

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

TD
RC121
.A5
C35
2001
c.1



1080124500

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



TD

121

AS

35

9 1



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*.

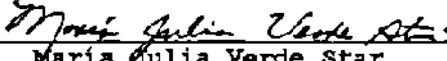
TESIS

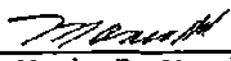
Presentada como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Con especialidad en
PRODUCTOS NATURALES

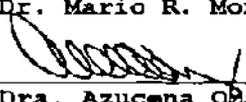
Presenta:

M.C. CARMINA CARLOTA CALZADO FLORES

COMISION DE TESIS:

DIRECTOR: 
Dra. María Gulia Verde Star

SECRETARIO: 
Dr. Mario R. Morales Vallarta.

VOCAL: 
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.

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.

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 Gracitud.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS.

INDICE DE CONTENIDO

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

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.

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 Metabólico Activo.....	27
7. 5. Cromatografía en Columna Líquida.....	29
7. 6. Aislamiento de la Chaparrina.....	31

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

8. RESULTADOS

8. 1. Cinética de Crecimiento de <i>E. invadens</i>.....	40
8.2. Cinética de Enquistamiento de <i>E. invadens</i>.....	42
8. 3. Desenquistamiento de <i>E. invadens</i>.....	47
8.4. Estudio Fitoquímico de la <i>Castela texana</i>.....	48
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>.....	56
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>.....	59

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>.....	63
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>.....	65
8.9. Estudio Comparativo de la Actividad de la Chaparrina, Emetina y Tinidazol sobre Proceso de Crecimiento de Trofozoitos de <i>E. invadens</i>.....	67
8.10 Actividad de la Chaparrina y de la Rifampicina sobre el Proceso de Enquistamiento de <i>E. invadens</i>.....	70
8.11. Efecto del Extracto Metanólico y de la Chaparrina sobre el Proceso de Desenquistamiento de <i>E. invadens</i>.....	73
9. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES.....	75
10. BIBLIOGRAFÍA.....	77

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 trofozoítos 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

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

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 ₅₀	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 McConnachi (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.