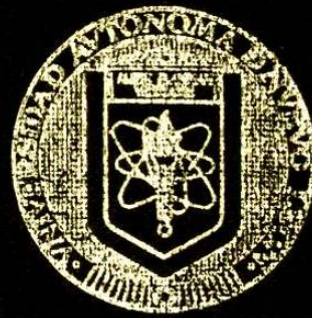


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE
NUEVO LEON**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD
ANTIAMIBIANA DEL GOSIPOL

T E S I S

QUE EN OPCION AL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

BIOL. MARIA TERESA GONZALEZ GARZA Y BARRON

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE 1992

MARIA TERESA GONZALEZ GARZA Y BARRON
TESIS DOCTORAL 1992

TD
RC121
.A5
G6
C.1

10



1080073258

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD ANTIAMIBIANA DEL GOSIPOL

T E S I S

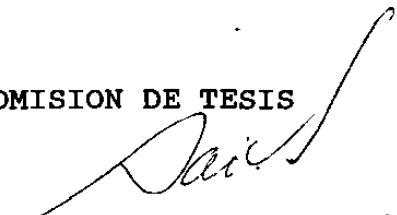
QUE EN OPCION AL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

BIOL. MARIA TERESA GONZALEZ GARZA Y BARRON

COMISION DE TESIS


DR. SALVADOR SAID FERNANDEZ


DR. MARIO MORALES VALLARTA


DRA. HERMINIA RODRIGUEZ MARTINEZ


DR. ANTONIO MORALES AGUILLERA

RC121
- A5
06



(73258)

DEDICATORIAS

Al recuerdo imborrable de mi Padre

A mi Madre por su apoyo y ejemplo

A mis hijos por su cariño y comprensión

A mis hermanos de los que siempre he recibido apoyo y cariño

A la M. en C. Angela Sotelo por su amistad incondicional

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Bromatología de la
Unidad de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional,
cuya amistad perdura a través del tiempo y la distancia.

I N D I C E

DEDICATORIAS	i
INDICE	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS	ix
AGRADECIMIENTOS	xi
RESUMEN	xiii
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	2
Descripción del gosipol y sus efectos biológicos	2
Algunos aspectos del metabolismo de <i>E. histolytica</i>	5
Efectos tóxicos del gosipol en el hombre y en animales de experimentación	6
HIPOTESIS	11
OBJETIVOS	12
MATERIAL	13
Amibas	13
Medio PEHPS	13
Medio TYI-S-33	14

Suero bovino	15
Obtención y manejo del Gosipol	15
Animales de laboratorio	16
Reactivos	16
METODOS	17
Propagación de las cepas de referencia	17
Obtención de biomasa para las determinaciones enzimáticas	17
Determinación de la potencia anti <i>amibiana</i> del gosipol <i>in vitro</i>	18
Efecto del gosipol sobre dos enzimas NADP ⁺ -dependientes	20
Enzima málica	20
Alcohol deshidrogenasa	20
Inducción de absceso hepático <i>amibiano</i> en hámsters	22
Determinación del efecto del gosipol sobre el desarrollo del absceso hepático <i>amibiano</i> inducido en hámsters	24
Evaluación de los resultados	25
RESULTADOS	27
Actividad anti <i>amibiana in vitro</i>	27
I. Potencia anti <i>amibiana</i> del gosipol con respecto a emetina, metronidazol y diiodohidroxiquinoleína	27
II. Susceptibilidad al gosipol de cinco cepas axénicas	

de <i>E. histolytica</i>	27
III. Contribución específica de los isómeros a la actividad anti <i>amibiana</i> de la mezcla racémica del gósipol	28
IV. Efecto del gósipol sobre la enzima málica y la alcohol deshidrogenasa	33
Actividad anti <i>amibiana in vivo</i> .	42
Evaluación del valor terapéutico del gósipol <i>in vivo</i>	42
DISCUSION	47
CONCLUSIONES	59
PERSPECTIVAS	61
BIBLIOGRAFIA	62

LISTA DE ABREVIATURAS

PBS	Amortiguador salino de fosfatos
cm	Centímetro
N	Concentración normal
M	Concentración molar
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
K _m	Constante de Michaelis
d	días
DE ₅₀	Dosis efectiva media
DL ₅₀	Dosis letal media
Fig.	Figura
FSH	Hormona folículo estimulante
°C	Grados centígrados
g	Gramos
h	Horas
Kg	Kilogramo
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDH-X	Lactato deshidrogenasa de testículo
LH	Hormona luteinizante
log	Logaritmo
μg	Microgramos

μM	Micromolar
μl	Microlitros
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
min	Minutos
mseg	Milisegundos
NAD	Nicotinamida-adenin dinucleótido
NADP	Nicotinamida-adenin dinucleótido fosfato
nm	Nanómetro
PEHPS	Peptona, extracto de hígado y páncreas, 10% Suero bovino
pH	Potencial de hidrógeno
%	Por ciento
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
S35	Sobrenadante de 35,000 Xg/30 min
TE	Tiempo de eco
TYI-S-33	Tripticasa, levadura, fierro, suero
T1	Tiempo de relajación del spín
T2	Tiempo de relajación
Vmax	Velocidad máxima

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Estructura del gosipol y sus tres formas tautoméricas.	3
Fig. 2. Relación lineal de la dosis respuesta del gosipol y tres fármacos antiamicibianos	27
Fig. 3. Relación lineal dosis-respuesta al gosipol de cinco cepas de <i>E. histolytica</i>	28
Fig. 4. Relación de la concentración de sustrato contra la velocidad de reducción, de NADP/min/mg de proteína para la enzima málica.	32
Fig. 5. Relación de los recíprocos de la velocidad y concentración de sustrato para la enzima málica.	33
Fig. 6. Relación de los recíprocos de la velocidad y concentración de sustrato para la enzima málica en ausencia y presencia de gosipol.	35
Fig. 7. Relación de la concentración de sustrato contra la velocidad de reducción, de NADP/min/mg de proteína para la alcohol deshidrogenasa.	36

- Fig. 8. Relación de los recíprocos de la velocidad y concentración de substrato para la alcohol deshidrogenasa. 37
- Fig. 9. Relación de los recíprocos de la velocidad y concentración de substrato para la alcohol deshidrogenasa en presencia y ausencia de gosipol. 39
- Fig. 10. Aspecto de los abscesos hepáticos amibianos en hámsters. El número corresponde al grupo experimental 2 y 3; 10 y 20 mg/Kg gosipol, 4; 30 mg/Kg metronidazol y 5; control. 42
- Fig. 11. Imagen obtenida con RMN de un absceso hepático amibiano en hámster. A: Imagen T1, el absceso corresponde a la zona mas obscura. B: Imagen T2, corresponde a la zona clara. 44

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. Potencia antiamebiana del gossipol y tres de los fármacos comunes en la práctica clínica sobre <i>E. histolytica</i> .	29
Tabla 2. Potencia antiamebiana, límites de confianza y χ^2 del gossipol y tres de los fármacos mas comunes en la práctica clínica sobre cultivos axénicos de <i>E. histolytica</i> .	29
Tabla 3. Actividad antiamebiana in vitro del gossipol sobre cinco cepas de <i>E. histolytica</i> .	
Tabla 4. In vitro actividad antiamebica del (\pm)- (+)- (-)-gossipol y emetina contra cinco cepas axénicas de <i>E. histolytica</i> .	30
Tabla 5. Actividad antiamebica relativa del (\pm)- (+)- (-)-gossipol y emetina contra cinco cepas axénicas de <i>E. histolytica</i> .	30
Tabla 6. Efecto inhibitorio medio del gossipol y sus enantiómeros sobre la actividad de las enzimas alcohol deshidrogenasa y enzima málica de <i>E. histolytica</i> .	39

Tabla 7. Desarrollo de abscesos en hámsters, 24 horas después de suspender el tratamiento antiméxico y crecimiento de trofozoítos en los tubos de cultivo.	43
Tabla 8. Variación de la actividad antiamebiana <i>in vitro</i> de diferentes fármacos en <i>E. histolytica</i> .	48
Tabla 9. Efecto inhibitorio del gosipol sobre la actividad de varias enzimas NAD^+ ó NADP^+ dependientes.	51
Tabla 10. Efecto del gosipol sobre la actividad de diversas enzimas.	53

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Estructura del gósipol y sus tres formas tautoméricas.	4
Fig. 2. Relación lineal de la dosis respuesta del gósipol y tres fármacos antiamicibianos	29
Fig. 3. Relación lineal dosis-respuesta al gósipol de cinco cepas de <i>E. histolytica</i>	31
Fig. 4. Relación de la concentración de sustrato contra la velocidad de reducción, de NADP/min/mg de proteína para la enzima málica.	34
Fig. 5. Relación de los recíprocos de la velocidad y concentración de sustrato para la enzima málica.	35
Fig. 6. Relación de los recíprocos de la velocidad y concentración de sustrato para la enzima málica en ausencia y presencia de gósipol.	37
Fig. 7. Relación de la concentración de sustrato contra la velocidad de reducción, de NADP/min/mg de proteína para la alcohol deshidrogenasa.	38

- Fig. 8. Relación de los recíprocos de la velocidad y concentración de sustrato para la alcohol deshidrogenasa. 39
- Fig. 9. Relación de los recíprocos de la velocidad y concentración de sustrato para la alcohol deshidrogenasa en presencia y ausencia de gosipol. 40
- Fig. 10. Aspecto de los abscesos hepáticos amibianos en hámsters. El número corresponde al grupo experimental 2 y 3; 10 y 20 mg/Kg gosipol, 4; 30 mg/Kg metronidazol y 5; control. 44
- Fig. 11. Imagen obtenida con RMN de un absceso hepático amibiano en hámster. A: Imagen T1, el absceso corresponde a la zona mas obscura. B: Imagen T2, corresponde a la zona clara. 46

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. Potencia antiamebiana del gossipol y tres de los fármacos comunes en la práctica clínica sobre <i>E. histolytica</i> .	30
Tabla 2. Potencia antiamebiana, límites de confianza y χ^2 del gossipol y tres de los fármacos mas comunes en la práctica clínica sobre cultivos axénicos de <i>E. histolytica</i> .	30
Tabla 3. Actividad antiamebiana in vitro del gossipol sobre cinco cepas de <i>E. histolytica</i> .	30
Tabla 4. In vitro actividad antiamebica del (\pm)- (+)- (-)-gossipol y emetina contra cinco cepas axénicas de <i>E. histolytica</i> .	32
Tabla 5. Actividad antiamebica relativa del (\pm)- (+)- (-)-gossipol y emetina contra cinco cepas axénicas de <i>E. histolytica</i> .	32
Tabla 6. Efecto inhibitorio medio del gossipol y sus enantiómeros sobre la actividad de las enzimas alcohol deshidrogenasa y enzima málica de <i>E. histolytica</i> .	41

Tabla 7. Desarrollo de abscesos en hámsters, 24 horas después de suspender el tratamiento antiaméptico y crecimiento de trofozoítos en los tubos de cultivo.	45
Tabla 8. Variación de la actividad antiamebiana <i>in vitro</i> de diferentes fármacos en <i>E. histolytica</i> .	50
Tabla 9. Efecto inhibitorio del gossipol sobre la actividad de varias enzimas NAD ⁺ ó NADP ⁺ dependientes.	54
Tabla 10. Efecto del gossipol sobre la actividad de diversas enzimas.	55

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi mas profundo agradecimiento al Dr. Salvador Said Fernández por su asesoría, por la confianza en mi capacidad profesional y por su colaboración durante el desarrollo de éste trabajo, ya que gracias a su constante interes y apoyo, fué posible que éste se realizara.

Al Dr. Antonio Morales Aguilera cuya invaluable experiencia en el campo de la Farmacología fue de gran ayuda durante el desarrollo tanto experimental como la presentación escrita de éste trabajo. A la Dra. Herminia Rodriguez Martinez por la revisión de la tesis y sus acertadas observaciones. Al Dr. Mario Morales Vallarta por la revisión del manuscrito y las sugerencias al mismo.

También quiero hacer patente mi agradecimiento al M. en C. Benito David Mata Cárdenas por su colaboración en el desarrollo y ejecución del protocolo experimental. Asimismo por su colaboración desinteresada del Dr. Jorge Castro Garza, la Q.F.B. Leticia Navarro Marmolejo y demás personal del laboratorio de Biología Celular de la UNIBIN. Al M.V.Z. Gerardo Lozano Garza por el manejo de los hámsters y su disposición constante durante las

pruebas *in vivo*. Al Dr. Antonio Luna de la Rosa por su excelente trabajo gráfico y de fotografía.

Al Dr. Stephen A. Matlin de la Universidad de Warwick, Coventry, UK, por proporcionarme los enantiómeros del gossipol.

Al Centro Internacional de Biología Molecular y Celular (CIBMYC) y particularmente a su Director el Dr. Guillermo Elizondo Riojas por el apoyo económico y profesional durante la realización de las pruebas *in vivo*.

Al personal administrativo de la Unidad de Investigación Biomédica del Noreste (UNIBIN), IMSS; que contribuyó con su apoyo a que este trabajo concluyera con éxito. Y a todo el personal de la UNIBIN que de una u otra forma me han ayudado a alcanzar la meta fijada.

RESUMEN

La amibiasis humana es causada por el protozoario *Entamoeba histolytica*. Esta enfermedad parasitaria constituye un problema de salud en los países en desarrollo y se caracteriza principalmente por disentería, la que puede progresar a amibiasis hepática y otras complicaciones en pacientes no tratados, pudiendo producir la muerte.

Aunque existen buenos medicamentos anti-amibianos, estos tienen un margen terapéutico reducido, por lo que la búsqueda de nuevos compuestos más eficientes y menos tóxicos, está plenamente justificada.

Por otra parte, el gossipol, polifenol aislado de la planta de algodón, ha sido motivo de numerosas investigaciones debido a su efecto antifertilizante en el hombre. Recientemente se ha demostrado que también presenta actividad contra diversos agentes patógenos, siendo un factor común su efecto inhibitorio sobre ciertas enzimas NAD^+ ó NADP^+ dependientes.

Dadas las características de la vía glicolítica de *E. histolytica* surgió la hipótesis de que el gossipol podría tener actividad anti-amibiana.

Para probarla se determinó la actividad *in vitro* de dicho

compuesto sobre trofozoítos de la cepa HM-1 de *E. histolytica*, cultivada axénicamente y se comparó con tres de los fármacos mas utilizados en la práctica médica: emetina, metronidazol y diiodohidroxiquinoleína, los resultados demostraron que el gosipol es 11, 39 y 980 veces más activo, respectivamente.

Como podría haber diferencias en la susceptibilidad al gosipol en diferentes cepas de *E. histolytica* se analizó la potencia de este compuesto sobre las cepas axénicas HM-2, HM-3, HM-38 y HK-9. Los resultados demostraron que existe una diferente susceptibilidad de las cepas estudiadas, pero dentro del mismo orden de magnitud. La CI_{50} de todas ellas queda comprendida entre 0.010 a 0.089 μM .

Por otra parte se ha logrado purificar los isómeros de la forma racémica del gosipol, demostrándose en diversos modelos biológicos, que el isómero levógiro (-) es la forma activa. Con el objeto de probar si el efecto amebicida del gosipol se debe a ambos isómeros ó recae sobre uno de ellos, se determinó la CI_{50} de cada uno y se comparó con la forma racémica. Los resultados demostraron que el enantiómero (-)-gosipol es la forma activa; y, aunque nuevamente se observa una diferente susceptibilidad de las cepas estudiadas, la CI_{50} se conserva dentro del mismo orden de magnitud.

Debido a que se ha informado que el gosipol tiene un efecto inhibitorio sobre oxido-reductasas, principalmente sobre las deshidrogenasas láctica y málica, se analizó el posible efecto tanto de la forma racémica como de los enantiómeros sobre la actividad de la enzima málica y alcohol deshidrogenasa de *E. histolytica*. Los resultados demostraron que el gosipol es un fuerte inhibidor de la enzima málica, pero no de la alcohol deshidrogenasa, y que este efecto se debe al enantiómero (-)-gosipol.

