

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LA CHAPARRINA
in vitro SOBRE Entamoeba histolytica
Y FIBROBLASTOS DIPLOIDES HUMANOS

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN
QUIMICA DE PRODUCTOS NATURALES

PRESENTA

LA ING. QUIM. CARMINA CALZADO FLORES

MONTERREY N. L.

ABRIL DE 1995.

TM

Z5320

FCB

1995

C3



1020091525

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DIVISION DE INVESTIGACIONES DE POSGRADO



ACTIVIDAD CITOTOXICA DE LA CHAPARRINA
in vitro SOBRE Entamoeba histolytica
Y FIBROBLASTOS DIPLOIDES HUMANOS

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN
QUIMICA DE PRODUCTOS NATURALES

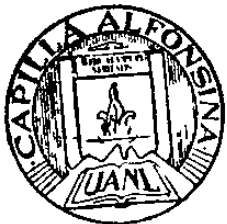
PRESENTA

LA ING. QUIM. CARMIÑA CALZADO FLORES

MONTERREY N. L.

ABRIL DE 1995.

TM
25320
FCB
1995
C3



FONDO TESIS

167206

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

ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LA CHAPARRINA in vitro SOBRE
Entamoeba histolytica Y FIBROBLASTOS DIPLOIDES HUMANOS

TESIS

QUE EN OPCIÓN AL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN
QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

PRESENTA

LA ING. QUIM. CARMINA CALZADO FLORES

COMISION DE TESIS

PRESIDENTE:



DR. JOSE JUAN SEGURA LUNA.

SECRETARIO:



DRA. JULIA VERDE STAR.

VOCAL:



DR. MARIO MORALES VALLARTA.

MONTERREY N.L.

ABRIL DE 1995.

RESUMEN

OBJETIVO GENERAL: Analizar la actividad citotóxica de la chaparrina sobre cultivos axénicos de E. histolytica, cepa HM-1:IMSS y de fibroblastos diploides humanos, cepa MRC-5.

1. A partir de la raíz de la planta denominada Castela texana o "chaparro amargoso" se logró aislar un compuesto amargo de color blanco al que se le identificó como la lactona sesquiterpénica chaparrina por las siguientes pruebas químicas: Determinación de su punto de fusión (pf), factor de corrimiento en cromatografía en capa delgada (Rf) y, espectros de Infrarrojo (IR) y de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), la cual posee la fórmula química $C_{20}H_{28}O_7$.

2. Se determinó la actividad citotóxica in vitro de diferentes concentraciones de este compuesto sobre el crecimiento de cultivos celulares de E. histolytica y de fibroblastos diploides humanos.

Los resultados de este estudio mostraron que la chaparrina a la máxima concentración empleada (100 μ M) inhibió el 97 % de los cultivos amibianos y solo el 27 % de los cultivos de fibroblastos. Además, esta actividad se conservó hasta 1 μ M de chaparrina y fué muy semejante a la observada con drogas antiamibianas conocidas, como la emetina y el metronidazol.

INDICE

RESUMEN.....	I
IMPORTANCIA.....	1
OBJETIVOS.....	2
1. Objetivo General.....	2
2. Objetivos Específicos.....	2
ANTECEDENTES	3
1. Descripción Botánica.....	3
2. Clasificación Botánica.....	4
3. Usos en Medicina Tradicional.....	5
4. Actividad Biológica <u>in vitro</u> de Extractos y Compuestos Aislados de la Planta.....	6
5. Características Químicas de la <u>Castela texana</u>	10
ORIGINALIDAD.....	11
HIPOTESIS.....	12
MATERIAL Y EQUIPO.....	12
METODO.....	14
1. Obtención de la Chaparrina.....	14
2. Actividad Antiamibiana de la Chaparrina.....	17
3. Actividad de la Chaparrina Sobre Cultivos <u>in vitro</u> de Fibroblastos Diploides Humanos.....	18

4. Pruebas de Citotoxicidad de la Chaparrina Sobre Cultivos <u>in vitro</u> de Fibroblastos Diploides Humanos.....	20
5. Efecto Citotóxico y Citostático de la Chaparrina.....	22
RESULTADOS.....	23
CONCLUSIONES.....	29
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	31
FIGURA 1.....	36
FIGURA 2.....	37
FIGURA 3.....	37
FIGURA 4.....	42
TABLA 1.....	38
TABLA 2.....	39
FOTOGRAFIA 1.....	36
FOTOGRAFIA 2.....	40
FOTOGRAFIA 3.....	40
FOTOGRAFIA 4.....	40
FOTOGRAFIA 5.....	41
FOTOGRAFIA 6.....	41
FOTOGRAFIA 7.....	41

IMPORTANCIA.

Se estima que aproximadamente un 12 % de la población mundial es portadora del protozooario denominado Entamoeba histolytica, la enfermedad que este produce se conoce como amibiasis, y se localiza con mayor frecuencia en regiones tropicales y subtropicales (1). Aunque la terapéutica actual cuenta con diversos medicamentos para combatir esta enfermedad, ninguno está exento de producir efectos tóxicos indeseables en el humano (2). 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.

Las pruebas in vitro representan una etapa importante al estudio farmacológico de nuevos medicamentos previa a las pruebas in vivo; ya que estas pruebas son relativamente más económicas, se pueden efectuar en un período más corto de tiempo y son altamente sensibles. Además, si tomamos en cuenta de que en el caso del estudio de principios naturales extraídos a partir de plantas en el que en muchas ocasiones se nos presenta el inconveniente de no contar con suficiente muestra para realizar los estudios con animales, las pruebas

realizadas en cultivos de células son muy útiles ya que ofrecen un micrométodo, a partir de el cual se pueden obtener resultados preliminares aún y cuando la cantidad del principio activo aislado corresponda a una micromuestra, de tal manera que pudieran realizarse ensayos para demostrar la actividad que se espera tenga in vivo (3).

OBJETIVOS.

Objetivo General: Analizar la actividad citotóxica in vitro de la chaparrina sobre cultivos axénicos de Entamoeba histolytica, cepa HM-1:IMSS, y sobre cultivos axénicos de fibroblastos diploides humanos, cepa MRC-5.

Objetivos Específicos:

1. Aislar e identificar el compuesto denominado como chaparrina a partir de la raíz de la planta conocida como Castela texana y en la Medicina Tradicional como "chaparro amargoso".
2. Determinar la actividad citotóxica de la chaparrina sobre el crecimiento de cultivos celulares de E. histolytica, cepa HM-1:IMSS y

hacer una comparación con la actividad de drogas antiamebianas conocidas.

3. Analizar la actividad citotóxica de la chaparrina sobre el crecimiento celular de cultivos de fibroblastos diploides humanos cepa MRC-5.
4. Establecer una comparación entre los efectos producidos por la chaparrina sobre los trofozoítos amebianos y los fibroblastos diploides humanos.

ANTECEDENTES.

