.....	43
4.5.4 Análisis de la Integridad de proteínas totales purificadas.....	44
4.5.5 Primera dimensión o Isoelectroenfoque (IEF) de proteínas.....	44
4.5.6 Separación de proteínas IEF en geles SDS-PAGE (doble dimensión).....	45

4.5.7 Tinción con Sypro ® Ruby.....	45
4.5.8 Adquisición de imágenes y detección de spots.....	45
4.5.9 Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.....	46
4.5.10 Análisis bioinformático y clasificación funcional de las proteínas identificadas.....	48
<b>4.6 Ensayos funcionales.....</b>	<b>48</b>
4.6.1 Efecto de los QdNOs-7-carboxilato sobre la eritrofagocitosis de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	49
4.6.2 Ensayo de migración celular.....	50
4.6.3 Efecto citopático de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> en células de colon SW-480.....	51
4.6.4 Ensayo de adhesión de los trofozoítos a células SW-480.....	52
4.6.5 Determinación de ROS totales.....	53
<b>5.0 RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
<b>5.1 Los derivados de isopropilo QdNOs-7-carboxilato poseen actividad antiamebiana en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>.....</b>	<b>54</b>
<b>5.2. Los compuestos de la serie isopropilo producen citotoxicidad en células Vero.....</b>	<b>55</b>
5.2.1 Solo el compuesto T-116 de la serie isopropilo mostró un índice de selectividad adecuado contra <i>E. histolytica</i> .....	57
<b>5.3. Análisis de los cambios morfológicos y ultraestructurales de los trofozoítos <i>E. histolytica</i> durante el tratamiento con derivados de QdNOs-7-carboxilato.....</b>	<b>58</b>
5.3.1 El derivado de metilo QdNOs-7-carboxilato T-001 causa cambios en la distribución de la cromatina y la granularidad celular .....	61
5.3.2 Los derivados de etilo QdNOs-7-carboxilato produjeron redistribución vacuolar (T-014 y T-016) y daño al endosoma (T- 017).....	61

5.3.3 El derivado de isopropilo QdNOs-7-carboxilato T-116 produce reducción en el tamaño de los trofozoítos y un aumento en la granularidad celular .....	62
<b>5.4 Selección de los compuestos para electroforesis bidimensional.....</b>	<b>70</b>
<b>5.5 Electroforesis bidimensional de proteínas de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> después del tratamiento con T-001 y T-017.....</b>	<b>71</b>
<b>5.6 Los perfiles proteómicos de los trofozoítos con T-001 y T-017 presentan diferencias entre si .....</b>	<b>73</b>
<b>5.7 Los tratamientos con T-001 y T-017 modulan diferentes proteínas en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>.....</b>	<b>77</b>
<b>5.8 Los tratamientos con T-001 y T-017 modulan proteínas involucradas en diversos procesos biológicos en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....</b>	<b>85</b>
<b>5.9 T-001 y T-017 disminuyen la motilidad (migración) celular en <i>E. histolytica</i>.....</b>	<b>88</b>
<b>5.10 T-001 y T-017 afectan la eritrofagocitosis de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i>.....</b>	<b>89</b>
<b>5.11 T-001 disminuyen el efecto citopático de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....</b>	<b>92</b>
<b>5.12 T-001 y T-017 disminuyen la adhesión de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>.....</b>	<b>94</b>
<b>5.13 QdNOs inducen radicales libres en <i>E. histolytica</i>.....</b>	<b>97</b>
<b>6.0 DISCUSIÓN.....</b>	<b>99</b>
<b>7.0 CONCLUSIONES.....</b>	<b>107</b>
<b>8.0 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>109</b>
<b>9.0 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>110</b>
<b>10.0 PRODUCTIVIDAD.....</b>	<b>128</b>

