



## Inhibición del proceso de enquistamiento de *Entamoeba invadens* por *Castela texana*

CARMINA CALZADO FLORES\*, JULIA VERDE STAR\*,  
MARIO MORALES VALLARTA\*, JOSÉ JUAN SEGURA LUNA

La amibiasis es una enfermedad producida en los humanos por el parásito protozooario conocido como *Entamoeba histolytica*. Esta infección es una de las enfermedades parasitarias más frecuentes, ya que se estima que aproximadamente un 12% de la población mundial se encuentra afectada por ella.<sup>1,2</sup> El alto grado de incidencia es resultado de un pobre estado socioeconómico y sanitario de la población afectada.

Semejante a otros parásitos de vida libre, el ciclo de vida de *Entamoeba* se desarrolla a través de una alternancia de crecimiento trofozoítico y de la formación periódica de quistes. La forma móvil del parásito o trofozoíto, usualmente, habita como comensal en la luz del intestino grueso de los pacientes sin causar ningún daño, donde se multiplica y se diferencia a quiste, el cual es la forma resistente de este parásito y responsable de la transmisión de la infección. Hasta la fecha no se ha logrado, como con otras cepas amibianas, obtener la producción de quistes de *Entamoeba histolytica* en condiciones axénicas.<sup>3</sup>

Uno de los medicamentos más utilizados para el control de la amibiasis es el metronidazol; sin embargo, con el uso de este tratamiento se han aso-

ciado serios problemas neurológicos.<sup>4</sup> Además, un interés adicional surge ante la posibilidad de que la amiba pueda desarrollar resistencia hacia esta droga ya que esta propiedad ha sido reportada en otros parásitos protozoarios tales como las *Trichomonas vaginalis* y la *Giardia lamblia*.<sup>5</sup> Además, estudios recientes han demostrado que el metronidazol y la emetina resultaron inefectivos en el proceso de la diferenciación amibiana.<sup>6</sup>

La *Castela texana*, cuyo nombre común es "chaparro amargoso", es una planta que se ha empleado durante muchos años en la medicina herbolaria para el tratamiento de la disentería o diarrea de etiología amibiana. Algunos estudios han reportado que tanto la parte aérea como la raíz de esta planta poseen propiedades inhibitorias, tanto sobre el crecimiento de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* como en los de *Trichomonas vaginalis*,<sup>7</sup> y recientemente un estudio comparativo determinó que el extracto obtenido de esta planta fue capaz de inhibir el crecimiento de la *Entamoeba histolytica* de una manera similar a la observada con la emetina.<sup>8</sup>

\* Subdirección de Investigación, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Monterrey, N.L., México.

\*\* Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Monterrey, N.L., México

La búsqueda de principios activos aislados de productos que actúen sobre los procesos de enquistamiento y desenquistamiento de estos protozoarios contribuirá tanto en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la amibiasis, así como en la producción de nuevas estrategias, con la finalidad de controlar la diseminación de este parásito.

El objetivo de este estudio fue determinar el posible efecto inhibitorio producido por la *Castela texana* (raíz) sobre el proceso de diferenciación celular de enquistamiento de *Entamoeba invadens in vitro*.

## Materiales y métodos

Se utilizaron trofozoítos de la cepa IP-1 de *Entamoeba invadens*, los cuales, durante su crecimiento, se mantuvieron en tubos de vidrio pyrex de 16 x 125 mm con tapón de rosca, mismos que contenían 10 ml del medio de cultivo TYI-S-33 de Diamond,<sup>9</sup> suplemento con 15% de suero de bovino e incubados a 25°C. Semanalmente, y antes de alcanzar la fase de crecimiento estacionaria, los trofozoítos se sembraron a medio fresco.

### Obtención del material de la planta en estudio

La *Castela texana* se localizó 20 km al norte de la ciudad de Monterrey, Nuevo León, en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Se identificó con la ayuda de un botánico calificado y se colectó la raíz de la misma durante el mes de septiembre de 1997. Un ejemplar se depositó en el Herbario de la Facultad para su correcta identificación y marcaje, y el resto de la planta se llevó al Laboratorio de Biología Experimental del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN) del IMSS para su preparación y uso posterior.