1. Descripción Botánica. Muchas drogas "modernas" (tales como la quinina y la emetina) se han obtenido a partir de la Medicina Tradicional. La chaparrina es un compuesto puro que se extrae a partir de la planta llamada Castela texana o Castela nicholsoni (Torr y Gray) Rose. Esta planta pertenece a la Familia de las Simaroubaceas, y su localización corresponde a las regiones áridas del Norte de nuestro País, especialmente a los estados de Durango, Tamaulipas, San Luis Potosí, Nuevo León y, el sureste de

Texas (4).

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 (Fotografía No.1).

Recibe los nombres vulgares de "bisbirinda" en Tamaulipas, "amargoso" en Nuevo León y "chaparro amargoso" en Texas (4-7).

2. Clasificación Botánica.

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

3. Usos en Medicina Tradicional. El uso de las plantas está ligado a un contexto cultural que se desarrolla en ciertas comunidades. 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 en base a su uso etnobotánico (uso de las mismas por varias culturas). Spujt y Col en 1992 se dieron a la búsqueda de compuestos con actividad antineoplásica y, cuando ellos seleccionaron al azar los compuestos para su estudio solo encontraron un 10 % de respuesta antineoplásica en comparación de cuando su selección se hizo en base a su uso etnobotánico en cuyo caso encuentran un 20 % de respuesta (8).

Los conocimientos sobre las plantas medicinales en México son en su mayoría empíricos, datan desde épocas anteriores al descubrimiento de América. De acuerdo con la bibliografía consultada, una de las primeras publicaciones sobre el uso farmacológico de la *C. texana* fué 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 minutos 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 (9).

Posteriormente en 1918, Shephard y Sellards 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 (10-11).

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 (12).

4. Actividad Biológica in vitro de los extractos y de algunos compuestos aislados de la planta. Uno de los primeros reportes encontrados en la literatura sobre la actividad biológica in vitro de la planta fué el presentado

por Nixon en 1914; él observó que una dilución del extracto acuoso de 1:10 000 era suficiente para inmovilizar a trofozoítos aislados de pacientes con absceso hepático amibiano(13). Aún cuando este hallazgo fué prometedor para el advenimiento de un nuevo fármaco antiámibiano no fué sino hasta 1960 que Druey menciona la actividad amebicida in vitro de un principio activo extraído de la planta, la glaucarubina (14).

Posteriormente todas las investigaciones relacionadas con la actividad biológica de compuestos aislados de las Simaroubaceas estuvieron relacionadas con sus propiedades antitumorales in vitro e in vivo (15-16). hasta que en 1982 Frances Gillin y Col. prueban el efecto de 17 compuestos aislados de diferentes plantas pertenecientes a la familia de las Simaroubaceas utilizando un modelo de crecimiento de E. histolytica en agar semisólido. Ellos encuentran que la bruceantina aislada de la Brucea antidysentérica originaria de Etiopía es un potente amebicida a 0.076 $\mu\text{g/ml}$ y que comparada con el metronidazol (4.25 $\mu\text{g/ml}$) es 30 veces más activa. El problema de la bruceantina está en su toxicidad, ya que dosis superiores a 4 mg/Kg diarios en ratones fueron

letales (17).

Nosotros inicialmente probamos el efecto antiambiano de diferentes extractos preparados a partir de la parte aérea de la C. texana: extracto etanólico y extracto metanólico-clorofórmico, sobre el crecimiento ambiano de la cepa E. histolytica HM-2:IMSS mantenida en el medio de cultivo líquido TP-S-1 (18) y encontramos que el extracto metanólico-clorofórmico era el más activo a las tres concentraciones probadas: 10,50 y 100 µg/ml (19).

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 Simaroubaceas: extracto butanólico crudo de Brucea jabanica, bruceantina, bruceína C, quassina y xantina-6-1.

La Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀) de estos compuestos sobre E. histolytica fué 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 (20).

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 amibiiasis intestinal comprobada por estudios coproparasitológicos y, la compararon con la actividad de la diyodohidroxiquinoleína, droga antiamebiana 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 diyodohidroxiquinoleína reportaron: náusea, dolor abdominal y cefaléas. Otro problema que se pudo observar durante el estudio es que los pacientes tienden a abandonar con facilidad el tratamiento con las diyodohidroxiquinoleínas por lo largo de su duración (21 días), en comparación con el de Castela: 12 días. (21-22).

5. Características químicas de la Castela texana. La familia de las Simaroubaceas son plantas que se han caracterizado por poseer principios amargos (11), los cuales son triterpenos degradados denominados quassinoides (10).

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 fué el presentado por Bosman en 1922, quien aisló un glicósido al que nombró castelina con un punto de fusión (pf) de 105°C (23). Un año más tarde, el mismo autor obtiene otro principio amargo cristalino al que llamó castelamarina con pf de 267°C (2).

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 ($C_{20}H_{28}O_7$), cuya estructura correspondió a una lactona, ya que presentó coloración azul intensa al reaccionarlo con ácido sulfúrico concentrado. Un año más tarde la estructura de la chaparrina fué identificada (Fig. 1) por este mismo

autor cómo una molécula con cuatro grupos hidroxilo, un carbonilo y un anillo lactónico (24).

Otros componentes aislados de la C. texana son la glaucarubolona con pf de 258°C (15), 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_2 .

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 (16).

ORIGINALIDAD.

La amibiasis se encuentra en la actualidad ampliamente distribuída a nivel mundial, por lo que se sigue considerando como un problema de salud. La terapéutica actual cuenta con diversos medicamentos, pero ninguno está exento de producir efectos tóxicos indeseables en el humano, por lo tanto, se debe continuar la búsqueda de nuevos agentes amebicidas, de menor toxicidad y con igual o mayor potencia que los ya existentes.

HIPOTESIS.

Cómo los extractos de la Castela texana son utilizados en medicina tradicional en el tratamiento de disenterías de origen amibiano sin que se presenten efectos tóxicos en los pacientes, se espera que la chaparrina, compuesto extraído de esta planta resulte altamente activo (citotóxico) sobre los cultivos amibianos, y no presente actividad citotóxica alguna en los cultivos de células diploides humanas. Esta línea celular posee al menos el 75 % del cariotipo de las células normales de la especie de la cual fueron obtenidas originalmente.

MATERIAL Y EQUIPO.**Material Biológico:**

1. Línea celular de trofozoítos amibianos: cepa, HM-1:IMSS de Entamoeba histolytica.
2. Línea celular de fibroblastos diploides humanos cepa, MRC-5 de fibroblastos derivados de tejido de pulmón fetal.
3. Suero de bovino.
4. Suero Fetal de bovino.

Material Químico:

1. Medio de cultivo TYI-S-33 de Diamond.
2. Medio de cultivo basal de Eagle diploide.
3. Chaparrina, Emetina-HCl (Sigma Chem.).

Equipo:

1. Equipo de extracción tipo soxhlet.
2. Equipo para realizar CCL (cromatografía líquida en columna).
3. Equipo para realizar ccd (cromatografía en capa delgada).
4. Rotaevaporador marca Buchii.
5. Campana de cultivo.
6. Centrífuga refrigerada marca Diamond.
7. Incubadora marca National Apliance Co.
8. Fotomicroscopio compuesto, marca Carl Zeiss.
9. Fotomicroscopio invertido Modelo "D", marca Carl Zeiss.
10. Microcomputadora PC.