Para probar su actividad *in vivo* se montó la técnica para producir abscesos hepáticos amibianos en hámsters, a los diez días de la inoculación intrahepática de amibas provenientes de la cepa axénica de *Entamoeba histolytica* cepa HM-1 se comprobó el desarrollo de los abscesos hepáticos amibianos y los animales se separaron en cinco grupos, los que se trataron de acuerdo al siguiente esquema: 1) control sin medicamento, 2) grupo tratado con 30 mg de metronidazol/Kg de peso corporal, 3) grupo tratado con 5 mg de gosipol/Kg de peso corporal, 4) grupo tratado con 10 mg de gosipol /Kg de peso corporal, 5) grupo tratado con 20 mg de gosipol/Kg de peso corporal. La administración de las drogas se realizó durante 10 días; 24 horas después de la última dosis los animales fueron sacrificados y se cuantificó

el efecto de las drogas por 1) el número y tamaño de los abscesos 2) la presencia de trofozoítos en tubos de cultivo sembrados con muestras del tejido hepático conteniendo tanto tejido sano como del absceso hepático. A los resultados se les aplicó la prueba Q de Cochran cuyo análisis demostró que hubo diferencias significativa con respecto al control en los grupos de metronidazol y gosipol 20 mg/Kg de peso, pero no con los grupos a los que se les administró gosipol en dosis de 5 y 10 mg/Kg de peso.

Basados en los resultados anteriores proponemos al gosipol como un buen candidato como agente antiamebiano. Este trabajo ha dejado sentadas las bases para iniciar formalmente las fases 1 a 3 de la evaluación farmacológica del gosipol como medicamento contra la amebiasis en el hombre.

I N T R O D U C C I O N

La amibiasis es el nombre con que se describe la parasitosis humana causada por el protozoario *Entamoeba histolytica*. Este microorganismo invade principalmente el intestino grueso del hombre causando disentería, pero puede atacar otros órganos, siendo el hígado el más frecuentemente afectado, dando lugar a abscesos hepáticos cuya consecuencia puede ser mortal al no ser tratados adecuadamente.

A pesar de la alta morbilidad y mortalidad de dicha enfermedad en diversos países en desarrollo (Sepúlveda, 1982; Guerrat, 1986; Walsh, 1986), existe un número relativamente pequeño de compuestos antiámibianos (Campbell, 1986). La mayoría de ellos con un margen terapéutico estrecho y con diversos efectos secundarios en el hombre (Biagi, 1981). Además, empiezan a aparecer informes de resistencia de *E. histolytica* a algunos de los fármacos antiámibianos más usuales en la práctica médica (Wright y Phillipson, 1990). Por ello, el consenso general es que resulta muy conveniente la búsqueda permanente de compuestos antiámibianos más eficientes y mejor tolerados por el hombre, para ser usados en la quimioterapia de la amibiasis.

El gosispol parece ser un buen candidato como agente

quimioterapéutico, considerando que posee las siguientes características: a) su efecto inhibitorio sobre diversos agentes patógenos (Dorsset y Kerstine, 1975; Vander Jagt y Col, 1982; Montamat y Col, 1982; Wichman y Col, 1982; Blanco y Col, 1983; Gerez de Burgos y Col, 1984; Royer y Col, 1986; Rikihisa y Lin, 1986, 1990; Lin y Col, 1989); b) la baja toxicidad en el hombre, aún después de períodos largos de exposición (National Coordinating Group on Male Antifertility Agents, 1978; Aitken, 1983; Zhang y Col, 1985; Meng y Col, 1988; Xu y Col, 1988; Wu, 1989), c) el amplio conocimiento que se tiene de su toxicidad y farmacodinamia y d) por depositarse principalmente en hígado y colón Abou-Donia y Dieckert, 1974, 1975; Jensen y Col, 1982; Engler y Col, 1984; Gajvels y Col, 1984; Heywood y Col, 1986; Wu y Col, 1986), dos de los órganos más frecuentemente invadidos por *E. histolytica* (Sepúlveda, 1982).

Descripción del gospol y sus efectos biológicos:

El gospol es un polifenol (Fig. 1) presente en la planta de algodón *Gossypium hirsutum*, el cual durante la última década ha despertado un gran interés debido a su efecto antifertilizante en sujetos del sexo masculino, tanto en animales monogástricos como en el hombre (National Coordinating Group on Male Antifertility Agents, 1978; Chang y

Col, 1980; Sotelo y Col, 1982; Matlin y Col, 1985). Este efecto se debe a la acción citotóxica del gossipol sobre los espermatozoides (Kalla y Vasedev, 1980; Adeyemo y Col, 1982; Gonzalez-Garza y Col, 1985; Den Boer y Grootegoed, 1988; Herrera y Col, 1984, 1985; Kanwa Y Col, 1989). Dicho efecto es reversible cuando se suspende su administración (National Coordinating Group on Male Antifertility Agents, 1978). Por otra parte se ha demostrado que el gossipol inhibe la capacidad infecciosa del virus del herpes tipo 2 (Dorsset y Kerstine, 1975; Wichman y Col, 1982) y del virus de la inmunodeficiencia humana (Lin y Col, 1989). Inhibe también el desarrollo del metacéstodo *Taenia taeniaeformis* en la rata (Rikihisu y Col, 1986, 1990) y disminuye la velocidad de crecimiento *in vitro* de los protozoarios *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum*, agentes causales de la enfermedad de Chagas (Montmat y Col, 1982; Blanco y Col, 1983; Gerez de Burgos y Col, 1984) y de la malaria (Vander Jagt y Col, 1982; Royer y Col, 1986), respectivamente.

Se ha informado que un efecto común de la actividad del gossipol en los organismos mencionados, consiste en la inhibición de la actividad de las enzimas dependientes de las coenzimas nicotinamida-adenín-dinucleótido (NAD^+) o nicotinamida-adenín-dinucléotido-fosfato ($NADP^+$), siendo mas marcado sobre las lactato y malato deshidrogenasas (Tso y

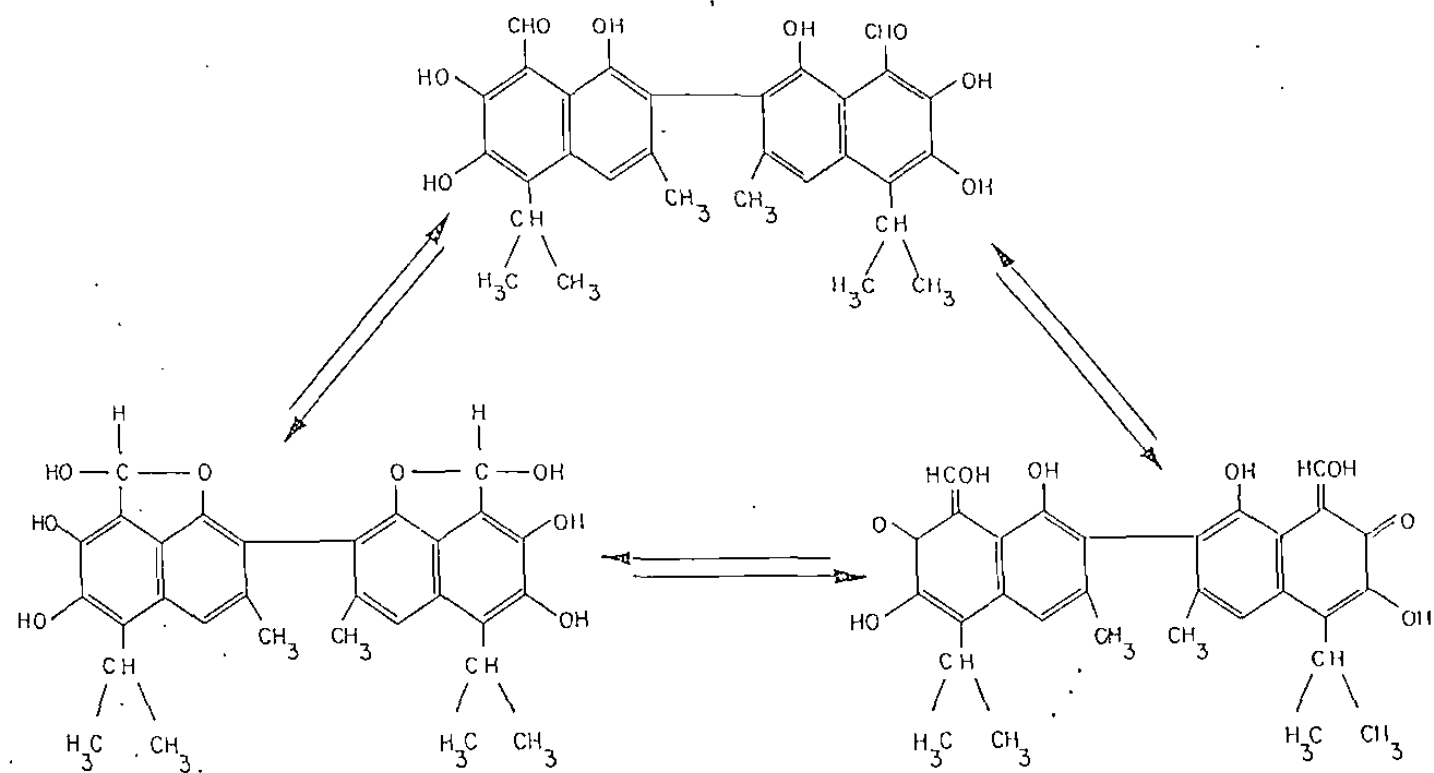


Fig. 1. Formas tautoméricas del gossipol.

Lee, 1980; Maugth, 1981; Oligati y Col, 1983, 1984; Steiner y Col, 1984; Berry y Col, 1985; Whaley y Col, 1986; Burgos y Col, 1986; Gonzalez-Garza y Col, 1986; Morris y Col, 1986; Ikeda, 1990).

Algunos aspectos del metabolismo de *Entamoeba histolytica*:

La vía glicolítica de *E. histolytica* difiere significativamente de la de otras células. En la transformación del fosfoenolpiruvato en piruvato, la mayoría de las células llevan a cabo esta reacción con la participación de una sola enzima, la piruvato cinasa. En cambio, en *E. histolytica* dicha transformación se realiza en los siguientes tres pasos: [1] el fosfoenol-piruvato se transforma en oxaloacetato, con la participación de la fosfoenol-piruvato-carboxitransfosforilasa, [2] el oxaloacetato se convierte en malato, con la participación de la malato deshidrogenasa que utiliza NAD^+ como coenzima, [3] el malato pasa a piruvato merced a la reacción catalizada por la enzima málica con NADP^+ como coenzima. En condiciones anaeróbicas el piruvato es metabolizado a etanol y CO_2 por medio de una NADP^+ deshidrogenasa alcohólica (Reeves y Col, 1974a, 1974b, 1977; Lo y Reeves, 1978; Maclaughlin y Aley, 1985).

Efectos tóxicos del gossipol en el hombre y en animales de experimentación:

Debido al efecto antifertilizante del gossipol, varios grupos de investigadores se han dedicado a buscar efectos colaterales en el hombre y animales de laboratorio (Jensen y Col, 1982; Engler y Col, 1984; Gajvels y Col, 1984; Heywood y Col, 1986; Xu y Col, 1988; Meng y Col, 1988;) tales como rata, ratón, cobayo, hámster y cerdo (Chang y Col, 1980; Sotelo y Col, 1982; Matlin y Col, 1985; Lindberg y Col, 1987). Uno de los estudios más importantes de este tipo por su magnitud e información obtenida, se efectuó en China con 4000 hombres sanos, quienes después de ingerir diariamente 20 mg de gossipol durante 60 meses no manifestaron alteraciones orgánicas o de comportamiento, a excepción del testículo, en el que se produjo azoospermia, y no se encontraron modificaciones significativas en la concentración de testosterona (National Coordinating Group on Male Antifertility Agents, 1978). En otro estudio, Zhang y colaboradores (1985) informaron que en 60 hombres tratados con 20 mg diarios de gossipol durante 5 meses no se produjeron cambios en los niveles de testosterona sérica, aunque las hormonas LH Y FSH aumentaron durante el tratamiento. Sin embargo estas se normalizaron en corto tiempo, después de

suspender la ingestión de gosipol. Resultados similares fueron informados por Meng y colaboradores en hombres tratados durante 2.5 años (Meng y Col, 1988). Con el objeto de detectar efectos no deseables, Xu y Colaboradores (1988) realizaron estudios sistemáticos de funcionamiento hepático y renal y del sistema inmunológico, en 32 hombres que tomaron gosipol durante 6 años, encontrándose que los niveles de funcionamiento estaban dentro de los límites normales, tampoco se detectaron cambios en los electrocardiogramas, y solo en uno de los sujetos estudiados se encontró el potasio sérico por abajo del nivel normal (3.5 mEq/l), pero sin que se presentara hipocalcemia.

Estudios de farmacocinética en el hombre han demostrado que el isómero (-)-gosipol se elimina en 30 horas, mientras que el isómero (+)-gosipol se elimina en 196 horas y la mezcla racémica tarda 286 horas en ser eliminada (Wu y Col, 1986).

Estudios recientes efectuados con los isómeros purificados han demostrado que el (-)-gosipol produce infertilidad en hámsters con la mitad de la dosis necesaria para producir infertilidad con la forma racémica ((±)-gosipol), mientras que el (+)-gosipol no es activo (Matlin y Col, 1985; Lindberg y Col, 1987). Por otra parte estudios *in vitro* informan que en líneas celulares tanto normales como

tumorales, el isómero (-) es más citotóxico que la forma racémica (\pm) o el isómero (+) (Joseph y Col, 1986), sin embargo Sufi y colaboradores (1985) no encontraron diferencias entre los dos isómeros con respecto a su efecto sobre la liberación de testosterona de células de Leydig *in vitro*. Den Boer y Grootegoed informaron que la actividad de la LDH-x solo se ve afectada por el isómero (-) (Den Boer y Grootegoed, 1988).

Las dosis empleadas en los estudios realizados en animales de laboratorio varían generalmente entre 14 y 30 mg diarios por kilo de peso corporal, lo que equivale a 100 veces más que las dosis utilizadas en el hombre: ya que 20 mg en un hombre de 60 Kg equivale a 0.33 mg/Kg de peso corporal. Los resultados en animales de experimentación presentan algunas divergencias: mientras que algunos autores informan que en ratas después de 8 semanas de ingerir 25 mg de gossipol/Kg de peso diariamente, se observó un incremento en el volumen y peso del testículo, hígado y bazo, mientras que la ganancia de peso corporal disminuyó. Sin embargo, otros autores no encuentran ningún cambio (Engler y Col, 1984; Heywood y Col, 1986). Se ha informado que en animales de experimentación que han ingerido 30 mg de gossipol/Kg de peso corporal, por períodos de 4 a 8 semanas, los niveles de LDH y testosterona no presentan alteraciones. Sin embargo, en

ratas alimentadas con harina de algodón con alto contenido de gossipol (> 30 mg/kg de peso de ingestión diaria) se encontró una disminución en la concentración testicular y sérica de andrógenos y en la de los precursores de hormonas esteroidogénicas (Herrera y Col, 1983, 1984). Por otra parte, el estudio de enzimas, tales como deshidrogenasa láctica en testículo, demuestra que hay una disminución en su actividad (Tso y Lee, 1980; Maugh, 1981; Oligati y Toscano, 1983; Whaley y Col, 1986) mientras que en corazón, hígado y músculo se ve afectada solo con dosis mayores a 30 mg diarios/Kg de peso (Gonzalez-Garza y Col, 1986), pero dosis menores no tienen ningún efecto en su actividad (Steiner y Col, 1984).

En los estudios realizados en hombres se han usado dosis de 20 mg diarios totales (dosis inferior a la experimentada en animales), y en éstos no se ha informado de ninguna alteración ajena a la observada en testículo, cuyo efecto también es reversible al suspender el tratamiento (National Coordinating Group on Male Antifertility Agents, 1978; Aitken, 1983; Zhang y Col, 1985; Meng y Col, 1988; Xu y Col, 1988; Wu, 1989).

De acuerdo a los antecedentes expuestos en los párrafos anteriores, se consideró que el gossipol, dado sus

características farmacológicas y los efectos biológicos observados, podría considerarse como probable droga antiamébrica. Con el objeto de analizar esta posibilidad se analizó el efecto de esta droga tanto *in vitro* como *in vivo*

H I P O T E S I S

Se ha demostrado que el gossipol inhibe el crecimiento de organismos patógenos como *Tripanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum*. También se ha demostrado que éste compuesto inhibe la actividad catalítica de enzimas NAD^+ o NADP^+ dependientes de estos organismos. Puesto que *Entamoeba histolytica* también posee éste tipo de enzimas, podría ser susceptible al efecto inhibitorio del gossipol.

.

O B J E T I V O S.