## RESUMEN

La amebiasis es causada por el protozoo *Entamoeba histolytica* que afecta a millones de personas en todo el mundo. El tratamiento estándar es el metronidazol, el cual desafortunadamente induce varios efectos secundarios y se han encontrado fallas en la terapia para el tratamiento del absceso hepático amebiano. Las quinoxalinas, son compuestos heterocíclicos que contienen un anillo de benceno y un anillo de pirazina. La oxidación de ambos nitrógenos del anillo de pirazina da como resultado derivados de quinoxalina (QdNO), que han exhibido una variedad de propiedades biológicas, incluida la actividad antiparasitaria. Sólo unos pocos estudios han investigado el mecanismo de acción antiparasitario de los QdNOs, sin embargo, su mecanismo de acción sobre *E. histolytica* permanece aún desconocido. Este estudio investigó el efecto amebicida de nuevos QdNOs de la serie isopropilo, de los cuales el compuesto T-116 ( $IC_{50}= 2.56 \mu M$ ) fue el que mejor actividad amebicida y menor toxicidad ( $CC_{50}= 30.56 \mu M$ ) presentó de tres compuestos evaluados (T-067, T-098 y T-116). La evaluación del efecto de las series metilo (T-001), etilo (T-014, T-016 y T-017) e isopropilo (T-116) sobre la morfología y ultraestructura de los trofozoítos de *E. histolytica*, demostró que los QdNOs causan pérdida de pleomorfismo celular y reducción en el tamaño de los trofozoítos, cambios en la granularidad e inducen condensación de la cromatina nuclear y vacuolización. Estas alteraciones encontradas evidencian que tanto T-001 como T-017 causan daño celular intenso a los trofozoítos por lo cual nos pareció interesante determinar algunas de las proteínas moduladas por estos dos compuestos. Después de comparar los perfiles de proteínas, se encontraron 163 proteínas con expresión alterada en el tratamiento con T-001 y 131 con expresión alterada en el tratamiento con T-017. El análisis por espectrometría de masas nos permitió la identificación de 21 proteínas sobreexpresadas y 24 proteínas subexpresadas relacionadas con: (1) citoesqueleto y tráfico intracelular; (2) transcripción, traducción y unión a ácidos nucleicos; y (3) homeostasis redox principalmente. Además se encontró que el tratamiento con T-001 y T-017 modifica la virulencia de los trofozoítos de *E. histolytica*, dado que alteran la eritrofagocitosis, la adhesión, y la producción de especies reactivas del oxígeno.

Nuestros resultados muestran que el mecanismo a través del cual T-001 y T-017 ejerce su efecto sobre *E. histolytica* implica la alteración de funciones esenciales relacionadas con la homeostasis redox y el citoesqueleto de actina, lo que eventualmente inhiben el crecimiento de trofozoítos.



## ABSTRACT

Amebiasis is caused by the *Entamoeba histolytica* protozoan that affects millions of people worldwide. The standard treatment is metronidazole, which unfortunately induces several side effects and therapy failures have been found for the treatment of amoebic liver abscess. Quinoxalines are heterocyclic compounds that contain a benzene ring and a pyrazine ring. Oxidation of both pyrogen ring ring nitrogens results in quinoxaline derivatives (QdNO), which have exhibited a variety of biological properties, including antiparasitic activity. Only a few studies have investigated the mechanism of antiparasitic action of QdNOs, however, its mechanism of action on *E. histolytica* remains unknown. This study investigated the amoebicidal effect of new isopropyl QdNOs, of which the compound T-116 (IC<sub>50</sub> = 2.56 μM) was the one with the best amoebicidal activity and lowest toxicity (CC<sub>50</sub> = 30.56 μM) presented three compounds evaluated (T -067, T-098 and T-116). Evaluation of the effect of the methyl (T-001), ethyl (T-014, T-016 and T-017) and isopropyl (T-116) series on the morphology and ultrastructure of *E. histolytica* trophozoites showed that QdNO<sub>s</sub> cause loss of cellular pleomorphism and reduction in the size of trophozoites, changes in granularity and induce condensation of nuclear chromatin and vacuolization. These alterations found evidence that both T-001 and T-017 cause intense cellular damage to the trophozoites for which we found interesting to determine some of the proteins modulated by these compounds. After comparing the protein profiles, 163 proteins were found with altered expression in the treatment with T-001 and 131 with altered expression in the treatment with T-017. Mass spectrometry analysis allowed us to identify 21 overexpressed proteins and 24 underexpressed proteins related to: (1) cytoskeleton and intracellular traffic; (2) transcription, translation and nucleic acid binding; and (3) redox homeostasis mainly. It was also found that treatment with T-001 and T-017 modifies the virulence of the trophozoites of *E. histolytica*, since they alter erythrophagocytosis, adhesion, and the production of reactive oxygen species. Our results show that the mechanism through which T-001 and T-017 exerts its effect on *E. histolytica* involves the alteration of essential functions related to redox homeostasis and actin cytoskeleton, which eventually inhibit the growth of trophozoites.