METODO.

1. Obtención de la chaparrina. Para poder llevar a cabo este estudio, primeramente se realizó la colecta de la planta Castela texana en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL situado aproximadamente a 20 Km hacia el norte de la ciudad de Monterrey, en el mes de Septiembre de 1992.

Posteriormente se procedió a aislar la chaparrina haciendo una modificación al método reportado por el Dr. Xorge A. Domínguez en 1979 (25): El material de estudio (raíz de la planta), se dejó secar en un horno de gas a una temperatura alrededor de 50°C durante 4-8 horas. Una vez seco, se llevó a un molino tipo "Willey" en el cual se trituro finamente.

Dos kilos de material seco y molido se extrajeron con metanol (MeOH) en extractores tipo soxhlet durante 7 días.

El extracto obtenido (E-MeOH-D) se concentró en un rotavapor a presión reducida y, posteriormente se sometió a una partición con dicloruro de metilo-agua ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$ 3:1 v/v) en un embudo de separación mediante constante agitación,

y la capa intermedia formada que resultó ser insoluble tanto en CH_2Cl_2 como en H_2O de color café claro y de consistencia granulosa.

Esta capa intermedia se corrió en una cromatografía en columna (CCL en sílica gel-60) y se hizo la secuencia cromatográfica de las fracciones obtenidas.

Los principios obtenidos fueron aislados mediante el empleo de la cromatografía en columna líquida por succión (CCL) e identificados por cromatografía en capa delgada (ccd).

Se usaron columnas cromatográficas de vidrio cuyas medidas estuvieron en función de la cantidad del extracto a percolar. La columna cromatográfica se colocó a la boca de un matraz erlenmayer para la colecta de las distintas fracciones eluidas. Se usaron como eluentes combinaciones de hexano-acetona y acetona-metanol, todas ellas de menor a mayor polaridad.

La cromatografía en capa delgada se utilizó para determinar al o los compuestos presentes en la fracción activa del extracto. Se usaron cámaras de vidrio cerradas con

una tapa movable también de vidrio. Las placas cromatográficas estaban cubiertas con una pasta de gel de sílice G (Merck). Como eluentes se usaron combinaciones de CH_2Cl_2 -MeOH y, como agentes cromogénicos se utilizaron la luz ultravioleta (UV) de onda corta y onda larga y, la solución de cloruro de cobalto al 2 % en ácido sulfúrico acuoso al 10 %.

Para la identificación de la chaparrina se utilizaron métodos químicos y físicos entre los que se encuentran las reacciones de identificación, punto de fusión (pf), cromatografías comparativas en capa delgada (ccd), métodos espectroscópicos: espectroscopía de absorción en el ultravioleta (UV), en el infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN), rotación óptica y espectroscopía de masas.

El molido del material así como las determinaciones del punto de fusión y de los métodos espectroscópicos se realizaron en el Departamento de Química del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM).

2. Actividad anti*Amibiana* de la chaparrina. Una vez aislada la chaparrina se observó su efecto sobre la cinética de crecimiento de la cepa axénica HM-1:IMSS de Entamoeba histolytica, propagada en el medio de cultivo TYI-S-33 a 35.5 °C según la técnica de Diamond (26).

La chaparrina fué disuelta en el propio medio basal de cultivo a temperatura de ebullición para obtener una solución madre (100 µM de chaparrina), a partir de la que se hicieron diluciones seriadas de con el mismo medio de cultivo para obtener las concentraciones de 10, 1.0, y 0.1 µM de chaparrina. Posteriormente estas soluciones se esterilizaron por filtración, utilizando membranas Gelman de un tamaño de poro de 0.2 µm. Volúmenes de 10 ml de las soluciones esterilizadas, se almacenaron en tubos de vidrio estériles, pyrex de 16 x 125 mm con tapón de rosca a 24 °C. En seguida a cada tubo se le añadió una alícuota de 1 ml de suero de bovino adicionado de vitaminas y, se incubaron 48 h a 36°C como prueba de su esterilidad.

Pasada esta prueba se les añadió un inóculo de 10^4 trofozoítos/ml y se pusieron a incubar a 35.5°C.

Posteriormente por triplicado, se determinó la densidad celular de los cultivos con las diferentes concentraciones de chaparrina utilizando la técnica de exclusión al colorante vital azul de tripano y con la ayuda de un hematímetro, por la técnica microscópica de contraste de fases en un fotomicroscopio Carl Zeiss compuesto.

Simultáneamente se hicieron dos grupos testigo: uno correspondiente al crecimiento típico amibiano y otro al grupo testigo positivo que corresponde a la actividad de fármacos antiamibianos conocidos.

3. Actividad de la chaparrina sobre cultivos in vitro de fibroblastos diploides humanos. Primeramente se establecieron y adaptaron los cultivos de fibroblastos en las condiciones de nuestro laboratorio:

Cultivos axénicos de fibroblastos diploides humanos derivados de tejido de pulmón fetal humano, cepa MRC-5 fueron comprados a la compañía In Vitro S.A. Su propagación en nuestro laboratorio se llevó a cabo en el Medio basal de Eagle diploide suplementado con 10 % de suero fetal de bovino y 2.5 % de bicarbonato de sodio gasificado al 4.4 % (27).

Los cultivos se establecieron en cajas Falcon con 25 cm² de superficie con tapón de rosca y se desarrollaron en una incubadora marca National Appliance Co. a 35.5°C.

Para la resiembra de los cultivos primeramente se retiró en esterilidad de las cajas con ayuda de una pipeta pasteur el medio de cultivo consumido. Posteriormente se agregaron 5 ml de una solución de tripsina-verseno (0.05% - 0.05% v/v), a 36°C para desprender las células de las paredes de la caja.

La solución de tripsina-verseno se decantó y se añadió nuevamente 1 ml de la misma en iguales condiciones, se dejó por espacio de 15-20 min a 35.5 °C hasta que se observó al microscopio (fotomicroscopio invertido, marca Carl Zeiss) el desprendimiento completo de las células. Posteriormente las mismas se barrieron suavemente con la misma solución con ayuda de una pipeta pasteur y bulbo estériles.

Finalmente se resuspendieron en 3 ml de medio fresco, mantenido previamente a 36°C y se dispersaron en forma homogénea. Se tomó una pequeña muestra con una pipeta pasteur y se contó con ayuda de un hematímetro el número de células de la misma manera como se cuentan los glóbulos

blancos y se ajustó el inóculo (10^4 células/ml de medio) de la resiembra.

El inóculo se pasó a cajas nuevas y se ajustó a un volumen de 6 ml con medio fresco, y se agitó suavemente de 20 a 25 veces para homogenizar el cultivo. Es importante señalar con un lápiz graso en una de las caras de la caja la fecha de la siembra y el número de generación del cultivo. Las cajas se devolvieron a la incubadora y se revisaron cada 24 h para detectar cualquier contaminación; se deshecharon las cajas contaminadas.

