

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

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

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

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

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

Comportamiento de los Trofozoítos obtenidos por Desenquistamiento:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8. RESULTADOS

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

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

Cálculos:

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

T generación = $1/k$

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

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

A₀ = Número de células/ml al tiempo cero (día 0).

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

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

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

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

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

La incubación de los trofozoitos de *E. invadens*, cepa IP-1 en el medio de enquistamiento sin glucosa y gaseado con CO₂ llevó a esta cepa ambiana a un proceso de enquistamiento masivo el cual pudo ser observado desde las primeras 24 h llegando a alcanzar su valor máximo a las 96 h (Figura No. 2). A lo largo del tiempo se obtuvo una población de quistes semejante al número de trofozoitos inoculados los cuales fueron considerados como viables, bajo el criterio de que estas células fueran capaces de resistir la acción del detergente (trifón x-100) y se observó una pared refringente bajo la técnica microscópica de contraste de fases después de estar en contacto con el colorante vital azul de tripan. Pasado este tiempo el cultivo, empezó a decaer gradualmente.

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

Estos mismos resultados se presentan en la Fig. No. 3 como el porcentaje de quistes producidos en función del tiempo. Como ya se mencionó en la página 9, segundo párrafo de la sección de antecedentes, se ha reportado que los quistes de esta cepa ambiana están formados por un poliarquidio reconocido como quina (Fig. 4) el cual proporciona a este parásito la capacidad para superar el ataque de diferentes agentes adversos en su medio ambiente. La fotografía adjunta a la descripción química de la quina (Fig. 1) nos muestra la población de quistes obtenida en forma de grumos después de someter el cultivo presentado en la fotografía No. 4 (trofozoitos + quistes) a la acción del detergente (trifón x-100).

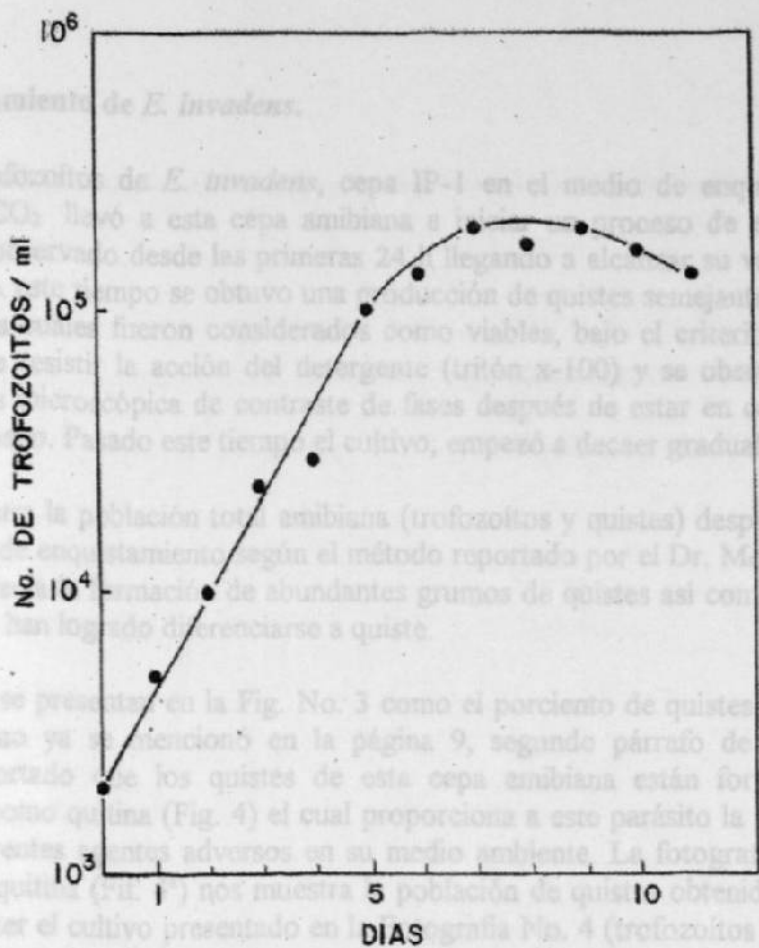
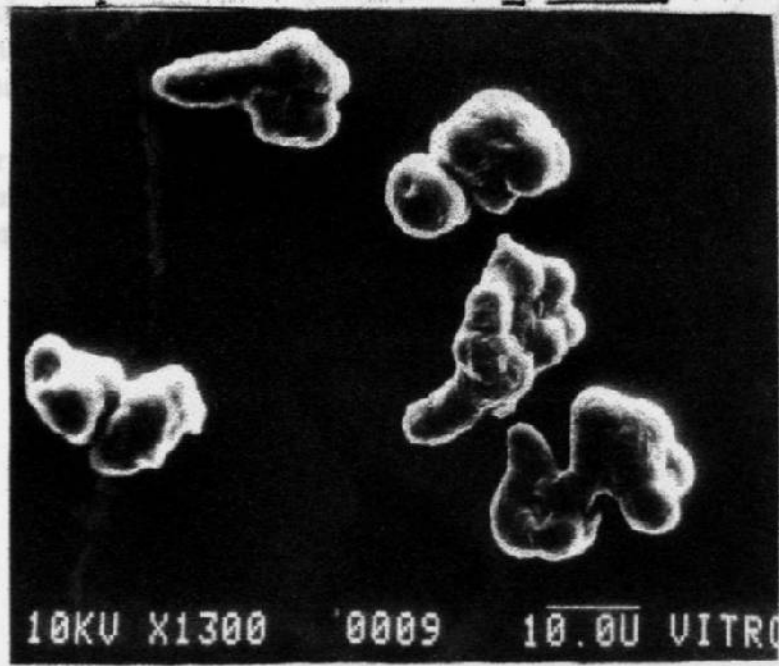


FIGURA No. 1 GINETICA DE CRECIMIENTO DE *E. invadens*, CEPA IP-1



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

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

La incubación de los trofozoítos de *E. invadens*, cepa IP-1 en el medio de enquistamiento sin glucosa y gaseado con CO₂ llevó a esta cepa amibiana a iniciar un proceso de enquistamiento masivo el cual pudo ser observado desde las primeras 24 h llegando a alcanzar su valor máximo a las 96 h (Figura No. 2). A este tiempo se obtuvo una producción de quistes semejante al número de trofozoítos inoculados los cuales fueron considerados como viables, bajo el criterio de que estas células fueron capaces de resistir la acción del detergente (tritón x-100) y se observó una pared refringente bajo la técnica microscópica de contraste de fases después de estar en contacto con el colorante vital azul de tripano. Pasado este tiempo el cultivo, empezó a decaer gradualmente.

