

1. INTRODUCCIÓN

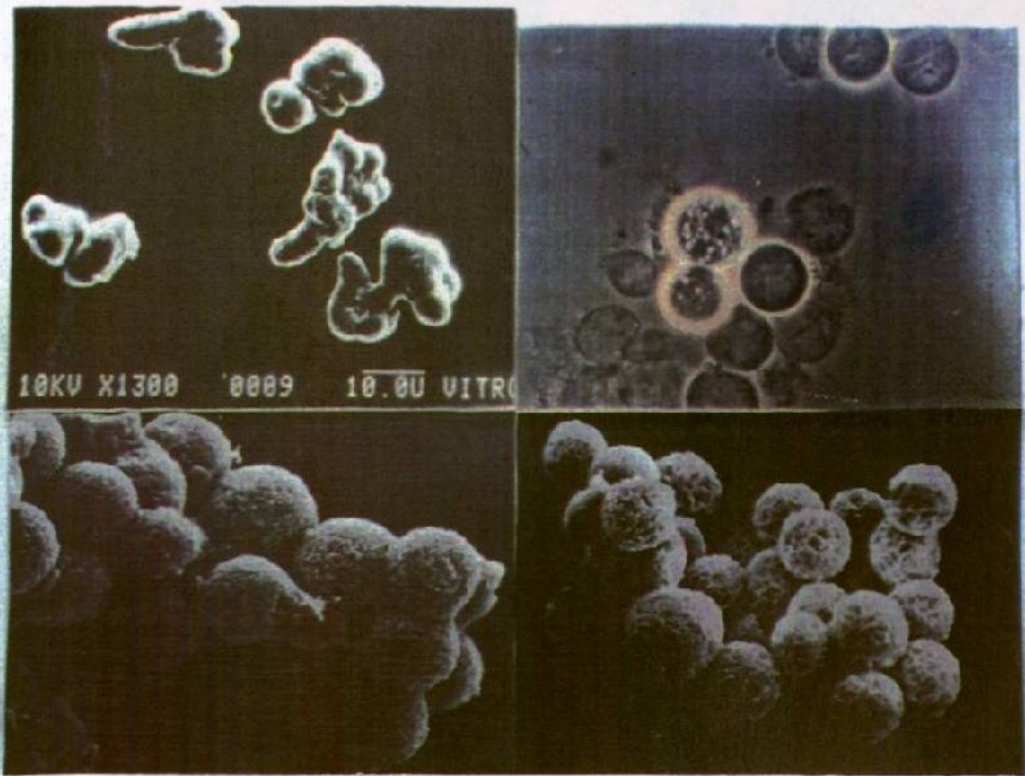
1.1. Amibiasis.

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.