Al momento de la formación de la primera monocapa se procede a la resiembra. Con inóculos de $15-20 \times 10^3$ células por caja, se obtuvo la monocapa aproximadamente a las 96 h. A partir de una caja en confluencia se pueden sembrar dos o cuatro cajas en tales condiciones lo cual dará lugar a una o dos generaciones respectivamente.

4. Pruebas de citotoxicidad de la chaparrina sobre cultivos in vitro de fibroblastos humanos. Para hacer las pruebas de citotoxicidad se evaluaron los siguientes parámetros:

- 1) Observación morfológica de las células con ayuda de un fotomicroscopio invertido marca Carl Zeiss.
- 2) Cinética de proliferación celular. Implica la elaboración de curvas de crecimiento de las células en presencia de diferentes concentraciones de chaparrina.

Primeramente se preparó, una solución concentrada de chaparrina (100 μM) disuelta en el mismo medio de cultivo y, a partir de ella se hicieron diluciones con el medio de cultivo para obtener las concentraciones de chaparrina (10, 1, 0.1 μM).

Estas soluciones se esterilizaron haciéndolas pasar por filtros Millipore HAW con poro de 0.22 μm y se colocaron volúmenes de 5 ml en cajas Falcon estériles de 25 cm^2 a las cuales posteriormente se les añadieron suero fetal de bovino al 10 % y la solución gasificada de bicarbonato.

Por último se inocularon las células ($10^4/\text{ml}$) y se llevaron a la incubadora a 35.5°C. Diariamente se contaron tres cajas por concentración, utilizando un

hematímetro igual a como se cuentan los glóbulos blancos empleando la técnica de exclusión al colorante vital azul de tripano.

A partir de los valores de porcentaje de inhibición de crecimiento de los cultivos obtenidos se calcularon los valores Probit correspondientes utilizando las tablas de Finney (28) para determinar la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) producida por la chaparrina sobre los cultivos de fibroblastos y sobre los cultivos amibianos.

5. Efecto citotóxico y, citostático de chaparrina.

La valoración de la capacidad de recuperación de los cultivos después de haber permanecido en contacto con las diferentes concentraciones de chaparrina por un período de tiempo de 72h sirve para diferenciar si la concentración del fármaco utilizada en los cultivos fué suficiente para producir un efecto citotóxico o uno citostático. Una vez que los cultivos fueron tratados con el fármaco por el período preestablecido se les cambia el medio de cultivo con chaparrina por medio de crecimiento fresco y, se incuban a 35.5°C. Posteriormente se

hace la observación periódicamente al microscopio de los cultivos y se determina el grado de recuperación y si son capaces de llegar a desarrollar una monocapa celular.

Nota: Todas las fotografías fueron tomadas con ayuda de una cámara fotográfica adaptada al microscopio marca Carl Zeiss utilizando la técnica de contraste de fases y un aumento de 400X para los trofozoítos amibianos y de 160X para los fibroblastos diploides humanos respectivamente.

RESULTADOS.

Se obtuvieron 120 g de el extracto metanólico directo (E-MeOH-D): 6.0 % de recuperación respecto al peso de la raíz seca extraída.

Despues de correr la cromatografía en capa delgada (ccd) en placas de silica gel-60 del E-MeOH-D en un sistema CH_2Cl_2 -MeOH (9:1) v/v se revelaron las siguientes manchas:

UV.	CoCl_2	Rf
-	café	0.98
-	café	0.80

amarilla	-	0.59
azúl	-	0.51
gris	-	0.42
amarilla	-	0.35
amarilla	-	0.25
azúl	-	0.19
amarilla	-	0.13

Posteriormente se sometió el E-MeOH-D a una partición con dicloruro de metilo-agua ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$ 3:1) en un embudo de separación mediante constante agitación, y se observó la formación de una capa que resultó ser insoluble tanto en CH_2Cl_2 como en H_2O y que siempre se formaba en la interfase, de un color café claro y de consistencia granulosa; a esta capa se le dió el nombre de capa intermedia, obteniéndose 16.0 g de ella (0.8 % de recuperación respecto al total de la raíz seca).

La capa intermedia (16 g) se corrió en una cromatografía en columna (CCL en sílica gel-60) y se hizo la secuencia cromatográfica de las fracciones obtenidas.

Fracción (de 250 ml c/u)	Eluente	Observaciones
1-2	Hexano	ningún residuo
3-6	Hexano-acetona 9:1	"
7-8	Hexano-acetona 8:2	"
9-11	Hexano-acetona 7:3	"
12-14	Hexano-acetona 6:4	"
15-17	Hexano-acetona 1:1	"
18-40	acetona	"
41-65	acetona-MeOH 9:1	precipitado blanco
66-78	acetona-MeOH 8:2	"
79-90	acetona-MeOH 1:1	"
91-109	MeOH	ningún residuo

Al aumentar la polaridad del eluente empieza a formarse un precipitado de color blanco amarillento de consistencia polvorienta, el cuál se procedió a lavar varias veces con acetona y, al tomarle una ccd reveló la presencia de un compuesto con impurezas. Posteriormente, mediante lavados con MeOH caliente logró obtenerse puro. Se aislaron 0.100 g (0.005 % de recuperación) de un compuesto de color blanco con

pf= 278-290°C. Su ccd con CH_2Cl_2 -MeOH (9:1) v/v revelada con CoCl_2 dió una mancha de color amarillo-café con un Rf de 0.60 igual que el obtenido con la chaparrina utilizada como testigo .

Pruebas químicas:

Pruebas para Simaroubolidanos: Muchos simaroubolidanos dan coloración azul característica al ponerse en contacto con ácido sulfúrico.

Pruebas espectroscópicas:

La Fig. No. 2 nos muestra el espectro IR obtenido con la muestra de chaparrina aislada. Se utilizó un espectrofotómetro 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.

IR: cm^{-1} : 3400(m), 2900(m), 1740(i), 1470(m), 1370(m), 1240(m), 1030(m).

La Fig. No. 3 presenta el espectro NMR obtenido con la chaparrina aislada en este estudio. Se utilizó un aparato Varian EM 360A de 60 mhz y un HNMR de 400 mhz utilizándose

como referencia interna tetrametilsilano y como disolvente deuterocloroformo.

Se determinaron las propiedades citotóxicas de la chaparrina. La Tabla No. 1 muestra los efectos de este compuesto y de la emetina-HCl sobre el crecimiento de E. histolytica HM-1:IMSS, y podemos observar que la chaparrina resultó tener una buena actividad antiambiana in vitro dentro de el rango de 1-100 μM y que, además posee una potencia relativa similar a la de la emetina (antiambiano utilizado en la clínica).

En la fotografía No. 2 se muestra un cultivo testigo de trofozoítos de E. histolytica, cepa HM-1:IMSS con 72 h de incubación. En la secuencia fotográfica 3 y 4, se puede apreciar el efecto antiambiano (lisis celular) producido por la chaparrina y la emetina-HCl a la concentración de 100 μM respectivamente.

A las concentraciones de 100 μM de los compuestos probados se puede apreciar una lisis total de los trofozoítos ambianos y a la de 0.1 μM ya no se observa efecto alguno.

