



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Efecto *in vitro* de la resina de *Gymnosperma glutinosum*
(Spreng.) Less. Sobre *Naegleria fowleri*.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA

MA. CONCEPCIÓN PEÑA JUÁREZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY

LOS REYES IZTACALA TLALNEPANTLA, EDO DE MÉX. 2009.



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.

AGRADECIMIENTOS

...“Cuando se tiene la dicha de vivir la vida que a mí me tocó, no se puede elegir con facilidad a quien agradecer el haber coexistido, el haber enriquecido algunos de aquellos momentos y decisiones más importantes de mi vida, pero lo que sí se puede hacer para no omitir a nadie, es el decir algo muy sencillo, algo muy especial y sobre todo muy difícil de olvidar que es para reflexionar, ¿qué hubiese sido de mí si no los hubiese conocido?, quien en su lugar hubiera aportado a mi vida todo lo que ustedes me han dado sin condición?, ...tal vez no fuera yo sin ustedes. Debo agradecerles, porque nadie puede superarse ni alcanzar sus metas solo, aislado del mundo, sin una familia, un amigo, un compañero, un buen maestro, , o simplemente alguien a quien confiarle sobre aquella decisión tan difícil de tomar.

Por eso y más, gracias a todos!.....”

Este trabajo no lo hubiese podido realizar, sin la generosa colaboración de muchas personas, a quienes expreso mi más sincero agradecimiento.

Quiero agradecer especialmente a la Dra. Leticia Moreno Fierros, por permitir que este trabajo se desarrollara en el laboratorio 9 de la UBIMED, de la FES Iztacala.

A mis padres, por infundirme la ética y la responsabilidad en cada una de las actividades de mi vida, gracias Mamá por estar conmigo en los momentos más difíciles, por tu apoyo incondicional.... “Te quiero mucho”.

A mi esposo y mis hijos Emilio y Braulio, por su paciencia, apoyo, comprensión y cariño, yo también los amo.

A mi hermana Julieta, gracias “Buru”, porque siempre me sacas de apuros.

A la Dra. Margarita Canales, por su apoyo incondicional, su gran conocimiento, por darme esta oportunidad y por creer en mí.

A mi querido Director de Tesis: Dr. Marco A. Rodríguez Monroy, por su paciencia, atención, dedicación, tolerancia y confianza, por su gran amistad y por transmitirme tantos conocimientos, mil gracias por estar conmigo en todo momento, por escucharme y por soportar a esta rebelde sin causa, gracias por hacer que mi regreso a la escuela valiera la pena. En el mundo hacen falta más personas como usted.

A los Conchiz; Alfredo Medina, Oscar Nieto, Ana Lilia García y Marco Rodríguez, por brindarme su amistad sin condiciones, sus consejos; por enseñarme que aún hay personas en el mundo en quien se puede confiar, por estar conmigo en las buenas y malas, por compartirme un poquito de sus conocimientos y por todos aquellos tan agradables momentos.

A Fredy; por ser un gran compañero y amigo

A Lety Verdín, gracias por sus conocimientos, apoyo y por ser como usted es.

DEDICATORIA

Mi vida, como la de tantas, ha dado muchas vueltas, he tropezado tantas veces, que ya perdí la cuenta, pero esta vez se con toda certeza que fue una muy buena decisión retomar lo que por tanto tiempo olvidé y ahora que ese gran paso es una realidad me quedo con el buen sabor de boca que esta experiencia me dejó y me llevo en la mente y el corazón el recuerdo de tantas cosas y personas que a lo largo de esta prueba conocí y que fungieron un papel importante en este momento a quienes dedico el esfuerzo, los desvelos, los ayunos y las largas horas de trabajo que me robó la vida para llegar al final de esta difícil prueba.

Con especial cariño dedico este trabajo y todo mi esfuerzo;

A mis hijos Emilio y Braulio, por ser mi orgullo, mi motor y lo más importante de mi vida,

A mi esposo Francisco, el mérito no solo es mío, tú estuviste conmigo hasta el final,

A mi Madre, esto es para ti con todo mi amor, que sería de mí sin ti,

A mi Padre, que me enseñó tantas cosas,

A mis guías durante este camino, Margarita y Marco, por su gran apoyo, son grandes personas.

CONTENIDO

CONTENIDO	i
ÍNDICE DE FIGURAS, Y CUADROS	3
FIGURAS	3
CUADROS	4
1 RESUMEN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2 INTRODUCCIÓN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.1 MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.2 ECOLOGÍA DE LAS AMIBAS DE VIDA LIBRE.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.3 UBICACIÓN TAXONÓMICA.	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
3 INFECCIONES POR AMIBAS DE VIDA LIBRE.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
3.1 <i>Naegleria</i>	
<i>fowleri</i>	¡Error! Marcador no
<i>definido.</i>	
4 INFECCIONES EN HUMANOS.	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
4.1 MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
4.2 CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
4.3 DIAGNÓSTICO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
5 ANTECEDENTES.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
6 JUSTIFICACIÓN.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
7 HIPÓTESIS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
8 OBJETIVOS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

