



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES ZARAGOZA

ESTUDIO QUIMICO Y PRUEBAS FARMACOLOGICAS PRELIMINARES DE Zanthoxylum liebmanniarum (Colopahtle)

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a n :

ZITA RAMIREZ RAMIREZ

JOSE LUIS MONTESINOS GARCIA



México, D. F.

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

	Pag.
Abreviaturas	
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Búsqueda de nuevos fármacos.....	1
1.2 La amibiasis.....	3
1.3 Antecedentes de la planta en estudio.....	5
2. FUNDAMENTO DE LA ELECCION DEL TEMA.....	7
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	8
4. OBJETIVOS.....	8
5. HIPOTESIS.....	8
6. MATERIALES.....	9
6.1 Material.....	9
6.2 Reactivos.....	11
6.3 Aparatos.....	12
6.4 Material biológico.....	13
7. METODOS.....	14
7.1 Método para el estudio químico.....	14
7.1.1 Análisis químico preliminar.....	14
7.2 Método para el estudio farmacológico.....	14
7.2.1 Obtención de los extractos.....	14
7.2.2 Cultivo axénico de <u>E. histolytica</u>	16
7.2.3 Determinación de anticuerpos anti amibas...	17
7.2.4 Determinación de proteína con el reac- tivo de Folin-Ciocalteu.....	18
8. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	20
8.1 Análisis químico preliminar.....	20
8.2 Estudio "in vitro".....	22
8.3 Estudio "in vivo".....	25

	Pag.
9. RESULTADOS.....	29
10. DISCUSION.....	40
11. CONCLUSIONES.....	43
12. ANEXO.....	44
13. BIBLIOGRAFIA.....	47

A B R E V I A T U R A S

AcC ₅₀	Extracto acuoso - Tratamiento de curación Dosis 50 mg/Kg.
AcC ₅₀₀	Extracto acuoso - Tratamiento de curación Dosis 500 mg/Kg.
AcP ₅₀	Extracto acuoso - Tratamiento de protección Dosis 50 mg/Kg.
AcP ₅₀₀	Extracto acuoso - Tratamiento de protección Dosis 500 mg/Kg.
NAcC ₅₀	Extracto no acuoso - Tratamiento de curación Dosis 50 mg/Kg.
NAcC ₅₀₀	Extracto no acuoso - Tratamiento de curación Dosis 500 mg/Kg.
NAcP ₅₀	Extracto no acuoso - Tratamiento de protección Dosis 50 mg/Kg.
NAcP ₅₀₀	Extracto no acuoso - Tratamiento de protección, Dosis 500 mg/Kg.
Ab	Anticuerpos
Ag	Antígeno
GRC	Glóbulos rojos de carnero
GRC-T	Glóbulos rojos de carnero tanizados

GRC-T-Ag	Glóbulos rojos de carnero tanizados con antígeno
SNC	Suero normal de conejo
IgG	Inmunoglobulina G
PBS	Solución reguladora de fosfatos
rpm	Revoluciones por minuto
nm	Nanómetros
pH	Potencial de iones hidronio
°C	Grados centígrados
l	litros
ml	Mililitros
mccl	Microlitros
Kg	Kilogramos
g	Gramos
mg	Miligramos
mcg	Microgramos
cm	Centímetros
mm	Milímetros

mm ³	Milímetros cúbicos
mu	Milimicras
hr	Horas
HIM	Hospital Infantil de México
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social

1. INTRODUCCION

1.1 Búsqueda de nuevos fármacos.

Los productos naturales fueron alguna vez la fuente de todos los fármacos y la purificación de las sustancias medicinales a partir de las plantas llegó a ser la preocupación principal de la química medicinal durante el siglo XIX.

En años recientes el progreso en los métodos analíticos y de separación estimuló un resurgimiento del interés - en este campo (1). Los productos naturales y sus derivados representan todavía casi la mitad de todos los fármacos de uso clínico, de los cuales los antibióticos constituyen la mayor parte de ellos (20).

En ocasiones el conocimiento popular proporciona evidencia de plantas con actividad farmacológica. La digital, los opiáceos y los alcaloides de la Chinchona (quinina y - quinidina) se introdujeron a la medicina por esta vía. Así también, la atropina, pilocarpina, nicotina, efedrina, cocaína, teofilina y otros fármacos se obtuvieron primero al purificar extractos de plantas que se decía tenían cualidades medicinales. A pesar de estas contribuciones tan útiles a la Farmacología, la medicina herbolaria es desde luego una guía poco confiable en la investigación de productos activos (38), ya que muchos de los quince mil compuestos - aislados de productos naturales hasta enero de 1977 son productos de degradación o transposición que ocurren durante - su aislamiento debido a la influencia de enzimas o agentes químicos externos que dieron origen en pocas ocasiones a - verdaderos fármacos (14, 24). Es así, como los conocimientos que se han venido acumulando a través de los años han - permitido comprender, en cierta medida, los mecanismos por

los cuales las sustancias químicas detienen o alteran el curso de las enfermedades y puesto en relieve sus virtudes, limitaciones y los riesgos de su uso (40), por lo que el efecto deseado debe estar bien definido y es necesario un procedimiento que pueda determinar si un fármaco en particular tiene o no un efecto específico (26, 47, 50).

Para la selección de un fármaco se realizan procedimientos "in vitro" o bien pueden emplearse animales de laboratorio. En general, como al principio se desconoce por completo la dosificación, se administran varias dosis hasta alcanzar la "dosis máxima tolerada", es decir el límite al que ocurre la toxicidad. El problema es determinar si los efectos terapéuticos deseados se obtienen o no a dosis atóxicas (2).

En los productos naturales es posible distinguir 4 fases características de estas investigaciones.

- 1o. La actividad biológica es detectada en el material crudo y se monta el sistema de biovaloración para permitir la identificación de las fracciones activas y descartar rápidamente las inactivas.
- 2o. Se fracciona el material crudo por el procedimiento químico más apropiado; todas las fracciones se prueban, las fracciones activas se fraccionan aún más, etc., hasta que se obtiene el compuesto puro.
- 3o. Se determinan las estructuras químicas de los compuestos puros.
- 4o. Se realizan los ensayos preclínicos y de cernimiento.

En ocasiones los compuestos se someten a una "selección ciega"; en este tipo de búsqueda, el criterio específico para acciones deseadas en particular, no se han establecido de antemano; el objetivo es determinar si un nuevo compuesto tiene alguna actividad farmacológica útil (19).

La analogía entre las enfermedades humanas y los modelos animales pueden ser muy superficiales y la selección del fármaco en animales puede no revelar una acción útil o sugerir - falsamente su utilidad (29). Actualmente se han enlistado - 352 modelos que proveen sistemas de funcionamiento en ciertos órganos similares a los humanos (8); aún así, no se ha descubierta la contraparte animal de algunas enfermedades humanas; ejemplos de ellas son la depresión mental y la epilepsia idiopática.

Todo esto hace que sea difícil formular criterios para - encontrar un programa de selección adecuado (20). La selección del modelo animal depende del objetivo que se persiga, - por ejemplo en los estudios de amibiasis experimental pueden llevarse a cabo en gatos, perros, ratas, conejos, cuyos y -- hamsters. Las primeras cinco especies son útiles para el estudio de la amibiasis intestinal y los hamsters para la investigación sobre la amibiasis hepática (46).

1.2 La amibiasis.

Las diversas amibas que afectan al hombre son Entamoeba histolytica, Naegleria gruberi y Acantamoeba. De las tres anteriores la E. histolytica es la más frecuente en nuestro medio socioeconómico y afecta en un promedio del 20% de la población mundial (28).

La amibiasis en México ocupa uno de los primeros renglones en las estadísticas de morbilidad y mortalidad. En 1974 se le consideró responsable de la muerte de 2,072 personas, - una tercera parte de las cuales no alcanzaban aún los 5 años de edad (39).

Actualmente la tasa de infección amibiana está definida como el porcentaje de la población que tiene E. histolytica en el intestino, pero éste no es índice fiel para juzgar la fre-

cuencia de la amibiasis clínica en una zona geográfica dada. Tal vez el único índice seguro para determinar la prevalencia y gravedad de la amibiasis es la cantidad de abscesos hepáticos amibianos (28).

De acuerdo con este criterio, se demuestra que ciertos países son más duramente azotados por el padecimiento (21).

La fuente de contagio y el mecanismo de transmisión se adquiere por la ingestión de quistes a través de los alimentos, en el agua contaminada o por contagio directo (ano-manoobra) (28).

Actualmente la transformación de la forma no invasora (quiste) a la invasora (trofozoito) es aún desconocida, aunque se aceptan dos ciclos vitales; un ciclo no patógeno durante el cual el parásito vive en la superficie de la mucosa o en la luz del intestino en forma quística, nutriéndose de otros microorganismos y restos alimenticios y un ciclo patógeno, en donde habita en el espesor de los tejidos y se alimenta de los productos de histólisis fagocitando eritrocitos e invadiendo tejidos, adoptando la forma de trofozoito y multiplicándose por división (7, 21, 27).

Algunos factores que causan dicha transformación son los siguientes:

Relativos al huésped: la amibiasis hepática es más frecuente en el adulto, en mujeres de edad reproductiva y en casos de desnutrición.

Relativos al parásito: virulencia de la cepa, magnitud del inóculo y repetición de las infecciones.