1. Determinar *in vitro* la concentración inhibitoria media (CI₅₀) del gosispol sobre trofozoítos de *E. histolytica*, cepa HM-1: IMSS, cultivados en condiciones axénicas, y compararla con la CI₅₀ de emetina, metronidazol y diiodohidroxiquinoleína.
2. Comparar la CI₅₀ del gosispol sobre cinco cepas axénicas de *E. histolytica*: HM1, HM2, HM3, HM38 y HK9.
3. Comparar la CI₅₀ *in vitro* de la forma racémica (+)-gosispol, con los isómeros (-)-, y (+)-gosispol, para conocer la contribución específica de cada enantiómero al efecto de la mezcla natural.
4. Determinar el efecto del gosispol sobre la actividad de la enzima málica y la deshidrogenasa alcohólica de *E. histolytica*.
5. Determinar el efecto terapéutico del gosispol *in vivo*, en hámsters inoculados experimentalmente en el hígado con trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1-IMSS.

M A T E R I A L

Amibas:

Para las pruebas *in vitro* se usaron las cepas de *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS (Mattern y Keister, 1977), HM-2:IMSS, HM-3:IMSS (De La Torre y Col, 1974) y HM38:IMSS (Meza y Col, 1986), aisladas de pacientes con disentería amibiana en la ciudad de México por De la Torre y HK-9:NIH de *Entamoeba histolytica* (Diamond, 1968). Todas las cepas provienen del cepario del Dr. Salvador Said Fernández, del Departamento de Biología Celular de la Unidad de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS. En donde se han cultivado en forma axénica por 7 años en medio PEHPS (Said-Fernández y Col, 1988).

Para las pruebas *in vivo* se utilizó la cepa HM-1:IMSS capaz de producir abscesos hepáticos (Meerovich y Chadee, 1988) cultivada en medio TYI-S-33 (Diamond y Col, 1978): la que fué proporcionada gentilmente por el Dr. Fernando Anaya del Instituto de Investigación en Biología Experimental de la Facultad de Química de la Universidad de Guanajuato.

Preparación del medio de cultivo PEHPS (Said-Fernández y Col, 1988).

Medio basal (PEHP): Peptona de caseína 5 g; D-glucosa 3 g; L-cisteína 0.5 g; ácido ascórbico 0.1 g; NaCl 0.2 g; K₂HPO₄ 0.5 g; KH₂PO₄ 0.3 g; Extracto de hígado y páncreas 125 ml. Se mezclan y

disuelven los componentes en 500 ml de agua bidestilada estéril. Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10 N y se colocaron 10 ml de medio en tubos para cultivo de 16 X 125 mm con tapón de rosca (Pyrex o Kimax, Mty, Méx), ó de 780 ml en frascos para cultivo en suspensión ("spinners", Bellco Glass Inc. Vineland, NJ, USA). Se esterilizó el medio en autoclave por 15 minutos a 15 lb de presión por pulgada cuadrada con los tapones flojos, que se apretaron después, estando los recipientes todavía calientes. El medio se almacenó a temperatura ambiente.

Preparación del medio de cultivo TYI-S-33 (Diamond y Col, 1978).

Peptona de caseína 10 g; extracto de levadura 5 g; D-glucosa 5 g; NaCl 1 g; K_2HPO_4 0.5 g; KH_2PO_4 0.3 g; L-Cisteína.HCl 0.5 g; L-ácido ascórbico 0.1 g; Citrato férrico de amonio 11.4 mg. Se disolvieron los componentes en 500 ml de agua bidestilada estéril. Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10 N y se colocaron 10 ml de medio en tubos para cultivo de 16 X 125 mm con tapón de rosca. Se esterilizó el medio en autoclave, por 15 minutos, con los tapones flojos, los que se cerraron bien al salir de la autoclave. Los tubos se almacenaron a 4°C.

A los tubos con 10 ml de medio de cultivo se les añadió asépticamente 1 ml de suero descomplementado de bovino, ó a los spinners con 700 ml de medio, 80 ml de suero descomplementado de bovino.

Suero bovino

El suero se obtuvo de sangre colectada en el rastro de la ciudad de Monterrey, y se pasó por una serie de filtros HAWP Millipore de 10 μ a 0.22 μ . Fué esterilizado por filtración a través de membranas HAWP con poros de 0.22 μ , distribuyéndolo en volúmenes de 40 ó 100 ml en botellas estériles de borosilicato con tapón de rosca. Después fue descomplementado por calentamiento a 56°C por 30 min. De cada botella se sembró 1 ml de suero en 10 ml de medio PEHPS y se incubó por una semana para comprobar su esterilidad, luego fue almacenado a -20°C.

Obtención y manejo del gosipol

Para las pruebas *in vitro* y de actividad enzimática se utilizó la presentación comercial de la forma racémica (\pm) (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA) o la purificada de la planta de algodón (*Gossypium sp*) por el Dr. Stephen A. Matlin de City University at London, en Inglaterra, según se indica. El Dr. Matlin también purificó y nos proporcionó los isómeros (+)-gosipol aislado de *Thespesia populnea* (ópticamente pura) y (-)-gosipol, los que fueron obtenidos químicamente puros (>99.5%), por cromatografía de alta presión (HPLC) de sus derivados diasterioméricos de una base de Schiff

El gosipol (10 mg) se disolvió en un mínimo (0.2 ml) de NaOH 0.5 N y se aforó con buffer de fosfatos salino (PBS) pH 7.4,

0.02M ó medio de cultivo a las concentraciones requeridas según fué el caso.

Para las pruebas *in vivo* el gosipol comercial se disolvió en la siguiente mezcla:

Tween 80.....	4.0 μ l
alcohol bencílico.....	9.0 μ l
carboximetilcelulosa....	5.0 mg
agua.....cbp.	1.0 ml

Animales de laboratorio.

Como modelo experimental para producir amibiasis hepática, se utilizaron hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*), machos, recién destetados con un peso de 40-60 g, los cuales fueron criados y mantenidos en el bioterio de la Unidad de Investigación Biomédica del Noreste.

Reactivos.

La emetina, metronidazol, diiodohidroxiquinoleína, NADP⁺, ácido málico y 2-propanol fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St Louis Mo, U.S.A.), el resto de las sales y disolventes orgánicos, grado reactivo, fueron adquiridos de Baker de México, S.A. (Xalostoc, México). El suero bovino y el medio PEHPS fueron preparados en el laboratorio con insumos locales de

acuerdo con el método descrito por Said-Fernández y colaboradores (1988).

M E T O D O S

Propagación de las cepas de referencia

Las cepas amibianas se propagaron en cultivo incubándolas a 36°C (incubadora National Heinicke Co. OR., USA). Antes de cada resiembra se observaron los cultivos en un microscopio invertido (Biovert, Reichert, Austria) para comprobar el buen estado morfológico y la movilidad de las amibas. El mejor cultivo fue colocado en agua-hielo por 10 min, se determinó la concentración amibiana en un hemocitómetro y se inoculó 1×10^3 trofozoítos por ml a cada uno de otros tres tubos con medio PEHPS fresco. Los cultivos de la penúltima resiembra se conservaron hasta comprobar el crecimiento de las amibas y la ausencia de contaminación en los cultivos recién sembrados. Los cultivos se resembraron cada 4 días, en fase logarítmica de crecimiento.

Obtención de biomasa para las determinaciones enzimáticas

Los cultivos masivos de *E. histolytica* se obtuvieron de acuerdo con la técnica descrita por Said-Fernández y Mata-

Cárdenas (1992) utilizando frascos para cultivo en suspensión (spinners) de 780 ml de capacidad. El inóculo fue de 5×10^3 amibas por ml en 700 ml de medio PEHP y 80 ml de suero descomplementado de bovino. Se incubaron por 72 horas a 36°C manteniendo los cultivos estáticos. Terminado el tiempo de incubación, se procedió a cosechar los trofozoítos mediante inmersión del frasco en agua-hielo por 30 min con agitación. Se centrifugó el medio en botellas de polipropileno de 1000 ml con tapón de rosca (Damon IEC Div. MA., USA) a 200 Xg por 10 min a 4°C y se lavaron tres veces con PBS. Después del lavado las amibas se resuspendieron en cinco volúmenes de buffer fosfatos pH 7.0 adicionado con sacarosa 0.25 M y ditiotreitól 1 mM y se homogeneizaron con un homogenizador tipo Elvenhjem-Potter accionado por un motor eléctrico a 12 rpm. La suspensión se centrifugó a 35 000 Xg por 30 min a 4°C . El sobrenadante (S35) se almacenó a -20°C hasta su uso en las determinaciones enzimáticas.

Determinación de la potencia antiamibiana del gosipol *in vitro*.

Se realizaron curvas de crecimiento con la cepa HM-1 mantenida en cultivos axénicos y resemebradas cada 96 h. Todas las amibas se mantuvieron y propagaron en medio PEHPS (Said-Fernández y Col, 1988).

Se determinó la CI_{50} añadiendo a los cultivos

concentraciones variables de gosipol (0.002-20.00 μM ,) en un volumen de 0.1 ml, el día del inóculo. Después de 72 horas de cultivo, se determinó el número de amibas/ml que había en los tubos de cultivo. Se transformó a valores probit el porcentaje de inhibición del crecimiento amibiano con respecto al control, y estos datos se graficaron contra el logaritmo de la concentración. De la gráfica se calculó por interpolación la CI_{50} y los límites de confianza (Finney, 1977). En igual forma se procedió para obtener los valores de actividad antiamebiana correspondientes a los otros tres fármacos, para después comparar todos los valores CI_{50} con la potencia amebicida de gosipol. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado.

Para determinar las diferencias de susceptibilidad al gosipol entre cepas axénicas de la especie *E. histolytica* se determinó la CI_{50} de la droga para las cepas HM-2:IMSS, HM-3:IMSS, HM-38:IMSS y HK-9:NIH, siguiendo el esquema antes descrito para la cepa HM-1:IMSS.

Con el objeto de conocer la contribución específica de cada uno de los isómeros ópticos al efecto amebicida de la forma racémica, se analizó el efecto inhibitorio de sendos isómeros y la mezcla racémica comercial y la purificada por el Dr. Matlin, en la forma descrita en los párrafos anteriores.

Efecto del gopiol sobre dos enzimas NADP⁺-dependientes.

Se analizó la actividad catalítica de las siguientes enzimas dependientes de NADP⁺ a) la enzima málica y b) la alcohol deshidrogenasa. Para ello se cosecharon los trofozoítos de la cepa HK-9, provenientes de cultivos de 72 h en Spinners. Las amibas se concentraron por centrifugación a 200 g x 10 min a 4°C, y se procesaron hasta obtener la fracción S35, con ésta se hicieron los ensayos con las mezclas y condiciones que a continuación se describen:

Enzima málica (E.C.1.1.1.40): La actividad enzimática se determinó de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción: Buffer de fosfatos pH 7.4, 0.25 M, MnCl₂ 2 mM, 0.1 mg de proteína/ml de la fracción S35 y NADP⁺ 0.15 mM, la mezcla se incubó a 36°C durante 10 min. La reacción se inició al agregar el sustrato (ácido málico) en concentraciones de 0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.125, 0.150, 0.175, 0.200, 0.225 y 2.5 mM (69).

Alcohol deshidrogenasa (E.C.1.1.1.71): La actividad enzimática se determinó de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción: buffer de glicina/NaOH 50 mM, (pH 9.5), 0.1 mg de proteína/ml de la fracción S35, NADP⁺ 0.2 mM, la mezcla se incubó a 36°C durante 10 min. La reacción se inició al agregar el sustrato (2-propanol) en concentraciones de 0.008, 0.016, 0.032, 0.048, 0.064, 0.080, 0.096, 0.112, 0.128, 0.144, 1.6, 4.0 y 8.0 mM (Barman, 1985).

La actividad catalítica de las dos enzimas mencionadas, se

estímó realizado lecturas de absorbancia a 340 nm en las mezclas de reacción, cada 30 segundos durante tres minutos. Las mezclas de reacción se mantuvieron en celdillas de cuarzo, de 1.0 cm de vía óptica, a 36°C, dentro de la cámara para las celdillas de un espectrofotómetro PMQ3 (Zeiss, Alemania). La actividad enzimática específica, en todos los casos, se estimó como la cantidad de micromoles de NADP⁺ reducidos/min/mg de proteína. El NADPH alcanza un máximo de extinción a 340 nm, por lo que cuando NADP⁺ se reduce a NADPH, la absorbancia aumenta en función del tiempo de incubación, ya que la forma oxidada no absorbe luz a 340 nm. Por lo tanto el incremento de la A₃₄₀ en las mezclas de reacción es directamente proporcional a la cantidad de NADPH formado a partir de NADP⁺ por la actividad de una enzima NADPH-dependiente. Un cambio de 0.030 unidades de densidad óptica, es equivalente a 0.0097 micromoles de NADP reducido (Barman, 1985).

Se graficaron los resultados correspondientes a concentraciones variables de substrato para después calcular la concentración inhibitoria media (CI₅₀) por interpolación en la curva correspondiente a cada enzima. Las determinaciones enzimáticas se realizaron en ausencia y presencia de la forma racémica o los enantiómeros del gopipol a diferentes concentraciones (0.5 a 100 μM), para determinar el porcentaje de inhibición de estos compuestos con respecto a la actividad de la enzima en los testigos positivos. Para lo cual el gopipol se solubilizó en 0.1

ml de NaOH 0.1 N y se diluyó en el buffer correspondiente a la concentración deseada a temperatura ambiente y se protegió de la luz. Para la determinación del efecto inhibitorio se mezcló el buffer, la coenzima, la fracción S35 y el (\pm)-gospol o sus enantiómeros, y se incubaron durante 10 min a 37°C. La reacción se inició al agregar el substrato.

La concentración de proteínas de la fracción S35 se determinó de acuerdo al método de Said-Fernández et al. (1990), el cual consiste en colocar 5.0 μ l de la muestra en pequeños círculos (3mm de diámetro, cortados con una perforadora de oficina para hojas archivables en carpetas de anillos) de papel filtro Whatmann 3MM; Los filtros se lavan con etanol a 4°C, se dejan secar y se colocan en tubos con el colorante Coomassie G-250 (Pierce Chemical Co. Rockford IL, U.S.A.) durante 10 min. Se aspira el colorante y los filtros se lavan con ácido acético al 10 %. La elución del complejo proteína-colorante se realiza con NaOH 0.01 N y se neutraliza con HCl 0.1 N. Las lecturas se realizan a 500 nm.

Inducción de absceso hepático amibiano en hámsters.

Los animales se anestesiaron por vía intraperitoneal, con una solución de 0.063 g/ml de pentobarbital sódico (SmithKline Norden de México, México) de uso veterinario, con jeringa desechable de 1 ml y aguja calibre # 23 en dosis de 42

mg/Kg de peso corporal. Con esta dosis se indujo una anestesia profunda en 5 minutos. Después se procedió a rasurar el vientre del hamster y desinfectar el área con una solución acuosa de cloruro de benzalconio 0.25%. Inmediatamente después se hizo una incisión de 1.5 cm en la línea media, abajo del esternón con tijeras y se expuso el hígado. Se inocularon 250,000 amibas, suspendidas en 0.1 ml de PBS, directamente en el lóbulo izquierdo del hígado, con una aguja calibre # 23. Después de la inoculación se limpió bien la herida producida por la aguja, con un hisopo estéril de algodón, empapado en solución salina isotónica, y se suturó la incisión, mediante surgete continuo, abarcando los planos muscular y seroso y la piel, con seda estéril del 00.

La evaluación de las lesiones hepáticas se realizó 10 días después de la inoculación, mediante una laparotomía exploratoria, practicada a cada animal. A un lote de estos animales se les valoró además mediante imágenes de resonancia magnética nuclear, con la colaboración del Dr. Guillermo Elizondo Riojas, utilizando el aparato de resonancia magnética nuclear del Centro de Radiodiagnóstico de la Facultad de Medicina de la UANL: el equipo cuenta con un magneto 0.3T Fonar B 3000 (Melville, N.Y.), operado a 13.8 MHz. Se utilizó una antena receptora solenoidal de tobillo, adaptada para uso en animales con un diámetro de 12.8 cm y se representó con una matriz de 256 X 256, lo que resulta en

una resolución espacial de 0.5 mm x 0.5 mm x 3.5 mm. Las secuencias utilizadas fueron con técnica de eco del spín obteniendo imágenes dependientes de T1 (tiempo de repetición: [TR] 500 mseg, tiempo de eco: [TE] 30 mseg) y de T2 (TR: 2000 mseg: TE: 85 mseg). En todos los animales se obtuvieron cortes localizadores en planos sagital y/o coronel, y la evaluación del absceso en cortes axiales con las 2 secuencias mencionadas.

Cuando la presencia de los abscesos se hizo evidente, los animales se sacrificaron y se determinó el número y el tamaño de éstos. Para demostrar la presencia de trofozoítos vivos en los abscesos hepáticos; piezas de 0.5 cm del tejido afectado se inocularon directamente en el medio de cultivo axénico. La presencia de trofozoítos móviles en los tubos de cultivo se detectó a las 72 horas. De estos mismos animales se tomaron muestras de los hígados para realizar análisis histopatológicos.