8.1	OBJETIVO GENERAL.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
8.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
9	MATERIAL Y MÉTODO.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
9.1	RECURSOS BIOLÓGICOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
9.1.1	PLANTA.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
9.1.2	AMIBAS.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
9.1.3	RATONES.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
9.2	BIOENSAYOS PRELIMINARES.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
9.2.1	OBTENCIÓN DE LA RESINA DE LA PLANTA <i>Gymnosperma glutinosum</i> . <i>no definido.</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
9.2.2	CULTIVO DE LAS AMIBAS.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
9.2.3	REACTIVACIÓN DE VIRULENCIA.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
9.2.4	CURVA PATRON PARA LOS ENSAYOS DE VIABILIDAD DE LOS TROFOZOÍTOS DE <i>Naegleria fowleri</i> CON LA RESINA <i>Gymnosperma glutinosum</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
9.3	DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL (DL) Y LETAL MEDIA (DL ₅₀) DE LA RESINA DE <i>Gymnosperma glutinosum</i> SOBRE <i>Naegleria fowleri</i>	¡Error! Marcador no definido.
9.4	PRUEBA DE TOXICIDAD GENERAL: MÉTODO DE TOXICIDAD GENERAL (MCLAUGHLIN, 1991).	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
9.4.1	CONTROL NEGATIVO.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
9.4.2	CONTROL POSITIVO.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
9.4.3	INCUBACIÓN.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
9.4.4	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
10	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
10.1	OBTENCIÓN DE LA RESINA POR INMERSIÓN DE LA PLANTA EN CLOROFORMO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

10.2 REACTIVACIÓN DE VIRULENCIA DE LOS TROFOZOÍTOS DE *Naegleria fowleri*.....¡Error! Marcador no definido.

10.3 CURVA PATRÓN PARA LOS ENSAYOS DE VIABILIDAD DE LOS TROFOZOÍTOS DE *N. fowleri* CON LA RESINA DEG. *glutinosum*.....¡Error! Marcador no definido.

10.4 ENSAYO DEL EFECTO DE LA ANFOTERICINA B. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

10.5 ENSAYO DEL EFECTO DE LA RESINA DE *Gymnosperma glutinosum*, sobre la amiba *Naegleria fowleri*.....¡Error! Marcador no definido.

10.6 PRUEBA DE TOXICIDAD GENERAL..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

11 DISCUSIÓN¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

12 CONCLUSIONES¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

13 APÉNDICE I¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

13.1 FAMILIA ASTERACEAE ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

13.2 *Gymnosperma glutinosum* (*Spreng.*)Less. *Asteraceae*.....¡Error! Marcador no definido.

13.3 CLASIFICACION ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

13.4 ETNOBOTÁNICA Y ANTROPOLOGÍA ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

14 APÉNDICE II¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

14.1 MEDIO DE CULTIVO ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

MEDIO BACTOCASITONA AL 2%.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

14.2 SOLUCION DE PBS 10X..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

14.3 SOLUCION DE PBS 1X..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

15 BIBLIOGRAFÍA.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

ÍNDICE DE FIGURAS, Y CUADROS

FIGURAS

Figura 1. Trofozoíto de *Naegleria fowleri*.....¡Error! Marcador no definido.

Figura 2. Estadio flagelar de *Naegleria fowleri*.....¡Error! Marcador no definido.

Figura 3. Forma quística de *Naegleria fowleri*.....¡Error! Marcador no definido.

Figura 4. Obtención de cerebro para recuperación de amibas.....¡Error! Marcador no definido.

Figura 5. Placa de cultivo para centrifugar.....¡Error! Marcador no definido.

Figura 6. Curva patrón.....¡Error! Marcador no definido.

Figura 7. Microscopía electrónica de barrido de *N. fowleri*.....¡Error! Marcador no definido.

Figura 8. Actividad de la resina de *G. glutinosum* sobre la curva de crecimiento de *N. fowleri*.....¡Error! Marcador no definido.

Figura 9. Resultados de la prueba de toxicidad general.....¡Error! Marcador no definido.

Figura 10. *G. glutinosum* (*Spreng.*) *Less*.....¡Error! Marcador no definido.

CUADROS

Cuadro 1. Interpretación de la actividad tóxica general.....¡Error! Marcador no definido.

Cuadro 2. Rendimiento de la resina.....**¡Error! Marcador no definido.**

Cuadro 3. Sintomatología de la MEAP.....**¡Error! Marcador no definido.**

Cuadro 4. Dosis letal y letal media obtenidas en los ensayos de anfotericina B y *Gymnosperma glutinosum* sobre *Naegleria fowleri*.....**¡Error! Marcador no definido.**

Cuadro 5. Resultados del ensayo de toxicidad general y de la DL₅₀ de la resina de *Gymnosperma glutinosum*.....**¡Error! Marcador no definido.**

Cuadro 6. Actividad tóxica de la resina (DL₅₀ de la resina de *G. glutinosum* en el ensayo de toxicidad).....**¡Error! Marcador no definido.**

1 RESUMEN

Las amibas de vida libre (**AVL**) se encuentran en todo tipo de ambiente y su distribución es cosmopolita, ocupando un lugar importante en la cadena alimenticia y las comunidades naturales donde hay agua, alimentándose de bacterias, hongos, algas y otros protozoarios.

