

SENSIBILIDAD DE TROFOZOITOS DE *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA* A IVERMECTINAFRANCISCO GONZALEZ-SALAZAR¹, BENITO D. MATA-CARDENAS^{1,2}, JAVIER VARGAS-VILLARREAL¹¹Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social,²Facultad De Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México

Resumen La amibiasis producida por *Entamoeba histolytica* es un problema de salud pública. Las formas clínicas más frecuentes son la disentería y el absceso hepático amibiano. En el mundo se notifican anualmente 50 millones de casos y más de 100 000 muertes por esta enfermedad. El ciclo de vida de *E. histolytica* tiene dos fases: trofozoito y quiste. Los trofozoitos son los responsables de producir enfermedad. El tratamiento actual para la amibiasis incluye medicamentos con efectos colaterales serios. La ivermectina es un macrólido con actividad contra endoparásitos y ectoparásitos causantes de strongiloidosis, filariasis, oncocercosis, sarna y pediculosis. Su uso está extendido a casi todo el mundo y se lo reconoce como un medicamento seguro. El objetivo de este trabajo fue determinar la sensibilidad *in vitro* de trofozoitos de *E. histolytica* al tratamiento con ivermectina. Para determinar su sensibilidad a la droga, se utilizaron trofozoitos de *E. histolytica* cultivados en medio PEHPS. Durante su fase de crecimiento logarítmico se expusieron a diferentes concentraciones de ivermectina. Como controles se usaron otras drogas antiparasitarias. Se prepararon diluciones seriadas de cada droga, luego se agregaron a tubos con parásitos (2×10^4 células/ml). Se incubó por 72 h y luego se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento calculado por análisis *Probit*. La ivermectina tiene actividad contra trofozoitos de *E. histolytica*. La dosis de ivermectina que produjo el 50% de inhibición de crecimiento fue de 6.40 mg/ml. Esta dosis fue mayor a la encontrada con otras drogas antiparasitarias. Falta demostrar su actividad *in vivo* en modelos animales.

Palabras clave: ivermectina, *Entamoeba histolytica*, amibiasis, viabilidad

Abstract *Sensibility of Entamoeba histolytica trophozoites to ivermectin.* Amebiasis caused by *Entamoeba histolytica* is a problem of public world health. The most frequent clinical presentation are the dysentery and the amebic liver abscess. Fifty millions of cases and more than 100 000 deaths for this disease are reported annually worldwide. The life cycle of *E. histolytica* has two phases: trophozoite and cyst. Trophozoites are the causal agent of disease. The effective treatment for the amebiasis includes drugs with serious collateral effects. Ivermectin is a macrolid with activity against endoparasites and ectoparasites causing strongiloidosis, filariasis, oncocercosis, scabiasis and pediculosis. The use of ivermectin has been extended almost worldwide; it is recognized as a safe drug. The main objective of this study was to determine *in vitro* sensibility of trophozoites of *E. histolytica* was to the treatment with ivermectin. To determine the sensibility of the parasites to the drug, *E. histolytica* was cultivated in PEHPS medium. During its logarithmic growth phase the trophozoites were exposed to different concentrations of ivermectin. As controls other antiparasitic drugs were used. For each drug, serial dilutions were prepared, and mixed in culture tubes with parasites (2×10^4 cells/ml). They were incubated for 72 h and then the percentage of growth inhibition was calculated by *Probit* analysis. Ivermectin showed activity against trophozoites of *E. histolytica*. The 50% of growth inhibition of ivermectin was 6.40 mg/ml. This dose was higher than for other anti parasitic drugs. Its activity *in vivo* in animal models remains to be demonstrated.