La Tabla No. 2 presenta la actividad citotóxica de la chaparrina sobre cultivos de fibroblastos diploides humanos, cepa MRC-5. Después de probar el mismo rango de concentración de chaparrina que el empleado con los trofozoítos amibianos solo fué posible inhibir el crecimiento de los fibroblastos en un 27 % con la concentración de 100 μM del compuesto.

La secuencia fotográfica No. 5,6 y 7 nos muestran: el crecimiento del cultivo testigo de los fibroblastos diploides humanos, cepa MRC-5 a las 72 h de incubación, el efecto producido por la chaparrina sobre el crecimiento de los cultivos a la concentración de 100 μM , y por último se observa claramente que el efecto que produjo la chaparrina a la máxima concentración utilizada a las 72 h fué del tipo citostático ya que el cultivo fué capaz de recuperarse después de cambiarle el medio con chaparrina de esta concentración por medio fresco, los cultivos fueron capaces de desarrollar su monocapa característica.

La Fig. 4 presenta la determinación gráfica de la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) de la chaparrina sobre los cultivos de *E. histolytica* y, de los fibroblastos diploides humanos (28). La IC_{50} obtenida por la chaparrina

sobre los trofozoítos amebianos fué similar a la obtenida con la emetina-HCl. En cambio, en el caso de los fibroblastos diploides humanos no fué posible determinarla puesto que, aún a la máxima concentración empleada no se alcanzó una inhibición en el crecimiento de los cultivos mayor al 27%.

CONCLUSIONES.

1. La chaparrina mostró ser un buen agente antiamebiano sobre los cultivos axénicos de E. histolytica cepa HM-1:IMSS a las concentraciones de 1-100 μM .
2. La chaparrina presentó una IC_{50} similar sobre nuestros cultivos amebianos que el de fármacos antiamebianos conocidos.
3. La chaparrina no inhibió el crecimiento de los cultivos axénicos de fibroblastos diploides humanos cepa MRC-5, en más del 27 % aún a la concentración máxima utilizada (100 μM).
4. No se produjo un efecto citotóxico sobre los fibroblastos, el efecto producido fué del tipo citostático, ya que después de haber estado en contacto por 72 h a las

diferentes concentraciones de chaparrina, los cultivos se recuperaron y llegaron a formar su monocapa característica.

5. Puesto que la chaparrina mostró menos actividad sobre los fibroblastos que sobre los trofozoítos amibianos, se puede sugerir que en un futuro podría ser posible identificar a este quassinoide como agente anti-amibiano.
6. La presente investigación muestra que las pruebas in vitro pueden aplicarse al estudio de compuestos aislados a partir de productos naturales para la determinación de su actividad biológica.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.- Muñoz, O. (1989). Epidemiología de la Amibiasis. En Martínez-Palomo, A. (Eds) Amibiasis, 1^a Ed., Editorial Médica Panamericana S.A., México D.F. págs.164-183.
- 2.- Rollo, I.M. (1970) Drugs used in the Chemotherapy of Amebiasis. En Goodman, L.S. y Gilman, A. (Eds.). The Pharmacological Basis of Therapeutics, 4^a Ed, MacMillan Co. New York, New York. págs. 1125-1143.
- 3.- Hsu, T.C. The Future of animals, Cells, Models and Systems in Research Development, Education and testing. Natl. Acad. Sci., Washington D.C. pág.180, 1977.
- 4.- Standley, P.C. (1923). Trees and Shrubs of México. N.S. Herbarium, Smithsonian, Press, Washington, D.C. Vol 23, parte 3, págs. 539,553.
- 5.- Martínez, M. (1959). Las Plantas Medicinales de México. 4^a Ed., Ediciones Botas, México D.F., pág.100. (1959).
- 6.- Uphof, J.C. (1968). Dictionary of Economic Plants. 5^a Ed Verlag von J. Cramer, Brasilea. págs. 113,339-340.

- 7.- Carrell, D.S. y Johnson M.C. (1970). Manual of the Vascular Plants of Texas, Texas Research Foundation, Renner, Texas, págs. 612, 911.
- 8.- Huxtable R.J. The pharmacology of extinction. J. Ethnopharmacol. 37:1-11, 1992.
- 9.- Putegnat, J.L. Castela nicholsonii characteristics and proximate analysis. New Remedies, N.Y., 12:102-103, 1883.
- 10.- Shepheard, S.; Lond, L.R.C.P.; Lillie, D.G.; Cantab, M.A. Persistent carriers of Entamoeba histolytica: Treatment with chaparro amargosa and simaruba. Lancet 194:501-502, 1918.
- 11.- Sellards, A.W. y McIver, M.A. The treatment of amoebic dysentery with chaparro amargosa (Castela nicholsonii of the family Simaroubaceae). J. Pharmacol. Exp. Ther. 11:331-356, 1918.
- 12.- Bosman, L.P. Castelamarin: A bitter principle from Castela nicholsonii. J. Chem Soc. 123:207-210, 1923.

- 13.- Nixon, P.I. Chaparro amargosa in the treatment of amoebic dysentery. J. Am. Med. Assn. 42:1530-1533, 1914.
- 14.- Druey J. Amoebizide. Agnew. Chem. 72:677-685, 1960.
- 15.- Wall, M.E. y Wani, M.C. Antineoplastic agents from plants. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 17:117-132, 1977.
- 16.- Wall, M.E. y Wani M.C. Plants antitumor agents. 17 Structural requirements for antineoplastic activity in quassinoids. J. Med. Chem. 21:1186-1188, 1978.
- 17.- Gillin, F.D. y Reiner D.S. In vitro activity of certain quassinoid anti-tumor agents against Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 13:43-49, 1982.
- 18.- Diamond, L.S. Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 and E. histolytica like amoebae. J. Parasit. 54:1046-1056, 1968.
- 19.- Calzado-Flores, C.; Segura-Luna, J.J.; Domínguez, X.A. y García-González, S. Castela texana: Cernimiento de su actividad antiamebiana. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 17:127-134, 1986.

- 20.- Keene, A.T.; Harris, A.; Phillipson, J.D. y Warhurst, D.C. In vitro amoebicidal testing of natural products: Part I. Methodology. *Planta Med.* 278-295, 1985.
- 21.- Martínez-Velez, S. Tratamiento de la amibiasis quística con chaparro amargoso. Tesis de Postgrado con Especialidad en Medicina Familiar. Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Cuernavaca, Mor. México, 1986.
- 22.- Samaniego-Verduzco , R.I. Estudio comparativo entre la Castela tortuosa y la diyodohidroquinoleína en el tratamiento de la amibiasis intestinalquística. Tesis de Postgrado con Especialidad en Medicina Familiar. Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Cuernavaca Mor. México, 1987.
- 23.- Bosman, L.P. Castelin, a new glucoside from Castela nicholsonii. *J. Chem. Soc.* 121:969-972, 1922.
- 24.- Geissman, T.A. y Chandorkar, K.R. Bitter principles of the Simaroubaceae. I. Chaparrin from Castela nicholsonii *J. Org. Chem.* 26:1217-1220, 1961.

