

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA**  
*Castela texana* (Torr & Gray) Rose **EN LOS PROCESOS**  
**DE ENQUISTAMIENTO Y DESENQUISTAMIENTO**  
*DE Entamoeba in vitro.*

**T E S I S**

Presentada como requisito parcial para obtener el Grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Con especialidad en

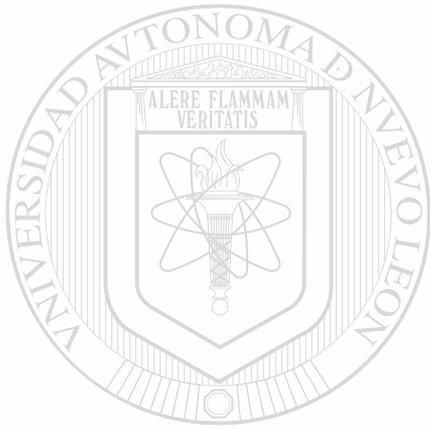
**PRODUCTOS NATURALES**

PRESENTA

**M.C. CARMINA CARLOTA CALZADO FLORES**

**MONTERREY, N. L.,**

**2001**



**M.C. CARMINA CARLOTA CALZADO FLORES**  
**TESIS DOCTORAL 2001**

U  
ANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

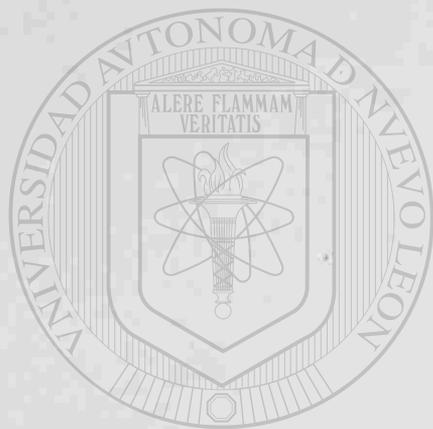
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

TD  
RC121  
.A5  
C35  
2001  
c.1



1080124500



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

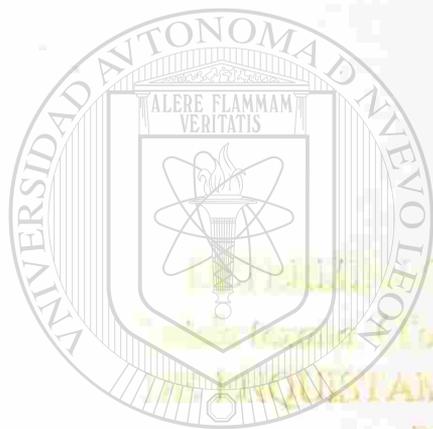
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FAACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



TRABAJOS DE LA ACADÉMIA DE LA  
CIENCIA (Four de Gray) Roux EN LOS PRODIGIOS  
DE ENRIQUESTAMIENTO Y DESENRIQUESTAMIENTO  
DE *Entamoeba in vitro*.

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Con especialidad en

PRODUCTOS NATURALES

PRESENTA

M.C. CARMINA CARLOTA CALZADO FLORES

LEONTERREY, N. L.

2001



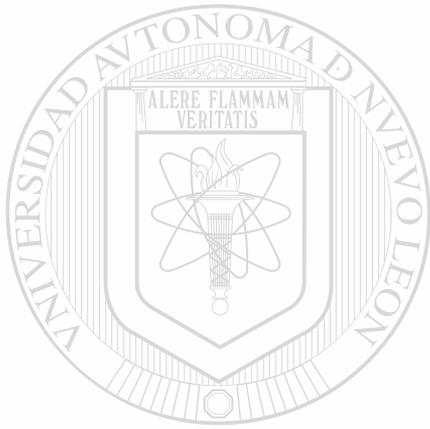
TD

121

AS

35

9 1



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA *Castela texana* (Torr & Gray) Rose EN  
LOS PROCESOS DE ENQUISTAMIENTO Y DESENQUISTAMIENTO DE *Entamoeba in vitro*.

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el Grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Con especialidad en  
**PRODUCTOS NATURALES**

Presenta:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

M.C. CARMINA CARLOTA CALZADO FLORES

COMISION DE TESIS:

DIRECTOR: *Maria Julia Verde Star*  
Dra. María Julia Verde Star

SECRETARIO: *Mario R. Morales Vallarta*  
Dr. Mario R. Morales Vallarta.

VOCAL: *Azucena Obanday Cárdenas*  
Dra. Azucena Obanday Cárdenas.



Este trabajo se realizó en los Laboratorios de Fitoquímica y de Biología Celular de la División de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) en la ciudad de Monterrey, N.L. y en el Laboratorio de Biología Experimental de la División de Farmacología del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Monterrey, N.L. México.

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**A MI MADRE:**

**Profra. Pura Flores vda. de Calzado**

**A MI ESPOSO:**

**Ing, Jaime González Rodríguez**

**A MIS HIJOS:**

**Jaime Rodolfo, Jessica y Luis Gerardo González Calzado**

**Quienes comparten conmigo el placer de la culminación de mis estudios de**

**Doctorado; con amor y cariño.**

**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**



**A MIS ASESORES:**

**Dra. Ma. Julia Verde-Star**

**Dr. Mario R. Morales-Vallarta**

**Dra. Azucena Oranday-Cárdenas**



**Por su dirección, apoyo y enseñanzas**

**Con aprecio y Gratitud.**

**UANL**

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS.**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



# INDICE DE CONTENIDO

<b>INDICE DE CONTENIDO</b> .....	<b>i</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE FOTOGRAFIAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	
<b>1.1. Amibiasis</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1.1. Distribución Global de la Amibiasis</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1.2. El Parásito</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1.3. Diferencias entre Cepas Amibianas</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1.4. Bases Biológicas de su Actividad Lítica</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1.5. Métodos de Diagnóstico</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1.6. Tratamiento</b> .....	<b>8</b>
<b>1.2. Medicina Tradicional</b> .....	<b>8</b>

## 2. ANTECEDENTES

<i>Castela texana</i> (Torr & Gray) Rose.....	12
2.1. Descripción Botánica.....	12
2.2. Clasificación Botánica.....	12
2.3. Especies Mexicanas Reconocidas.....	16
2.4. Actividad Biológica.....	16
2.5. Características Químicas.....	20

## 3. IMPORTANCIA.....22

## 4. ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN.....22

## 5. HIPÓTESIS.....23

## 6. OBJETIVOS.....23

6. 1. Objetivo General.....	23
6. 2. Objetivos Específicos.....	23

## 7. MATERIAL Y METODOS.

7. 1. Obtención del Material de la Planta en Estudio.....	24
7. 2. Pruebas Fitoquímicas con la <i>Castela texana</i> .....	24
7. 3. Extractos Aislados de la <i>Castela texana</i> .....	27
7. 4. Fraccionamiento del Extracto Metaabólico Activo.....	27
7. 5. Cromatografía en Columna Líquida.....	29
7. 6. Aislamiento de la Chaparrina.....	31

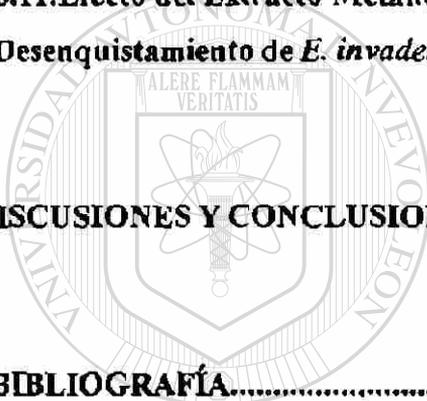
<b>7. 7. Cromatografía en Capa Delgada.....</b>	<b>31</b>
<b>7. 8. Material Biológico.....</b>	<b>32</b>
<b>7. 9. Preparación del Medio TYI-S-33.....</b>	<b>32</b>
<b>7. 10. Solución Salina para Lavado (PBS).....</b>	<b>33</b>
<b>7. 11. Colorante Vital Azul de Tripano al 0,5% en PBS.....</b>	<b>33</b>
<b>7.12. Solución Detergente Tritón X-100 al 25%.....</b>	<b>33</b>
<b>7. 13. Determinación del Número de Células.....</b>	<b>33</b>
<b>7. 14. Cinética de Crecimiento.....</b>	<b>34</b>
<b>7. 15. Inducción del Proceso de Enquistamiento.....</b>	<b>34</b>
<b>7. 16. Inducción del Proceso de Desenquistamiento.....</b>	<b>35</b>
<b>7. 17. Inhibición Producida por la <i>Castela texana</i> sobre los Procesos de Enquistamiento y/o Desenquistamiento Amibiano.....</b>	<b>36</b>
<b>7. 18. Concentración Óptima de la <i>Castela texana</i>.....</b>	<b>37</b>
<b>7.19. Actividad de la Chaparrina, Emetina y Tiuidazol sobre el Crecimiento de Trofozoítos <i>E. invadens</i>.....</b>	<b>38</b>
<b>7.20. Actividad de la Chaparrina y de la Rifampicina sobre el Proceso de Enquistamiento de <i>E. invadens</i>.....</b>	<b>38</b>
<b>7.21. Actividad del Extracto Metanólico y de la Chaparrina Aislados de la <i>Castela texana</i> sobre el Proceso de Desenquistamiento de <i>E. invadens</i>.....</b>	<b>39</b>

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## **8. RESULTADOS**

<b>8. 1. Cinética de Crecimiento de <i>E. invadens</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>8.2. Cinética de Enquistamiento de <i>E. invadens</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>8. 3. Desenquistamiento de <i>E. invadens</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>8.4. Estudio Fitoquímico de la <i>Castela texana</i>.....</b>	<b>48</b>
<b>8.5. Efecto Inhibitorio de los Extractos Acuoso y Metanólico Aislados de la Raíz de la <i>Castela texana</i> sobre el proceso de Enquistamiento de <i>E. invadens</i>.....</b>	<b>56</b>
<b>8. 6. Determinación de la Concentración Subletal del Extracto Metanólico Activo Aislado de la <i>Castela texana</i> sobre el Proceso de Crecimiento de <i>E. invadens</i>.....</b>	<b>59</b>

<b>8.7. Actividad Inhibitoria de las Fracciones Acuosa, Intermedia y Diclorometano Aisladas del Extracto Metanólico Activo de la <i>Castela texana</i> sobre el Proceso de Enquistamiento de <i>E. invadens</i>.....</b>	<b>63</b>
<b>8.8. Seguimiento de la Actividad Inhibitoria de la <i>Castela texana</i> la Chaparrina sobre el Proceso de Enquistamiento de <i>E. invadens</i>.....</b>	<b>65</b>
<b>8.9. Estudio Comparativo de la Actividad de la Chaparrina, Emetina y Tinidazol sobre Proceso de Crecimiento de Trofozoitos de <i>E. invadens</i>.....</b>	<b>67</b>
<b>8.10 Actividad de la Chaparrina y de la Rifampicina sobre el Proceso de Enquistamiento de <i>E. invadens</i>.....</b>	<b>70</b>
<b>8.11. Efecto del Extracto Metanólico y de la Chaparrina sobre el Proceso de Desenquistamiento de <i>E. invadens</i>.....</b>	<b>73</b>
<b>9. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>75</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>77</b>



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## LISTA DE FIGURAS

Figura No. 1 Cinética de Crecimiento de la cepa IP-1 de <i>Entamoeba invadens</i> .....	41
Figura No. 2 Cinética de Enquistamiento de la cepa IP-1 de <i>Entamoeba invadens</i> .....	43
Figura No. 3 Porcentaje de Quistes Producidos durante el Enquistamiento de la cepa IP-1 de <i>E. invadens</i> .....	46
Figura No. 4 Estructura Química de la Quitina.....	45
Figura No. 5 Distribución Geográfica de la <i>Castela texana</i> .....	13
Figura No. 6 Esqueleto de Compuestos de Tipo Simaroubolidano.....	26
Figura No. 7. Determinación de la Concentración Subletal del Extracto Metanólico aislado de la Raíz de la <i>Castela texana</i> sobre el crecimiento de los trofozoitos de <i>E. invadens</i> , cepa IP-1.....	60
Figura No. 8 Identificación de la Chaparrina.....	53
Figura No. 9 Espectro IR de la Chaparrina.....	54
Figura No. 10 Espectro RMN de la Chaparrina.....	55

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía No.1 Ciclo Vital de <i>Entamoeba invadens</i> , cepa IP-1.....	3
Fotografía No.2 Ciclo Infeccioso de la Amibiasis.....	4
Fotografía No. 3 Trofozoítos de <i>Entamoeba invadens</i> , cepa IP-1.....	41
Fotografía No.4 Población Amibiana de Trofozoítos y Quistes de <i>Entamoeba invadens</i> , cepa IP-1, .....	44
Fotografía No.4a Población Amibiana de Quistes de <i>Entamoeba invadens</i> , cepa IP-1.....	45
Fotografía No.5 <i>Castela texana</i> .....	14
Fotografía No.6 Flores de la <i>Castela texana</i> .....	15
Fotografía No.7 Frutos de la <i>Castela texana</i> .....	15
Fotografía No.8 Obtención de la Raíz de la <i>Castela texana</i> .....	25
Fotografía No.9 Raíz de la <i>Castela texana</i> Seca y Molida.....	25
Fotografía No.10 Extracción Metanólica de la Raíz de la <i>Castela texana</i> en un Extractor tipo Soxhlet.....	28
Fotografía No.11 Extracto Metanólico de la Raíz de <i>Castela texana</i> .....	28
Fotografía No.12 Concentrado del Extracto Metanólico de la <i>Castela texana</i> en un Equipo Rotaevaporador.....	28
Efecto del Extracto Metanólico Aislado de la Raíz de la <i>Castela texana</i> sobre el Crecimiento de Trofozoítos de <i>Entamoeba invadens</i> , cepa IP-1:	
Fotografía No.13 Grupo Testigo.....	62
Fotografía No.14 Extracto Metanólico [10 µg/ml].....	62
Efecto del Extracto Metanólico Aislado de la Raíz de la <i>Castela texana</i> sobre el Enquistamiento de Trofozoítos de <i>Entamoeba invadens</i> , cepa IP-1	
Fotografía No.15 Grupo Testigo.....	62
Fotografía No.16 Extracto Metanólico [10 µg/ml].....	62

Fotografía No.17 Fraccionamiento del Extracto Metanólico de la <i>Castela texana</i> en un Embudo de Separación.....	30
Fotografía No.18 Cromatografía Líquida en Columna de la Fase Intermedia Obtenida del Extracto Metanólico de la <i>Castela texana</i> .....	30
Fotografía No. 19 Fraccionnes Colectadas de la CCL .....	30
Actividad de la Chaparrina, Emetina y Tinidazol [10 mM] sobre el Crecimiento de <i>Entamoeba invadens</i> , Cepa IP-1:	
Fotografía No.20 Grupo Testigo.....	69
Fotografía No. 21 Chaparrina.....	69
Fotografía No.22 Emetina.....	69
Fotografía No.23 Tinidazol.....	69
Actividad de la Chaparrina y de la Rifampicina [10 mM] sobre el Proceso de Enquistamiento de <i>Entamoeba invadens</i> , Cepa IP-1:	
Fotografía No.24 Grupo Testigo.....	72
Fotografía No 25 Chaparrina.....	72
Fotografía No.26 Rifampicina.....	72
Proceso de Desenquistamiento de <i>Entamoeba invadens</i> , Cepa IP-1:	
Fotografía No.27 Grupo Testigo.....	74
Fotografía No. 28 Chaparrina [1 mM].....	74
Fotografía No.29 Extracto Metanólico [10 µg/ml].....	74

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## INDICE DE TABLAS

Tabla No. 1 Efecto Inhibitorio de los Extractos Acuoso y Metanólico (10-100 µg/ml) Aislados de la Raíz de la <i>Castela texana</i> sobre el Proceso de Enquistamiento de <i>E. invadens</i> .....	57
Tabla No. 2 Efecto Inhibitorio de los Extractos Acuoso y Metanólico ( 0.1-1.0 µg/ml) Aislados de la Raíz de la <i>Castela texana</i> sobre el Proceso de Enquistamiento de <i>E. invadens</i> .....	58
Tabla No. 3 Efecto del Extracto Metanólico de la <i>Castela texana</i> sobre:	
a) El Proceso de Crecimiento de <i>E. invadens</i> , cepa IP-1.....	61
b) El Proceso de Enquistamiento de <i>E. invadens</i> , cepa IP-1.....	61
Tabla No 4 Cromatografía en Capa Delgada y Pruebas Colorimétricas Realizadas al Extracto Metanólico Aislado de la Raíz de la <i>Castela texana</i> .....	49
Tabla No 5 Actividad de las Fracciones Acuosa, Intermedia y Diclorometano Aisladas a partir del Extracto Metanólico Obtenido de la <i>Castela texana</i> sobre el Proceso de Enquistamiento de <i>E. invadens</i> .....	64
Tabla No 6 Secuencia Cromatográfica de las Fracciones Colectadas de la Cromatografía en Columna Líquida (CCL) realizada a la Fase Intermedia Aislada del Extracto Metanólico de la <i>Castela texana</i> .....	51
Tabla No 7 Cernimiento de la Actividad de la <i>Castela texana</i> sobre el Proceso de Enquistamiento de <i>E. invadens</i> , cepa IP-1.....	66
Tabla No 8. Actividad de la Chaparrina, Emetina y Tinidazol sobre el Crecimiento de <i>Entamoeba invadens</i> , cepa IP-1.....	68
Tabla No 9 Actividad de a Chaparrina y Rifampicina sobre el Proceso de Enquistamiento de <i>Entamoeba invadens</i> , cepa IP-1.....	71

## ABREVIATURAS

ccd.....	cromatografía en capa delgada
ccl.....	cromatografía en columna líquida
<i>C. texana</i> .....	<i>Castela texana</i>
cél.....	célula
cm.....	centímetr
o	
CIBIN.....	Centro de Investigación Biomédica del Noreste
CI <sub>50</sub> .....	Concentración inhibitoria 50
col.....	Colaboradores
X.....	concentración con respecto a la solución de trabajo
d.....	días
DNA.....	ácido deoxiribonucleico
<i>E. histolytica</i> .....	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>E. invadens</i> .....	<i>Entamoeba invadens</i>
Fig.....	figura
Foto.....	fotografía
°C.....	grados centígrados
g.....	gramo
h.....	hora
IMSS.....	Instituto Mexicano del Seguro Social
IR.....	espectro infrarrojo
KB.....	carcinoma nasofaríngeo humano
Kg.....	kilogramo
L.....	litro
m.....	metro
µm.....	micrómetro
mg.....	miligramo
mm.....	milímetro
ml.....	mililitro
mM.....	milimolar
min.....	minuto
PBS.....	solución salina balanceada
pH.....	potencial de hidrógeno
%.....	por ciento
pf.....	punto de fusión
PS.....	leucemia linfocítica P-388 en ratón
RF.....	relación de frentes
RMN.....	espectro de resonancia magnética nuclear
rpm.....	revoluciones por minuto
SNC.....	sistema nervioso central
UV.....	espectro ultravioleta
v/v.....	relación volumen/volumen

## RESUMEN

La amibiasis representa un grave problema de salud pública en México y otros países en desarrollo. Esta enfermedad cuyo agente causal es el protozoo conocido como *Entamoeba histolytica*, es típica de países de clima tropical, sin embargo, la disentería amibiana es bastante ubicua y se le puede localizar también en regiones templadas; aunque se manifiesta con mayor frecuencia y con cuadros clínicos más severos en países tropicales y subtropicales con bajo nivel económico en donde la sanidad ambiental y la alimentación son deficientes (Brandt y Pérez-Tamayo, 1970; Gutiérrez y col. 1976; Kagan, 1976 y WHO, 1969).

Semejante a otros protozoarios de vida libre, el ciclo de vida de *Entamoeba* muestra dos etapas de desarrollo principales: el trofozoito o fase vegetativa el cual es capaz de producir lesiones en el intestino del hospedero, y el quiste o fase resistente responsable de la propagación del parásito y de la infección en nuevos hospederos. Esta enfermedad generalmente se transmite por la llegada de los quistes al huésped, estos posteriormente, bajo condiciones favorables se desenquistan dando origen a los trofozoitos, responsables de las lesiones tisulares durante el curso de la enfermedad.

Aunque la terapéutica actual cuenta con diversos medicamentos para combatir esta enfermedad, ninguno está exento de producir efectos tóxicos indeseables en el humano, por lo tanto, se debe de continuar con la búsqueda de nuevos agentes amebicidas, de menor toxicidad y con igual o mayor potencia que los ya existentes.

La *Castela texana* es una planta que se ha empleado durante muchos años en Medicina Tradicional para el tratamiento de la disentería o diarrea de etiología amibiana. Estudios de finales del siglo XIX reportan el uso de infusiones preparadas con esta planta para combatir problemas de diarreas y disenterías de tipo amibiano. Además, recientemente se ha observado que también es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de trofozoitos de la cepa HM1:IMSS de *E. histolytica* mantenidos en cultivo axénico y no produce efectos tóxicos sobre los cultivos *in vitro* de fibroblastos humanos, cepa MRC-5 (células diploides).

El objetivo principal de este trabajo fue aislar e identificar extractos, fracciones y compuestos de esta planta y, estudiar su posible efecto inhibitorio sobre los procesos de enquistamiento y/o desenquistamiento de *Entamoeba invadens*. Esta especie amibiana se ha utilizado como modelo para el estudio de los procesos de diferenciación de *Entamoeba*, particularmente de *Entamoeba histolytica* ya que existen reportes de que los quistes de ambas especies son extraordinariamente semejantes en morfología y patogenicidad de tal manera que la descripción de estos o de alguno de otros procesos en una especie puede ser aplicado a la otra (Rattcliffe y Geiman (1933) y McConnell (1969)).

La búsqueda de principios activos aislados de productos naturales que actúen sobre los procesos de enquistamiento y/o 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.

# 1. INTRODUCCIÓN

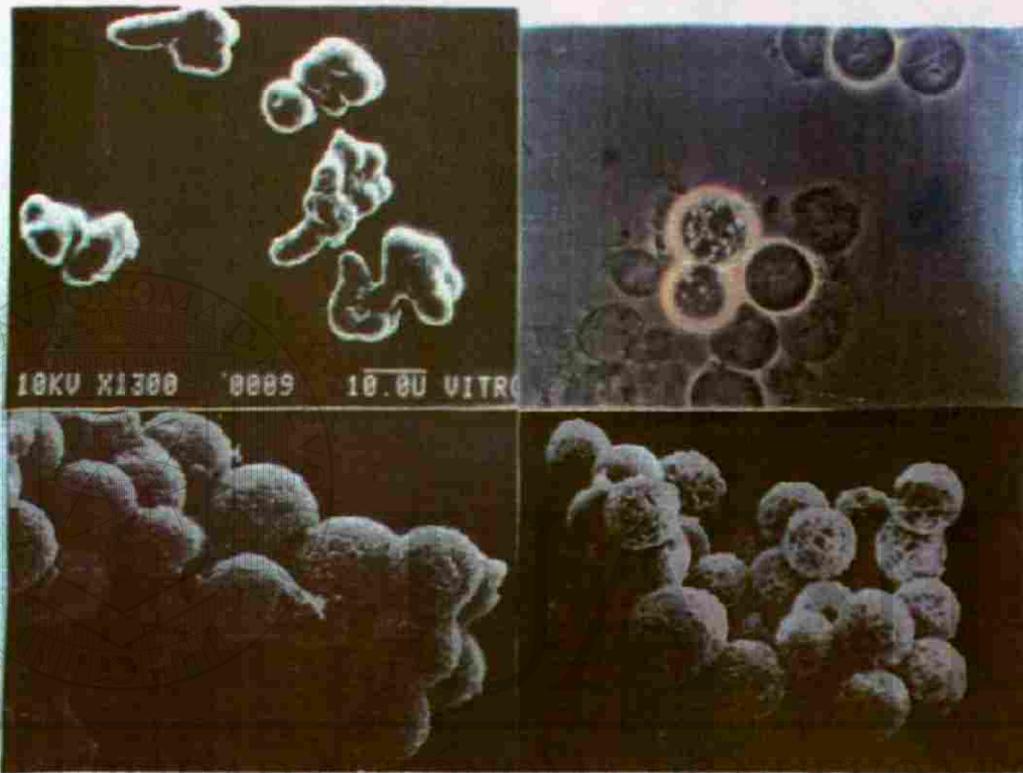
## 1.1. Amibiasis.

La amibiasis es una enfermedad producida en los humanos por el protozoo parásito conocido como *Entamoeba histolytica*. Esta infección es una de las enfermedades parasitarias más frecuentes ya que se estima que aproximadamente un 10% de la población mundial se encuentra afectada por ella (WHO, 1969,81). Este alto grado de incidencia es el resultado de un pobre estado socioeconómico y sanitario de la población afectada lo cual, ha sido comprobado mediante un estudio serológico que compara la prevalencia de la amibiasis entre países de diferentes status socioeconómicos. Así también los altos niveles de seropositividad entre la población general de la ciudad de México correlacionaron positivamente con varios de los indicadores de pobreza como son: hacinamiento, ignorancia, falta de agua corriente, y el uso de métodos inadecuados para el deshecho de los excrementos humanos (Gutiérrez y col, 1976).

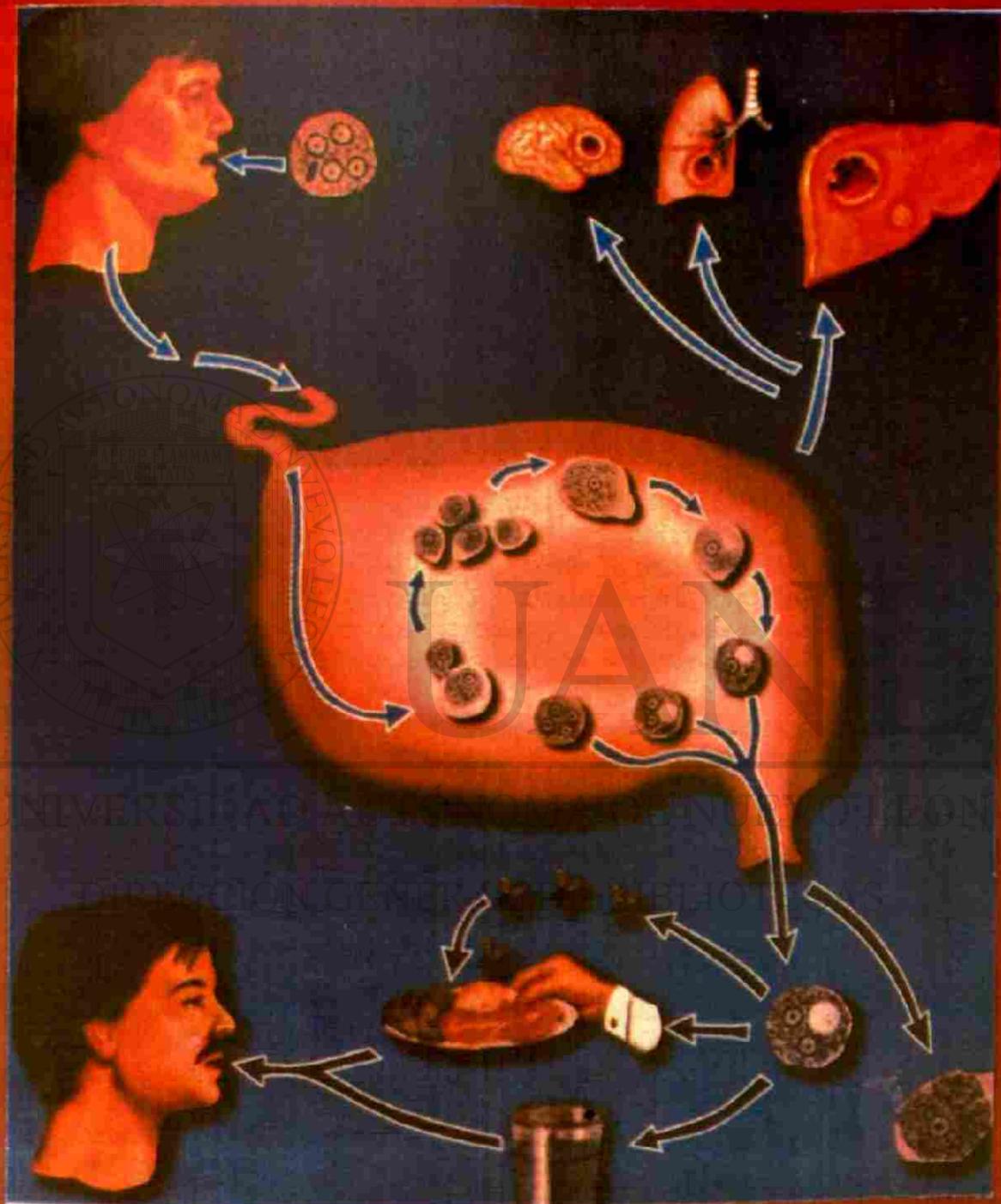
Semejante a otros parásitos de vida libre, el ciclo de vida de *Entamoeba* se desarrolla a través de una alternancia de crecimiento trofozoítico y de la formación periódica de quistes (Foto 1). La forma móvil del parásito o trofozoito usualmente habita como comensal en la luz del intestino grueso de los pacientes sin causar ningún daño donde se multiplica y se diferencia a quiste, la forma resistente y responsable de la transmisión de la infección. El estudio del trofozoito normalmente está encaminado hacia el conocimiento de la patogénesis y es donde existe mayor información al respecto. El quiste sin embargo, aún siendo la forma infecciosa, ha sido relativamente menos estudiado, así como el proceso mismo del enquistamiento, el cual, implica una serie de complejos cambios morfológicos y bioquímicos poco conocidos.

En la mayoría de los casos, principalmente en los países desarrollados, la conocida amibiasis luminal producida por *E. histolytica* no produce síntomas, en cambio, en los países subdesarrollados, el parásito puede actuar como patógeno y ser la causa de la amibiasis invasora. Los síntomas más comunes de la infección sintomática son la disentería la cual ocurre cuando las cepas virulentas invaden la mucosa intestinal y las lesiones extraintestinales principalmente el absceso hepático, el cual ocurre cuando los trofozoitos alcanzan el torrente sanguíneo. Este último puede llegar a ser fatal a menos que se diagnostique con prontitud y sea tratado correctamente (Sepúlveda y Martínez-Palomo, 1984).

La manera más común de la transmisión de este parásito es la ingestión de alimentos o de agua contaminada con quistes. Los individuos portadores de quistes son la principal fuente de infección y con mayor razón si son los encargados de la preparación de alimentos. Los quistes permanecen vivos en las heces y con capacidad infectiva hasta por varios días llegando a sobrevivir en el suelo por aproximadamente 8 días a 34-38 °C y por más de un mes a 10 °C. También pueden permanecer infectivos en agua fresca, agua de mar, aguas negras y en el suelo húmedo. Pueden removerse del agua por filtración pero no son destruidos por la concentración de cloro añadida ordinariamente para purificar el agua (Foto 2).



FOTOGRAFIA No.1 CICLO VITAL DE Entamoeba invadens, CEPA IP-1. ®  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



FOTOGRAFIA No. 2 — CICLO INFECTIVO DE LA AMIBIASIS.