Key words: ivermectin, *Entamoeba histolytica*, amebiasis, cell survival

La amibiasis es un problema de salud pública en todo el mundo, principalmente en los países en desarrollo¹. Esta enfermedad es producida por el protozooario parásito *Entamoeba histolytica*. Las formas clínicas más fre-

cuentes son la disentería y el absceso hepático amibiano (AHA)². Se considera que en el mundo existen 50 millones de casos de disentería y AHA y poco más de 100 000 muertes por año por estas formas clínicas³. En México, el 8.4% de la población ha estado expuesta a la amibiasis; se estima que poco más de un millón de casos son tratados por año y se producen 1216 muertes anuales por esta enfermedad³. El ciclo vital de *E. histolytica* tiene dos fases: trofozoito (forma invasiva) y quiste (forma infectiva). Los trofozoitos son las formas vegetativas y los respon-

Recibido: 14-X-2008

Aceptado: 12-II-2009

Dirección postal: Dr. Francisco González-Salazar, Calle 2 de abril, Jesús Dionisio González 501, Colonia Independencia, Monterrey, Nuevo León, CP 64720, México
Fax: (01 81) 8190 4035

e-mail: fgons75@yahoo.com

sables de las lesiones en la pared intestinal, las cuales producen los cuadros patológicos de colitis amibiana y disentería. Además, pueden diseminarse a otros órganos, con mayor frecuencia al hígado, y producir AHA⁴. Bajo ciertas condiciones desfavorables para su crecimiento, los trofozoítos pueden formar quistes, los que salen del intestino en las heces fecales y pueden contaminar agua o alimentos, y sirven como vehículos para infectar a un nuevo hospedero⁵.

La ivermectina es un fármaco macrólido sintético derivado de la avermectina, con actividad ectoparasiticida y endoparasiticida. Se ha usado en el tratamiento de gatos, perros, cabras y caballos con una muy buena actividad antihelmíntica⁶. En humanos se ha utilizado en el tratamiento de strongiloidosis, oncocercosis, filariasis, escabiasis y pediculosis con buenos resultados y relativamente pocos efectos colaterales⁷⁻⁹.

La ivermectina actúa por inhibición del neurotransmisor ácido γ -amino-butiárico (GABA), produciendo parálisis de los parásitos y con ello su muerte⁶.

Las dosis convencionales de ivermectina son de 200 microgramos por kg por día en una o dos tomas. Esas tomas pueden ser o no consecutivas¹⁰. Estudios previos mencionan que los efectos colaterales de la ivermectina siempre son menores a los producidos por albendazol, tiabendazol, mebendazol y metronidazol. En EE.UU. su uso está restringido a niños con más de 15 kg y personas adultas no embarazadas ni lactando. Sin embargo, en países pobres esta droga se ha usado en niños menores e inclusive en embarazadas sin que se hayan notificado reacciones colaterales serias ni efectos teratogénicos¹¹.

Para strongiloidosis, en un estudio con 125 pacientes, sólo tres de ellos presentaron vértigo, dos náuseas y dos diarrea, mientras el resto de los antiparasitarios provocaban efectos colaterales en más del 33, 51 y 71% de los casos¹².

La farmacocinética de la ivermectina es bien conocida; después de su administración un 15 a 16% de la droga es absorbida¹³, se alcanza un pico máximo de 4 a 5 horas después de su ingesta y un segundo pico entre las 6 y 12 horas, ocasionado por la circulación entero-hepática¹⁴. Es metabolizada en hígado y sus metabolitos son eliminados por la bilis. Su vida media en el organismo varía entre las 12 y las 56 horas^{15,16}, mientras que la vida media de sus metabolitos es de tres días. Se desconoce la concentración de la droga en la luz intestinal, pero se sabe que administrada en dosis terapéuticas puede curar desde un 85 a un 97% de los pacientes infectados con *Strongiloides stercoralis*¹⁷⁻¹⁹. No conocemos publicaciones relacionadas al uso de ivermectina en el tratamiento de amibiasis.

El objetivo de este trabajo fue determinar la sensibilidad *in vitro* de los trofozoítos de *E. histolytica* al uso del fármaco ivermectina.

