

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA



CERNIMIENTO DE EFECTOS FARMACOLÓGICOS DE *EYSENHARDTIA*  
*POLYSTACHYA* EN GATOS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**CLAUDIA LEDESMA CARRASCO**

Asesores:

MVZ MPA Dr C Carlos Gutiérrez Olvera.

MVZ M en C Dr C Lilia Gutiérrez Olvera.

México, D.F.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## DEDICATORIA

A mis padres, hermanos y amigos, por su gran apoyo y cariño que me han brindado a lo largo de toda mi vida.

A todos mis gatos (Garras, Uñas, Morris, Lipgen, Nina, Pancha, Iris, Argos, Azul, Rayitas y Winzig) que me han inspirado a estudiar Medicina Veterinaria y que con sus maullidos y travesuras me hacen esforzarme más para adquirir nuevos conocimientos.

## AGRADECIMIENTOS

A la MVZ Sara del Carmen Caballero Chacón jefa del departamento de Fisiología y Farmacología de la FMVZ, por haberme permitido hacer uso de las instalaciones y equipo del laboratorio 2317.

A mis asesores: Carlos Gutiérrez Olvera y Lilia Gutiérrez Olvera por encamíname en este primer paso en la investigación científica, brindándome su apoyo y comprensión durante este proceso.

A las doctoras MVZ Yazmín Alcalá Canto y MVZ Dinorah Vargas Estrada por su ayuda en el procesamiento de las muestras en el laboratorio.

Al Químico José Fausto Rivero Cruz por su asesoramiento y enseñanzas de las técnicas de análisis fitoquímico.

Al Becanet-superior de la SEP por haberme otorgado una beca de servicio social y de titulación.

A Mars® por haber donado croquetas Whiskas gatitos® y arena higiénica para gatos Catsan® durante las 5 semanas de la estancia de los gatitos en el experimento.

A Itzcoatl F. Aquino Díaz, Ivonne Lozano Vega y a otros amigos que me ayudaron a muestrear, dosificar y socializar a los gatitos.

A los 10 gatitos (Uno, Tito, Rayitas, Helios, Circe, Cascabel, Winzig, Concha, Botas y Güero) que utilicé para la realización de la parte de inmunoestimulación.

# CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
RESULTADOS.....	22
DISCUSIÓN.....	38
CONCLUSIONES.....	41
REFERENCIAS.....	42

## RESUMEN

LEDESMA CARRASCO CLAUDIA. Cernimiento de efectos farmacológicos de *Eysenhardtia polystachya* en gatos. (Bajo la dirección de: MVZ Carlos Gutiérrez Olvera y MVZ Lilia Gutiérrez Olvera).

La gran problemática que existe en la clínica de gatos, debida a la resistencia generada por microorganismos hacia los antibióticos, ha dado paso a la búsqueda de nuevas entidades terapéuticas, siendo una buena fuente de ellas las plantas. En el presente trabajo se evaluó dos de las propiedades terapéuticas que la medicina alternativa le atribuye sin estudios científicos a los extractos de *Eysenhardtia polystachya*; el efecto inmunoestimulante y antimicrobiano. Para la evaluación del efecto inmunoestimulante, se emplearon 10 gatos clínicamente sanos a los cuales se les midió a través de muestras sanguíneas los niveles de INF- $\gamma$  e IL-4 mediante RT-PCR, observándose que no existe estimulación en la producción de INF- $\gamma$  e IL-4 después de la administración del extracto de *Eysenhardtia polystachya* tanto vía oral como intravenosa.

En lo que respecta al efecto antimicrobiano, se utilizaron cultivos bacterianos derivados de *Staphylococcus aureus* (ATCC 9144), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Salmonella* spp (ATCC 35664) para llevar a cabo CMI empleando la técnica propuesta por Bennet *et al* dando como resultado un efecto inhibitor del crecimiento de *E. coli* y *Salmonella* spp. Sin embargo, para *Staphylococcus aureus* no existe tal efecto.

Se empleo la técnica de bioautografía para poder tener un acercamiento más preciso al componente antimicrobiano, el cual mostró que dicho compuesto es uno de los más polares que posee el extracto.

## **Cernimiento de efectos farmacológicos de *Eysenhardtia polystachya* en gatos.**

### **Introducción:**

En medicina veterinaria hace más de dos décadas que no se genera un grupo antibacteriano nuevo. La industria farmacéutica estima que para producir un antibacteriano novedoso y al menos igual o más potente que los ya existentes, se requiere una inversión cercana a los 100 millones de dólares y un periodo de investigación de 5 - 10 años.<sup>1</sup> Evidentemente, esto representa un capital de alto riesgo financiero. No es de extrañar entonces, que se haya perdido el interés de la industria farmacéutica veterinaria por la investigación y el desarrollo de nuevos antimicrobianos. Por lo tanto, a no ser que se logre controlar y/o desacelerar la aparición de cepas resistentes no existe otra forma de prolongar la vida de los medicamentos actuales, con lo cual es muy probable que se llegue a una importante falta de tratamientos eficaces contra algunos agentes patógenos.<sup>2, 3</sup> De tal suerte, es poco probable que en el corto o mediano plazo se genere un grupo de antibacterianos específicos en medicina veterinaria que iguale o supere la potencia de los ya existentes.<sup>1</sup>

La resistencia generada para los antimicrobianos en algunos casos deja muy pocas o casi ninguna alternativa terapéutica, lo cual ha dado paso a la búsqueda de nuevas entidades terapéuticas, siendo una buena fuente de ellas las plantas.<sup>4</sup> Las propiedades antibacterianas, inmunomoduladoras e inmunoestimulantes han sido demostradas en numerosos polisacáridos naturales aislados de hongos, levaduras, algas, bacterias, plantas superiores, así como en algunos derivados obtenidos por hidrólisis o modificación química ya sea de la raíz, tallo, hojas, frutos o semillas. Es importante el considerar la facilidad de acceso de los extractos vegetales utilizados, ya que en algunos casos se ha llegado a la deforestación en busca de paliativos para algunas enfermedades, por lo que dentro de la elección del extracto vegetal con propiedades inmunoestimulantes se

ha considerado a la familia de Fabaceae como producto de, relativamente fácil acceso y que ha demostrado poseer actividad inmunomoduladora.<sup>4, 5, 6</sup>

La *Eysenhardtia polystachya* es un arbusto con hojas alternas, pinnada-compuestas; flores pequeñas, blancas, aromáticas; frutos en legumbres, pequeñas y planas. Florece y fructifica en el verano.<sup>7</sup>

Durante largo tiempo se ha empleado en la medicina alternativa como paliativo o cura para diferentes enfermedades que aquejan a los seres humanos. Se han descrito las diferentes propiedades terapéuticas que posee, entre las cuales se encuentran: eliminar el ácido úrico, disminuir el reumatismo, artritis, lumbago, ciática, prevenir los cólicos hepáticos, eliminar problemas renales, suprimir diarreas, poseer un efecto diurético y bactericida. Aunque, es sumamente importante señalar que no existen estudios farmacológicos que confirmen la efectividad de la planta en todos estos casos.<sup>8,9</sup>

### Compuestos químicos de *Eysenhardtia polystachya*.

En el tallo de *Eysenhardtia polystachya* se han identificado los flavonoides dimetoxi-metilendioxi-pterocarpan y dehidrorotenona, el esteroil beta-sitosterol y un componente de estructura no determinada, el agustlegorretoside. En la corteza del tallo se han detectado los mismos componentes además del triterpeno beta-amirina. En el duramen el flavonoide hidrox-trimetoxi-isoflavona, y en la madera del tronco, los flavonoides coatline A y B y la cumarina flemichaparín C.<sup>8, 10, 11</sup>

### Flavonoides.

Los flavonoides comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las frutas y en los vegetales. Existen 13 subclases de flavonoides con un total de más de 5 000 compuestos.<sup>12, 13, 14</sup>

Los flavonoides poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales, inmunoestimulantes y antiasmáticas.<sup>12, 13, 14, 15</sup>

## Efecto antimicrobiano de los flavonoides.

Existen numerosas investigaciones, en donde se ha comprobado el efecto antimicrobiano de los flavonoides que contienen diversas plantas que se utilizan en la medicina alternativa. Sólo por mencionar algunos ejemplos, se tiene a los flavonoides que se encuentran en las hojas del guayabo (*psidium guajava l.*) que poseen un efecto contra *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.<sup>16, 17, 18</sup> Los flavonoides del orégano (*Lippia graveolens*) que tiene actividad contra *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*. Además de capacidad antifúngica contra *Cándida albicans*, *C. tropicalis*, *Torulopsis glabrata* y *Aspergillus níger*.<sup>19</sup> En la planta *Pluchea carolinensis* se han detectado flavonoides con actividad antimicrobiana en contra de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Trichophyton mentagrophytes*.<sup>20</sup> Y los flavonoides del vegetal *Lupinus ballianus* actúan contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* y *Klebsiella pneumoniae*.<sup>21</sup>

En varios casos se sabe que ciertos vegetales tienen actividad antimicrobiana debido a sus flavonoides, pero aún no se ha logrado identificar bien que flavonoide específicamente tiene efecto contra cada microorganismo.<sup>4</sup>