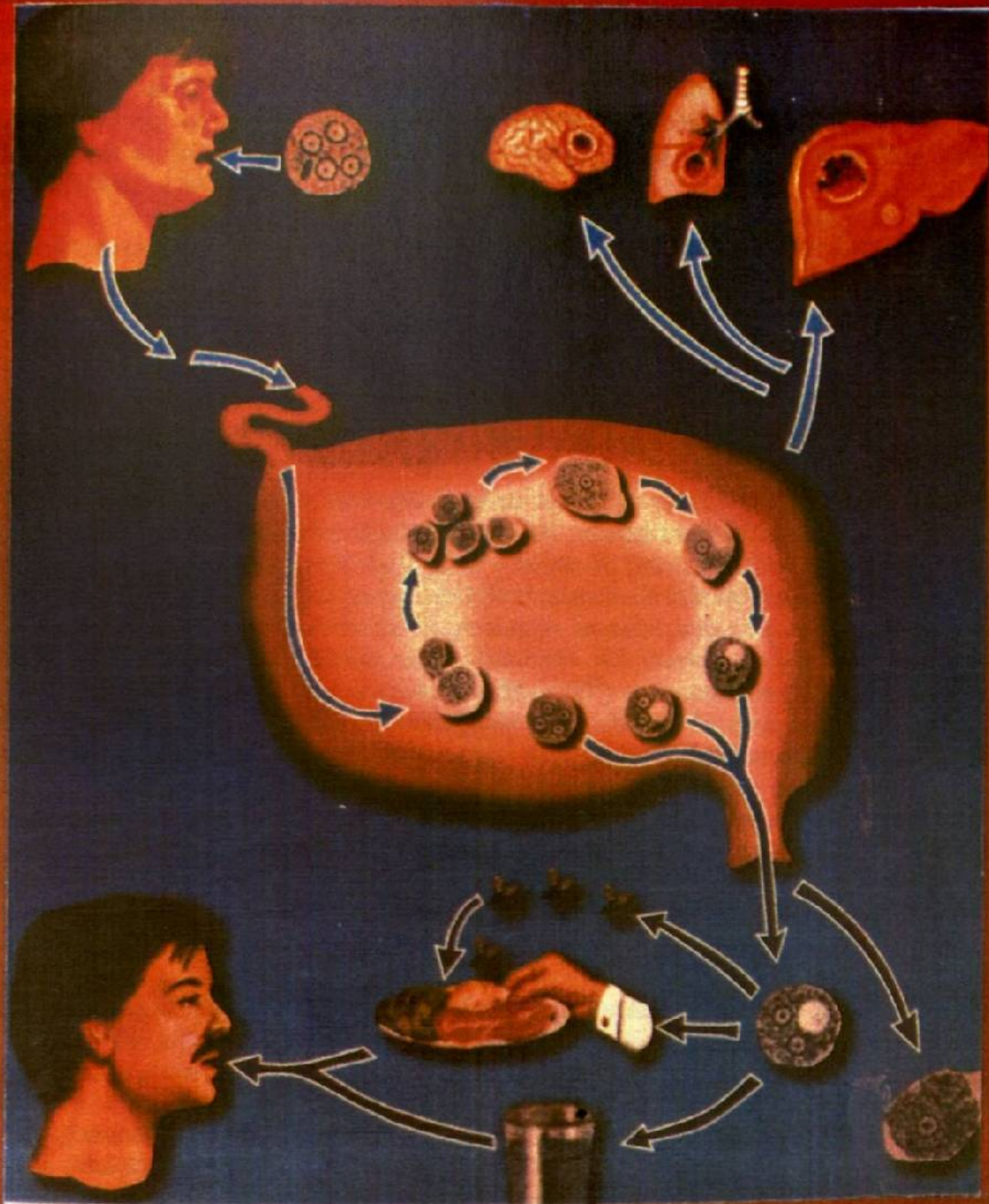
En la mayoría de los casos, principalmente en los países desarrollados, la conocida amibiasis luminal producida por *E. histolytica* no produce síntomas, en cambio, en los países subdesarrollados, el parásito puede actuar como patógeno y ser la causa de la amibiasis invasora. Los síntomas más comunes 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.

FOTOGRAFIA No. 2 CICLO EFECTIVO DE LA AMIBIASTA.



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^b) y estimaciones realizadas por este autor (1986^{a, b}) 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 trofozoito, el quiste y el metaquiste. Los trofozoitos 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 µm 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 trofozoitos 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 trofozoitos 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 β y la ausencia de una banda α 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^{a, b}).

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 dihidrohidroquinoleínas 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 metronidazol, el nitroimidazol y sus derivados, el secnidazol, el nimorazol y el tinidazol 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.

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 protozooario 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 protozooario 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 protozooario y diez años después la del medio TYI-S-33, este autor proporcionó las condiciones favorables para realizar estudios bioquímicos y fisiológicos de este protozooario 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 al 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 ambianas.

Cuatro años más tarde Arroyo-Begovich y Cáravez-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 amibas inoculadas, así un inóculo de 1×10^5 cél/ml requiere solo de 8 h para que se inicie el enquistamiento y cuando el inóculo empleado es de 5×10^5 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 Fera (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 ambiana 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 trofozoítos 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 trofozoítos 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*