Determinación del efecto del gosipol sobre el desarrollo del absceso hepático amibiano inducido en hámsters.

Se inocularon 45 hámsters, como se describió antes, 8 días después del inóculo se comprobó el desarrollo del absceso por laparatomía exploratoria en todos los animales y se dividieron en cinco grupos de 9 animales cada uno. A los de los grupos 1, 2 y 3 se le administraron 5, 10 y 20 mg de gosipol/Kg de peso, respectivamente; a los del grupo 4, 30 mg/Kg de peso de

metronidazol y los del grupo 5 sólo se les inyectó el vehículo en un volumen equivalente al usado para administrar los fármacos. El período de tratamiento en todos los grupos fué de 10 días. La administración de las drogas se hizo diariamente, por vía intragástrica, utilizando un sonda esofágica. La evaluación del efecto del gosisol sobre el absceso hepático amibiano se hizo mediante laparotomía exploratoria y en tres animales de cada grupo además por resonancia magnética nuclear. Los animales se sacrificaron un día después de finalizado el tratamiento.

Evaluación de resultados

Para las pruebas *in vitro* se hizo una prueba de χ^2 a los valores probit obtenidos, en donde los grados de libertad son el número de dosis, menos 2 con lo cual se compara la validez de los valores probit obtenidos, y saber si la gráfica es una representación adecuada de la actividad de cada compuesto. Para determinar si existía una diferencia significativa entre la CI_{50} del grupo control con los grupos experimentales se utilizó la prueba t de Student (Zar, 1974). Para comparar la elevación de la curva dosis respuesta se uso análisis de covarianza (Zar 1974).

Se determinó la actividad anti-amibiana relativa, dándole el valor de 1.0 a la dosis obtenida con emetina por ser ésta la droga más potente como agente terapéutico en la práctica médica.

Para las pruebas *in vivo* se comparó la evolución del absceso hepático amibiano, determinándose la presencia del absceso por laparotomía 24 h después de terminado el tratamiento, tanto en el grupo control como en los animales tratados con gosispol ó metronidazol, considerándose positivo cuando este tenía un tamaño de 3 mm o más. Para analizar estadísticamente estos resultados se utilizó la prueba de Q de Cochran (Siegel, 1975). De estos mismos animales se tomaron trozos de 3 X 5 mm de hígado que contenían tanto tejido sano como afectado por el absceso hepático y se sembraron en tubos con medio TYI-S-33 (Diamond y Col. 1978), 24 h después se determinó la presencia de trofozoítos vivos en los tubos y a los resultados se les aplicó la prueba de Q de Cochran (Siegel, 1975).

RESULTADOS

Actividad anti*amibiana in vitro*.

I.- Potencia anti*amibiana* del gossipol con respecto a emetina, metronidazol y diiodohidroxiquinoleína.

La relación del efecto anti*amibiano* de (\pm)-gossypol, emetina, metronidazol o diiodohidroxiquinoleína, determinado como porcentaje de inhibición del crecimiento *amibiano* con respecto a un testigo no tratado, graficado en valores probit contra el logaritmo de la concentración de cada droga probada correspondió en todos los casos, a una recta (Fig. 2). Los correspondientes CI_{50} y límites de confianza se muestran en la Tabla 1. Se observa que el gossipol resultó ser 11, 39 y 980 veces más potente que la emetina, metronidazol y diiodohidroxiquinoleína, respectivamente. En la Tabla 2 se muestran los resultados de X^2 que en todos los casos es menor a los grados de libertad.

II. Susceptibilidad al gossipol de cinco cepas axénicas de *E. histolytica*.

La relación dosis respuesta para cada una de las cinco cepas de *E. histolytica* correspondió a una recta (Fig. 3). En la

Tabla 3 se muestra la CI_{50} correspondiente a cada una de ellas. Se observa una variación de 0.015 a 0.067 μM . La cepa HM1 resultó ser la más susceptible y la cepa HM-38 la más resistente (0.067 μM). En todas las cepas la sensibilidad al gosispol se circunscribió al mismo orden de magnitud.

III. Contribución específica de los isómeros a la actividad antiamebiana de la mezcla racémica del gosispol.

En la Tabla 4 se muestran los resultados de la CI_{50} obtenida para la forma racémica y los enantiómeros del gosispol y emetina, para las cepas HM-1, HM-2, HM-3, HM38 y HK-9; todos los cuales indican que la mayor potencia antiamebiana se debe al enantiómero (-)-gosispol en todas las cepas (Tabla 5). El análisis estadístico demostró una diferencia significativa ($P < 0.005$) entre la CI_{50} de todas las drogas en todas las cepas. De nuevo se observa una variabilidad en las cepas a la susceptibilidad a la droga, sin embargo las CI_{50} del (\pm)-, (-)-gosispol y emetina quedan dentro del mismo orden de magnitud. Lo que no se observó en el caso del (+)-gosispol, ya que la variabilidad entre la CI_{50} de cada cepa fué de 0.235 a 2.086 μM .

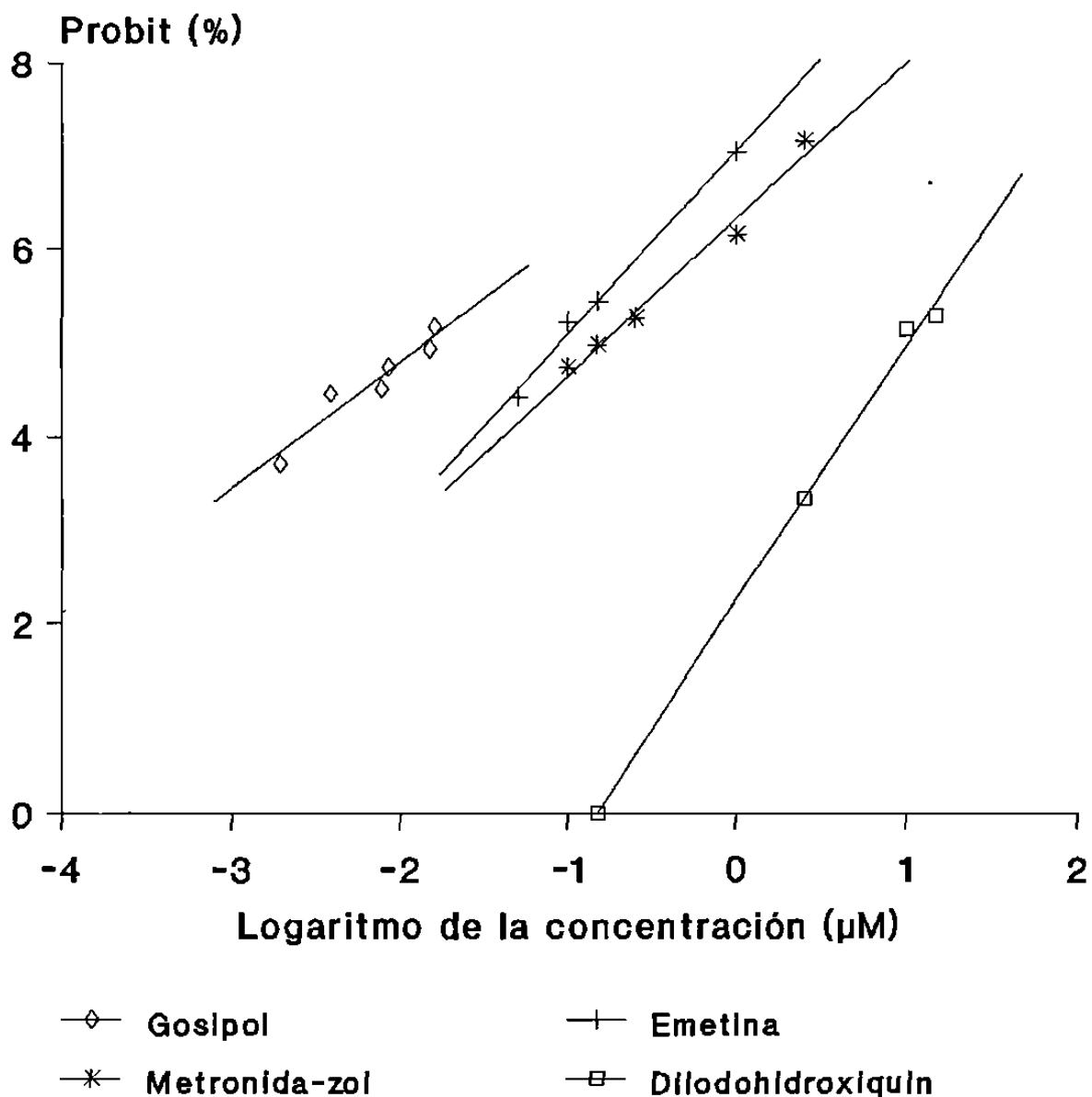


Fig. 2. Relación dosis respuesta al gosipol y tres fármacos antiamebianos de la cepa HM-1 de *E. histolytica*.

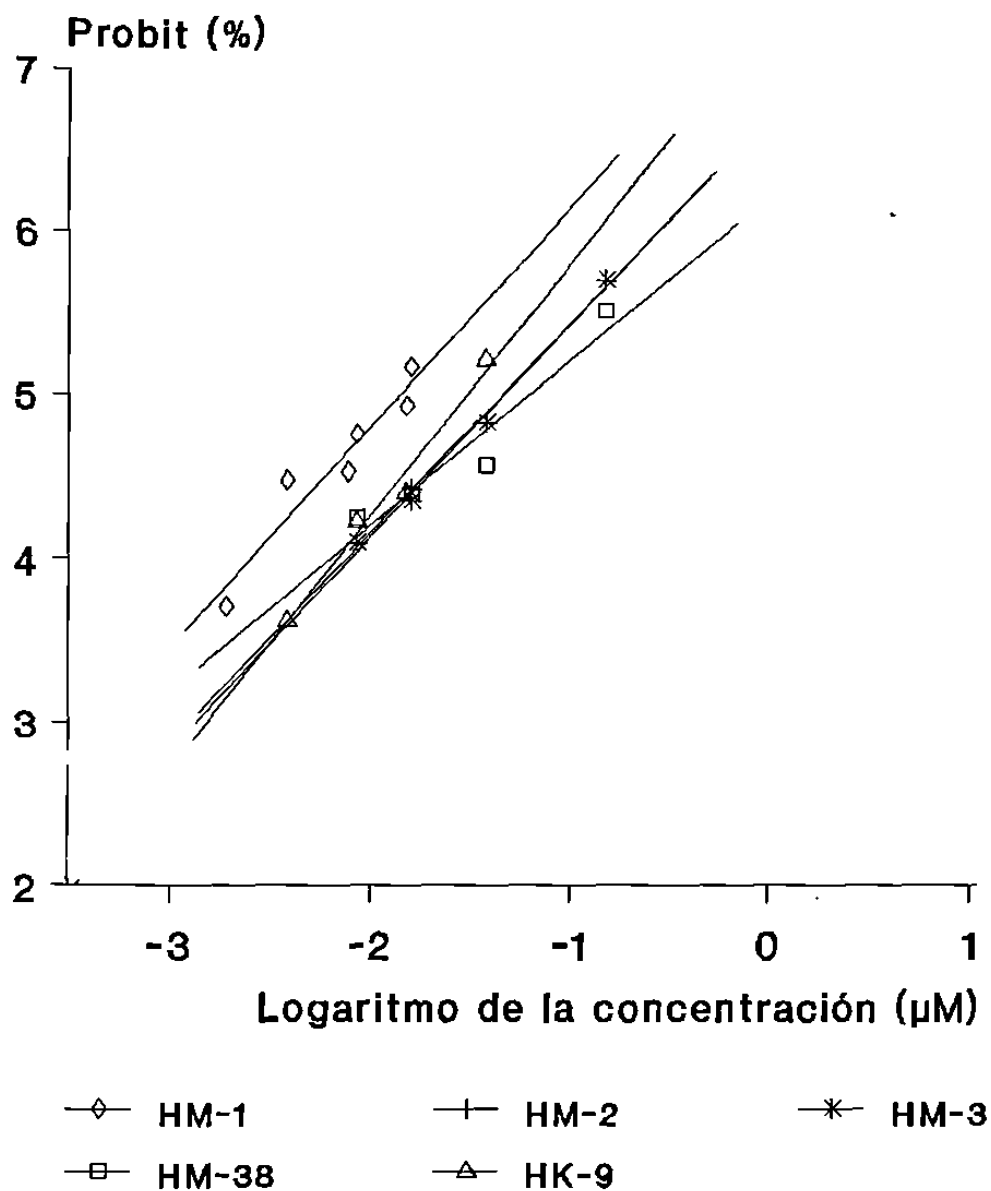


Fig. 3. Relación dosis respuesta al gossipol de cinco cepas axénicas de *E. histolytica*

Tabla 1. Potencia antiamebiana del gospol y tres de los fármacos mas comunes en la práctica clínica sobre cultivos axénicos de Entamoeba histolytica.

COMPUESTO	CI ₅₀ (μ M)	LIMITES DE CONFIANZA 95% (μ M)	CI ₅₀ RELATIVA
EMETINA	0.170	0.121-0.218	1.00
METRONIDAZOL	0.584	0.251-0.917	3.44
DIIDODOHIDROXIQUINOLEINA	14.711	11.540-17.835	86.53
GOSIPOL	0.015	0.010-0.021	0.09

Tabla 2. Potencia antiamebiana, límites de confianza y χ^2 del gospol y tres de los fármacos mas comunes en la práctica clínica sobre cultivos axénicos de E. histolytica.

COMPUESTO	IC ₅₀ (μ g/ml)	P ₉₅	χ^2
EMETINA	0.082	0.058-0.105	0.23
METRONIDAZOL	0.100	0.043-0.157	0.38
DIIDODOHIDROXIQUINOLEINA	5.840	4.600-7.080	0.13
GOSIPOL	0.008	0.005-0.011	0.35

Tabla 3. Actividad antiamebica in vitro del gospol sobre cinco cepas de E. histolytica.

CEPAS	CI ₅₀ μ M	LIMITES DE CONFIANZA 95% (μ M)
HM-1	0.015	0.010 - 0.021
HK-9	0.030	0.022 - 0.038
HM-3	0.038	0.027 - 0.049
HM-2	0.049	0.031 - 0.067
HM-38	0.067	0.045 - 0.089

Tabla 4. Actividad antiamebica *In vitro* del (±)-, (+)-, (-)-gospol y emetina contra cinco cepas de E. histolytica.

CEPA	(±)-GOSIPOL	(+) -GOSIPOL		(-)-GOSIPOL		EMETINA	
	Absoluto ^a	Absoluto ^a	Relativo ^b	Absoluto ^a	Relativo ^b	Absoluto ^a	Relativo ^b
HM-1	0.018 ± 0.001	0.235 ± 0.024	0.08	0.010 ± 0.001	1.80	0.170 ± 0.038	0.11
HK-9	0.053 ± 0.010	2.086 ± 0.368	0.03	0.016 ± 0.002	3.31	0.153 ± 0.013	0.35
HM-3	0.064 ± 0.007	0.225 ± 0.038	0.28	0.038 ± 0.002	1.68	0.113 ± 0.015	0.57
HM-2	0.068 ± 0.010	0.455 ± 0.035	0.15	0.026 ± 0.003	2.61	0.131 ± 0.012	0.52
HM-38	0.071 ± 0.006	1.085 ± 0.120	0.07	0.029 ± 0.003	2.45	0.082 ± 0.012	0.87

^aCI₅₀(μM)±95 % limite de confianza.

^bCI₅₀(±)gospol/CI₅₀ de (+)-gospol, (-)-gospol o emetina.

Tabla 5. Actividad relativa antiamebica del (±)-gospol con respecto al (+)-gospol, (-)-gospol y la emetina, contra cinco cepas axénicas de E. histolytica.

CEPAS	(±)-GOSIPOL ^b	(+) -GOSIPOL ^b	(-) -GOSIPOL ^b	EMETINE ^b
HM-1 ^a	1.00	1.00	1.00	1.00
HK-9	2.94	8.88	1.60	0.90
HM-3	3.56	1.00	3.80	0.66
HM-2	3.78	1.94	2.60	0.77
HM-38	3.94	4.62	2.90	0.48

^a1= CI₅₀ para la cepa HM-1.

^bCI₅₀ de (±)-, (+)-, (-)-gospol y emetina de cada cepa/CI₅₀ de HM-1.