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

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

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

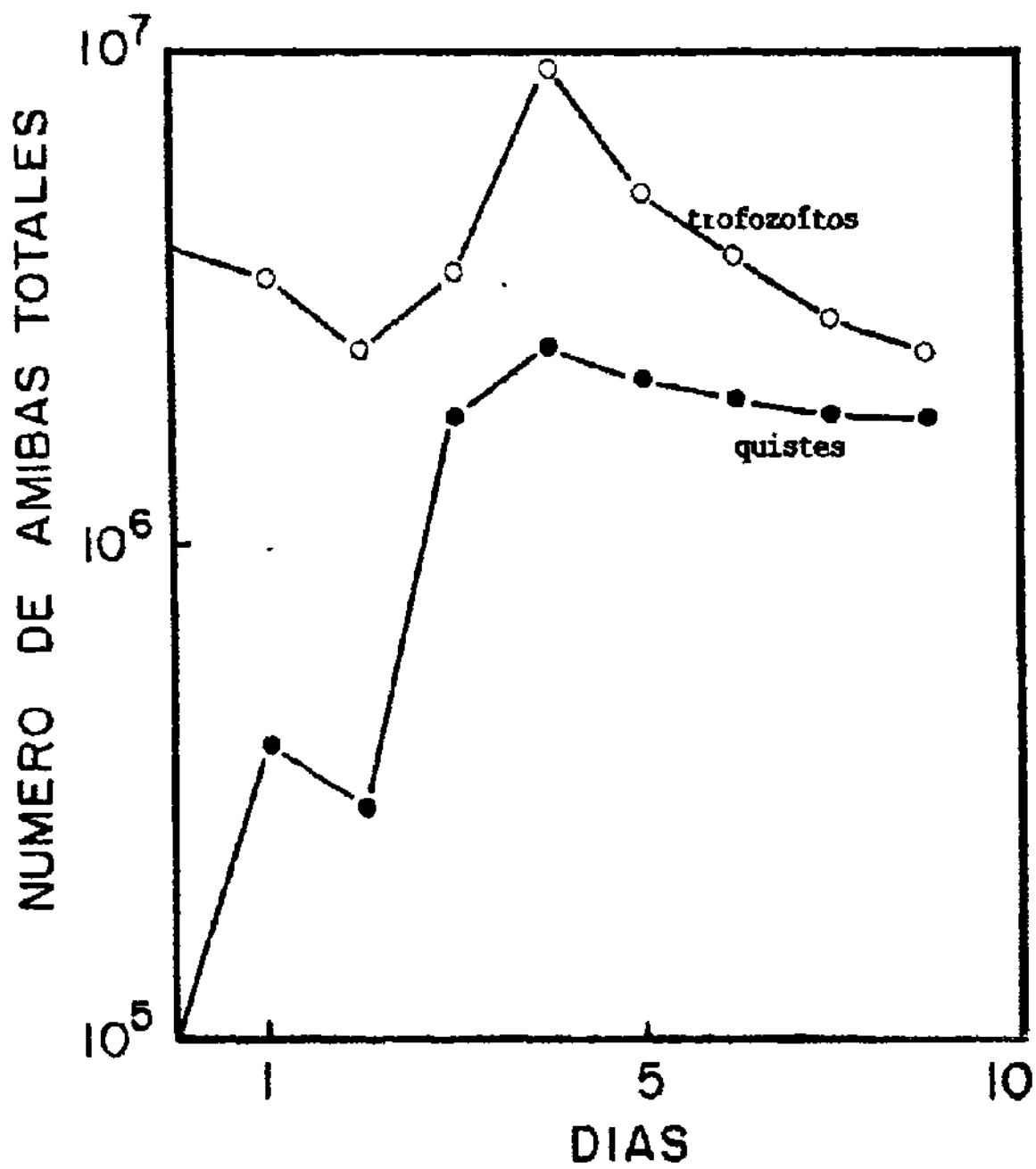
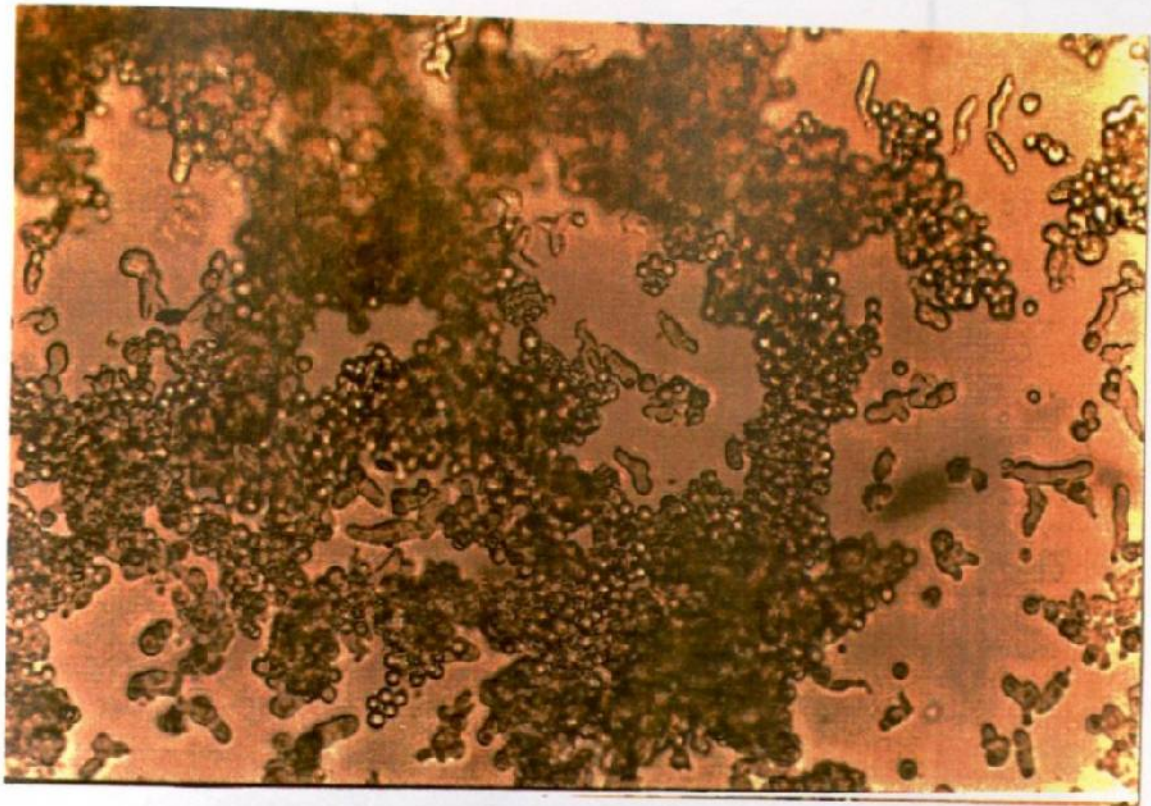
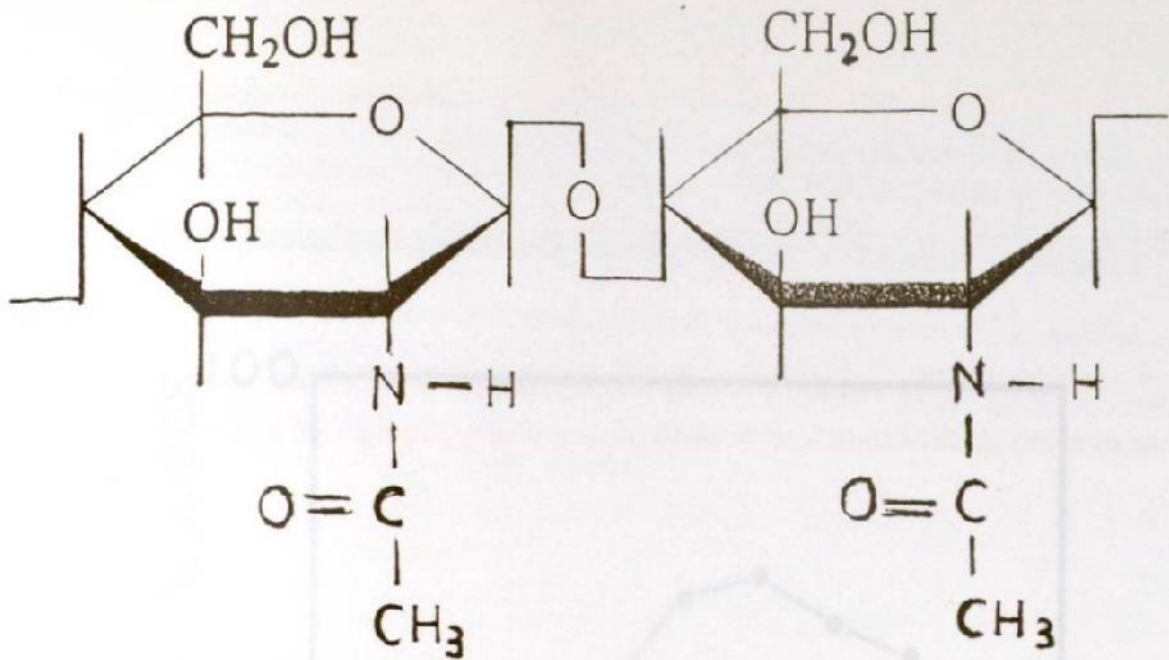


FIGURA No. 2 CINETICA DE ENQUISTAMIENTO DE LA CEPA IP-1
DE Entamoeba invadens.