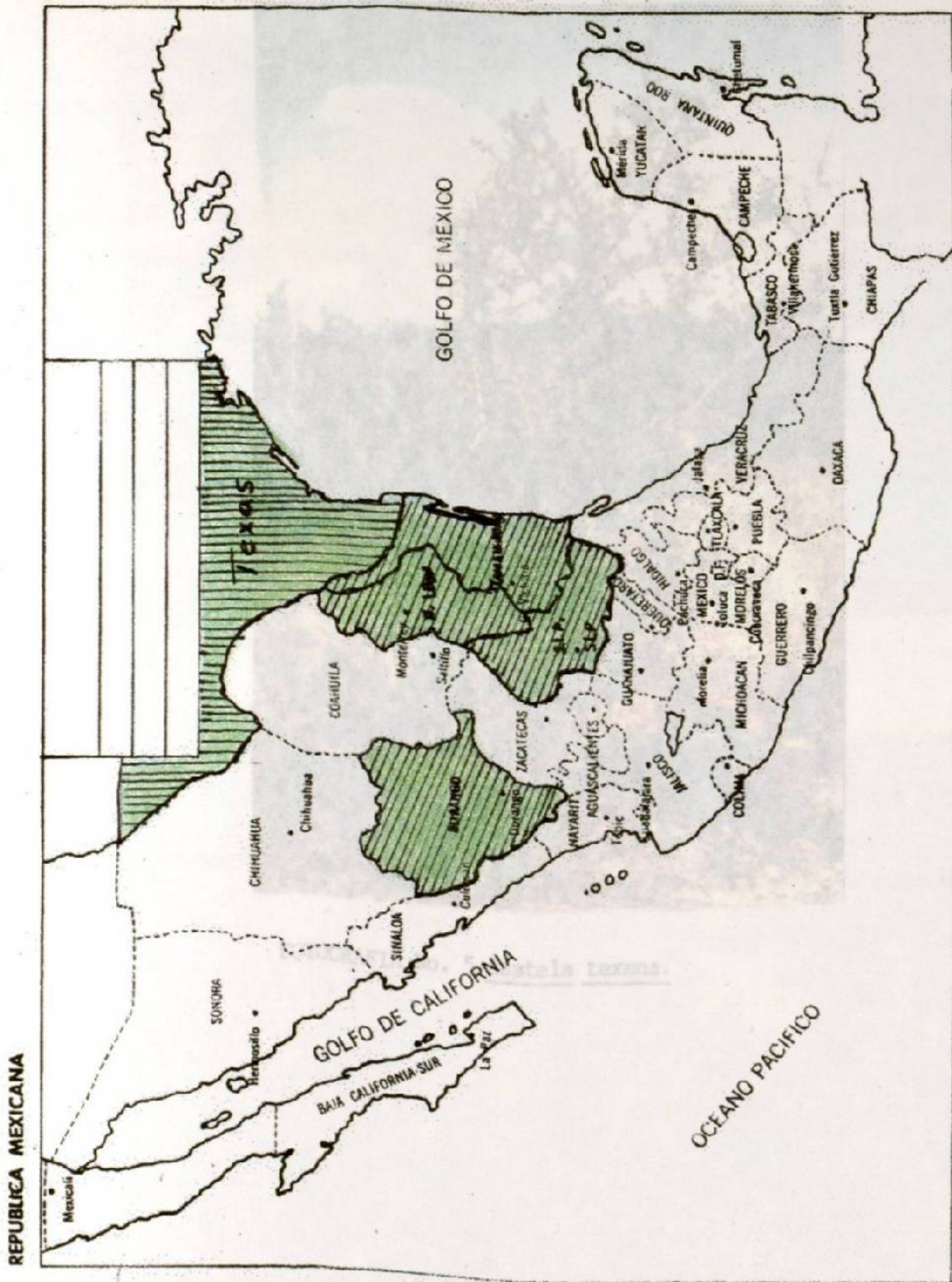
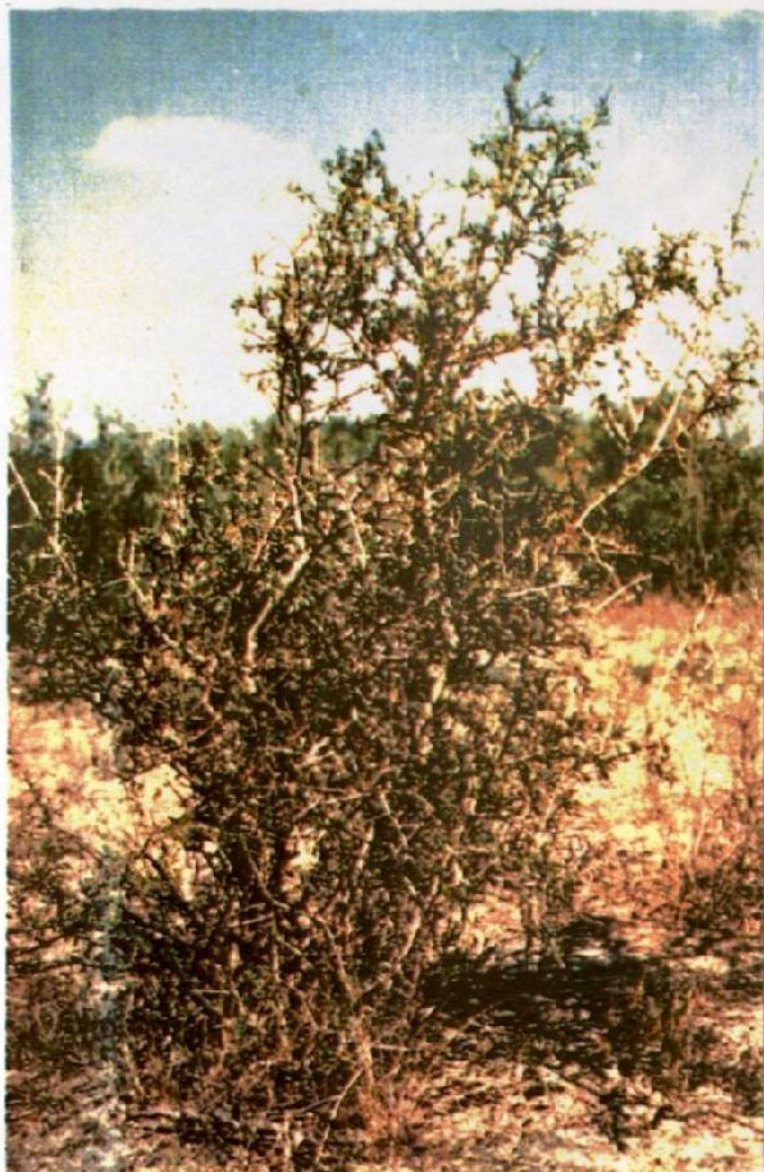