Materiales y métodos

Para los cultivos de parásitos, se usó *E. histolytica* cepa HM-1: IMSS, en medio con peptona, extracto de hígado y de páncreas y suero (PEHPS), con subcultivos tres veces por semana²⁰. Para determinar la sensibilidad de los parásitos a la droga, fueron expuestos a la misma en fase de crecimiento logarítmico. Como base de comparación se probaron otras drogas antiparasitarias; así, se incluyeron en el análisis: emetina, metronidazol, tinidazol, secnidazol, ornidazol, dimetridazol. La concentración de las drogas se ajustó a 1mg/ml disolviéndolas en agua bidestilada. Todas estas soluciones se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Inmediatamente antes de cada ensayo las soluciones *stock* se diluyeron en serie. Se utilizó medio PEHPS, con 500 ml de solución *stock* y 500 ml de medio, luego se tomaron 500 ml de la primera dilución y 500 ml de medio para una segunda dilución, y así sucesivamente. Las concentraciones de los fármacos en las diluciones fueron de 500, 250, 125, 62.5, 31.2, y 15.6 mg/ml. Los ensayos se realizaron en viales de cultivo estériles de un ml de capacidad, en ellos se agregaron 950 ml de medio PEHPS con una suspensión celular recién obtenida de trofozoítos de amibas en una concentración de 2×10^4 células/ml. A estos viales se les agregaron 50 ml de una de las concentraciones de los fármacos a probar, inoculando tres viales para cada dilución. Todos los viales se incubaron 36 °C durante 72 h. Los trofozoítos se obtuvieron enfriando los viales en agua con hielo por 20 minutos, luego se calculó el número de parásitos por ml con la ayuda de un hematocitómetro.

El porcentaje de inhibición del crecimiento se hizo comparando la sobrevida de los parásitos en los tubos tratados con respecto a controles no tratados. La concentración que inhibió el crecimiento del 50% de los parásitos se calculó con la ayuda del análisis *Probit*¹. Los experimentos se realizaron por triplicado, luego se calcularon los intervalos de confianza del 95%.

Resultados

La concentración de ivermectina que determinó una inhibición del crecimiento del 50% de los trofozoítos de *E. histolytica* calculada por análisis *Probit* fue de 6.40 μ g/ml, con intervalo de confianza 95% (IC95%) de 4.31 a 8.49 (Tabla 1). Las dosis de otras drogas antiparasitarias que se probaron para inhibir el crecimiento del 50% de

TABLA 1.— Susceptibilidad de trofozoítos de *E. histolytica* a diversas drogas antiamebianas

Droga	Dosis con sobrevida del 50% μ g/ml (*)
Ivermectina	6.40 (4.31-8.49)
Emetina	1.63 (1.52-1.74)
Metronidazol	0.71 (0.61-0.80)
Tinidazol	0.16 (0.14-0.18)
Secnidazol	0.16 (0.10-0.21)
Ornidazol	0.12 (0.10-0.13)
Dimetridazol	0.18 (0.15-0.20)

(*): IC: 95%

los mismos trofozoítos también se muestran en esa tabla. Al comparar estas dosis, se observó que la dosis de ivermectina fue 3.9 veces mayor que la de emetina, nueve veces superior a la de metronidazol y 40 veces mas alta al resto de los antiparasitarios probados, para producir el mismo porcentaje de inhibición.

Discusión

La ivermectina tiene actividad antiparasitaria contra trofozoítos de *E. histolytica*. Aunque la dosis de inhibición del crecimiento de trofozoítos fue superior a otras drogas antiparasitarias, su baja toxicidad y la posibilidad de utilizar dosis repetidas¹⁰, unido a que, a pesar del desconocimiento de las concentraciones que alcanza el medicamento en el intestino después de la ingesta de dosis convencionales¹³⁻¹⁵, presenta actividad intraluminal probada contra *Strongyloides stercoralis*¹², alientan la prosecución de estudios para investigar la posibilidad de su uso en el tratamiento de enfermedades ocasionadas por *E. histolytica*. Es importante señalar que aún falta demostrar la actividad de la droga *in vivo* en modelos animales.