De las AVL solo un grupo muy pequeño de ellas produce enfermedades en animales y el hombre.

El interés médico sobre las AVL radica en que con el paso del tiempo han cobrado la vida de pocas personas, principalmente las AVL que habitan en medios acuáticos naturales o artificiales, de uso recreativo e industrial, provocando enfermedades en el ser humano

Naegleria fowleri es el agente causal de la meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP), que produce la muerte en un lapso de 3 a 7 días posteriores a su periodo de incubación.

En el presente trabajo se probó el efecto antiamebiano de la resina de la especie *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less., por ser una planta que tiene multiples usos en la medicina tradicional mexicana, empleada como antimicótico y antibacterial.

Se realizaron ensayos de viabilidad con amibas de la especie *Naegleria fowleri*, mediante la técnica de MTT, para posteriormente determinar las dosis letal (DL) y letal media (DL₅₀), del exudado resinoso de *G. glutinosum* sobre *N. fowleri*. Como medicamento de referencia se utilizó Anfotericina B. La actividad amebicida se determinó por medio del efecto de la resina sobre la curva de crecimiento de *N. fowleri*.

La dosis letal fue de 90µg/mL y la letal media de 62.5µg/mL. La resina de *G. glutinosum* resultó ser amebicida a una concentración de 90µg/mL.

La resina presentó una toxicidad media (444 μ g/mL) sobre las larvas Nauplio II de *Artemia salina*.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que el exudado resinoso de *G. Glutinosum* posee actividad antiamebiana sobre *N. fowleri*.

2 INTRODUCCIÓN

Las amibas de vida libre (**AVL**) se encuentran en todo tipo de ambiente y su distribución es cosmopolita, ocupando un lugar importante en la cadena alimenticia y las comunidades naturales donde hay agua, alimentándose de bacterias, hongos, algas y otros protozoarios (Wellings *et al.*, 1979; Pelczar *et al.*, 1982).

Las **AVL** se pueden encontrar en toda la biosfera incluyendo los casquetes polares, el suelo, el agua y la atmósfera (Rivera *et al.*, 1987a). Viven principalmente donde hay agua, pudiéndoseles encontrar en estanques, ríos, arroyos, lagos, piscinas, sistemas de tratamiento de agua residual, corrientes subterráneas e incluso agua entubada y embotellada (Wellings *et al.*, 1977 ; 1979; Rivera *et al.*, 1979, 1981, 1986, 1987b, 1988, 1994). Las temperaturas elevadas favorecen su proliferación por lo que se les encuentra comúnmente en aguas termales, naturales y en aguas contaminadas térmicamente por descargas industriales (De Jonckheere, 1977, 1981; Cerva *et al.*, 1982; Kasprzak *et al.*, 1982; Sykora *et al.*, 1983).

El estudio de las **AVL** ha demostrado que sólo un grupo muy restringido provoca infecciones humanas incluyendo a los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y probablemente *Hartmannella* (John y Howard, 1993; Visvesvara *et al.*, 1993). Los organismos del género *Naegleria* son capaces de provocar meningoencefalitis amebiana primaria (**MEAP**) que ocasiona la muerte en el lapso de tres a siete días. Las pertenecientes al género *Acanthamoeba* provocan encefalitis amebiana granulomatosa (**EAG**) crónica que pueden ocasionar la muerte en periodos mayores, y también pueden provocar infecciones muy severas en otros órganos como pulmón, piel, ojos y oídos (Kilvington *et al.*, 1991).

Para describir a las amibas capaces de sobrevivir en el ambiente y como endoparásitos se ha propuesto el término anfizoico (del griego *amphi*, que significa, ambos lados) (Page, 1974, 1976).

2.1 MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA

Las **AVL** son organismos unicelulares, asexuales, cuyas dimensiones varían de unos cuantos micrómetros hasta algunos milímetros. Pueden estar desnudas o cubiertas por una testa; se mueven por medio de pseudópodos, que también usan para fagocitar. Los tiempos de generación son variables y generalmente se incrementan con la temperatura (John y Howard, 1993).

Los pseudópodos muestran una considerable diversidad de estructuras y tipos que se reflejan en una gran variedad de formas, su citoplasma está constituido por dos zonas; una capa transparente o ectoplasma y un endoplasma granular que fluye a lo largo del cuerpo hacia los pseudópodos. El ectoplasma es más visible en las puntas de los pseudópodos, donde forman zonas hialinas. El endoplasma contiene de uno a varios núcleos, una o varias vacuolas, gránulos de almacenamiento de alimento, mitocondrias y otras membranas e inclusiones cristalinas (Page, 1988).

La formación de quistes es el mecanismo de protección que presentan la mayoría de los protozoos, incluidas las **AVL**, para protegerse de los cambios ambientales. De esta manera pueden sobrevivir a la ausencia de humedad, cambios extremos de temperatura, presión, pH, falta de oxígeno, acumulación de desechos metabólicos, escasez de alimento o algún otro factor adverso (Schuster, 1979; Marciano-Cabral, 1988).