FIGURA No. 5 DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LA Castella texana.



FOTOGRAFIA No. 5 Castela texana.

1114 X
1115 X
1116 X
1117 X
1118 X
1119 X



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 simaroubolidos: la chaparrina, el β -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 gallinacium*), 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 tetráptera*) 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 polio 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 (CI₅₀) 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. Ohnishi 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 antiamibiano 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 CH_2Cl_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*: ermetina, 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 antiamibiano. 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 antiamibiana comprobada *in vivo* (8-hidroxiquinolinas y tinidazol) 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 μM) encontramos que la chaparrina a la máxima concentración empleada (100 μM) inhibió el 97% de los cultivos amibianos y solo el 27% de los cultivos de fibroblastos. Además, esta actividad se conservó hasta 1 μM 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 protozoo 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 (C₂₀H₂₈O₇), 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 MnO₂. 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 protozooario 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 trofozoíto 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 trofozoítos 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 Rattclife 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 trofozoítos 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 trofozoíto 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.

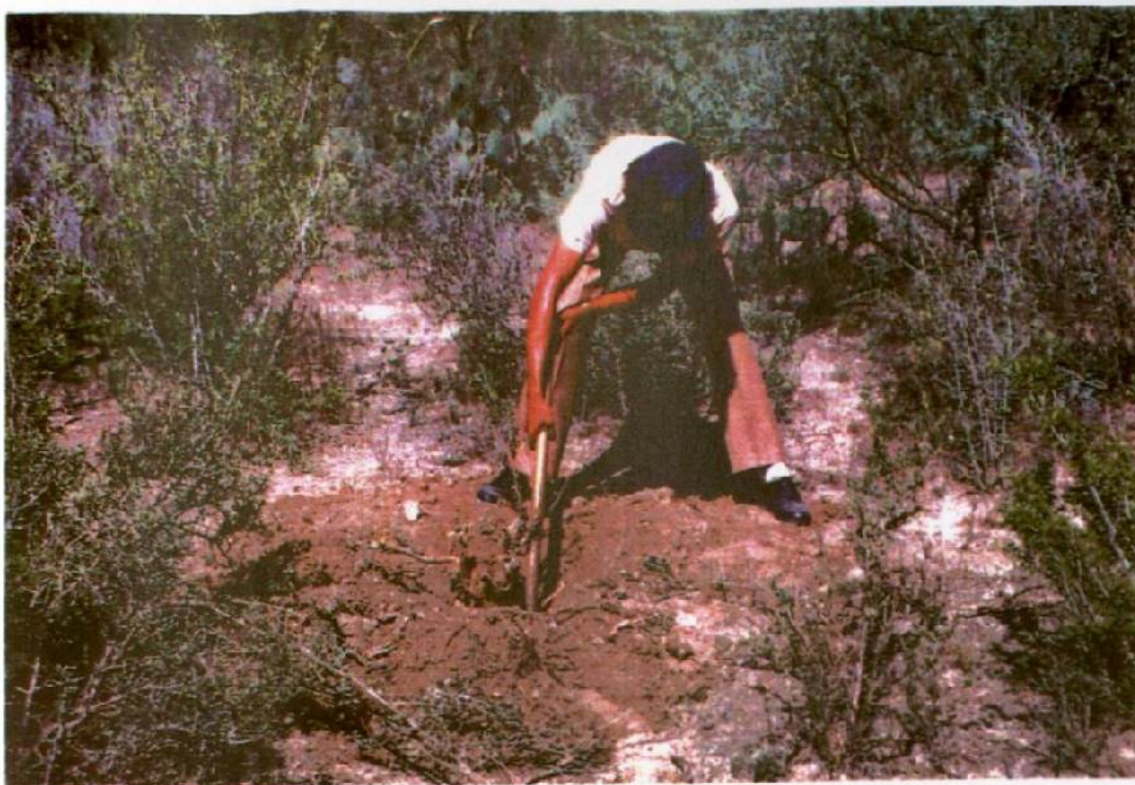
El material de la planta se puso a secar al sol por una semana y una vez seco, se trituró y molió por separado en un molino eléctrico. El material seco y molido (Foto 9) se guardó en frascos oscuros los cuales se rellenaron con algodón para disminuir el oxígeno y así evitar que se oxiden y evaporen los 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 (cedrolidano) 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.