### 1. 1. 1. Distribución Global de la Amibiasis:

Aunque estudios relacionados con la distribución mundial de la amibiasis estiman que solo una pequeña fracción del número total de individuos infectados poseen la amibiasis de tipo invasora, ya sea esta de tipo intestinal o extraintestinal, en los países donde la forma invasora representa un problema de salud pública un elevado porcentaje de los individuos que presentan esta infección muestran evidencias clínicas de la enfermedad. Aún en zonas de clima templado donde la sociedad generalmente es de nivel socioeconómico próspero y donde el número de casos de amibiasis invasora es muy bajo, es muy importante que el médico se encuentre familiarizado con esta enfermedad ya que un fracaso en el diagnóstico, por ejemplo llegar a confundirla con una colitis ulcerosa, podría llegar a producir un desenlace fatal.

La forma más común de la transmisión de esta enfermedad se produce por ingerir comida contaminada con quistes o por la transmisión fecal-oral de persona a persona. El riesgo mayor se encuentra con los portadores asintomáticos que de alguna manera están relacionados con la preparación y el manejo de los alimentos. La amibiasis puede ser también considerada como una enfermedad de transmisión sexual, especialmente entre individuos homosexuales y, en años recientes la amibiasis de tipo luminal ha alcanzado niveles hiperendémicos en ciertas poblaciones urbanas homosexuales.

En África, Asia y América Latina la amibiasis invasora representa un fuerte problema de salud ya que en estos países se combinan varios factores como son: condiciones sanitarias inadecuadas, una alta incidencia de cepas virulentas de *E. histolytica* y el uso de pruebas de baja confiabilidad para un buen diagnóstico lo cual se traduce en una elevada incidencia de infecciones de tipo sintomático de esta enfermedad. Así la proporción de la población mundial infectada con amibas parece continuar siendo la misma, sin embargo, como resultado del crecimiento de la población, la prevalencia de la infección se ha incrementado (Walsh 1986<sup>b</sup>) y estimaciones realizadas por este autor (1986<sup>a, b</sup>) sugieren que en 1984 probablemente 500 millones de personas se encontraban infectadas con el parásito y de estas, 38 millones llegaron a desarrollar una colitis de tipo incapacitante o un absceso hepático. Además de estas, aproximadamente de 40,000–100,000 muertes fueron atribuidas a la amibiasis y en escala global, la amibiasis probablemente sea la tercera causa de muerte producida por un protozoario parásito inmediatamente debajo de la malaria y la cistosomiasis.

### 1.1. 2. El Parásito:

*E. histolytica* es uno de los eucariotes más primitivo. El movimiento o actividad de los trofozoítos se basa en un simple arreglo de su citoplasma, el cual carece de los organelos encontrados en la mayoría de los eucariotes como serían: un citoesqueleto estructurado, microtúbulos citoplasmáticos, un sistema de membrana equivalente al complejo de Golgi y el retículo citoplásmico presente en los eucariotes superiores, mitocondrias y un sistema primario y secundario de lisosomas (McLaughlin y Aley, 1985; Martínez-Palomo, 1982, 1986). Pero, este pequeño (10–40 µm), frágil y sensible (temperatura) protozoario, es capaz de colonizar el intestino grueso de un gran porcentaje de nuestra población mundial. Y además, bajo circunstancias aún desconocidas puede invadir la cubierta del intestino y llegar eventualmente a destruir cualquier tejido del cuerpo humano, evadiendo simultáneamente la respuesta inmune del individuo hospedero. A menos que se reprima este parásito con un tratamiento adecuado, la amibiasis invasora puede continuar con su actividad destructiva hasta causar la muerte del hospedero.

El ciclo de vida de *E. histolytica* consiste de tres estados consecutivos: el trofozoíto, el quiste y el metaquiste. Los trofozoítos residen en el colon donde se multiplican por fisión binaria y se enquistan llegando a producir después de dos divisiones nucleares sucesivas quistes tetranucleados típicos. Pero no se conocen los detalles acerca de los mecanismos implicados en la división nuclear y en la determinación del número de cromosomas. Los quistes son localizados en las heces de individuos portadores como cuerpos hialinos de 8-20  $\mu\text{m}$  de diámetro, con una pared rígida formada probablemente por quitina (Fig. 4) y glicoproteínas, la cual, protege a la amiba fuera del cuerpo humano. Los quistes no se desarrollan dentro de los tejidos.

Los trofozoítos no son importantes en la transmisión de la enfermedad, ya que en el medio ambiente externo solo viven por muy poco tiempo y no sobreviven a la exposición de ácido clorhídrico ni a la de las enzimas digestivas que se encuentran en el tracto gastrointestinal.

Algunos de los problemas que han obstaculizado el entendimiento de la biología del parásito son: la aparente simplicidad de la organización estructural de su citoplasma lo cual deja casi sin utilidad la gran cantidad de información respecto a la biología celular de otros eucariotes más desarrollados; la presencia de numerosas y potentes proteasas y nucleasas; la fragilidad de las amibas, lo cual obstaculiza su manipulación; la extrema sensibilidad de los cultivos axénicos a pequeñas variaciones en los componentes del medio de cultivo y la falta de un medio de cultivo que promueva el enquistamiento de amibas axénicas.

La composición lipídica de su membrana es inusual (Cerbón y Flores, 1981) ya que al menos una docena de glicoproteínas han sido encontradas después de purificar sus membranas plasmáticas (Aley y col. 1980). Los anticuerpos que interactúan con los antígenos de la superficie producen una movilización notable de los complejos hacia el uroide (Pinto da Silva y col., 1975). Este fenómeno así también como la resistencia al complemento (Calderón y Tovar, 1986; Reed y col., 1986) y el encubrimiento con las proteínas del hospedero, representan la hipótesis de cómo este parásito evade la respuesta humoral del mismo. (Trissl, 1982; Krestchmer, 1986).

Todo lo anterior trae como consecuencia, que actualmente aún no se conozcan con certeza las bases celulares y moleculares de procesos fundamentales como son: la diferenciación de los trofozoítos a quistes y los mecanismos de evasión de respuesta inmune del hospedero que hacen que un comensal inocuo se transforme en un invasor dañino. Por todo esto, es clara la necesidad de estudios de investigación acerca de la biología del parásito para tratar de controlar su propagación.

### **1.1. 3. Diferencias entre Cepas Amibianas:**

Dos aspectos que nos dejan perplejos acerca de la biología de *E. histolytica* son la expresión variable de su potencial patogénico y la restricción general de la amibiasis invasora a ciertas áreas geográficas (aunque los brotes endémicos pueden ocurrir en cualquier lugar) a pesar de la distribución mundial del parásito (Sepúlveda y Martínez-Palomo, 1984; Martínez-Palomo, 1987).

Un mayor avance acerca del entendimiento de la amibiasis ha sido la demostración de consistentes diferencias bioquímicas entre las cepas patógenas y las no-patógenas de *E. histolytica*. Primeramente se mostró que las cepas no-patógenas difieren de las patógenas (aisladas de amibiasis invasora) en ciertas propiedades de superficie, esto refuerza la hipótesis de Brumpt en 1925, quién

estableció que una especie de amiba era la responsable de la amibiasis luminal y que en cambio la amibiasis invasora era causada por otra amiba morfológicamente similar pero de diferente especie.

Las diferencias iniciales marcan que las cepas patógenas presentan una alta susceptibilidad para aglutinarse en presencia de concanavalina-A (Martínez-Palomo y col., 1973), falta de carga superficial negativa a pH neutro (Trissl y col., 1977), alta capacidad eritrofagocítica (Trissl y col., 1978) y, habilidad para destruir monocapas de células epiteliales en cultivo.

La diversidad entre las cepas patógenas y no-patógenas de *Entamoeba* se ha reforzado con los resultados obtenidos a partir de los estudios realizados por Sargeant y col. (1982) con marcadores metabólicos. Después de aplicar esta técnica de isoenzimas a aislados de amibas obtenidos de varios continentes se demostró que los parásitos obtenidos de casos de amibiasis invasora bien caracterizada se pueden agrupar en 8 o más diferentes patrones los cuales, se distinguen por la presencia de una banda  $\beta$  y la ausencia de una banda  $\alpha$  en la enzima de fosfoglucomutasa y por la presencia de bandas de rápido corrimiento en la hexoquinasa. Todos los zimodemos restantes se encontraron en probables individuos portadores. Y como era de esperarse, los patrones patogénicos de las isoenzimas fueron encontrados también en algunos aislados de pacientes portadores de quistes asintomáticos (Meza y col. 1986).

Así, la hipótesis acerca de que las cepas patógenas son distintas de las no-patógenas, parecía ser razonable pero posteriormente surgieron observaciones que muestran, que al menos en condiciones *in vitro* los patrones de las isoenzimas no permanecen estables. Se ha demostrado que la axenización de una cepa que posee un patrón de isoenzima no-patógena conduce además de su adquisición de virulencia, a la reversión del zimodemo no-patógeno a otro patógeno. Esta inversión pudo encontrarse también en cepas patógenas en cultivo con ciertas bacterias las cuales se observó que pueden cambiar a un patrón iso-enzimático no-patógeno (Mirelman y col, 1986<sup>a, b</sup>).

Inicialmente podría pensarse que esto era debido a la presencia de poblaciones de tipo heterogéneo, pero después de proceder a realizar el clonaje de ambos tipos de cepas (patógenas y no-patógenas), se obtuvieron los mismos resultados con los cultivos de clonas.

#### 1.1. 4. Bases Biológicas de su Actividad Lítica.

A pesar de que se han realizado muchos intentos para tratar de identificar la causa o factor responsable de la actividad lítica o destructora de tejidos de las amibas, hasta la fecha esta actividad no ha podido ser atribuida a una simple proteína, toxina, enzima, organelo o función celular. Así, la notable actividad lítica del parásito parece ser el resultado de la combinación de varias causas o factores que implican: la liberación de toxinas, enzimas, la actividad móvil del parásito, actividad fagocítica ávida y una maquinaria citoplasmática eficiente que rápidamente degrada los componentes celulares digeridos tanto celulares como extracelulares (Martínez-Palomo, 1986).

A la fecha la participación de los mecanismos inmunológicos en la patogénesis de la amibiasis invasora no han sido totalmente aclarados, ya que en el humano los anticuerpos antiambianos circulantes son de interés solo para el diagnóstico y para su consideración epidemiológica y parece ser que en el control de las infecciones invasoras establecidas no son de gran importancia.

### **1.1.5. Métodos de Diagnóstico.**

Una de las principales prioridades de estudio y que a la fecha ha recibido poca importancia es: el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico para la amibiasis que resulten simples y confiables.

El diagnóstico de la amibiasis intestinal recae solo en la simple identificación de quistes en las heces de los pacientes, y, este procedimiento no es muy confiable ya que además de que toma mucho tiempo está lleno de resultados falsos positivos y falsos negativos. Por esta razón se deben de fomentar el uso de nuevos métodos biotecnológicos que empleen anticuerpos monoclonales o la extracción e identificación del DNA para la correcta detección de la enfermedad.

### **1.1.6. Tratamiento:**

Los amebicidas han contribuido grandemente a disminuir la morbilidad y la mortalidad causada por la amibiasis.

Las drogas antiamebianas se pueden clasificar en tres grupos: amebicidas lumbales, amebicidas tisulares y amebicidas mixtos. Los amebicidas con actividad luminal más frecuentemente utilizados en la clínica son las dihidrohidroxiquinoleínas y el furoato de diloxanida.

Los amebicidas efectivos en amibiasis de tipo tisular: son la emetina hidrociorada y la dehidroemetina, los cuales actúan sobre el hígado, pared intestinal y de otros tejidos. Actualmente se cuenta también con la cloroquina la cual, se ha comprobado que solo actúa sobre infecciones amebianas localizadas en el hígado. Pero existen algunos reportes acerca de que la emetina y la dehidroemetina pueden llegar a resultar tóxicas para el músculo cardíaco.

El metromidazol, el nitroimidazol y sus derivados, el secnidazol, el nimorazol y el timidazol son amebicidas que resultan efectivos tanto a nivel tisular como luminal. Estos amebicidas además de la ventaja de ser activos en ambos sitios y de que la ruta de su administración es la vía oral son terapéuticamente efectivos. Generalmente hay buena tolerancia a ellos, pero existe la inconveniencia de algunos estudios que muestran que su uso es capaz de producir efecto carcinogénico en roedores y otros que indican que son potencialmente mutagénicos en bacterias. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### **1.2. Medicina Tradicional.**

La herbolaria se ha utilizado desde los albores de la humanidad. El conocimiento de las plantas medicinales forma parte de la cultura de cada etnia y región. Cuando las plantas son seleccionadas al azar para cualquier tipo de estudio la probabilidad de encontrar actividad biológica disminuye en comparación de cuando se seleccionan sobre la base de su uso etnobotánico (uso de las mismas por varias culturas (Huxtable 1992).

La tradición señala la identificación de las especies útiles, su recolección, procesamiento y almacenaje, así como las indicaciones terapéuticas, contraindicaciones y efectos secundarios. Aunque el desarrollo de este tipo de terapia no ha seguido el método científico debemos de reconocer que se ha basado en la observación acuciosa de los fenómenos y constituye en muchos casos ejemplo del empirismo exitoso.

Por otra parte debemos recordar que los antecesores de la medicina moderna como Hipócrates, Galeno, Avicena y Maimonides utilizaron con frecuencia este tipo de preparaciones herbales en diversas terapias. De hecho antes del desarrollo de la química farmacéutica era común el empleo de terapias herbales dentro de la medicina alopática ortodoxa.

Sin embargo, los remedios de origen vegetal fueron cayendo en el desuso por la medicina alopática por varias razones, entre otras podemos señalar: la identificación de las plantas no siempre era cuidadosa y en ocasiones se recolectaban especies sin propiedades terapéuticas, los preparados difícilmente se podían estandarizar por lo que había grandes variaciones en sus contenidos y efectos terapéuticos, y además no se contaba con estudios controlados que avalaran su seguridad y eficacia.

En años recientes se ha originado un regreso a la fitoterapia en este continente como también en el europeo por todo esto, ante la necesidad de nuevos enfoques médicos para trastornos o enfermedades en los que estos productos ofrecen eficacia, con efectos secundarios prácticamente nulos.

Estos nuevos desarrollos de fitoterapia se han centrado en resolver los puntos débiles de las terapias herbales tradicionales, seleccionando las especies y subespecies de plantas con propiedades terapéuticas y se les ha cultivado en condiciones controladas, se han desarrollado avanzados métodos de extracción, procesamiento y estandarización que permiten contar con lotes equivalentes del producto con efectos terapéuticos constantes y reproducibles y la seguridad y eficacia de estas nuevas formas de fitoterapia se han demostrado en estudios clínicos controlados en instituciones prestigiosas.

Por lo tanto la nueva fitoterapia combina la seguridad y el efecto terapéutico adecuado de las medicaciones herbales con el rigor del método científico de los estudios clínicos y de los estándares de la manufactura de los medicamentos.

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

## 2. ANTECEDENTES

La amibiasis es una enfermedad originada por el protozoo parásito *Entamoeba histolytica*. Semajante a otros parásitos de vida libre, el ciclo de vida de *Entamoeba* (Foto. 7) se desarrolla a través de una alternancia de crecimiento trofozoítico y de la formación periódica de quistes (Vázquezdelara-Cisneros, 1984 y Avron, 1986). El conocimiento acerca del ciclo de vida de este parásito requiere del estudio de su estado trofozoítico, del quiste, del proceso de enquistamiento o diferenciación celular de trofozoito a quiste y del de desenquistamiento. El estudio del trofozoito normalmente está encaminado hacia el conocimiento de la patogénesis del parásito y es donde existe mayor información al respecto. El quiste, sin embargo aún siendo la forma infecciosa, ha sido relativamente menos estudiado, así como el proceso mismo del enquistamiento, el cual implica una serie de complejos cambios morfológicos y bioquímicos poco conocidos.

El estudio de las amibas del género *Entamoeba* resulta especialmente importante porque incluye especies parásitas para el hombre y algunos animales. Las dos especies más conocidas y estudiadas son: la parásita para el humano (*Entamoeba histolytica*, Schaudinn 1903) y la parásita para reptiles (*Entamoeba invadens*, Rodhain 1934).

Una enfermedad en los reptiles con gran parecido a la amibiasis en el hombre fue descrita en 1933 por Ratcliffe y col. y asociada directamente con *Entamoeba*. Tres años más tarde se estableció que el parásito aislado de los reptiles era muy similar a *Entamoeba histolytica* tanto en la morfología del trofozoito y del quiste como en sus procesos de diferenciación, desenquistamiento y en sus cambios metaquísticos (Geiman, 1936).

Anteriormente la mayor parte de los estudios realizados sobre el enquistamiento *in vitro* de *E. histolytica* se realizaban en cultivos mixtos o poliaxénicos, debido principalmente a la falta de un medio de cultivo que permitiera el mantenimiento del protozoo libre de otros microorganismos (McConnachie, 1969, Rees, 1941 y Snyder, 1941). Con los reportes del Dr. Diamond en 1968 donde dio a conocer la formulación del medio TP-S-1 para la cultivación axénica de este protozoo y diez años después la del medio TYI-S-33, este autor proporcionó las condiciones favorables para realizar estudios bioquímicos y fisiológicos de este protozoo y otras especies de *Entamoeba in vitro* en condiciones axénicas.

Desde que se desarrollaron los cultivos axénicos para diferentes especies de *Entamoeba* solo las cepas IP-1 y PZ de *Entamoeba invadens* se han logrado enquistar. Rengpien y Bailey en 1975 describieron un medio axénico para el enquistamiento masivo de estas cepas, éste consiste de un medio hipotónico carente de glucosa y panmede, con el cual aparecen los primeros quistes después, de 30-48 h luego de que trofozoitos de *E. invadens* de la cepa IP-1 mantenidos axénicamente son transferidos a este medio en fase de crecimiento logarítmico, produciéndose un enquistamiento de aproximadamente 70 %. El enquistamiento de la cepa PZ de esta especie de *Entamoeba* ocurre de una manera similar pero con menor reproducibilidad y sin embargo, *E. histolytica* no se logró enquistar mediante el proceso descrito por estos autores.

Posteriormente Das y col. en 1980 publicaron un método de enquistamiento axénico para la especie *E. invadens* cepa IP-1 el cual consiste en un medio hipotónico salino y sin nutrientes orgánicos.

El medio presentado por estos autores contiene diferentes sales de cloruro: cloruro de magnesio (30 mM), cloruro de calcio (30 mM) y cloruro de sodio (45 mM) las cuales inducen el enquistamiento a una temperatura menor a la utilizada en el mantenimiento de esta especie.

Martínez-Palomo y Arroyo-Begovich en 1978 observaron mediante estudios de microscopía que el enquistamiento de *E. invadens* se produce solo si el trofozoito conservaba su forma alargada y natural, ese mismo año, Chávez, Martínez-Palomo y De la Torre (1978) reportaron algunas similitudes estructurales entre las paredes de quistes de diferentes especies de *Entamoeba*: *E. invadens* (aislada de reptiles), *E. histolytica* y *E. coli* obtenidos de portadores asintomáticos después de realizar estudios de estructura ultramicroscópica de la pared de quistes de estas especies amebianas.

Cuatro años más tarde Arroyo-Begovich y Caravez-Trejo (1978) mediante estudios citoquímicos y de difracción de rayos X con trazadores coloidales de oro demostraron que la pared de los quistes de *E. invadens* están constituidas por un polisacárido cristalino denominado quitina (Fig. 4).

En 1984 Vázquezdelara-Cisneros y Arroyo Begovich reportaron otro procedimiento para inducir el enquistamiento axénico de *E. invadens* cepa IP-1 al eliminar la glucosa del medio de crecimiento TYI-S-33. También observaron que las vitaminas adicionadas en el suero de bovino empleado en la formulación de este medio, no son indispensables para obtener los mismos resultados. En este estudio determinaron que el tiempo que se requiere para que se inicie el enquistamiento es dependiente de la densidad del número de células o amebas inoculadas, así un inóculo de  $1 \times 10^5$  cél/ml requiere solo de 8 h para que se inicie el enquistamiento y cuando el inóculo empleado es de  $5 \times 10^5$  cél/ml se obtiene hasta un 70 % de diferenciación.

Raizada y Krishna-Murti (1972) utilizando diferentes bioaminas como agentes inductores de la degradación metabólica del glucógeno lograron la citodiferenciación de trofozoito a quiste en *Hartmannella culbertsoni*. Por el contrario los esfuerzos realizados hasta ahora para tratar de enquistar trofozoitos de *E. histolytica* en medio axénico no han producido resultados satisfactorios. Los trabajos localizados en la literatura sobre el enquistamiento *in vitro* de esta especie patógena para el humano solo reportan estudios en cultivos mixtos (Cleveland, Stone, Chang y Balamouth). Los Drs. Ludvick y Shipston (1970) y Treviño y Feria (1971) coinciden en su observación de que un cambio en el medio de cultivo puede producir cambios importantes en la fisiología y en la estructura de *E. histolytica*.

En 1978 Chávez y col. utilizando las nuevas técnicas de microscopía electrónica encontraron similitudes estructurales entre las paredes de los quistes de *E. invadens*, obtenidos axénicamente y los de las especies de *E. coli* y *E. histolytica* obtenidos de portadores humanos asintomáticos.

Considerando los estudios de Band y Cirrito que demuestran que la especie de *E. invadens* requiere de manera importante de dióxido de carbono y posee poca tolerancia al oxígeno, el Dr. Morales-Vallarta en 1991 reportó la inducción del enquistamiento masivo en trofozoitos de esta especie amebiana en fase de crecimiento logarítmico cultivados en el medio de crecimiento TPS-1 con alta tensión de dióxido de carbono y ayuno de glucosa.

Este autor mostró que aunado al enquistamiento las células muestran la aparición de cuerpos cromatoides los cuales son estructuras indispensables ya sea en quistes o prequistes de *Entamoeba*.

García-Zapien y col. en 1995 reportaron la inducción tanto del enquistamiento en trofozoitos de *E. invadens* de la cepa IP-1 en un medio con baja concentración de glucosa (LG) como de su desenquistamiento en los medios LG y BI-S-33 (Diamond, 1978) de los quistes axénicos producidos resistentes al detergente. Con estos resultados estos autores sugieren que los trofozoitos de esta especie amibiana son capaces de modular su fisiología de acuerdo a los nutrientes y a otros factores disponibles en el medio para efectuar los procesos de: crecimiento, enquistamiento y desenquistamiento con su respectivo crecimiento simultáneo.

### ***Castela texana* (Torr & Gray) Rose.**

La *Castela texana* o *Castela nicholsonii* (Torr & Gray) Rose es una planta que pertenece a la familia de las Simarubáceas, su localización corresponde a las regiones áridas del norte de nuestro País, especialmente los estados de Durango, Tamaulipas, San Luis Potosí y Nuevo León y en el sureste de Texas (Fig. 5). Desde finales del siglo pasado se encuentran reportes del uso en Medicina Tradicional de infusiones preparadas con esta planta para combatir problemas de diarreas y disenterías de tipo amibiano (Standley, 1923 y Uphof, 1968).

#### **2.1. Descripción Botánica.**

Es un arbusto leñoso de 1 a 2.5 m de altura; posee espinas alternas de 5 a 6 cm de largo; hojas blanquecinas obtusas de 0.5 a 1.5 cm, flores pequeñas de 3 a 4 mm de longitud de color rojo-naranja en su exterior y amarillas en su interior formadas por cuatro pétalos y cuatro sépalos. Sus frutos son de color rojo brillante en forma de chícharo y miden aproximadamente de 6 a 8 mm de diámetro (Fotos 5-7). Recibe los nombres vulgares de "bisbirinda" en Tamaulipas, "amargoso" en Nuevo León y "chaparro amargoso" en Texas (Martínez, 1959, Carrrell y Johnson, 1970).

#### **2.2. Clasificación Botánica.**

Reino.....Vegetal  
Subreino.....Spermatophyta  
Clase.....Angiospermae  
Subclase.....Dicotyledoneae  
Familia.....Simaroubaceae  
Género.....*Castela*  
Especie.....*texana*

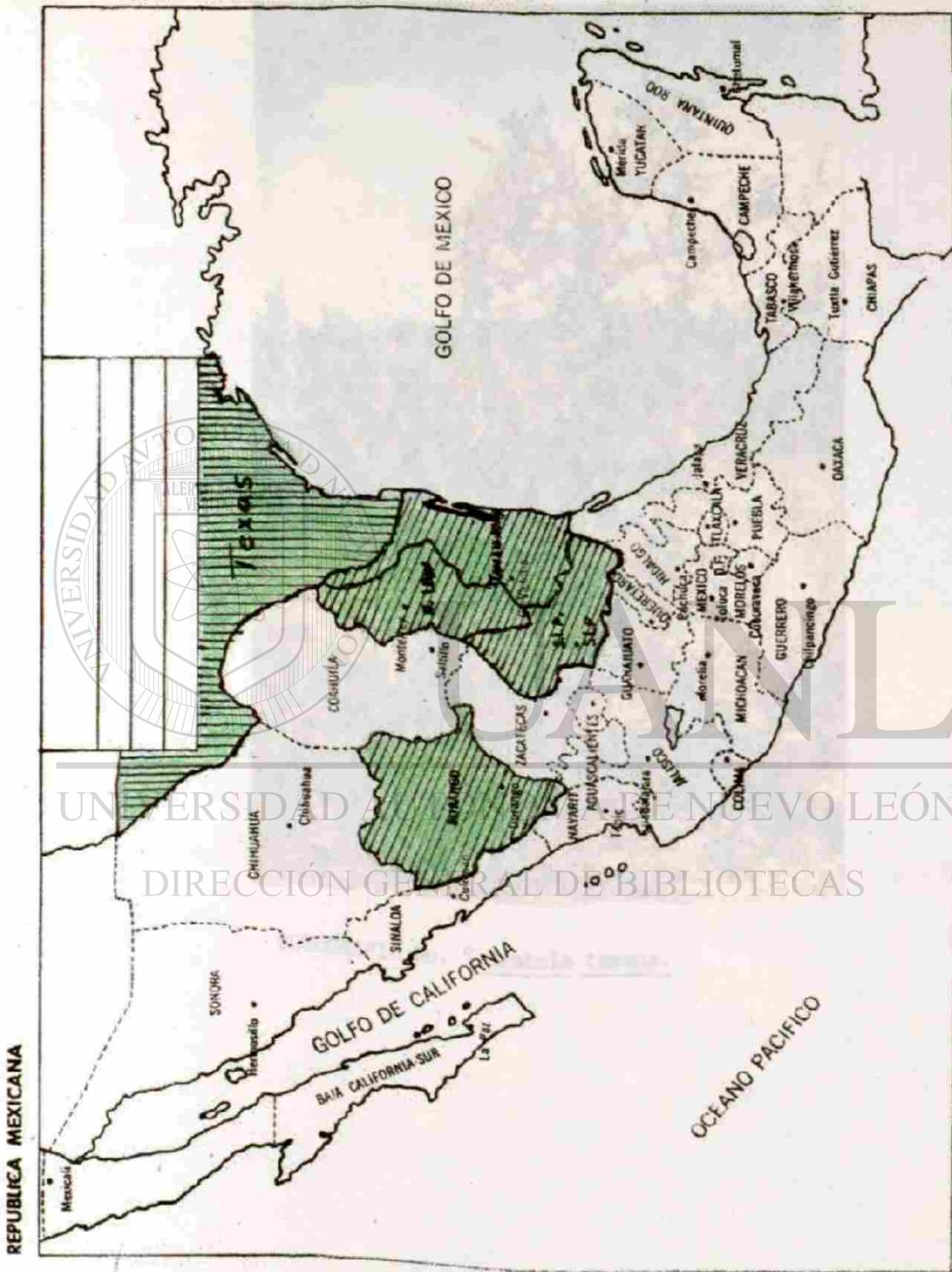


FIGURA No. 5 DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LA CasteLa Texana.



FOTOGRAFIA No. 5 Castela texana.



FOTOGRAFIA No. 6 Castela texana en Floración.



FOTOGRAFIA No. 7 Castela texana, Frutos.

### 2.3. Especies Mexicanas Conocidas.

El Dr. Jorge Alejandro Domínguez, en 1978 reportó que en México existen cuatro especies de *Castela*: La *Castela tortuosa*, la *Castela peninsularis*, la *Castela retusa* y la *Castela texana* (sinónima de la *Castela nicholsonii*) todas pertenecientes a la familia de las Simarubáceas. El Dr. Domínguez fue Director del Departamento de Química del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM) y contribuyó en gran parte al estudio fitoquímico de esta y muchas otras plantas. Él reportó el proceso y aislamiento a partir de la raíz de la *C. texana* colectada en esta ciudad de tres compuestos simaroubolídicos: la chaparrina, el  $\beta$ -sitosterol y, el amarólido IV y menciona que no localizó ni la glaucarubolona, glaucarubinona ni el glaucarubol.

### 2.4. Actividad Biológica.

De acuerdo con la bibliografía consultada, una de las primeras publicaciones sobre el uso farmacológico de la *C. texana* fue la realizada por Putegnat en 1883 quien recomendó el uso del chaparro amargoso en el tratamiento de la diarrea o disentería amibiana. El esquema terapéutico refiere la administración por vía oral de un cocimiento de la planta en agua a 96 °C durante 30 min., o bien hasta que tomase un color amarillo claro, además al paciente se le practicaban diariamente dos enemas rectales con 500 a 2000 ml del mismo cocimiento, durante dos semanas no observándose efectos tóxicos indeseables.

Posteriormente en 1918, Shephard y col. obtuvieron resultados similares utilizando extractos acuosos y metanólicos a partir de diferentes partes de la planta en pacientes a quienes se les había detectado la presencia de quistes de *E. histolytica* mediante estudios de laboratorio.

Bosman en 1923, haciendo estudios comparativos de la toxicidad del extracto acuoso de *C. texana* con la del clorhidrato de emetina en ranas, peces e intestino y útero aislados de gata, demostró que la emetina era más tóxica que el extracto en sus modelos estudiados.

Uno de los primeros reportes encontrados en la literatura sobre la actividad biológica *in vitro* de la planta fue el del Dr. Nixon en 1914 quien presentó 12 casos de pacientes con disentería amibiana tratados con éxito con un cocimiento preparado con *C. nicholsonii* sinónimo de *C. texana*. En su estudio Nixon hace referencia a un trabajo realizado por el Dr. Frank Paschal originario de San Antonio Texas, quien observó que una dilución del extracto acuoso de 1:10 000 de esta planta era suficiente para inmovilizar a trofozoitos amibianos aislados de pacientes con absceso hepático amibiano y que posteriormente toman forma esférica y finalmente se destruyen.

Los Drs. Del Pozo y Alcaraz en 1956 trabajando sobre la actividad biológica de la *Simaruba glauca* (Simaroubaceae) reportan que un compuesto aislado de ella (la glaucarubina), fue efectivo en 78 pacientes con amibiasis crónica y 9 con disentería a una dosis de 10-280 mg diarios por 5-30 días. Estos resultados fueron confirmados en un estudio presentado por el Dr. Van Assendelft y col. quienes reportan que esta droga fue bien tolerada y efectiva en un 70% de 113 pacientes con amibiasis intestinal comprobada por estudios coproparasitológicos a una dosis de 5 mg/kg de peso diariamente por 10 días.