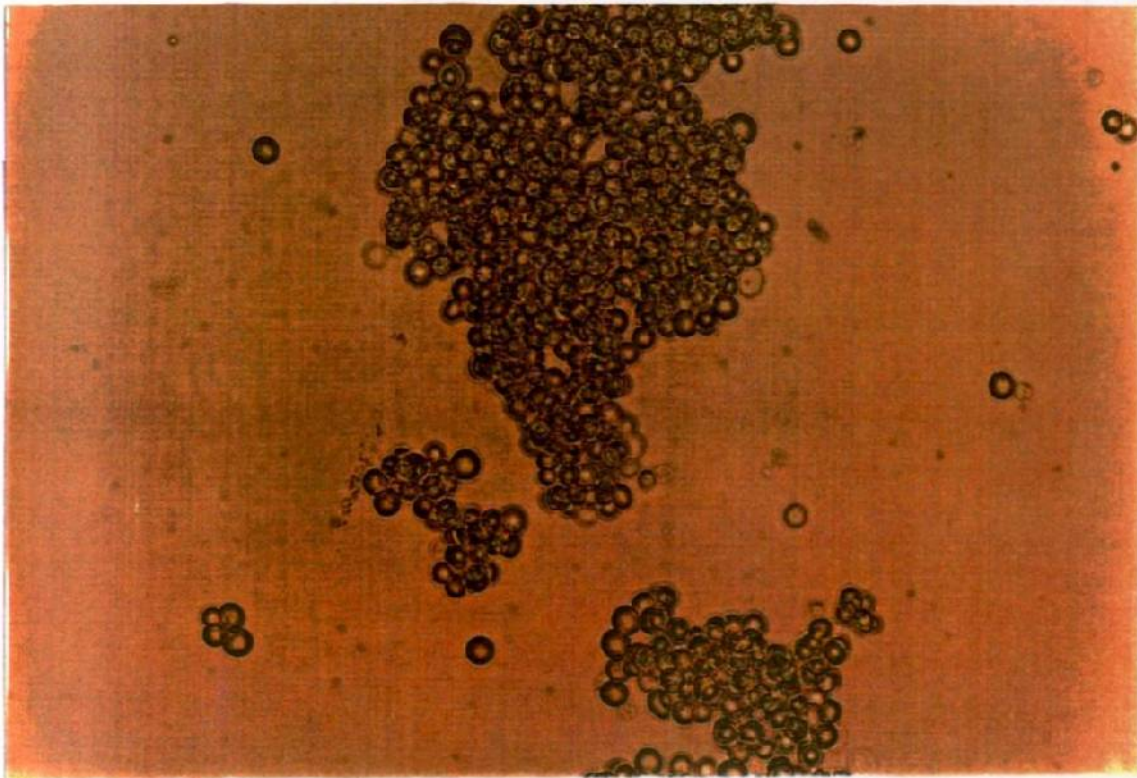


FCTOGRAFIA No. 4 POBLACION AMIBIANA DE TROFOZOITOS Y QUISTES
DE E. invadens, CEPA IP-1.

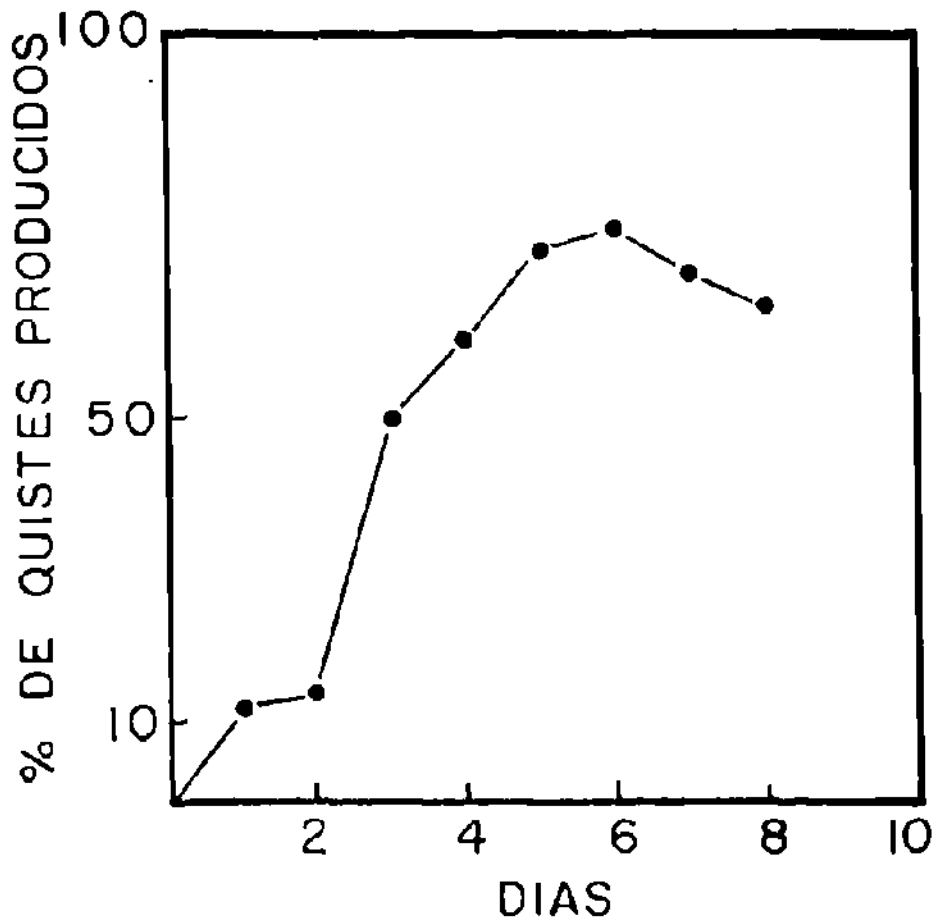


Quitina
(NAG-β(1 — 4)-NAG repetido)

FIGURA No. 4 ESTRUCTURA QUIMICA DE LA QUITINA.



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



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

8.3.Desenquistamiento de *Entamoeba invadens*.

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

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



FOTOGRAFIA No.27.

8.4. Estudios Fitoquímicos con *Castela texana*.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A este material se le practicó una ccd en un sistema de CH_2Cl_2 -MetOH (9:1, v.v), la cual fue después revelada empleando como agente cromogénico el compuesto dicloruro de cobalto (CoCl_2) obteniéndose una mancha de color amarillo-café y que marcó un factor de corrimiento o R_f de 0.60 el cual correspondió perfectamente con el R_f de nuestro compuesto control empleado (la chaparrina).

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

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

b. Químicas:

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

c. Pruebas Espectroscópicas:

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

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

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

Figura No 8. Identificación de la Chaparrina.

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

Su ccd con un sistema con CH_2Cl_2 -MetOH (9:1, v:v) después de revelarla con dicloruro de cobalto (CoCl_2) dio una mancha de color amarillo-café con un Rf de 0.60 el cual correspondió al Rf de nuestra chaparrina utilizada como control.

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

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

Pruebas Espectroscópicas:

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

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

41 1551 4000-650 1.00 3.15 99.95 T F 61 AC 4SR 4

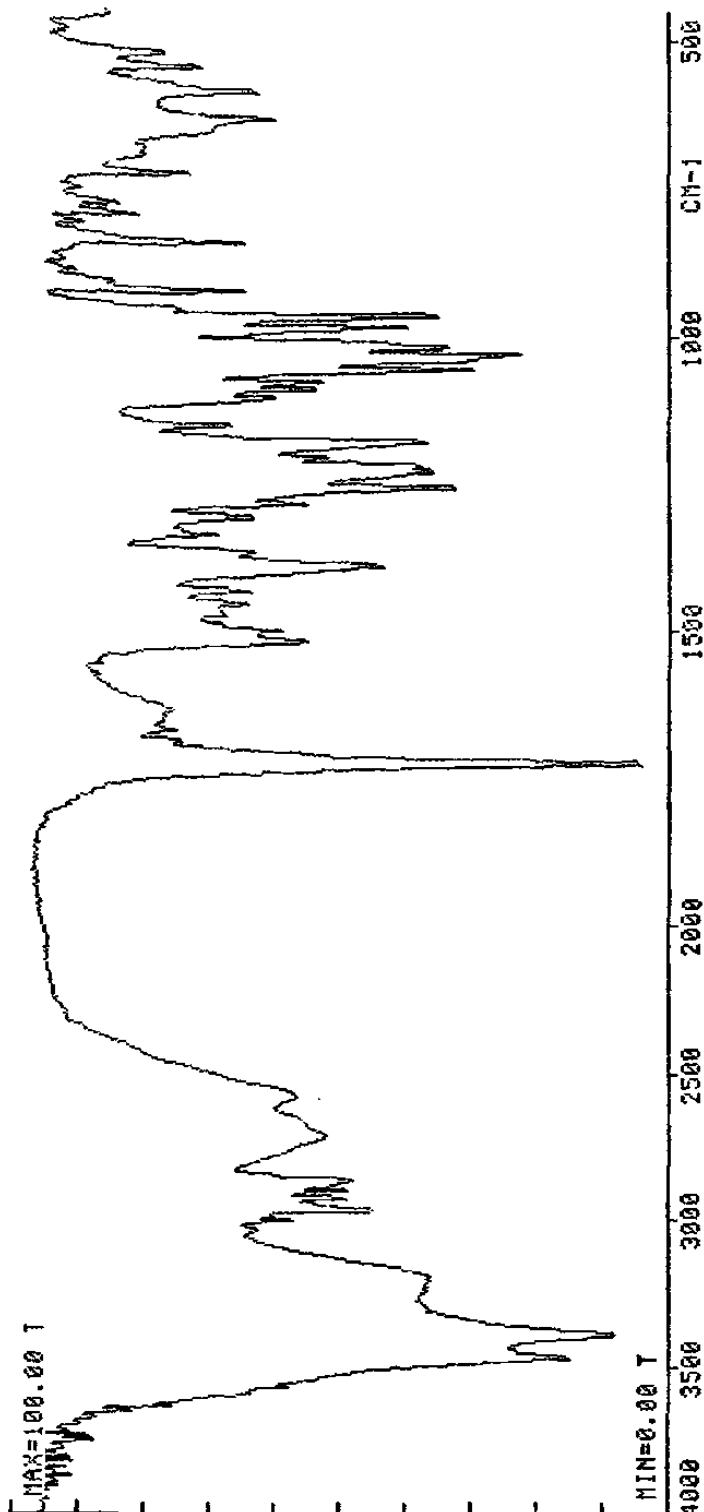
REF. VALUES :