## *Salmonella*, *E. coli* y *Staphylococcus* como causantes de enfermedades en la clínica de gatos.

### ***Salmonella* spp.**

*Salmonella* spp. puede infectar a una gran variedad de mamíferos, aves, reptiles e insectos, conduciendo a una enfermedad gastrointestinal (GI), enfermedad

sistémica, o una infección asintomática. *Salmonella* spp. puede ser aislada en más de 18% de los gatos, aunque dos recientes estudios en 468 animales de compañía y gatos de refugio con y sin diarrea demostraron tasas de prevalencia de 1%. Las infecciones en el útero ocurren raramente, provocando abortos, mortinatos, y gatitos débiles. *Salmonella* es adquirida vía ingestión de heces infectadas, presas infectadas, comida, agua contaminada, aves migratorias y fómites contaminados. La terapia de glucocorticoides, obesidad y la administración oral de antibióticos prolongada los predispone a desarrollar infección por *Salmonella*. El periodo de incubación de *Salmonella* es de tres a cinco días, y la eliminación se produce durante un máximo de seis semanas, pero puede ocurrir más tarde como consecuencia de la reactivación de la infección. *Salmonella* puede existir por largos periodos en el medio ambiente y a menudo es resistente a desinfectantes comunes, por lo que es fuente potencial de infecciones hospitalarias.<sup>22, 23, 24</sup>

Los signos clínicos de salmonelosis felina incluyen gastroenteritis aguda o crónica, sepsis, enfermedad crónica febril sin signos gastrointestinales, o infecciones localizadas en los tejidos. Comúnmente los gatos no demuestran enfermedad clínica. Gatos con gastroenteritis aguda puede tener diarrea de leve a severa de intestino delgado o grueso, vómito, dolor abdominal, borborigmos, pérdida de peso y anorexia. Ocasionalmente, los gatos pueden demostrar sólo diarrea crónica. Gatos con sepsis pueden presentar pirexia o hipotermia, deshidratación, debilidad, depresión o shock séptico y puede o no ser acompañado de signos gastrointestinales.<sup>22, 23, 24</sup>

Las enfermedades relacionadas con *Salmonella* son más comunes en gatos jóvenes, estresados y/o enfermos en condiciones pobres de sanidad o en confinamiento. *Salmonella* es considerada una zoonosis de importancia. Individuos inmunocomprometidos deben evitar el contacto con los animales infectados.<sup>22,23</sup>

Existe un incremento en la resistencia contra antibióticos de las cepas de *Salmonella* en humanos y animales. La resistencia a ampicilina, fluoroquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, streptomycinas y sulfonamidas ha sido documentada.

Esta resistencia se debe en parte al resultado del uso indiscriminado de antibióticos.<sup>22,23</sup>

### ***Escherichia coli (E.coli).***

*Escherichia coli* es un bacilo gram negativo variablemente móvil que es huésped de la porción distal del tubo digestivo de diversas especies animales. Se han aislado varios serotipos diferentes de *E. coli*; se relaciona más a las cepas hemolíticas como más patógenas que las no hemolíticas. *E. coli* es relativamente persistente en el medio ambiente y la infección se suele producir por contaminación fecal.<sup>23, 25</sup>

La infección con *E. coli* puede causar un amplio espectro de signos clínicos en muy diversos órganos y tejidos. La infección de animales jóvenes con cepas enterotoxigénicas puede ocasionar una gastroenteritis grave. La septicemia de los gatitos recién nacidos resultante de una infección en el momento del parto puede provocar pielonefritis, neumonía o bacteremia generalizada. Los gatos inmunocomprometidos también son sensibles a la septicemia y a la enterocolitis provocadas por *E. coli*. En todos los gatos se pueden encontrar infecciones localizadas que incluyen pielonefritis, endometritis, abscesos cutáneos, colitis necrótica y endocarditis.<sup>22, 23, 24, 25</sup>

La elección de una determinada pauta de tratamiento depende tanto de los órganos o tejidos afectados como de la gravedad de la infección. La terapia antibiótica debe ser seleccionada en base al cultivo y a las pruebas de sensibilidad del aislamiento de *E. coli*. En general, los aislados más patógenos son sensibles a las cefalosporinas y a los aminoglucósidos.<sup>22, 23, 24</sup>

### ***Staphylococcus aureus.***

*Staphylococcus aureus* es un coco gram positivo, inmóvil, no forma esporas y es anaerobio facultativo. Es resistente a la deshidratación del medio ambiente por

semanas, al calentamiento hasta 60° C durante 30 minutos y a fluctuaciones de pH que van desde 4 a 9.5.<sup>26</sup>

El *Staphylococcus* se transmite por contacto directo e indirecto. En gatitos es raro que sea un agente primario de dermatitis, pero cuando se presenta como tal, se manifiesta usualmente con la aparición de costras y lesiones eritematosas alrededor de los cojinetes digitales y márgenes de los ojos y labios.

El *Staphylococcus* es un invasor secundario común en problemas cutáneos, incluyendo dermatitis alérgica, seborrea oleosa y seca, abrasiones y quemaduras. *Staphylococcus* está asociado a infecciones en diferentes sitios: piel (piodermas y abscesos), vías urinarias, hueso (osteomielitis), orofaringe, oídos (otitis externa), ojos (conjuntivitis) y útero (metritis).

Los *Staphylococcus* son inhibidos por tintes bacteriostáticos (por ej. cristal violeta), las sales biliares, desinfectantes como la clorhexidina, y muchos antibióticos.<sup>26</sup>

El tratamiento para los abscesos consiste en drenar la pus, y para las formas más superficiales de piodermas, es suficiente la aplicación de antisépticos tópicos (hexaclorofeno 3%). Cuando los procesos supurativos son inaccesibles o amplios, se requiere de un tratamiento sistémico.<sup>22, 26</sup>

Los *Staphylococcus* son comúnmente resistentes a las penicilinas, estreptomycinas y tetraciclinas. Por lo general, los antimicrobianos más eficaces son fluoroquinolonas, penicilinas resistentes a las betalactamasas, cloranfenicol, eritromicina, cefalosporinas (de primera generación), vancomicina, lincomicina y sulfas-trimetoprim.<sup>26</sup>

### Efecto inmunoestimulante de los flavonoides.

De acuerdo a hallazgos científicos publicados por la British Ecological Society's Functional Ecology (BESFE), existe una conexión directa entre el consumo de flavonoides y el aumento de la inmunidad en aves. Sin embargo, hasta hoy el mecanismo que influye en el fortalecimiento de sistema inmune no ha sido del todo esclarecido.<sup>15</sup>

Aquellas aves que consumieron extractos de flavonoides tuvieron una respuesta inmune mayor, medida por su producción de anticuerpos. De las que recibieron suplementos, el 54% tuvo una respuesta inmune favorable ante la inyección de eritrocitos de oveja, comparado con un 30% de respuesta en las que no recibieron suplemento.<sup>15</sup>

En otros estudios se menciona que al poseer efectos antioxidantes los flavonoides, protegen al sistema inmunitario de los radicales libres.<sup>15</sup>

Las células inmunitarias están relacionadas entre ellas a través de receptores de membrana. Las membranas celulares son ricas en ácidos grasos poliinsaturados, los cuales, si se peroxidan, ponen en peligro la integridad de la membrana, alterándose la fluidez de esta, pudiendo resultar una alteración de la señal intracelular y de la función celular.<sup>15, 27, 28, 29</sup>

### Interferón gama e interleucina L4.

Las citocinas son una familia de moléculas cuya función más conocida consiste en regular el funcionamiento del sistema inmunológico, poniendo en comunicación a los diferentes tipos de células que forman parte de él.<sup>30</sup>

Los interferones (INF) son citocinas antivirales que se clasifican en dos tipos (I y II). Se les llamó “interferones” debido a que en 1957, los virólogos ingleses Alick Isaacs y Jean Lindenmann descubrieron que las células de embrión de pollo infectadas con el virus de la influenza liberaban una sustancia que **interfería** con la acción del virus, protegiendo a las células sanas.

Diversos agentes pueden inducir la síntesis y secreción de INF. Los virus son más potentes inductores de la expresión de los genes de IFN. El estímulo principal para su producción parece ser la formación de ARN viral de doble cadena durante la replicación viral dentro de la célula. Por eso los virus ADN, por regla general, son inductores menos potentes de la síntesis de IFN que los virus ARN.<sup>30, 31</sup>

Las infecciones por bacterias (especialmente aquellas que se replican dentro de las células), micoplasmas y protozoos también pueden inducir la síntesis de IFN.<sup>30</sup>

Asimismo ciertas citoquinas y factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factores estimuladores de colonias (CSF-1), interleucinas 1 y 2 (IL-1, IL-2) y el factor de necrosis tumoral (TNF) pueden inducir síntesis de IFN. En ocasiones, incluso el IFN  $\beta$  puede inducir la producción de IFN  $\gamma$ .<sup>30,31</sup>

El interferón  $\gamma$  es producido por los linfocitos T, macrófagos y células asesinas naturales (NK por su denominación en inglés, natural killer).<sup>30,31</sup>

El principal efecto biológico del interferón  $\gamma$  es ser inmunoregulador en la respuesta inmune específica. El efecto del IFN $\gamma$  es pleiotrópico; no obstante, uno de los más importantes, es la activación de macrófagos, que consiste en aumentar su capacidad fagocítica y favorecer la inflamación mediante los siguientes procesos: incremento en la síntesis de intermediarios del oxígeno, aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias, producción de quimiocinas y aumento en la expresión de moléculas de histocompatibilidad clase dos (MHCII).<sup>30,31</sup>

La interleucina 4 (IL-4) es producida por linfocitos Th2, mastocitos, basófilos, células del estroma de la médula ósea. Es una citocina muy pleiotrópica. Promueve la diferenciación de linfocitos T vírgenes hacia células de tipo Th2, inhibiendo la generación de células Th1.<sup>31</sup>

Por otra parte, promueve el desarrollo de las respuestas inmunes humorales a través de la inducción del crecimiento y diferenciación de linfocitos B.<sup>31,32</sup>

Por otro lado, la interleucina-4 (IL-4) disminuye los niveles de IFN- $\gamma$  y por lo tanto induce una respuesta no protectora contra varios organismos intracelulares o células neoplásicas.<sup>31</sup>

### Enfermedades infecciosas más comunes de los gatos.

Los gatos pueden padecer diversas patologías infecciosas, las cuales son de gran importancia en la práctica clínica, debido a los diferentes niveles de gravedad de los signos que se presentan. En el cuadro 1 se muestra un resumen de las infecciones más comunes en los gatos como sus signos y tratamiento.