Dos años más tarde los Drs. Cuckler y col. (1958) reportan la estructura química de la glaucarubina ( $C_{25}H_{36}O_{10}$ ) y, demostraron experimentalmente que es de acción amebicida directa después de probarlo en ratas y perros de laboratorio con colitis amebiana. En cambio, estudios *in vitro* realizados por estos autores indicaron que la glaucarubina mostró un bajo grado de actividad antiamebiana *in vitro* y, que el efecto fue solo de tipo amebicida ya que no se observó efecto alguno sobre el crecimiento de las bacterias en simbiosis asociada con los cultivos amebianos (*Escherichia coli*, *Proteus* y *Streptococcus*) resultando, la emetina de 2-8 veces más potente que esta droga.

En este mismo artículo aparece la comunicación personal de los Drs. Frost, Solotorovsky y McClelland quienes mencionan el efecto que la glaucarubina mostró sobre otro tipo de enfermedades parasitarias. No encontraron efecto alguno sobre las siguientes infecciones: Malaria en pájaros (*Plasmodium gallinactum*), tripanosomiasis (*Trypanosoma brucei*), trichomoniasis (*Trichomonas foetus*), enterohepatitis (*Histomonas meleagridis*) y coccidiosis avícola (*Eimeria tenella*). Este compuesto tampoco mostró efecto contra las infecciosas naturales de oxiuros e.v. o áscaris (*Syphacia obvelata* y de *Aspiculurus tetraoptera*) o de schistosomiasis experimental (*Schistosoma mansoni*) en ratones. Tampoco tuvo efecto *in vitro* sobre el crecimiento de algunas bacterias del tipo gram (+) o gram (-); ni tampoco, se observó actividad en ratones infectados con *Micrococcus pyogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, virus de poño SK, ni del virus de la influenza en cerdos.

En 1959 el Dr. Maximino Martínez en el libro de "Las Plantas Medicinales de México" menciona a partir de *C. texana* el aislamiento de tres compuestos glucósidos reconocidos como: la castelina, la castelagema y la amargosina además, de resinas, ceras, taninos, saponinas y azúcares haciendo también mención de que no se encontró ningún alcaloide. El cocimiento o preparado con la *C. texana* también se ha utilizado en odontología contra la poliartritis amebiana y la Dra. Ana María Orzac (citada por M. Martínez, 1959) refiere en su tesis que su acción terapéutica es similar a la de la emetina pero 25 veces menos tóxica.

En 1975 encontramos otros trabajos con relación al aislamiento y actividad de otros quassinoides pero pertenecientes a plantas diferentes a la *Castela*. Los Drs. Kupchan y cols. de la Universidad de Virginia, USA, trabajando en la búsqueda a partir de fuentes de origen natural de nuevos agentes que presenten actividad antitumoral encontraron que el extracto etanólico de *Brucea antidysenterica* (Simaroubaceae), originaria de Etiopía donde es utilizada para el tratamiento del cáncer mostró actividad inhibitoria significativa *in vitro* contra células derivadas del carcinoma nasofaríngeo humano (KB), carcinoma intramuscular Walker en ratas y, contra, las de leucemia linfocítica P-388 en el ratón (PS).

La actividad antileucémica de la *Brucea antidysenterica* y sus principios activos motivó a los Drs. Kupchan y Lacadie a continuar con el estudio de esta familia de plantas y, así, encontraron que el extracto alcohólico de la *Pierreodendron kerstingii* Little mostró también actividad significativa *in vivo* contra la leucemia linfocítica P-388 en el ratón (PS) e *in vitro* en cultivos de células derivadas del carcinoma nasofaríngeo humano (KB).

Posteriormente todas las investigaciones relacionadas con la actividad biológica de compuestos aislados de las Simaroubáceas estuvieron relacionadas con sus propiedades antitumorales *in vitro* e *in vivo* (Wall y Wani, 1977,78). hasta que en 1982 Frances Gillin y col. prueban el efecto de 17

compuestos aislados de diferentes plantas pertenecientes a la familia de las Simarubáceas utilizando un modelo de crecimiento de *E. histolytica* en agar semisólido. Ellos encuentran que la bruceantina aislada de la *Brucea antidysenterica* originaria de Etiopía es un potente amebicida a 0.076 µg/ml y que comparada con el metronidazol (4.25 µg/ml) es 30 veces más activa.

En 1985 el Dr. Keene y col. utilizaron pruebas *in vitro* para evaluar la actividad sobre *E. histolytica* de diferentes extractos crudos y compuestos aislados de plantas. Los resultados que obtienen son comparados con pruebas citotóxicas *in vitro* sobre queratinocitos de la oreja del cobayo (células GPK). Dentro de los compuestos que probaron se encuentran cinco aislados a partir de Simarubáceas: extracto butanólico crudo de *Brucea javanica*, bruceantina, bruceína C, quassina y xantina-6-1. La concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) de estos compuestos sobre *E. histolytica* fue de 8.25, 0.30, 10, 0.50 y 23 µg/ml respectivamente; pero de todos ellos solo la quassina tuvo una relación citotóxica/amebicida más favorable.

Martínez y Samaniego en 1986 y 1987 respectivamente probaron el efecto de la *Castela texana* administrando cápsulas preparadas con diferentes dosis de la planta en pacientes con amibiasis intestinal comprobada por estudios coproparasitológicos y la compararon con la actividad de la diiodohidroxiquinoleína, droga antiambiana en uso. Los resultados presentados indican que no hay una diferencia significativa entre el uso de los dos compuestos (80 % de remisión de la enfermedad), pero respecto a los efectos secundarios producidos, la *Castela* no presentó síntomas adversos durante el tratamiento, en cambio los pacientes tratados con diiodohidroxiquinoleína reportaron: náusea, dolor abdominal y cefaleas. Otro problema que se pudo observar durante el estudio es que los pacientes tienden a abandonar con facilidad el tratamiento con las diiodohidroxiquinoleínas por lo largo de su duración (21 días), en comparación con el de *Castela*: 12 días.

Como se ha reportado que los quassinoides, constituyentes amargos de las Simarubáceas poseen diversas propiedades biológicas incluyendo la actividad inhibitoria del crecimiento de insectos los Drs. Chaudhuri y Kubo probaron el efecto de la chaparramarina sobre el crecimiento de los insectos de la peste (*Lepidopteran*) y del gusano del tabaco (*Heliothis virescens*).

En 1994 los Drs. Moretti y cols. de la Paz, Bolivia probaron la actividad antimalaria *in vivo* e *in vitro* de la *Simaba cedron planchon* (Simaroubaceae) además de su actividad sobre las células KB. Los resultados mostraron que esta planta presentó actividad contra cepas de *Plasmodium* sensibles y resistentes a la cloroquina pero presentó baja toxicidad contra las células KB en comparación con la de los quassinoides C-20 activos.

En Japón, en ese mismo año los Drs. Kosuge y cols. (1994) aislaron varios compuestos a partir de *Ailanthus integrifolia Lamk* (Simaroubaceae) y determinaron que inhiben el crecimiento de la cepa K1 del parásito *Plasmodium falciparum* resistente a la cloroquina en cultivo. El año siguiente el Dr. Ohmishi y col. reportaron que ciertos quassinoides aislados a partir de *Brucea javanica* (Simaroubaceae) mostraron una citotoxicidad selectiva contra la leucemia, melanomas de pulmón, colon y SNC además de líneas celulares cancerosas de ovario.

En 1997 Raham obtuvo varios quassinoides semisintéticos por esterificación del hidroxilo C-15 de la iso-bruceína-B y los probaron en ensayos *in vitro* de corto término (prueba de activación del virus Epstein-Barr). Todos los derivados ésteres mostraron una alta actividad promotora

antitumoral en comparación con la potente isobruceína-B y de ellos resultó más efectivo el que contenía un éster alifático fluorado.

Los Drs. Tahir y col. (1999) probaron la actividad antiplasmódica del extracto metanólico de *Harrisonia abyssinica* (Simaroubaceae) sobre las cepas 3D7 del *Plasmodium falciparum* sensible a la cloquina y la cepa Dd2 resistente a la misma droga resultando este extracto con actividad inhibitoria con una  $IC_{50} = 4.7 \mu\text{g/ml}$  en Dd2 mientras que para 3D7 requirió de  $10 \mu\text{g/ml}$ .

Nosotros empezamos a trabajar con la *Castela texana* en la década de los 80's tomando en cuenta la información obtenida en cuanto a que dicha planta era utilizada como tratamiento en las disenterías de tipo amibiano por la población de la región norte de nuestro país. Inicialmente se estableció en nuestro laboratorio el modelo de cultivo axénico *in vitro* de trofozoítos con dos especies de cepas amibianas: *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS (patógena para el humano) y de *Entamoeba invadens* IP-1 y PZ (patógena en reptiles). La *Castela* fue identificada por el Biólogo Mauricio González Ferrara, Botánico calificado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL y se colectó en el campo experimental de esa misma facultad el cual, se encuentra localizado en el Municipio de Escobedo N.L. Posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente y se molió en un molino eléctrico para su uso posterior.

Inicialmente se estudió el efecto anti-amibiano de diferentes extractos preparados a partir del material seco y molido de la parte aérea de la *C. texana*: extracto etanólico y extracto metanólico-clorofórmico, sobre el crecimiento amibiano de la cepa *E. histolytica* HM-2:IMSS mantenida en el medio de cultivo líquido TP-S-1 de Diamond y se encontró que el extracto metanólico-clorofórmico fue el más activo a las tres concentraciones probadas: 10, 50 y 100  $\mu\text{g/ml}$  (Calzado y col, 1986).

La separación por cromatografía en capa fina del extracto metanólico de la parte aérea de la planta reveló la presencia de dos compuestos cuya concentración mínima inhibitoria fue de 50-100  $\mu\text{g/ml}$ . De la raíz se obtuvieron diferentes productos con actividad inhibitoria sobre los cultivos amibianos: fracción B del extracto soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , chaparrina y un compuesto glicosilado aislado de la fase intermedia (Calzado y col, 1983,6).

Posteriormente estudiamos el efecto inhibitorio *in vitro* de cinco compuestos sobre cultivos de *Entamoeba*: emetina, alcaloide obtenido de la raíz de la *Ipecacuanha*, ácido nordihydroguayarético (NDGA), lignano glicosilado aislado de la *Larrea tridentata*, con actividad inhibitoria sobre el crecimiento de organismos eucarióticos; ácido tánico aislado de la raíz de *Punica granatum* la cual ha sido empleada en el tratamiento de desórdenes intestinales; la chaparrina aislada, aislada de la *C. texana* y, el gossipol, sustancia aislada de la planta del algodón y, estudiada recientemente como una posible droga de uso anti-amibiano. Todos los compuestos probados resultaron activos a la máxima concentración utilizada (100  $\mu\text{g/ml}$ ) pero la chaparrina fue capaz de conservar esta actividad después de 48 h de incubación (Calzado y col. 1991).

Considerando que tanto la chaparrina como el NDGA poseen dentro de su estructura algunos grupos químicos funcionales hidroxilo, tal como los presentan otros compuestos con actividad anti-amibiana comprobada *in vivo* (8-hidroxiquinolinas y timidazol) realizamos un estudio para tratar de demostrar la importancia de la polaridad de estos radicales en su actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los cultivos de *E. histolytica*. En contraste con la chaparrina, su análogo acetilado

mostró una marcada disminución en su actividad inhibitoria. Resultados similares fueron observados con el NDGA y su derivado tetracetilado lo cual, sugiere que esta polaridad está implicada de alguna manera en la actividad antiambiana de estos compuestos (Calzado y col, 1995).

Posteriormente, después de llevar a cabo la separación por cromatografía líquida del extracto activo de la *Castela* y obtener un compuesto quassinoides puro (chaparrina) se determinó la actividad citotóxica *in vitro* de este compuesto para determinar si su uso podría llegar a producir un efecto secundario indeseable en el humano. Para ello realizamos un estudio en donde además de utilizar trofozoitos de *E. histolytica*, cepa HM-1:IMSS empleamos, cultivos celulares de fibroblastos diploides humanos (46 cromosomas), cepa MRC-5. Después de poner en contacto los dos tipos de células a diferentes concentraciones de chaparrina (0.1-100  $\mu\text{M}$ ) encontramos que la chaparrina a la máxima concentración empleada (100  $\mu\text{M}$ ) inhibió el 97% de los cultivos amibianos y solo el 27% de los cultivos de fibroblastos. Además, esta actividad se conservó hasta 1  $\mu\text{M}$  de chaparrina y fue semejante a la observada con drogas antiambianas conocidas (Calzado y Segura, 1995).

Tres años después realizamos un estudio agudo preliminar en relación con la actividad toxicológica aguda de la *C. texana*. 30 ratas macho adultas sanas de la raza Wistar de 8-9 semanas de edad recibieron intragástricamente diferentes dosis de un extracto metanólico preparado con *C. texana* no observándose ninguna diferencia ni efectos adversos en los animales tratados con la máxima concentración usada del extracto (30 mg/ml) además de que esta dosis no produjo cambios funcionales del sistema muscular ni del SNC, tampoco en el peso de los animales, ni se observaron manifestaciones clínicas que pudieran estar asociadas con la intoxicación producida por agentes farmacológicos comparativamente con el grupo testigo (Calzado y col. 1998)

Puesto que en la trichomoniasis (enfermedad transmitida sexualmente de alta incidencia) se utiliza como tratamiento el metronidazol, droga empleada también para combatir la amibiasis, pensamos en probar el efecto de la *C. texana* sobre los cultivos *in vitro* de este protozooario unicelular flagelado. Las soluciones del extracto metanólico y de la chaparrina obtenidos de *C. texana* mostraron efecto inhibitorio a la máxima concentración probada (100  $\mu\text{g/ml}$ ) la cual, se conservó en el caso de la chaparrina hasta con 1  $\mu\text{g/ml}$ . El metronidazol resultó ser más activo que el extracto y que la chaparrina a los diferentes tiempos probados (C Calzado y col, 1998).

## 2.5. Características Químicas.

La familia de las Simarubáceas son plantas que se han caracterizado por poseer principios amargos, los cuales son triterpenos degradados denominados quassinoides (Sellards, 1918). Varios investigadores han estado interesados en identificar estos principios activos, en donde se puede señalar que uno de los primeros trabajos sobre la composición química de esta planta fue el presentado por Bosman en 1922, quien aisló un glicósido al que nombró castelina con un punto de fusión de 105 °C. Un año más tarde, el mismo autor obtiene otro principio amargo cristalino al que llamó castelamarina con pf de 267°C.

En las siguientes cuatro décadas no se cita ningún trabajo y no es sino hasta 1961, cuando apareció la publicación de Geissman y Chandorkar, donde refirieron la purificación de otro compuesto amargo de apariencia cristalina y con pf de 308°C, al que llamaron chaparrina (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>7</sub>), cuya estructura correspondió a una lactona, ya que presentó coloración azul intensa con ácido sulfúrico concentrado. Un año más tarde la estructura de la chaparrina fue identificada por este mismo autor cómo una molécula con cuatro grupos hidroxilo, un carbonilo y un anillo lactónico (Fig. 8).

Otros componentes aislados de la *C. texana* son la glaucarubolona con pf de 258 °C, la cual ha sido posible obtenerla en el laboratorio a partir de la chaparrina por oxidación selectiva del hidroxilo en el carbón 2 con MnO<sub>2</sub>. Otra molécula aislada de la *C. texana* es el glaucarubol-15-isovalerato, el cual es de especial interés ya que a la presencia del grupo éster 15-isovalerato se le han atribuido importantes propiedades terapéuticas (Wall y Wani, 1977) y 4 lactonas: A= amarólido, D= chaparrólido, E= chaparrinona y F= castelanólido (Stocklin y Mitchell).

El Dr. Domínguez en 1978 menciona que en México existen cuatro especies de *Castela*: la *C. tortuosa*, la *C. peninsularis*, la *C. retusa* y la *C. texana* (sinónima de la *C. nicholsonii*) todas, pertenecientes a la familia de las Simarubáceas. El Dr. Domínguez con relación a las referencias de la actividad biológica de estas plantas realizó el estudio fitoquímico de la *C. texana* y reportó el aislamiento a partir de la raíz de la misma de la chaparrina, del β-sitosterol, del amarólido IV y no localizó ni glaucarubolona ni el glaucarubol.

En ese mismo año los Drs. Wall y Wani hicieron la observación que para que estos tipos de compuestos quassinoides conserven dicha actividad, su molécula, debe de poseer las siguiente características químicas: en el anillo A, un sistema 3-2-oxo, una lactona en el anillo D, grupos éster en el C-6 y/o C-15, oxhidrilos en el C-1 y C-12, así como un puente de epoximetano entre C-8 y C-11 o C-13.

En 1992 los Drs. Chaudhuri y Kubo del Colegio de Recursos Naturales de la Universidad de California, USA en su búsqueda continua de sustancias biológicamente activas reportaron el aislamiento y caracterización de nuevos compuestos quassinoides glucósidos a partir de la corteza de la *Castela tortuosa* originaria de Guadalajara, México: la chaparramarina, el castelósido A (chaparrin-2-O-β-D-glucopiranosido) y el castelósido B (glaucarubol 2-O-β-D-glucopiranosido). Continuando con el estudio de la fracción activa de la *Castela tortuosa* un año más tarde estos mismos autores reportaron el aislamiento de la castelina otro nuevo quassinoides además de flavonoides ya conocidos como la prosopina, el fisitinidol y el metil galato.

De la *Castela polyandra*, Grieco y col. en 1995 reportaron el aislamiento de un nuevo compuesto quassinoides, el polyandrol y, en 1999 el aislamiento de seis compuestos quassinoides C-20 y uno C-19 además de dos nuevos constituyentes no-quassinoides: un beta-glucósido y un esteroide.

### 3. IMPORTANCIA

Se estima que aproximadamente un 10 % de la población mundial es portadora del protozoo denominado *Entamoeba histolytica*, la enfermedad que este produce se conoce como amibiasis y, con mayor frecuencia se localiza en regiones tropicales y subtropicales así como en países donde la alimentación y la sanidad ambiental son deficientes. Aunque la terapéutica actual cuenta con diversos medicamentos para combatir esta enfermedad, ninguno está exento de producir efectos tóxicos indeseables en el humano por lo tanto, se debe de continuar con la búsqueda de nuevos agentes amebicidas, de menor toxicidad y con igual o mayor potencia que los ya existentes.

### 4. ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN

El ciclo vital de *Entamoeba* muestra dos etapas principales: el trofozoito o forma vegetativa la cual es capaz de producir lesiones en el intestino de su hospedero y el quiste, o forma resistente responsable de la diseminación del parásito y de la infección en nuevos hospederos. La amibiasis se transmite generalmente por la llegada de los quistes al huésped los cuales posteriormente y bajo condiciones favorables mediante diferenciación celular se desenquistan dando origen a los trofozoitos responsables de las lesiones tisulares durante el curso de la enfermedad (Foto 1).

Puesto que los quistes de *Entamoeba histolytica*, especie patógena para el humano no se han logrado obtener espontáneamente bajo condiciones axénicas, entonces para nuestros estudios utilizaremos la especie de *Entamoeba invadens*, parásita de los reptiles e inocua en los mamíferos con la justificación de que ambas especies según reportes de Rattcliffe y Geiman (1933) y McConnachi (1969) son extraordinariamente semejantes en morfología, patogenicidad e inclusive en sus procesos de diferenciación de enquistamiento y desenquistamiento de tal manera que la descripción de alguno de estos procesos en una especie puede aplicarse a la otra. El empleo de *E. invadens* presenta además otra ventaja, esta es su inducción del proceso de enquistamiento masivo® en medio axénico.

En la actualidad no existe ningún compuesto con actividad antiambiana reconocida que sea capaz de inhibir el proceso de enquistamiento de la amiba y todos los estudios biológicos realizados con *Castela texana* sobre su actividad antiambiana se han relacionado solo con su actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los trofozoitos pero no existe ningún reporte respecto al efecto de *Castela* sobre los quistes o fase resistente responsable de la propagación del parásito y de la infección de nuevos hospederos.

Si con este trabajo se determina, que la *Castela texana* posee la capacidad de inhibir los procesos de diferenciación de la amiba de trofozoito a quiste y viceversa estaremos contribuyendo en el desarrollo de un nuevo fármaco no solo para el tratamiento sino también para el control de la diseminación de este parásito.

## 5. HIPÓTESIS

Puesto que en Medicina Tradicional se ha utilizado a la *Castela texana* desde finales del siglo XIX para tratar problemas de disentería de etiología amibiana y además recientemente se ha reportado que posee actividad inhibitoria sobre el crecimiento *in vitro* del trofozoíto o forma móvil del protozooario responsable de esta enfermedad, consideramos que esta planta posee alguno/s principio/s activo/s que puedan afectar el ciclo vital del protozooario inhibiendo el o los procesos de diferenciación de *Entamoeba in vitro*.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. Objetivo General.

Determinar la actividad de la *Castela texana* (raíz) sobre los procesos de diferenciación celular, de enquistamiento y desenquistamiento de *Entamoeba invadens in vitro*.

### 6.2. Objetivos Específicos.

6.2.1. Identificar y coleccionar la *Castela texana*.

6.2.2. A partir de la raíz de la misma, seca y molida, aislar los diferentes extractos, fracciones y compuestos para este estudio.

6.2.3. Establecer nuestro modelo de diferenciación celular (enquistamiento y desenquistamiento) utilizando la cepa IP-1 de *Entamoeba invadens*.

6.2.4. Determinar la actividad inhibitoria de los extractos, fracciones y compuestos aislados de la raíz de *C. texana* sobre los procesos de diferenciación celular de *E. invadens*.

6.2.5. Realizar los estudios fitoquímicos de la planta en estudio.

6.2.6. Determinar la concentración óptima de la *C. texana* que sea capaz de inhibir la diferenciación de *E. invadens* sin afectar su crecimiento.

6.2.7. Realizar un estudio comparativo entre la actividad de la chaparrina, la emetina y el tinidazol rifampicina sobre el crecimiento de *E. invadens*.

6.2.8. Determinar la actividad de la chaparrina y de la rifampicina sobre el enquistamiento de *E. invadens*.

## 7. MATERIAL Y METODOS

### 7. 1. Obtención del Material de la Planta en Estudio.

La *Castela texana* (Foto 5) se localizó 20 Km al norte de la ciudad de Monterrey, N.L. en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL el cual se encuentra ubicado dentro del municipio de Escobedo N.L.; Se identificó con la ayuda del Biólogo Mauricio González Ferrara, Botánico calificado y se colectó tanto parte aérea como raíz de la misma, durante el mes de septiembre de 1997 (Foto 8).

Inmediatamente este material se llevó al laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL para su correcta identificación y marcaje, donde un ejemplar se incluyó dentro de una prensa botánica para donarlo al Herbario de la Facultad 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 y una vez seco, se trituró y molió por separado en un molino eléctrico. El material seco y molido (Foto 9) 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.

### 7. 2. Pruebas Fitoquímicas con la *Castela texana*:

Tomando en consideración los antecedentes bibliográficos, las plantas pertenecientes a la familia de las Simarubáceas se caracterizan por poseer compuestos derivados de tipo diterpénicos o simaroubolidanos por lo que, el fraccionamiento de la *Castela texana* estuvo dirigido a la búsqueda de este tipo de compuestos.

Hasta la fecha se han reportado el aislamiento de unos 20 compuestos de tipo simaroubolidano los cuales se caracterizan por poseer un sabor amargo, un esqueleto w común, por llevar grupos lactónicos y presentar tres modificaciones con 19, 20 y 25 carbonos representadas por los esqueletos x (quasolidano), y (oedrolidano) y z (simaroubolidano) (Fig. 6). Este grupo de compuestos se ha aislado tanto de semillas, raíces, tallos, corteza y aún en sus frutos. Además, estos compuestos poseen moléculas de oxígeno en abundancia los cuales se presentan ya sea como hidroxilos o carbonilos y, esta característica es utilizada para su proceso de extracción con solventes de alta polaridad como agua y metanol.

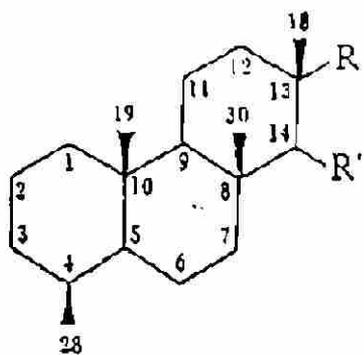
En su identificación, además de las reacciones coloridas características para este tipo de compuestos simaroubolidanos los cuales poseen la propiedad de que al contacto con el ácido sulfúrico concentrado dan una coloración azul intensa se emplearon, pruebas para la detección de cumarinas (Ehrlich), alcaloides (Drangendroff y Wagner), sesquiterpenlactonas (Legal y Baljet), flavonoides (Shinoda) y, para la detección de insaturaciones (Shinoda).



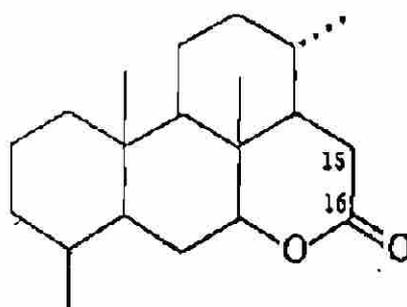
Fotografía No. 8 Obtención de la Raíz de la Castela texana.



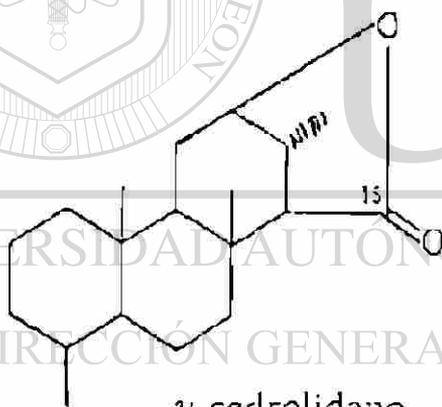
Fotografía No. 9 Raíz de la Castela texana Seca y Molida.



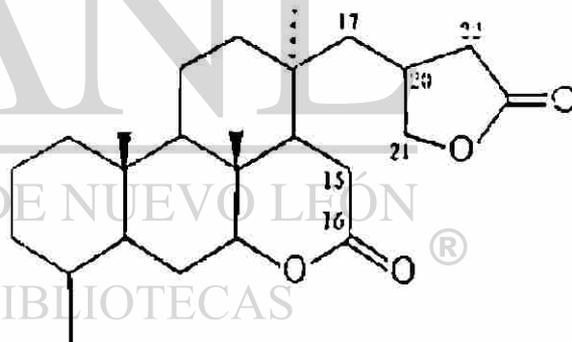
$\omega$  esqueleto común



$\alpha$  quasolidano



$\gamma$  cedrolidano



$z$  simarolidano

FIGURA No. 6 ESQUELETO DE COMPUESTOS DE TIPO SIMAROBOLIDANO.

### **7. 3. Extractos Aislados de la *Castela texana*:**

**7. 3. 1. Acuoso.** El material de la planta en estudio, seco y molido, se llevó a ebullición durante 10 min. con agua bidestilada en una proporción de 300g de material por 1.5 litros de agua. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró a través de un lienzo de algodón y el extracto acuoso obtenido se llevó posteriormente a sequedad dentro de una liofilizadora.

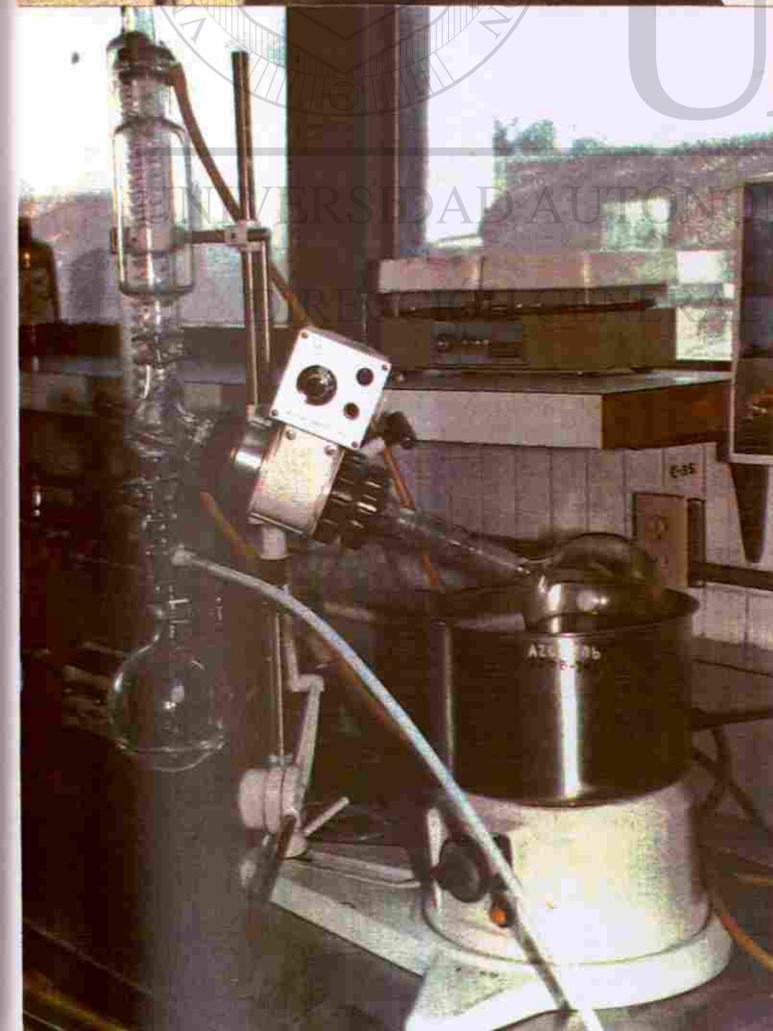
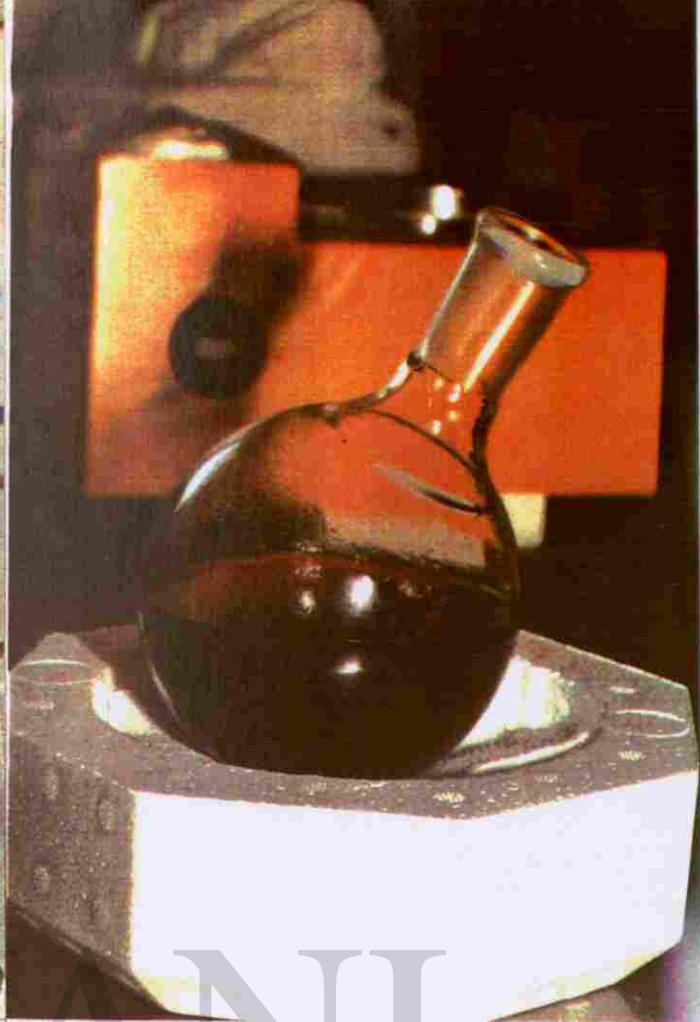
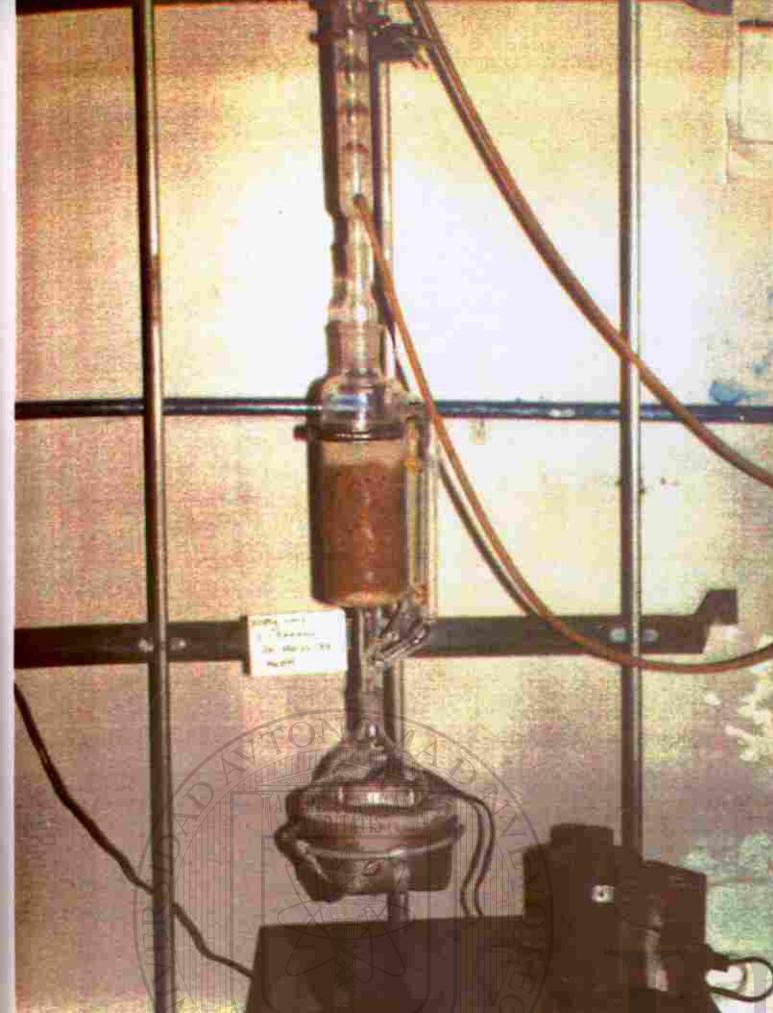
**7. 3. 2. Metanólico:** 500 g del material seco y molido se llevaron a extraer con metanol durante siete días en reflujo continuo en un equipo de extracción tipo soxhlet. Posteriormente el extracto obtenido se concentró en un equipo rotaevaporador marca Buchii y finalmente se llevó a liofilizar para eliminar el resto del solvente (Fotos 10-12).