Factores asociados: coexistencia de infecciones enteropatógenas (Shigella, Salmonella, E. coli), alcoholismo, dietas ricas en colesterol y almidones, fatiga, etc.

La invasión tisular amibiana desencadena una respuesta inmunológica caracterizada por: aparición de anticuerpos ---

séricos, aumento de inmunoglobulinas séricas (IgG) e inmunidad celular.

A partir de las paredes del intestino los trofozoitos, pueden llegar por vía porta al hígado, por contigüidad invadir piel y genitales o el peritoneo. A partir del hígado el parásito puede invadir pleura, pulmón, pericardio peritonéo, estómago, riñón, abrirse a la piel o por vía hemática diseminarse a distancia (cerebro, pulmón, bazo, etc.) (28).

De acuerdo al grado y desarrollo del parásito en el huesped existen 3 grupos de fármacos que se utilizan en el tratamiento de la amibiasis.

- 1o. Los que tienen acción principalmente en tejidos y en la luz intestinal, administrados por vía oral, por ejemplo los derivados imidazólicos, la dehidroemetina y el fosfato de cloroquina.
- 2o. Los que únicamente tienen acción en los tejidos y en la luz intestinal, administrados por vía parenteral, por ejemplo clorhidrato de zemetina y la dehidroemetina.
- 3o. Los que tienen acción únicamente en la luz intestinal, administrados por vía oral, con muy poca o nula absorción del intestino y que actúan por contacto contra los trofozoitos de la amiba. Se encuentran desde los antiguos arsenicales y fármacos yodados hasta las nuevas amidas que poseen un radical clorado en su composición química. Por ejemplo: Las hidroxiquinolinas halogenadas dicloroacetamidas y fenantrolinas (3, 28, 45).

1.3 Antecedentes de la planta en estudio.

El Valle de Tehuacán es una provincia florística xerofítica, ubicada dentro de los 18°00' a 18°43' latitud norte y 96°55' longitud oeste en el sureste del estado de Puebla y norte de Oaxaca; altitud promedio 1,580 metros sobre el nivel

del mar; clima semiárido, lluvias de verano; suelos calcáreos predominantes; población: Nahuas y Popolacas.

En esta zona se realizó una exploración etnobotánica de información bilateral (intercambio de datos y material con la gente). De esta investigación se obtuvieron un total de 358 plantas medicinales, de las cuales se identificaron 269 especies; se encontraron registradas en la literatura 217 y 52 fueron de nuevo registro (14.5% del total). Dentro de estas especies de uso medicinal se encuentra el Colopahtle (Zanthoxylum liebmanniarum), del cual se emplea la infusión acuosa de la corteza para el tratamiento de la amibiasis e infecciones parasitarias intestinales y en ocasiones como anestésico local (18, 33).

Entre los compuestos encontrados del género Zanthoxylum se hallan:

Z. arborescens (16, 22, 23)

(2S,5S)-2,5-dibenzil-1,4-dimetilpiperazina

1-metil-3-(2'-feniletíl)-1H,3H-quinazolína-2,4-diona

1-metil-3-(2'-(4''-metoxifenil)etil)-1H,3H-quinazolína-2,4-diona

8-hidroxi-4,7-dimetoxifuranoquinolína

8-isopenteniloxi-4,7-dimetoxifuranoquinolína

Z. fagara: (15)

Skimmianina y scopeletina, lauriflorina y magnoflorina

Z. limoncillo y Z. caribaeum: (16)

Skimmiamina

2. FUNDAMENTO DE LA ELECCION DEL TEMA

Debido a la alta incidencia de la amibiasis en la población mundial; ésta ocupa un lugar importante entre las principales enfermedades que afectan al hombre (42). En México se encuentra clasificada dentro de las primeras causas de muerte (12).

Durante más de 50 años el tratamiento utilizado con mayor éxito para la amibiasis intestinal disintérica fue la emetina, sustancia de origen natural, obtenida de la Ipecacuana pero ésta ha sido reemplazada por otros fármacos con menos efectos secundarios y de menor toxicidad (41), debido a que las reacciones adversas se presentan en un 50-70% de los pacientes que reciben este fármaco; siendo las reacciones cardiovasculares las más serias e incluyen: dolor precordial, disnea, taquicardia, hipotensión, ritmo de galope, dilatación cardiaca, insuficiencia congestiva y muerte (40).

Actualmente los medicamentos de elección para el tratamiento de la amibiasis disintérica son los derivados imidazólicos (metronidazol, tinidazol, mebendazol, etc.) (31). En los últimos años se han reportado efectos carcinogénicos -- para el metronidazol (18). Pruebas en ratas demostraron que este fármaco inducía la formación de tumores, esto ha provocado una corriente de opiniones que motivan a la "Food and Drug Administration" de los Estados Unidos de Norteamérica para que este medicamento sea suprimido del mercado. Sin embargo para la amibiasis hepática, la alternativa terapéutica es prácticamente inexistente por el momento (17).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ya que hasta ahora no se cuenta con un antiamebiano ideal resulta importante impulsar la investigación de nuevos fármacos que solo afecten al parásito sin dañar al huésped. En este trabajo se planteó la determinación de la existencia del efecto amebicida en un extracto de la corteza del Colopohtle (Zanthoxylum liebmanniarum), planta medicinal, utilizada en San Andrés Cacaluapan, Puebla.

4. OBJETIVOS

Realizar un estudio químico preliminar de la corteza de la planta.

Efectuar estudios preliminares para verificar la acción farmacológica sugerida por conocimiento empírico popular.

Determinar la acción amebicida "in vitro" del extracto acuoso a diferentes concentraciones.

Determinar el efecto amebicida "in vivo" provocando absceso hepático amebiano en hamsters y tratándolos con diferentes dosis de extracto acuoso y no acuoso.

5. HIPOTESIS

En base a la información adquirida con respecto al efecto farmacológico asignado al Colopohtle (Zanthoxylum liebmanniarum). Se espera encontrar actividad amebicida en la corteza de la planta.

6. MATERIALES

6.1 Material

- 1.- Vasos de precipitados de 1000, 500, 250, 100, 25 y 10 ml de capacidad.
- 2.- Probetas de 1000, 500, 250, 100, 50 y 25 ml de capacidad.
- 3.- Matraces kitasato de 1000, 500 y 250 ml de capacidad.
- 4.- Tubos de ensaye con tapón de rosca de 15 x 125 mm de capacidad.
- 5.- Matraces Erlenmeyer con tapón de rosca de 500, 250 y 125 ml de capacidad.
- 6.- Embudos Buchner de 500, 250 y 100 ml de capacidad.
- 7.- Pipetas graduadas de 10, 5, 1.0, 0.5 y 0.1 ml de capacidad.
- 8.- Cubreobjetos de 22 x 22 mm.
- 9.- Portaobjetos de 26 x 76 mm y 1.1 mm de espesor.
- 10.- Cámara de Neubauer.
- 11.- Pipeta para glóbulos blancos.
- 12.- Termómetro de -10 a 100 °C.
- 13.- Tubos de ensayo de 10 x 100 mm.
- 14.- Vidrios de reloj de 10 cm de diámetro
- 15.- Pipetas Pasteur.
- 16.- Micropipetas de 50 y 10 mcl de capacidad.
- 17.- Placas para microtitulación Cooke.
- 18.- Tubos para centrifuga Falcon de 50 ml de capacidad.
- 19.- Jeringas estériles Plastipak BD de 10, 5 y 1.0 ml de capacidad.
- 20.- Frascos ampula de 5 ml de capacidad.
- 21.- Embudos de filtración de talle corto y largo.

- 22.- Cajas Petri de 10 cm de radio.
- 23.- Gradillas de acero inoxidable.
- 24.- Barras magnéticas de 2 y 1 pulg.
- 25.- Espátulas de diferentes tamaños.
- 26.- Soporte universal.
- 27.- Estuche de disección.
- 28.- Agujas quirúrgicas con sutura Ethicon simple calibre 00.
- 29.- Guantes para cirujano.
- 30.- Hisopos estériles.
- 31.- Gasa.
- 32.- Algodón absorbente Zuum
- 33.- Papel filtro Whatman No. 1.
- 34.- Membrana de diálisis No. 38 Analyzer tubing.
- 35.- Membrana de millipore de 0.22 μ .
- 36.- Cinta testigo Tuk.
- 37.- Sonda de hule latex.
- 38.- Mangueras de hule latex.
- 39.- Tapones de hule de diferentes tamaños.
- 40.- Mechero Bunsen.
- 41.- Mechero Fisher.
- 42.- Frascos reactivo con tapón esmerilado de color ambar y blanco.
- 43.- Frascos goteros de 100 y 50 ml de capacidad.
- 44.- Matraz bola de boca esmerilada de 2000 ml de capacidad.
- 45.- Refrigerante.
- 46.- Cabeza de destilación.
- 47.- Tripies de acero inoxidable.
- 48.- Telas de asbesto.
- 49.- Placas para cromatografía en placa fina de 20 x 20 cm.
- 50.- Pinzas de 3 dedos.
- 51.- Soxhlet.

- 52.- Trampas para vacío.
- 53.- Canastilla para calentamiento.