## Inmunoestimulación en gatos.

En la clínica de gatos se utilizan inmunomoduladores para favorecer la respuesta inmune y evitar infecciones oportunistas, en el caso de que padezcan enfermedades inmunodepresoras, tales como; Leucemia Viral Felina y Síndrome de Inmunodeficiencia Felina. Algunos de los medicamentos inmunomoduladores que se emplean son los interferones.<sup>32, 33, 34</sup>

### Interferones.

Existe diferentes interferones disponibles en el mercado, como por ejemplo; el Interferón alfa ( $INF\alpha$ ) y el interferón omega ( $INF\omega$ ).<sup>32, 34</sup>

El  **$INF\alpha$**  regula múltiples funciones, incluyendo la actividad antiviral, modulación inmune, diferenciación celular y supervivencia o muerte de varios tipos celulares. Al administrar el  $INF-\alpha$  a gatos infectados incrementa su actividad y apetito, por la resolución de las anomalías hematológicas. Además, prolonga la supervivencia de los gatos y ayuda en la lucha contra enfermedades oportunistas.<sup>32, 33</sup>

Cantidades pequeñas pero óptimas de interferón-  $\alpha$  pueden unirse a macrófagos, linfocitos u otras células de la mucosa que a su vez inician cascadas de citocinas.<sup>33</sup>

En la clínica se utiliza el interferón recombinante humano (rHuIFN- $\alpha$ ) y se comercializa con los siguientes nombres: Roferon® (ROCHE) e IntronA® (Shering Plough).<sup>32</sup>

La terapia con  $INF\alpha$  se debe basar en el avance y severidad de la enfermedad. En el caso del tratamiento a largo plazo de gatos con LVF y que sean considerados virémicos persistentes, o para pacientes con SIDAF, el protocolo consiste en administrar por vía oral cantidades muy pequeñas de interferón para que no se desarrolle resistencia al fármaco. El tiempo de desarrollo de resistencia es inversamente proporcional a la dosis de interferón recibida.<sup>32, 33, 34</sup>

El  **$INF-\omega$**  presentan actividad antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora. Es el primer  $INF$  veterinario, el cuál fue desarrollado para el tratamiento contra

calicivirus. En la práctica clínica se emplea en forma de interferón recombinante felino omega (rFeIFN- $\omega$ ), el cual en el mercado se encuentra con el nombre de Virbagen Omega® (Virbac).<sup>32, 34</sup>

A diferencia del rHuIFN- $\alpha$  el rFeIFN- $\omega$  al ser específico de especie es capaz de sobrepasar el problema de la creación de anticuerpos contra rFeIFN- $\omega$ .<sup>32, 34</sup>

In vitro, rFeIFN- $\omega$  ha demostrado un efecto antiviral contra varios virus como parvovirus, herpesvirus, calicivirus, coronavirus y rotavirus.<sup>34</sup>

En vivo, la eficacia de rFeIFN- $\omega$  en gatos con PIF, SIDAF, VLF y calicivirus felino también se ha informado.<sup>32, 34</sup>

Uno de los inconvenientes de utilizar INF es su costo elevado, aunado a la respuesta intermitente que se ha presentado en investigaciones, por lo que es necesario buscar otras alternativas que promuevan la inmunoestimulación a un menor costo, como podría ser el uso de derivados vegetales.<sup>4</sup>

**Cuadro 1: Enfermedades infecciosas más comunes de los gatos, signos y tratamiento.**

<b>Enfermedad</b>	<b>Etiología</b>	<b>Transmisión</b>	<b>Signos</b>	<b>Tratamiento</b>
Panleucopenia viral felina	Parvovirus	Directa - Horizontal y Vertical. Indirecta- (fómites y vectores).	Fiebre, diarrea, signos de inmunosupresión, ataxia, aborto, depresión, anorexia, vómito y signos de hipoplasia cerebelar.	Antibióticos (para tratar enteritis) Terapia de líquidos, vitaminas. <sup>35</sup>
Rinotraqueitis viral felina	Herpesvirus	Directa - Horizontal y Vertical. Indirecta (fómites y vectores),	Fiebre, secreción nasal, tos paroxística, conjuntivitis, quemosis, blefaroespasma, descarga ocular serosa, lesiones corneales, depresión, estomatitis ulcerativa, anorexia, deshidratación, debilidad.	Terapia de sostén, dietas con aroma penetrante, <sup>36</sup> mucolíticos, antibióticos.
Infección por calicivirus felino	Calicivirus	Directa – Horizontal	Dependiendo de la cepa: úlceras orales y en fosas nasales, fiebre, anorexia, depresión, edema cutáneo, signos respiratorios inferiores.	Terapia de sostén, dietas palatables, fármacos mucolíticos, antibióticos. <sup>37</sup>
Leucemia viral felina (LVF)	Retrovirus	Directa - Horizontal y Vertical	Inmunosupresión, linfoma, fiebre, enteritis crónica, depresión, anorexia, disnea, vómito, neuropatías periféricas, trastornos de la reproducción y muchos otros.	Terapia de sostén, terapia antirretroviral, terapia inmunomoduladora y antibióticos. <sup>38</sup>

Peritonitis infecciosa felina (PIF).	Coronavirus	Directa – Horizontal Indirecta (fómites y vectores) Mutación de coronavirus entérico	Forma húmeda: distensión abdominal por derrame torácico y disnea por efusión pleural.  Forma seca: dolor abdominal, masas abdominales palpables (lesiones piogranulomatosas). Además puede existir fiebre, letargo, anorexia y pérdida de peso.	Inmunodepresores, antibióticos de amplio espectro, terapia de sostén y terapia inmunomoduladora. <sup>39</sup>
Síndrome de Inmunodeficiencia Felina (SIDAF).	Retrovirus lentivirus	Directa - Horizontal y Vertical	Signos relacionados a inmunodeficiencia, gingivostomatitis crónica, rinitis crónica, linfadenopatías, pérdida de peso y muchos otros.	Terapia de sostén, terapia antirretroviral, terapia inmunomoduladora y antibióticos. <sup>40</sup>
Toxoplasmosis	<i>Toxoplasma gondii</i>	Directa - Horizontal y Vertical Indirecta	Fiebre de 40- 41.1 °C, signos de neumonía intersticial y alveolar acompañada de disnea y a veces tos. Diarrea sanguinolenta, deshidratación, dolor abdominal, anorexia, depresión, aborto, ictericia. Signos nerviosos, uveítis y otros signos oculares.	Dependiendo de la fase de la enfermedad: Sulfadiazina, pirimetamina, clindamicina. <sup>22, 23, 24</sup>
Neumonitis felina	<i>Chlamydomphila felis</i>	Directa – Horizontal	Blefaroespasmos, congestión, quemosis e incremento en el lagrimeo, fiebre transitoria, inapetencia, pérdida de peso, descarga nasal, secreción ocular de serosa a mucopurulenta, neumonía.	Tetraciclinas Doxiciclina. <sup>41</sup>

## **Justificación:**

Las infecciones en los gatos son importantes desde el punto de vista clínico, económico y zoonótico, por lo tanto, es necesario contar con alternativas más efectivas para el tratamiento y prevención de la enfermedad clínica, como por ejemplo la fitoterapia, la cual permite reducir y retardar la aparición de resistencias, evitar los tratamientos masivos y disminuir la necesidad de utilizar agentes quimioterapéuticos con costos elevados, además de ser productos biodegradables.<sup>3, 4</sup>

## **Objetivo General:**

Evaluar el efecto farmacológico de la *Eysenhardtia polystachya* sobre: el perfil inmunológico (INF $\gamma$  e IL-4) en gatos sanos y efecto bactericida *in vitro* sobre microorganismos que pueden llegar afectar a los gatos, tales como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.

## **Objetivos específicos:**

- Evaluación de la administración de un extracto de *Eysenhardtia polystachya* por vía intravenosa sobre: el perfil inmunológico (INF $\gamma$  e IL-4) en gatos sanos.
- Evaluación de la administración de un extracto de *Eysenhardtia polystachya* por vía oral sobre: el perfil inmunológico (INF $\gamma$  e IL-4) en gatos sanos.
- Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana y concentraciones mínimas inhibitorias de extractos de *Eysenhardtia polystachya* sobre microorganismos que pueden llegar afectar a los gatos, tales como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.

## **Hipótesis:**

La *Eysenhardtia polystachya* presenta actividad estimulante sobre el perfil inmunológico (interferón  $\gamma$  en gatos) y actividad antibacteriana *in vitro* sobre microorganismos que pueden llegar afectar a los gatos, tales como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.

## **Material y métodos:**

### Animales.

Se utilizaron 10 gatos clínicamente sanos, a los cuales se les realizó un hemograma y un examen físico general completo (frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, pulso, palmo percusión, tiempo de llenado capilar, reflejo tusígeno, reflejo deglutorio, palpación abdominal, estado de consciencia y temperatura) previo al estudio.

Todos los gatos fueron desparasitados al llegar a las instalaciones con oxibendazol y niclosamida (Vitaminthe reforzado®) a una dosis de 1mL por cada 2Kg de peso vía oral y fipronil 0.25%(Frontline® Spray) vía cutánea. A los 10 gatos se les realizó la prueba SNAP® Triple Felino (Leucemia, SIDA, Dilofilariasis) del laboratorio IDEXX. Resultando los 10 gatos negativos para las tres enfermedades.

Los gatos contaron con edades de 1 a 2 meses y con un peso promedio de 794 gr. Estos animales fueron prestados con la autorización por escrito de sus propietarios durante 5 semanas para mantenerlos en un mismo medio ambiente, y así, evitar posibles factores que interfirieran en los resultados.