### **7. 4. Fraccionamiento del Extracto Metanólico Activo:**

El extracto metanólico activo fue fraccionado posteriormente dentro de un embudo de separación. Primeramente y en relación con la composición de las manchas identificadas mediante cromatografía en capa delgada el extracto se separó empleando mezclas de solventes con diferentes polaridades: dicloruro de metileno: agua.

Inicialmente el extracto metanólico obtenido se mezcló vigorosamente dentro de un vaso de precipitado con una mezcla (300 ml) de dicloruro de metileno:agua en proporción (3:1) (v:v). Ya disuelto en esta mezcla de solventes se vació dentro de un embudo de separación con capacidad de 1 litro y se agitó manualmente de forma vigorosa permitiendo que el contenido del extracto se fraccionara en los solventes empleados en relación con la polaridad de sus componentes (Foto 17).

Posteriormente se dejó en reposo por 30 min. y se procedió a separar las fracciones formadas (acuosa, intermedia y diclorometano). Este proceso de fraccionamiento se repitió varias veces más hasta que ya no se observó ninguna separación del extracto activo hacia las capas de solventes. Las tres fracciones colectadas del extracto metanólico activo se llevaron posteriormente a concentrar dentro de un rotaevaporador, se les determinó su ocd y finalmente su actividad biológica sobre los procesos de citodiferenciación de interés para este estudio de investigación.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS

FOTOGRAFÍAS No. 10-12.  
EXTRACCIÓN Y CONCENTRADO DEL  
EXTRACTO METANOLICO DE LA  
Castela texana.

## 7. 5. Cromatografía en Columna Líquida (CCL):

Después de determinar la actividad inhibitoria que los diferentes extractos y fracciones aisladas de nuestra planta en estudio mostraron sobre los procesos de diferenciación celular de los trofozoítos amibianos de la cepa IP-1 de *E. invadens* se procedió al aislamiento de compuestos de tipo simaroubolidano contenidos en los mismos:

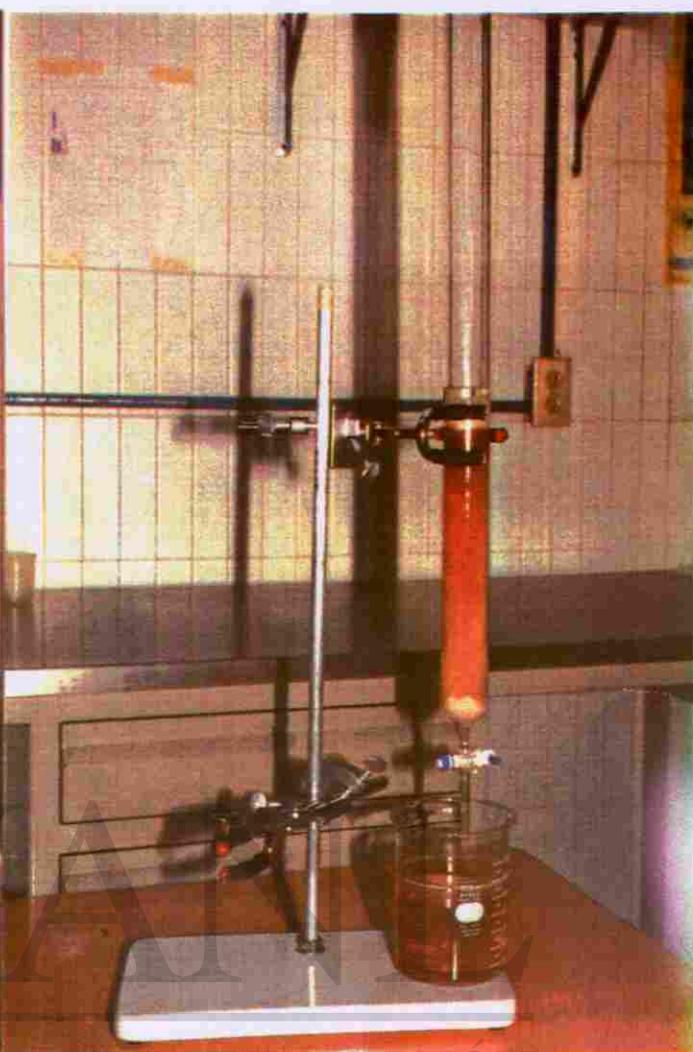
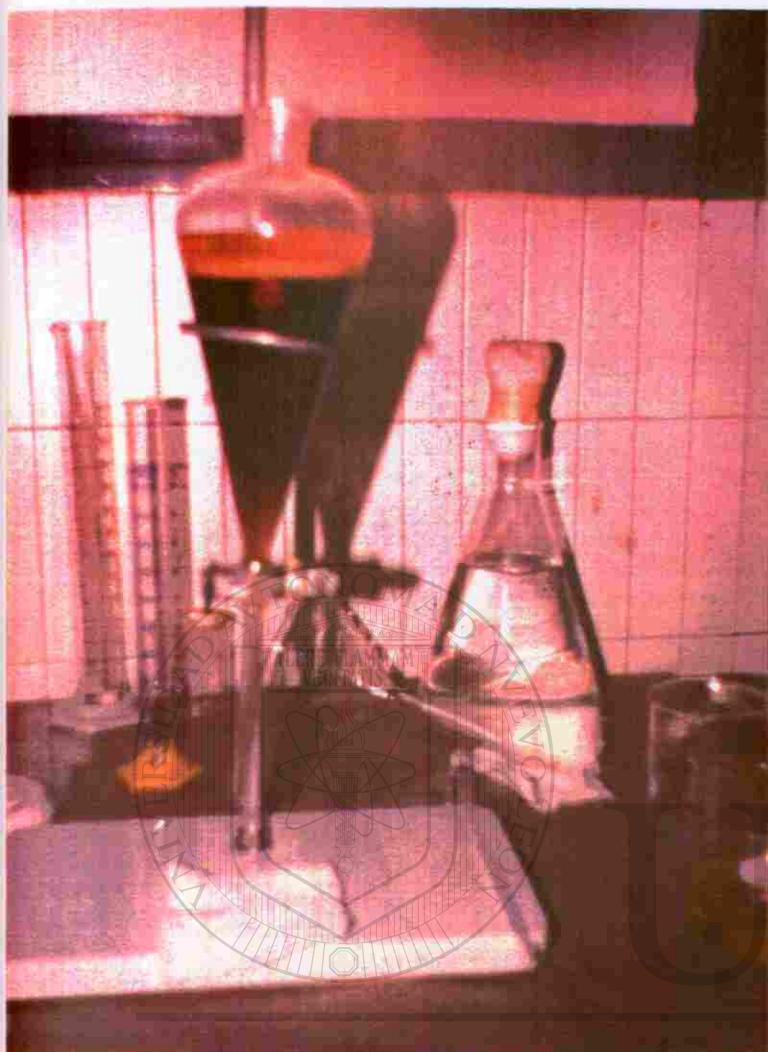
La fracción (intermedia) activa obtenida del fraccionamiento del extracto metanólico según el proceso de separación mostrado en el inciso anterior fue sometida a un nuevo proceso de separación conocido como separación en cromatografía en columna líquida (Foto 18):

Primeramente se depositó en un vidrio reloj la fracción intermedia activa colectada anteriormente en un vidrio-reloj para permitir la evaporación de los residuos de dicloruro de metileno que pudieran estar contenidos dentro de ella. Posteriormente se preparó una mezcla de esta fracción activa seca con sílica gel 60, malla 35-70 mesh, marca Merck en una proporción de peso (2:1).

Para este tipo de cromatografía se preparó una columna de vidrio de 80 cm de largo por 6 cm de diámetro de la siguiente manera: primeramente a la columna se le introdujo con ayuda de una varilla de vidrio hasta el extremo inferior un tapón de algodón para evitar que al introducir y correr la muestra que nos interesa, se llegue a perder parte de ella. Posteriormente encima de este tapón de algodón se le añadieron aproximadamente 25 cm de sílica gel 60 pura e inmediatamente después de esta capa de sílica, se colocó la muestra previamente mezclada con la sílica como se mencionó en el párrafo inmediato anterior y por último se colocó otra capa de algodón. Terminado esto, la columna se fijó a un soporte de manera vertical y en la parte inferior se le fueron colocando matraces earlenmayer de 125 ml de capacidad para recoger las fracciones eludías (Fig. 19).

Posteriormente la columna se empezó a correr con varios tipos de eluentes empezando con aquellos de menor polaridad como el hexano puro y aumentando progresivamente la polaridad con mezclas de solvente como la mezcla de hexano-acetona en las proporciones de 9:1; 8:2; 7:3; 6:4 y 1:1 (v/v). Después se corrió con acetona pura y se continuó la separación con mezclas de acetona:metanol 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; y 1:1 (v/v) y por último, se corrió con metanol puro. Al término de este proceso contamos con aproximadamente 100 fracciones colectadas.

Las fracciones colectadas durante la cromatografía en columna líquida por succión (ccl) fueron llevadas a sequedad para posteriormente identificarlas mediante pruebas de ccd.



PROCESO DE FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO METANOLICO DE LA C. texana EN:  
FOTOGRAFIA No. 17 EMBUDO DE SEPARACION.  
FOTOGRAFIA No. 18 CROMATOGRAFIA LIQUIDA EN COLUMNA.  
FOTOGRAFIA No. 19 FRACCIONES AISLADAS DE LA CCL.

## **7. 6. Aislamiento de la Chaparrina.**

Para esta extracción se utilizó una modificación al método descrito por el Dr. Domínguez. Al correr la columna con acetona pura empezó a aparecer un precipitado de color blanco el cual fue aumentando en cantidad conforme se fue incrementando gradualmente la polaridad del eluyente con una mezcla de acetona:metanol (9:1).

Se siguió corriendo la columna con este sistema de solventes hasta que dejó de aparecer el precipitado de color blanco y, las fracciones colectadas (en matraces de 250 ml) mediante este procedimiento se llevaron a evaporar en un rotaevaporador y los precipitados obtenidos se colocaron en filtros Whatman No. 1 para lavarlos con acetona y un poco de metanol.

Para la identificación de la chaparrina se utilizaron métodos químicos y físicos entre los que se encuentran las reacciones coloridas de identificación, punto de fusión (pf), cromatografías comparativas en capa delgada (ccd), métodos espectroscópicos: de absorción en el ultravioleta (UV), en el infrarrojo (IR), resonancia magnético nuclear (RMN), rotación óptica y espectroscopia de masas. El uso de estos métodos espectroscópicos se realizó con la colaboración del Departamento de Química del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, en esta ciudad.

## **7. 7. Cromatografía en Capa Delgada (ccd):**

Este método cromatográfico es comúnmente utilizado en la separación y purificación de los principios activos de las muestras de plantas (extractos, fracciones, etc.) en los cuales se desee conocer su contenido. Para ello, se emplean cámaras de vidrio, con una cubierta móvil donde las dimensiones de las cámaras empleadas son variables en función del número de muestras que se deseen correr.

### **Preparación de Placas para Cromatografía en Capa Delgada:**

10 g de sílica gel G se disolvieron con 30 ml de agua bd mezclándose con cuidado para que no se formen grumos o burbujas y, esta mezcla la dejamos reposar durante dos min.

Previamente, las placas de vidrio de 5 x 10 ó de 10 x 20 cm se limpiaron con una torunda impregnada de alcohol etílico para retirar las impurezas de polvo o de grasa que pudieran contener. Ya limpias se les vacía una cantidad considerable de la sílica preparada según se mencionó en el párrafo anterior dejándose deslizarse sobre la misma cuidando que se forme una capa de sílica uniforme, posteriormente se dejaron reposar por 30 min. y se activaron o secaron dentro de una incubadora.

Antes de correr muestras en las placas de ccd recién preparadas se hizo una prueba de solubilidad de los extractos, fracciones de nuestra planta en estudio que se deseaban identificar utilizando para ello solventes de diferente polaridad como son: acetona, hexano, cloroformo, metanol, etanol, agua bidestilada y dimetilsulfóxido. En un vaso de precipitado de 10 ml, se puso por separado cada uno de los solventes y se añadió una pequeña muestra del extracto, fracción o compuesto activo de la planta en estudio, y se dejó reposar aproximadamente por 30 min.

En la parte inferior de una placa de silica gel (aproximadamente 0.5 cm de su límite inferior) se marcó con lápiz una línea horizontal y, sobre esta se colocaron con ayuda de un capilar preparado (se afina la punta con calor) tres muestras de cada uno de los extractos, fracciones o compuestos activos además de depositar también a un lado muestras testigo de compuestos conocidos. Este procedimiento se repitió varias veces cuidando de depositar la muestra en el mismo lugar para obtener en nuestra placa muestras saturadas y así facilitar el deslizamiento. Posteriormente la placa se depositó dentro de la cámara de vidrio que ya contenía un volumen del sistema de eluentes (mezcla de solventes con diferentes polaridades), correspondiente al o los compuestos que por referencia pensamos que dichas muestras contenían, se tapó con la cubierta de vidrio y se dejó correr en posición vertical el tiempo necesario para que la muestra se deslizara por la placa sin permitir que subiera por completo (aproximadamente 0.5 cm del extremo superior).

Inmediatamente se retiró la placa de la cubeta de vidrio y, se llevó a secar en una plancha con calor y si, después de secarse no se revelaron las manchas entonces, la llevamos a una cámara que contenga una lámpara de luz ultravioleta para observarlas y si todavía no se aprecia ninguna mancha procedimos a impregnar la placa mediante aspersión con un agente cromogénico que puede ser cloruro de cobalto, vapores de yodo, etc. La secamos con calor y la llevamos al cuarto oscuro para observarla bajo la lámpara de luz ultravioleta. Por último se midió la relación de frente (rf) que nos marca la distancia que corrió la muestra durante su revelado en la ccd y en base a este valor se determinó mediante tablas el tipo de compuesto que contenía muestra muestra.

### 7. 8. Material Biológico.

Se utilizaron trofozoitos de la cepa IP-1 de *Entamoeba invadens* (Foto 3) los cuales, durante su crecimiento se mantuvieron en tubos de vidrio pyrex de 16 x 125 mm con tapón de rosca los cuales contenían 10 ml del medio de cultivo TYI-S-33 de Diamond e incubados a 25 °C. Semanalmente y antes de alcanzar la fase de crecimiento estacionaria los trofozoitos se sembraron a medio fresco.

### 7. 9. Medio de Crecimiento TYI-S-33 (Diamond, 1978).

Componentes en.....	g/100 ml de agua bidestilada.
Tripticasa (Bioxon).....	2.00
Extracto de levadura (Bioxon).....	1.00
Glucosa (Bioxon).....	1.00
NaCl (Sigma).....	0.20
L-Cisteína (Sigma).....	0.10
Ácido ascórbico (Sigma).....	0.02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma).....	0.06
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma).....	0.10
Citrato férrico de amonio (Sigma).....	0.0028

Se disolvieron todos los componentes en 50 ml de agua bidestilada. Se ajustó el pH a 6.8 con NaOH 10 N y se aforó a un volumen de 100 ml con agua bidestilada. Posteriormente se distribuyó a tubos pyrex con tapón de rosca de 16 x 125 mm, se llevaron a esterilizar a 20 lb/pulg<sup>2</sup> por 15 min. y se almacenaron en refrigeración y cubiertos de la luz para su uso posterior. Antes de inocular los trofozoitos a cada uno de estos tubos se les añadió 1 ml de suero de bovino adulto inactivado y adicionado de vitaminas.

### 7. 10. Solución Salina para Lavado (PBS), (López-Revilla y col, 1976):

Componentes en.....	g/100 ml de agua bidestilada
NaCl (Sigma).....	6.50
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma).....	2.80
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma).....	0.40

Se disolvieron todos los componentes en 950 ml de agua bidestilada. Se ajustó el pH a 7.4 con NaOH 10 N y se aforó a un volumen de 1000 ml con agua bidestilada. posteriormente se distribuyó a botellas lecheras en alícuotas de 100 ml c/u y se etiquetó con las iniciales PBS y con la fecha de su preparación. Se cubrieron con papel aluminio y con los tapones flojos llevamos a la autoclave 15 min. a 20 lb/in<sup>2</sup> posteriormente, se apretaron los tapones y se almacenó a temperatura ambiente con las cubiertas de aluminio para su uso posterior.

### 7. 11. Colorante Vital Azul de Tripaño al 0.5% en PBS:

Componente en.....	g/100 ml de PBS
Colorante azul de tripano (Sigma).....	0.5

Disolver el colorante en 100 ml de solución salina PBS estéril preparada con anterioridad. Posteriormente distribuir a tubos pyrex con tapón de rosca de 18 x 125 mm y almacenar a temperatura ambiente para su uso posterior.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

### 7. 12. Solución Detergente Tritón X-100 al 0.25%:

Componentes en.....	ml/100 ml de agua bidestilada
Tritón X-100 (Sigma).....	0.25 ml

Se disolvieron los 0.25 ml del detergente Tritón X-100 en 100 ml de agua bidestilada. Posteriormente se llevó a esterilizar haciéndose pasar la solución a través de membranas Millipore de 0.2 µm hacia tubos pyrex con tapón de rosca de 18 x 125 mm previamente esterilizados y se almacenaron a temperatura ambiente para su uso posterior.

### 7. 13. Determinación del Número de Células:

Los tubos de cultivo se colocaron en un baño de agua: hielo (0-4 °C) por 10 min. para que se desprendieran las células (trofozoítos) adheridas al tubo. Pasado este tiempo se homogenizó el cultivo suavemente por inversión y, con ayuda de una pipeta Pasteur estéril se tomó una alícuota la cual se depositó en una cámara hematocimétrica de Neubauer y se determinó el número de trofozoítos totales de la misma manera como se cuentan los glóbulos blancos.

#### 7. 14. Cinética de Crecimiento:

Para realizar la resiembra se tomó de la incubadora un tubo fuente en fase de crecimiento exponencial y después de comprobar un buen estado morfológico a través de un microscopio invertido marca Zeiss, se colocó en un baño de agua-hielo (0-4 °C) por 10 min. para que se desprendieran las células (trofozoítos) adheridas al tubo. Pasado este tiempo se homogenizó el cultivo suavemente por inversión y, con ayuda de una pipeta Pasteur estéril se tomó una alícuota la cual se depositó en una cámara hematocimétrica de Neubauer y se determinó el número de trofozoítos totales de la misma manera como se cuentan los glóbulos blancos.

Posteriormente se dispusieron 30 tubos los cuales contenían 10 ml de medio TYI-S-33 y, a cada uno de ellos, se les añadió a partir del tubo fuente un volumen tal que ajustara un inóculo final de  $10^4$  cél/ml, después de la inoculación los tubos se agitaron suavemente e inmediatamente se llevaron a incubar a 25 °C. Diariamente se tomaron de la incubadora tres tubos y se contó su densidad celular de la forma ya descrita en el párrafo anterior y con estos datos se construyó la cinética de crecimiento representativa de nuestros cultivos amibianos testigo o control (Fig. 1).

A partir de la gráfica representativa de la cinética de crecimiento de esta cepa amibiana se hicieron los cálculos necesarios y se determinó su tiempo de duplicación y de generación (López- Revilla y col. 1976).

#### 7. 15. Inducción del Proceso de Enquistamiento:

Precondicionamiento con Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>).

Cultivos con 7 días de incubación en el medio de crecimiento TYI-S-33 se contaron como ya se ha descrito y alícuotas que representaron un inóculo de  $10^4$  trofozoítos/ml finales fueron inoculadas a tubos de 18 x 150 mm que contenían 10 ml de medio TYI-S-33 e inmediatamente se precondicionaron mediante el gaseado con CO<sub>2</sub> de la manera siguiente: Inmediatamente después de hacer el inóculo de los trofozoítos se procedió al gaseado de los mismos con CO<sub>2</sub> para lo cual se utilizó una pipeta Pasteur estéril con un tapón de algodón a través de la cual, se hizo pasar el flujo del gas a cada uno de los tubos por separado empleando un tiempo de burbujeo de dos minutos. Después del gaseado los tubos se llevaron a incubar a 25 °C.

Obtención de Quistes de *Entamoeba in vitro*.

Cultivos con 4 días de edad mantenidos en el medio de crecimiento TYI-S-33 y precondicionados con CO<sub>2</sub> fueron colocados en baño de agua-hielo por 10 min e inmediatamente y en esterilidad se les determinó a cada uno de ellos su densidad celular, posteriormente se centrifugaron a 800 rpm durante 10 min., se les retiró el sobrenadante y la pastilla celular se lavó dos veces con una solución salina balanceada estéril (PBS).

Posteriormente y en esterilidad se vació la suspensión celular a tubos cónicos de policarbonato de 50 ml y se centrifugaron en frío (6-8 °C) a 800 rpm por 10 min. Después con ayuda de una pipeta Pasteur conectada al vacío se les retiró el sobrenadante y a la pastilla celular resultante se le añadió 1 ml de medio de cultivo (TYI-S-33) carente de glucosa, se agitó suavemente para finalmente, aforarlos utilizando el mismo medio carente de glucosa a un volumen de 4 ml.

Por separado y en esterilidad se prepararon tubos de vidrio pyrex con tapón de rosca de 18 x 150 ml los cuales contenían 10 ml de medio TYI-S-33 carente de glucosa y fueron inoculados con 1 ml del paquete celular preparado según el proceso mencionado en el párrafo anterior para dar una concentración celular final de  $5 \times 10^5$ /ml. Inmediatamente después de hacer el inóculo de los trofozoítos se procedió a darles un segundo gaseado con CO<sub>2</sub> siguiendo el mismo procedimiento presentado en el proceso de acondicionamiento y, nuevamente se llevaron a incubar a 25 °C.

#### Evaluación del Enquistamiento Obtenido.

Cada 24 h se tomaron al azar tres tubos de la incubadora y, se llevaron al microscopio invertido para observar el estado de diferenciación de los trofozoítos. Los quistes se distinguieron fácilmente de los trofozoítos puesto que ellos son más pequeños en tamaño y adquieren forma esférica. Después de analizar la morfología de los cultivos se determinó individualmente el contenido celular total (trofozoítos + quistes): se enfriaron en agua hielo por 10 min., se agitaron suavemente para desprender las células de las paredes del tubo y con ayuda de una pipeta Pasteur estéril se tomó una alícuota la cual se colocó en un hematímetro y así determinar el número de células totales contenidas por tubo (Foto 4).

Posteriormente los tubos se centrifugaron a 800 rpm por 10 min., se les retiró el sobrenadante e inmediatamente la pastilla celular resultante se mezcló con 4 ml de detergente tritón X-100 al 0.25% estéril, se agitaron suavemente y se dejó por 3 min. el contacto de las células con el detergente y por último se le añadió el colorante vital azul de tripano para después proceder a contar nuevamente. Las células que resistieron el contacto con el detergente fueron las que lograron diferenciarse de trofozoito a quiste puesto que estos últimos están cubiertos de una pared que los hace resistente a un medio exterior adverso no así el trofozoito cuya frágil membrana no resiste el contacto con el detergente. Los quistes que se tiñeron con el colorante no se contaron ya que el hecho de que hubieran absorbido el colorante indicaba que poseían una pared inmadura o rota.

#### Cinética de enquistamiento de los trofozoítos de *E. invadens*.

A partir de los datos de densidad celular de trofozoítos y quistes obtenidos en el punto anterior se construyó una cinética o curva de enquistamiento que representó el comportamiento de los trofozoítos amibianos sometidos al proceso de enquistamiento así como la aparición y el aumento de los quistes producidos en este medio condicionante (Fig. 4).

#### 7. 16. Inducción del Proceso de Desenquistamiento.

##### Diferenciación de Quiste a Trofozoito.

Los quistes obtenidos y que resultaron resistentes al detergente fueron empleados en este estudio. Los tubos que contenían los quistes resistentes al detergente fueron sometidos a un doble proceso de lavado con PBS estéril, posteriormente se contaron para emplearlos en esta prueba de desenquistamiento: quistes ( $10^5$ /ml) obtenidos de cultivos con 72 h en el proceso de enquistamiento fueron inoculados en el medio de crecimiento TYI-S-33 completo e inmediatamente se llevaron a incubar a 25 °C.

Comportamiento de los trofozoítos obtenidos.

Después de un mes de la propagación y mantenimiento en cultivo de los trofozoítos desenquistados en el proceso de diferenciación celular de desenquistamiento ambiano estos, fueron utilizados para correr una cinética de crecimiento. Se prepararon 30 tubos pyrex de 16 x 125 mm con 10 ml de medio de crecimiento TYI-S-33 completo los cuales, se inocularon individualmente con  $10^4$  trofozoítos/ml empleando para ello los trofozoítos propagados a partir de los quistes cosechados en este estudio e inmediatamente se llevaron a incubar a 25 °C. Diariamente se tomaron tres tubos y, se determinó su densidad celular y con estos datos se construyó una curva de crecimiento utilizando como control a trofozoítos de la misma cepa los cuales habían sido manipulados para estos estudios de diferenciación celular.

#### **7. 17. Inhibición Producida por la *Castela texana* sobre los Procesos de Enquistamiento y/o Desenquistamiento Amibiano:**

Después de aislar los diferentes extractos, fracciones o compuestos a partir de la planta en estudio se procedió a evaluar su capacidad para inhibir el o los procesos de diferenciación de *Eutamoeba invadens*.

**Inhibición sobre el Proceso de Diferenciación de Trofozoito a Quiste (Enquistamiento):**

Después de obtener nuestra muestra ya sea extracto, fracción o compuesto de la planta en estudio se procedió a evaluar su capacidad inhibitoria sobre el proceso de enquistamiento de *E. invadens* cepa IP-1:

Primeramente se preparó una solución concentrada (100 µg/ml) de cada uno de los extractos a probar. Para esto se disolvieron con agitación constante 100 mg de la muestra en 1000 ml del medio de cultivo TYI-S-33 carente de glucosa y a partir, de esta solución madre se hicieron diluciones seriadas de 10 en 10 empleando el mismo medio de cultivo para obtener las concentraciones (100, 10, 1.0 y 0.1 µg/ml) de los diferentes extractos, fracciones o compuestos obtenidos de la planta. Estas soluciones fueron, posteriormente esterilizadas por filtración haciéndolas pasar través de membranas marca Gelman con poro de 0.2 µm. Inmediatamente se les añadió el suero de bovino al 10 % y, se llevaron a incubar por 48h a 36 °C como prueba de su esterilidad antes de su uso en este estudio.

Pasada la prueba de esterilidad se procedió a someter a los trofozoítos al proceso de inducción del enquistamiento según el método mencionado en el párrafo correspondiente en este texto empleando como el medio de cultivo inductor del enquistamiento a las soluciones de TYI-33 carente de glucosa preparadas con las diferentes concentraciones ya sea de los extractos, fracciones o compuestos de la planta en estudio. Inmediatamente después de hacer el inóculo de los trofozoítos se procedió al gaseado de los mismos con CO<sub>2</sub> haciendo pasar el flujo del gas a cada uno de los tubos por separado empleando un tiempo burbujeo de dos minutos para posteriormente llevarlos a incubar a 25 °C.

Cada 24 h se tomaron de la incubadora tres tubos por tipo de extracto, fracción o compuesto y por concentración de cada uno de ellos más, tres del cultivo testigo (TYI-S-33 carente de glucosa sin ninguna muestra de la planta), se llevaron al microscopio para su observación morfológica y se siguió la metodología indicada en esta sección para evaluar el grado de enquistamiento obtenido con el extracto a prueba en sus diferentes concentraciones.

Con estos resultados, se hicieron los cálculos necesarios para evaluar la capacidad inhibitoria de esta fracción de la planta. Una solución era considerada inhibitoria si era capaz de producir una inhibición del proceso de enquistamiento del cultivo en un 50 % o más en comparación con el porcentaje de enquistamiento de nuestro cultivo control.