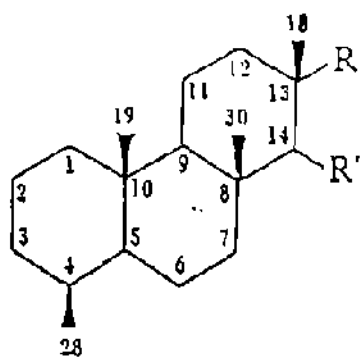
En su identificación, además de las reacciones coloridas características para este tipo de compuestos simaroubolidanos los cuales poseen la propiedad de que al contacto con el ácido sulfúrico concentrado dan una coloración azul intensa se emplearon, pruebas para la detección de cumarinas (Ehrlich), alcaloides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



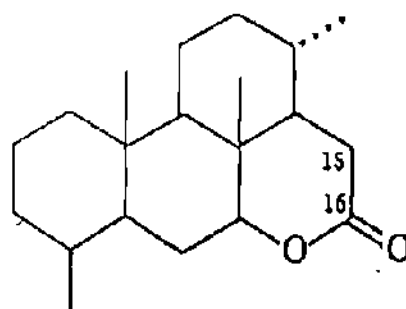
Fotografía No. 8 Obtención de la Raíz de la Castela texana.



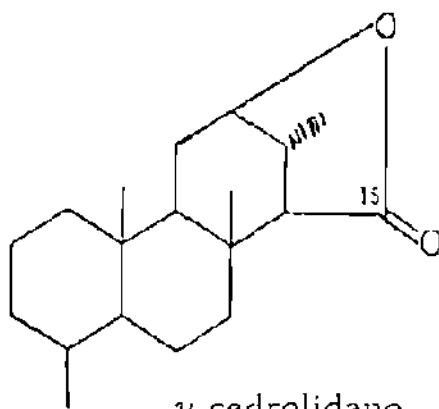
Fotografía No. 9 Raíz de la Castela texana Seca y Molida.



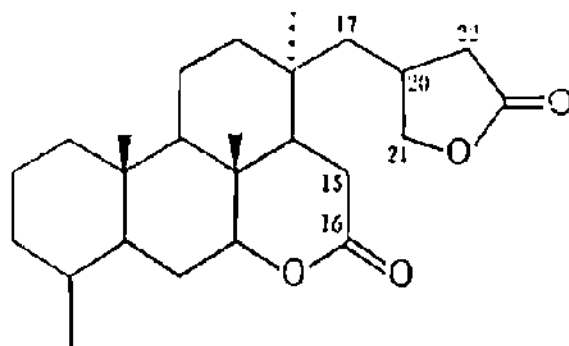
ω esqueleto común



α quasolidano



γ cedrolidano



z simarolidano

FIGURA No. 6 ESQUELETO DE COMPUESTOS DE TIPO SIMARUBOLIDANO.

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.