6.2 Reactivos.

1.-	Peptona biotriptasa	Bioxon
2.-	Dextrosa anhidra	Baker
3.-	Cloruro de sodio	Baker
4.-	Fosfato monobásico de potasio	Baker
5.-	Fosfato dibásico de potasio	Baker
6.-	Acido ascórbico	Baker
7.-	Clorhidrato de L-cistéina	Sigma
8.-	Citrato férrico de amonio	BBL
9.-	Solución de vitaminas NCTC-107	Microlab
10.-	Vitamina B ₁₂	Mega Pharma
11.-	Acido teótico	Sigma
12.-	Tween 80	Actual Química
13.-	Suero bovino	Microlab
14.-	Acido tánico	Sigma
15.-	Fosfato dibásico de sodio	Baker
16.-	Carbonato de sodio	Baker
17.-	Hidróxido de sodio	Baker
18.-	Sulfato de cobre pentahidratado	Baker
19.-	Tartrato de sodio y potasio	Baker
20.-	Reactivo de Folin Ciocalteu	Sigma
21.-	Formaldehido	Baker
22.-	Extran	Merk
23.-	Fenol	Baker
24.-	Azul tripano	Sigma
25.-	Eter	Baker
26.-	Acetato de etilo	Baker
27.-	Cloroformo	Baker
28.-	Cloruro de mercurio	Baker

29.-	Yoduro de potasio	Baker
30.-	Acido pícrico	Baker
31.-	Yodo	Baker
32.-	Subnitrato de bismuto	Merk
32.-	Acido nítrico	Baker
33.-	Acido silicotúngstico	Merk
34.-	Vainillina	Baker
35.-	Etanol	Baker
36.-	Bromo	Baker
37.-	Cloruro férrico	Baker
38.-	Carbonato de sodio	Baker
39.-	Citrato de sodio	Baker
40.-	Globulos rojos de carnero	
41.-	Suero normal de conejo	

6.3 Aparatos

1.-	Campana de flujo laminar	Veco
2.-	Incubadora	Medi-Lab, SA
3.-	Centrífuga clínica	Int. Eq. Co.
4.-	Filtro millipore	Millipore
5.-	Potenciometro	Corning
6.-	Microscopio	Me-opta Prafa
7.-	Olla express	Presto
8.-	Balanza analítica	Bosch P 115
9.-	Liofilizadora	
10.-	Homogenizador	Precision Sc. Co.
11.-	Colorímetro	Beckman
12.-	Refrigerador	Whirlpool
13.-	Rotavapor	Buchii
14.-	Agitador Magnético	Thermolyne
15.-	Reloj	General Electric

- 17.- Lámpara de luz ultravioleta Corning
- 18.- Molino de compresión y fricción
- 19.- Estufa de secado con aire caliente Medi-Lab, S.A.

6.4 Material Biológico.

- 1.- 10 Kg de corteza seca y molida de Colopahtle (Zanthoxylum liebmanniarum), recolectada durante el mes de mayo en el Valle de Tehuacán, Puebla.
- 2.- Entamoeba histolytica cepa HMI:IMSS, cultivada en medio axénico, donada gentilmente por la Srta. QBP -- Margarita de la Torre.
- 3.- 80 hamsters dorados de Siria hembras (Mesocricetus auratus) de aproximadamente 2 meses de edad, con peso promedio de 90 gr, donados por el bioterio del IMSS.

7. METODOS

7.1 Método para el estudio químico

7.1.1 Análisis químico preliminar.

La corteza de la planta fue recolectada durante el mes de mayo, la cual se secó y molió para someterla a una extracción con etanol durante una hora, se filtró y concentró a presión reducida. El residuo semisólido resultante se utilizó para los siguientes ensayos de acuerdo a las técnicas de Cain y colaboradores (14).

Alcaloides
Saponinas
Triterpenos
Taninos
Azucares
Glucosidos cianogénicos

7.2 Métodos para el estudio farmacológico.

7.2.1 Obtención de los extractos.

Para probar el efecto farmacológico sugerido se obtuvieron dos extractos de la siguiente manera.

Extracto acuoso. La corteza seca y molida del tallo de la planta fue extraída por una hora con agua destilada, la solución se filtró y dializó, concentrándose a sequedad por liofilización. (Fig. 1)

Extracto no acuoso. Este fue obtenido mediante la extracción de la corteza de la planta seca y molida con acetato de etilo en Soxhlet por 2 horas, se filtró y concentró a presión reducida. (Fig. 1)

7. METODOS

7.1 Método para el estudio químico

7.1.1 Análisis químico preliminar.

La corteza de la planta fue recolectada durante el mes de mayo, la cual se secó y molió para someterla a una extracción con etanol durante una hora, se filtró y concentró a presión reducida. El residuo semisólido resultante se utilizó para los siguientes ensayos de acuerdo a las técnicas de Cain y colaboradores (14).

Alcaloides

Saponinas

Triterpenos

Taninos

Azucares

Glucosidos cianogénicos

7.2 Métodos para el estudio farmacológico.

7.2.1 Obtención de los extractos.

Para probar el efecto farmacológico sugerido se obtuvieron dos extractos de la siguiente manera.

Extracto acuoso. La corteza seca y molida del tallo de la planta fue extraída por una hora con agua destilada, la solución se filtró y dializó, concentrándose a sequedad por liofilización. (Fig. 1)

Extracto no acuoso. Este fue obtenido mediante la extracción de la corteza de la planta seca y molida con acetato de etilo en Soxhlet por 2 horas, se filtró y concentró a presión reducida. (Fig. 1)

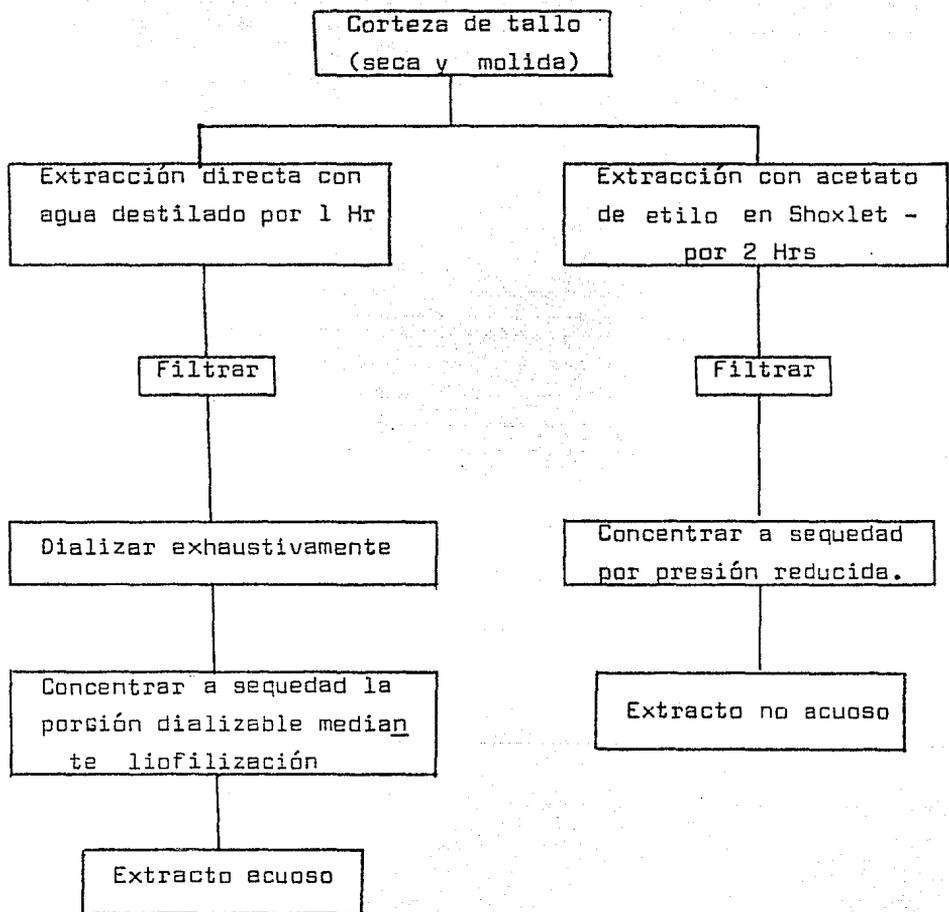


Fig. 1 Obtención de los extractos para la evaluación farmacológica - del Colopahtle.

7.2.2. Cultivo axénico de E. histolytica.

El estudio farmacológico "in vitro" fue realizado utilizando la cepa de E. histolytica HM1:IMSS cultivada en medio axénico de acuerdo a la metodología del Dr. Diamond (12).

La constitución y preparación del medio axénico es la siguiente:

Componentes	g / 100 ml
Peptona biotriptasa	3.0
Dextrosa	1.0
Cloruro de sodio	0.2
Fosfato dibásico de potasio	0.1
Fosfato monobásico de potasio	0.05
Acido ascorbico	0.02
Clorhidrato de L-cisteina	0.01
Citrato férrico de amonio	0.00228
Agua bidestilada cbp	77.0 ml

Para el medio TY se disolvieron los reactivos en el orden presentado con aproximadamente 50 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 6.8 con hidróxido de sodio 0.1 M y después se llevó a un volumen de 77 ml con agua bidestilada.

Se clarificó mediante filtración a través de papel filtro Whatman No. 1 y se esterilizó en autoclave por 15 min. a 121°C.

Para cada 77 ml de caldo TY se le añadieron en condiciones estériles 3 ml de mezcla vitamínica y 20 ml de suero bovino, para obtener el medio TYI - S - 33, el cual se dejó en una incubadora a 37°C durante 24 hrs. para verificar su esterilidad.