#### **Inhibición sobre el Proceso de Diferenciación de Quiste a Trofozoíto(Desenquistamiento):**

Los quistes producidos en presencia de las diferentes concentraciones del extracto, fracción o compuestos aislados de la *C. texana* y que resultaron resistentes al detergente fueron utilizados posteriormente para la prueba de desenquistamiento. En este estudio se siguió con el mismo procedimiento mencionado en este texto para la inducción del enquistamiento ambiano.

Primeramente las muestras o tubos que contengan los quistes en detergente se sometieron a un doble proceso de lavado con agua bidestilada estéril, posteriormente se contó el contenido (número) de quistes y se preparó o concentró un inóculo de  $10^5$  quistes /ml los mismos que posteriormente fueron inoculados en el medio de crecimiento TYI-S-33 completo e inmediatamente se llevaron a incubar a 25 °C. Diariamente se observaron estos cultivos al microscopio y si llegaron a formar un cultivo en confluencia se procedió a su resiembra para después de 4 semanas construir su curva característica de crecimiento y compararla con una curva típica y representativa de cultivos que no han estado en presencia de ningún metabolito o muestra de la planta.

Esta prueba también determinó la viabilidad de los quistes cosechados puesto que los quistes que fueron capaces de diferenciarse nuevamente a trofozoítos son considerados como viables. Además, los trofozoítos obtenidos por este método se identificaron y trataron como cultivos por separado ya que no se deben de mezclar con nuestros cultivos testigo.

#### **Comportamiento de los Trofozoítos obtenidos por Desenquistamiento:**

Después de un mes de la propagación y mantenimiento en cultivo de estos trofozoítos se utilizaron para propagarlos y determinar una crecimiento en comparación con el de nuestros cultivos testigo: Se inocularon ( $10^4$  trofozoítos/ml) en tubos pyrex de 16 x 125 mm con 10 ml de medio TYI-S-33 adicionado de suero de bovino al 10% y se llevaron a incubar a 25 °C. Diariamente se tomaron tres tubos y se determinó su densidad celular (trofozoítos/ml) y con estos datos se construyó una curva de crecimiento utilizando como control a trofozoítos de la cepa original.

#### **7. 18. Concentración Óptima de *Castela texana* que sea capaz de Inhibir el Enquistamiento pero no el Crecimiento de los Cultivos de Trofozoítos Amibianos:**

Después de determinar que la *Castela texana* sí fue capaz de inhibir el proceso de diferenciación de los trofozoítos amibianos nos interesó determinar si esta actividad inhibitoria se debía a que si inicialmente afectaba el crecimiento de los trofozoítos en cultivo impidiéndoles después su diferenciación a quiste.

Para aclarar esta duda se procedió primero a determinar la concentración mínima de la *Castela texana* que estando en contacto con los cultivos de trofozoítos no afectara su crecimiento. Para ello, primeramente se realizó la cinética de crecimiento de los trofozoítos de *E. invadens* en presencia de diferentes concentraciones del extracto activo de la planta en estudio en comparación con una curva testigo que representó la cinética de crecimiento típico de los trofozoítos de esta cepa amibiana.

Inicialmente la dosis necesaria para producir el mínimo efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las amibas se calculó de curvas dosis-respuesta para el extracto metanólico activo.

Con este estudio se determinó la concentración mínima del extracto activo que no afectaba el crecimiento de los trofozoítos. Posteriormente los trofozoítos que habían estado en contacto con esta concentración del extracto activo se pasaron al proceso de enquistamiento para confirmar que esta concentración aunque no afecta el crecimiento de los trofozoítos sí inhibe su diferenciación a quiste.

#### **7. 19. Actividad de la Chaparrina, Emetina y Tinidazol sobre el Crecimiento de *Entamoeba invadens*:**

Después de determinar que la *Castela texana* sí fue capaz de inhibir el proceso de diferenciación de los trofozoítos amibianos nos interesó hacer un estudio comparativo entre la actividad de la chaparrina con la actividad de otros compuestos o drogas antiamebianas en uso clínico.

Así, además del compuesto puro (chaparrina) aislado de esta planta añadimos en el estudio otras drogas con actividad antiamebiana reconocida: emetina, fuerte inhibidor de la síntesis de proteínas tanto en *E. histolytica* como en *E. invadens* (Segura JJ y López-Revilla, 1976) y el tinidazol, un derivado del imidazol utilizado en el tratamiento de la amebiasis de tipo intestinal así también como en la extraintestinal (Powell y Elsdon-Dew, 1972).

Primeramente se realizó la cinética de crecimiento de los trofozoítos de *E. invadens* en presencia de diferentes concentraciones [1.0-100 mM] de estos tres diferentes compuestos en comparación con nuestra curva de crecimiento de un cultivo testigo el cual representó el crecimiento típico de los trofozoítos de esta cepa amebiana. Este estudio fue con la finalidad de corroborar los reportes de que estas drogas de uso antiamebiano actúan solo sobre el trofozoíto o fase móvil de este parásito.

#### **7. 20. Actividad de la Chaparrina y de la Rifampicina sobre el Proceso de Enquistamiento de *Entamoeba invadens*.**

Tomando en consideración que la RNA polimerasa es una enzima reconocida como responsable de la diferenciación celular en algunos organismos (Wehrlí y col., 1968) y si la rifampicina actúa como una droga inhibidora del DNA dependiente de la RNA polimerasa procedimos, a emplear esta droga como control para tratar de evaluar el probable mecanismo de acción que la *C. texana* emplea para inhibir la citodiferenciación de *E. invadens*.

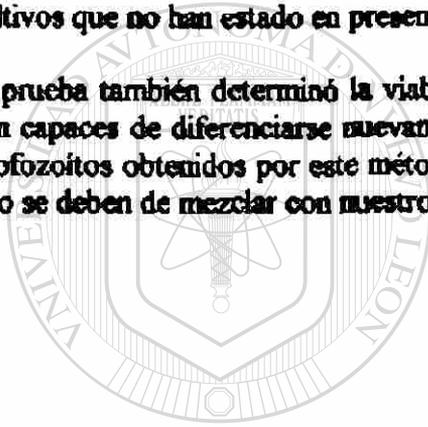
Para ello se indujo la diferenciación celular de trofozoítos amibianos en presencia de diferentes concentraciones de chaparrina y de rifampicina [0.1-10mM] para determinar si la rifampicina igual que la chaparrina, actuaba como un compuesto inhibidor del proceso del enquistamiento de este parásito.

## **7. 21. Actividad del Extracto Metabólico y de la Chaparrina Aislados de la castela texana sobre el Proceso de Desenquistamiento de *E. invadens*.**

Los quistes producidos en presencia de las diferentes concentraciones del extracto o de la chaparrina aislados de la *C. texana* y que resultaron resistentes al detergente fueron utilizados posteriormente para la prueba de desenquistamiento. En este estudio se siguió con el mismo procedimiento mencionado en la sección 7.15, de material y métodos para la inducción del enquistamiento ambiental.

Primeramente las muestras o tubos que contengan los quistes en detergente se sometieron a un doble proceso de lavado con agua bidestilada estéril, posteriormente se contó el contenido (número) de quistes y se preparó o concentró un inóculo de  $10^5$  quistes /ml los mismos que posteriormente fueron inoculados en el medio de crecimiento TYI-S-33 completo e inmediatamente se llevaron a incubar a 25 °C. Diariamente se observaron estos cultivos al microscopio y si llegaron a formar un cultivo en confluencia se procedió a su resiembra para después de 4 semanas construir su curva característica de crecimiento y compararla con una curva típica y representativa de cultivos que no han estado en presencia de ningún metabolito o muestra de la planta.

Esta prueba también determinó la viabilidad de los quistes cosechados puesto que los quistes que fueron capaces de diferenciarse nuevamente a trofozoitos son considerados como viables. Además, los trofozoitos obtenidos por este método se identificaron y trataron como cultivos por separado ya que no se deben de mezclar con nuestros cultivos testigo.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Cinética de Crecimiento de *E. invadens*.

La cinética de crecimiento de *E. invadens* se muestra en la Figura No. 1, en la cual se puede observar que el máximo de la fase logarítmica de crecimiento de los trofozoitos en el medio de crecimiento de Diamond se alcanzó a los 7 días de incubación (Foto No. 3), con un rendimiento celular final de  $2 \times 10^5$  células/ml y con un tiempo de duplicación de aproximadamente 25 h. La cinética de crecimiento obtenida resultó muy semejante en su pendiente y en su rendimiento a las obtenidas con trofozoitos de *E. invadens* de la misma cepa cultivados *in vitro* y reportados por otros autores en trabajos anteriores (Portillo, 1992).

Cálculos:

T duplicación =  $\ln 2 \times T$  generación. Donde:

T generación =  $1/k$

$k = \frac{\ln A/A_0}{\text{Tiempo(h)}}$

A = Número de células/ml al tiempo (7 días) que se alcanzó el máximo de la fase logarítmica.

A<sub>0</sub> = Número de células/ml al tiempo cero (día 0).

Tiempo = tiempo (días) en el que se alcanzó el máximo de la fase logarítmica = 7 días.

$$k = \frac{\ln(20 \times 10^4) / (0.2 \times 10^4)}{7 \text{ d } (24 \text{ h/1d})} = \frac{\ln 100}{168} = \frac{4.6}{168} = 0.027$$

$$T \text{ generación} = 1/k = 1/0.027 = 36.5 \text{ h}$$

$$T \text{ duplicación} = \ln 2 T \text{ generación} = 0.69 (36.5) = 25.2 \text{ h.}$$

3.2. Cinética de Multiplicación de *E. invadens*.

La inoculación de las trofozoítas de *E. invadens*, cepa IP-1 en el medio de cultivo sintético en placas y gomas Petri-Coxo a una concentración de  $10^3$  trofozoítas/ml, produjo un crecimiento relativo al cual pudo ser determinado a las 24 h (Figura No. 1). A las 48 h se obtuvo una población de cuatro veces superior al número de trofozoítas inoculadas. Los datos obtenidos en estas pruebas, bajo el control de que estas células fueran capaces de realizar la acción del flagelo (orden x-100) y se observó una pérdida de vitalidad de los mismos después de estar en contacto con el medio de cultivo sintético, después de haber producido.

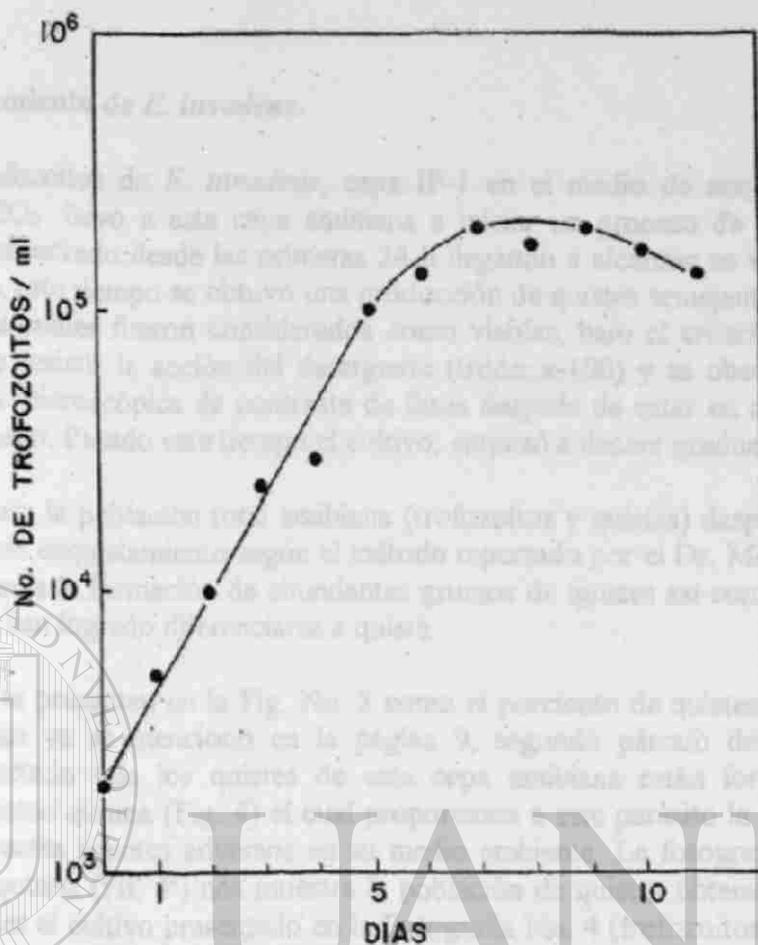
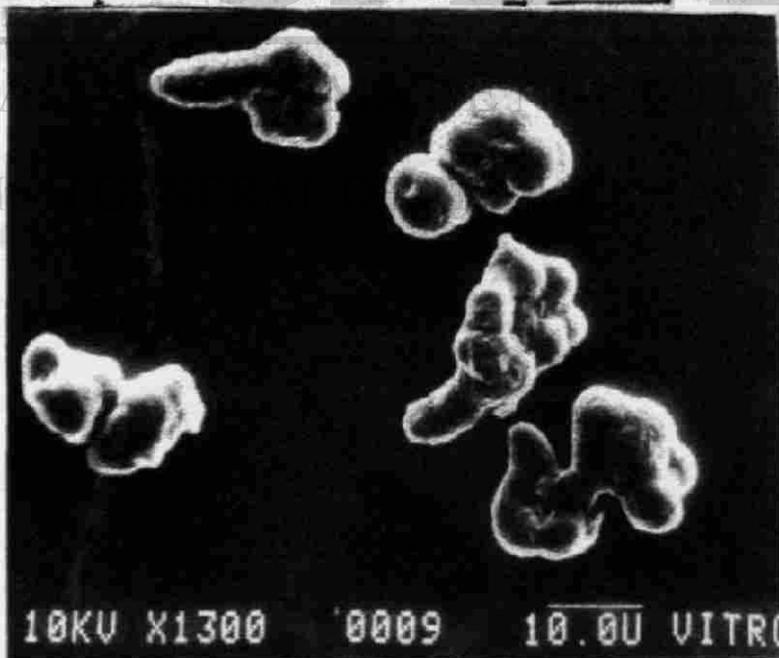


FIGURA No. 1 GINETICA DE CRECIMIENTO DE *E. invadens*, CEPA IP-1



10KV X1300 0009 10.00 VITRO

FOTOGRAFIA No.3 TROFOZOITOS DE *E. invadens*, CEPA IP-1.

### 3.2. Cinética de Enquistamiento de *E. invadens*.

La incubación de los trofozoitos de *E. invadens*, cepa IP-1 en el medio de enquistamiento sin glucosa y gaseado con CO<sub>2</sub> llevó a esta cepa amibiana a iniciar un proceso de enquistamiento masivo el cual pudo ser observado desde las primeras 24 h llegando a alcanzar su valor máximo a las 96 h (Figura No. 2). A este tiempo se obtuvo una producción de quistes semejante al número de trofozoitos inoculados los cuales fueron considerados como viables, bajo el criterio de que estas células fueron capaces de resistir la acción del detergente (tritón x-100) y se observó una pared refringente bajo la técnica microscópica de contraste de fases después de estar en contacto con el colorante vital azul de tripano. Pasado este tiempo el cultivo, empezó a decaer gradualmente.

La fotografía No. 4 muestra la población total amibiana (trofozoitos y quistes) después de 72 h de haber iniciado el proceso de enquistamiento según el método reportado por el Dr. Morales-Vallarta. En esta fotografía, se aprecia la formación de abundantes grumos de quistes así como, la presencia de trofozoitos que aún no han logrado diferenciarse a quiste.

Estos mismos resultados se presentan en la Fig. No. 3 como el porcentaje de quistes producidos en función del tiempo. Como ya se mencionó en la página 9, segundo párrafo de la sección de antecedentes, se ha reportado que los quistes de esta cepa amibiana están formados por un polisacárido reconocido como quitina (Fig. 4) el cual proporciona a este parásito la capacidad para resistir el ataque de diferentes agentes adversos en su medio ambiente. La fotografía adjunta a la estructura química de la quitina (Fig. 4<sup>a</sup>) nos muestra la población de quistes obtenida en forma de grumos después de someter el cultivo presentado en la Fotografía No. 4 (trofozoitos + quistes) a la acción del detergente (tritón x-100) por un tiempo de 3 min. Este detergente, tiene la propiedad de destruir las membranas celulares por lo que los trofozoitos que aún no habían logrado diferenciarse así como los quistes inmaduros que aún no habían terminado de construir su pared rígida protectora, fueron totalmente destruidos quedando solo una población de quistes viables y maduros.

Considerando que la mayor producción de quistes viables se obtuvo después de las 48 h (Fig. 2) se decidió utilizar en los experimentos siguientes, solo quistes cosechados a las 72 h de incubación en nuestro medio de enquistamiento.

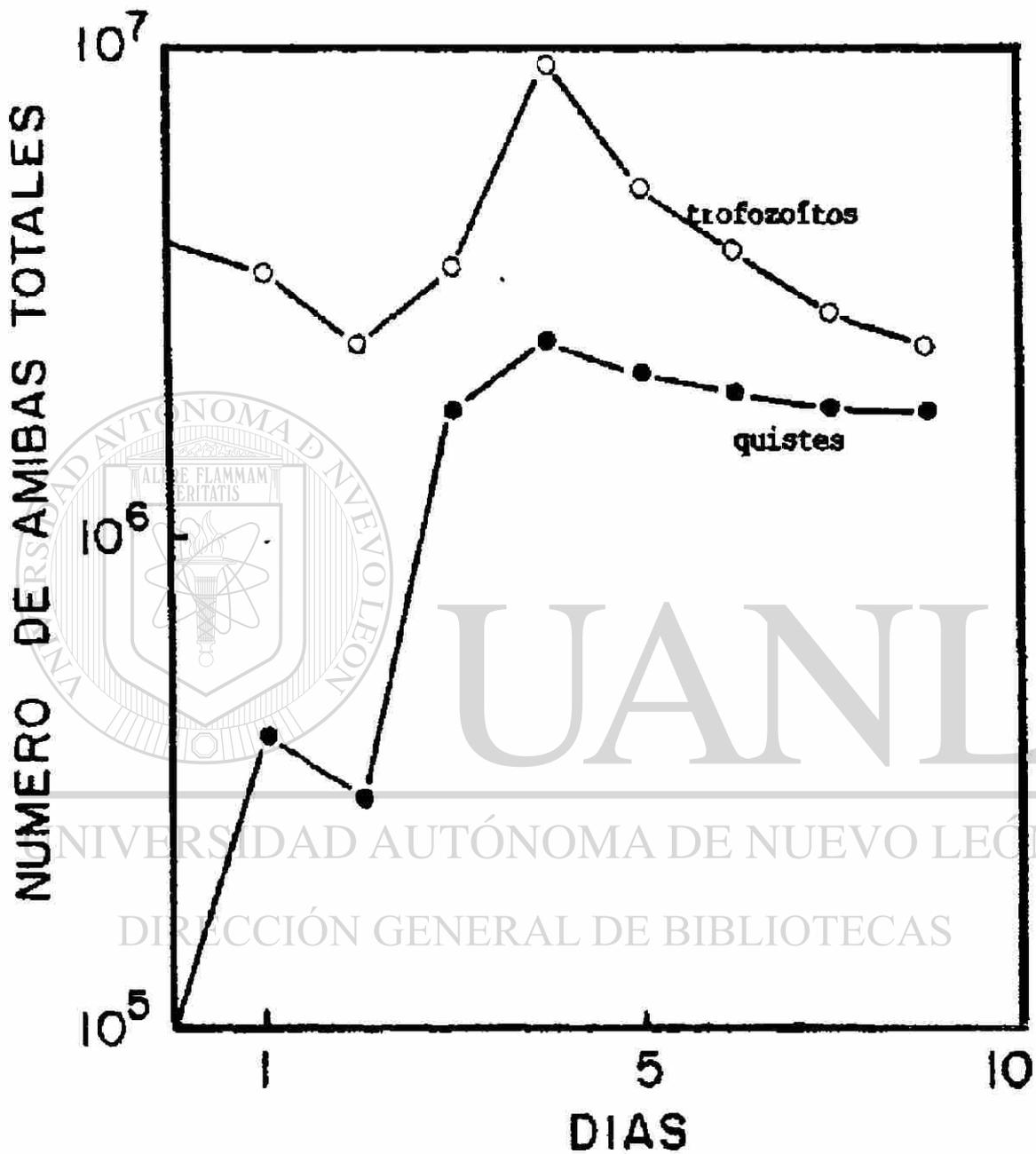
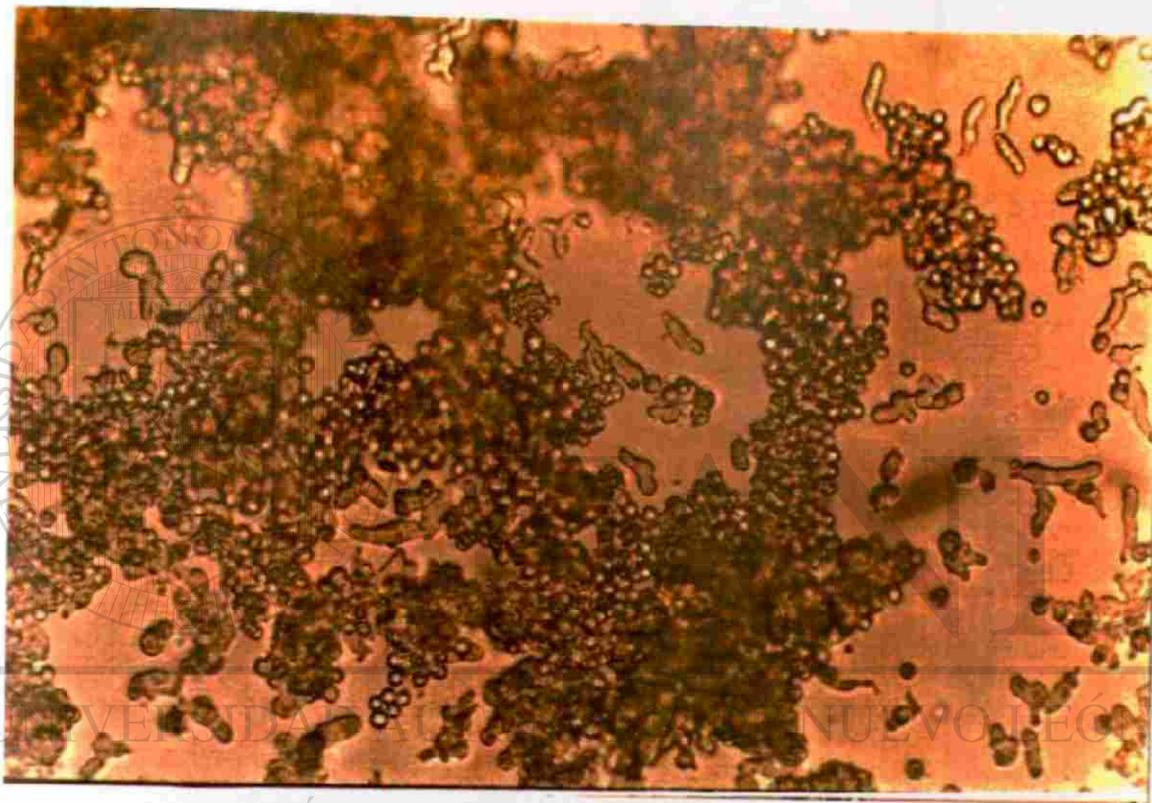


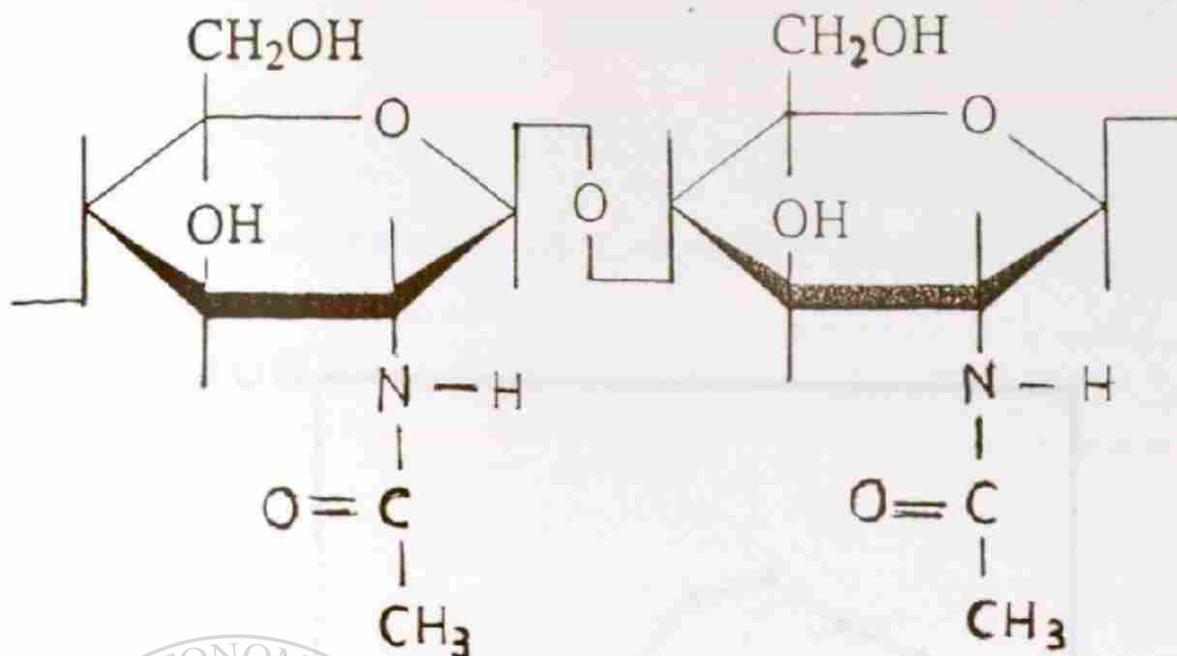
FIGURA No. 2 CINETICA DE ENQUILSTAMIENTO DE LA CEPA IP-1  
DE Entamoeba invadens.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

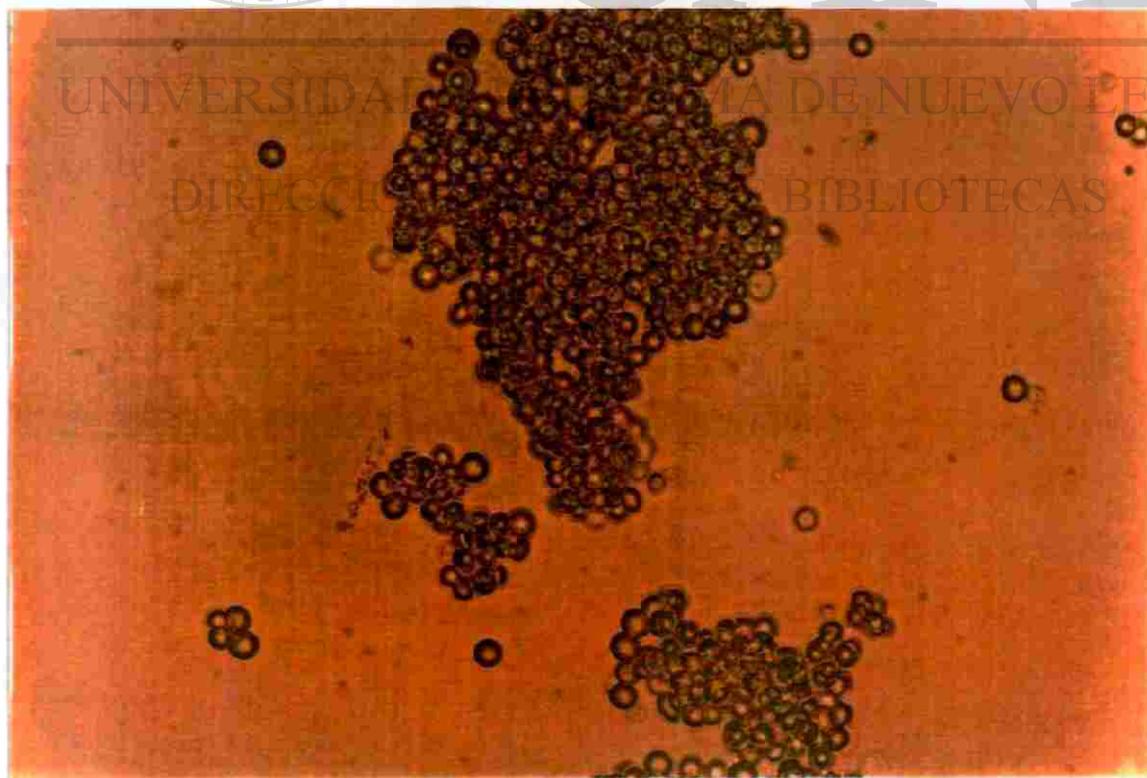
FOTOGRAFIA No. 4 POBLACION AMIBIANA DE TROFOZOITOS Y QUISTES

DE E. invadens, CEPA IP-1.



Quitina  
(NAG- $\beta(1-4)$ -NAG repetido)

FIGURA No. 4 ESTRUCTURA QUIMICA DE LA QUITINA.



FOTOGRAFIA 4a. GRUMOS DE QUISTES DE E. invadens.