Se dio una semana de adaptación antes de comenzar con la toma de muestras sanguíneas y dosificación de los gatos.

### Consideraciones de alojamiento.

El alojamiento de los animales se adecuó a lo especificado por Loveridge en su documento “Comfortable Environmentally Enriched Housing For Domestic Cats”. Se utilizó un cuarto con las dimensiones necesarias para proporcionar a cada gato su espacio vital, el cual según “El Centro Waltham de Nutrición para Mascotas”, debe de ser de 1.0 m<sup>2</sup> por animal, más espacio en niveles superiores de por lo menos 2.0 m de altura.<sup>42</sup>

En la figura 1, se observa que el cuarto fue provisto de lo necesario para el bienestar de los gatos, los cuales contaron con espacios para esconderse, rascaderas, repisas alfombradas, hamacas y juguetes adecuados para gatos. Se colocarán 11 areneros, 10 platos de comida y 10 platos para agua<sup>43</sup>. El alimento que se ofreció fueron croquetas para gatitos y se dio de forma *ad libitum* al igual que el agua.



Figura 1.- Alojamiento de los gatos.

Los gatos fueron socializados diariamente, ofreciendo periodos de juego en conjunto e individual.

### Preparación del extracto de *Eysenhardtia polystachya*.

Se pesaron 100 g de tronco de *Eysenhardtia polystachya* previamente identificada por un etnobotánico para confirmar que era *Eysenhardtia polystachya* y se hirvió durante 10 minutos en 1000 mL en agua bidestilada posteriormente se adicionó 1000 mL de alcohol etílico, se evaporó en un rotavapor durante un día hasta obtener una pasta de aproximadamente 4 gr, esta se reconstituyó en 10 mL de agua inyectable. Finalmente, el líquido obtenido se pasó por filtros de esterilización (0.45 micras).

### Tratamiento.

Se formaron dos grupos de 5 gatos cada uno, los cuales fueron asignados de forma aleatoria.

El grupo "A" se dosificó con el extracto de *Eysenhardtia polystachya* por vía oral una dosis de 3 mL cada 24 hrs durante 7 días consecutivos.

El grupo "B" se dosificó con el extracto de *Eysenhardtia polystachya* por vía intravenosa a través de la vena cefálica una dosis de 1 mL cada 24 hrs durante 3 días consecutivos.

### Manejo de los gatos.

Para realizar la administración del extracto y la obtención de sangre, se utilizó un bozal para gatos del número 1, así como una toalla de baño para evitar el forcejeo y minimizar el estrés a los gatos.

### Muestreo.

Durante el quinto día de la semana de adaptación se les tomó 1 mL de sangre con tubos al vacío (Vacutainer®) con heparina para utilizarla como muestra basal, a través de la vena yugular.

Los siguientes muestreos se realizaron los siguientes días: 3, 8, 16 y 30 de iniciada la dosificación. Cuya cantidad en cada toma fue de 1 mL para la cuantificación de interleucina- 4 e interferón  $\gamma$ .

Las muestras sanguíneas fueron conservadas en refrigeración hasta el momento de su análisis.

### Procesamiento de las muestras.

#### **1) Muestras para cuantificación de interleucina- 4 (IL-4) e interferón (IFN- $\gamma$ ).**

En este estudio se incluyeron iniciadores (oligonucleótidos) específicos de gato para estas citocinas <sup>29</sup>.

a) Se extrajo el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de las células mediante el kit comercial QIA amp<sup>®</sup> RNA Blood Mini Kit, QIAGEN y se calculó su concentración y pureza midiendo las densidades ópticas con un espectrofotómetro a 260 y 280 nm. A partir del ARNm extraído, se obtuvo el ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) mediante Superscript<sup>™</sup> III First-strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) y se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa de fase reversa (RT-PCR) para determinar en este caso la expresión de cada uno de los genes de las citocinas. <sup>29</sup>

b) Se uso el Gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) como gen constitutivo que se expresa siempre independientemente de las circunstancias como testigo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y para poder cuantificar el nivel de expresión de las citocinas (IL-4 e IFN- $\gamma$ ). <sup>29</sup>

#### **2) Método microbiológico.**

La evaluación del efecto bactericida se hizo de forma indirecta utilizando cultivos bacterianos derivados de cepas ATCC (*American Type Culture Collection*): *Staphylococcus aureus* (ATCC 9144), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y

*Salmonella* spp (ATCC 35664) para realizar evaluaciones de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) a diversas concentraciones de la *Eysenhardtia polystachya* empleando la técnica de difusión en placa propuesta por Bennet *et al*  
44

a) Agares:

El agar que se utilizó fue Mac Conkey (Bixon) para las enterobacterias y agar sangre (Bixon) para *Staphylococcus aureus*, preparados siguiendo las indicaciones que marca el producto.

b) Cultivo bacteriano:

Se manejaron las cepas bacterianas derivadas de ATCC anteriormente mencionadas.

c) Estándar bacteriano:

Se sembraron las bacterias de la cepa a utilizar en caja petrí (24 horas antes a temperatura 37° C) y estandarizaron a un porcentaje de transmitancia del 60-70% en un volumen de 5 mL de agua bidestilada y estéril.

d) Preparación de las placas:

En un refractario tipo Pirex® de 21 X 20 cm, estéril, se colocaron 400 mL de agar y se dejaron enfriar durante 10 minutos. Sobre el agar ya frío se agregaron 400 µL de la bacteria ya estandarizada y por medio de un hisopo estéril se distribuyó homogéneamente sobre todo el agar, dejando reposar la placa de agar a temperatura ambiente por 2 horas.

e) Preparación del “extracto primario”:

Se pesaron 100 gr de tronco de *Eysenhardtia polystachya* y se hirvieron durante 10 minutos en 1000 mL de agua bidestilada.

f) Obtención del “extracto secundario”:

Con el fin de evaluar la potencia que puede presentar el “extracto secundario” dependiendo de su manejo, se hizo su procesamiento de cuatro distintas formas: 1) concentración del “extracto primario” en el rotavapor con vacío, 2) filtración del “extracto primario” con poros de 0.04 micras, 3) exposición del “extracto primario” a luz ultravioleta durante 30 minutos y 4) extracto primario reposado por 24 hrs.

g) Preparación de las diluciones:

Se realizaron a partir del “extracto secundario” diluciones que dieron como resultado diferentes concentraciones (véase cuadro 2).

**Cuadro 2: Concentración de *Eysenhardtia polystachya* en las diferentes diluciones que se emplearon.**

Dilución	Concentración
1/1	100 mg/mL
½	50 mg/mL
1/3	25 mg/ mL
¼	12.5 mg/mL
1/5	6.25 mg/mL

h) Elección del método de difusión del extracto vegetal secundario en el agar:

Para la evaluación de la difusión del extracto vegetal en el agar se utilizaron diferentes métodos: 1.- penicilindros, 2.- cilindros de polipropileno, 3.- pozos directo en el agar y 4.- sensidiscos.

Se realizaron 12 repeticiones por cada método utilizando cultivos bacterianos de *Escherichia coli* (ATCC 25922) para demostrar los halos de inhibición de crecimiento.

i) Lectura de la placa:

Una vez preparada la placa y elegido un método (penicilindros, cilindros de polipropileno, pozos directo en el agar o sensidiscos) para el depósito de 100  $\mu$ L de cada una de las diluciones, se realizaron 10 repeticiones de cada dilución.

Se incubaron durante 24 horas a 37°C. Transcurridas las 24 horas se realizaron las lecturas de milímetros de halo de inhibición.

j) Estabilidad del extracto vegetal:

Se elaboró un “extracto secundario” y a partir de él se evaluó a los 0, 10, 15 y 20 días, manteniéndolo en refrigeración con el fin de determinar su estabilidad.

k) Procesamiento de las lecturas de los halos de inhibición:

Se obtuvieron medias y desviaciones estándar del diámetro de halo de inhibición de cada una de las diluciones. A partir de las cuales y con ayuda de los programas Microcal Origin y Excel se realizaron las gráficas de milímetros de halo de inhibición vs concentración.

L) Bioautografía:

Con el propósito de tener un acercamiento más preciso al componente antimicrobiano del extracto secundario de *Eysenhardtia polystachya*, se llevó a cabo en la Facultad de Química de la UNAM, bajo la supervisión del Químico

José Fausto Rivero Cruz\*, la técnica de autobiografía cubierta de agar o inmersión de bioautografía. La cuál se obtuvo al realizar una cromatografía de capa fina (en donde los compuestos se separaron por sus polaridades) y después encima de ella se aplicó el agar inoculado (con *E. coli*), se incubó durante 12 hrs a 37°C y se realizó la lectura de la misma.<sup>45</sup>

## **Resultados:**

### Efectos de *Eysenhardtia polystachya* sobre: el perfil inmunológico (interferón $\gamma$ e interleucina 4):

Después de haber procesado las muestras mediante la técnica de RT-PCR se observó que la aplicación de *Eysenhardtia polystachya* tanto vía oral e intravenosa no modificó el nivel de interferón  $\gamma$  e interleucina 4, manteniéndose ausente los niveles de estas dos citocinas durante el estudio. En las figuras 2 y 3, se muestran los resultados de la determinación de INF $\gamma$  e IL-4 mediante RT-PCR, en donde los números romanos representan los muestreos que se realizaron y los números arábigos representan a cada uno de los gatos muestreados, la "M" representa a los marcadores, "C<sup>+</sup>" al control positivo y "C<sup>-</sup>" al control negativo.