Para la inoculación de trofozoitos al medio TYI - S - 33 se llenaron en forma estéril tubos de ensayo con tapón de rosca con 12 ml de medio. Los tubos con crecimiento óptimo de amibas fueron enfriados en un baño de hielo por 5 min. para desprender

las células de la pared del tubo, se invirtió en 10 ocasiones para su homogenización y se realizó el conteo del número de trofozoitos resemebrando con un inóculo de 1.2×10^4 amibas en 0.3 ml.

La determinación del número de células se realizó mediante el uso de una cámara de Neubauer y una pipeta para glóbulos blancos, con los siguientes cálculos.

$$\frac{A \times B \times C}{D} \times E = \text{células / ml}$$

Donde: A = suma de los cuatro cuadrantes grandes de la cámara de Neubauer.

B = dilución de la pipeta 1:20

C = factor para determinar el valor por mm^3 (10)

D = número de cuadrantes (4)

E = factor para determinar el valor por ml (1000)

7.2.3 Determinación de anticuerpos anti-amibas.

Los sueros obtenidos de los hamsters utilizados se les determinó el título de anticuerpos anti-amibas por la técnica de hemaglutinación pasiva (35), la que consistió en la incubación de un vol de GRC al 1.5% más un vol de ácido tánico (1:20 000) a 37°C por 10 min, transcurrido este tiempo se centrifugó a 1500 rpm y se lavó el paquete de GRC-T con PBS pH 7.2, resuspendiéndolo finalmente en un vol de PBS de pH 6.4 : a éste se le añadió 4 vol de PBS de pH 6.4 más un vol de solución de Ag, homogenizado por 10 min con una concentración de 2 mg/ml de proteína cuantificada de acuerdo a la técnica de Folin-Ciocalteu, a esta mezcla se le dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente se centrifugó y descartó el sobrenadante, para resuspenderlo en un vol de suero normal de conejo 1:100.

Por otra parte en una placa de microtitulación se realizaron las siguientes diluciones de los antisueros: 1:10, -- 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160 que fueron puestas en contacto con la solución de GRC-T-Ag, utilizando un control negativo sin Ag, formado por la dilución mínima del antisuero más GRC-T; un control negativo sin Ab, conteniendo GRC-T-Ag más el suero normal de conejo y un control positivo de título conocido, al que se le realizaron las mismas diluciones del antisuero problema.

7.2.4 Determinación de proteínas con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Las proteínas pueden determinarse por métodos colorimétricos midiendo la intensidad del color azul que se produce al agregar el reactivo de Folin-Ciocalteu a una solución alcalina de proteínas sin digestión previa (35). Esta determinación se realizó en los lisados de E. histolytica obtenidos de cultivos axénicos, como se muestra en la tabla No. 1.

Tabla No. I Determinación de proteínas por el método de Folin - Ciocalteu

	Blanco		Curva estandar						Muestra
Tubo No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Contenido de proteína/tubo/mg	-	0.01	0.02	0.03	0.05	0.1	0.15	0.2	-
ml del estandar 0.5 mg/ml	-	0.02	0.04	0.06	0.1	0.2	0.3	0.4	-
ml de solución salina	-	0.38	0.36	0.34	0.30	0.20	0.10	-	-
ml de muestra	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4
ml de reactivo A	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Mezclar y reposar a temperatura ambiente por 10 min.									
ml de reactivo B	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Mezclar, reposar por 30 min y leer a 500 nm.									

Reactivo A Solución de carbonato de sodio, tartrato de sodio y potasio y sulfato de cobre - pentahidratado relación 100:1:1

Reactivo B Reactivo de Folin Ciocalteu

B. DESARROLLO EXPERIMENTAL

8.1 Análisis Químico Preliminar

A 100 grs. de corteza del tallo de la planta, seca y molida se sometieron a una extracción con 300 ml de etanol durante una hora, se filtró y concentró a presión reducida. El residuo semisólido resultante se utilizó para los siguientes ensayos.

Alcaloides. Un gramo del residuo se disolvió en 10 ml de ácido clorhídrico diluido (10%), se agitó y filtró hasta que éste fue completamente transparente. El filtrado se ensayó con los reactivos de: Mayer, Dragendorff, Hager, ácido silicotungstico y bicarbonato de sodio.

Saponinas. Se disolvió un gramo del residuo en un tubo de ensayo y se probó con el reactivo de Rosenthaler.

Triterpenos. Se disolvió un gramo del residuo en un mililitro de cloroformo al que se le agregó un mililitro de anhídrido acético dejándolo resbalar por las paredes del tubo y se dejó en reposo hasta la aparición de colores rojos, rosa, púrpura o azul en la interfase.

Taninos. Se disolvió con agua un gramo del residuo, se filtró, se tomaron alícuotas para las pruebas con: agua de bromo y cloruro férrico.

Azúcares. Un gramo del extracto etanólico se diluyó en aproximadamente 50 ml de agua, se filtró y se probaron los siguientes reactivos: Reactivo de Benedict. Se tomó un mililitro de

la solución problema y se agregó un mililitro de reactivo de Benedict, 2 ml de agua y se calentó la mezcla en baño maría, paralelamente se corrió un blanco.

Reactivo de Fehling, se tomó una alícuota de 10 ml de extracto diluido y se le agregaron 5 ml de la solución A y 5 ml de la solución B, se calentó en baño maría paralelamente se -- corrió un blanco.

Glucósidos cianogénicos. Una tira de papel filtro se impregnó con reactivo de Guignard, el cual se colocó en la boca - del tubo que contenía una pequeña cantidad del extracto etanólico con unas gotas de cloroformo, se calentó a 30-35°C y se observó la coloración del papel.

8.2 Estudio "in vitro"

Con el extracto acuoso liofilizado del Colopantle se realizaron diluciones que iban de 1.0 a 10 mcg/ml en agua bidestilada, a estas soluciones se les fijo el pH a 6.8 y se esterilizaron por filtración con membrana Millipore de 0.22 μ .

Los experimentos consistieron en probar 5 tubos por concentración que contenía 12 ml del medio TYI-S-33, 0.5 ml de la concentración del extracto liofilizado y 0.3 ml de la suspensión de amibas (1.2×10^4 trofozoitos). Los tubos fueron mezclados por inversión suave en 10 ocasiones e incubados a 37°C en forma inclinada (12).

En todos los ensayos se utilizó un testigo que correspondió al crecimiento típico de la célula en ausencia del extracto acuoso de la planta.

El número de trofozoitos así como su viabilidad fue determinado bajo las siguientes condiciones (Fig. 2).

10. Los tubos se incubaron a 37°C por 72 hrs., después de este tiempo se observaba su movilidad y la población de amibas fue contada de la siguiente manera: los tubos se enfriaron en baño de hielo por 5 min., se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min. desechando el sobrenadante para concentrar a un mililitro, del cual se tomó una alícuota para determinar el número de amibas en una cámara de Neubauer, utilizando azul tripano como colorante vital, considerando como amibas viables aquellas que no eran permeables al colorante.
20. Después de las 72 hrs. se realizaron subcultivos de 48 hrs. en presencia y ausencia del extracto, durante 3 resiembras. Al término de cada subcultivo se observó el estado morfológico de las amibas, su viabilidad y su número.

Los tratamientos empleados fueron identificados como:

Subcultivo "A" presencia de extracto.

Subcultivo "B" ausencia de extracto.

Los resultados fueron tabulados con el siguiente criterio:

(-) Amibas lisadas.

(\pm) Escasa presencia de amibas y/o pronunciada redondez.

(+) Número de amibas menor a 50 000 / ml.

(++) Número de amibas igual o menor a 100 000 / ml.

(+++) Número de amibas igual o menor a 200 000 / ml.