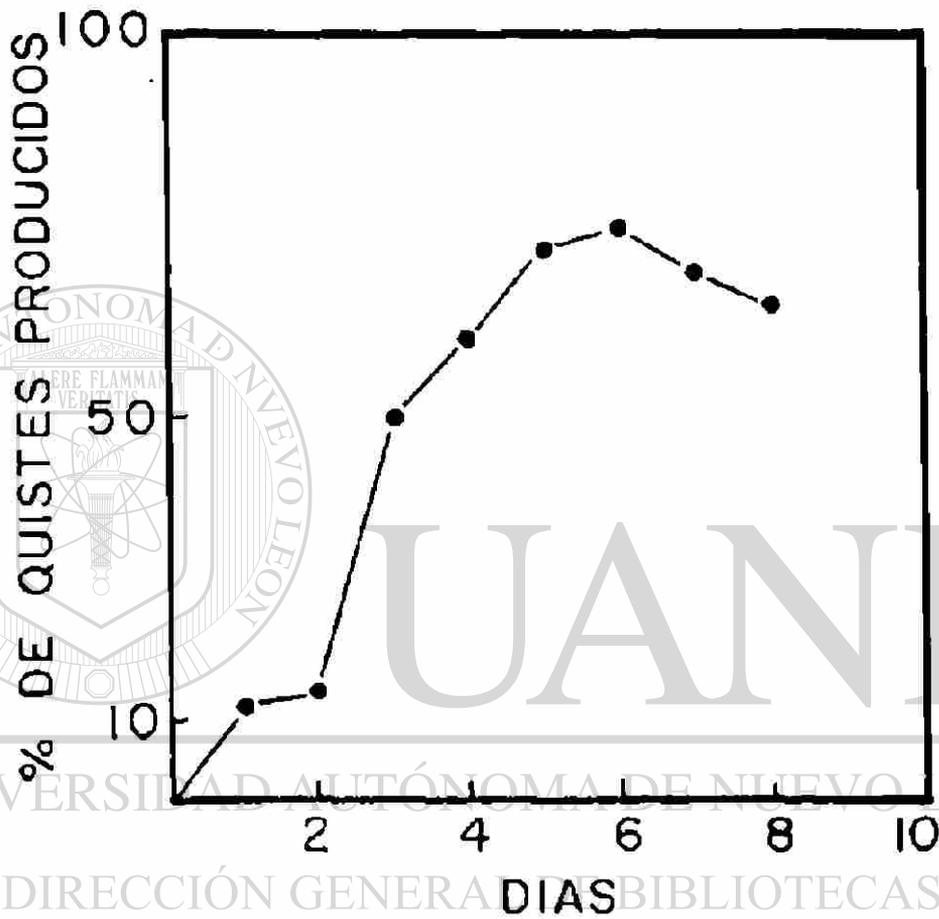
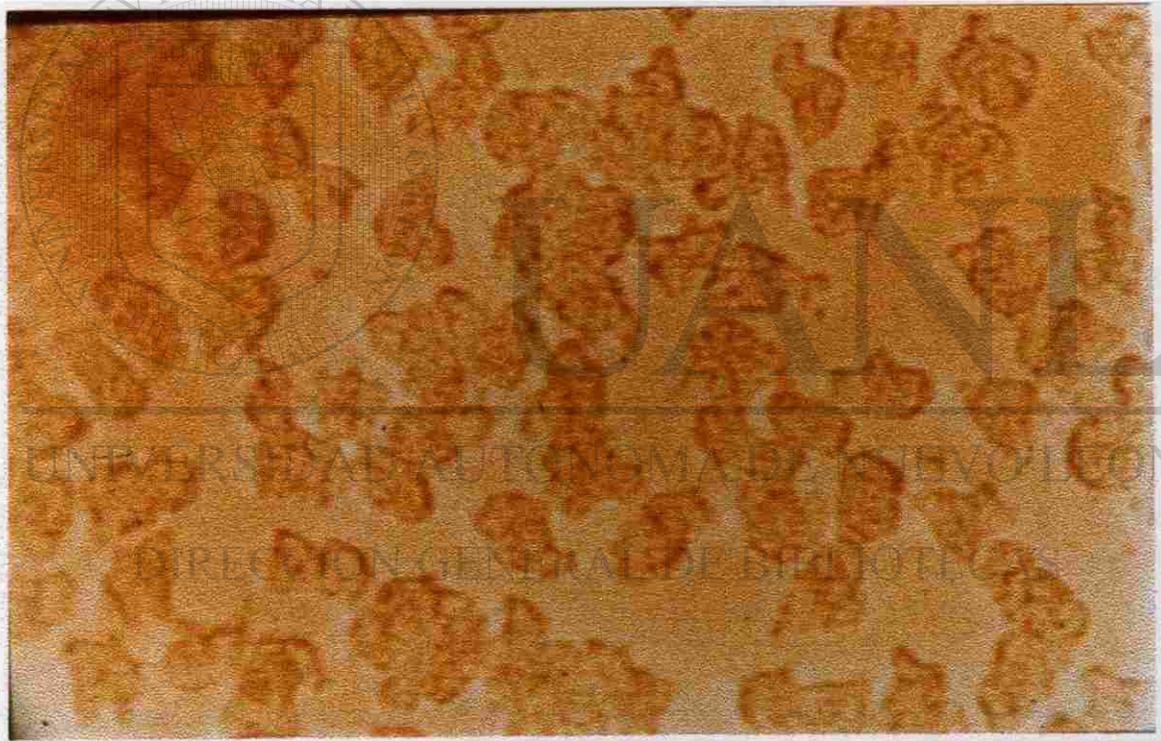


FIGURA No. 3 PORCIENTO DE QUISTES PRODUCIDOS DURANTE EL ENQUISTAMIENTO DE LA CEPA IP-1 DE *E. invadens*.

### **8.3.Desenquistamiento de *Entamoeba invadens*.**

Los quistes cosechados a este tiempo óptimo (72 h) fueron posteriormente sometidos a varios procesos de lavado empleando para ello la solución salina PBS preparada y esterilizada con anterioridad para después, transferirlos al medio de crecimiento TYI-S-33 de Diamond y determinar su capacidad de desenquistamiento o de diferenciación nuevamente a trofozoitos.

Pocas horas después (12 h) de sembrar un paquete de aproximadamente  $10^5$  quistes/ml a dicho medio de cultivo se pudieron distinguir claramente con la ayuda de un microscopio invertido empleando la técnica microscópica de contraste de fases la aparición de los primeros trofozoitos móviles los cuales, fueron capaces de crecer y de llegar a formar cultivos en confluencia en un tiempo de aproximadamente 10 días (Fotografía No.27).



**FOTOGRAFIA No.27.**

#### **8.4. Estudios Fitoquímicos con *Castela texana*.**

Tomando en consideración que en estudios previos se había encontrado que en la raíz de la *Castela texana* se encuentran concentrados los metabolitos activos procedimos a trabajar con esta parte de la planta.

**8.4.1.** A partir de 1 kilogramo de la raíz de la planta seca y molida se obtuvieron 100 mg del extracto acuoso lo cual representó, un 1% de recuperación en relación con la cantidad de material de la planta extraído .

**8.4.2.** A partir de 500 g de la raíz de la planta seca y molida se obtuvieron 25 g de extracto metanólico lo cual representó, una recuperación del 5% en relación con peso de la raíz extraída.

**8.4.3.** Aunque la población que refiere el uso de esta planta como tratamiento para la amibiasis acostumbra tomar el extracto o cocimiento acuoso de la misma. Si consideramos, que el metanol y el agua son solventes de alta polaridad por lo que poseen la propiedad de extraer casi el mismo tipo de compuestos químicos además, si tomamos en cuenta nuestros resultados presentados en los puntos anteriores 4.1 y 4.2 donde observamos que el extracto metanólico nos proporciona una recuperación 5 veces mayor a la obtenida en comparación con la recuperación obtenida con el extracto acuoso entonces, decidimos continuar con el estudio fitoquímico de este extracto metanólico para realizar los estudios de su actividad sobre el proceso de enquistamiento de la amiba.

---

En la tabla No. 4 se presenta la cromatografía en capa delgada practicada al extracto metanólico activo aislado de la raíz de la *Castela texana* la cual, se corrió con un sistema de revelado de dicloruro de metileno:metanol, (9:1, v.v). En esta tabla podemos apreciar el revelado de 9 manchas de las cuales, 7 se pudieron observar con el uso de luz ultravioleta y dos con más con el de dicloruro de cobalto como agentes cromatogénicos.

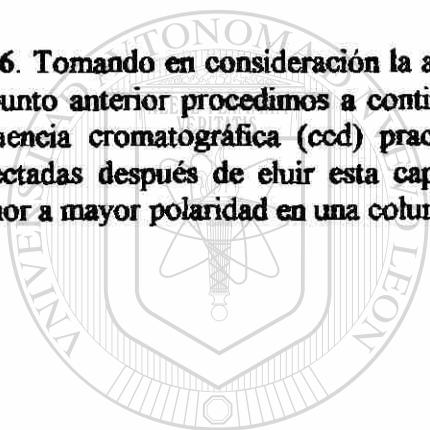
**8.4.4.** Con las reacciones coloridas practicadas al extracto metanólico de la *C. texana* se logró determinar que este extracto posee diferentes compuestos químicos como son: sesquiterpenlactonas, simaroubolidanos y algunas instauraciones como se puede apreciar en la Tabla No. 4.

**Tabla 4. Cromatografía en Capa Delgada (ccd) y Pruebas Coloridas Realizadas al Extracto Metanólico Aislado de la Raíz de la *Castela texana*.**

<b>UV</b>	<b>CoCl<sub>2</sub></b>	<b>Rf</b>
--	café	0.98
--	café	0.80
amarilla	--	0.59
azúl	--	0.51
gris	--	0.42
amarilla	--	0.35
amarilla	--	0.25
azul	--	0.19
amarilla	--	0.13
<b>Cumarinas</b>	<b>Ehrlich</b>	<b>(-)</b>
<b>Alcaloides</b>	<b>Drangendroff</b>	<b>(-)</b>
	<b>Wagner</b>	<b>(-)</b>
<b>Sesquiterpenlactonas</b>	<b>Legal</b>	<b>(+)</b>
	<b>Baljet</b>	<b>(+)</b>
<b>Simaroubolidanos</b>	<b>Ácido sulfúrico</b>	<b>(+)</b>
<b>Insaturaciones</b>	<b>KMnO<sub>4</sub></b>	<b>(+)</b>
	<b>Bromo</b>	<b>(+)</b>
<b>Flavonoides</b>	<b>Shinoda</b>	<b>(-)</b>

**8.4.5.** Posteriormente para fraccionar el extracto metanólico aislado según el punto 8.4.2. de esta sección la totalidad del extracto obtenido se depositó dentro de un embudo de separación de 1 litro de capacidad y, se le añadió una mezcla de solventes: ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$ , 3:1, v:v) y, posteriormente se le aplicó una agitación vigorosa y constante. Se dejó reposar aproximadamente por 10 min. y pasado este tiempo se pudo observar la formación de dos fases claramente definidas (acuosa y diclorometano) además, de una tercera interfase de color café claro de apariencia granulosa la cual, resultó insoluble tanto en el dicloruro de metilo como en el agua (Foto 17) por lo que se le denominó fase intermedia. Después de separar, secar y pesar estas tres fracciones, obtuvimos, 16 g de la fracción intermedia, lo cual representó un 0.8% de recuperación en relación con el total del material de la planta manejado desde el inicio del estudio. Estas tres fracciones colectadas de la separación del extracto metabólico fueron posteriormente probadas en relación con su capacidad para inhibir el proceso de enquistamiento de *E. invadens*.

**8.4.6.** Tomando en consideración la actividad presentada por esta fracción intermedia aislada según el punto anterior procedimos a continuar con su separación. Así, en la tabla No. 6 se presenta la secuencia cromatográfica (ccd) practicada a aproximadamente 110 fracciones (de 125 ml c/u) colectadas después de eluir esta capa intermedia activa con diferentes sistemas de solventes de menor a mayor polaridad en una columna de cromatografía líquida (Fotos 18y 19).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Tabla 6. Secuencia Cromatográfica de las Fracciones Colectadas de la Cromatografía en Columna Líquida realizada a la Fase Intermedia aislada del Extracto Metanólico de la *Castela texana*.**

<b>Fracción (de 250 ml c/u)</b>	<b>Eluente de menor a mayor polaridad</b>	<b>Observaciones</b>
1-2	Hexano	ningún residuo
3-6	Hexano:acetona, (9:1)	“
7-8	“ (8:2)	“
9-11	“ (7:3)	“
12-14	“ (6:4)	“
15-17	“ (1:1)	“
18-40	Acetona	“
41-65	Acetona:metanol, (9:1)	precipitado blanco
66-78	“ (8:2)	“
79-90	“ (1:1)	“
91-109	Metanol	ningún residuo

**8.4.7.** Se logró el aislamiento de un compuesto puro reconocido como chaparrina (Fig. 8): Durante la etapa del manejo de la cromatografía en columna líquida se observó que al aumentar la polaridad del sistema de eluentes de acetona pura a otro de acetona-metanol 9:1, v:v, de mayor polaridad se empezó a formar un precipitado de color blanco amarillento y consistencia polvorienta, el cual, se fue colectando durante toda esta parte del proceso de extracción hasta que dejó de aparecer cuando se fue aumentando la polaridad del eluyente hasta llegar a metanol puro. Este precipitado de color blanco amarillento fue sometido a un proceso de lavados con acetona y posteriormente se le practicó una ccd la cual reveló la presencia de un solo compuesto pero todavía con algunas impurezas.

Para eliminarle las impurezas se sometió posteriormente a lavados cuidadosos con metanol caliente lográndose así, purificar y aislar 100 mg de un polvo color blanco con lo cual obtuvimos una recuperación del 0.005% de este compuesto en relación con el peso de la muestra de planta manejada desde un inicio.

A este material se le practicó una ccd en un sistema de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MetOH (9:1, v:v), la cual fue después revelada empleando como agente cromogénico el compuesto dicloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ) obteniéndose una mancha de color amarillo-café y que marcó un factor de corrimiento o  $R_f$  de 0.60 el cual correspondió perfectamente con el  $R_f$  de nuestro compuesto control empleado (la chaparrina).

Estos resultados cromatográficos fueron posteriormente confirmados mediante otros tipos de pruebas:

**a. Físicas:** Determinación de su punto de fusión = 278-290 °C.

**b. Químicas:**

Prueba para la identificación de compuestos de tipo Simaroubolidano: El precipitado dio una coloración azul intensa al ponerse en contacto con ácido sulfúrico concentrado.

**c. Pruebas Espectroscópicas:**

La Figura No. 9 nos muestra el espectro infrarrojo (IR) obtenido con la muestra del precipitado aislado. Se utilizó un espectrofotómetro marca Perkin-Elmer 137, un Beckman 4240 y un espectrofotómetro infrarrojo de Transformadas de Fourier Perkin Elmer, 1710 FTIR. Los espectros se corrieron en fase sólida en pastilla de KBr. Los resultados fueron:

IR:  $\text{cm}^{-1}$ : 3 400 (m), 1740 (i), 1470 m, 1370 (m), 1240 (m), 1030 (m).

La Figura No. 10 representa el espectro de resonancia magnética nuclear (NMR) practicado al precipitado aislado en este punto del estudio. Se utilizó un aparato Varian EM 360Å de 60 mhz y un MNR de 400 mhz utilizándose como referencia interna tetrametilsilano y como disolvente deuterocloroformo.

## Figura No 8. Identificación de la Chaparrina.

---

100 mg de un polvo blanco (0.005% de recuperación).

Su ccd con un sistema con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MetOH (9:1, v:v) después de revelarla con dicloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ) dio una mancha de color amarillo-café con un Rf de 0.60 el cual correspondió al Rf de nuestra chaparrina utilizada como control.

**Prueba Física:** Punto de fusión = 278-290 °C.

**Pruebas Químicas:** Reacción colorimétrica para la identificación de compuestos de tipo Simaroubolidano: Dio la coloración azul intensa al ponerlo en contacto con ácido sulfúrico concentrado.

### **Pruebas Espectroscópicas:**

La Figura No. 9 nos muestra el espectro infrarrojo (IR) obtenido con la muestra de chaparrina aislada. Se utilizó un espectrofotómetro marca Perkin-Elmer 137, un Beckman 4240 y un espectrofotómetro infrarrojo de Transformada y Fourier Perkin Elmer, 1710 FTIR. Los espectros se corrieron en fase sólida en pastilla de KBr. Los resultados son:  
IR:  $\text{cm}^{-1}$ : 3 400 (m), 1740 (i), 1470 m, 1370 (m), 1240 (m), 1030 (m).

La Figura No. 10 representa el espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) obtenido con la chaparrina aislada en este estudio. Se utilizó un aparato Varian EM 360A de 60 mhz y un MNR de 400 mhz utilizándose como referencia interna tetrametilsilano y como disolvente deuterocloroformo.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

REF. VALUES :

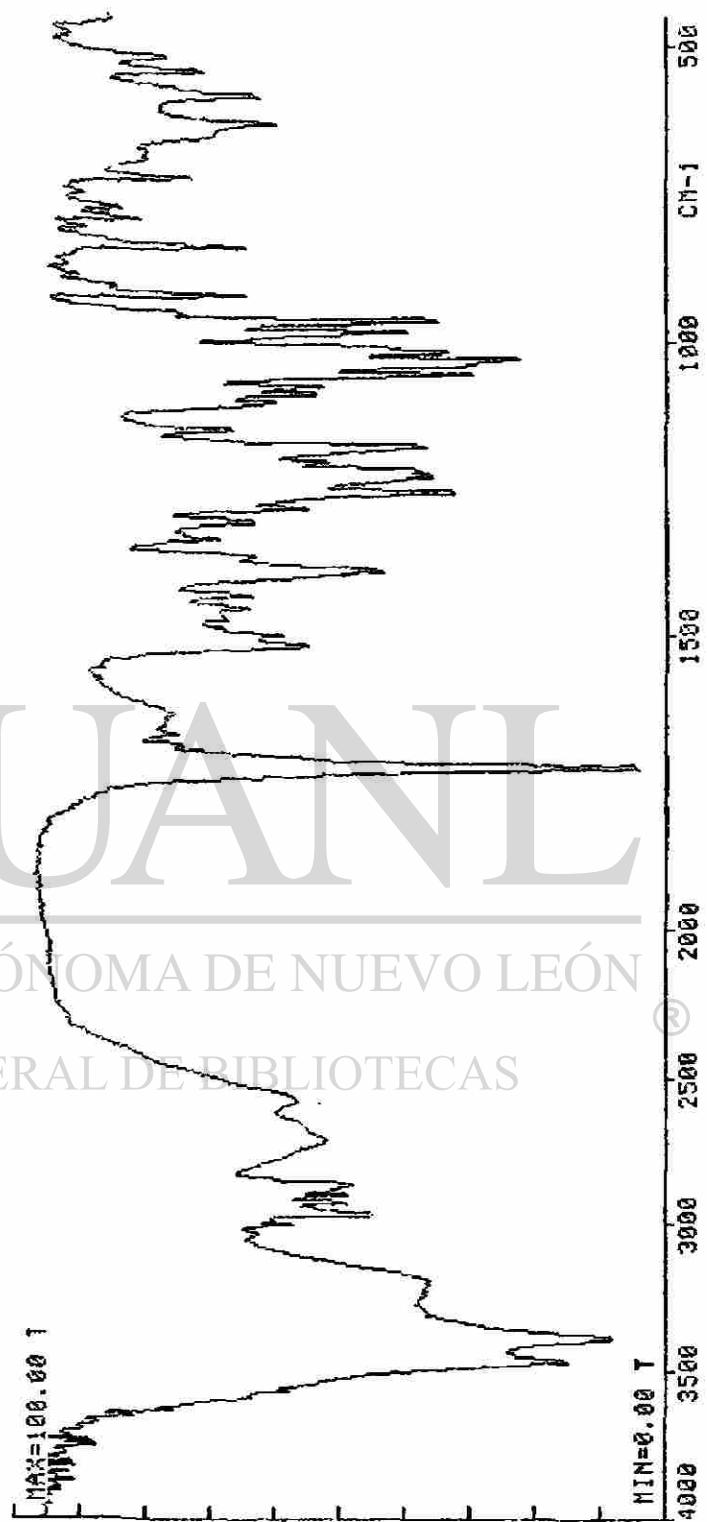
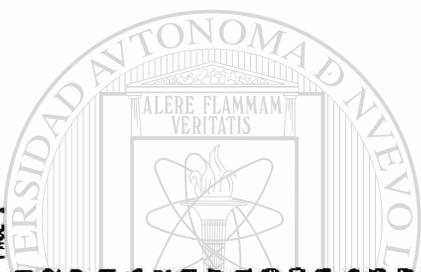
3771. 90.6	3760. 89.8	3752. 87.2	3745. 92.3	3736. 87.4
3725. 91.0	3712. 87.1	3702. 90.2	3691. 84.9	3677. 83.2
3670. 85.9	3657. 83.1	3650. 77.5	3630. 75.2	3620. 72.7
3388. 63.3	3368. 58.1	3345. 33.9	3372. 34.6	3393. 8.4
3289. 36.1	3037. 62.6	3007. 37.1	2992. 60.2	2975. 42.6
2954. 52.5	2853. 46.8	2808. 49.1	2889. 49.2	2876. 47.1
2716. 52.4	2578. 36.6	1869. 93.9	1729. 3.2	1687. 71.4
1689. 75.2	1654. 75.9	1647. 76.5	1436. 74.8	1377. 86.7
1359. 85.5	1518. 54.7	1500. 58.7	1473. 67.0	1464. 68.1
1435. 63.7	1432. 43.9	1393. 43.1	1365. 62.9	1337. 68.3
1307. 63.0	1283. 34.6	1237. 39.7	1229. 33.0	1218. 37.0
1203. 51.8	1176. 35.8	1147. 65.6	1100. 59.6	1087. 51.4
1075. 51.8	1056. 29.3	1048. 28.6	1033. 21.7	1019. 31.6
983. 39.4	966. 32.4	952. 73.1	922. 64.2	908. 84.5
893. 90.7	876. 92.3	840. 84.6	812. 89.2	794. 80.9
777. 83.7	755. 89.5	724. 72.7	691. 79.9	679. 79.8
650. 59.4	583. 41.1	544. 70.5	519. 76.5	485. 91.4

END 85 PERSIS FOUND

PAGE 1

Nombre SURMINDO CALZADO  
 Resaca CHICAGOILINA  
 Densidad R.P.  
 Fecha 7-07-96  
 Operador Eduardo Gonzalez  
 No. de espectro \_\_\_\_\_

• E X E G H , C . Z . 4 . 1 G U A T : M I C H



CHAPARRINA

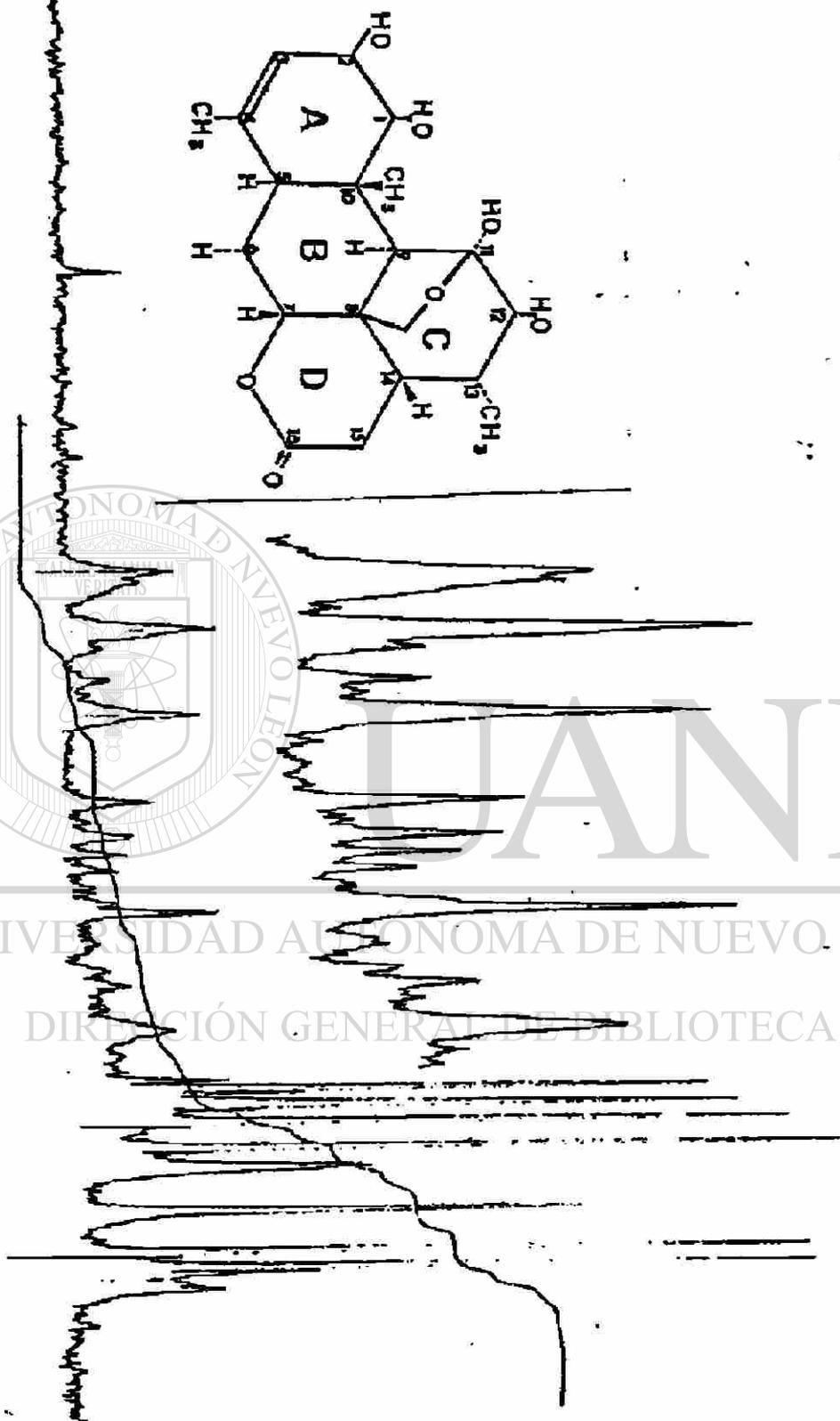


FIGURA No. 10 ESPECTRO ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE LA CHAPARRINA.

### **3.5. Efecto Inhibitorio de los Extractos Acuoso y Metanólicos Aislados de la Raíz de la *C. texana* sobre el Proceso de Enquistamiento de *E. invadens*.**

Como una evaluación de tipo preliminar para determinar la actividad de los extractos aislados inicialmente de nuestra planta motivo de este estudio sobre el enquistamiento de nuestros trofozoítos amibianos:

Se preparó inicialmente una solución concentrada con cada uno de ellos utilizando el propio medio de enquistamiento que se empleó posteriormente para la prueba de diferenciación.

A partir de estas soluciones concentradas se preparó posteriormente una dilución de 10 en 10, v.v con el mismo medio de enquistamiento con lo que se obtuvieron las concentraciones de [10-100]  $\mu\text{g/ml}$  de cada uno de los extractos aislados (metanólico y acuoso).

Posteriormente, los trofozoítos de nuestra cepa amibiana fueron inducidos a su diferenciación a quistes mediante el método reportado por el Dr. Morales-Vallarta en presencia de estas soluciones y como podemos apreciar en la Tabla No. 1 tanto el extracto acuoso como el metanólico a las dos concentraciones probadas, presentaron una actividad inhibitoria sobre el proceso de diferenciación celular superior al 95%.

Considerando que la actividad presentada por ambos extractos se conservó hasta la concentración mínima probada en este estudio preliminar [10  $\mu\text{g/ml}$ ] entonces, procedimos a repetir la evaluación de estos extractos sobre el enquistamiento de *E. invadens* pero ahora añadiendo concentraciones de ellos hasta 100 veces menores [0.1-1.0  $\mu\text{g/ml}$ ].

En la tabla No. 2 se observan estos resultados y apreciamos que tanto el extracto acuoso como el metanólico tuvieron la capacidad de conservar su efecto inhibitorio (>50 %) sobre el proceso de enquistamiento de esta cepa amibiana hasta una concentración de 1.0  $\mu\text{g/ml}$  en relación con el cultivo testigo.

**TABLA 1. Efecto Inhibitorio de los Extractos Acuoso y Metanólico (10-100 µg/ml) Aislados de *Castela texana* sobre el Proceso de Enquistamiento de *Entamoeba invadens*.**

Extracto [µg/ml]	Cél. Totales (10 <sup>6</sup> )	Quistes (10 <sup>6</sup> )	Enquistamiento (%)	Inhibición del Enquist. (%)
<b>Acuoso:</b>				
100.0	5.8±0.7	0.005±0.001	0.1	99.8
10.0	6.5±0.5	0.1±0.07	1.5	97.6
<b>Metanólico:</b>				
100.0	6.3±0.9	0.0±0.01	0.0	100.0
10.0	5.4±0.2	0.1±0.04	2.2	96.4
<b>Testigo</b>	<b>6.0±0.7</b>	<b>3.7±0.30</b>	<b>61.6</b>	

Los valores son la media ± DE para 3 determinaciones.

**TABLA 2. Efecto Inhibitorio de los Extractos Acuoso y Metanólico (0.1-1.0 µg/ml) Aislados de *Castela texana* sobre el Proceso de Enquistamiento de *Entamoeba invadens*.**

Extracto [µg/ml]	Cél.Totales (10 <sup>6</sup> )	Quistes (10 <sup>6</sup> )	Enquistamiento (%)	Inhibición del Enquist. (%)
<b>Acuoso:</b>				
0.1	4.9±0.6	2.0±0.1	40.2	16.2
1.0	4.7±0.5	0.9±0.07	18.3	62.0
<b>Metanólico:</b>				
0.1	5.0±0.4	1.8±0.02	36.0	25.0
1.0	4.9±0.6	0.8±0.03	16.3	66.0
Testigo	4.6±0.7	2.2±0.30	49.0	

Los valores son la media ± DE para 3 determinaciones.

### **3.6. Determinación de la Concentración Subletal del Extracto Metanólico Aislado de la *C. texana* sobre el Crecimiento de Trofozoitos de *E. invadens*.**

Como en el estudio anterior pudimos apreciar que los extractos aislados de *C. texana* (acuoso y metanólico) habían presentado una buena actividad inhibitoria (> 50 %) sobre la diferenciación de trofozoito a quiste de la cepa IP-1 de *E. invadens* nos interesó entonces, determinar si esta actividad inhibitoria no era más que el resultado de una actividad lítica directa de estos extractos sobre los trofozoitos amibianos ya que, esta lisis o destrucción de nuestros trofozoitos se traduce, en la disminución del número o densidad de células (trofozoitos) disponibles para iniciar su diferenciación al ponerlos en contacto con el medio de enquistamiento.

Así, para tratar de aclarar esta observación procedimos a realizar la cinética de crecimiento de esta cepa amibiana en presencia de diferentes concentraciones [1,5,10 y 100 µg/ml] de nuestro extracto metanólico activo para determinar la máxima concentración que esta cepa amibiana puede aceptar sin que se vea afectado su proceso de crecimiento (determinación de la concentración subletal del extracto metanólico sobre el crecimiento de *E. invadens*). Estos resultados los presentamos en la Figura No. 7 y en la Tabla 3 en donde podemos apreciar después de correr la cinética de crecimiento de los trofozoitos que [10 µg/ml] del extracto metanólico es la máxima concentración con la que los cultivos pueden mantenerse sin que su crecimiento se vea afectado o decaiga en comparación con el grupo testigo (Fotografías 13 y 14).

Tomando como base esta concentración [10 µg/ml] del extracto metanólico activo se procedió a repetir el proceso de diferenciación de los trofozoitos en presencia de esta concentración del extracto metanólico y se confirmó que 10 µg/ml es la concentración óptima que no afecta el crecimiento de los trofozoitos pero si es capaz de inhibir su diferenciación a quiste (Tabla No. 3) y (Fotografías 15 y 16).