---

\* Facultad de Química de la UNAM, Conjunto E, Edificio de Bioquímica y Farmacia, Laboratorio 124, email: joserc@unam.mx

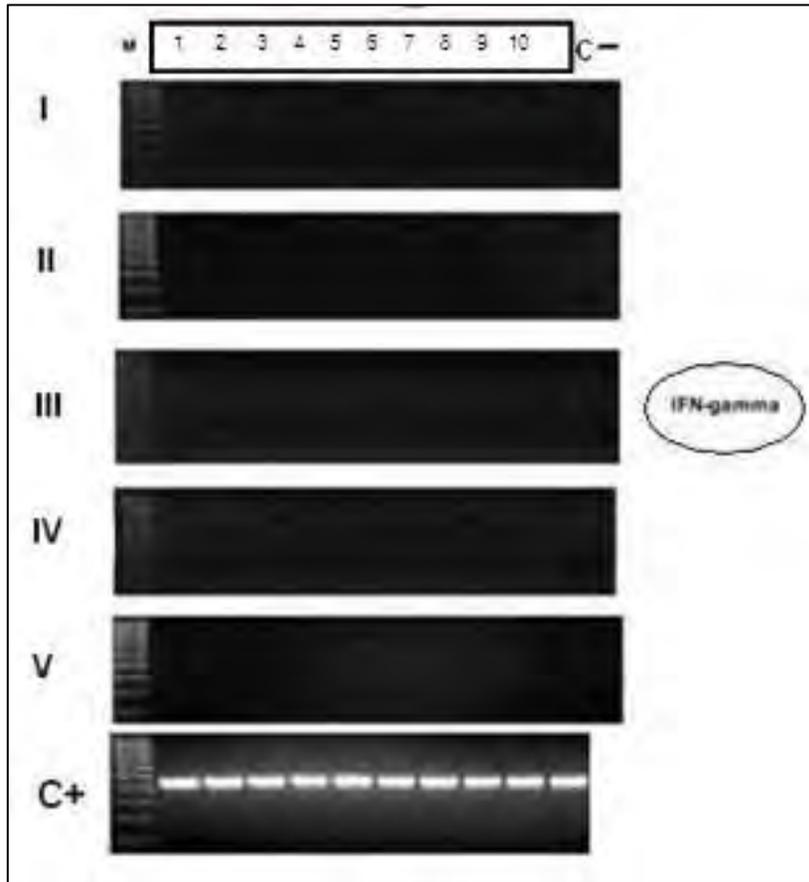


Figura 2.- Determinación de IFN $\gamma$  mediante RT-PCR.

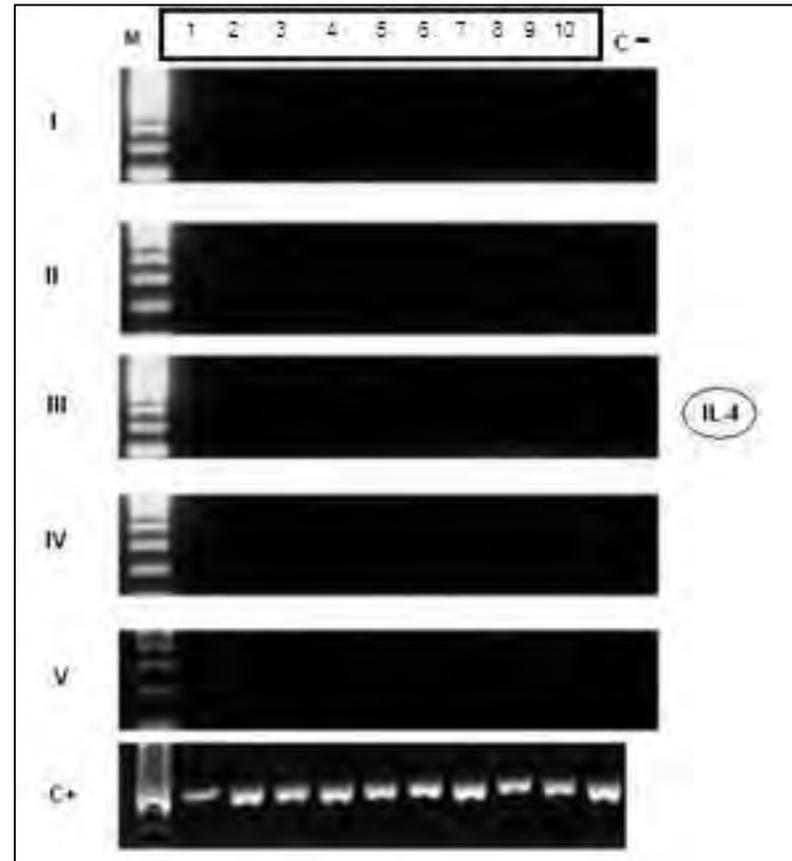


Figura 3.- Determinación de IL-4 mediante RT-PCR.

## Evaluación del efecto bactericida *in vitro*:

### 1) Difusión del extracto vegetal en el agar:

Se observó que el extracto vegetal difundía bien en los pozos hechos en el propio agar, mientras que en los cilindros de polipropileno y en los sensidiscos no existían halos de inhibición (véase figura 4).



Figura 4.- Prueba de difusión del extracto vegetal empleando sensidiscos, cilindros de polipropileno y pozos hechos en el propio agar.

En lo que respecta a los penicilindros se observó que los halos de inhibición se manifestaban en algunas repeticiones y en otras no. No se pudo determinar en este estudio si el extracto vegetal interactúa con el material del que está hecho el penicilindro (véase figura 5).

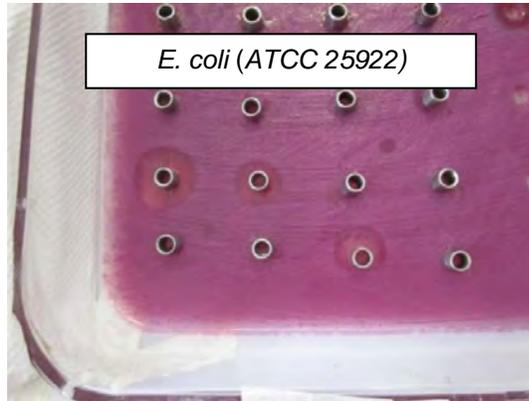


Figura 5.- Prueba de difusión de extracto vegetal utilizando penicilindros.

## 2) Estabilidad del extracto vegetal:

Se encontró en este estudio que los halos de inhibición de mayor diámetro (promedio: 24.97 con una desviación estándar: 0.74) se presentaron utilizando los “extractos secundarios” más recientes (Véase cuadro 3).

## 3) Potencia del “extracto secundario” manipulado por diversos métodos:

Al evaluar los extractos vegetales secundarios derivados de diferentes metodologías se observó que los que se obtuvieron mediante rotavapor con vacío y los que fueron filtrados formaban un halo de inhibición al utilizarlos en el agar sembrado con *E. coli* (ATCC 25922) (Véase cuadro 4).

**Cuadro 3: Promedios y desviaciones estándar del diámetro de los halos de inhibición en milímetros (mm) de cada uno de los extractos evaluados.**

Diámetro del halo de inhibición en milímetros.	Extracto de 0 días	Extracto de 10 días	Extracto de 15 días	Extracto de 20 días
	25,44	22,34	12,29	0
	24,53	20,76	12,67	0
	25,45	18,23	14,15	0
	24,43	21,96	13,46	0
	25,7	19,22	13,37	0
	24,02	22,01	11,87	0
	23,98	18,93	13,93	0
	24,71	21,24	12,74	0
	25,38	19,45	12,23	0
	26,13	20,62	11,51	0
Promedio	24,97	20,47	12,82	0
Desviación estándar	0,74	1,44	0,88	0

**Cuadro 4.- Cuatro diferentes tipos de procesamiento para obtener el extracto “secundario” y medias del halo de inhibición que se obtuvieron al emplearlos.**

Tipo procesamiento	Presencia de halo de inhibición.	Promedio en milímetro del halo de inhibición.	Desviación estándar.
Rotavapor con vacío	Si	24.86 mm	0.41
Filtrado	Si	25.06 mm	0.63
Reposado por 24 hrs.	No	0 mm	0
Expuesto a luz ultravioleta	No	0 mm	0

### Evaluaciones de concentraciones mínimas inhibitorias.

Teniendo en cuenta los tres factores que se estudiaron, se eligieron pozos hechos en el mismo agar para el depósito de la muestra, extracto vegetal de 0 y de 10 días, y que estuviera filtrado. Obteniéndose como resultado inhibición en el crecimiento de *E. coli* (véase cuadro 5 y 6) (Figura 6 y 7) y *Salmonella* spp. (véase cuadro 7 y 8) (Figura 8). Existiendo nulo efecto sobre *Staphylococcus aureus* (véase cuadro 9 y 10).