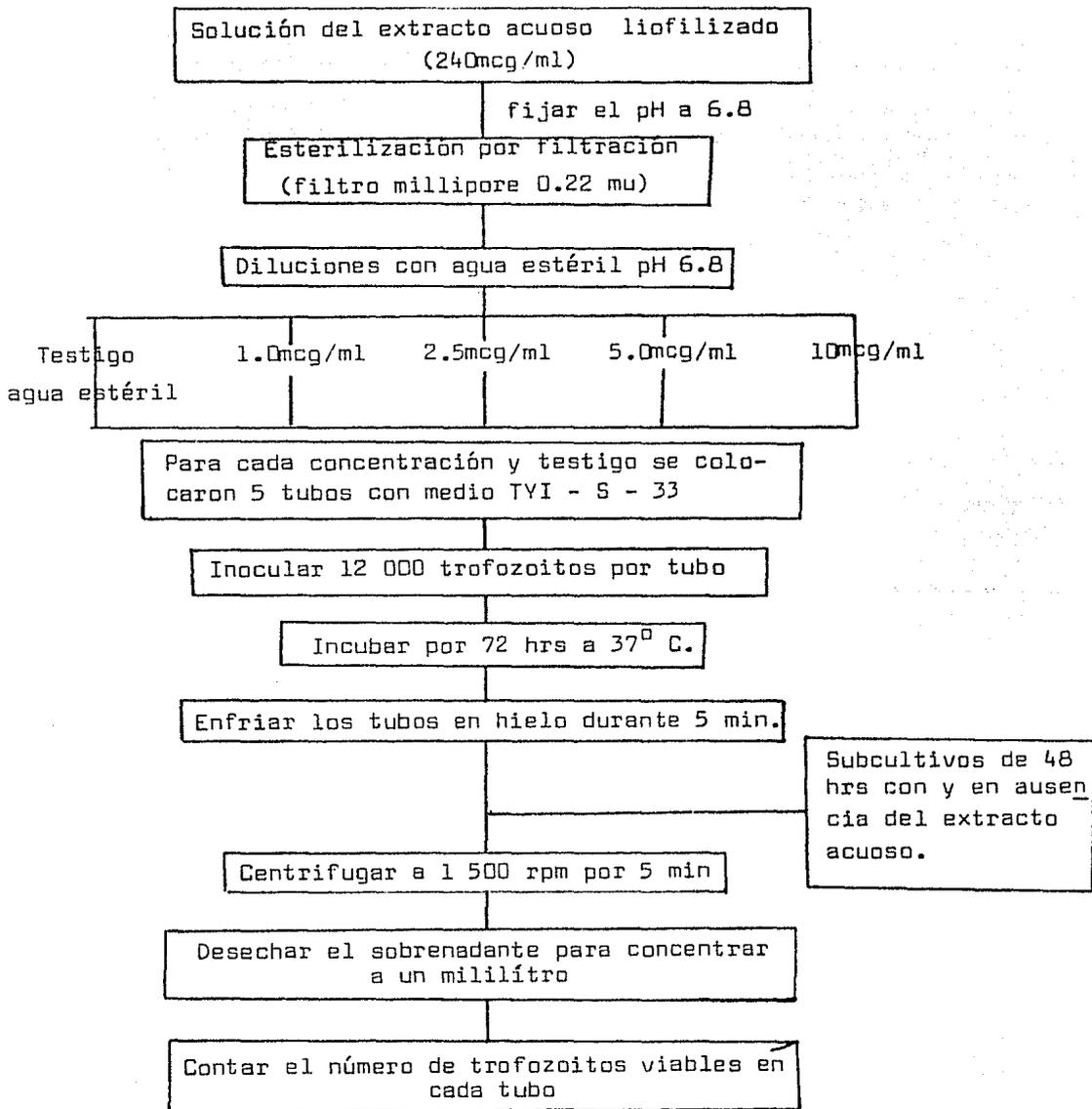


Fig. 2 Determinación del efecto amebicida de un extracto acuoso sobre *E. histolytica* cultivada en medio axénico.

8.3 Estudio "in vivo"

Se utilizaron 80 hamsters hembras de 2 meses de edad, con peso promedio de 90 grs., divididos en 10 grupos. Los animales fueron inoculados intrahepáticamente con 1.5×10^6 trofozoitos en 0.2 ml por medio de microcirugía (25).

Los grupos fueron distribuidos en dos secciones para la administración de un extracto acuoso y uno no acuoso - con los siguientes tratamientos (Fig. 3)

- 1o. Dosis de Protección (AcP ; NAcP) : a estos grupos les fue administrado los extractos acuoso y no acuoso por vía oral a la dosis de 50 y 500 mg/Kg de peso, cuatro horas antes de la inoculación y después cada 12 hrs. durante 7 días. Al grupo control se le administró solamente el vehículo bajo las mismas condiciones.

- 2o. Dosis de Curación (AcC : NAcC) : a estos grupos se les inoculó y dejó reposar durante 7 días, transcurrido este tiempo les fueron administrados los extractos acuoso y no acuoso por vía oral a la dosis de 50 y 500 mg/Kg de peso cada 12 hrs. durante 10 días. Al grupo control se le administró solamente el vehículo bajo - las mismas condiciones.

Al término de cada tratamiento se sacrificaron los animales de la siguiente manera: los hamsters fueron colocados en una cámara y se les administró éter etílico; una vez anestesados, se colocaron en una tabla de disección, se abrió la cavidad torácica, se les puncionó directamente a la aurícula derecha con una jeringa de insulina estéril desechable, obteniéndose 2 ml de sangre para las pruebas de hemaglutina-

ción. Posteriormente se abrió la cavidad abdominal y se removió el hígado seccionando las venas cavas, suprahepática y porta. Una vez extraído el hígado, se colocó en recipientes que contenían 10 volúmenes de formol al 10% amortiguado con solución reguladora de fosfatos a pH de 7.4. Una vez fijado, el hígado se estudió microscópicamente y se describieron las lesiones encontradas, se buscó intencionalmente abscesos, para determinar su tamaño y localización, así como sitios anfractuosos, hemorrágicos o blanquecinos que correspondieran al sitio de la punción. Se hicieron cortes seriados en sentido transversal cada 2 mm y se exploró y describió la superficie del corte. Se seleccionaron cortes representativos, los cuales se incluyeron en una cápsula y se enviaron al laboratorio de Histología del Departamento de Patología del Hospital Infantil de México para ser incluidos en parafina, cortados y teñidos con hematoxilina y eosina. En algunos casos se incluyeron varias cápsulas y se hicieron además tinciones especiales para confirmar la presencia de amibas como las de PAS y Grecott. Las laminillas obtenidas fueron estudiadas por un patólogo en ciego y posteriormente fueron revisados en un microscopio de luz de tres estaciones por tres observadores.

Se buscó bajo el microscopio: 1) sitio de la punción, - presencia de hemorragia, necrosis o trayectos fistulosos perihepáticos, respuesta de la cápsula de Glisson u otros -- hallazgos sugestivos del sitio de la inoculación como material extraño, restos del medio de cultivo, etc. 2) Presencia de abscesos hepáticos. 3) Presencia de trofozoitos de amibas. 4) Necrosis coagulativa, necrosis central y necrosis basófila periférica. 5) Respuesta inflamatoria: su grado y componentes. a) Leucocitos polimorfonucleares, b) Neutrófilos. - c) Eosinófilos. d) Linfocitos. e) Células plasmáticas. 7) - Cápsula: denotada por una banda formada por fibroblastos pro

liferados y depósitos de fibras de colágena. B) Granulomas: dentro del parénquima hepático alejado de la lesión se busca la presencia de acúmulos de células inflamatorias con - histiocitos, células hepiteloides y/o células gigantes multinucleadas.

La presencia de todos estos hallazgos se calificó en tres grados:

- (+) Presente, escasa, leve, focal.
- (++) Prominente, moderada en cantidad o extensión.
- (+++) Extensa, intensa, acentuada, marcada, difusa.

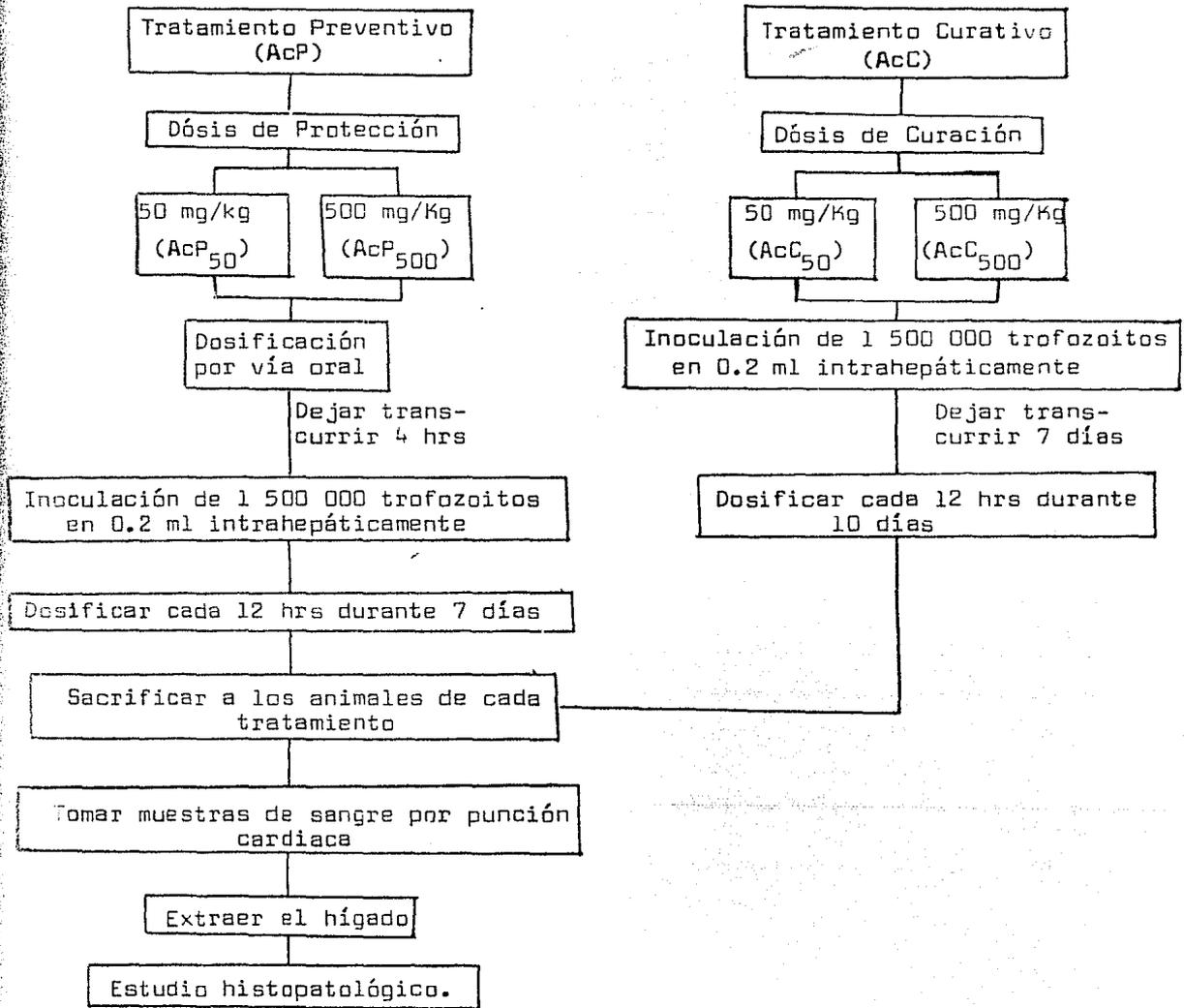


Fig. 3 Determinación del efecto preventivo o curativo de los extractos acuoso y no acuoso del Colopahle en el absceso hepático amibiano del hamster.