PHASE 1

| | | | | | | | | | |
|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 3771. | 90.6 | 3760. | 89.8 | 3732. | 87.2 | 3745. | 92.3 | 3736. | 87.4 |
| 3725. | 91.0 | 3712. | 87.1 | 3702. | 90.2 | 3691. | 84.9 | 3677. | 83.2 |
| 3670. | 85.9 | 3657. | 83.1 | 3650. | 77.5 | 3630. | 75.2 | 3620. | 72.7 |
| 3588. | 63.5 | 3568. | 58.1 | 3545. | 33.9 | 3472. | 14.6 | 3393. | 8.4 |
| 3289. | 36.1 | 3037. | 62.6 | 3007. | 37.1 | 2992. | 60.2 | 2975. | 43.6 |
| 2984. | 52.5 | 2933. | 46.8 | 2908. | 49.1 | 2889. | 49.2 | 2876. | 47.1 |
| 2716. | 52.4 | 2578. | 36.6 | 1869. | 93.8 | 1729. | 3.2 | 1687. | 74.4 |
| 1689. | 75.2 | 1654. | 75.9 | 1647. | 76.5 | 1636. | 74.8 | 1577. | 86.7 |
| 1559. | 85.5 | 1519. | 54.7 | 1500. | 58.7 | 1473. | 67.0 | 1466. | 68.1 |
| 1455. | 63.7 | 1432. | 63.8 | 1393. | 63.1 | 1365. | 62.9 | 1337. | 68.5 |
| 1307. | 63.0 | 1283. | 54.6 | 1237. | 39.7 | 1229. | 35.0 | 1218. | 37.0 |
| 1203. | 51.8 | 1176. | 35.8 | 1147. | 65.6 | 1100. | 59.6 | 1087. | 51.4 |
| 1075. | 51.8 | 1056. | 29.3 | 1046. | 28.6 | 1033. | 21.7 | 1019. | 31.6 |
| 983. | 39.4 | 966. | 32.4 | 952. | 73.1 | 922. | 64.2 | 908. | 84.5 |
| 893. | 90.7 | 876. | 92.3 | 840. | 84.6 | 812. | 89.2 | 794. | 80.9 |
| 777. | 83.7 | 755. | 89.5 | 724. | 72.7 | 691. | 79.9 | 679. | 79.8 |
| 630. | 59.4 | 583. | 61.1 | 544. | 70.5 | 519. | 76.3 | 483. | 91.9 |

END 85 PEEKS FOUND

Nome SURMING (alcano)
 Numero CHEMICALS
 Divalente KOL
 Fecha 7-07-76
 Operador Eduardo Gonzalez
 No. de espectro _____
 E X E C O H , C . I . 9 . 1 C U A T : M E C H



CHAPARRINA

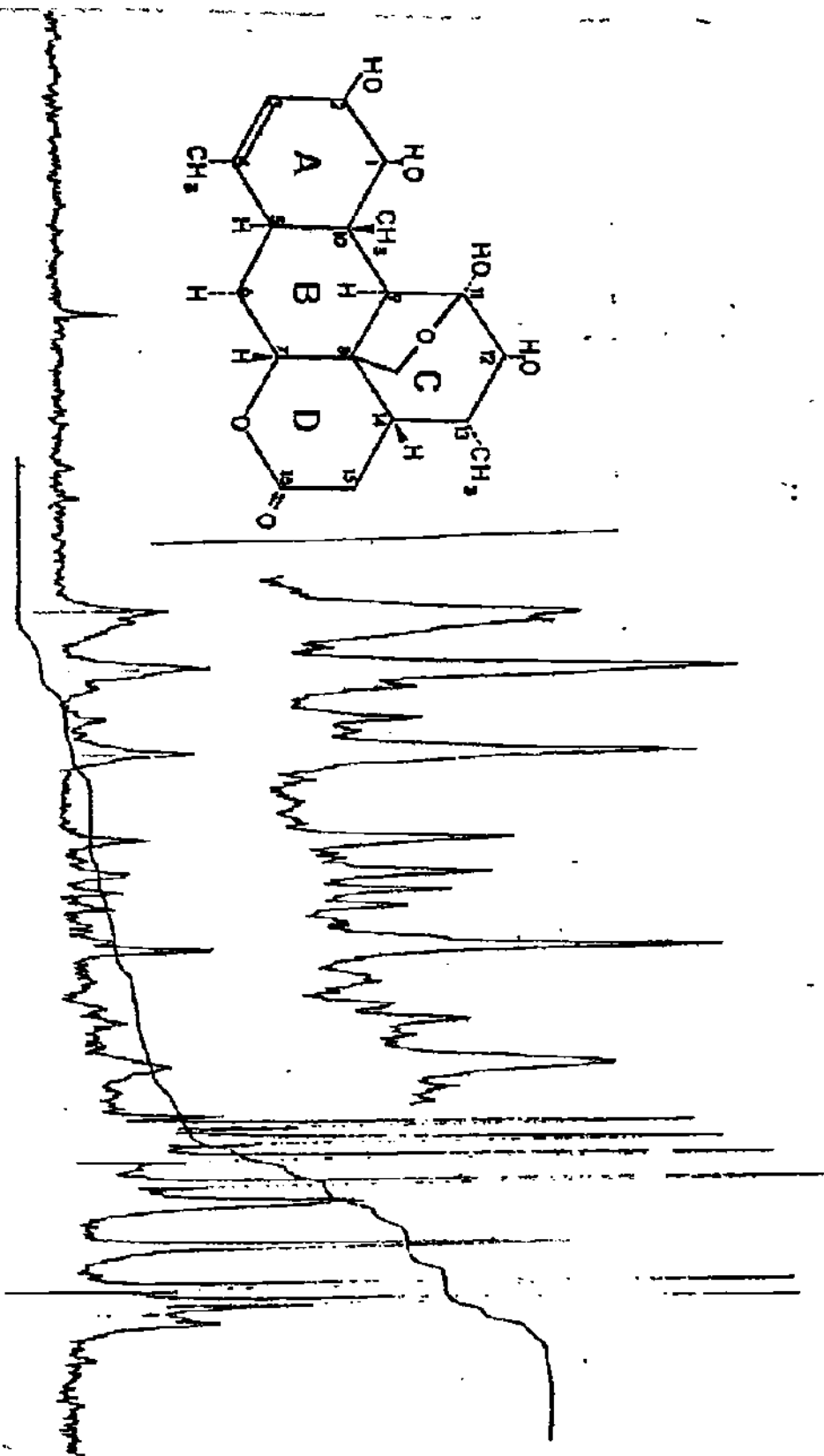


FIGURA No. 10 ESPECTRO ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE LA CHAPARRINA.

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

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

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

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

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

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

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

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

| Extracto [µg/ml] | Cél. Totales (10⁶) | Quistes (10⁶) | Enquistamiento (%) | Inhibición del Enquist. (%) |
|-----------------------------|--|-------------------------------------|-------------------------------|--|
| Acuoso: | | | | |
| 100.0 | 5.8±0.7 | 0.005±0.001 | 0.1 | 99.8 |
| 10.0 | 6.5±0.5 | 0.1±0.07 | 1.5 | 97.6 |
| Metanólico: | | | | |
| 100.0 | 6.3±0.9 | 0.0±0.01 | 0.0 | 100.0 |
| 10.0 | 5.4±0.2 | 0.1±0.04 | 2.2 | 96.4 |
| Testigo | 6.0±0.7 | 3.7±0.30 | 61.6 | |

Los valores son la media ± DE para 3 determinaciones.