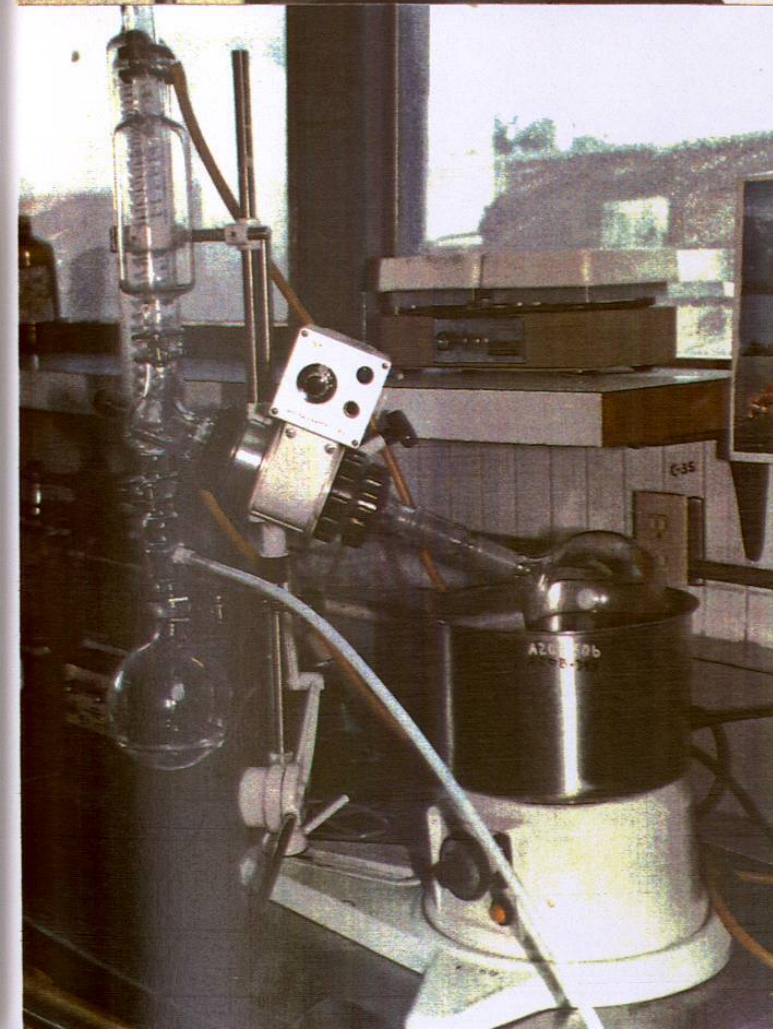
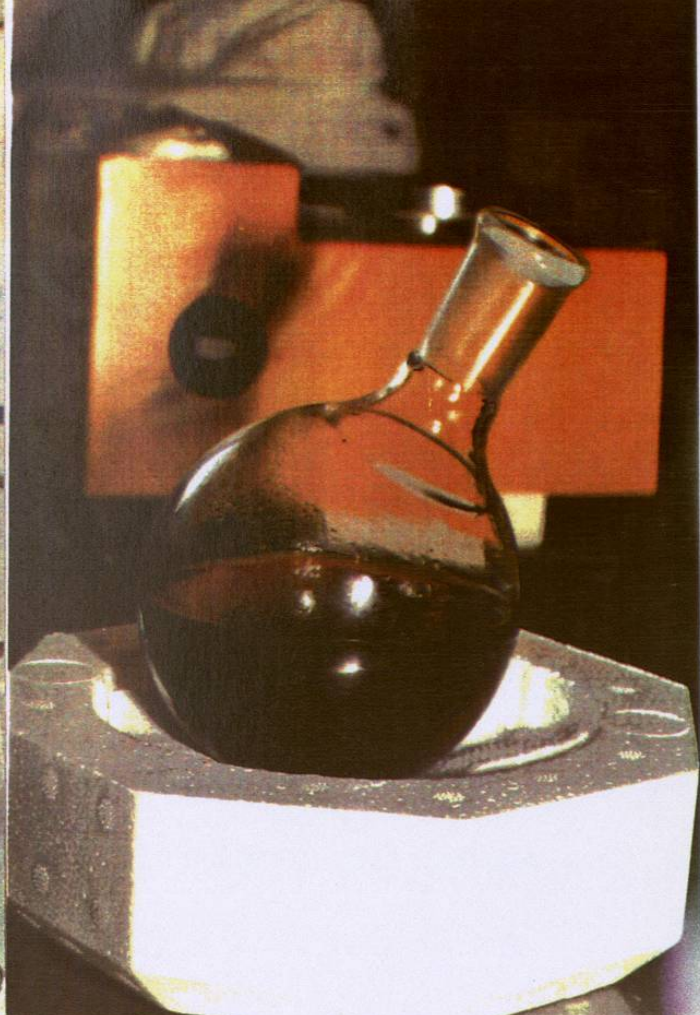
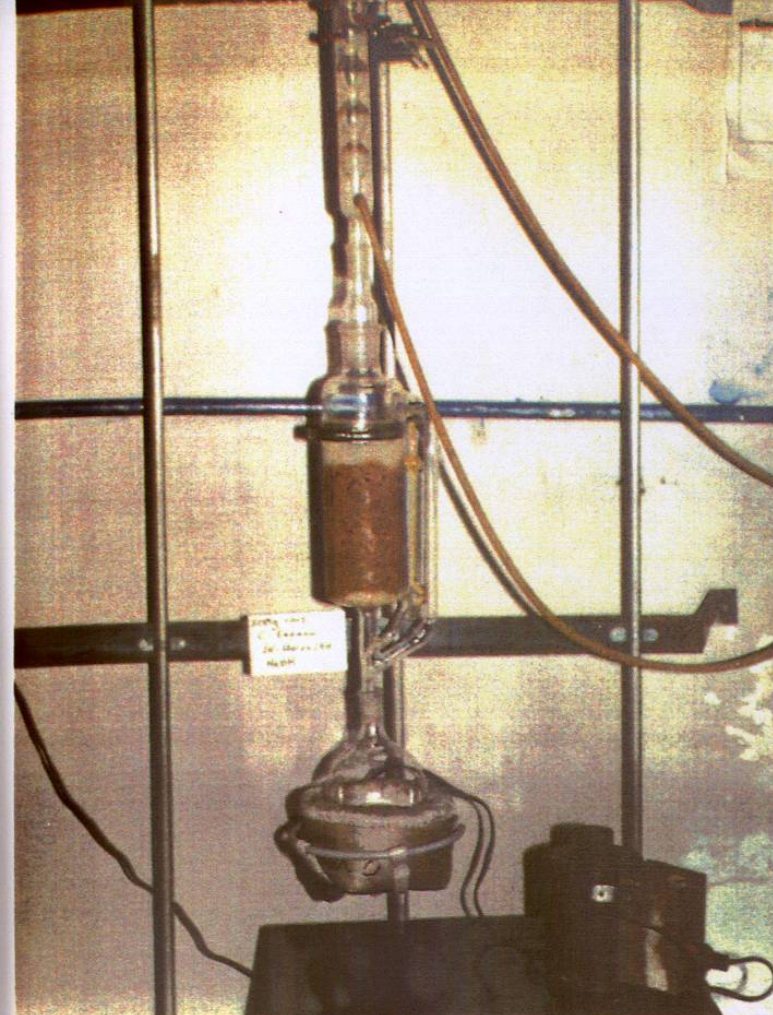
7. 3. 2. Metanólico: 500 g del material seco y molido se llevaron a extraer con metanol durante siete días en reflujo continuo en un equipo de extracción tipo soxhlet. Posteriormente el extracto obtenido se concentró en un equipo rotaevaporador marca Buchii y finalmente se llevó a liofilizar para eliminar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