IV. Efecto del gosipol sobre la actividad de la enzima málica y la alcohol deshidrogenasa de trofozoítos de *E. histolytica*.

La cinética de la enzima málica se muestra en la Fig. 4, la cual al graficar concentración de sustrato contra velocidad inicial resultó en una curva hiperbólica.

Al graficar los recíprocos de velocidad inicial contra concentración de sustrato (Fig. 5) se determinó una K_m de 0.20 mM. Al hacer las mismas determinaciones en presencia de (\pm)-gosipol o sus enantiómeros y graficar sus recíprocos se observó una disminución de la velocidad máxima (V_{max}), pero no un cambio de la K_m dado por el intercepto en el plano de las X, de lo cual se deduce que el gosipol es un inhibidor de tipo no competitivo para esta enzima (Fig. 6).

Con el objeto de determinar si el efecto inhibitorio del (\pm)-gosipol se debía a ambos enantiómeros ó solo a uno de ellos, se hicieron las mismas determinaciones en presencia de concentraciones equivalentes de (-)-gosipol o (+)-gosipol. Los resultados obtenidos sugieren que la actividad inhibitoria observada se debe al enantiómero (-)-gosipol. Sin embargo la CI_{50} para el gosipol y sus isómeros que se muestra en la Tabla 6 indican que el enantiómero (+) tiene actividad inhibitoria, aunque considerablemente menor que su contraparte.

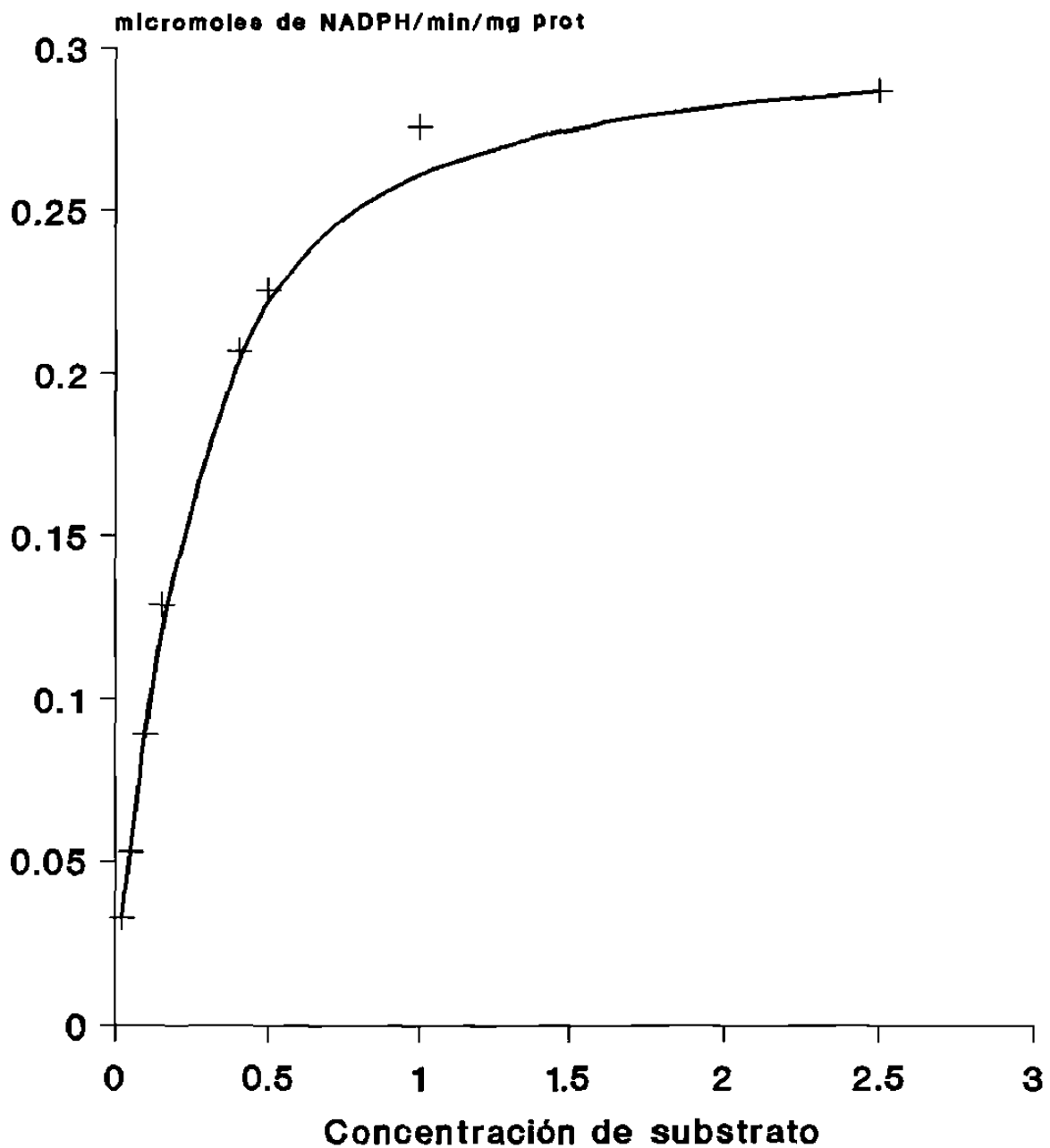


Fig. 4. Relación de la concentración de sustrato vs la velocidad inicial de la reducción de NADP por la enzima málica

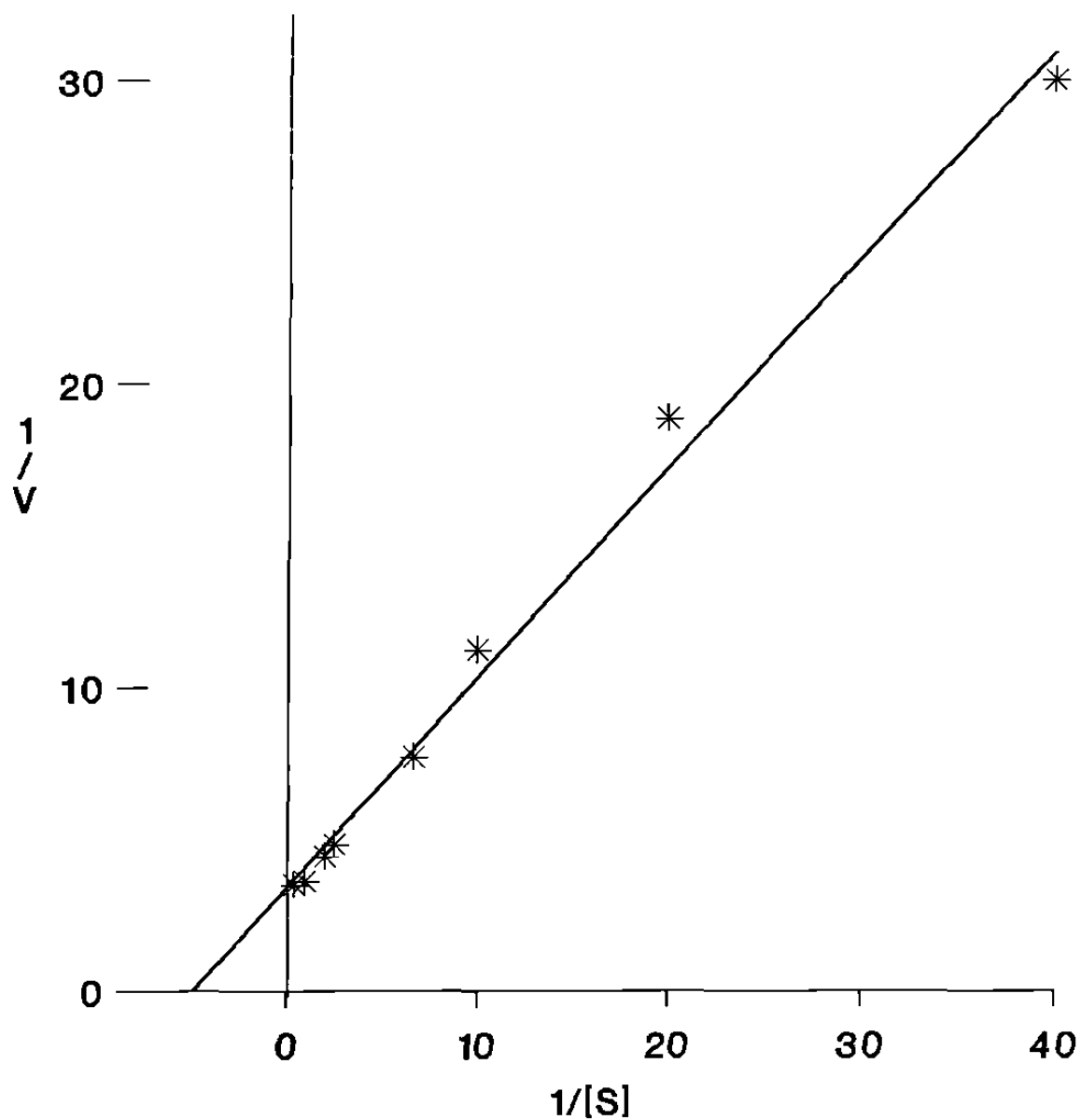


Fig. 5. Ecuación de Lineweaver-Burk para la Enzima Máltica de *E. histolytica*.

Con la alcohol deshidrogenasa se hicieron las mismas determinaciones. En la Fig. 7 se muestra la gráfica de velocidad inicial contra concentración de substrato, la gráfica de los recíprocos de estos valores se muestra en la Fig. 8, de donde se obtuvo una K_m de 1.4 mM. Al realizar las mismas determinaciones en presencia de gosispol. Se determinó una inhibición de tipo no competitiva (Fig. 9). La CI_{50} del (\pm)-gosispol y sus enantiómeros para alcohol deshidrogenasa se muestra en la Tabla 6. Esta enzima resultó ser 23, 9 y 43 veces más resistente que la enzima mállica a los efectos inhibitorios del gosispol (\pm)-, (+)- y (-)-, respectivamente. La actividad inhibitoria de éste último es 17 y 4 veces más potente que el (+)-gosispol, con respecto a la forma racémica es 5 y 2 veces mas potente para la enzima mállica y la alcohol deshidrogenasa, respectivamente.

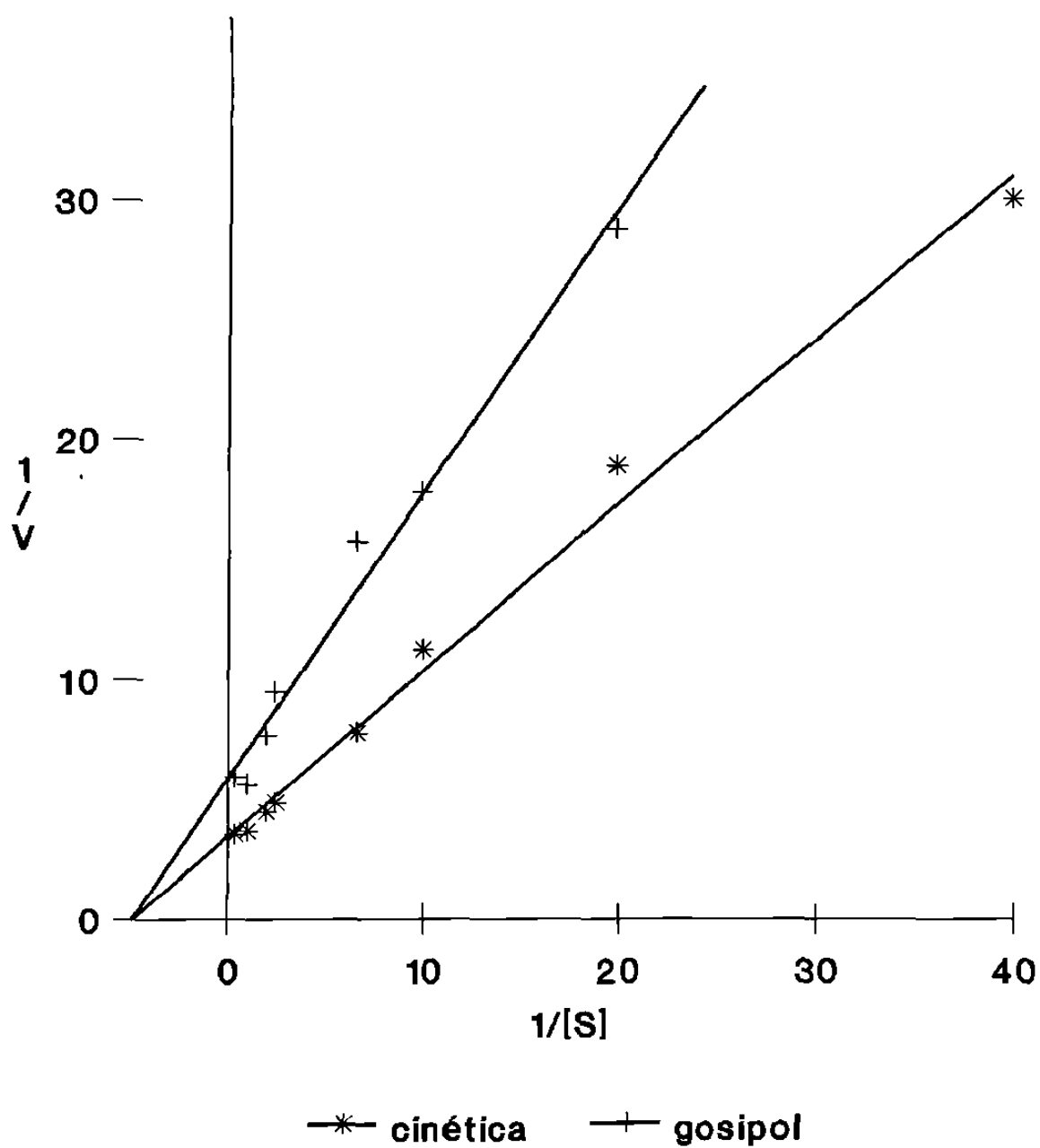


Fig. 6. Ecuación de Lineweaver-Burk para la Enzima Málica de *E. histolytica* con y sin (+)-gospol 3.4 μ M.

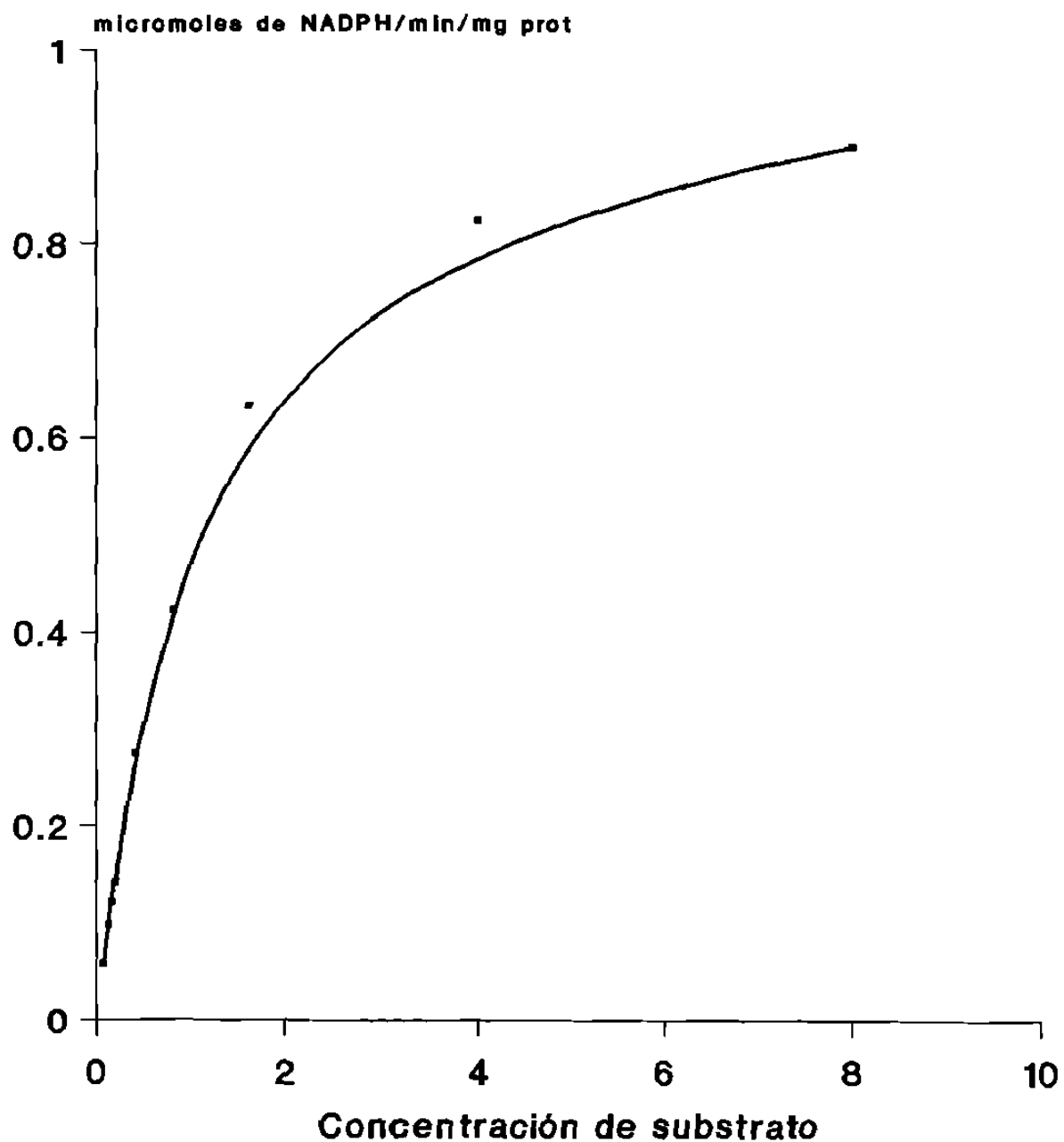


Fig. 7. Relación de concentración de sustrato contra velocidad inicial de la alcohol deshidrogenasa.