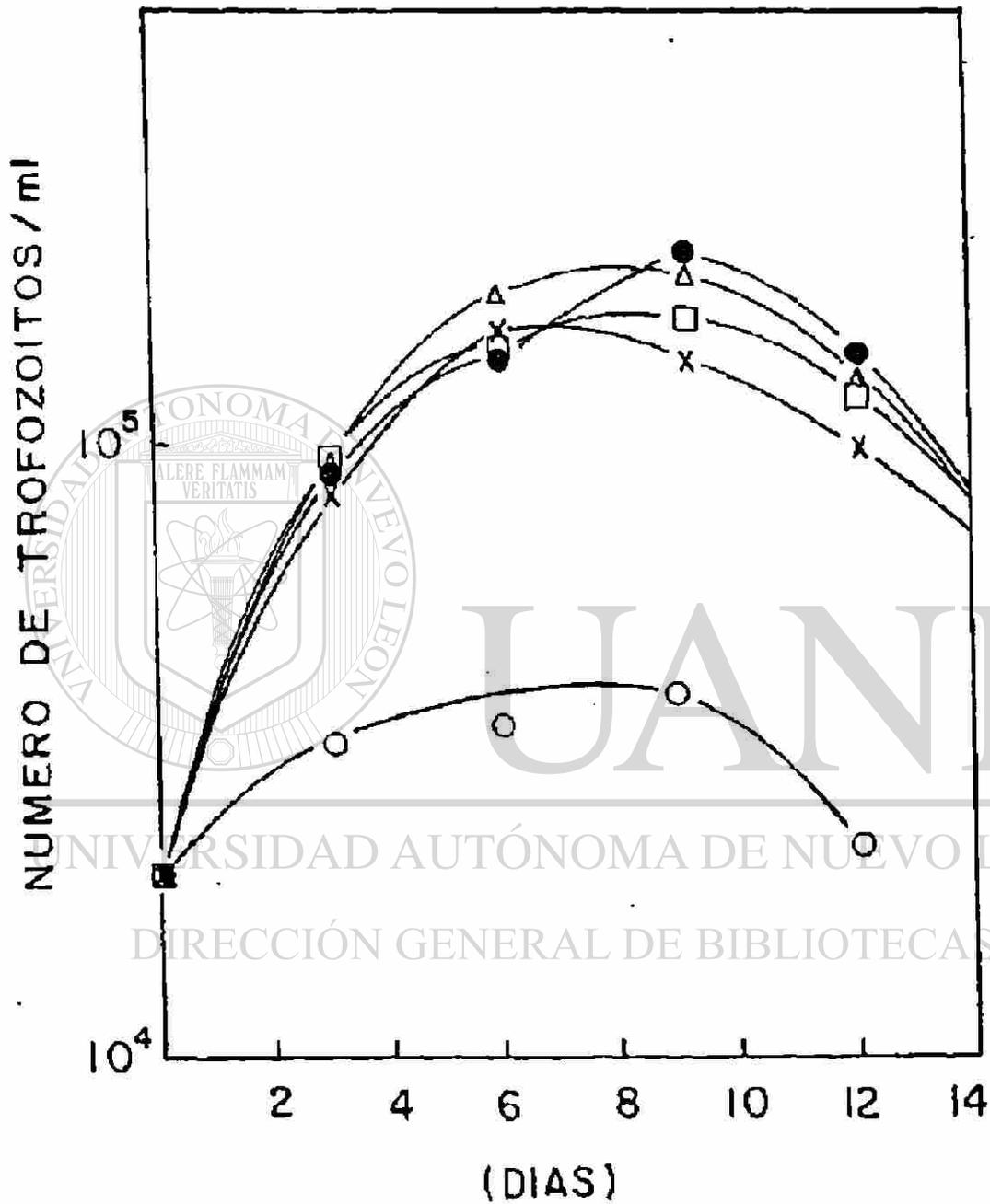


FIGURA No. 7 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION SUBLETAL DEL EXTRACTO METANOLICO AISLADO DE LA *E. texana* SOBRE EL CRECIMIENTO DE TROFOZOITOS DE *E. invadens*: (●-● testigo, Δ-Δ 1, □-□ 5, x-x 10, ○-○ 100 µg/ml).

**TABLA 3. Efecto del Extracto Metabólico de la *Castela texana* sobre:****a) El Proceso de Crecimiento de *Entamoeba invadens*.**

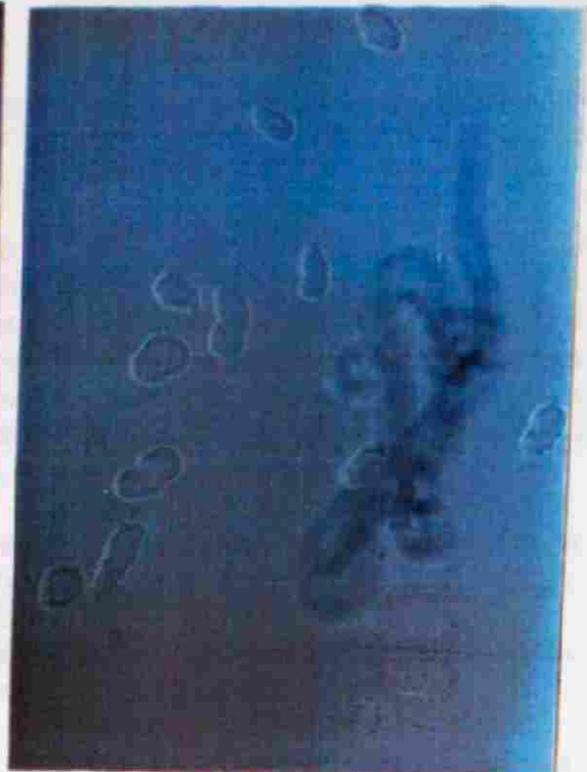
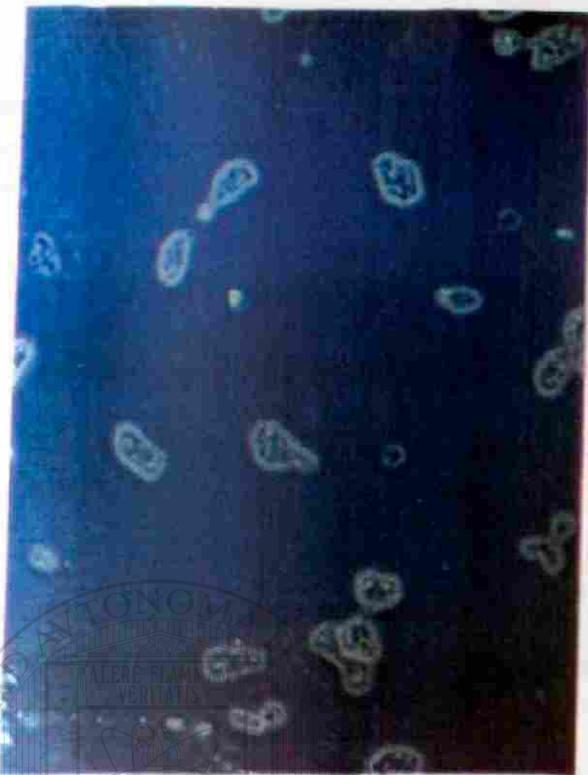
TIEMPO (d)	3		6	
Conc. [µg/ml]	Células (10 <sup>4</sup> )	Inhibición (%)	Células (10 <sup>4</sup> )	Inhibición (%)
100	3.3±0.5	63.0	3.9±0.2	80
10	8.3±0.7	6.7	13.7±0.3	29
5	9.4±0.9	0.0	16.0±0.2	18
1	9.4±1.1	0.0	18.8±0.6	4
Testigo	8.9±0.7		19.5±0.8	

Los valores son la media ± DE para 3 determinaciones.

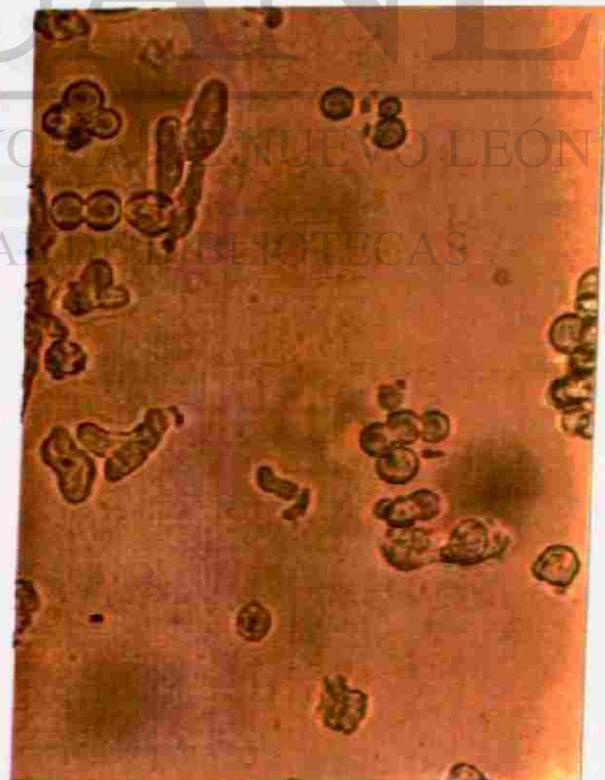
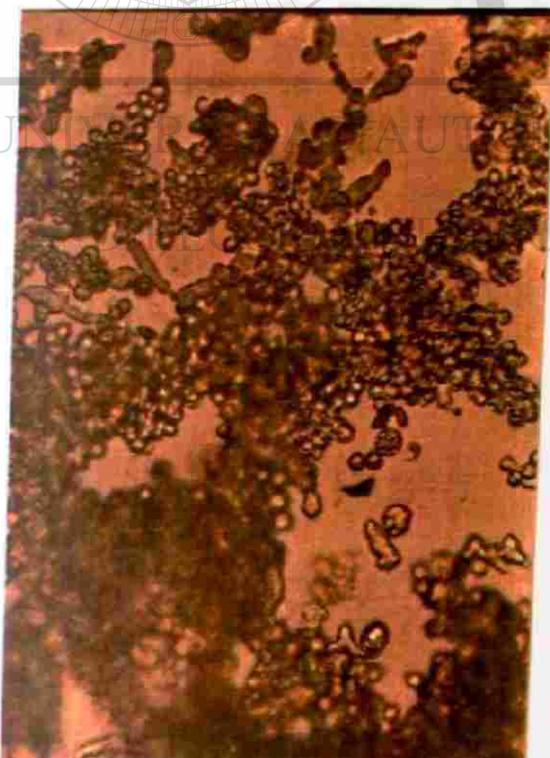
**b) El Proceso de Enquistamiento de *E. invadens*.**

Conc. [µg/ml]	Células Totales (10 <sup>6</sup> )	Quistes (10 <sup>6</sup> )	Enquistamiento (%)	Inhibición del enquist. (%)
10.0	5.4±0.5	0.12±0.07	2.2	95.7
1.0	4.9±0.7	0.80±0.40	16.3	68.8
0.1	5.0±0.9	1.80±0.21	36.0	31.2
Testigo	6.5±0.4	3.40±0.40	52.3	

Los valores son la media ± DE para 3 determinaciones.



EFEECTO DEL EXTRACTO METANOLICO DE LA *C. texana* SOBRE EL CRECIMIENTO DE TROFOZOITOS DE *Entamoeba invadens*, CEPA IP-1:  
FOTOGRAFIAS No. 13 CONTROL Y No. 14 EXTRACTO METANOLICO 10 µg/ml.



EFEECTO DEL EXTRACTO METANOLICO DE LA *C. texana* SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE TROFOZOITOS DE *Entamoeba invadens*, CEPA IP-1:  
FOTOGRAFIAS No. 15 CONTROL Y No.16 EXTRACTO METANOLICO 10 µg/ml.

### **8.7. Actividad Inhibitoria de las Fracciones Acuosa, Intermedia y Diclorometano Aisladas del Extracto Metanólico Activo de la *Castela texana* sobre el Proceso de Enquistamiento de *Entamoeba invadens*.**

Considerando la alta actividad inhibitoria que presentó el extracto metanólico aislado de la raíz de la *C. texana* sobre nuestros cultivos de trofozoítos ambianos se procedió a fraccionarlo tomando en cuenta los diferentes estudios fitoquímicos realizados con él (cromatografía en capa delgada y pruebas colorimétricas) y presentados en la Tabla No. 4 en donde, podemos apreciar que este extracto contiene compuestos activos de tipo simarubolídano además de sesquiterpenlactonas y presenta algunas insaturaciones y, resultó negativo para compuestos químicos como cumarinas, alcaloides y flavonoides.

En relación con estos antecedentes, se procedió a fraccionar nuestro extracto metanólico activo en un embudo de separación (Foto 17) empleando para ello un sistema de solventes de agua y dicloruro de metileno en la proporción 3:1, v.v con lo cual, se recuperaron las siguientes fracciones: acuosa, diclorometano y una tercera fracción que resultó de la parte del extracto que no entró en solución con ninguno de los dos solventes y que reconocimos como fracción intermedia.

Posteriormente se procedió a determinar la actividad inhibitoria de las tres diferentes fracciones aisladas sobre el proceso de diferenciación de *Entamoeba invadens*.

Inicialmente se preparó una solución concentrada [100 µg/ml] de cada una de estas tres fracciones empleando el propio medio de enquistamiento y posteriormente haciendo diluciones seriadas de 10 en 10, con este mismo medio se obtuvieron las concentraciones: [0.1-10.0 µg/ml] en donde, después de inocular los trofozoítos e inducir su enquistamiento mediante el gaseado con CO<sub>2</sub> observamos que aunque las tres fracciones presentaron una actividad inhibitoria muy similar (Tabla No. 5), aparentemente, la fase intermedia resultó un poco más activa ya que a la mínima concentración probada [0.1 µg/ml] mostraba una actividad inhibitoria sobre el enquistamiento de nuestros trofozoítos ambianos de alrededor del 50% en comparación con las otras dos fracciones quienes solo mostraron actividad hasta la concentración de [1.0 µg/ml].

**TABLA 5. Actividad de las Fracciones: Acuosa, Intermedia y Diclorometano Aisladas del Extracto Metanólico de la *Castela texana* sobre el Proceso de Enquistamiento de *E. invadens*.**

Fracción [µg/ml]	Cél. Totales (10 <sup>6</sup> )	Quistes (10 <sup>6</sup> )	Enquistamiento (%)	Inhibición del Enquist. (%)
<b>Acuosa:</b>				
0.1	5.2±0.8	1.8±0.04	34.6	38.9
1.0	4.7±0.8	1.2±0.04	25.5	54.9
10.0	6.1±0.5	0.7±0.07	11.5	79.7
<b>Intermedia:</b>				
0.1	5.6±0.4	1.7±0.31	30.3	46.5
1.0	4.4±1.0	0.9±0.14	20.9	63.0
10.0	4.2±0.9	0.10±0.02	2.4	95.7
<b>Diclorometano:</b>				
0.1	4.6±0.3	1.6±0.20	34.7	38.7
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
Testigo	6.0±0.7	3.40±0.40	56.6	

Los valores son la media ± DE para 3 determinaciones.

### **8.8. Cernimiento de la Actividad Inhibitoria de la *Castela texana* sobre el Proceso de Enquistamiento de *Entamoeba invadens*.**

Considerando estos resultados se procedió a separar esta fase intermedia activa para tratar de aislar algún tipo de compuesto: Se preparó una columna de cromatografía líquida (Foto 18) en donde depositamos nuestra muestra activa (fase intermedia) colectada y probada con anterioridad y después de correrla, con diferentes sistemas de solventes y obtener múltiples fracciones (más de 100, Foto 19) las cuales fueron sometidas posteriormente a estudios cromatográficos (Tabla No. 6) para hacer un seguimiento de su fraccionamiento y de su actividad logramos aislar un polvo de color casi blanco el cual mediante diferentes procesos de lavado según se mencionaron en la sección de material y métodos se fue purificando hasta tener un polvo fino de color blanco.

Posteriormente después de someter esta muestra a diferentes pruebas fitoquímicas de tipo físicas, químicas y espectroscópicas (Figuras No. 8-10) se logró la confirmación de que el compuesto aislado se trataba del compuesto reportado como la chaparrina.

Este compuesto fue incluido al igual que la fracción intermedia y el extracto metanólico de los cuales fue aislado en un estudio para determinar su capacidad para inhibir el proceso de enquistamiento de nuestros trofozoítos amibiano y así, realizar el cernimiento de la actividad de *C. texana*.

Los resultados se muestran en la Tabla No. 7 y en ella podemos apreciar, que aunque el efecto inhibitorio obtenido con la chaparrina no alcanzó valores superiores al 71% a la máxima concentración probada [10.0 µg/ml] en comparación, con la actividad presentada por el extracto metanólico y por la fase intermedia quienes mostraron valores inhibitorios mayores al 90 % a esta concentración, la chaparrina, conservó su actividad hasta la concentración de 1.0 µg/ml (56 % activa) en comparación con nuestro grupo testigo..

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**TABLA 7. Cernimiento de la Actividad de la *Castela texana* sobre el Proceso de Enquistamiento de *Entamoeba invadens*.**

Solución [µg/ml]	Cél. Totales (10 <sup>6</sup> )	Quistes (10 <sup>6</sup> )	Enquistamiento (%)	Inhibición del Enquist.(%)
<b>Extracto Metanólico:</b>				
10	5.4±0.5	0.12±0.07	2.2	96.1
1.0	4.9±0.7	0.80±0.40	16.3	71.2
0.1	5.0±0.9	1.80±0.21	36.0	36.4
<b>Fase Intermedia:</b>				
10	4.2±0.9	0.10±0.02	2.4	95.7
1.0	4.4±1.0	0.92±0.14	20.9	63.0
0.1	5.6±0.4	1.70±0.31	30.3	46.5
<b>Chaparrina:</b>				
10	5.0±0.7	0.81±0.01	16.2	71.4
1.0	5.3±0.6	1.30±0.23	24.5	56.7
0.1	5.5±0.5	2.30±0.37	41.8	26.1
<b>Testigo:</b>	6.0±0.7	3.40±0.40	56.6	

Los valores representan la media ± DE de 3 determinaciones.

### **8.9. Estudio Comparativo de la Actividad de la Chaparrina , la Emetina y el Tinidazol sobre el Crecimiento de Trofozoítos de *Entamoeba invadens*, cepa IP-1.**

La Tabla No. 8 nos muestra los resultados de un estudio comparativo entre la actividad del compuesto puro (chaparrina), aislado de la planta en estudio y dos drogas antiamebianas de uso clínico reconocido: emetina y tinidazol sobre el proceso de crecimiento de nuestros trofozoítos amebianos de *E. invadens*, cepa IP-1 en relación con el crecimiento de nuestro cultivo testigo.

Con este estudio podemos determinar que tanto el tinidazol como la emetina resultaron ser ampliamente efectivos sobre el trofozoíto o forma móvil del parásito, ya que a las tres concentraciones probadas [1.0, 10 y 100 mM], estas dos drogas antiamebianas mostraron una fuerte actividad lítica o destructiva sobre nuestros trofozoítos amebianos.

A las dos concentraciones mayores probadas [10 y 100 mM] estas drogas produjeron un 100 % de inhibición en el crecimiento de los cultivos y aún a la mínima concentración [1.0 mM] continuaron activas produciendo una inhibición > 50 %.

La chaparrina, en cambio, aunque a concentraciones elevadas [100 mM] si fue capaz de inhibir casi en su totalidad el crecimiento de los trofozoítos (96.2 % de inhibición) su capacidad inhibitoria fue disminuyendo gradualmente en función de su concentración: 68 y 40 % a las concentraciones de 10 y 1.0 mM respectivamente.

Estos resultados nos muestran que este compuesto puede ser utilizado a una concentración de 1mM sin que se vea afectado su proceso de crecimiento y no así ninguna de las drogas antiamebianas empleadas como control.

La secuencia fotográfica 20-23 muestra la actividad del tinidazol, la emetina y la chaparrina [10 mM] sobre el crecimiento de los trofozoítos amebianos en comparación con el crecimiento de nuestro cultivo testigo a un periodo de incubación de 72 h. En ellas podemos observar la fuerte actividad lítica que presentaron tanto la emetina como el tinidazol (fotos 22 y 23) en comparación con el campo de la fotografía representativa de la actividad de la chaparrina (Foto 21) en donde a la misma concentración [10 mM] aún se pudieron apreciar trofozoítos viables en movimiento los cuales como se pudo corroborar después de mantenerlos en de pasarlos al medio de crecimiento TYI-S-33 fueron nuevamente de crecer y llegar a confluencia.

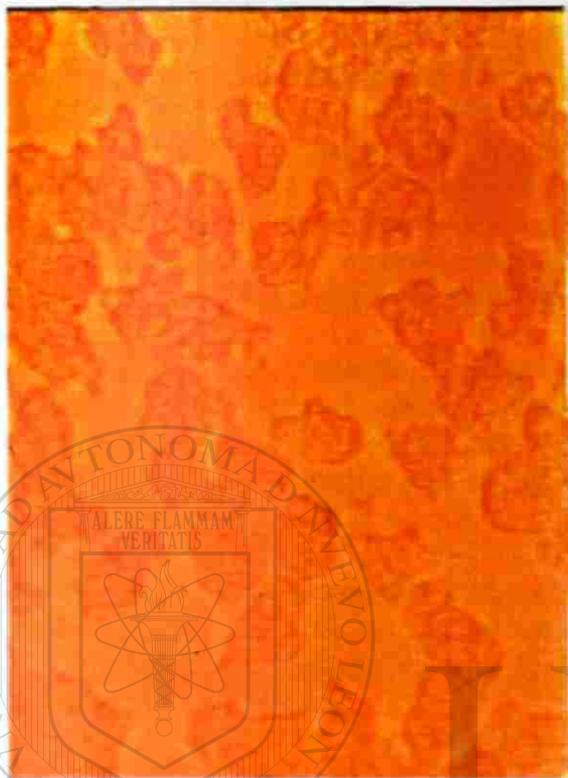
Con estos resultados podemos confirmar los reportes previos donde se ha señalado que el mecanismo de acción de las drogas de uso antiamebiano de uso actual va dirigido de una manera directa sobre el trofozoíto y no poseen la capacidad de inhibir los procesos de diferenciación de trofozoíto a quiste de la ameba, por lo que el desarrollo de un nuevo fármaco que afecte estos procesos será de gran utilidad no solo para el tratamiento mismo de la amebiasis, sino también para el buen control de la diseminación de este parásito.

**TABLA 8. Actividad de la Chaparrina, Emetina y Tinidazol sobre el Crecimiento de *Entamoeba invadens*.**

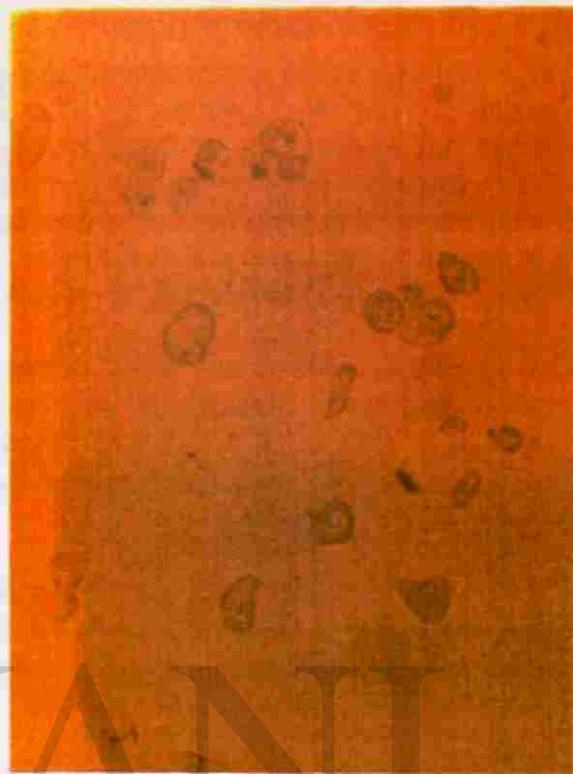
TIEMPO (d)	3		6	
	Células	Inhibición	Células	Inhibición
	(10 <sup>4</sup> )	(%)	(10 <sup>4</sup> )	(%)
<b>Droga [mM]</b>				
<b>Chaparrina:</b>				
100	1.3±0.5	80.4	0.5±0.1	96.2
10	3.0±0.4	56.0	3.8±0.4	68.0
1	4.5±0.9	33.7	7.2±0.2	40.2
<b>Emetina:</b>				
100	1.7±0.5	75.0	0.0±0.2	100.0
10	2.8±0.7	58.8	0.0±0.4	100.0
1	3.3±0.9	51.5	3.2±0.2	73.5
<b>Tinidazol:</b>				
100	2.5±0.5	63.0	0.0±0.1	100.0
10	1.0±0.7	85.0	0.0±0.4	100.0
1	2.9±0.9	56.8	3.8±0.2	68.3
<b>Testigo:</b>	6.8±0.7		12.0±0.4	

Los valores son la media ± DE para 3 determinaciones.

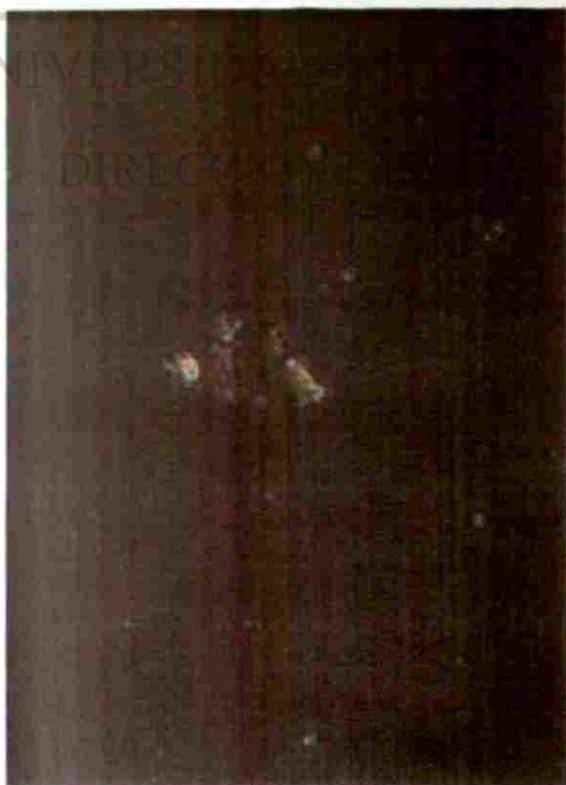
ACTIVIDAD DE LA CHAPARRINA, EMETINA Y TINIDAZOL 10mM  
SOBRE EL CRECIMIENTO DE Entamoeba invadens, CEPA IP-1.



FOTOGRAFIA No. 20 TESTIGO.



FOTOGRAFIA No. 21 CHAPARRINA.



FOTOGRAFIA No. 22 EMETINA.



FOTOGRAFIA No. 23 TINIDAZOL.

### 3.10. Actividad de la Chaparrina y de la Rifampicina sobre el Proceso de Enquistamiento de *Entamoeba invadens*, cepa IP-1.

Para tratar de definir el probable mecanismo de acción que la *Castela texana* utiliza para inhibir el proceso de diferenciación de *E. invadens* llevamos a cabo un estudio preliminar en donde determinamos la actividad que sobre este proceso pudiera tener la rifampicina, que como comentamos en la sección de material y métodos es una droga que posee actividad inhibitoria sobre la diferenciación de algunos organismos y añadimos además a la chaparrina, compuesto puro aislado por nosotros a partir del extracto metanólico activo de la *Castela* y comparamos su actividad contra la de un cultivo testigo que representa el proceso de diferenciación de este parásito.

La Tabla No. 9 nos muestra los resultados en donde podemos observar que la rifampicina, droga de interés, no presentó efecto alguno sobre la diferenciación de *E. invadens* a ninguna de las concentraciones probadas [0.1-10.0 mM] en cambio, la chaparrina si fue capaz de inhibir el proceso de diferenciación de la amiba a las dos concentraciones mayores probadas en este estudio:

[1.0-10.0 mM].

Estos resultados resultan muy interesantes porque de ellos podemos definir que aparentemente la amiba no utiliza el mecanismo de acción que utilizan los otros organismos a los cuales la rifampicina si inhibe su diferenciación (esta droga actúa como una droga inhibidora del DNA dependiente de la RNA polimerasa).

En las fotografías 24, 25 y 26 podemos observar como la chaparrina [10 mM] inhibió el enquistamiento de la amiba, por lo que solo se pudieron observar la producción de muy pocos quistes pero de forma aislada y no en grandes grumos como en el caso de la misma concentración de la rifampicina en comparación con nuestro grupo testigo.

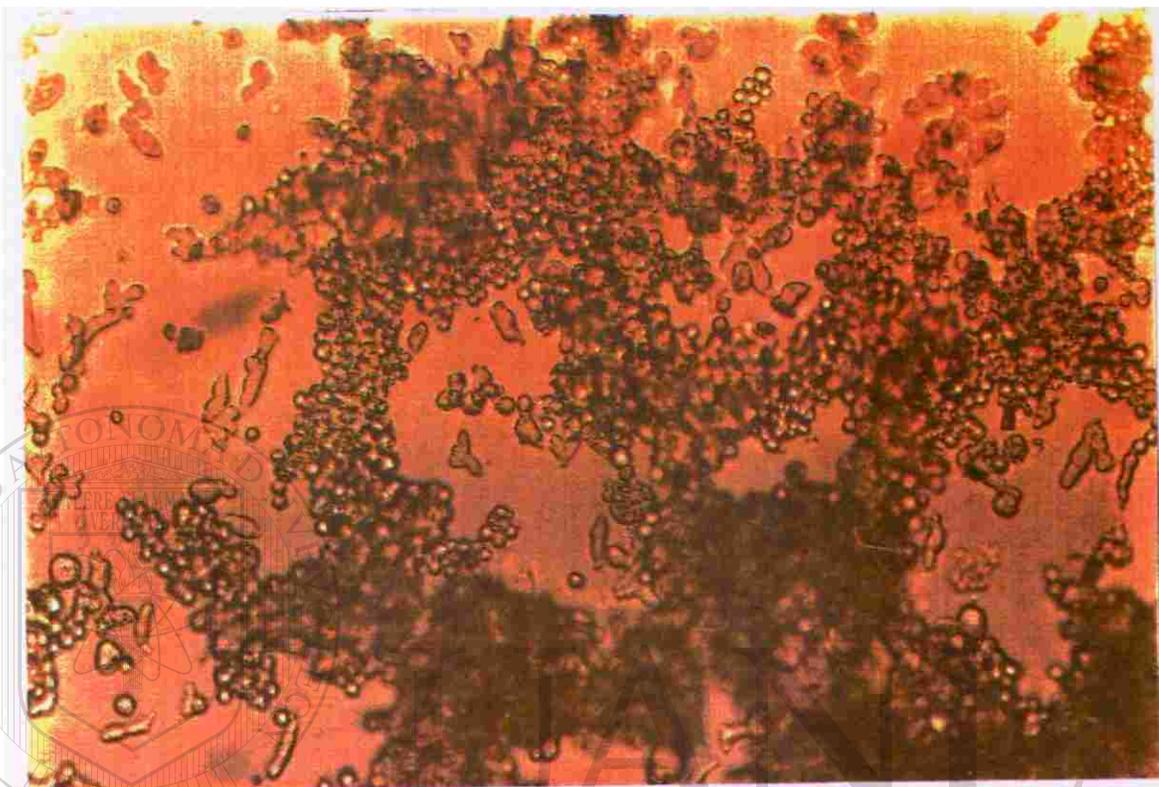
Con estos resultados podemos definir a la concentración de 1.0 mM como la concentración con la que la chaparrina no inhibe el proceso de crecimiento de la amiba pero si su diferenciación a quiste. Este valor es 10 veces menor que el que requiere el extracto metanólico aislado de la *C. texana* para actuar de manera semejante.