FOTOGRAFIAS No. 10-12.
EXTRACCION 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:

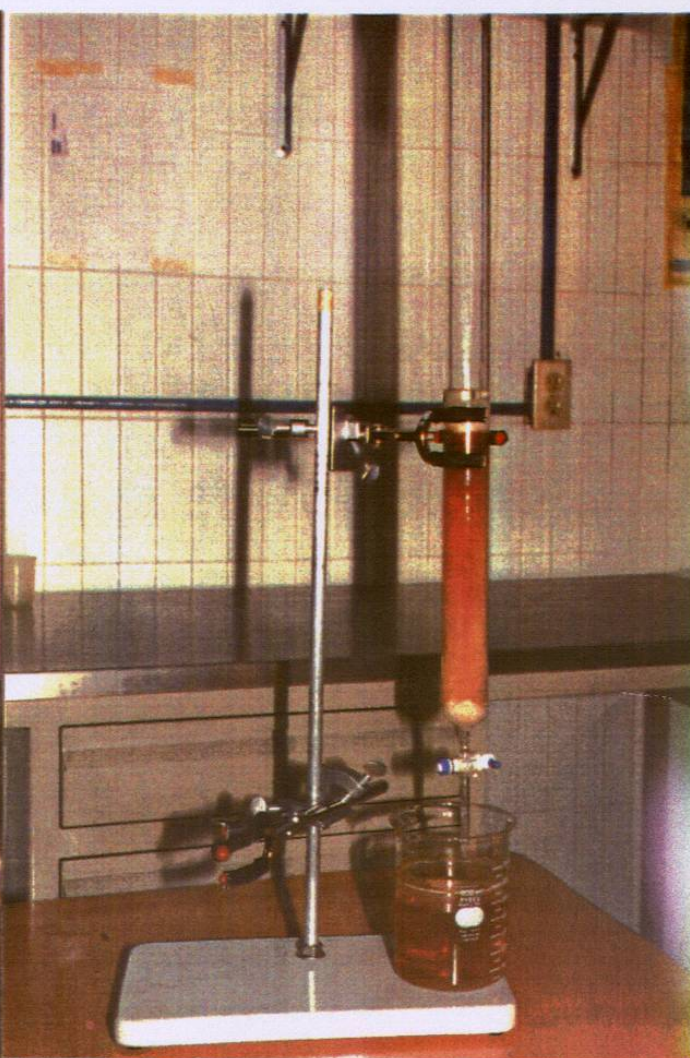
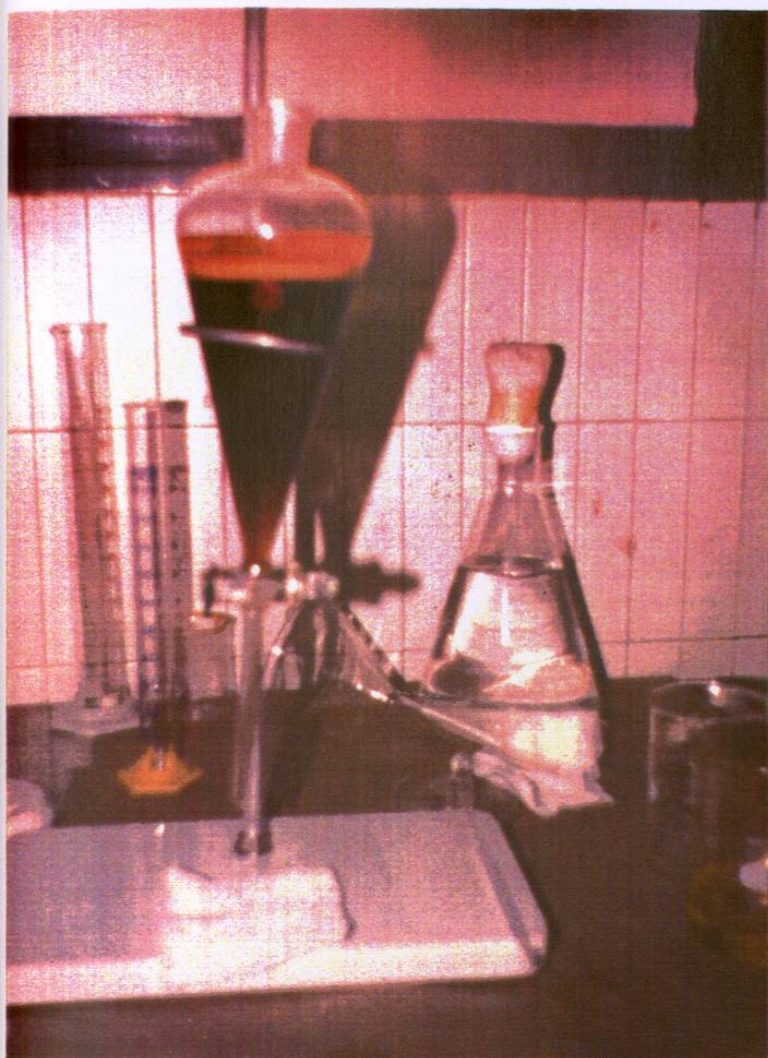
La fracción (intermedia) activa obtenida del fraccionamiento del extracto metanólico según el proceso de separación mostrado en el inciso anterior fue sometida a un nuevo proceso de separación conocido como separación en cromatografía en columna líquida (Foto 18):

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 silica 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 silica gel 60 pura e inmediatamente después de esta capa de silica, se colocó la muestra previamente mezclada con la silica 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 eluente 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 silica gel G se disolvieron con 30 ml de agua bidestilada 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 silica preparada según se mencionó en el párrafo anterior dejándose deslizarse sobre la misma cuidando que se forme una capa de silica 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 ₂ PO ₄ (Sigma).....	0.06
K ₂ HPO ₄ (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/pulg² 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 ₂ HPO ₄ (Sigma).....	2.80
KH ₂ PO ₄ (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/in² 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 Tripano 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.

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 (CO₂).

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 gaseo con CO₂ de la manera siguiente: Inmediatamente después de hacer el inóculo de los trofozoítos se procedió al gaseado de los mismos con CO₂ 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 CO₂ 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 5×10^5 /ml. Inmediatamente después de hacer el inóculo de los trofozoítos se procedió a darles un segundo gaseado con CO₂ 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 trofozoíto a quiste puesto que estos últimos están cubiertos de una pared que los hace resistente a un medio exterior adverso no así el trofozoíto 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 amebianos 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 Trofozoíto.

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 *Entamoeba invadens*.

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

Después de obtener muestra 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 CO₂ 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.