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

| Extracto [µg/ml] | Cél.Totales (10⁶) | Quistes (10⁶) | Enquistamiento (%) | Inhibición del Enquist. (%) |
|-----------------------------|---|-------------------------------------|-------------------------------|--|
| Acuoso: | | | | |
| 0.1 | 4.9±0.6 | 2.0±0.1 | 40.2 | 16.2 |
| 1.0 | 4.7±0.5 | 0.9±0.07 | 18.3 | 62.0 |
| Metanólico: | | | | |
| 0.1 | 5.0±0.4 | 1.8±0.02 | 36.0 | 25.0 |
| 1.0 | 4.9±0.6 | 0.8±0.03 | 16.3 | 66.0 |
| Testigo | 4.6±0.7 | 2.2±0.30 | 49.0 | |

Los valores son la media ± DE para 3 determinaciones.

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

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

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

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

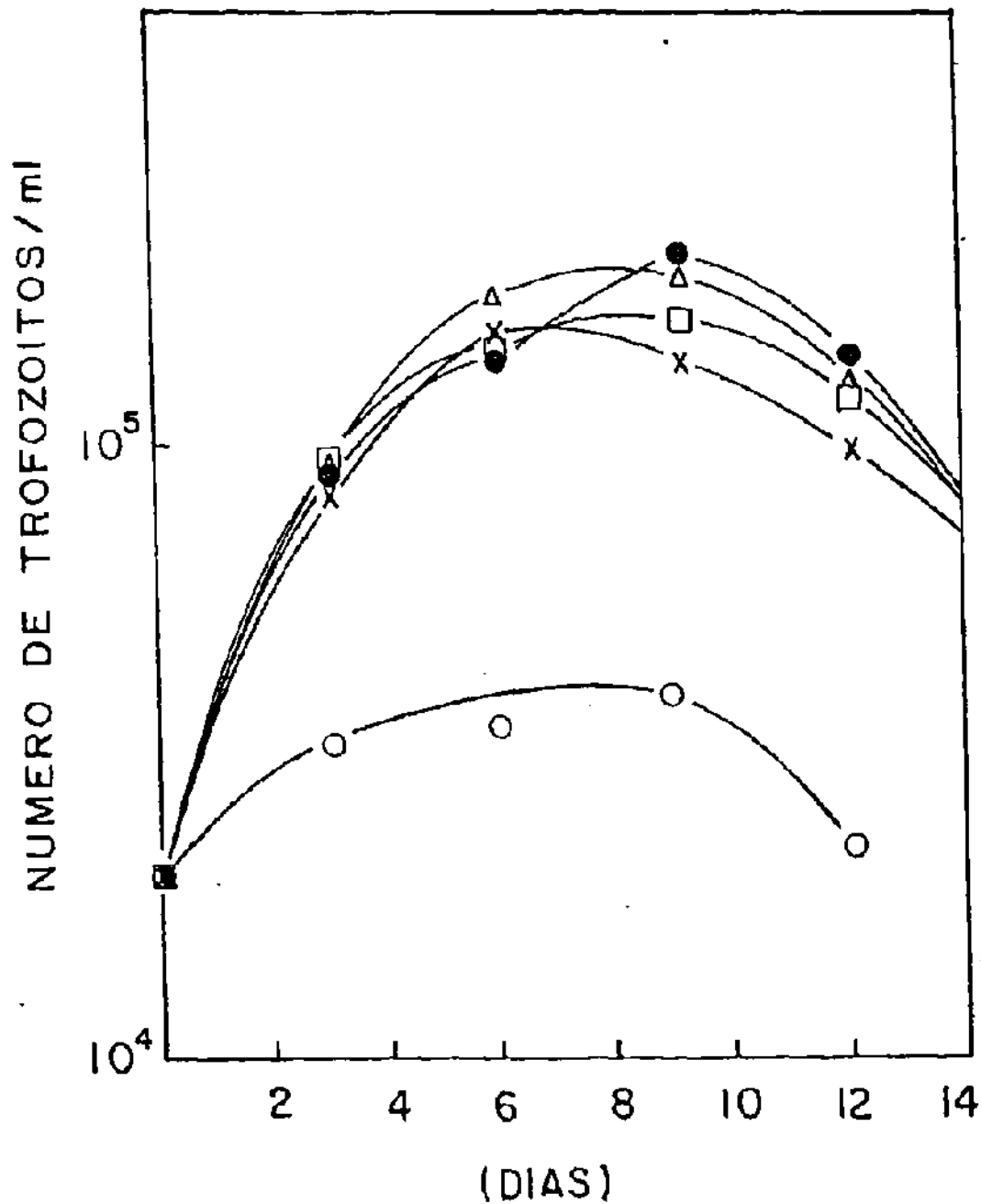


FIGURA No. 7 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION SUBLETAL DEL EXTRACTO METANOLICO AISLADO DE LA *C. texana* SOBRE EL CRECIMIENTO DE TROFOZOITOS DE *E. invadens*: (●-● testigo, Δ-Δ 1, □-□ 5, x-x 10, ○-○ 100 µg/ml).

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

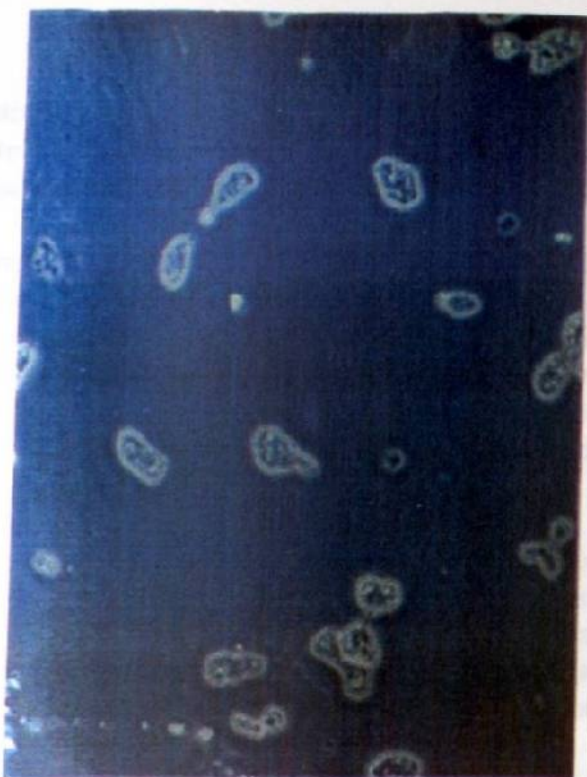
| Conc. [µg/ml] | 3 | | 6 | |
|------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
| | Células (10 ⁴) | Inhibición (%) | Células (10 ⁴) | Inhibición (%) |
| 100 | 3.3±0.5 | 63.0 | 3.9±0.2 | 80 |
| 10 | 8.3±0.7 | 6.7 | 13.7±0.3 |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

Los valores son la media ± DE para 3 determinaciones.

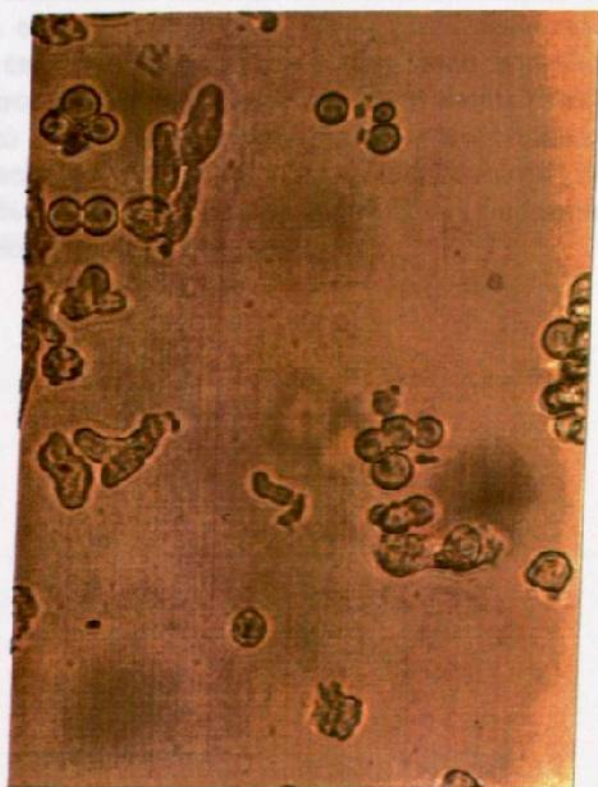
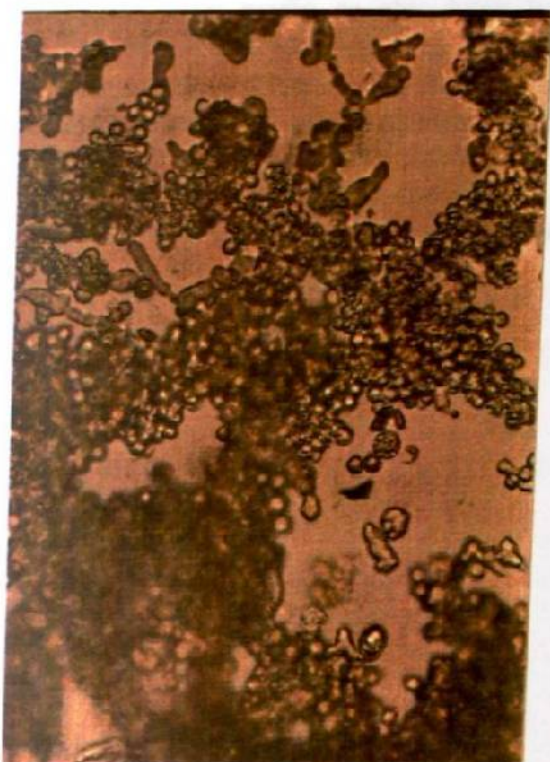
b) El Proceso de Enquistamiento de *E. invadens*.