9. RESULTADOS

La tabla No. II muestra los resultados del análisis químico preliminar, en ella se puede observar que la corteza del Colopantle (Zanthoxylum liebmanniarum) contiene alcaloides, saponinas, azúcares y taninos.

La tabla No. III presenta los resultados obtenidos en el estudio "in vitro", del efecto del extracto acuoso a diferentes concentraciones y con dos tipos de tratamientos, presencia y ausencia del extracto acuoso.

Los resultados obtenidos en el estudio "in vivo", se describen en la tabla No. IV, estos correspondieron a la sobre vida de los animales después de ser inoculados.

El título de anticuerpos en los hamsters tratados con los extractos acuoso y no acuoso se muestran en la tabla No. V.

La presencia de abscesos hepáticos y amibas encontrados en los hamsters en estudio se muestran en las tablas VI y VII.

Los datos recopilados del estudio histopatológico se resumen en la tabla No. VIII.

Tabla No. II Análisis Químico Preliminar.

Ensayo	Reacción	Resultado
Alcaloides	Meyer	(+)
	Dragendorff	(+)
	Acido silicotugstico	(+)
	Hager	(+)
	Bicarbonato de sodio	(+)
Saponinas	Rosenthaler	(+)
Triterpenos	Anhídrido acético	(-)
Azúcares	Benedict	(+)
	Fehling	(-)
Taninos	Agua de bromo	(+)
	Cloruro férrico	(+)
Glucósidos Cianogénicos	Guignard	(-)

(+) Positivo

(-) Negativo

Tabla No. III Efecto del extracto acuoso del *Colopeltle* sobre *E. histolytica* en medio exenico

Tiempo/concentración		1 mcg/ml	2.5 mcg/ml	5 mcg/ml	10 mcg/ml	Control
Resiembra 72 hrs.		+++	++	+++	+++	+++
1er. subcultivo 48 hrs.	"A"	+++	++	+++	++	+++
	"B"	++	+++	+++	+++	
2o. subcultivo 48 hrs.	"A"	++	+++	++	++	+++
	"B"	++	+++	++	++	
3er. subcultivo 48 hrs.	"A"	-	+	±	±	+++
	"B"	±	+	±	+	

Los tratamientos empleados fueron identificados como:

Subcultivo "A" presencia de extracto.

Subcultivo "B" ausencia de extracto.

- Amibas lisadas
- ± Escasa presencia de amibas y/o pronunciada redondez
- + Número de amibas menor a 50 000/ml.
- ++ Número de amibas igual o menor a 100 000/ml.
- +++ Número de amibas igual o menor a 200 000/ml.

Tabla No. IV Sobrevida

Dosis de protección			
Extracto acuoso		Extracto no acuoso	
AcP ₅₀	AcP ₅₀₀	NAcP ₅₀	NacP ₅₀₀
8/8	6/8	8/8	6/8
Dosis de curación			
AcC ₅₀	AcC ₅₀₀	NAcC ₅₀	NacC ₅₀₀
8/8	6/8	5/8	5/8
Controles			
Protección		Curación	
6/8		6/8	

Tabla No. V* Título de anticuerpos antiamibas en sueros de hamsters tratados con los extractos acuoso y no acuoso.

	Tratamientos								CP	CC
	Acp		NAcP		AcC		NAcC			
	50	500	50	500	50	500	50	500		
	40	40	20	40	80	80	80	320	20	80
	40	20	20	40	80	80	160	40	40	320
	20	40	40	20	80	80	40	80	40	80
	40	40	40	20	40	80	60	80	20	160
	10	20	40	20	40	80	160	80	40	80
Total	150	160	160	140	320	400	500	600	160	720
Media	30	32	32	28	64	80	100	120	32	144

Los títulos de anticuerpos antiamibas de los grupos - problemas se analizaron estadísticamente, por medio de un - diseño de bloques completamente al azar de acuerdo a R.A. - Fisher (9). El modelo para el análisis toma la forma:

$$X_{ij} = \mu + \beta_i + t_j + e_{ij} \quad (1)$$

donde:

X_{ij} = Variable de respuesta (título de anticuerpos).

μ = Media general.

β_i = Es un efecto del i-ésimo bloque.

* Dilución máxima del suero que da respuesta positiva a la interacción antígeno-anticuerpo.

t_j = Representa un efecto del j-ésimo tratamiento.

e_{ij} = Error.

Para el cual se plantean las siguientes hipótesis.

Hipótesis nula: No hay efecto de tratamiento

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots \mu_B \quad (2)$$

Hipótesis alterna:

$$H_a : \text{No todos los tratamientos son iguales.} \quad (3)$$

Análisis de Varianza

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F
Tratamiento	7	45 517.5	6 502	2.93
Bloques	4	7 740	1 935	
Error	28	62 020	2 215	

Obteniéndose para dicho modelo una razón de varianza de $F = 2.93$ y una F crítica de 2.36 con $\alpha = 0.05$ por lo que se acepta la hipótesis alterna.

Bajo el mismo criterio estadístico se analizaron los grupos tratados y sus respectivos controles con las siguientes hipótesis.

Hipótesis nula: No hay efecto por tratamiento

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \dots \mu_{10} \quad (4)$$

Hipótesis alterna :

Ha : No todos los tratamientos
son iguales. (5)

Análisis de Varianza

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F
Tratamiento	4	267 832.4	66 958.1	-2.3
Bloques	4	263 997.4	65 999.3	
Error	16	-464 632.4	-29 039.5	

Análisis de Varianza

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F
Tratamiento	4	22 831.3	5 707.8	-4.5
Bloques	4	22 911.3	5 727.8	
Error	16	-20 191.3	-1 261.9	

Se obtuvieron los siguientes resultados con una -
de 0.05

	Protección	Curación
F crítica	3.01	3.01
R.V.	-4.52	-2.3

Por lo que se acepta la hipótesis nula en ambos casos.

Tabla No. VI Presencia de absceso en los grupos
en estudio y sus controles

	Tratamientos										
	AcP		NAcP		AcC		NAcC		CP	CC	T
	50	500	50	500	50	500	50	500			
Presencia de abscesos	1	4	3	2	6	2	3	6	4	5	36
Ausencia de abscesos	5	1	4	4	2	4	3	1	0	1	25
Total	6	5	7	6	8	6	6	7	4	6	61

Se plantea la hipótesis nula a probar:

H₀: No hay diferencia en las proporciones verdaderas de los animales que presentan el absceso bajo los distintos tratamientos.

$$H_0: P_{AcP_{50}} = P_{AcP_{500}} = P_{NAcP_{50}} = P_{NAcP_{500}} = \dots = P_{CC} = P_{CP} \quad (6)$$

Se calcula χ^2 por la fórmula de Brandt y Snedecor (9)

$$\chi^2 = \frac{\sum a_i p_i - \bar{p} \sum (a_i)}{\bar{p} \bar{q}} \quad (7)$$

donde a_i = número de animales con absceso bajo el tratamiento i-ésimo

$$\bar{p} = \frac{\text{Total con absceso } (\sum a_i)}{\text{Total de animales probados } (n)} = 0.5901 \quad (8)$$

$$\bar{q} = 1 - \bar{p} \quad (9)$$

$$= 1 - 0.5901 = 0.4099$$

$$\chi^2 = 16.72$$

χ^2 tablas con 9 G.L. y $\alpha = 0.05$ es de 16.919

Como χ^2 calculada es menor que χ^2 tablas la hipótesis nula se acepta

Tabla No. VII Presencia de amibas en los grupos en estudio y sus controles.

	TRATAMIENTOS										
	AcP		NAcP		AcC		NAcC		CP	CC	T
	50	500	50	500	50	500	50	500			
Presencia de amibas	1	4	2	2	2	2	3	4	3	4	27
Ausencia de amibas	5	1	5	4	6	4	3	3	1	2	34
Total	6	5	7	6	8	6	6	7	4	6	61

Se plantea la hipótesis nula a probar:

H₀: No hay diferencia en las proporciones verdaderas de los animales que presentan amibas bajo los diferentes tratamientos.

$$H_0: P_{AcP_{50}} = P_{AcP_{500}} = P_{NAcP_{50}} = P_{NAcP_{500}} = \dots = P_{CC} = P_{CP} \quad (10)$$

Se calcula χ^2 por la fórmula (7)

$$\chi^2 = \frac{14.466 - 11.934}{0.442 \times 0.558} = \frac{2.5326}{0.2466} = 10.268$$

χ^2 tablas con 9 G.L. y $\alpha = 0.05$ es de 16.919

Como χ^2 calculada es menor que χ^2 tablas se acepta la hipótesis nula.