2.2 ECOLOGÍA DE LAS AMIBAS DE VIDA LIBRE

Las **AVL** pueden llegar a los cuerpos de agua, a los alimentos y a las heridas superficiales en forma de quiste. Pueden desprenderse de los cuerpos de agua en forma de aerosoles. Dentro de los cuerpos de agua las amibas viven sobre la superficie, adheridas a partículas flotantes, en la columna de agua, o en los sedimentos. Puesto que las **AVL** son habitantes comunes del suelo, juegan un papel dentro del ciclo de los nutrientes, porque estimulan el incremento en la tasa de transformación bacteriana del fósforo y del nitrógeno

a formas aprovechables para las plantas, lo que produce una mayor producción de biomasa vegetal (Fenchel, 1987; Tyndall *et al.*, 1989).

El enquistamiento es la manera como las amibas responden a variaciones ambientales que amenacen su existencia. Los quistes pueden sobrevivir a las sequías, cambios de pH y falta casi total de oxígeno. En su forma de quiste, las **AVL** pueden ser acarreadas hacia la atmósfera mediante corrientes de convección, sistemas frontales, turbulencias o burbujas de aire (Rivera *et al.*, 1987b, 1994; Rodríguez *et al.*, 1993). El tiempo y la distancia a la que pueden transportarse en la atmósfera dependen de la altura de la corriente de aire que las transporte y del tamaño que posean los quistes. En general, las partículas de un diámetro mayor de 20 μm sedimentan casi de inmediato y su área de distribución es aproximadamente de 100 μm . Lo anterior tiene importancia porque la mayoría de las especies de **AVL** tienen un tamaño pequeño (6 a 15 μm) y pueden ser acarreadas por el viento a través de grandes distancias incluso entre continentes (Rondanelli, 1987).

Las temperaturas extremas a las cuales las **AVL** son capaces de sobrevivir están por debajo de los 4°C y algunas pueden sobrevivir a temperaturas mayores de 45°C (De Jonckheere, 1981). Por lo general, las especies patógenas son termo tolerantes (Rivera *et al.*, 1994). Los cuerpos de agua que tienen temperaturas estables por arriba de los 35°C son lugares ideales para la sobrevivencia y el desarrollo de las especies patógenas (Kyle y Noblet, 1986 y 1987). Aunque las **AVL** patógenas tienen velocidades de crecimiento inferiores a las no patógenas, las primeras pueden crecer e incrementar paulatinamente su número hasta llegar a niveles infectivos. Así, los cuerpos de agua contaminada térmicamente ofrecen un lugar abundante en materia orgánica y libre de competencia y un nicho “vacío” de ameboflagelados, con escasa o nula depredación. Puede hacerse un símil con el cerebro de los vertebrados, en donde las amibas encuentran un ambiente con temperatura estable, con abundante alimento, sin competencia y con una escasa presión depredadora por parte de los mecanismos de defensa (Griffin, 1983).

El intervalo de pH que las amibas pueden soportar está entre 5.5 y 8.6. Solamente las especies del género *Acanthamoeba* son tolerantes a los cambios de salinidad de las aguas cuando están en su forma trófica y el quiste es resistente al ataque del cloro hasta niveles de 2 partes por millón. Esta puede ser una de las razones que las convierten en infectantes oportunistas. En contraste, en la mayoría de las áreas geográficas donde se ha aislado *N. fowleri* en el ambiente se ha detectado una fuerte influencia de los ciclos estacionales, con números altos de amibas en el verano y el otoño y bajos en el invierno y la primavera (De Jonckheere, 1979).

2.3 UBICACIÓN TAXONÓMICA.

La siguiente clasificación no incluye todos los grupos de amibas, sólo los géneros *Entamoeba*, *Acanthamoeba* y *Naegleria* que son patógenos para el hombre y fue reportado por la Sociedad de Protozoología en 1985 (Lee *et al.*, 1985).

Reino: Protista; Haeckel, 1866

Subreino: Protozoo; Golfuss, 1818, von Siebold, 1846

Phylum: Sarcomastigophora; Honigberg y Balamuth, 1963

Subphylum: Sarcodina; Schmarda, 1871

Superclase: Rhizopodea; Von Siebold, 1845

Clase: Lobosea; Carpenter, 1861

Subclase: Gymnamoebia; Haeckel 1862

Orden: Amoebida, Kent, 1880

Suborden: Tubulina; Bovee y Jahn, 1966

Familia: Entamoebidae; Catón, 1925

Género: *Entamoeba*; Casagrandi y Barbagallo, 1895

Familia: Acanthamoebidae; Sawyer and Griffin, 1975

Género: *Acanthamoeba*; Volkonsky, 1931; Page, 1967

Orden Schizopyrenida; Singh, 1952.

Familia : Vahlkampfiidae; Jollos, 1971; Zulueta, 1917

Género: *Naegleria*; Alexeieff, 1912; enmed. Calkins, 1913

Hasta la fecha se han descrito seis especies del género *Naegleria* (John, 1993).