**TABLA 9. Actividad de la Chaparrina y Rifampicina sobre el  
Proceso de Enquistamiento de *E. invadens*.**

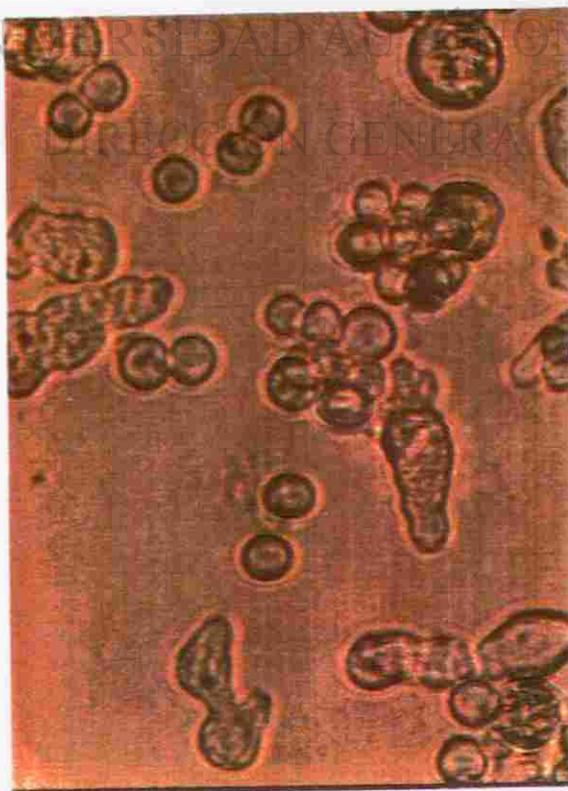
Compuesto [mM]	Cél.Totales (10 <sup>6</sup> )	Quistes (10 <sup>6</sup> )	Enquistamiento (%)	Inhibición del enquist.(%)
<b>Chaparrina:</b>				
10	4.2±0.5	1.10±0.4	10.5	80.0
1.0	5.0±0.7	0.82±0.1	16.4	69.1
0.1	5.3±0.6	1.90±0.2	35.8	31.5
<b>Rifampicina:</b>				
10	5.7±0.3	2.11±0.1	37.1	29.1 ®
1.0	6.3±0.7	2.89±0.2	45.9	12.5
0.1	6.5±0.4	3.09±0.3	47.6	9.0
Testigo	6.5±0.3	3.40±0.2	52.3	

Los valores son la media ± DE para 3 determinaciones.

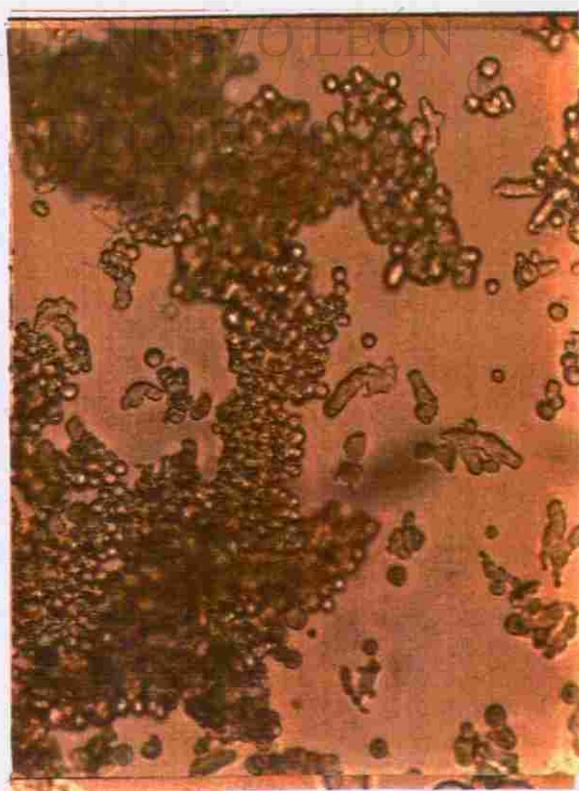
ACTIVIDAD DE LA CHAPERRINA Y DE LA RIFAMPICINA 10mM  
SOBRE EL PROCESO DE ENQUISTAMIENTO DE E. invadens, CEPA IP-1.



FOTOGRAFIA No. 24 TESTIGO.



FOTOGRAFIA No. 25 CHAPARRINA.



FOTOGRAFIA No. 26 RIFAMPICINA.

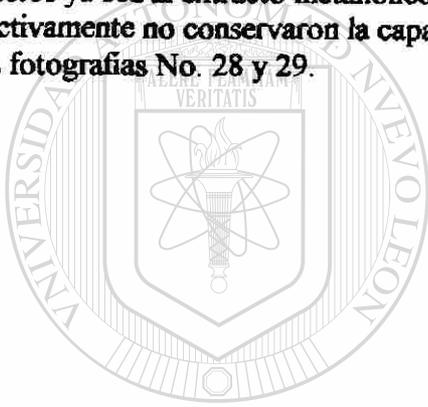
### **8.11. Proceso de Desenquistamiento.**

Los quistes obtenidos después de inducir el enquistamiento de los trofozoítos de *E. invadens* se colectaron y se sometieron a procesos de lavado con PBS como se mencionó en la sección de material y métodos.

Posteriormente estas células se transfirieron al medio de crecimiento rico en nutrientes conocido como TYI-S-33 y se observó su capacidad de diferenciarse nuevamente a trofozoíto o forma móvil de la amiba hasta llegar a producir un cultivo en confluencia.

Este proceso está representado por nuestro cultivo testigo el cual, se puede apreciar en la fotografía No. 27 en donde podemos observar múltiples trofozoítos en crecimiento.

En cambio los pocos quistes que se lograron formar y colectar de los cultivos que habían estado expuestos ya sea al extracto metanólico como a la chaparrina [10.0 mg/ml y 1.0 mM] respectivamente no conservaron la capacidad de diferenciarse a trofozoítos como se puede apreciar en las fotografías No. 28 y 29.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PROCESO DE DESENQUISTAMIENTO DE Entamoeba invadens, CEPA IP-1.

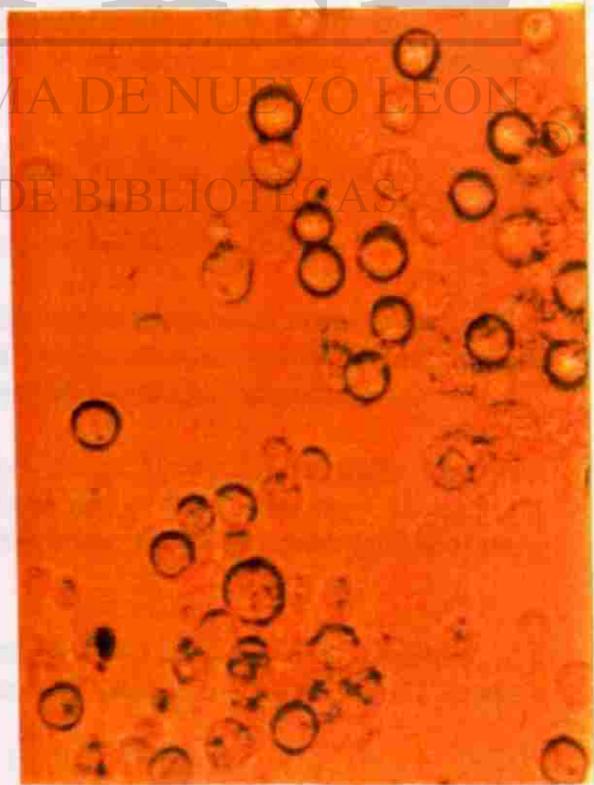


FOTOGRAFIA No. 27 TESTIGO



FOTOGRAFIA No. 28 CHAPARRINA

[1mM]



FOTOGRAFIA No. 29 EXTRACTO METANOLICO

[10 g/ml.]

## 9. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES.

1. Se confirmó que *Entamoeba invadens*, es una especie amibiana que posee la capacidad de enquistarse *in vitro*.

2. Se observó que, durante su diferenciación de trofozoito a quiste, el proceso de enquistamiento ocurre de manera simultánea con el de su crecimiento.

2. Al someter los cultivos de trofozoitos de esta especie amibiana al proceso de enquistamiento la aparición de los primeros quistes se apreció a partir de las primeras 24 h y, la producción de los mismos se fue incrementando con el tiempo hasta alcanzar su valor máximo en el cuarto día y, a partir de este, tanto la producción de quistes como el crecimiento de los trofozoitos inició un proceso de decaimiento.

3. Los quistes producidos en nuestros cultivos testigo mediante el proceso reportado por el Dr. Morales-Vallarta se observaron refringentes bajo la técnica microscópica de contraste de fases, repelentieron el colorante vital azul de tripano y, resistieron la acción del detergente tritón -100. Por las propiedades mencionadas se observó que casi inmediatamente después de su transferencia al medio de crecimiento TYI-S-33 los quistes colectados fueron capaces de desenquistarse, convirtiéndose nuevamente en trofozoitos y después de un periodo de tiempo que varió en función del número inoculado crecieron, se propagaron y llegaron a formar un cultivo en confluencia.

4. Después de extraer la raíz de la *Castela texana* colectada para nuestro estudio por separado con agua y metanol obtuvimos una recuperación del 1 y 5% de los extractos acuoso y metanólico, respectivamente.

5. Después de someter a los trofozoitos de esta especie amibiana durante su proceso de diferenciación a la acción de cada uno de estos extractos observamos que ambos fueron capaces de inhibir el enquistamiento de nuestros cultivos hasta la concentración de 1.0 µg/ml.

6. La cromatografía en capa delgada y las pruebas colorimétricas practicadas al extracto metanólico activo aislado de la *C. texana* revelaron la presencia de compuestos químicos del tipo de simaroubolidanos y de sesquiterpenlactonas además de contener algunas instauraciones.

7. Después de fraccionar el extracto metanólico activo de la *C. texana* se pudo hacer un seguimiento de su actividad sobre el proceso de diferenciación de *E. invadens* llegando al aislamiento de un compuesto puro reconocido como chaparrina el cual presentó también buena actividad sobre la diferenciación de esta cepa amibiana.

8. Se reconoció que 10 µg/ml y 1.0 mM respectivamente son, las concentraciones óptimas que tanto el extracto metanólico como la chaparrina requieren para inhibir su diferenciación a quiste y viceversa, sin afectar el crecimiento de los trofozoitos.

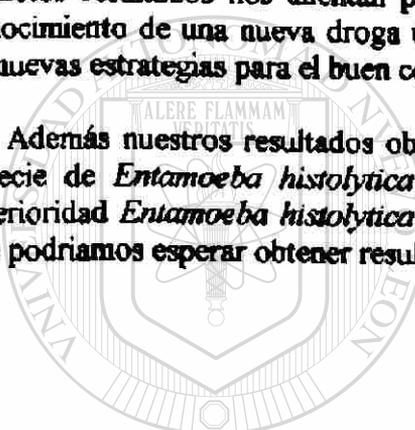
9. Confirmamos que la emetina así como el tinidazol son drogas activas solo sobre el trofozoito o forma móvil de la amiba.

10. En cambio la rifampicina, droga inhibidora de la citodiferenciación de algunos organismos no presentó efecto alguno sobre el enquistamiento de la amiba pudiéndose deber esto probablemente a que al momento de agregarse esta droga los trofozoitos ya habian iniciado su proceso de diferenciación.

11. Los resultados encontrados con la rifampicina nos indican que la chaparrina utiliza algún otro mecanismo para inhibir el proceso de diferenciación de este parásito.

12. Estos resultados nos alientan para continuar con el estudio de *Castela texana* para llegar al conocimiento de una nueva droga 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.

13. Además nuestros resultados obtenidos con la cepa IP-1 de *E. invadens* podrían aplicarse a la especie de *Entamoeba histolytica* ya que como se ha observado en estudios reportados con anterioridad *Entamoeba histolytica* es más sensible que la especie utilizada en este estudio por lo que podríamos esperar obtener resultados muy similares con *E. histolytica*.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 10. BIBLIOGRAFÍA.

1. Aley SB, Scott WA, Cohn ZA. Plasma Membrane of *Entamoeba histolytica* (1981). *J Exp Med* 152:391-404.
2. Arroyo-Begovich A, Cáravez-Trejo A, Ruíz-Herrera J. Composición de la pared celular de quistes de *Entamoeba invadens* (1978). *Arch Invest Med (Méx)*; 9:99.
3. Arroyo-Begovich A, Cáravez-Trejo A, Ruíz-Herrera J (1980). Identification of the structural component in the cyst wall of *Entamoeba invadens*. *J Parasitol*; 66:735.
4. Avron B, Stolarsky T, Chayen A, Mirelman D (1986). Encystation of *E. invadens* IP-1 is induced by lowering the osmotic pressure and depletion of nutrients from the medium. *J Protozool*; 33:522.
5. Balamuth W (1951). Biological studies on *Entamoeba histolytica*. III. induced encystations in several mediums, including an account of a new procedure. *J Infec Dis*; 88:230.
6. Balamouth W (1961). Effects of some environmental factors upon growth and encystation of *Entamoeba histolytica*. *J Parasitol*; 48:101.
7. Band RN, Cirrito H (1979). Growth H. Growth response of axenic *Entamoeba histolytica* to hydrogen, carbon dioxide and oxygen. *J Protozool*; 26:282.
8. Brandt H, Pérez-Tamayo R (1970). Pathology of human amebiasis. *Hum Pathol*, 351.
9. Brumpt E (1925). Etude sommaire de l' "*Entamoeba dispar*" n. sp. Amibe à kystes quadrinucléés, parasite de l'homme. *Bull Acad Med (Paris)* 94:943-952.
10. Bosman LP (1922). Castelin, a new glucoside from *Castela nicholsonii*. *J Chem Soc*; 121:969.
11. Bosman LP (1923). Castelamarin: A bitter principle from *Castela nicholsonii*. *J Chem Soc*; 123:207.
12. Calderón J, Tovar R (1983). Loss of susceptibility to complement lyses in *Entamoeba histolytica* HML by treatment with human serum. *Immunology* 58:467-471.
13. Calzado-Flores C C, Segura-Luna JJ, Rodríguez DM, Domínguez XA (1983). A new amebicide agent from *Castela texana*. *Proc West Pharmacol Soc*; 26:431-4.

14. Calzado-Flores C, Segura-Luna JJ, Domínguez XA, García-González S (1986). *Castela texana*: Cernimiento de su actividad antiamibiana. Arch Invest Med (Mex); 17:127
15. Calzado-Flores C, Segura-Luna JJ, Flores Villanueva Z (1991). *In vitro* study of different antiamoebic drugs. Proc West Pharmacol Soc; 34:355-8.
16. Calzado-Flores C, Segura-Luna JJ (1995). *In Vitro* Cytotoxicity of Chaparrin from *Castela texana*. Proc West Pharmacol Soc; 38:49-50.
17. Calzado-Flores C, Segura-Luna JJ, Guajardo-Touché EM (1995). Effects of chaparrin, nordihydroguaiaretic acid and their structural analogues on *Entamoeba histolytica* cultures. Proc West Pharmacol Soc; 38:105-6.
18. C. Calzado-Flores, J. Verde-Star, G. Lozano-Garza, JJ Segura-Luna (1998). Preliminary Acute Toxicological Study of *Castela texana*. Proc west Pharmacol Soc 41:77-78.
19. C Calzado-Flores, EM Guajardo-Touche, MP Carranza-Rosales, JJ Segura-Luna (1998). *In vitro* Anti-Trichomonis Activity of *Castela texana*. Proc West Pharmacol Soc 41:173-174.
20. Carrell DS, Johnson MC (1970). Manual of the Vascular Plants of Texas, Texas Research Foundation, Renner, Texas; 911:612.
21. Cerbón J, Flores J (1981). Phospholipid composition and turnover of pathogenic amoebas. Comp Biochem Physiol (B) 69:487-492.
22. Cleveland LR, Sanders EP (1930). Encystation multiple fission without encytmnt, exystation, metastatic development and variation in a pure line and nine strains of *Entamoeba histolytica*. Arch Protistenk; 70:223.
23. Cuckler Ac, Jkuna S, Mushett CW, Silber RH, Stebbins RB, Stoerk HC, Arison RN, Cuchie F, Malanga CM (1958). Arch Intl Pharmacodyn 114(3-4):307-321.
24. Chang SL (1942). I. Effect hydrogen-ion concentration on encystations of *E. histolytica* in culture. Am J Trop Med; 22:471.
25. Chaudhuri S, Kubo I (1992). Two quassinoid glycosides from *Castela tortuosa*. Phytochemistry 31(11) 3961-3964.
26. Chávez B, Martínez-Palomo A, De la Torre N (1978). Estructura ultramicroscópica de la pared de quistes de *E. invadens*, *E. histolytica* y de *E. coli*. Arch Invest Med (Méx); 9:113.

27. Das SR, Rastogi AK, Sagar P, Singh MP (1980). Axenic encystation of *Entamoeba invadens*. Indian J Exp Biol; 18:333.
28. Diamond LS (1968). Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudin, 1903 and *Entamoeba histolytica* like amoebae. J Parasit; 54:1046.
29. Diamond LS, Harlow DR, Cunick CC (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoebas*. Trans R Soc Trop Med Hyg ; 72:431.
30. Del Pozo EC, Alcaraz MD (1956). Clinical trial of glaucarubin in treatment of amebiasis. Am J Med 10:412-417.
31. Domínguez XA, Franco R, Cano G, García-Delgado C, García S, Torres MJ (1978). Plantas medicinales mexicanas XXXIX. Aislamiento de simaroubolidanos de la raíz de la *Castela texana* (T & G)Rose (chaparro amargoso, bisbirinda). Rev Latinoam Quím; 10:138.
32. Domínguez XA (1988). Métodos de Investigación Fitoquímica. 4a Ed. Editorial Limusa S.A. de C.V., México D.F., 175-186.
33. El Tahir A, Satti GM, Khalid SA (1999). Antiplasmodial activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Maytenus senegalensis* (Lam)Excel. Journal of Ethnopharmacology 64(3):227-233.
34. García-Zapata AG, Hernández-Gutiérrez R, Mora-Galindo J (1995). Simultaneous growth and mass encystation of *Entamoeba invadens* under axenic conditions. Arch Med Res; 26:257.
35. Geiman QM, Ratcliffe HL (1936). Morphology and life-cycle of an amoeba producing amoebiasis in reptiles. Parasitol; 28:208.
36. Geissman TA, Chandorkar KR (1961). Bitter principles of the Simaroubaceae. I. Chaparrin from *Castela nicholsonii*. J Org Chem; 26:1217.
37. Geissman TA, Ellestead GA (1962). Tetrahedron letters 1083-8.
38. Gillin FD, Reiner DS (1982). *In vitro* activity of certain quassinoid anti-tumor agents against *Entamoeba histolytica*. Arch Invest Med (Méx); 13:43.
39. Grieco PA, Vander-Roest JM, Piñeiro-Núñez MM, Campaigne EE, Carmack M (1985). Polyandrol, a C19 quassinoid from *Castela polyandra*. Phytochemistry; 38:1463.
40. Grieco PA, Haddad J, Piñeiro-Núñez MM, Huffman JC (1999). Non-quassinoid constituents from the twigs and thorns of *Castela polyandra*. Phytochemistry 50(4):511-525

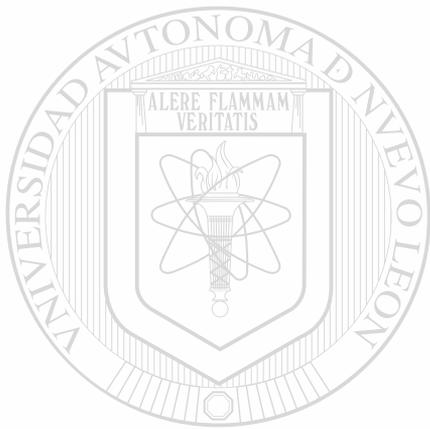
41. Grieko PA, Haddad J, Pineiro-Núñez MM, Huffman JC (1999). Quassinoids from the twigs and torns of *Castela polyandra*. *Phytochemistry* 50(4):637-645.
  42. Gutiérrez G, Ludlow A, Espinosa G, Herrera S, Muñoz D, Rattomi N, Sepúlveda B (1976). Encuesta Serológica Nacional. II Investigación de Anticuerpos contra *Entamoeba histolytica* en la República Mexicana. En: B Sepúlveda y LS Diamond (eds). *Memorias de la Conferencia Internacional de Amibiasis*. Instituto Mexicano del Seguro Social, México D.F.
  43. Huxtable RJ (1992). The pharmacology of extinction. *J Ethnopharmacol* 37:1.
  44. Kagan IG (1976). Seroepidemiology of amebiasis. En: B Sepúlveda Y LS Diamond (eds). *Memorias de la Conferencia Internacional de Amibiasis*. Instituto Mexicano del Seguro Social., México.
  45. Keene AT, Harris A, Phillipson JD, Warhurst DC (1985). *In vitro* amoebicidal testing of natural products: Part I. Methodology, *Planta Med*: 278.
  46. Kosuge K, Mitsunaga K, Lkoike K, Ohmoto T (1994). Studies on constituents of *Ailanthus integrifolis*. *Chem Pharm Bull Tokyo* 42(8):1669-1671.
  47. Krestchmer R (1986). Immunology of amebiasis. In A Martínez-Palomo (ed): *Amebiasis*, Amsterdam, Elsevier Biomedical, pp. 95-168.
  48. Kubo I, Murai Y, Chaudhuri SK (1992). Structure of chaparramarin, a quassinoid from *Casiela tortuosa*. *Phytochemistry* 31(9): 3362-4.
- 
49. Kupchan SM, Britton RW, Lacadie JA, Ziegler MF, Sigel CW (1975). The isolation and structural elucidation of bruceantin and bruceantanol, new potent antileukemic quassinoids from *Brucea antidysenterica*. *J Org Chem* 40(5):648-654.
  50. López Revilla R, Rodríguez J (1976). *Manual de Cultivo*. Departamento de Biología Celular, CINVESTAV, México DF.
  51. Ludvik J, Shipston AC (1970). The ultra structure of *Entamoeba histolytica*. *Bull Org Mund Santé*; 43:301.
  52. Martínez M (1959). *Las Plantas Medicinales de México*. 4a Ed. Ediciones Botas, México DF,100.
  53. Martínez-Palomo A, González Robles A, de la Torre M (1973). Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced by concanavalin A. *Nature New Biol*. 245:186-187.

54. Martínez-Palomo A, Arroyo-Begovich A, Sánchez ME (1978). Formación de la pared celular durante el enquistamiento de *Entamoeba invadens*. Arch Invest Med (Méx) 9:105.
55. Martínez-Palomo A (1982). The biology of *Entamoeba histolytica*. Chichester: Research Studies Press.
56. Martínez-Palomo A (1986). Biology of *Entamoeba histolytica*. In A Martínez-Palomo (ed): Amebiasis. Amsterdam: Elsevier Biomedical, 11-43.
56. Martínez-Palomo A (1987). The pathogenesis of amoebiasis. Parasitol. Today 3:111-118.
57. Martínez-Palomo A, Ruiz-Palacios G (1990). Amebiasis. In: Tropical and Geographical Medicine (KS Warren y AF Mahmoud, eds) pp. 327-344. McGraw-Hill, New York.
58. Martínez-Velez S (1986). Tratamiento de la amebiasis quística con chaparro amargoso. Tesis de Postgrado con Especialidad en Medicina Familiar, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Cuernavaca, Mor, México.
59. McConnachie EW (1969). The morphology, formation and development of cysts of *Entamoeba*. Parasitol; 59:41.
60. Meza I, Meraz MA, De la Garza M, de la Torre M, Tanimoto M, Martínez-Palomo A (1986). Isoenzyme patterns of *Entamoeba histolytica* isolates from asymptomatic carriers. Am J Trop Med Hyg 35:1134-1139.
61. Mirelman D, Bracha R, Chayen A, Aug-Kettis A, Diamond LS (1986a). *Entamoeba histolytica*: Effect of growth conditions and bacterial associates on isoenzyme patterns and virulence. Exp Parasitol 62:142-148.
62. Mirelman D, Bracha R, Wexler A, Chayen A (1986b). Alterations of isoenzyme patterns of a clone culture of non-pathogenic *Entamoeba histolytica* upon changes in growth conditions. Arch Invest Med (Méx) 17(Suppl 1):187-193.
63. McLaughlin J, Aley S (1985). The biochemistry and functional morphology of *Entamoeba*. J Protozool 32:221-240.
64. Morales-Vallarta M, Villarreal-Treviño L, Guerrero-Medrano L, Ramírez-Bon E, Navarro-Marmolejo L, Said-Fernández S, Mata-Cárdenas B (1997). *Entamoeba invadens* Differentiation and *Entamoeba histolytica* Cyst-Like Formation Induced by  $\text{CO}_2$ . Arch Med Res; 28:150.

65. Morales-Vallarta M (1991). 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 presentó el maestro Morales-Vallarta en el Depto. de Postgrado de la Fac. de Ciencias Biológicas de la UANL en Mayo de 1991.
66. Muñoz O (1989). Epidemiología de la Amibiasis. En: Martínez-Palomo A (eds) Amibiasis, 1a Ed. Editorial Médica Panamericana SA, México DF, 164.
67. Moretti C, Deharo E, Sauvain M, Jardel C, David PT, Gasquet M (1994). Antimalarial activity of cedronin. *J Ethnopharmacolo* 43(1):57-61.
68. Nixon PI (1914). Chaparro amargosa in the treatment of amoebic dysentery. *J Am Med Assn*; 42:1530.
69. Ohnishi S, Fukamiya N, Okano M, Tagahara K, Lee KH (1995). Bruceosides D,E, and F, three new cytotoxic quassinoid glucosides from *Brucea javanica*. *J Nat Prod* 58(7):1032-8.
70. Pinto da Silva, Martínez-Palomo A, González Robles A (1975). Membrane structure and surface coat of *Entamoeba histolytica*. Top chemistry and dynamics and the cell surface: Cap formation and microexudate. *J Cell Biol* 64:538-550.
71. Portillo I (1992). Consideraciones al método de diferenciación de *Entamoeba invadens* por alta tensión de CO<sub>2</sub>. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Químico Bacteriólogo Parasitólogo, UANL, México.
72. Powell, SJ, Elsdon-Drew R (1972). *Am J Trop Med Hyg* 21:518.
- 
73. Putegnat JL (1883). *Castela nicholsonii* characteristics and proximate analysis. *New Remedies*, NY; 12:102.
74. Raham S, Fukamiya N, Ohno N, Tokuda H, Nishino H, Tagahara K, Lee KH, Okano M (1997). Inhibitionary effects of quassinoids derivatives on Epstein-Barr virus early antigen activation. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 45(4):675-677.
75. Raizada MK, Krishna-Murti CR (1972). Transformation of tropic *Harmamella culberstoni* into viable cysts by cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. *J Cell Biol*; 522:743.
76. Ratcliffe HL, Geiman QM (1933). Eleven cases of amoebiasis in reptiles. *J Parasitol*; 20:139.
77. Reed SL, Curd JG, Guillin FD, Braude AI (1986). Activation of complement by pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Immunol* 136:2265-2270.

78. Rees CW, Reardon LV, Jacobs L, Jones F (1941). Problems encountered in the growth of *Endamoeba histolytica* in cultures developed by micro-isolation. *Am J Trop Med*, 21:567.
79. Reugpien S, Bailey GB (1975). Differentiation of *Entamoeba*: a new medium and optimal conditions for axenic encystation of *E. invadens*. *J Parasitol*; 61:24.
80. Rollo IM (1970). Drugs used in the Chemotherapy of Amebiasis. En Goodman LS, Gilman A. (eds). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 4a Ed, MacMillan Co. New York, New York, 1125.
81. Samaniego-Verduzco RI (1987). Estudio comparativo entre la *Castela tortuosa* y la diyodohidroxiquinoleína en el tratamiento de la amebiasis intestinal quística. Tesis de Postgrado con Especialidad en Medicina Familiar. Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Cuernavaca Mor, México.
82. PG, Jackson TFGH, Simjee A (1982). Biochemical homogeneity of *Entamoeba histolytica* isolates, especially those from liver abscess. *Lancet* I:1386-1388.
83. Segura JJ, López-Revilla R (1976). En: *Amebiasis* (eds) B Sepúlveda y L Diamond. Instituto Mexicano del Seguro Social, México, p 120.
84. Segura JJ, Calzado-Flores, C. Fernández S, Hurtado-Díaz LM (1980). VIII Congreso Latinoamericano de Farmacología, México, DF., Noviembre, 1980.
85. Sellards AW, McIver MA (1918). The treatment of amoebic dysentery with chaparro amargosa (*Castela nicholsonii* of the family Simaroubaceae). *J Pharmacol Exp Ther*; 11:331.
86. Sepúlveda B, Martínez-Palomo A (1984): Amoebiasis. In KS Warren y AAF Mahmoud (eds): *Tropical and Geographical Medicine*. New York: McGraw-Hill, pp. 305-318.
87. Shephard S, Lond LCP, Lillie DG, Cantab MA (1918). Persistent carriers of *Entamoeba histolytica*. Treatment with chaparro amargosa and simaruba. *Lancet*; 94:50.
88. Snyder TL, Meleney HE (1941). The excystation of *Endamoeba histolytica* in bacteriologically sterile media. *Am J Trop Med*; 21:63.
89. Standley PC (1923). *Trees and Shrubs of México*. NS Herbarium, Smithsonian Press, Washington, DC; 23:539.
90. Stone WS (1935). A method of producing encystment in cultures of *Endamoeba histolytica*. *Am J Trop Med*; 15:681.

91. Treviño N, Feria VA (1971). Golgi complex in trophozoites of *Entamoeba histolytica*. 29<sup>th</sup> Ann Proc Electron Microscopy Soc Am.
  92. Trissl D, Martínez-Palomo A, Arguello C, de la Torre M, de la Hoz R (1977). Surface properties related to concanavalin A-induced agglutination. A comparative study of several *Entamoeba* strains. J Exp Med 145:652-665.
  93. Trissl D, Martínez-Palomo A, Arguello C, de la Torre M, de la Hoz R, Pérez de Suarez E (1978). Surface properties of *Entamoeba*: Increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. J Exp Med 148:1137-1145.
  94. Trissl D (1982). Immunology of *Entamoeba histolytica* in human and animal hosts. Rev Infect Dis 4:1154-1184.
  95. Uphof JC (1968). Dictionary of Economic Plants. 5a Ed Verlag von J Cramer, Brasilea; 113:339.
  96. Vazquezdelara-Cisneros LG, Arroyo-Begovich A (1984). Induction of encystation of *Entamoeba invadens* removal of glucose from the culture medium. J Parasitol; 70:629.
  97. Verma AK, Raizada MK, Krishna CR (1974). Effect of bioamines on the cellular differentiation of *Harmannella culberstoni*. Bioch Pharm; 23:57.
  98. Wall ME, Wani MC (1977). Antineoplastic agents from plants. Ann Rev Pharmacol Toxicol; 17:117.
- 
99. Wall, ME, Wani MC (1978). Plants antitumor agents. 17 Structural requirements for antineoplastic activity in quassinoids. J Med Chem; 21:1186.
  100. Walsh J (1986a). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis. Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev Infect Dis. 8:228-238.
  101. Walsh J. Amebiasis in the world. Arch Invest Med (Méx) (Suppl)17:385-389.
  102. Wehrli W, Nüesch J, Knüsel F y StaeHelim M (1968). Biochim Biophys Acta. 157:215.
  103. World Health Organization (1969). Amoebiasis: Report of a WHO Expert Committee. W.H.O. Geneva, Tech Rep Ser, No.421.
  104. World Health Organization (1981). Amoebiasis. Intestinal Protozoan and Helminthic Infections: Report of a W.H.O. Scientific Group. W.H.O., Geneva Tech Rep Ser, No. 666.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