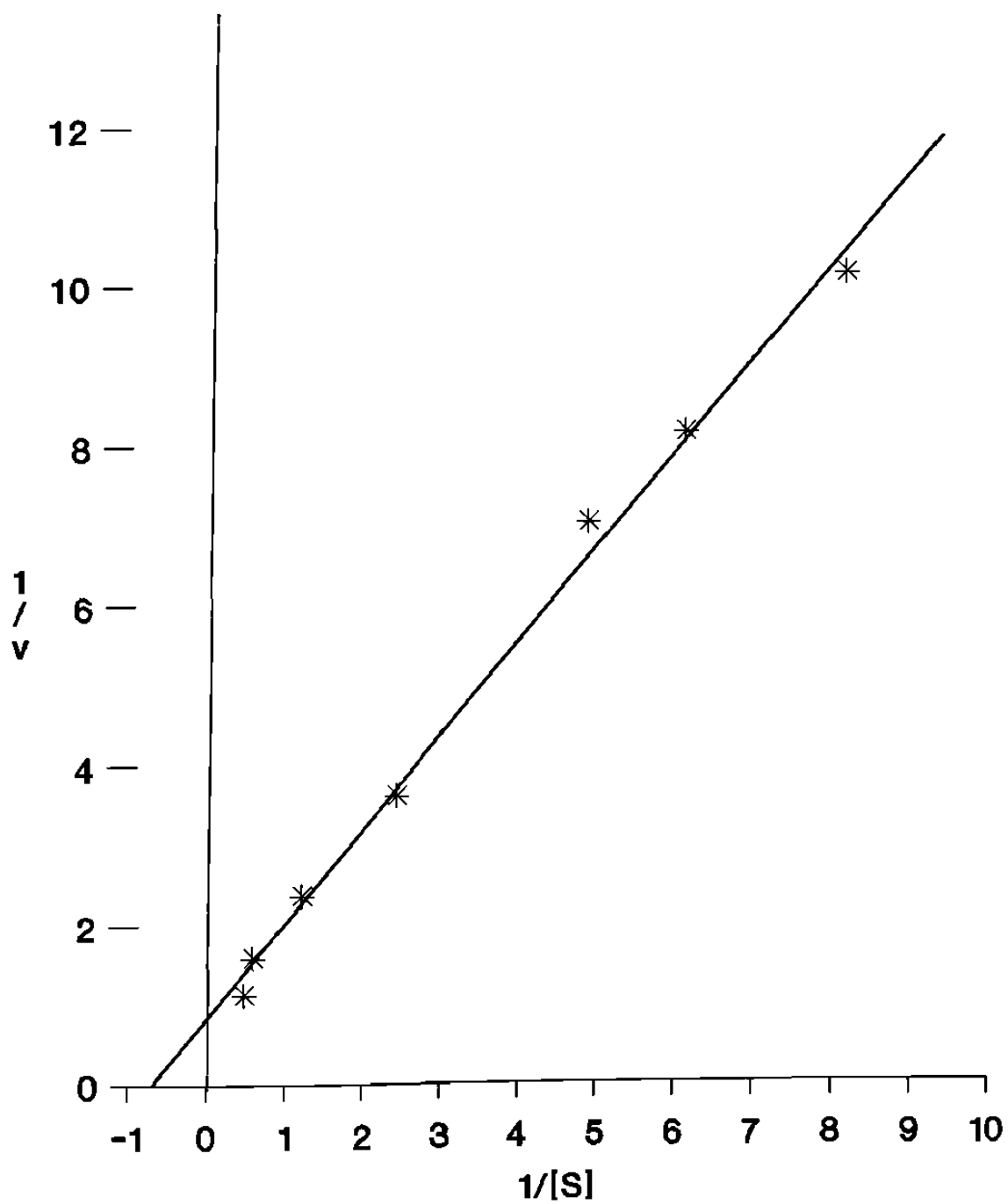


Fig. 8. Ecuación de Lineweaver-Burk para la Alcohol deshidrogenasa de Entamoeba histolytica.

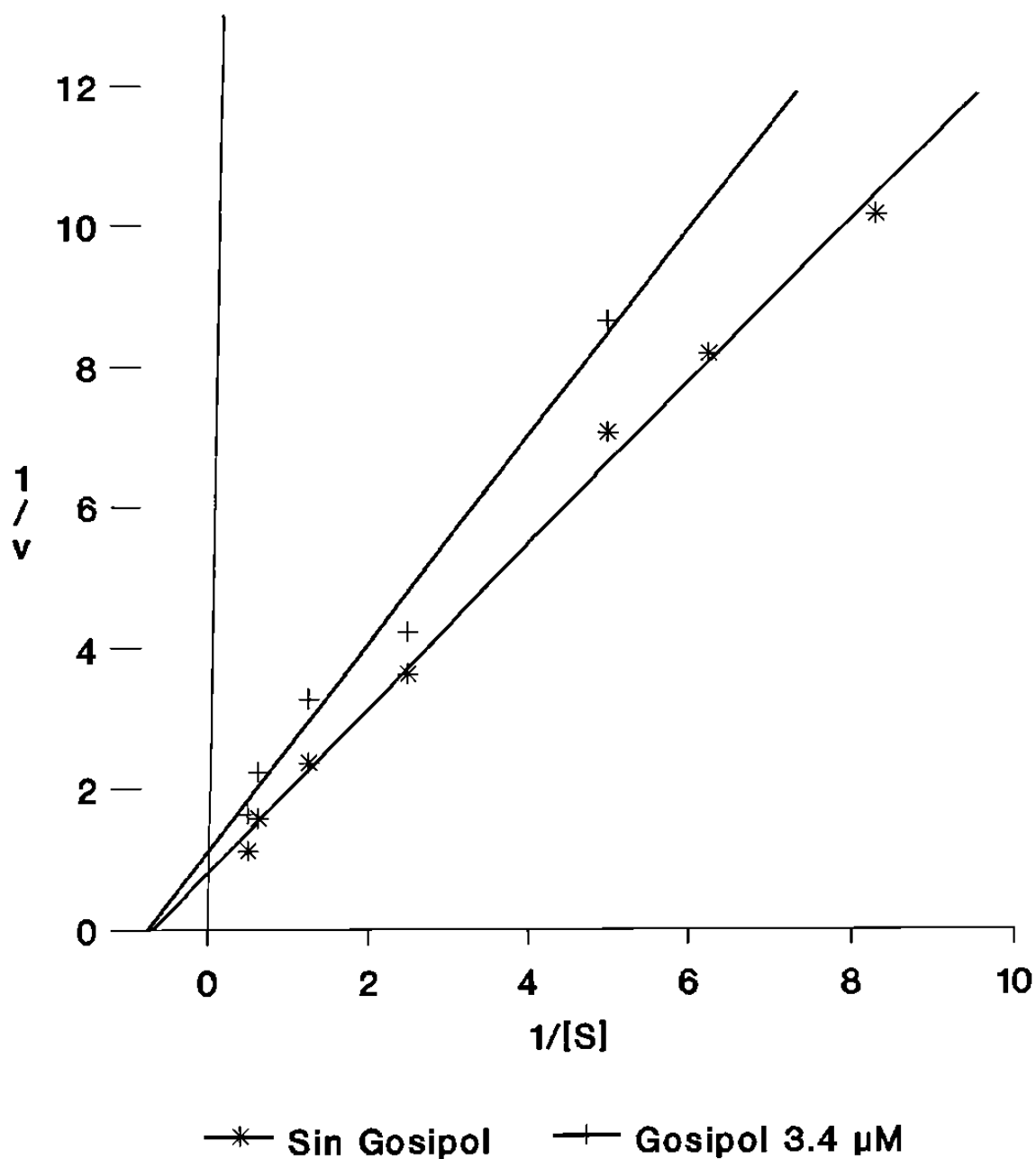


Fig. 9. Ecuación Lineweaver-Burk para la Alcohol Deshidrogenasa de Entamoeba histolytica con y sin (+)-gospol

Tabla 6. Efecto del (±)-gospol y sus enantiómeros sobre dos oxido-reductasas de Entamoeba histolytica.

Enzima	Gospol *C ₁₅₀ (μM)		
	(±)	(+)	(-)
Enzima Máfica	3.15	14.29	0.85
Alcohol Deshidrogenasa	48.0	126.0	34.0

*Concentración máxima inhibitoria media

Actividad antiamibiana in vivo

V. Evaluación del valor terapéutico del gosipol *in vivo*, en hámsters inoculados experimentalmente en el hígado con trofozoítos de *E. histolytica*.

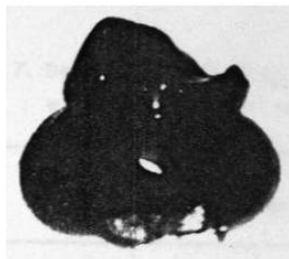
El aspecto de los abscesos hepáticos al momento del sacrificio se muestra en la Fig. 10 en la cual se puede observar que en algunos animales el absceso ocupó todo el lóbulo infectado. Al comparar el desarrollo de los abscesos en los 5 grupos experimentales se observó la presencia de abscesos más grandes en el grupo control que los de los animales tratados (Fig. 10). El análisis estadístico demostró diferencias significativas ($P < 0.05$) sólo entre el tamaño de los abscesos de los hámsters tratados con 20 mg de gosipol/Kg de peso corporal y del grupo de hámsters tratados con 30 mg de metronidazol/Kg de peso corporal, con respecto al grupo de animales no tratados (Tabla 7).

El desarrollo de nuevos cultivos a partir de la siembra de muestras de hígado de todos los animales incluidos en el experimento también fué mayor y con crecimiento más vigoroso en los tubos correspondientes a los animales no tratados que en los tratados con gosipol en dosis de 20 mg/Kg de peso y en los animales tratados con metronidazol (Tabla 7) y al aplicarse la prueba de Q de Cochran sólo se encontraron diferencias

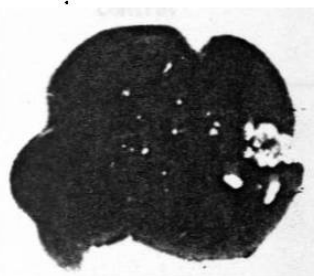
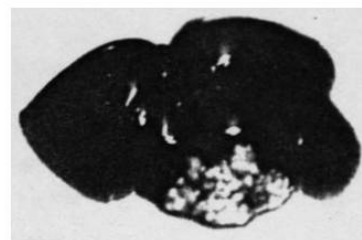
significativas ($P < 0.05$) entre estos grupos y el grupo control.

Las imágenes de resonancia magnética nuclear obtenidas de animales inoculados intrahepáticamente con trofozoítos de *E. histolytica* en donde se muestra la imagen proyectada en T1 (Fig. 11A) en la cual el absceso corresponde a la zona más oscura que en el ángulo superior izquierdo, el resto de la imagen corresponde al hígado no afectado. El mismo campo, analizado con T2 (Fig. 11B) revela una zona clara, que coincide con la zona oscura de la imagen de T1 con lo que se comprueba la presencia del absceso.

3I



2H



(4I

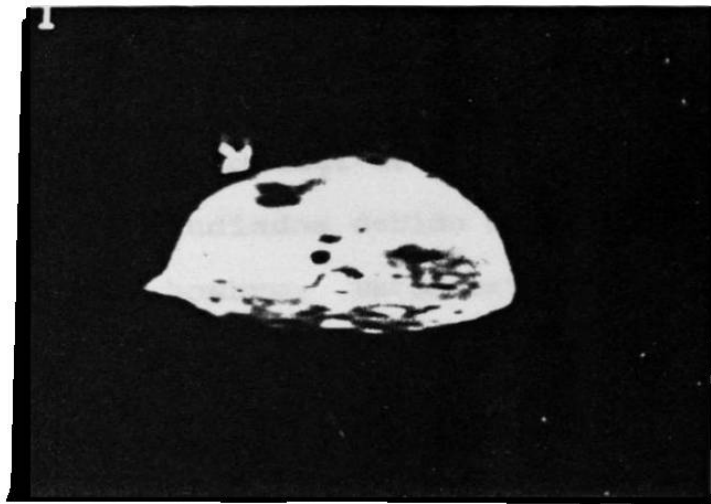
5F



Fig. 10. Aspecto de los abscesos hepáticos ambianos en hámsters. El número corresponde al grupo experimental: 2 y 3 de gosípol 10 y 20 mg/Kg. 4; 30 mg/Kg metronidazol y 5; Control

Tabla 7. Desarrollo de abscesos en hamsters 24 horas después de suspender el tratamiento antiamebico y presencia de trofozoitos en cultivo.

Grupo	Número de hamster con absceso	Cultivos Positivos absceso positivo	Cultivos Positivos absceso negativo
Gosipol 5mg	7/9	4/7	1/2
Gosipol 10 mg	6/9	3/6	2/3
Gosipol 20 mg	4/9	2/4	1/5
Metronidazol 30 mg	7/9	2/7	0/2
Control	9/9	6/9	---



A



B

Fig. 11. Imagen obtenida con RMN de un absceso hepático amilblano en hámster. A: Imagen T1, el absceso corresponde a la zona oscura. B: Imagen T2, corresponde a la zona clara.

D I S C U S I O N

Las propiedades farmacológicas y toxicológicas del gosipol han sido ampliamente estudiadas debido a su efecto antifertilizante en el hombre. Estos estudios se han seguido a lo largo de períodos hasta de 10 años, en donde la mayoría de los sujetos estudiados (98.9 %) no presentaron efectos secundarios indeseables. Además, al suspenderles la administración de la droga, ellos recuperaron su fertilidad en un período de dos meses (National Coordination Group on male Antifertility Agents, 1978; Aitken, 1983; Zhang y Col, 1985; Meng y Col, 1988; Xu y Col, 1988; Wu, 1989). Por otro lado, se sabe bien que este compuesto se concentra principalmente en hígado y colón y es eliminado con la bilis (Abou-Donia y Dieckert, 1974, 1975), y tiene actividad inhibitoria sobre las deshidrogenasas láctica y málica dependientes de NAD^+ ó NADP^+ (Tso y Lee, 1980; Maugh, 1981; Oligati y Toscano, 1983; Gerez de Burgos y Col, 1984; Berry y Col, 1985; Whaley y Col, 1986; Gonzalez-Garza y Col, 1986; Morris y Col, 1986; Stainer y Col, 1984; Ikeda, 1990) y sobre diversos agentes patógenos (Dorsset y Kerstine, 1975; Vander Jagt y Col, 1982; Blanco y Col, 1983; Rikihisa y Lin, 1986, 1990; Lin y Col, 1989). En consecuencia todas estas características sugirieron al gosipol como un posible agente antiaméptico en vista de que en el metabolismo amibiano hay enzimas dependientes de dichas

coenzimas.

Con esa idea en mente, se realizó el presente estudio, el cual consistió de dos partes; la evaluación del efecto antiamebíico del gosiol *in vitro* y un estudio preliminar sobre su efecto *in vivo*, en hamsters con absceso hepático amebiano producido experimentalmente.