El material de la planta se puso a secar al sol por una semana, una vez seco se trituró y molió por separado en un molino eléctrico. El material seco y molido se guardó en frascos oscuros, los cuales se rellenaron con algodón para disminuir el oxígeno y así evitar que se oxiden y evaporen los

metabolitos activos.

**Obtención de los extractos crudos.** El material de la planta, seco y molido, 300 g, se llevó a ebullición durante 20 min con 1.5 litros de agua bidestilada. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró a través de un lienzo de algodón y el extracto acuoso obtenido se llevó posteriormente a sequedad dentro de una liofilizadora para finalmente obtener 50 g de extracto acuoso. Para la obtención del extracto metanólico 1 kg del material fue extraído con metanol durante siete días a reflujo continuo en un equipo de extracción tipo soxhlet, concentrado en un rotaevaporador a presión reducida y, posteriormente, liofilizado para eliminar el resto del solvente y obtener así 70 g de extracto metanólico.

**Obtención de la chaparrina.** El extracto metanólico fue fraccionado posteriormente en una mezcla de diclorometano: agua (3:1, v:v) para obtener tres fracciones: acuosa, diclorometano y una fracción intermedia insoluble en ambos solventes. Esta última fracción se separó por cromatografía en columna líquida, empleando para ello solventes de menor a mayor polaridad. Se colectaron 110 fracciones de 25 ml cada una, las cuales después de llevarlas a sequedad se examinaron por cromatografía en capa delgada, utilizando una muestra estándar de chaparrina pura ( $r_f = 0.6$ ). La chaparrina se detectó en las fracciones extraídas con la mezcla de acetona: metanol (9:1) y se aisló como un polvo de color blanco (0.05 g),  $C_{20}H_{28}O_7$ , 305°C, PM = 380, IR = 1730, 1235  $cm^{-1}$ .

### Proceso de enquistamiento

El método se basó en el procedimiento reportado por el Dr. Mario Morales-Vallarta<sup>10</sup> para inducir la formación de quistes de *Entamoeba invadens*.

**Inhibición del proceso de enquistamiento.** Trofozoítos ( $35-40 \times 10^4/ml$ ) precondicionados durante 72 h con  $CO_2$  fueron transferidos a tubos pyrex de 18 x 150 mm, los cuales contenían 10 ml de cada uno de los extractos, fracciones o chaparrina a las diferentes concentraciones (0.1-10  $\mu g/ml$ ) preparadas con anterioridad en condiciones estériles, se aplicó nuevamente  $CO_2$  y se incubaron a 25°C. Pasa-

das 72 h el número de amibas (trofozoítos y quistes) se evaluó en un hemacitómetro y con estos resultados se calcularon los valores promedio y sus desviaciones estándar para cada una de las condiciones ensayadas. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 800 rpm durante 15 min a 4°C y a la pastilla resultante se le añadieron 4 ml de una solución detergente (tritón X-100, 0.25%) para destruir las membranas celulares; después de 20 min y de dos series del lavado con solución salina (PBS) estéril, los quistes resistentes resultantes se contaron nuevamente.

Finalmente, los quistes colectados de cada solución y concentración preparada con *Castela texana* para inducirles su diferenciación a la forma móvil o trofozoíto. Todas las pruebas fueron hechas por triplicado y de manera simultánea se manejó un cultivo control para la obtención de quistes.

## Resultados y discusión

Los efectos de los extractos, fracciones y de la chaparrina sobre el proceso de enquistamiento, se muestran en la tabla I. Los resultados se expresaron como el porcentaje relativo al enquistamiento observado en el cultivo control. Una solución se define como inhibitoria cuando su actividad es capaz de disminuir el enquistamiento amibiano en un 50 % o más en relación a los valores obtenidos con el cultivo control a las 72 hrs.

Todos los extractos, fracciones y el compuesto puro mostraron un alto efecto inhibitorio a las 72 hrs. sobre el proceso de enquistamiento a la máxima concentración probada (10 µg/ml). Sin embargo, es interesante hacer notar que la actividad inhibitoria se mantuvo hasta la concentración de 1 µg/ml, con excepción de la chaparrina. Además, los pocos quistes recuperados de las diferentes fracciones, extractos y del compuesto aislados de la *Castela texana* no fueron capaces de desenquistarse y producir trofozoítos nuevamente después de que se transfirieron al medio de crecimiento TYI-S-33. De manera contrastante los quistes aislados de los cultivos control produjeron abundantes trofozoítos después de cinco a siete días.