Mediante un análisis puntual se encontró que existe una diferencia entre los grupos AcP_{50} y AcP_{500} , para verificar si esta diferencia era significativa se realizó una prueba de contingencia.

$$H_0: P_{AcP_{50}} = P_{AcP_{500}} \quad (11)$$

Grupo	AcP_{50}	AcP_{500}	Total
Amibas	1	4	5
No amibas	5	1	6
Total	6	5	11

Mediante la corrección de Yates

$$\chi^2 = \frac{N ((ad-bc) - 0.5 N)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)} \quad (12)$$

$$\chi^2 = 2.23$$

$$\chi^2_{0.975} = 5.02$$

Tabla No. VIII Alteraciones histopatológicas en hígados de hamsters, tratados en su control.

Grupo	Punción	Absceso	Amibas	Necrosis coagulativa ó basófila	Inflamación aguda	Macrófagos	Cápsula	Granulomas
A _c P ₅₀	6/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	7/8
A _c P ₅₀₀	5/6	4/6	4/6	3/6	4/6	4/6	4/6	4/6
NA _c P ₅₀	7/8	3/8	2/8	2/8	3/8	3/8	3/8	6/8
NA _c P ₅₀₀	6/6	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6	3/6
A _c C ₅₀	8/8	6/8	2/8	6/8	6/8	6/8	5/8	5/8
A _c C ₅₀₀	6/8	2/8	2/8	2/8	2/8	2/8	2/8	4/8
NA _c C ₅₀	6/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6	4/6
NA _c C ₅₀₀	7/8	6/8	4/8	6/8	6/8	6/8	6/8	4/8
CP	4/6	4/6	3/6	4/6	4/6	4/6	4/6	6/6
CC	6/6	5/6	4/6	5/6	5/6	5/6	4/6	4/6

10. D I S C U S I O N

El análisis químico preliminar demostró que la planta - contenía saponinas, azúcares, taninos y alcaloides, siendo - estos últimos una base importante para proseguir su estudio farmacológico ya que frecuentemente estas sustancias son ricas en principios con actividad terapéuticamente útil (48).

En el estudio "in vitro", como se aprecia en la tabla - No. III, los trofozoítos de E. histolytica cultivados en medio axénico, después de un tratamiento de dosis única y -- transcurridas 72 hrs. no mostraron alteraciones en su viabilidad y número. Sin embargo después de tres generaciones de 48 hrs. se observó una disminución en su número así como cambios morfológicos tales como vacoulización, redondes y lisis; ésto se dió tanto en los subcultivos de dosis única como en los de dosis repetida.

Con respecto a la eficacia para producir absceso hepático amibiano en los hamsters inoculados, en estudios realizados por Mattern, muestran que es posible hacerlo en un 95% - de los casos (34). Pero en este estudio solo se logró realizarlo en el 75% de los casos, debido probablemente al número de amibas y su viabilidad que no fue el adecuado, puesto que el sitio de la punción pudo determinarse en el 83% de los - animales y la presencia de amibas aproximadamente en el 50% de los mismos. Finalmente el 17% de los restantes especímenes en los cuales no se encontró evidencia de la punción hepática pudiera considerarse como falla del método, sin que ésto indique la ausencia de amibas, ya que se demostró la existencia de anticuerpos mediante ensayos serológicos. Por otra - parte, este último grupo no pudo ser valorado adecuadamente, debido a que no fue posible determinar lo que sucedió, es - decir, si hubo absceso y éste se resolvió o si nunca existió absceso.

Los extractos en estudio aparentemente no tienen actividad tóxica, puesto que al determinar la sobrevivencia de los animales presentados en la tabla No. IV, puede observarse que este parámetro fue similar en los grupos tratados y su control.

Para confirmar la presencia de E. histolytica en los hamsters se determinó el título de anticuerpos antiamiba mostrados en la tabla No. V, encontrándose estadísticamente que existían diferencias entre los grupos problemas pero no así entre estos y sus respectivos controles, lo cual era de esperarse ya que fueron animales sacrificados en diferentes períodos del estudio lo que indicó que todos habían estado bajo la presencia de E. histolytica.

Así mismo, mediante la determinación del análisis de χ^2 , para la presencia de absceso hepático amibiano, así como de amibas, se encontró que no existía diferencia significativa entre los grupos en estudio. No obstante por medio de un análisis puntual para el parámetro de presencia de amibas se encontró que existía diferencia entre los grupos de protección AcP₅₀ y AcP₅₀₀, por lo que se decidió realizar una prueba de contingencia para verificarlo, encontrándose que no había evidencia suficiente para rechazar la hipótesis de que ambos grupos eran iguales, sugiriendo sea aumentado el tamaño de la muestra.

Con lo que respecta a las alteraciones histopatológicas en los hígados de hamsters presentados en la tabla No. VIII, estas fueron las mismas para todos los grupos; el tipo de necrosis, su extensión, la presencia de trofozoítos de amibas, la respuesta inflamatoria periférica y la proliferación de fibroblastos. Tampoco fue posible observar diferencias en cuanto a la morfología de las amibas, su número y la respuesta del huésped.

El tipo de lesión histológica que se encontró en este estudio no difiere tampoco de los abscesos hepáticos amibianos reportados en otros estudios (42). Tanto la intensidad de la

respuesta inflamatoria como los componentes de la misma, especialmente la presencia de linfocitos y macrófagos estuvo en relación directa con la lesión hepática observada. Así mismo la proliferación de fibroblastos se encontró en todos los abscesos observados. Los granulomas en el tejido hepático representan un tipo de respuesta inespecífica a gran cantidad de agentes etiológicos (32). Entre estos E. histolytica es capaz de evocar una respuesta granulomatosa en el hígado (42). En 48 de los especímenes se observaron granulomas hepáticos. Se podría pensar que estos granulomas fueron provocados por infestación amibiana. Sin embargo cuando se compararon los especímenes que presentaron granulomas con la presencia de la punción, absceso, amibas, títulos de anticuerpos anti-amibas no existió ninguna correlación.

11. CONCLUSIONES

El estudio químico preliminar de la corteza del tallo del Colopahtle (Zanthoxylum liebmanniarum) demostró la presencia de saponinas, azúcares, teninos y alcaloides.

Se encontró un efecto amebicida en el extracto acuoso -- sobre el trofozoito de Entamoeba histolytica cepa HMI:IMSS en medio axénico después de tres subcultivos, sin que influyera - en que fuera a una dosis o a dosis repetida.

En el estudio "in vivo" se encontró:

- Ausencia de efecto tóxico de los extractos en las dosis empleadas.
- Los especímenes estudiados tuvieron en su organismo la - presencia de E. histolytica.
- No se encontró diferencia significativa entre los grupos tratados y el control, en los dos parámetros evaluados - (presencia de absceso hepático amibiano y amibas).
- Las lesiones encontradas no difieren histológicamente - entre los grupos problemas y su control, así como tampoco de los reportados en otros estudios (42).

Sin embargo aunque no se encontró efecto farmacológico de los extractos estudiados sobre el absceso hepático amibiano, - no se puede descartar la posibilidad de que exista una actividad intraluminal.

12. A N E X O

Reactivos para el análisis fitoquímico.

Reactivo de Mayer. Disolver 1.36 gr de cloruro de mercurio en 60 ml de agua y 5 gr de yoduro de potasio. Se mezclan las dos soluciones y se aforan a 100 ml de agua.

Reactivo de Hager. Se hace una solución saturada de ácido pícrico en agua.

Reactivo de Wagner. Se disuelven 12.7 gr de yodo y 20 gr de yoduro de potasio aforándolos a 1 L.

Reactivo de Dragendorff. 8 gr de subnitrito de bismuto se disuelven en 20 ml de ácido nítrico concentrado, en muy poca agua, se disuelven 22.7 gr de yoduro de potasio, se mezclan ambas soluciones, se decanta para separar los cristales de nitrato de potasio y se diluye con agua a 100 ml.

Reactivo de ácido silicotungstico. 12 gr se disuelven en 100 ml. de agua.

Reactivo de Rosenthaler. Un gramo de vainillina se diluye con etanol a 100 ml.

Aqua de Bromo. Solución saturada con vapores de bromo.

Cloruro férrico. Se prepara una solución al 1% en agua.

Reactivo de Guignard. 1 gr de carbonato de sodio más 100 mg de ácido pícrico se aforan a 100 ml de agua.

Reactivo de Fehling. Solución A: 3.5 gr de sulfato de cobre pentahidratado se diluyen a 50 ml de agua. Solución B: 17.5 gr de tartrato de sodio y potasio más 5 gr de hidróxido de sodio son llevados a 50 ml con agua.

Reactivo de Benedict. 17.3 gr de citrato de sodio, 10 gr de carbonato de sodio anhidro se disolvieron en 60 ml de agua, la cual se añade lentamente y agitando 1.73 gr de sulfato de cobre pentahidratado en 15 ml de agua la mezcla es aforada a 100 ml.

Reactivos para la determinación de proteína.-

Reactivo A. Mezclar las siguientes soluciones en el orden presentado y en una proporción de 100 : 1 : 1 .