La evaluación *in vitro* del gosiol consistió en la determinación de su potencia sobre cinco cepas de *E. histolytica* cultivadas experimentalmente, la determinación de la contribución específica de cada uno de los enantiómeros presentes en la mezcla racémica natural y el análisis de su efecto a nivel molecular sobre dos enzimas probablemente susceptibles. Consideramos que esta es la parte medular y original del trabajo. La evaluación *in vivo* es, por lo pronto solamente un indicio de su posible utilidad como agente antiamebíico, considerando que se deberán hacer pruebas farmacológicas exhaustivas para determinar su DE_{50} como antiamebíico, en al menos sobre cuatro especies animales, para después realizar su evaluación como antiamebíico en el hombre.

En la primera serie de experimentos se determinó la potencia antiamebíica del gosiol y se comparó con la de tres de los fármacos que han sido los más empleados en la práctica médica: emetina, metronidazol y diiodohidroxiquinoleína. Los valores de potencia de estos tres coinciden con los reportados por otros

autores. Es decir 0.146-0187 μM para emetina (Neal, 1983; Keene y Col, 1986), 0.584-2.921 μM para metronidazol (Neal, 1983; Gault y Col, 1985) y 9.068 μM para diiodohidroxiquinoleína (Neal, 1978). Ello refuerza nuestra comparación con el gosipol.

La CI_{50} del gosipol para la cepa HM-1 fué 11, 39 y 980 veces menor que la CI_{50} de la emetina, metronidazol y diiodohidroxiquinoleína, respectivamente (Tabla 1). En todos los casos la χ^2 fué menor a los grados de libertad (Tabla 2), lo cual indica que los resultados obtenidos son confiables (Finney, 1977). La diferente susceptibilidad a las drogas antimébrica de las cepas de *E. histolytica*, que se observó (Tablas 4 y 5), coincide con lo informado por otros grupos de trabajo (Neal, 1978, 1983; Gault y Col, 1985; Keene y Col, 1986; Chintana y Col, 1986; Bhutani y Col, 1987; Charttejee y Col, 1987). Sin embargo, en el caso del gosipol, la variación de la CI_{50} se circunscribe un mismo orden de magnitud, es decir, la CI_{50} es de 0.008 a 0.034 $\mu\text{g/ml}$; en cambio para las otras drogas mencionadas varía hasta dos ordenes de magnitud como en el caso del metronidazol que varia de 0.027 a 12.50 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 8). Debido a que el gosipol es una mezcla racémica, se determinó la CI_{50} de los enantiómeros, con el objeto de conocer la contribución específica de cada uno de ellos al efecto global del compuesto. Los resultados mostraron que la mayor actividad reside en el (-)-gosipol. Lo cual es congruente con lo que se

Tabla 8. Variación de la actividad antiamibiana in vitro de diferentes fármacos en Entamoeba histolytica.

FARMACO	$\mu\text{g/ml}^a$	REFERENCIA
EMETINA	0.082 - 1.60	Neal, 1973; Neal, 1978; Keene y Col, 1987.
DEHIDROEMETINA	0.125 - 1.00	Chintana y Col, 1986.
METRONIDAZOL	0.027 - 12.5	Neal, 1978; Bhutani y Col, 1987; Charttejee y Col, 1987.
TINIDAZOL	0.032 - 0.125	Neal, 1978; Chintana y Col, 1986.
ORNIDAZOL	0.032 - 0.125	Neal, 1978; Chintana y Col, 1986.
DILOXIMAMIDA	0.880	Neal, 1978.
DILOXIANIDE FURATO	1.50 - 1.95	Neal, 1978; Charttejee y Col, 1987.
DIIDOHIDROXIQUINOLEINA	3.60 - 8.40	Neal, 1973, 1978.
GOSIPOL	0.008 - 0.034	Este trabajo

^aDatos obtenidos en experimentos realizados con diferentes cepas de E. histolytica en condiciones axénicas.

conoce sobre otros sistemas biológicos: Por ejemplo, se sabe bien que de los dos enantiómeros, el (-)-gospol es el principal responsable de la actividad antifertilizante en hámsters (Matlin y Col, 1985; Lindberg y Col, 1987), de la disminución en el contenido de ATP en espermátidas (Den Boer y Grootegoed, 1988) y de la actividad antiviral del gospol sobre el virus HIV 1 (Lin y Col, 1989).

El (+)-gospol fue el enantiómero menos tóxico para *E. histolytica*, sin embargo presenta también una actividad antiamébrica detectable (Tabla 4), inclusive mayor que la informada para la diidrohdroxiquinoleína (Tabla 8) y para el metronidazol. Este efecto citotóxico del (+)-gospol también fué observado por Joseph y colaboradores (1986) en células tumorales.

Para el análisis del gospol, a nivel molecular, se eligieron a dos de las enzimas de *E. histolytica* que podrían ser las susceptibles al efecto del gospol, dado que en ese momento se sabía que la droga de referencia inhibe las enzimas dependientes de NAD^+ o NADP^+ (Tso y Lee, 1980; Maugh, 1981; Oligati y Toscano, 1983; Steiner y Col, 1984; Whaley y Col, 1986; Gonzalez-garza y Col, 1986; Morris y Col, 1986; Kim y Col, 1987; Ikeda, 1990), y que *E. histolytica* tiene un metabolismo peculiar, precisamente en el paso de conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato, en el que intervienen en forma determinante la enzima málica (que utilizan como coenzima el

NADP⁺) (Reeves y Col, 1974a, 1974b, 1977), y por último, se conocía también que algunos protozoarios, como *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum* también son susceptibles al efecto del gosipol (Vander Jagt y Col, 1982; Gerez de Burgos y Col, 1984). Encontramos que la enzima málica se inhibió hasta en un 50 % en presencia de (±)-gosipol 3.4 µM, con respecto a la velocidad de reacción de la enzima en ausencia del inhibidor. Se determinó también el efecto sobre otra oxido-reductasa, la alcohol deshidrogenasa que también fue susceptible, aunque para obtener el 50% de inhibición de esta enzima fué necesaria una dosis de 48.0 µM (Tabla 6). En ambos casos el gosipol actuó como un inhibidor de tipo no competitivo con respecto al sustrato, lo cual coincide con lo informado por otros autores con otras oxido-reductasa (Gerez de Burgos y Col, 1984; Ikeda, 1990). Es notable que en *E. histolytica* la malato deshidrogenasa resultó ser la más susceptible, mientras que la deshidrogenasa alcohólica fué la menos susceptible, inclusive menos que otras oxido-reductasa, como puede observarse en la Tabla 9, lo cual sugiere que el efecto inhibitorio del gosipol no es de la misma magnitud sobre todas las oxido-reductasa, pues una vez más encontramos diferente susceptibilidad, sin que hasta el momento se haya podido establecer un mecanismo de acción que pueda aclarar esta especificidad. Si se analiza la Tabla 9 con respecto al tipo de coenzima que usa cada una de estas deshidrogenasas encontramos

que no existe un patrón de inhibición dependiente a la coenzima, ya que la CI_{50} de las enzimas NAD^+ -dependientes estudiadas hasta el momento es de 0.5-110.0 μM , y para las enzimas $NADP^+$ -dependientes es de 1.2- 53.2 μM . Esto sugiere que si bien el grupo de las oxido-reductasa se ve fuertemente afectado por el efecto inhibitorio del gossipol, esta característica no es la única involucrada en el fenómeno observado, y debe existir otro atributo intrínseco a cada una de las oxido-reductasa que las hace en mayor o menor grado susceptibles al gossipol.

También es interesante que la enzima málica de *E. histolytica* es más sensible al efecto inhibitorio del gossipol que la enzima málica de *T. cruzi* y aun más para otras oxido-reductasa tanto de espermatozoides de varios mamíferos y otros tejidos humanos (Tabla 9). Aún más, el efecto inhibitorio del gossipol sobre la enzima málica de *E. histolytica* es más potente que el reportado para otro tipo de enzimas, como puede observarse en la Tabla 10.

El análisis del efecto de los enantiómeros demostró que el (-)-gossipol es la forma más activa (Tabla 7). Esto, es congruente con los resultados de Den Boer y colaboradores (1988), quienes informaron que el enantiómero (-)- es un inhibidor más potente que el (±)- y el (+) para la deshidrogenasa láctica C-4 de hámster.

La inhibición de las enzimas NAD^+ ó $NADP^+$ dependientes podría

Tabla 9. Efecto del gosispol sobre la actividad de varias enzimas NAD⁺ y NADP⁺ dependientes.

TEJIDO	ENZIMA	GOSIPOL μ M	% INHIBICION
E. histolytica	Enzima Málica*	3.2	50.0
	Alcohol DH*	53.2	50.0
T. cruzi Gerez de Burgos y Col, 1984.	D. Hidroxiacida	0.5	45.0
	D. Málica	0.3	38.2
	D. Glutámica*	5.0	66.8
	Enzima Málica*	10.0	37.3
	D. Glucosa-6-fostato*	20.0	57.6
T. taeniaeformis Rikihiya y Col, 1990.	D. Succínica	100.0	0.0
	D. Láctica	25.0	61.0
Espermatozoides Humanos Ikeda, 1990.	D. Málica*	1.2	50.0
	D. Láctica	9.8	50.0
	D. Glutaraldehido-3P	110.0	50.0
	D. Isocítrica	2.7	50.0
Espermatozoides Erizo Adeyemo y Col, 1982.	D. pirúvica	20.0	40.0
Testículo Ratón Kim y Col, 1987.	LDH-x	10.0	80.0
Testículo Bovino Oligati y Toscano 1983.	LDH-x (piruvato)	300.0	50.0
	LDH-x (lactato)	12.0	50.0
Testículo Mono Whaley y Col, 1986.	LDH-x	6.0	50.0
Testículo Humana Bovina Berry y Col, 1985.	PGDH	22.0	50.0
	PGDH	20.0	50.0
Tejidos Humanos (KI) Burgos y Col, 1986.	LDH-1	3.75	46.1
	LDH-5	15.0	40.0
	LDH-4	7.0	11.0
	MDH (Hígado)	3.0	2.8
	Glut DH*	2.5	3.3

*NADP⁺ dependientes

Tabla 10. Efecto del gospol sobre la actividad de diversas enzimas.

TEJIDO	ENZIMA	GOSIPOL μ M	% INHIBICION
Cel. Leydig Rata Oligati y Col, 1984.	Adenilciclase	75.0	50.0
Higado Rata Oligati y Col, 1984.	Adenilciclase	110.0	50.0
Esperma Rata Oligati y Col, 1984.	Adenilciclase	87.0	50.0
Riñon conejo Fu y Col, 1988.	ATPasa Na ⁺ , K ⁺	6.5	50.0
Eritrocitos Humanos Drayer y Col, 1988.	ATPasa Na ⁺ , K ⁺	5mM	0.0
Esperma Erizo Adeyemo y Col, 1982.	ATPasa Na ⁺ , K ⁺	40.0	52.0
	ATPasa Mg ⁺⁺	40.0	43.0
Esperma Humano Kanwa y Col, 1989.	ATPasa Na ⁺ , K ⁺	10.0	43.6
	ATPasa Ca ⁺⁺	10.0	59.9
	ATPasa Mg ⁺⁺	10.0	25.0
	5'nucleotidasa	10.0	22.7
	Alcalin fosfatasa	10.0	40.0
Hígado Rata Ali y El-Sewedy, 1984.	P-Acetil transferasa	60.0	60.0
Puerco Katoh y Sahns, 1989.	Fosvitin quinasa	47.0	50.0

ser uno de los mecanismos responsables de la inhibición del crecimiento de los trofozoítos, especialmente la de la enzima mállica, por jugar ésta un papel crucial en la producción de energía del parásito (Reeves y Col, 1974a 1974b, 1977; Lo y Reeves, 1978). Dado que el enantiómero (+)-gospol sí mostró efectos antiambianos, aunque con una potencia notablemente menor que el (-)-gospol (Tabla 4); es posible que dicho enantiómero actúe mediante algún mecanismo diferente al efecto inhibitorio de la enzimas NAD^+ ó NADP^+ , lo cual está de acuerdo con la información que se tiene al respecto: se conocen algunos otros efectos tóxicos del gospol, puesto que además de la inhibición de enzimas NAD^+ ó NADP^+ dependientes, inhibe otro tipo de enzimas (Ali y El-Sewdy, 1984; Fu y Col, 1988; Drayer y Reidenberg, 1988; Ueno y Col, 1988; Katoh y Kimura, 1989).

La probabilidad de que el efecto biológico deseado sea producido por el (-)-gospol, plantea la posibilidad de reducir a la mitad la dosis terapéutica al utilizar sólo uno de los isómeros en lugar de la mezcla racémica.

Los resultados del estudio *in vivo* demostraron demostraron que la administración del gospol en dosis de 20 mg/Kg de peso tiene un efecto similar a la administración de 30 mg/Kg de peso de metronidazol y aunque éste último fue mas eficaz (Tabla 7) el análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre

estos dos grupos, pero si al compararse con el control: en estos dos grupos experimentales se detectó un menor crecimiento de trofozoítos en los tubos de cultivo procedentes de hígados con absceso. Con respecto a la ausencia de trofozoítos en los tubos de cultivo procedentes de hígados con absceso, se sabe que tanto en animales de experimentación como en el hombre, el absceso es detectable aunque los trofozoítos ya no esten presentes debido a que permanece el daño originado por las amibas, formandose una pared al rededor del tejido necrosado, que en el caso de los humanos se detecta aún después de dos años de haberse dado de alta al paciente. Ello explica el porque de abscesos sin trofozoítos. En el otro caso, de cultivos positivos en muestras de hígados sin absceso sugiere un estado latente de los trofozoítos inhibidos por el fármaco, por lo que no desarrollaron un absceso hepático, éste fenómeno no se observó en el grupo de metronidazol y en los grupos de gosipol resulto inversamente proporcional a la dosis de gosipol administrada (Tabla 7), lo que sugiere que el gosipol también tiene un efecto antiamoebico *in vivo*.

La utilización de la técnica de RMN para comprobar la presencia del absceso amibiano, resultó ser una técnica recomendable para este tipo de seguimientos, ya que ofrece las mismas ventajas de la espectroscopía, es decir permite representar con imágenes las alteraciones en la composición

molecular y/o el comportamiento del órgano en estudio, y añade la posibilidad de imágenes multiplanares con mayor contraste y caracterización tisular. Además, hasta ahora puede decirse que es inocuo, lo que no sucede con otras técnicas de imagen diagnóstica como la tomografía computada, ó el ultrasonido. Esta técnica ha demostrado ser de gran utilidad en pacientes con absceso hepático amibiano (Todd y Col, 1988; Elizondo y Col, 1988). En el desarrollo de este trabajo demostró que es posible localizar el absceso hepático en el hámster, lo cual sería de gran utilidad, ya que no se corre el riesgo de perder al animal durante la laparotomía.

CONCLUSIONES

Se ha planteado que la estrategia a seguir en la búsqueda de nuevas drogas antiparasitarias, debe estar basada en las diferencias metabólicas del huésped y el parásito (6). En el caso de *Entamoeba histolytica* se sabe que la vía glicolítica difiere en la transformación del fosfoenolpiruvato en piruvato, la mayoría de las células llevan a cabo esta reacción con la participación de una sola enzima, la piruvato cinasa. En cambio, en *E. histolytica* dicha transformación se realiza en los siguientes tres pasos: [1] el fosfoenol-piruvato se transforma en oxaloacetato, con la participación de la fosfoenol-piruvato-carboxitransfosforilasa, [2] el oxaloacetato se convierte en malato, con la participación de la malato deshidrogenasa que utiliza NAD^+ como coenzima, [3] el malato pasa a piruvato merced a la reacción catalizada por la enzima málica con NADP^+ como coenzima. Basado en esto se estudio el posible efecto inhibitorio del gosipol sobre el crecimiento de *E. histolytica* cultivada axénicamente, ya que el gosipol es un potente inhibidor de oxidoreductasas siendo especialmente susceptibles las enzimas láctica y málica. Los resultados demostraron que el gosipol es un potente antiamebico *in vitro* y muy prometedor *in vivo* y considerando el efecto inhibitorio que tiene sobre la enzima málica de *E. histolytica* podría considerarse como una de las

causas del efecto inhibitorio sobre el crecimiento de éste microorganismo, lo cual lo incluiría dentro de la premisa antes mencionada; por lo que consideramos reúne las características necesarias para ser considerado dentro de las drogas con mas posibilidades de incluirse en la práctica clínica.