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

Los valores son la media ± DE para 3 determinaciones.



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



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

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

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

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

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

Inicialmente se preparó una solución concentrada [100 µg/ml] de cada una de estas tres fracciones empleando el propio medio de enquistamiento y posteriormente haciendo diluciones seriadas de 10 en 10, con este mismo medio se obtuvieron las concentraciones: [0.1-10.0 µg/ml] en donde, después de inocular los trofozoítos e inducir su enquistamiento mediante el gaseado con CO₂ observamos que aunque las tres fracciones presentaron una actividad inhibitoria muy similar (Tabla No. 5), aparentemente, la fase intermedia resultó un poco más activa ya que a la mínima concentración probada [0.1 µg/ml] mostraba una actividad inhibitoria sobre el enquistamiento de nuestros trofozoítos amebianos de alrededor del 50% en comparación con las otras dos fracciones quienes solo mostraron actividad hasta la concentración de [1.0 µg/ml].

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

| Fracción [µg/ml] | Cél. Totales (10 ⁶) | Quistes (10 ⁶) | Enquistamiento (%) | Inhibición del Enquist. (%) |
|-----------------------|------------------------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| Acuosa: | | | | |
| 0.1 | 5.2±0.8 | 1.8±0.04 | 34.6 | 38.9 |
| 1.0 | 4.7±0.8 | 1.2±0.04 | 25.5 | 54.9 |
| 10.0 | 6.1±0.5 | 0.7±0.07 | 11.5 | 79.7 |
| Intermedia: | | | | |
| 0.1 | 5.6±0.4 | 1.7±0.31 | 30.3 | 46.5 |
| 1.0 | 4.4±1.0 | 0.9±0.14 | 20.9 | 63.0 |
| 10.0 | 4.2±0.9 | 0.10±0.02 | 2.4 | 95.7 |
| Diclorometano: | | | | |
| 0.1 | 4.6±0.3 | 1.6±0.20 | 34.7 | 38.7 |
| 1.0 | 3.8±0.2 | 1.0±0.20 | 26.3 | 53.5 |
| 10.0 | 6.5±0.5 | 0.07±0.02 | 1.1 | 98.0 |
| Testigo | 6.0±0.7 | 3.40±0.40 | 56.6 | |

Los valores son la media ± DE para 3 determinaciones.

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

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

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

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

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

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

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

Los valores representan la media ± DE de 3 determinaciones.

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

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

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

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

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

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

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

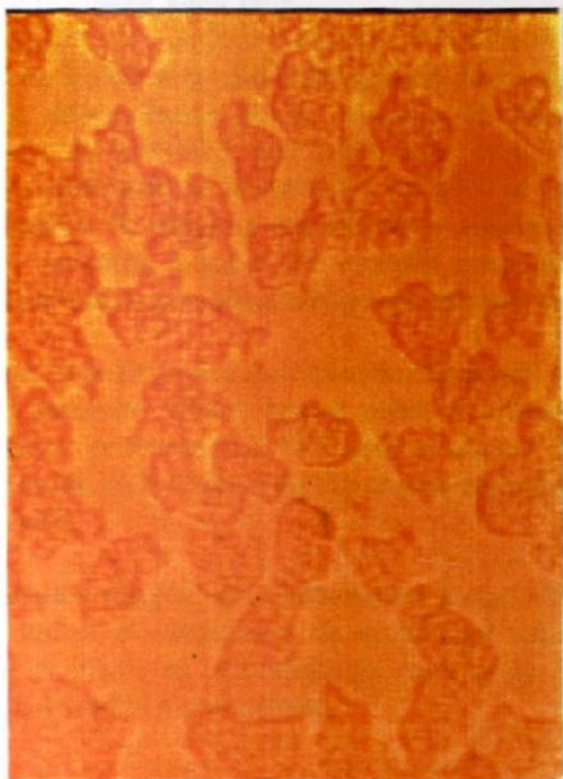
Con estos resultados podemos confirmar los reportes previos donde se ha señalado que el mecanismo de acción de las drogas de uso antiambiano de uso actual va dirigido de una manera directa sobre el trofozoíto y no poseen la capacidad de inhibir los procesos de diferenciación de trofozoíto a quiste de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

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

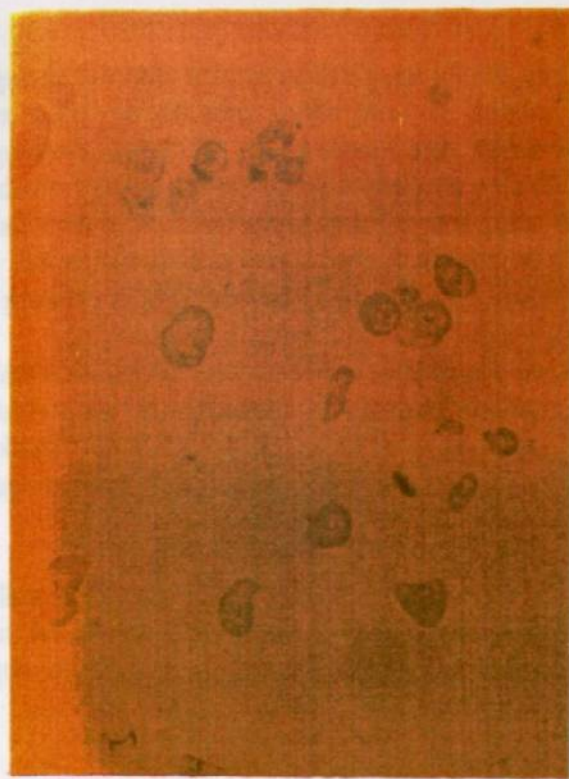
| TIEMPO (d) | 3 | | 6 | |
|--------------------|--------------------|------------|--------------------|------------|
| | Células | Inhibición | Células | Inhibición |
| | (10 ⁴) | (%) | (10 ⁴) | (%) |
| Droga [mM] | | | | |
| Chaparrina: | | | | |
| 100 | 1.3±0.5 | 80.4 | 0.5±0.1 | 96.2 |
| 10 | 3.0±0.4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

Los valores son la media ± DE para 3 determinaciones.

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



FOTOGRAFIA No.20 TESTIGO.



FOTOGRAFIA No.21 CHAPARRINA.



FOTOGRAFIA No. 22 EMETINA.



FOTOGRAFIA No.23 TINIDAZOL.

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

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

La Tabla No. 9 nos muestra los resultados en donde podemos observar que la rifampicina, droga de interés, no presentó efecto alguno sobre la diferenciación de *E. invadens* a ninguna de las concentraciones probadas [0.1-10.0 mM] en cambio, la chaparrina si fue capaz de inhibir el proceso de diferenciación de la amiba a las dos concentraciones mayores probadas en este estudio: [1.0-10.0 mM].