- *N. gruberi* Schardinger, 1899
- *N. fowleri* Carter, 1970
- *N. jadini* Willaert & Le Ray, 1973
- *N. lovaniensis* Etevens. De Jonckheere & Willaert, 1980
- *N. andersoni* De Jonckheere, 1981
- *N. australiensis* De Jonckheere, 1981

Siendo las dos únicas especies patógenas *N. australiensis* (patógena para ratón) y *N. fowleri* (patógena de mamíferos, aves y el hombre).

1 INFECCIONES POR AMIBAS DE VIDA LIBRE

Las **AVL** han sido estudiadas desde 1841, cuando Félix Dujardin en Francia describe por primera vez una amiba pequeña de vida libre y le da el nombre de *Amoeba limax*. No obstante, solo se les consideraba como organismos que forman parte del ambiente y que llevan un papel modesto en la trama del ecosistema. Ciento diecisiete años después, se hace el primer reporte del efecto citopático de *Hartmannella* y *Acanthamoeba* en cultivos celulares de riñón de mono y se propone que las amibas de vida libre tienen un potencial patógeno (Culbertson *et al.*, 1958). Los primeros casos de infecciones humanas fueron registrados en Australia (Fowler y Carter, 1965). Un año después del reporte, tres infecciones fatales fueron descritas en Florida (Butt, 1968). La sintomatología de estos casos fue muy similar a la de los casos de Australia, aunque esto no era aparente en ese entonces, los siete casos sentaron las bases de las características clínicas y patológicas de la enfermedad.

Los primeros casos de meningoencefalitis en humanos debidamente comprobados provienen de hace apenas unas décadas (Carter, 1970). En ese entonces, se creía que todos los casos comprobados de **MEAP** se debían a *Naegleria fowleri* posteriormente se reconocen casos de encefalitis causados por amibas del género *Acanthamoeba* (Robert y Rorke, 1973) con lo que las diferencias clínico-patológicas empezaron a emerger. A medida que la enfermedad se fue conociendo más, se encontró que algunas infecciones oculares y de la piel eran causadas por *Acanthamoeba* (Martínez, 1985) y se propuso el término de encefalitis amibiana granulomatosa (**EAG**) (Martínez y Amado-Ledo, 1979) para diferenciarla de **MEAP** debida a *Naegleria fowleri*. El interés médico se ha venido incrementando al saberse que provocan la muerte (De Jonckheere *et al.*, 1984). Este hecho reviste mayor importancia si se considera que las **AVL** potencialmente patógenas se pueden encontrar con facilidad en cuerpos de agua de uso recreativo e industrial (De Jonckheere, 1978, 1979; Coronado-Gutiérrez y López-Ochotorena, 1980; Kasprzak *et al.*, 1982; Scaglia *et al.*, 1983; Rivera *et al.*, 1989)

Los estudios **AVL** en México fueron iniciados por Rivera y colaboradores (Rivera y Paz, 1978; Rivera *et al.*, 1984 a,b), quienes reportaron amibas del género *Naegleria* y *Acanthamoeba* en reservorios naturales de agua dulce de la Ciudad de México. A partir de 1979 a la fecha, se han aislado de aguas de grifo y de agua mineral embotellada, de la atmósfera de la Ciudad de México, así como de la región nasobucofaringea de pacientes odontológicos de ambos sexos, (Rivera *et al.*, 1981, Rivera *et al.*, 1984b; 1986, Rivera y colaboradores 1987a, 1988, 1994 y Bonilla 2000). Las infecciones por **AVL** son relativamente extrañas, sin embargo, se tienen reportes prácticamente en todo el mundo. En México, el estudio de estos organismos se intensificó después de los reportes de **MEAP** por Valenzuela *et al.*, (1984), Rodríguez-Pérez (1984) y López-Corella *et al.*, (1989); además de los casos en el Valle de Mexicali (Ferreira *et al.*, 1997)

El primer caso de **MEAP** en México fue detectado en 1978 en un sujeto de 16 años de edad con antecedentes de natación en los canales de riego del Valle de Mexicali, Baja California y fue publicado hasta 1984 (Valenzuela *et al* 1984). Desde entonces a la fecha, se han diagnosticado 29 casos en México (Lares, 2001), incluyendo un sobreviviente tratado con anfotericina B, cloranfenicol y sulfadiazina (Rodríguez-Pérez, 1984).

1.1 *Naegleria fowleri*.

La especie *N. fowleri*, también puede invadir al ser humano y animales, el trofozoíto es el estadio invasivo, su periodo de incubación varía de dos días a tres semanas, dependiendo del tamaño del inóculo y la virulencia de las amibas. La inhalación de agua, o más raramente, de aire conteniendo amibas, pone en contacto a estos microorganismos con el neuroepitelio olfatorio, constituyéndose de esta manera la ruta de diseminación de las amibas a otras partes del encéfalo y del espacio subaracnoideo vascular (Martínez, 1985; Martínez y Visvesvara, 1997).