Estos resultados nos indican que ciertos extractos, fracciones y la chaparrina aislados de la *Castela*

*texana* poseen la actividad de inhibir el enquistamiento de *Entamoeba invadens in vitro*, y que este tipo de pruebas *in vitro* pueden ser de gran utilidad para la búsqueda de nuevos agentes antiamebianos a partir de productos de origen natural.

## Conclusiones

*Entamoeba invadens* posee la capacidad de enquistarse *in vitro*. La viabilidad de los quistes producidos en nuestros cultivos testigo se confirmó ya que éstos mostraron una pared refringente bajo la técnica microscópica de contraste de fases, fueron capaces de repeler el colorante vital azul de tripano y resistieron la acción del detergente tritón x-100.

Al someter a los trofozoítos de esta especie amibiana durante su proceso de diferenciación a la acción de cada uno de estos extractos, fracciones y de la chaparrina se observó que fueron capaces de inhibir el enquistamiento de los cultivos hasta una concentración de 1.0 µg/ml, con excepción de la chaparrina. Estos resultados son un aliciente para continuar con el estudio de *Castela texana* y llegar al reconocimiento de una nueva droga que sea útil en el tratamiento de la amibiasis, así como en la producción de nuevas estrategias para el buen control de la diseminación de este parásito. Además, los resultados obtenidos con la cepa IP-1 de *Entamoeba invadens* también podrían, probablemente, aplicarse a la especie de *Entamoeba histolytica*, ya que, como se sabe, esta última es una especie más sensible por lo que podría pensarse que con *Entamoeba histolytica* se podrían obtener resultados muy similares a los encontrados en este estudio.

## Resumen

El parásito conocido como *Entamoeba histolytica* es el agente causal de la amibiasis, la cual es la tercera enfermedad de origen parasitario a nivel mundial. Este parásito posee dos etapas principales en su ciclo de vida: el trofozoíto y el quiste. La amibiasis es tratada regularmente con metronidazol, pero serios efectos secundarios, tales como complicaciones de tipo neurológico, se han asociado con su uso. La *Castela texana* es una planta medicinal que se ha venido empleando desde hace muchos años en

México como tratamiento para la amibiasis. El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar el posible efecto inhibitorio de la *Castela texana* sobre el proceso de enquistamiento de *Entamoeba invadens* para tratar de evitar la principal forma de transmisión de la infección producida por este parásito.

**Palabras claves:** *Entamoeba invadens*, *Castela texana*, Enquistamiento.

### Abstract

The protozoan *Entamoeba histolytica* is the causal agent of amebiasis, the third most common parasitic disease worldwide. This parasite has two stages in its life cycle: trophozoite and cyst. Amebiasis is mainly treated with metronidazole. However, serious side effects such as neurological complications have been associated with this treatment. *Castela texana* has been used in Mexico as a treatment for human dysentery for many years. The aim of this study was to determine the possible inhibitory effect of *C. texana* in *E. invadens* encystation to avoid transmission of the infection.