**Cuadro 5.- Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición de crecimiento de *E. coli* (ATCC 25922) empleando extracto vegetal secundario de 10 días de elaborado.**

Repetición	Diluciones			
	1/1	½	1/3	¼
1	13.69	8.72	0	0
2	16.67	8.39	0	0
3	14.15	6.99	0	0
4	13.46	6.82	0	0
5	13.67	7.02	0	0
6	15.45	6.23	0	0
7	12.99	9.01	0	0
8	13.87	7.34	0	0
9	14.04	7.86	0	0
10	13.85	8.08	0	0
<b>Promedio</b>	14.18	7.65	0	0
<b>Desvest</b>	1.08	0.91	0	0

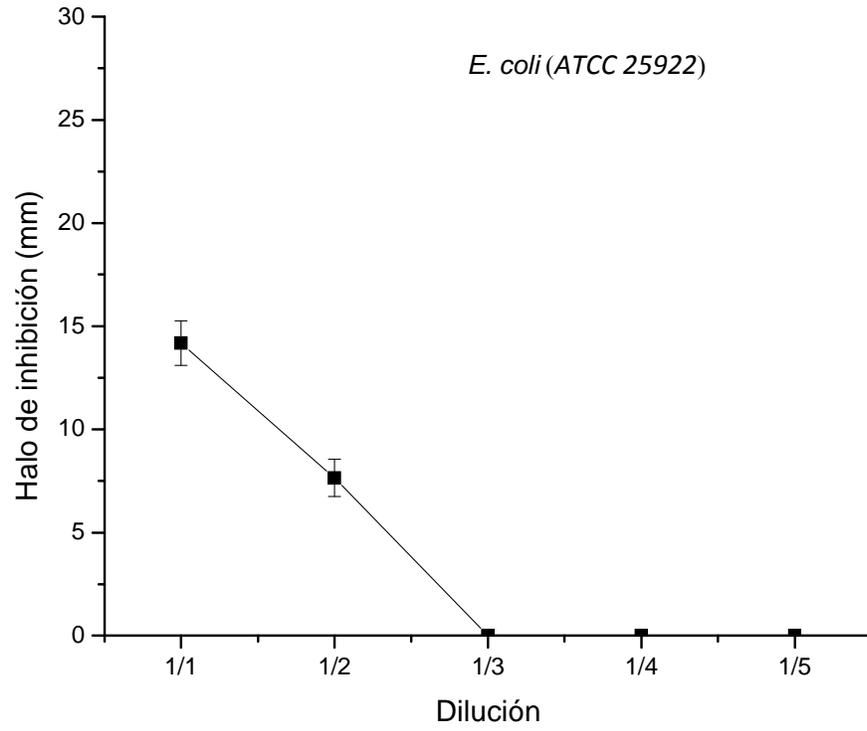


Figura 6.- Curva de actividad vs concentración del extracto secundario de 10 días de elaborado en *E. coli* (ATCC 25922).

**Cuadro 6.- Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición de crecimiento de *E. coli* (ATCC 25922) empleando extracto vegetal secundario recién de elaborado.**

Diluciones				
Repetición	1/1	½	1/3	¼
1	25.44	21.82	21.55	13.19
2	24.53	24.93	22.28	11.95
3	25.45	19.19	16.65	11.57
4	24.43	20.31	17.45	10.07
5	28.35	24.67	20.39	12.45
6	28.57	23.34	20.36	11.02
7	28.32	27.07	17.19	13.4
8	26.45	24.92	19.34	13.21
9	24.69	19.89	20.56	11.87
10	26.32	20.65	22.38	12.08
<b>Promedio</b>	26.26	22.68	19.82	12.08
<b>Desvest</b>	1.64	2.67	1.99	1.05

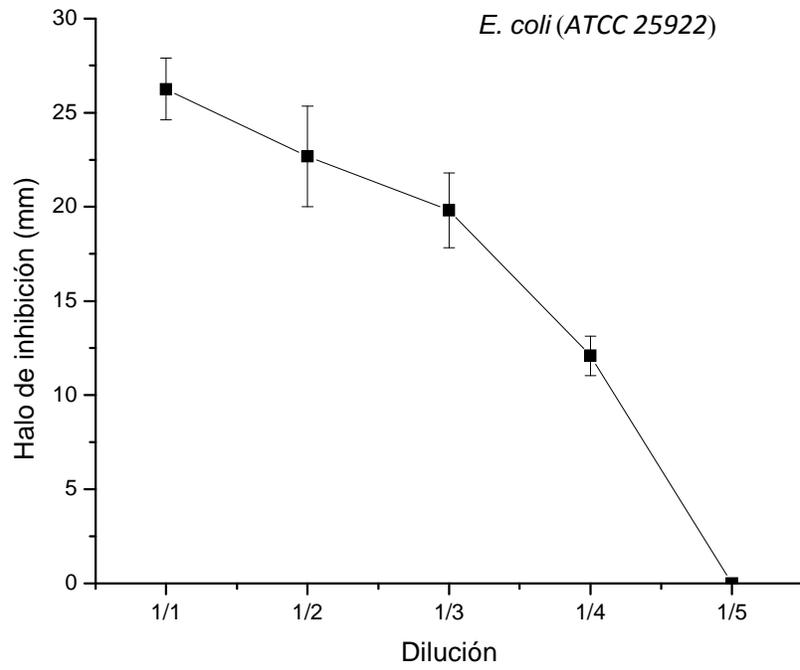


Figura 7.- Curva de actividad vs concentración del extracto secundario recién elaborado en *E. coli* (ATCC 25922)

**Cuadro 7.- Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición de crecimiento de *Salmonella* spp (ATCC 35664) empleando extracto vegetal secundario de 10 días de elaborado.**

Diluciones				
Repetición	1/1	1/2	1/3	1/4
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
<b>Promedio</b>	0	0	0	0
<b>Desvest</b>	0	0	0	0

**Cuadro 8.- Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición de crecimiento de *Salmonella* spp (ATCC 35664) empleando extracto vegetal secundario recién elaborado.**

Diluciones				
Repetición	1/1	½	1/3	1/4
1	24.17	18.16	16.52	7.06
2	24.83	18.99	15.26	7.59
3	24.32	19.56	14.25	6.95
4	22.8	17.97	14.51	8.05
5	22.05	19.45	10.57	8.13
6	21.85	19.12	12.72	6.84
7	22.59	18.59	14.4	7.04
8	23.42	17.82	15.92	7.92
9	24.04	17.85	14.82	6.85
10	24.18	18.83	15.83	7.32
<b>Promedio</b>	23.43	18.63	14.48	7.38
<b>Desvest</b>	1.04	0.66	1.74	0.51

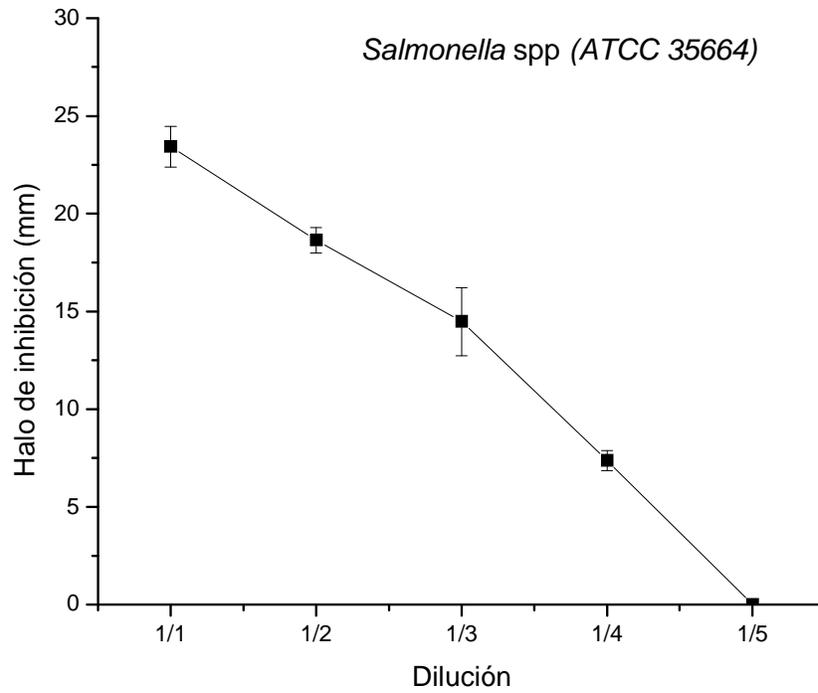


Figura 8.- Curva de actividad vs concentración del extracto vegetal secundario recién elaborado en *Salmonella* spp.

**Cuadro 9.- Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición de crecimiento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 11778) empleando extracto vegetal de 10 días de elaborado.**

Diluciones				
Repetición	1/1	½	1/3	1/4
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
<b>Promedio</b>	0	0	0	0
<b>Desvest</b>	0	0	0	0

**Cuadro 10.- Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición de crecimiento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 11778) empleando extracto vegetal recién elaborado.**

Diluciones				
Repetición	1/1	1/2	1/3	1/4
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
<b>Promedio</b>	0	0	0	0
<b>Desvest</b>	0	0	0	0

### Inmersión de bioautografía:

Después de haber realizado la técnica de bioautografía (véanse figuras 9, 10 y 11) se encontró que el componente con efecto antimicrobiano es uno de los compuestos más polares que posee el extracto vegetal secundario de *Eysenhardtia polystachya*.

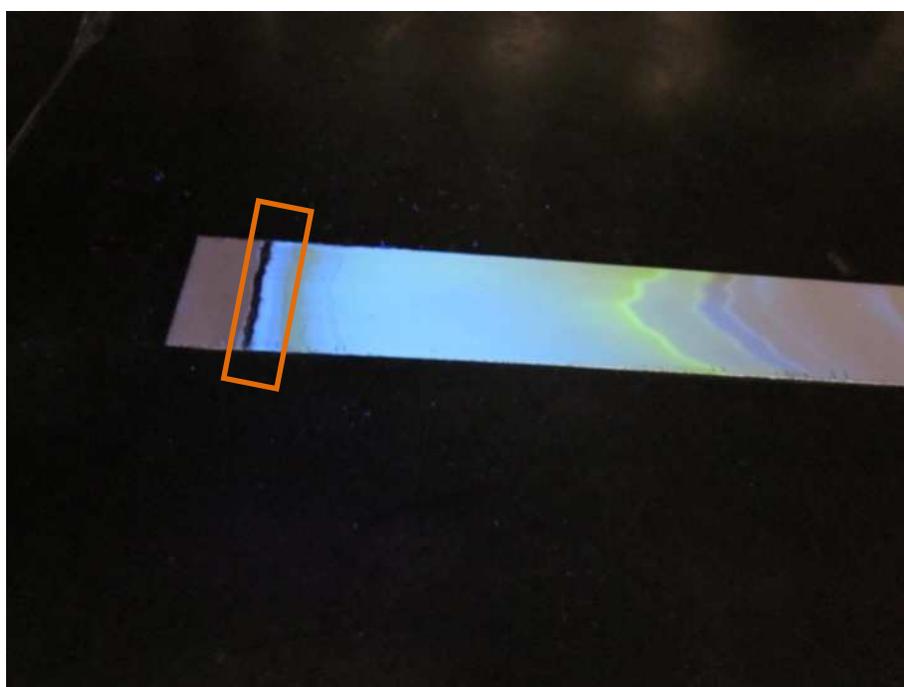


Figura 9.- Cromatografía de capa fina del extracto secundario de *Eysenhardtia polystachya*.  
La zona encerrada en el rectángulo naranja muestra el componente que posee efecto antimicrobiano.