PERSPECTIVAS

La evaluación inicial del gosipol como agente antiamebiano *in vivo* demostró que el gosipol tiene un efecto inhibitorio ($P < 0.05$) sobre el desarrollo del absceso hepático amebiano en hámsters. Sin embargo, este hallazgo no es concluyente, pero sí muy prometedor, sobre todo si se considera la potente actividad que el gosipol mostró tanto sobre los cultivos de trofozoítos como sobre la enzima málica de éstos. Con este trabajo se aportan suficientes datos para justificar un estudio farmacológico formal del gosipol, como agente terapéutico antiamebiano en animales de experimentación, con el objeto de determinar la DE_{50} sobre cuatro especies de animales de experimentación, lo cual, de acuerdo con la legislación internacional sobre evaluación de medicamentos, constituye el paso previo para la evaluación del gosipol como un posible medicamento para el tratamiento de la amebiasis humana.

LITERATURA CITADA:

Abou-Donia MB and Dieckert JW (1974). Urinary and biliary excretion of ^{14}C -gossypol. J. Nutr. 104: 754-760

Abou-Donia MB y Dieckert JW. 1975. Metabolic fate of gossypol: the metabolic of [^{14}C]gossypol in swine. Toxicol. Appl. Pharmacol. 31: 32-46

Adeyemo O, Chang CY, Segal SJ y Koide SS. 1982. Gossypol action on the production and utilization of ATP in sea urchin spermatozoa. Arch. Androl. 9: 343-349

Ali SF y El-Sewedy SM. 1984. Effects of gossypol on liver metabolic enzymes in male rats. Toxicol. Lett. 23: 299-306

Aitken RJ (1983) New techniques in contraception: Gossypol, vaccines and GnRH analogues. En: "Developments in human reproduction and their eugenetic, ethical Implications" (CQ Carter, Ed) Academic Press, New York pp 1-4

Barman TE. 1985. "Enzyme Handbook" Vol I. New York: Spring-Verlag, pp 25, 61

Berry CN, Phillips JA y Hoult JRS. 1985. Gossypol is a potent inhibitor of the NAD-dependent dehydrogenase responsible for the inactivation of prostaglandins. Acta Pharmacol. Sin. 6: 55-59

Bhutani KK, Sharma GL, Ali M. 1987. Plant based antiamebic drugs. Part I. Antiamebic activity of phenanthroindolizine alkaloids; common structural determinants of activity with emetine. Planta Medica 53: 532-536

Biagi F. (1981). Amibiases, En: "Antibiotics chemotherapy" (H. Shogeld) Vol 30 Karger, New York pp 2027

Blanco A, Aoki A, Montmant EE and Rovai LE 1983. Effect of gossypol upon motility and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool. 30: 648-651

Burgos C, Gerez de Burgos NM, Rovai LE y Blanco A. 1986. *In vitro* inhibition by gossypol of oxidoreductases from

human tissues. *Biochem. Pharmacol.* 35: 801-804

Campbell WC. 1986. The chemotherapy of parasitic infection. *J. Parasitol.* 72: 45-61

Chang MC, Zhiping G y Saksena SK. 1980. Effects of gossypol on fertility of male rats, hamster and rabbits. *Contraception* 21: 461-469

Charttejee DK, Iyer N y Ganguli BN. 1987. Antiamoebic activity of chloromorphine, a steroidal alkaloid, in experimental models. *Parasitol. Res.* 74: 30-33

Chintana T, Sucharit P, Mahakittikim V, Siripanth C y Suphadtanaphongs W. 1986. *In vitro* studies on the sensitivity of local *Entamoeba histolytica* to anti-amoebic drugs. *South Asian J. Trop. Publ. Hth.* 17: 591-594

De La Torre M, De La Hoz R, Filloy L. 1974. Cultivos axénicos de cepas mexicanas de *E. histolytica* HM-2:IMSS y HM-3:IMSS. *Arch. Invest. Med. (Supl. 2)*: 279-282

Den Boer PJ, Grootegoed JA. 1988. Differential effects of (+)- and (-)-gossypol enantiomers on LDH-C₄ activity of hamsters espermatogenic epithelium *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 83:701-709

Diamond LS. 1968 Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Schaudinn, 1903 and *E. histolytica* like amoeba. *J. Parasitol.* 54: 1047-1056.

Diamond LS, Harlow DR y Cunnick CC. 1978. A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72: 431-432

Dorsset PH and Kerstine E (1975) Antiviral activity of gossypol and appogossypol. *J. Pharmac. Sci.* 64: 1073-1075

Drayer DE y Reidenberg MM. 1988. Gossypol and Na⁺, K⁺ ATPase from human erythrocytes. *Contraception* 38: 579-583

Elizondo G, Weissleder R, Stark DD, Todd L. 1988. Treatment evaluation of amebic liver abscess by MR imaging. En: Cañedo LE, Todd EE, Parcker L y Jaz J ed. *Cell Function and disease USA*, Plenum Press, 467-475

Engler SJ, Hess P, Hoffer AD. 1984. Absence of

histopathology in somatic tissues of rats male infertile with gossypol. Arch. Androl. 13: 93-100

Finney DL. 1977. "Probit Analysis" New York: Cambridge Univ Press, 1-80

Fu YF, Zhang Zhang SL, Lu ZM y Wang W. 1988. Effects of gossypol on the activity of kidney (Na^+ + K^+)-ATPase and the functions of erythrocyte membrane. Contraception 37: 179-184

Gault MJ, Teiner DS y Gillen FD. 1985. Tolerance of axenically cultured *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to a variety of antimicrobial agents. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 79: 60-62

Gajvels M, Wang J, Bergh A, Damber JB y Selstam G. 1984. Toxic effects of the antifertility agent gossypol in male rats. Toxicology 32: 325-333

Gerez de Burgos NM, Burgos C, Montamat E, Rovai LE y Blanco A. 1984. Inhibition by gossypol of oxidoreductases from *Trypanosoma cruzi*. Biochem. Pharmacol. 33: 955- 959

Gonzalez-Garza MT, Montalvo I y Sotelo A. 1985. Cytotoxic effect of gossypol and vitamin E on human and rat lymphocytes and spermatozoa. Nutr. Rep. Int. 32: 559-564

Gonzalez-Garza MT, Montalvo I, Mota L y Sotelo A. 1986. Lactic dehydrogenase activity in various organs of rats fed with cottonseed flour. Nutr. Res. 6: 443-449

Guerrat RL (1986) The global problem of amoebiasis: Current status research needs and opportunity for progress. Rev. Infec. Dis. 8: 218-227

Herrera J, Montalvo I, Gonzalez-Garza MT, Sotelo A y Bermudez JA. 1983. Cottonseed flour effects on androgen testicular content and serum levels. Arch. Androl. 11: 161-165

Herrera J, Montalvo I, Gonzalez-Garza MT, Sotelo A, Gomez S y Bermudez JA. 1984. Modification in testis stereodogenic pathways in rats fed with cottonseed flour. Arch. Androl. 12: 53-58

Heywood R, Lloyd GK, Majeed SK y Gopinnath C. 1986. The

toxicity of gossypol to male rats. *Toxicology* 40: 279-284

Ikeda M. 1990. Inhibition kinetics of NAD-linked enzymes by gossypol acetic acid. *Andrology* 22: 409-416

Jensen DR, Sorensen JN y Bosek SA. 1982. Deposition pattern of antifertility agent, gossypol, in selected organs of male rats. *Toxicology* 24: 65-72

Joseph AEA, Matlin SA, Knox P. 1986. Cytotoxicity of enantiomers of gossypol. *Brit. J. Cancer* 54: 511-513

Kalla NR y Vasudev M. 1980. Studies on male antifertility agent gossypol acetic acid: *In vitro* studies on the effects of gossypol acetic acid in human spermatozoa. *IRCS Med. Sci. Biochem.* 8: 375

Kanwa U, Batla A, Sanyal S, Minocha R, Majundar S y Ranga A. 1989. Gossypol Inhibition of Ca^{++} uptake and Ca^{++} ATPase in human ejaculated spermatozoal plasma membrane vesicles. *Contraception* 39: 431-445

Katoh N y Kimura K. 1989. Inhibition by gossypol of cyclic nucleotide-independent phosphokinase from pig testis. *Jpn. J. Vet. Sci.* 51: 105-109

Keene AT, Harris A, Phillipson JD y Warhurst DC. 1986. *In vitro* antiamebic resting of natural products. Part I. Methodology. *Planta Medica* No.4: 201-206

Kim I, Marcelle GB, Waller DP, Cordell GA, Fong HHS (1987). Inhibition of lactate dehydrogenase-X by imino-derivates of gossypol: structure activity relationship. *Contraception* 35: 289-297

Lin TS, Schinazi R, Griffith BP, August EM, Eriksson BFH, Zheng DK, Huag L and Prusoff WH (1989). Selective inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by the (-) but not the (+) enantiomer of gossypol. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 2149-2151

Lindberg MC, Naqvi RH, Matlin SA, Zhou RH, Bialy G, Blye RP. 1987. Comparative anti-fertility effects of gossypol enantiomers in male hamsters. *Inter. J. Androl.* 10: 619-623

Lo H-s y Reeves R. 1978. Pyruvate to ethanol pathway in *E. histolytica*. *Biochem. J.* 171: 225-230

- Matlin SA, Zhou RJ. 1984. Resolution of gossypol: Analytical and preparative HPLC. *J. High Res. Chromat. Comun.* 7: 629-631
- Matlin SA, Zhou RH, Bialy G, Blye RP, Lindberg MC. 1985. Gossypol: an active male antifertility agent. *Contraception* 31: 141-149
- Mattern CFT, Keister DB. 1977. Experimental amoebiasis. I. Pathogenicity of axenically cultured *Entamoeba histolytica* in the brain of the newborn mouse. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26: 393-401
- Maugh TH. 1981. Male "Pill" blocks sperm enzyme. *Science* 212: 314
- Mclaughlin J y Aley S. 1985. The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. *J. Protozool.* 32:221-240
- Meng G-d, Zhu J-c, Chen Z-w, Wong L-t, Zhang G-y, Hu Y-z, Ding J-h, Wang X-h y Qian S-z. 1988. Follow up of men in the recovery period immediately after the cessation of gossypol treatment. *Contraception* 37: 119-128
- Meerovich E y Chadee K. 1988 *In vivo* models for pathogenicity in amoebiasis. En: Ravdin JI ed. *Amebiasis, human infection by Entamoeba histolytica*. USA: Plenum Press, 415-420
- Meza, I.; De la Garza, M.; Meraz, A.; Gallegos, B.; De la Torre, M.; Tanimoto, M.; Martínez-Palomo, A. 1986 Isoenzyme patterns of *Entamoeba histolytica* isolates from asymptomatic carriers: Use of gradient acrylamide gels. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 1134-1139
- Montamat EE, Burgos C, Gerez de Burgos NM, Rovai LE y Blanco A. 1982. Inhibitory action of gossypol on enzymes and growth of *Trypanosoma cruzi*. *Science* 218: 288-289
- Morris IP, Higgins C y Matlin SA. 1986. Lactic dehydrogenase activity animals and man by gossypol and its isomer. *J. Reprod. Fert.* 22: 607-612
- National coordinating Group on Male Antifertility Agents. 1978. Gossypol a new antifertility agent for males. *Chinese Medical Journal* 4: 417-427

- Neal RA. 1983. Experimental amoebiasis and development of anti-amoebic compounds. *Parasitology* 86: 175-191
- Neal RA. 1978. Anti-amoebic activity of drugs given singly and in combination against axenically grown *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Méx)* 9 (Suppl 1): 387-392
- Oligati KL y Toscano Jr WA. 1983. Kinetics of gossypol inhibition of bovine lactate dehydrogenase X. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 115: 180-185
- Oligati KL, Tosacano DG, Atkins WM y Toscano Jr WA. 1984. Gossypol Inhibition of adenylate Cyclase. *Arch. Biochem. Biophys.* 231: 411-415
- Rikihisa T and Lin YC. (1986). *Taenia taeniaeformis*: Inhibition of metacestode development in the rat by gossypol. *Exp. Parasitol.* 61: 127-133
- Rikihisa T, Lin YC, Garber, PL and Gu Y. (1990). *Taenia taeniaeformis*: Inactivation of metacestodes by gossypol in vitro. *Exp. Parasitol.* 71: 135-145
- Reeves R. 1974a. Glycolytic enzymes in *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd. (Méx)* 5 suppl 2: 411-414
- Reeves R, Warren L y Guthrie J. 1974b. Studies on the intracellular concentration of glycolytic intermediates in *E. histolytica*. *Arch. Invest. Méd. (Méx)* 5 suppl 2: 331-336
- Reeves R, Warren L, Sasskud B y Lo H-s. 1977. An energy conserving pyruvate to acetate pathway in *E. histolytica*. *J. Biol. Chem.* 252: 726-731
- Royer RE, Deck LM, Campos NM, Hunsaker LA, Vander Jagt DL. 1986. Biologically active derivatives of gossypol: synthesis and antimalarial activities of peri-acylated gossylic nitriles. *J. Med. Chem.* 29: 1799-1801
- Said-Fernández S, Vargas-Villareal J, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas BD, Navarro-Marmolejo L, Lozano-Garza G y Martínez-Rodríguez H. 1988. PEHPS medium: An Alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 249-253

- Said-Fernández S y Mata-Cárdenas BD. 1992. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* in suspension. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86: 173-174
- Said-Fernández S, Gonzalez-Garza MT, Mata-Cárdenas BD y Navarro-Marmolejo L. 1990. A multipurpose solid-phase method for protein determination with Coomassie Brilliant Blue G-250. *Anal. Biochem.* 191: 119-126
- Sepúlveda B (1982) Amoebiasis: Host pathogen Biology. *Rev. Infec. Dis.* 4: 1247-1253
- Siegel S. 1975. "Estadística no paramétrica". México, Trillas pp 190-195
- Sotelo A, Montalvo I, Crail ML y Gonzalez-Garza MT. 1982. Infertility in male rats induced by diets containing whole cottonseed flour. *J. Nutr.* 112: 2052-2057
- Steiner M, Frick J and Rován E. 1984. *In vivo* study of LDH isoenzyme activities in heart, liver and testis cytosols of gossypol-treated rats. *Int. J. Androl.* 7: 521-528
- Sufi SB, Donaldson A, Jeffcoate SL, Matlin SA, Zhou RH. 1985. Inhibition by (+) and (-) isomers of gossypol of testosterone release from mouse leydig cells *in vitro*. *Contraception* 31: 159-163
- Todd LE, Elizondo G, Weissleder R. 1988. Disease detection by MR imaging. T1 and T2 relaxation times. En: Cañedo LE, Todd LE, Parcker L y Jaz J ed. *Cell Function and Disease*. USA Plenum Press, 415-420
- Tso WW, Lee CS. 1980. Lactate dehydrogenase-X: an isoenzyme particularly sensitive to gossypol inhibition. *Int. J. Androl.* 5: 205-209
- Ueno H, Sahns MK, Segal SJ y Koide SS. 1988. Interactions of gossypol with sperm macromolecules and enzymes. *Contraception* 37: 333-341
- Vander Jagt DL, Heidrich JE, Royer RE y Hunsaker LA. 1982. Antimalarian activity of gossypol and Methylglyoxal-Bis-guanythycazone. *Fed. Proc.* 41: 6769
- Walsh JA. 1986. Problems in recognition and diagnosis of

amibiiasis: Estimation of the global magnitud of morbidity and mortality. Rev. Infect. Dis. 8: 228-238

Whaley KL, Stephens DT, Klinkow NM y Hoskins DD. 1986. Monkey lactate dehydrogenase-C₄ as a model for the interaction of enzymes with gossypol. Contraception 33: 605-616

Wichman R, Vaheri A y Luukkainen T. 1982. Inhibiting herpes simplex virus type 2 infection in human epithelial cells by gossypol, a potent spermicidal and contraceptive agent. Amer. J. Obst. Ginecol. 142: 593-594

Wright CW and Phillipson JD (1990). Natural products and development of selective antiprotozoal drugs. Phytother. Res. 4: 127-139

Wu D. 1989. An overview of the clinical pharmacology and therapeutic potential of gossypol as a male contraceptive agent and in gynaecological disease. Drugs 38: 333-341

Wu DF, Y Y-w, Tang Z-m y Wang M-z. 1986. Pharmacokinetics of (±), (+)-and (-)-gossypol in human and dogs. Clin. Pharmacol. Ther. 39: 613-618

Xu D, Cai W-j, Zhu B-h, Dong C-j, Zheng Z-c y Gao Z-q. 1988. Clinical safety of long-term administration of gossypol in 32 cases. Contraception 37: 129-135

Zar JH. 1974. "Biostatistical Analysis". Englewood Cliffs, New Jersey: Prince-Hall, pp 228-235

Zhang G-y, Xiao B, Chen Z-w, Zhu J-c y Meng G-d. 1985. Dinamic study of serum gonadotropin and testosterone levels in gossypol treated men: Long term follow-up study of 60 cases. Int. J. Androl. 8: 177-185