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

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

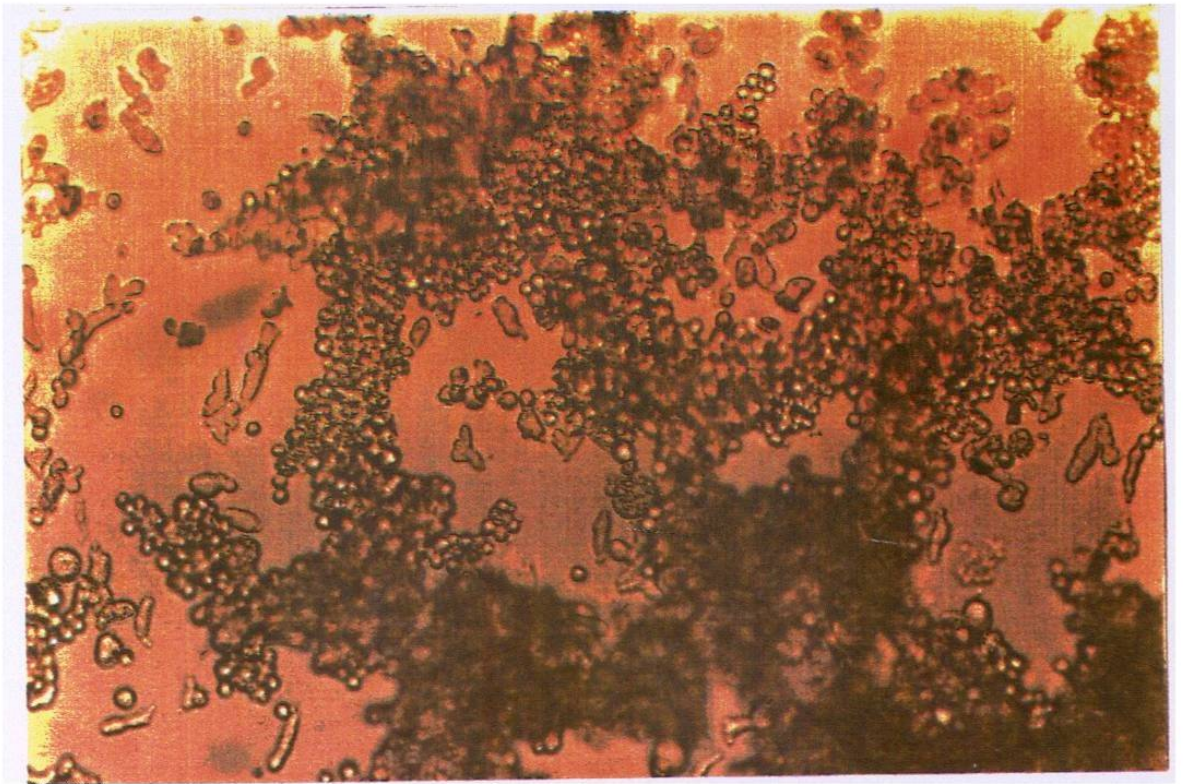
Con estos resultados podemos definir a la concentración de 1.0 mM como la concentración con la que la chaparrina no inhibe el proceso de crecimiento de la amiba pero si su diferenciación a quiste. Este valor es 10 veces menor que el que requiere el extracto metanólico aislado de la *C. texana* para actuar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

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

| Compuesto [mM] | Cél.Totales (10⁶) | Quistes (10⁶) | Enquistamiento (%) | Inhibición del enquist.(%) |
|---------------------------------|---|---|-------------------------------------|---|
| Chaparrina: | | | | |
| 10 | 4.2±0.5 | 1.10±0.4 | 10.5 | 80.0 |
| 1.0 | 5.0±0.7 | 0.82±0.1 | 16.4 | 69.1 |
| 0.1 | 5.3±0.6 | 1.90±0.2 | 35.8 | 31.5 |
| Rifampicina: | | | | |
| 10 | 5.7±0.3 | 2.11±0.1 | 37.1 | 29.1 |
| 1.0 | 6.3±0.7 | 2.89±0.2 | 45.9 | 12.5 |
| 0.1 | 6.5±0.4 | 3.09±0.3 | 47.6 | 9.0 |
| Testigo | 6.5±0.3 | 3.40±0.2 | 52.3 | |

Los valores son la media ± DE para 3 determinaciones.

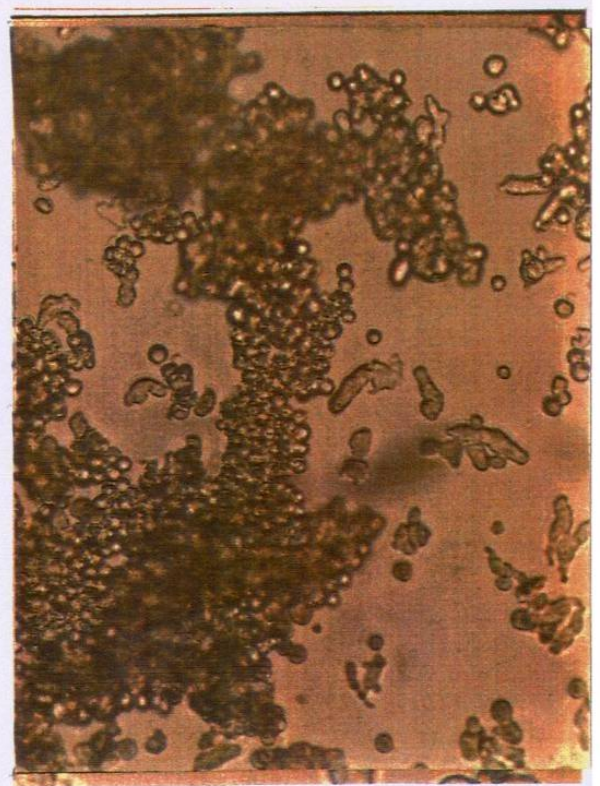
ACTIVIDAD DE LA CHAPERRINA Y DE LA RIFAMPICINA 10mM
SOBRE EL PROCESO DE ENQUISTAMIENTO DE E. invadens, CEPA IP-1.



FOTOGRAFIA No. 24 TESTIGO.



FOTOGRAFIA No. 25 CHAPARRINA. 72



FOTOGRAFIA No. 26 RIFAMPICINA.

8.11. Proceso de Desenquistamiento.

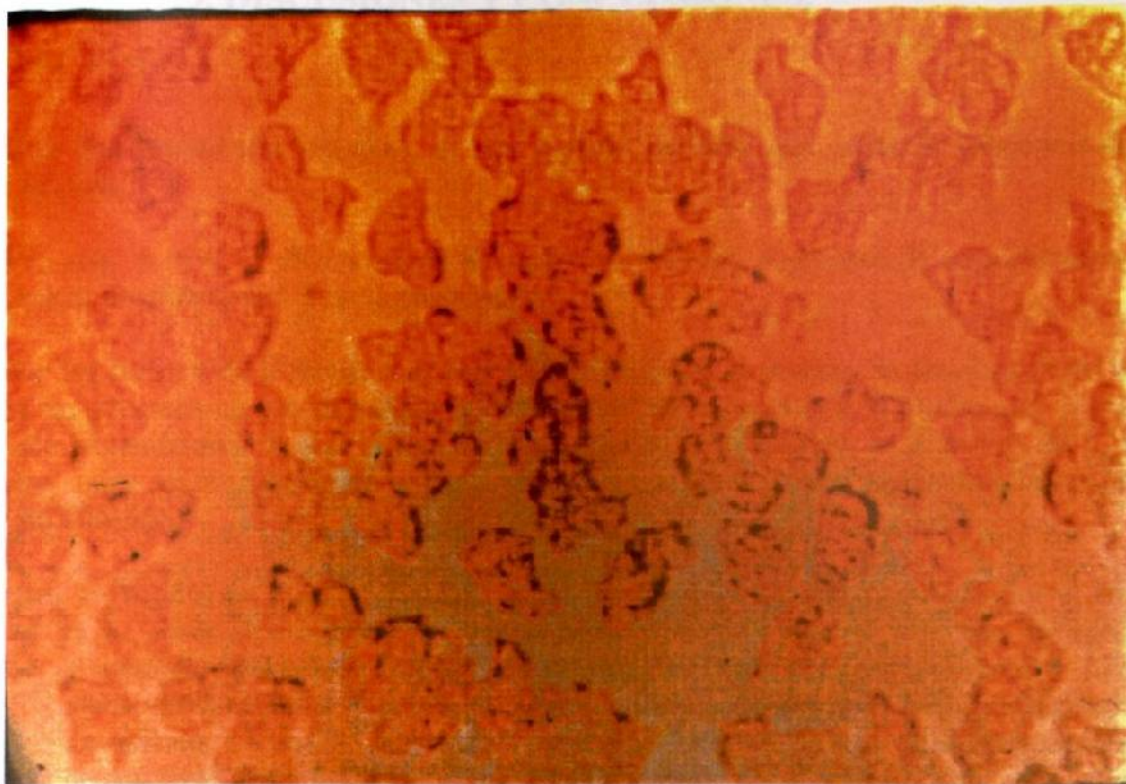
Los quistes obtenidos después de inducir el enquistamiento de los trofozoítos de *E. invadens* se colectaron y se sometieron a procesos de lavado con PBS como se mencionó en la sección de material y métodos.