Figura 10.- Técnica de inmersión de autobiografía del extracto secundario de *Eysenhardtia polystachya* empleando la bacteria *E. coli* (ATCC 25922). “A” corresponde al control positivo (donde no existe ningún agente antimicrobiano), “B” corresponde al extracto secundario de *Eysenhardtia polystachya*. El área dentro del rectángulo indica la zona de inhibición.



Figura 11.- Acercamiento a la zona de inhibición de crecimiento bacteriano de *E. coli*, provocado por el efecto antimicrobiano del extracto secundario de *Eysenhardtia polystachya*.

## Discusión:

El sobreuso, las subdosificaciones, la falta de bioequivalencia y una terapéutica inadecuada son parte de los principales factores en el surgimiento de bacterias resistentes, factores que llevan a la terapéutica actual a una ineficacia, surgiendo así un grave problema para el clínico de pequeñas especies. La investigación de inmunomoduladores está proporcionando un nuevo modelo de terapéutica veterinaria tanto para la prevención como el control de infecciones bacterianas, proporcionando a los animales una adecuada respuesta inmune previa a la infección, evitando así la colonización y por ende la disminución de enfermedades infectocontagiosa. Hecho que no solamente brinda un avance en la bioseguridad de los animales, sino que abre una nueva ventana a la terapéutica para el mejor control de problemas infectocontagiosos, disminuyendo el uso de antibacterianos, así como el surgimiento de resistencias bacterianas.<sup>1, 5</sup>

Como ya fue mencionado, se ha manejado información que indica la acción inmunomoduladora, inmunoestimulante y antimicrobiana de los flavonoides en diversas especies animales y humanos, sin embargo, no existen estudios que hablen de *Eysenhardtia polystachya* al respecto de todas estas propiedades, de ahí el interés de este estudio en probarlo en un modelo animal (gato).

Efecto inmunoestimulante y/o efecto inmunomodulador: los resultados obtenidos sobre la estimulación de la producción de INF- $\gamma$  e IL-4, no muestran la producción de estos. Por un lado, esto indica que los animales no estaban enfermos o por lo menos que no había infecciones virales, bacterias intracelulares o protozoarios, como mencionan Tizard y Pabello.<sup>30, 31</sup> También este resultado, muestra que el extracto vegetal no promueve una inmunoestimulación de estas citocinas, al menos en animales que se encuentran sanos, sin embargo habría que probarlos en animales enfermos ya que, en pollos de engorda y ovinos enfermos, se pudo observar un incremento del INF- $\gamma$  (comunicado de las doctoras Lilia Gutiérrez O. y Jazmín Alcalá C. \*\*), lo cual podría ser por un lado, una respuesta ante una

---

\*\* MVZ. Lilia Gutiérrez Olvera. Departamento de Fisiología y Farmacología, FMVZ, UNAM. email: liliago@servidor.unam.mx y MVZ. Yazmín Alcalá Canto. Departamento de parasitología. FMVZ. UNAM. email: yazmin@unam.mx "Comunicado personal" del día 08/05/10.

infección o que el extracto tenga un grado de actividad diferente según la especie.

Efecto antimicrobiano: los resultados demuestran que existe un efecto antimicrobiano del extracto sobre algunas especies bacterianas, entre las cuales se encuentran: *E. coli* y *Salmonella* spp. Sin embargo, en el caso de *Staphylococcus aureus* no tuvo tal efecto. Evidenciándose entonces, que el extracto tiene un efecto antimicrobiano sobre bacterias gram negativas. Posiblemente, el mecanismo de acción del extracto es el daño a la membrana celular bacteriana; teniendo propiedades tensoactivas el extracto, que alteran la arquitectura y la función de la membrana.<sup>46</sup> Sin embargo, para establecer el mecanismo de acción exacto hace falta evaluaciones a nivel microscopia electrónica y con marcadores específicos en posteriores estudios.

En general, las bacterias gram negativas tienen una pared celular delgada, que está cubierta por una membrana externa de lipopolisacáridos. Dicha membrana es susceptible a los efectos de agentes tensoactivos. Por su parte, las bacterias gram positivas, al poseer una pared celular gruesa, son más susceptibles a los antibióticos que tienen como mecanismo de acción la alteración de dicha pared; lo que resulta en una pared incompleta y en la pérdida de la permeabilidad selectiva de la bacteria, lo que provoca lisis de ésta.<sup>46</sup>

Se pudo observar que el efecto antimicrobiano depende mucho de la concentración del extracto secundario, del tiempo de elaboración, de su forma de obtención, y de factores ambientales, tales como la luz ultravioleta y la temperatura. Se observó que a mayor concentración del extracto secundario recién elaborado (100 mg/mL) el diámetro de inhibición microbiana era mayor y al irse reduciendo esta el efecto se perdía (6.25 mg/mL). Existió efecto cuando la forma de extracción fue mediante filtración y condensación con rotavapor, mientras que el extracto primario reposado y el extracto secundario expuesto a luz ultravioleta no tuvieron ningún efecto. La falta de acción del extracto primario reposado pudo deberse a que los metabolitos que poseen el efecto antimicrobiano, no se activan a menos de que se oxigenen, efecto que podría dar el rotavapor y la filtración, o también podría ser a causa de la interacción con partículas más grandes de las cuales se separa al momento de filtrar o ser

expuestas por la acción del rotavapor, sin embargo en este estudio no se puede confirmar ninguna de estas suposiciones por lo que se recomienda seguir haciendo estudios sobre estos componentes. En el caso de la falta de acción por la luz ultravioleta, podría deberse a que los flavonoides que contiene este extracto tienen como función en el vegetal protegerlo en contra de los radicales libres y de la acción oxidativa de las condiciones ambientales y los efectos nocivos de la luz ultravioleta, al ser expuesta a esta última están perdiendo su acción como menciona Tenorio *et al* en “Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿Pueden ser una alternativa terapéutica?”<sup>47</sup> en donde se describe este efecto protector ante el daño de la luz ultravioleta, sin embargo esto también se necesita estudiar más a detalle. Otros factores como la temperatura y el pH pudieron afectar también la actividad antimicrobiana, este efecto se ha demostrado en el aspecto de la utilización de los extractos de *Eysenhardtia polystachya* en el curtido de pieles en donde Salinas, *et al*<sup>48</sup> menciona que el calor sobre el extracto provoca la degradación de los compuestos y a medida que aumenta el tiempo de exposición de la muestra al calor, la concentración inicial de flavonoides disminuye hasta desaparecer. En cuanto al pH menciona, que los rangos de 0 a 8 no afectan al extracto, mientras que los rangos de pH de 9 a 14 degradan algunos o varios de sus componentes.

La autobiografía de este extracto fue de gran utilidad, ya que permitió determinar la polaridad del o los compuestos con actividad antimicrobiana<sup>45</sup>, lo cual va a permitir en posteriores estudios el aislamiento de dichos componentes. Lo que representa un paso importante en la identificación de nuevos antimicrobianos naturales. Como ya se mencionó, este o estos compuestos son polares, por lo que con la utilización de algunas técnicas del análisis fitoquímico (de extracción [soxhlets, arrastre de vapor, fluido supercrítico], de separación y purificación [Cromatografía] y de determinación estructural [espectrométricas, Rx, reacciones de coloración y de precipitación])<sup>4</sup>, podrían separarse del extracto secundario y probarse solos.

## Conclusiones.

Según los datos obtenidos en este estudio los extractos de *Eysenhardtia polystachya* no tienen efecto en la producción de INF- $\gamma$  e IL-4 en gatos sanos.

No existe efecto detrimental en la salud de gatos sanos, a los que se les administró vía oral e intravenosa, los extractos de *Eysenhardtia polystachya*.

*In vitro* los extractos de *Eysenhardtia polystachya* tienen un efecto inhibitor del crecimiento de cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp. Sin embargo, para el caso de *Staphylococcus aureus* este efecto no ocurre.

Es importante considerar la forma de extracción de los componentes de *Eysenhardtia polystachya*, ya que este determina que se obtenga efecto antimicrobiano a partir de su utilización.

La utilización de la bioautografía es una herramienta importante para la identificación de los componentes con actividad antimicrobiana de *Eysenhardtia polystachya*.

Es necesario llevar a cabo más investigaciones sobre el efecto inmunomediador y antimicrobiano de los extractos de *Eysenhardtia polystachya* en gatos. Sin embargo, sería importante trabajar con gatos enfermos para ver el desempeño de estos extractos.

Se requiere de más estudios sobre los extractos de *Eysenhardtia polystachya* y continuar trabajando con la separación e identificación de los diferentes compuestos de estos, para poder definir cuáles de ellos podrían ser utilizados en la medicina veterinaria, ya sea en el área farmacológica, inmunológica, nutricional, etc.