El género *Naegleria* consta de tres estadios durante su ciclo de vida en el ambiente (Page, 1988):

- Trofozoíto, o forma vegetativa, que es la fase del ciclo en la que se alimenta y reproduce.
- Quiste, que es la forma de resistencia.
- Flagelado, estadio transitorio que no se alimenta, ni se multiplica y después de un tiempo regresa a la fase trófica.

Trofozoíto. Los trofozoítos de las diferentes especies son muy similares en apariencia y son conocidas como amibas limax, son alargadas y se mueven de manera unidireccional por medio de un pseudópodo eruptivo, llamado lobópodo, el núcleo posee un denso y esférico nucléolo central o cariosoma y una membrana nuclear sin cromatina granular. El trofozoíto de *N. fowleri* en movimiento mide en promedio 22 μm de longitud; en forma inactiva, redondeada, mide de 9 a 15 μm de diámetro (Carter, 1970)(Figura 1).

Los trofozoítos de *N. fowleri* y *N. australiensis* (patógena en ratón) poseen unas estructuras fagocíticas distintas conocidas como amebostomas, que son usadas para engullir alimento y varían en número de una a doce por amiba. Por microscopía electrónica de transmisión se ven granuladas, en contraste con las áreas vacuoladas de la amiba. En las especies no patógenas no son evidentes. Aparentemente, no existe correlación entre el grado de virulencia y el número de amebostomas; sin embargo, la patogenicidad sí parece estar correlacionada con su presencia, ya que las dos únicas especies patógenas de *Naegleria* las poseen (John, 1993).

La reproducción es por fisión binaria del trofozoíto. La división nuclear es promitótica, lo cual indica que el núcleo y la membrana nuclear persisten durante la división nuclear (cariocinesis). El nucléolo se alarga formando una estructura en forma de “pesas” y se divide en dos masas polares, que más adelante se convierten en el nucléolo de cada una de las dos nuevas amibas (Page, 1988)

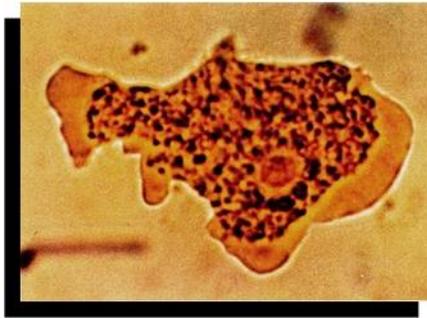


Figura 1. Trofozoíto de *Naegleria fowleri*.

Flagelado: Cuando las condiciones en el ambiente son adversas, los trofozoítos se pueden transformar en formas flageladas temporales; el mismo efecto se puede inducir experimentalmente con agua destilada o solución buffer no nutritiva. El flagelado típico es una célula de forma pirimiforme, con dos flagelos que emergen por debajo del *rostrum* anterior. El estadio flagelar de *N. fowleri* es muy uniforme, la mayoría presenta dos flagelos (Figura 2), (Page, 1988).



Figura 2. Estadio flagelar de *Naegleria fowleri*.

Quiste. El quiste de *N. fowleri* es esférico, con un diámetro de 7 a 15 μm (Page, 1988)(Figura 3). En quistes analizados con la técnica de microscopía electrónica, se observan al menos dos poros (u ostiolas) con tapón y una pared relativamente delgada, característica que hace a esta especie muy susceptible a la desecación (Bonilla, 2000).



Figura 3. Forma quística de *Naegleria fowleri*.

2 INFECCIONES EN HUMANOS.

La **MEAP** es una enfermedad aguda, rápidamente progresiva y fatal que tiene como agente causal a *Naegleria fowleri*. Debido a que la invasión es muy rápida, hay necrosis hemorrágica de gran parte del encéfalo (Martínez, 1985).

El cuadro clínico es muy parecido a la meningitis bacteriana; sin embargo, en la infección por *Naegleria* existe el antecedente de que los pacientes, en su mayoría son jóvenes y previamente sanos, que nadaron en algún cuerpo de agua, así como el hecho de encontrar escaso exudado purulento y ausencia de bacterias en el líquido cefalorraquídeo (**LCR**). El diagnóstico se confirma con el aislamiento de amibas en forma de trofozoíto (nunca quiste, ni flagelados) del **LCR** o del tejido de biopsia cerebral.

2.1 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Naegleria fowleri puede producir una meningoencefalitis aguda y fatal en niños y jóvenes. Los signos y síntomas de la **MEAP** consisten en presión intracraneal elevada (náusea, vómito en proyectil y fotofobia), cefalea intensa, irritación de la mucosa nasal, fiebre, datos de irritación meníngea (rigidez de nuca) y encefalitis. El curso clínico se caracteriza por confusión mental, en algunos casos crisis convulsivas; pérdida de apetito, visión doble y/o borrosa, trastornos del gusto, del olfato y alucinaciones, coma profundo y finalmente la muerte. La mayoría de los pacientes mueren dentro de la primera o segunda semana después de la aparición de los primeros síntomas, dependiendo del manejo y resistencia del paciente, así como la virulencia de las amibas (Martínez y Visvesvara, 1997).