- 25.- Domínguez, X.A.; Franco, R.; Cano, G.; García Delgado, C.; García, S. y Torres, M.J. Plantas medicinales mexicanas XXXIX. Aislamiento de simaroubolidanos de la raíz de la Castela texana (T & G) Rose (chaparro amargoso, bisbirinda). Rev. Latinoam. Quím. 10:138-140, 1979.
- 26.- Diamond, L.S.; Harlow, D.R. y Cunnick, C.C. A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:431-432, 1978.
- 27.- Hayflick, L. y Moorhead, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp. Cell. Res. 25:585-621, 1961.
- 28.- Finney, D.J. (1952). Probit Analysis. 2^a Ed., Cambridge University Press. London.



FOTOGRAFIA No. 1

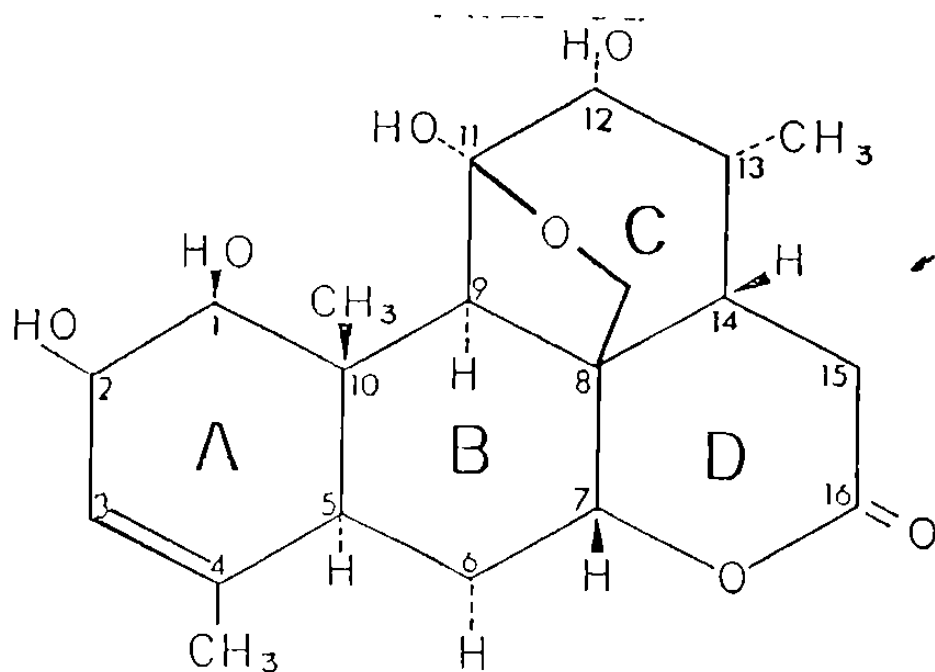


FIG. 1 ESTRUCTURA QUIMICA DE LA CHAPARRINA

1 3551 4000 430 1 00 12 17 100.00 1 F A. 508 4 PAGE 1

REF. VALUES: 4900 57.3 7000 98.4

3934	96.4	3906	95.3	3893	96.0	3874	95.8	3856	93.5
3841	94.8	3823	94.8	3808	93.1	3772	94.8	3753	93.6
3737	93.5	3726	94.5	3714	93.9	3692	92.5	3678	91.1
3651	89.4	3631	88.1	3590	85.0	3569	80.3	3471	53.9
3392	25.9	3192	53.2	3037	73.2	3007	68.8	2975	56.7
2533	56.1	2505	60.1	2489	59.7	2476	56.9	2412	61.1
2377	67.0	1728	12.2	1688	85.1	1671	85.9	1656	26.1
1645	89.0	1638	88.3	1578	91.4	1561	91.6	1519	68.0
1500	70.8	1474	78.0	1466	77.9	1455	77.3	1432	76.4
1393	55.3	1363	73.9	1357	78.4	1307	73.9	1285	67.6
1257	46.2	1228	50.5	1217	51.2	1202	60.8	1176	49.8
1147	73.4	1100	69.5	1087	63.2	1075	65.3	1056	44.1
1040	42.9	1033	36.8	1019	46.5	985	53.6	966	45.6
952	78.4	922	72.8	908	89.1	894	94.2	840	74.4
812	92.6	794	86.4	777	83.2	755	94.3	724	81.6
679	86.7	636	69.9	582	72.8	544	82.4	519	86.3