## Referencias.

1. - Baquero F, Blazquez J. Evolution of antibiotic resistance. TREE. 1997; 12: 482 - 486.
- 2.- Casadevall A, Scharff MD. Return to the past: the case for antibody-based therapies in infectious diseases. Clin Infect Dis. 1995; 21: 150- 161.
- 3.- Lenski RE. The cost of antibiotic resistance – from the perspective of the bacterium. In: Chadwick DJ and Goode J, editors. Antibiotic resistance: Origin, Evolution, Selection and Spread. Chichester: Wiley and Sons, 1997: 131 – 151.
- 4.- Lock O. Métodos de Estudios de Productos Naturales. Perú: Fondo Editorial, 1994.
- 5.- Wager H, Blandt S, Zgainski EM. Plant Drug Analysis Athin Layer Chromatography Atlas. Berlín: Heidelberg, 1994.
- 6.- Lock O. Análisis fotoquímico y metabolitos secundarios [página de Internet]. Perú: Pontifica Universidad Católica del Perú [descargado el 16 de Agosto de 2010; citado el 10 de Noviembre de 2010]. Disponible en: <http://www.maca-peruana.com/analisis.htm>
- 7.- Kelly LM, Delgado SA. Árboles de la UNAM [página de internet]. México: Instituto de Biología de la UNAM [descargado el 16 de Agosto de 2010; citado el 10 de Noviembre de 2010]. Disponible en: [http://www.arboles.org/paginas/eysenhardtia\\_polystachya.html](http://www.arboles.org/paginas/eysenhardtia_polystachya.html)
- 8.- Palo Dulce. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana [página de internet]. México: Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana [descargado el día 16 de Agosto de 2010; citado el 10 de Noviembre de 2010]. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7734>
- 9.- Mier OEJ, *et tal.* Actividad antimicrobina de los extractos de *Eysenhardtia polystachya texana*. Memorias del congreso nacional de ciencias de los alimentos; 2006 junio 1-2; Monterrey N.L. México. Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2006/ee-14-2006/documentos/Art76.pdf>

- 10.- Beltrami E, De Bernardi M, Fronza G, Mellerio G, Vidari G, Vita FP. Coatline A and B, two C-glucosyl- $\alpha$ -hydroxydihydrochalcones from *Eysenhardtia polystachya*. *Phytochemistry*. 2001(21):2931-2933.
- 11.- Burns DT, Dalgarno BG, Gargan PE, Grimshaw J. An isoflavone and a coumestan from *eysenhardtia polystachya*—Robert Boyle's fluorescent acid—base indicator. *Phytochemistry*. 2001(23):167-169.
- 12.- Escamilla JCI, Cuevas MEY, Guevara FJ. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*. 2009; 52(2):73-75.
- 13.- Pietta, PG. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* 2000; 63: 1035-1042.
- 14.- Pérez TG. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Bioméd.* 2003; (22): 48-57.
- 15.- Hughes, D.A. Effects of dietary antioxidants on the immune function of middle-aged adults. *P Nutr Soc.* 1999; 58: 79-84.
- 16.- Arima H, Ashida H, Danno G. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cerus* and *Salmonella enteritidis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002; 66: 1009 – 1014.
- 17.- Gnan S, Demello M. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous *Goiaba* extracts. *J Ethnopharmacol.* 1999; 68: 103-108.
- 18.- Viera RH, Rodriguez DP, Goncalves FA, Menezes FG, Aragao JS, Sousa OV. Microbicidal effect of medicinal plants extracts (*Psidium guajava* Linn. And *Carica papaya* Linn). Upon bacteria isolated from fish muscle and Known to induced diarrhea in children. *Rev Inst Med Trop.* 2001; 43: 145-148.
- 19.- Arcila LCC, *et al.* El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *ALAN.* 2004, 54 (1): 100- 111.
- 20.- Perea CWH, Gonzalez ML, Payo HAL. Metabolitos secundarios y actividad antimicrobiana de *Pluchea carolinensis*. *Rev Cubana Farm.* 2006; 40(2): 370-374.
- 21.- Fuertes RCM, Roque AM, Trisitan VM. Flavonoides y alcaloides de *Lupinus Ballianus* C.P. Smith con actividad antimicrobiana y antifúngica. *Cienc Technol.* 1998; 1 (2): 328 – 333.
- 22.- Crystal MA. Salmonellosis. In: Norsworthy GD, Crystal MA, Grace SF, Tilley LP, editors. *The feline patient*. USA: Blackwell Publishing, 2006: 267, 218, 268, 269, 292- 293, 310-311.

- 23.- Zoran DL. The cat with signs of chronic small bowel diarrhea. In: Rand J, editors. Problem-based Feline Medicine. EUA; 2006: 187, 206, 234, 293, 308, 440, 701-703, 719 – 720, 770 - 771.
- 24.- Lister A, Rand J. Nursing Common Diseases. In: Cannon M, Forster-van HM, editors. Feline medicine: a practical guide for veterinary nurses and technicians. EUA; 2006: 135-136, 140, 145, 154-155.
- 25.- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GD. Clinical Veterinary Microbiology. España: Mosby, 1994.
- 26.- Hirsh DC, Biberstein EL. Staphylococcus. In: Hirsh DC, Maclachlan NJ, Walker RL, editors. Veterinary microbiology. EUA; 2004: 153 – 158.
- 27.- Collado VM, Gómez-Lucía E, Miró G, Porrás R, Tejerizo G, Martín S, Doménech A. Comparación de la acción del IFN- $\alpha$  y el IFN- $\omega$  sobre células crónicamente infectadas por FeLV. *IX Congreso Nacional de Virología de la Sociedad Española de Virología (SEV); 2007 Abril 11-14; Zaragoza España. España, 2008: 199.*
- 28.- Steinfelder S, Lucius R, Greif F, Pogonka T .Treatment of mice with the anticoccidial drug Toltrazuril does not interfere with the development of a specific cellular intestinal immune response to *Eimeria falciformis*. Parasitol Res. 2005; 97: 458–465.
29. - Gelain ME, Meli M, Paltrinieri S. Whole blood cytokine profiles in cats infected by feline coronavirus and healthy non-FCoV infected specific pathogen-free cats. J Feline Med Surg. 2007; 8: 389- 399.
- 30.- Pabello GJA. Inmunología veterinaria. México: Manual Moderno, 2010.
- 31.- Tizar IR. Inmunología veterinaria. 6ta ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana, 2002.
- 32.- Collado VM, Gómez-Lucía E, Tejerizo G, Miró G, Escolar E, Martín S, Doménech A. Effect of type I interferons on the expression of feline leukemia virus. Vet Microbiol. 2007; 123: 180 - 186.
- 33.- Pedretti E, Passeri B, Amadori M, Isola P, Di Pede P, Telera A, Vescovini R, Quintavalla F, Pistello M. Low-dose interferón- $\alpha$  treatment for feline immunodeficiency virus infection. Vet Immunol Immunop. 2005; 109: 245 – 254.

- 34.- Paltrinieri S, Crippa A, Comerio T, Angioletti A, Roccabianca P. Evaluation of inflammation and immunity in cats with spontaneous parvovirus infection: Consequences of recombinant feline interferon  $\alpha$  administration. *Vet Immunol Immunop.* 2007; 118: 68- 74.
- 35.- Truyen U, Addie D, Belak S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, *et al.* Feline panleukopenia. ABCD guidelines on prevention and management. *JFMS.* 2009; 11(7): 538-546.
- 36.- Thiry E, Addie D, B elak S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, *et al.* Feline herpesvirus infection. ABCD guidelines on prevention and management. *JFMS.* 2009; 11 (7):547-555.
- 37.- Radford AD, Addie D, B elak S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, *et al.* Feline calicivirus infection. herpesvirus infection. ABCD guidelines on prevention and management. *JFMS.* 2009; 11 (7):556- 564.
- 38.- Lutz H, Addie D, Bel ak S, Boucraut- Baralon C, Egberink H, Frimus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, *et al.* Feline Leukemia. ABCD guidelines on prevention and management. *JFMS.* 2009; 11 (7): 565-574.
- 39 .- Addie D, Belak S, Boucraut- Baralon C, Egberink H, Frimus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, *et al.* Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management. *JFMS.* 2009; 11 (7):594 - 604.
- 40.- Hosie MJ, Addie D, Bel ak S, Boucraut- Baralon C, Egberink H, Frimus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, *et al.* Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. *JFMS;* 11 (7):575 – 584.
- 41.- Gruffydd-Jones T, Addie D, Bel ak S, Boucraut- Baralon C, Egberink H, Frimus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, *et al.* Chlamydomphila felis infection. ABCD guidelines on prevention and management. *JFMS.* 2009; 11 (7): 605 - 609.
- 42.- Loveridge G.G. Comfortable environmentally enriched housing for domestic cats, Comfortable Quarters for Laboratory Animals. 8<sup>th</sup> ed. Washington DC: Animal Welfare Institute, 1997.

- 43.- Manteca VX. *Etología clínica veterinaria del perro y del gato*. 3<sup>a</sup> ed. España: Multimédica, 2003.
- 44.- Elsheikh HA, Taha AAW, Khalafallah AI, Osman IAM. Disposition kinetics of enrofloxacin (Baytril 5%) in sheep and goats following intravenous and intramuscular injection using a microbiological assay. *Res Vet Sci* 2002; 73:125–129.
- 45.- Jiménez LRA. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. (tesis de maestría). (Bogotá D.C.) Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, 2008.
- 46.- Sumano LH, Ocampo CL. *Farmacología veterinaria*. 4<sup>a</sup> ed. México: Mc Graw Hill, 2006.
- 47.- Tenorio LFA, Del Valle ML, Pastelín HG. Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿Pueden ser una alternativa terapéutica? *Arch Cardiol Mex* 2006; 76 (Suppl 4): 23-45.
- 48.- Salinas HP, López BFJ, Morales AF, Rojas HA, Ramírez ST. Estabilidad de Extractos de Palo azul (*Eysenhardtia polystachya*). *Memorias del Congreso Nacional de Química Analítica*; 2006 Junio 27 -30; Acapulco (Guerrero) México. México (D.F): UAM, 2006: 232-237.