Solución A₁. Carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio al 0.1 N

Solución A₂. Tartrato de sodio y potasio al 2% en agua.

Solución A₃. Sulfato de cobre pentahidratado al 1% en agua.

Reactivo B. Reactivo de Folin-Ciocalteu, disponible comercialmente.

Soluciones para la prueba de hemaglutinación.

Solución reguladora de fosfatos pH 6.4. Se mezclan 67.8 ml

de fosfato monobásico de potasio con 32.2 ml de fosfato dibásico de sodio ambas al 0.15 M más 100 ml de solución salina 0.85%

Solución reguladora de fosfatos pH 7.2. Se mezclan 24 ml de fosfato monobásico de potasio 0.15 M con 76 ml de fosfato dibásico de sodio 0.15 M más 100 ml de solución salina 0.85%

Acido tánico. Se prepara una solución stock al 1%, de ésta se toma 1 ml y se lleva a 200 ml con solución salina al 0.85% quedando una solución de trabajo con una concentración final de 1:20 000 de ácido tánico.

Glóbulos rojos de carnero. Se toman en forma estéril y son lavados tres veces con solución salina al 0.85%, se suspenden al 1.5% en PBS pH 7.2 para obtener una densidad óptica de 0.5 a 555 nm.

Suero normal de conejo. El suero es inactivado por 30 min. a 56º C.

13. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bohonos, N., Piersma, H. : Natural products in the pharmaceutical industry. Bro. Science 16: 706 (1966)
- 2.- Bondani, G. A. : La seguridad de un nuevo medicamento: estudios toxicológicos. Cemifar, México p. 7-10 (1982).
- 3.- Botero, D. : Simposium sobre el tratamiento de la amebiasis. En : Sepulveda, B., Diamond, L. eds : Memorias de la Conferencia Internacional sobre amebiasis. México: IMSS p. 849-850 (1976).
- 4.- Brandt, H., Tamayo, P. R. : Generalidades y frecuencia : Amebiasis. Ed. La Prensa Mexicana, México p. 8-12 (1970).
- 5.- Carl, F. T. : Virulencia de E. histolytica bajo continuos cultivos axénicos. Arch. Inv. Med. 13 (supl 3) 185 (1982).
- 6.- Carneri, I., Carnevali, C. : Achievements and obstacles in research for new antiamebic drugs. Arch. Inv. Med. 9 (Supl 1) : 381 (1978).
- 7.- Cheng, T. L. : General Parasitology. Ed. Academic Press. New York, p 216-217 (1973).
- 8.- Cornelius, C. E. : Animals models a neglected miqlical resource. N. Engl. J. Med. 281 : 934 (1969)
- 9.- Daniels, W. W. : Bioestadística. Ed. Limusa, México (1979)

- 10.- De la Torre, M. : Cambios morfológicos en el trofozoito de E. histolytica bajo el efecto de drogas antiamicibianas. Arch. Inv. Med. 2 (Supl 1) 187 (1971)
- 11.- Diamond, S. L., Harlow, R. D. : A new medium for the axenic cultivation of E. histolytica and other Entamoeba. Trans. of the Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg. 72, 4: 431-432 (1978).
- 12.- Diamond, S. L., Bartgis, L. I. : Axenic cultures for in vitro testing of drugs against E. histolytica. Arch. Inv. Med. 1 (Supl 2) : 339 (1971).
- 13.- Diamond, L. S. : Tecnicas of axenic cultivation of E. histolytica Schaudinn, 1903 and E. histolytica like amebas. J. Parasitol. 54 : 1047 (1968).
- 14.- Dominguez, X. A.: Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa, México (1973).
- 15.- Domínguez, X. A. : Las bases quaternarias de la racina de Zanthoxylum fagara. Phytochemical Reports. England 13 : 680 (1974).
- 16.- Dreyer, D. L.: Brenner, R. C. : Alkaloids of some Mexican Zanthoxylum species. Phytochemistry. 19:935-939 (1980).
- 17.- Espejo, O. : Estructura y actividad biológica del metro nidazol. En: Cartuña, N. C., ed.: Posibles fuentes de riesgo en el consumo de amebicidas y antihelmínticos. México : Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM p. 21-32 (1980).

- 18.- Estrada, L. E., Senties, N. A. : Las plantas medicinales del Valle de Tehuacán, Puebla. Resumen del Congreso Latinoamericano de Botánica. Lima, Perú (1982)
- 19.- Goldstein, A., Aronow, L. : Farmacología, Ed. Limusa México. (1979)
- 20.- Gosselin, R. : The status of natural products in the American pharmaceutical market. Lloydia. 25: 241 (1982)
- 21.- Graig, C. F., Faust, E. C.: Clinical parasitology, 5a. Ed., Ed. Lea and Fabiger, London p. 25-30 (1978)
- 22.- Grina, J. A. : Old and new alkaloids from Zanthoxylum arborescens. J. Org. Chem 47:2648-2651 (1982).
- 23.- Grina, J. A., Stermitz, F. R. : (2S,5S)-2,5-Dibenzyl-1,4-dimethylpiperazine, a novel alkaloid from Zanthoxylum arborescens. Tetrahedron Letters. 22(52):5257-5258 (1981).
- 24.- Harborne, J. B. : Phytochemical methods, 2o. ed., Ed. Chapman and Hall, London p. 1-3 (1984).
- 25.- Hernández, H., López, R.: Efectos del metronidazol sobre el absceso hepático amibiano del hamster. Arch. Inv. Med. 1 (Supl 1): 165 (1970).
- 26.- Irwing, S. : Drug screening and evaluative procedures. Science 136 : 123 (1962).
- 27.- Kreier, J. P. : Parasitic protozoa. New York: Academic Press, 2 : 455-489 (1978).

- 28.- Kumate, J., Gutiérrez, G. : Manual de infectología 6a. ed., Ediciones Médicas del Hospital Infantil - de México. p 56-65 (1978).
- 29.- Lichtfield, J. T. : Evaluation of the safety of new drugs by means of tests in animals. Clin. Pharmacol Ther. 3:665 (1962)
- 30.- Lichtfield, J. T. : Fore casting drug effects in man from studies in laboratory animals. J. Amer. Med. Ass. 177: 104-108 (1961)
- 31.- Litter, M. : Compendio de Farmacología, Ed. El Ateneo México p 644-663 (1972).
- 32.- MacSween, R. N. : Pathology of the liver. Churchill Livingstone: Edinburgh p 416-418 (1979)
- 33.- Martínez, M. : Las plantas medicinales de México. México: Ediciones Botas p 99-103 (1944).
- 34.- Mattern, C. F. : Virulence of Entamoeba histolytica upon continuous axenic cultivation. Arch. Inv. Med. 13 (Supl 3): 185-190 (1982).
- 35.- Nakamura, M. D. : Inmunopathology clinical laboratory Ed. Little Brown and Co. Boston p. 247-288 (1974).
- 36.- Powell, S. J. : Metronidazole in the treatment of amoebic liver abscess. Medice Today. 3:85 (1969)
- 37.- Powell, S. J. : Amoebiasis and metronidazole. Medicine Today. 13, 121 (1969).

- 38.- Price, J. : Antifertility agents of plant origin.
En: Austin, C. R. ed.: A symposium on agents affecting fertility. Boston Little, Brown and Co.
p. 3-17 (1965).
- 39.- Rivero, S. O. : Palabras pronunciadas en el noveno seminario sobre la amibiiasis. Arch. Inv. Med. 13 (Supl 3) : 5-7 (1982).
- 40.- Rodríguez, C. R., Rubio, P. C. : Vademecum académico de medicamentos. Tomo I Ed. Programa del libro de texto universitario. México (1984).
- 41.- Segura, J., López, R. : Inhibición de la síntesis de proteína por la emetina en cepas axénicas de E. histolytica y E. invadens. En: Sepulveda, B. Diamond, L., eds. : Memorias de la Conferencia Internacional sobre amibiiasis. México p. 112-119 (1976).
- 42.- Sepulveda, B. : La amibiiasis invasora por E. histolytica. Gaceta Médica de México. 100:201 254 (1970).
- 43.- Singh, B. N., Shri, A.K. : A reliable and reproducible method for testing direct acting amoebicides -- against axenic Entamoeba histolytica. Curr. Sci. 42 (22): 796 (1973).
- 44.- Taylor, A., Baker, J. : Methods of cultivating parasites in vitro. Ed. Academic Press, New York. p 1-29 (1978).
- 45.- Thompson, P. E. : Pharmacology of antiamebic drugs. Arch. Inv. Med. 1 (Supl 1): 165 (1970)

- 46.- Thompson, P.E. : Experimental amebiasis and chemotherapy
Arch. Inv. Med. Mex; 2 (Supl 1):245 (1971).
- 47.- Turner, R., Heborn, P. : Screening methods in Pharmacology. Ed. Academic Press. New York, (1965).
- 48.- Vázquez, J. : Exámen cuantitativo de la presencia de alcaloides en plantas colectadas en el Estado de Morelos, México. Ciencia 29(2): 139-150 (1974).
- 49.- Vinayak, V. K., Prakas, D. : A comparative evaluation of metronidazole and other amoebicidal drugs on the strains of Entamoeba histolytica. Ind. J. Med. Res. 57:841 (1969).
- 50.- Zbinden, G.: The problem of the toxicologic examination of drugs in animals and their safety in the man. Clin. Pharmacol. Therap. 5:537 (1964).