**Keywords:** *Entamoeba invadens*, *Castela texana*, Encystation.

### Referencias

1. World Health Organization. Amoebiasis: Report of a WHO Expert Committee. W.H.O. Geneva, Tech. Rep. Ser. 1969. No. 421.
2. World Health Organization. Amoebiasis. Intestinal Protozoan and Helminthic Infections: Report of a W.H.O. Scientific Group. W.H.O., Geneva, Tech. Rep. Ser. 1981. No. 666.
3. Rengpien S., Bailey G.B. (1975). Differentiation of *Entamoeba*: a new medium and optimal conditions for axenic encystation of *E. invadens*. *J. Parasitol* 61:24-4.
4. Schaumburg H.H., Spencer P.S., Thomas P.K. (1983). Toxic neuropathy: Pharmaceutical agents. In *Disorders of peripheral nerves. Contemporary Neurology Series*. Philadelphia: FA Davis Company; p. 119-130.
5. Martínez-Palomo A., Ruiz-Palacios G. (1990). Amebiasis. In: *Tropical and Geographical Medicine* (K.S. Warren, A.F. Mahmoud, eds), McGraw-Hill, New York 327-344.
6. Segura J. J., Calzado-Flores C., González-Cisneros F. (1991). Inhibition of *E. invadens* cysts induced by the addition of rifampicin. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 34:369-372.
7. Calzado-Flores C., Guajardo-Touche E.M., Carranza-Rosales M.P., Segura-Luna J.J. (1998). In vitro anti-trichomonoc activity of *Castela texana*. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 41:173-174.
8. Calzado-Flores C. (1995). Cytotoxicity of Chaparrin from *Castela texana*. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 38:49-50.
9. Diamond L.S., Harlow D.R., Cunnick C.C. (1998). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoebas*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72:431.
10. Morales-Vallarta M. C., Segura-Luna J.J. In Vitro Inducción de cuerpos cromatoides en trofozoítos que crecen en fase-log y diferenciación de *Entamoeba invadens* por alta tensión de CO<sub>2</sub>. Aspectos en la formación de la pared del quiste. Tesis que para obtener el grado de doctor en ciencias que presentó el maestro Morales-Vallarta en el Depto. de Posgrado de la Fac. de Ciencias Biológicas de la UANL, en mayo de 1991.
11. Brandt H., Pérez-Tamayo R. (1970). Pathology of human amebiasis. *Hum. Pathol.* 351.
12. Gutiérrez G., Ludlow A., Espinoza G., Herrera S., Muñoz D., Rattoni N., Sepúlveda B. (1976). Encuesta Serológica Nacional. II Investigación de Anticuerpos contra *Entamoeba histolytica* en la República Mexicana. En: B Sepúlveda Y LS Diamond (eds). *Memorias de la Conferencia Internacional de Amibiasis*. IMSS, México, D.F.
13. Kagan I.G. (1976). Seroepidemiology of amebiasis. En. B. Sepúlveda, L.S. Diamond (eds). *Memorias de la Conferencia Internacional de Amibiasis*. IMSS, México D.F.
14. Ratcliffe H.L., Geiman Q.M. (1933). Eleven cases of amebiasis in reptiles. *J. Parasitol.* 20:139.

15. McConnachie E.W. (1969). The morphology, formation and development of cysts of Entamoeba. Parasitol. 59:41

Recibido: 24 de julio de 2005  
Aceptado: 19 de julio de 2006

Tabla I. Inhibición del proceso de enquistamiento de *Entamoeba invadens* producida por la *Castela texana*.

Solución [µg/ml]	Cél. totales (10 <sup>6</sup> )	Quistes (10 <sup>6</sup> )	Enquistamiento (%)	Inhibición del enquist. (%)
<b>Extracto acuoso</b>				
0.1	4.9±0.8	1.97±0.04	40.2	28.9
1.0	4.7±0.8	0.86±0.24	18.3	67.7
10.0	5.8±0.5	0.10±0.01	1.7	96.9
<b>Extracto metanólico</b>				
0.1	5.0±0.9	1.80±0.21	36.0	36.4
1.0	4.9±0.7	0.80±0.40	16.3	71.2
10.0	5.4±0.5	0.12±0.07	2.2	96.1
<b>Fracción acuosa</b>				
0.1	5.2±0.8	1.80±0.04	34.6	38.9
1.0	4.7±0.8	1.20±0.04	25.5	54.9
10.0	6.1±0.5	0.70±0.07	11.5	79.7
<b>Fase intermedia</b>				
0.1	4.6±0.3	1.60±0.20	34.6	38.9
1.0	4.4±1.0	0.92±0.14	20.9	63.0
10.0	4.2±0.9	0.1±0.02	2.4	95.7
<b>Fase diclorometano</b>				
0.1	5.6±0.4	1.7±0.31	30.3	46.5
1.0	3.8±0.2	1.0±0.20	26.3	53.5
10.0	6.5±0.5	0.07±0.02	1.1	98.0
<b>Chaparrina</b>				
0.1	5.5±0.5	2.3±0.37	41.8	26.1
1.0	5.3±0.6	1.9±0.23	35.8	36.7
10.0	5.0±0.7	0.81±0.01	16.2	71.4
<b>Control</b>	<b>6.0±0.7</b>	<b>3.40±0.40</b>	<b>56.6</b>	