2.2 CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS

Durante la **MEAP** los hemisferios cerebrales y el cerebelo muestran edema y una gran congestión. El bulbo olfatorio y los córtices orbitofrontales presentan necrosis y hemorragia. El exudado fibrinopurulento es usualmente escaso. Histológicamente los

trofozoítos se encuentran rodeando los vasos sanguíneos dentro de los espacios de Virchow-Robin con un número reducido de leucocitos polimorfonucleares. Generalmente no se encuentran quistes en los tejidos (Butt, 1966; Callicot, 1968; Valenzuela *et al.*, 1984)

2.3 DIAGNÓSTICO

La **MEAP** puede confundirse con una meningoencefalitis aguda purulenta producida por bacterias. El diagnóstico positivo de **MEAP** se basa en la correlación de signos y síntomas, que incluye áreas endémicas (Visvesvara *et al.*, 1990). El diagnóstico definitivo en **MEAP** está basado en la detección al microscopio óptico de los trofozoítos en muestras de líquido cefalorraquídeo o en tejido cerebral. La movilidad de los trofozoítos se observa a través del microscopio de luz, de campo oscuro o de contraste de fases. Las muestras teñidas con Giemsa o Wright muestran la forma típica del trofozoito. El diagnóstico también puede realizarse utilizando técnicas inmunohistoquímicas como inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia con anticuerpos anti-*Naegleria* (Visvesvara, 1990).

1 ANTECEDENTES.

Hasta el momento no existe un tratamiento satisfactorio para la meningoencefalitis amibiana primaria. Los antibióticos usados para tratar la meningitis bacteriana no son efectivos en una infección por *Naegleria*, al igual que los fármacos que se usan generalmente como antiamebícos. La anfotericina B (**AMB**), una droga considerablemente tóxica, es el único agente anti-*Naegleria* del cual se tiene evidencia de su efectividad en el tratamiento de esta infección. Los cinco casos conocidos de sobrevivientes de **MEAP**, fueron tratados con **AMB** suministrada por vía intravenosa o intratecalmente. Los cinco sobrevivientes fueron de Australia (Anderson y Jamieson, 1972), Gran Bretaña (Apley *et al.*, 1970), India (Pan y Ghosh, 1971), de los Estados Unidos de Norteamérica (Seidel *et al.*, 1982) y México, el cual fue tratado además en forma conjunta con cloranfenicol y sulfadiazina (Rodríguez-Pérez, 1984).

Los estudios *in vitro* de cepas de *N. fowleri* aisladas de humano y que son altamente virulentas, demuestran que la amiba es extremadamente susceptible a la **AMB**, un poco susceptible a miconazol y resistente a rifampicina (Seidel *et al.*, 1982).

La **AMB** es administrada intravenosamente a altas dosis: 1-1.5 mg por Kg de peso diariamente por 3 días y después 1 mg por Kg al día, durante 6 días. Esta droga es un polieno que actúa sobre la membrana plasmática perturbando su permeabilidad selectiva y causando poros y por ende, fuga de los componentes celulares (Kobayashi y Medoff, 1977). Cuando la amiba es expuesta a la **AMB**, se redondea y es incapaz de formar pseudópodos.

Existen otros compuestos que han mostrado cierta protección en modelos de ratones infectados con *N. fowleri* como por ejemplo la ciclofosfamida, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Pringle *et al.*, 1979) y combinaciones de **AMB** y miconazol, o con rifampicina (Vargaz *et al.*, 2004), con tetraciclina (Thong *et al.*, 1979), con voriconazol e incluso con el anti cancerígeno miltefosina, empleada en concentraciones arriba de 80 μM (Schuster *et al.*, 2006). Sin embargo, después de todos estos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, la **AMB** ha demostrado ser el compuesto que presenta una mayor actividad y eficiencia contra las especies patógenas de *Naegleria*, (*N. fowleri* y *N. australiensis*), (Scaglia *et al.*, 1983).

El problema del uso de la **AMB**, no radica entonces en su eficacia, sino en su alta toxicidad, ya que se ha reportado que produce daño renal principalmente, el cual generalmente resulta irreversible y puede evolucionar a una insuficiencia renal, además de que ocasiona daños a otros órganos como, insuficiencia hepática aguda y alteraciones hematopoyéticas (Belofsky *et al.*, 2006). Tomando en cuenta lo anterior, se hace necesaria la búsqueda de nuevas combinaciones de fármacos o incluso la prueba de nuevos compuestos que ofrezcan una alternativa al uso de la **AMB** tanto en eficacia como en la disminución de los efectos colaterales.

1 JUSTIFICACIÓN.

Una de las posibilidades para encontrar nuevos tratamientos para aliviar la infección por *Naegleria fowleri* se puede encontrar en la medicina tradicional, sobre todo si se toma en cuenta que el uso de las plantas medicinales para combatir ciertas enfermedades, ofrecen una disminución de los efectos colaterales además de ser productos que están al alcance de un gran porcentaje de la población mundial (Rates, 2001).