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

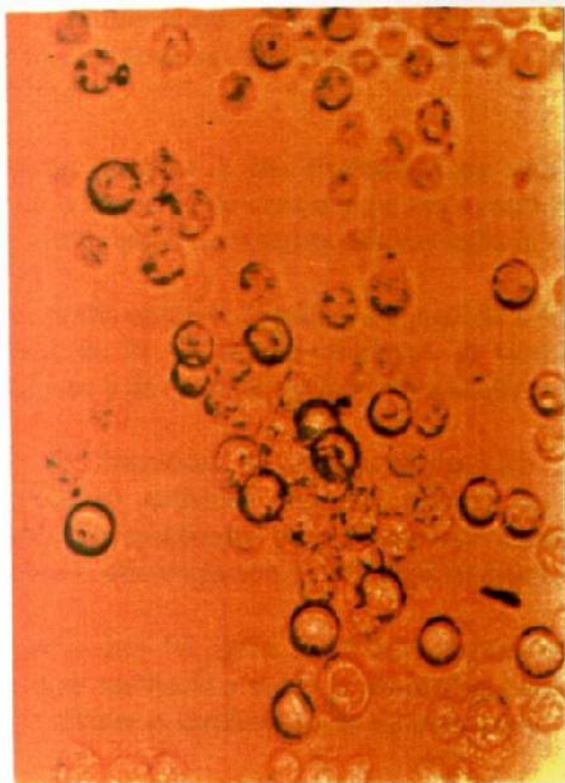
Este proceso está representado por nuestro cultivo testigo el cual, se puede apreciar en la fotografía No. 27 en donde podemos observar múltiples trofozoítos en crecimiento.

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

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

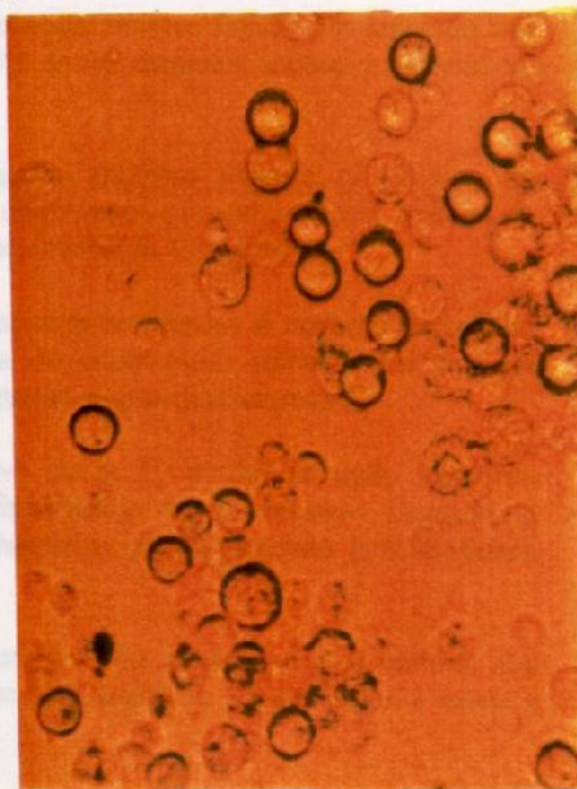


FOTOGRAFIA No. 27 TESTIGO



FOTOGRAFIA No. 28 CHAPARRINA

[1mM]



FOTOGRAFIA No. 29 EXTRACTO METANOLICO

[10 g/ml.]

9. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

12. Estos resultados nos alientan para continuar con el estudio de *Castela texana* para llegar al conocimiento de una nueva droga útil en el tratamiento de la amibiasis así como en la producción de nuevas estrategias para el buen control de la diseminación de este parásito.

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

10. BIBLIOGRAFÍA.

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

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

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

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

54. Martínez-Palomo A, Arroyo-Begovich A, Sánchez ME (1978). Formación de la pared celular durante el enquistamiento de *Entamoeba invadens*. Arch Invest Med (Méx) 9:105.
55. Martínez-Palomo A (1982). The biology of *Entamoeba histolytica*. Chichester: Research Studies Press.
56. Martínez-Palomo A (1986). Biology of *Entamoeba histolytica*. In A Martínez-Palomo (ed): Amebiasis. Amsterdam: Elsevier Biomedical, 11-43.
56. Martínez-Palomo A (1987). The patogenesis of amoebiasis. Parasitol. Today 3:111-118.
57. Martínez-Palomo A, Ruiz-Palacios G (1990). Amebiasis. In: Tropical and Geographical Medicine (KS Warren y AF Mahmoud, eds) pp. 327-344. McGraw-Hill, New York.
58. Martínez-Velez S (1986). Tratamiento de la amebiasis quística con chaparro amargoso. Tesis de Postgrado con Especialidad en Medicina Familiar, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Cuernavaca, Mor, México.
59. McConnachie EW (1969), The morphology, formation and development of cysts of *Entamoeba*. Parasitol; 59:41.
60. Meza I, Meraz MA, De la Garza M, de la Torre M, Tanimoto M, Martínez-Palomo A (1986). Isoenzyme patterns of *Entamoeba histolytica* isolates from asymptomatic carriers. Am J Trop Med Hyg 35:1134-1139.
61. Mirelman D, Bracha R, Chayen A, Aust-Kettis A, Diamond LS (1986a). *Entamoeba histolytica*: Effect of growth conditions and bacterial associates on isoenzyme patterns and virulence. Exp Parasitol 62:142-148.
62. Mirelman D, Bracha R, Wexler A, Chayen A (1986b). Alterations of isoenzyme patterns of a clone culture of non-pathogenic *Entamoeba histolytica* upon changes in growth conditions. Arch Invest Med (Méx) 17(Suppl 1):187-193.
63. McLaughlin J, Aley S (1985). The biochemistry and functional morphology of *Entamoeba*. J Protozool 32:221-240.
64. Morales-Vallarta M, Villarreal-Treviño L, Guerrero-Medrano L, Ramírez-Bon E, Navarro-Marmolejo L, Said-Fernández S, Mata-Cárdenas B (1997). *Entamoeba invadens* Differentiation and *Entamoeba histolytica* Cyst-Like Formation Induced by CO₂. Arch Med Res; 28:150.

65. Morales-Vallarta M (1991). Inducción de cuerpos cromatoides en trofozoitos que crecen en fase-log y diferenciación de *Entamoeba invadens* por alta tensión de CO₂. Aspectos en la formación de la pared del quiste. Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias presentó el maestro Morales-Vallarta en el Depto. de Postgrado de la Fac. de Ciencias Biológicas de la UANL en Mayo de 1991.
66. Muñoz O (1989). Epidemiología de la Amibiasis. En: Martínez-Palomo A (eds) Amibiasis, 1a Ed. Editorial Médica Panamericana SA, México DF, 164.
67. Moretti C, Deharo E, Sauvain M, Jardel C, David PT, Gasquet M (1994). Antimalarial activity of cedronin. *J Ethnopharmacolo* 43(1):57-61.
68. Nixon PI (1914). Chaparro amargosa in the treatment of amoebic dysentery. *J Am Med Assn*; 42:1530.
69. Ohnishi S, Fukamiya N, Okano M, Tagahara K, Lee KH (1995). Bruceosides D,E, and F, three new cytotoxic quassinoid glucosides from *Brucea javanica*. *J Nat Prod* 58(7):1032-8.
70. Pinto da Silva, Martínez-Palomo A, González Robles A (1975). Membrane structure and surface coat of *Entamoeba histolytica*. Top chemistry and dynamics and the cell surface: Cap formation and microexudate. *J Cell Biol* 64:538-550.
71. Portillo I (1992). Consideraciones al método de diferenciación de *Entamoeba invadens* por alta tensión de CO₂. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Químico Bacteriólogo Parasitólogo, UANL, México.
72. Powell, SJ, Elsdon-Drew R (1972). *Am J Trop Med Hyg* 21:518.
73. Putegnat JL (1883). *Castela nicholsonii* characteristics and proximate analysis. *New Remedies*, NY;12:102.
74. Raham S, Fukamiya N, Ohno N, Tokuda H, Nishino H, Tagahara K, Lee KH, Okano M (1997). Inhibitionary effects of quassinoids derivatives on Epstein-Barr virus early antigen activation. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 45(4):675-677.
75. Raizada MK, Krishna-Murti CR (1972). Transformation of tropic *Harmanniella culberstoni* into viable cysts by cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. *J Cell Biol*; 522:743.
76. Ratoliffe HL, Geiman QM (1933). Eleven cases of amoebiasis in reptiles. *J Parasitol*; 20:139.
77. Reed SL, Curd JG, Guillin FD, Braude AI (1986). Activation of complement by pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Immunol* 136:2265-2270.

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

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



DONATIVO