END 60 PEAKS FOUND

MUESTRA: 7639 Castela texana
Chaparrina pf

NUM. ESPECTRO: 242

37

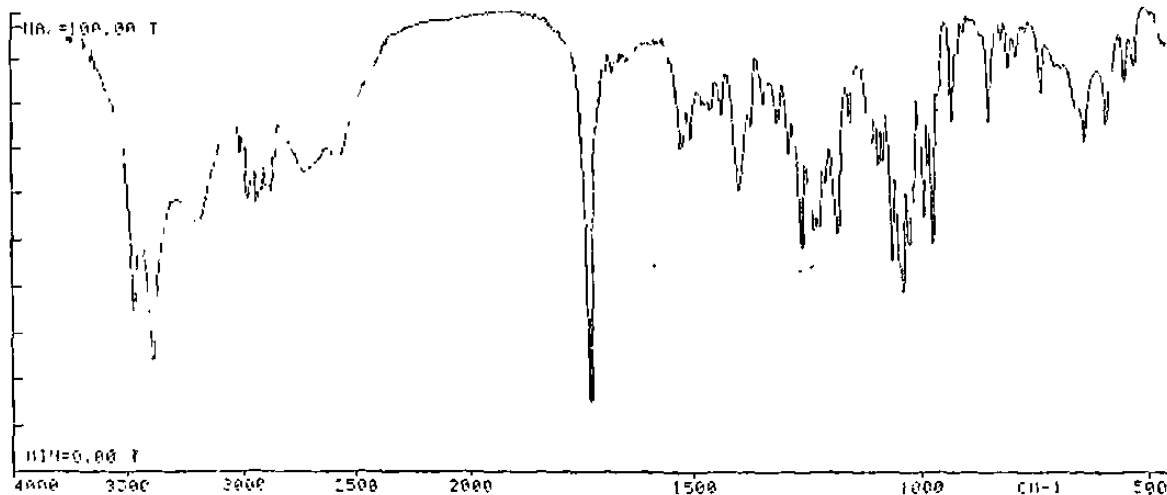


FIG. 2

CHAPARRINA

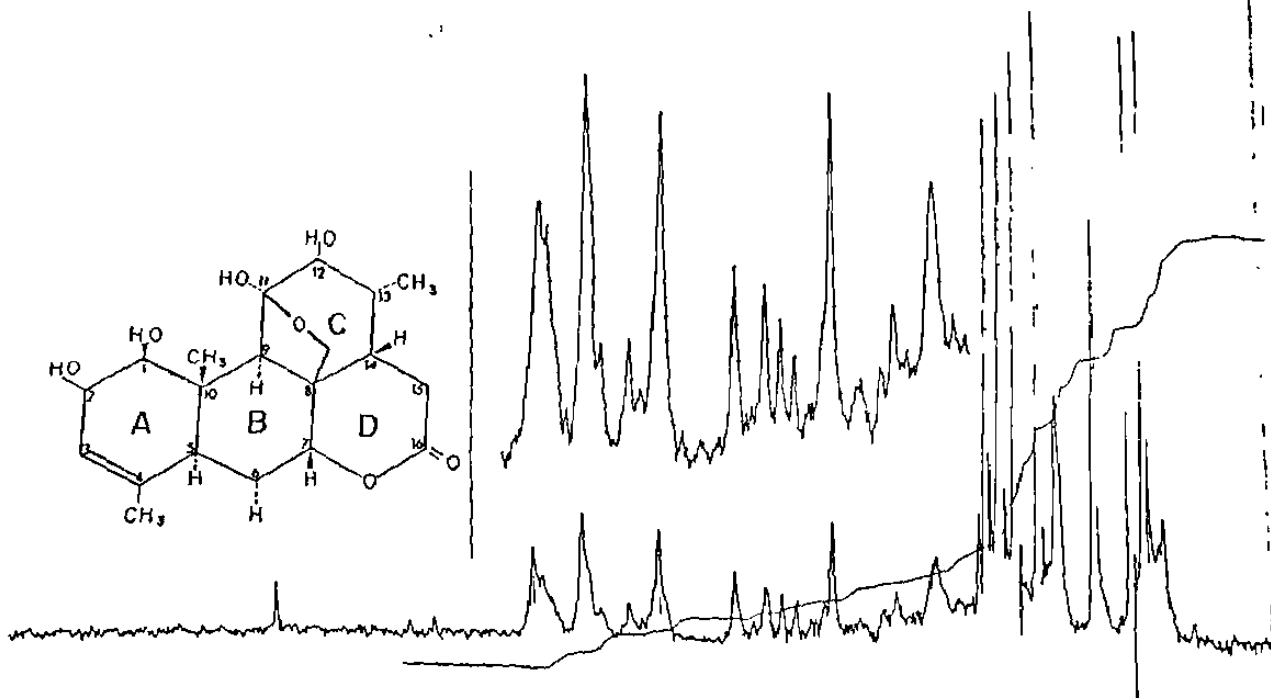


FIG. 3

Tabla 1. Actividad de la chaparrina sobre el crecimiento de cultivos de Entamoeba histolytica, cepa HM-1:IMSS.

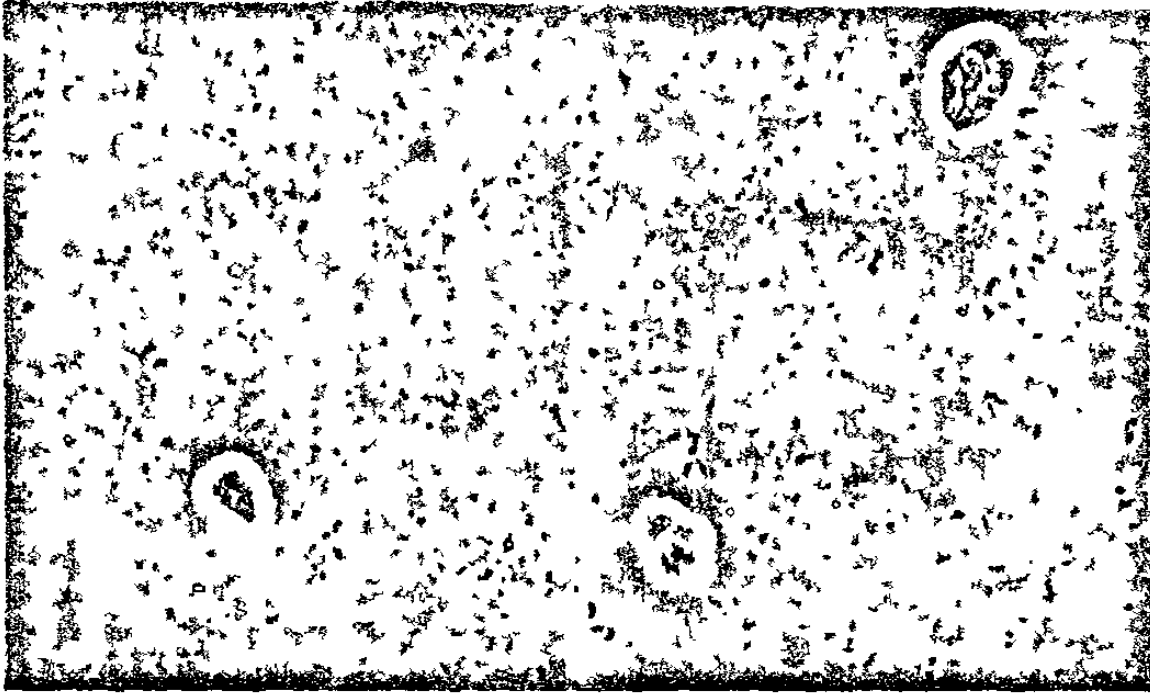
Compuesto (μM)	No. células/ml* $\times (10^4)$	Inhibición (%)	Valores Probit
0.0 (Testigo)	7.8 \pm 0.4		
<u>Chaparrina</u>			
0.1	5.6 \pm 0.6	27.8	4.40
1.0	4.5 \pm 0.5	42.6	4.81
10.0	2.5 \pm 0.3	68.1	5.47
100.0	0.2 \pm 0.1	97.0	6.88
<u>Emetina-HCl</u> (control positivo)			
0.1	7.3 \pm 0.6	6.5	3.48
1.0	4.5 \pm 0.7	41.8	4.79
100.0	0.0 \pm 0.0	100.0	7.33

* Promedio de tres tubos \pm DS (n,3)

Tabla 2. Actividad citotóxica de la chaparrina sobre el crecimiento de cultivos de fibroblastos diploides humanos, cepa MRC-5.

Chaparrina (μM)	No. células/ml* $\times (10^4)$	Inhibición (%)	Valores Probit
0.0 (Testigo)	7.1 \pm 0.8		
0.1	6.7 \pm 0.4	5.0	3.36
1.0	6.4 \pm 0.7	9.8	3.71
10.0	6.2 \pm 0.6	13.0	3.87
100.0	5.3 \pm 0.5	27.0	4.39

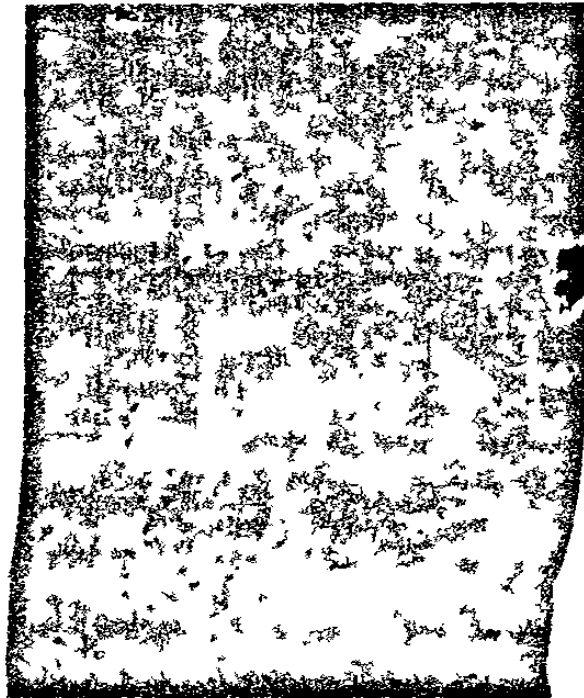
* Promedio de tres tubos \pm DS (n,4)