Conflictos de interés: Este estudio no presenta conflictos de interés.

Bibliografía

- Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 1986; 8: 228-38.
- Petri WA Jr. Recent advances in amebiasis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1996; 33: 1-37.
- Stanley SL Jr. Amoebiasis. *Lancet* 2003; 36: 1025-34.
- Salles JM, Salles MJ, Moraes LA, Silva MC. Invasive amebiasis: an update on diagnosis and management. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007; 5: 893-901.
- Idowu OA, Rowland SA. Oral fecal parasites and personal hygiene of food handlers in Abeokuta, Nigeria. *Afr Health Sci* 2006; 6: 160-4.
- Dourmishev AL, Dourmishev LA, Schwartz RA. Ivermectin: pharmacology and application in dermatology. *Int J Dermatol* 2005; 44: 981-8.
- Fox LM. Ivermectin: uses and impact 20 years on. *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19: 588-93.
- Flinders DC, De Schweinitz P. Pediculosis and scabies. *Am Fam Physician* 2004; 69: 341-8.
- Richard-Lenoble D, Chandener J, Gaxotte P. Ivermectin and filariasis. *Fundam Clin Pharmacol* 2003; 17: 199-203.
- López Herrera E, Mejía Lagunes J, Martínez Labat J P. Efecto de dosis repetitivas de ivermectina contra larvas enquistadas de *Toxocara canis* en ratones blancos. *Ammvepe* 2003; 14: 117-9.
- Usha V, Gopalakrishnan Nair TV. A comparative study of oral ivermectin and topical permethrin cream in the treatment of scabies. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42: 236-40.
- Shikiya K, Zaha O, Niimura S, et al. Clinical study on ivermectin against 125 strongyloidiasis patients. *Kansenshogaku Zasshi* 1994; 68: 13-20.
- Fink D, Porras A. Pharmacokinetics of ivermectin in animals and humans. In: Ivermectin and Abamectin. In Campbell W (ed) Berlin:Springer-Verlag, 1989, p 113-30.
- Baraka O, Mahmoud B, Marschke C, Gerary T, Homeida M, Williams J. Ivermectin distribution in the plasma and tissues of patients infected with *Onchocerca volvulus*. *Eur J Clin Pharmacol* 1996; 50: 407-10.
- Edwards G, Dingsdale A, Helsby N, Orme M, Breckenridge A. The relative systemic availability of ivermectin after administration as capsule, tablet, and oral solution. *Eur J Clin Pharmacol* 1988; 35: 681-4.
- Njoo FL, Beek WM, Keukens HJ, et al. Ivermectin detection in serum of onchocerciasis patients: relationship to adverse reactions. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52: 94-7.
- Marti H, Haji HJ, Savioli L, et al. A comparative trial of a single-dose ivermectin versus three days of albendazole for treatment of *Strongyloides stercoralis* and other soil-transmitted helminth infections in children. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55: 477-81.
- Datry A, Hilmarsdottir I, Mayorga-Sagastume R, et al. Treatment of *Strongyloides stercoralis* infection with ivermectin compared with albendazole: results of an open study of 60 cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88: 344-5.
- Toma H, Sato Y, Shiroma Y, Kobayashi J, Shimabukuro I, Takara M. Comparative studies on the efficacy of three antihelminthics on treatment of human strongyloidiasis in Okinawa, Japan. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000; 31: 147-51.
- Said Fernández S, Vargas Villarreal J, Castro Garza J, et al. PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82: 249-53.
- González AG, Ravelo AG, Bazzocchi IL, et al. Biological study of triterpenequinones from celastraceae. *Farmaco [Sci]* 1988; 43: 501-5.