FOTOGRAFIA No. 2



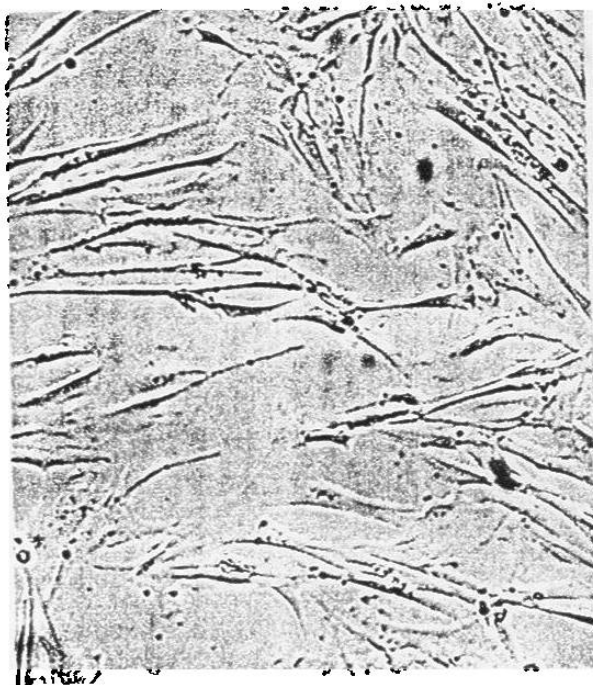
FOTOGRAFIA No. 3



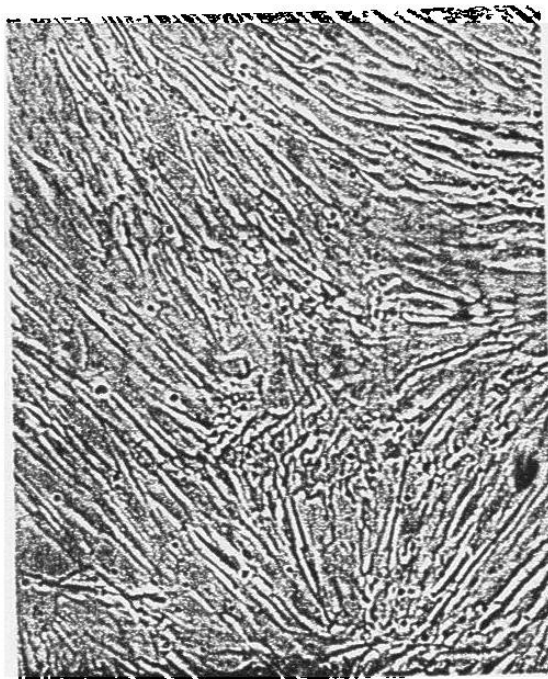
FOTOGRAFIA No. 4



FOTOGRAFIA No. 5



FOTOGRAFIA No. 6



FOTOGRAFIA No. 7

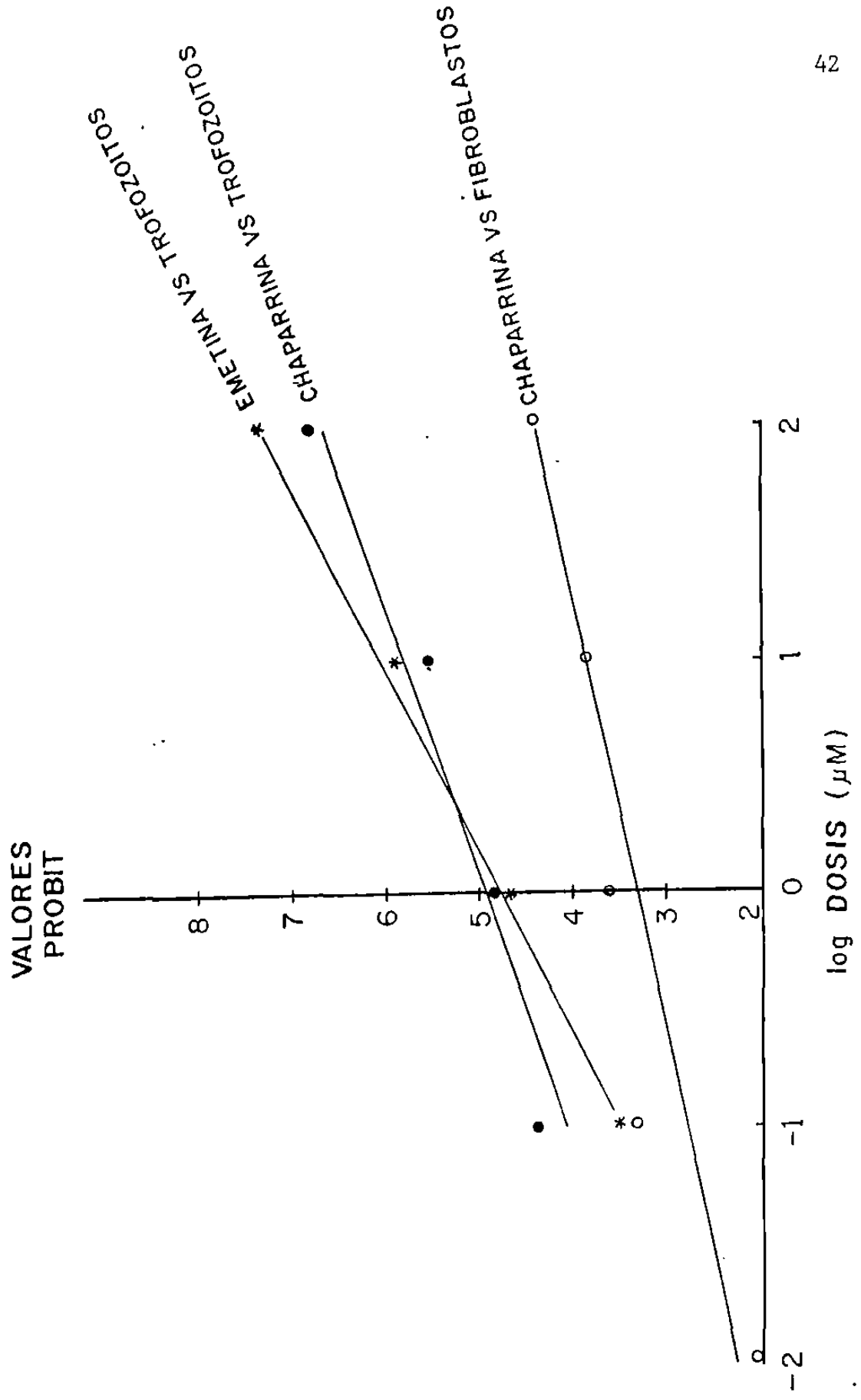


FIG. 4