Actualmente, se ha demostrado que la resina de la planta *Gymnosperma glutinosum* (que pertenece a la familia de las Asteraceae y que Heinrich *et al.*, 1998, la considera como una de las familias botánicas de mayor importancia en la medicina tradicional de México), presenta una alta actividad antimicrobiana (Canales, 2007). Se ha probado en bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Sarcina lutea* y *Bacillus subtilis*) y en Gram-negativas (*Vibrio cholerae*, aislada de un caso clínico, *V. cholerae* No-01, *V. cholerae* aislada de agua, *V. cholerae* Tor, *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes* y *Shigella boydii*) (Serrano, 2004; Canales *et al.*, 2005a). Además, se ha demostrado recientemente que dicha resina presenta también una importante actividad antifúngica sobre hongos patógenos que pueden afectar riñones (*Fusarium sporotrichum*), pulmones (*Aspergillus niger*), piel (*Trichophyton mentagrophytes* (*Candida albicans*)) (Canales, 2007).

Algunos de los compuestos presentes en las resinas de las plantas de esta familia, son los diterpenos, los cuales son metabolitos farmacológicamente importantes, por ejemplo el taxol, del cual se ha determinado que tiene una función contra el cáncer (Buchanan *et al.*, 2002). La actividad antibacteriana de los terpenos se atribuye a su acción como disolventes de las membranas celulares, produciendo un efecto de lisis bacteriana (Helander *et al.*, 1998; Barre *et al.*, 1997; Ahmed *et al.*, 1993; Cowan, 1999) y por los resultados observados, es muy probable que actúe de la misma forma contra los hongos.

En cuanto al mecanismo de acción, un dato importante a considerar, es que la anfotericina B, al igual que algunos diterpenos, presenta alta afinidad por los esteroides de

las membranas celulares de hongos y bacterias, para formar canales en las membranas, ocasionando la pérdida de moléculas y componentes celulares, hacia el exterior de la célula. Por otra parte, en cuanto a los niveles de toxicidad, en estudios etnobotánicos previos, se ha documentado el uso de infusiones de la parte aérea de la planta *G. glutinosum* para aliviar diarreas (Canales *et al.*, 2005a, b), lo que hace suponer que los efectos colaterales no son tan adversos como con el uso de la anfotericina B.

2 HIPÓTESIS.

Si el mecanismo de acción de algunos metabolitos secundarios como los diterpenos y las flavonas que tienen actividad antibacteriana y antifúngica, es el de tener una gran afinidad por los lípidos que componen la membrana celular, y actúan como disolventes de la misma produciendo una lisis al igual que la anfotericina B, que actúa sobre los esteroides de la membrana plasmática formando poros por donde se pierde una gran cantidad de moléculas y componentes celulares; y si se ha demostrado que la anfotericina B es el fármaco que presenta una mayor actividad y eficiencia contra la infección ocasionada por *Naegleria fowleri* y que los diterpenos y flavonas están presentes en la mayoría de las resinas de las plantas de la familia *Asteraceae* como en el caso de la planta *Gymnosperma glutinosum*, la cual ha demostrado una alta actividad antibacteriana y antifúngica en estudios *in vitro*, entonces es probable que la resina de *G. glutinosum* tenga actividad contra *N. fowleri*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad *in vitro* de la resina de la planta *Gymnosperma glutinosum* sobre la amiba *Naegleria fowleri*.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener la resina de *Gymnosperma glutinosum*, mediante la técnica de inmersión en cloroformo.
- Realizar una curva patrón para los ensayos de viabilidad de los trofozoítos de *Naegleria fowleri* en cultivo axénico, mediante la técnica de MTT.
- Determinar la dosis letal (**DL**) y la dosis letal media (**DL₅₀**) de la resina de *Gymnosperma glutinosum* sobre *Naegleria fowleri* mediante la técnica de MTT.
- Determinar la toxicidad de la resina de *Gymnosperma glutinosum* mediante la prueba de toxicidad general de McLaughlin.

1 MATERIAL Y MÉTODO

1.1 RECURSOS BIOLÓGICOS

1.1.1 PLANTA.

Como ya se ha mencionado, el presente estudio se llevó a cabo con la especie *Gymnosperma glutinosum*, la que fue colectada en la localidad de Tepeji del Río, Hidalgo (voucher 28243) (Apéndice I).

1.1.2 AMIBAS.

Las amibas que se utilizaron para probar el efecto de la resina, son de la cepa ATCC-30808, de la especie *Naegleria fowleri* (donadas por el laboratorio de Conservación y Mejoramiento del Ambiente CyMA de la F.E.S Iztacala).

1.1.3 RATONES.

Para reactivar la virulencia de las amibas se utilizaron ratones (*Mus musculus*) machos de la cepa BALB/c de seis semanas de edad.

1.2 BIOENSAYOS PRELIMINARES

1.2.1 OBTENCIÓN DE LA RESINA DE LA PLANTA *Gymnosperma glutinosum*.

Se tomó la parte aérea fresca de la planta, la resina se extrajo por inmersión de las ramas de *G. glutinosum* en cloroformo, por un tiempo de 15s., este corto periodo de inmersión fue suficiente para aislar toda la resina que cubre las ramas y las hojas, sin extraer otros compuestos no-resinosos de otras partes de la planta. Posteriormente el cloroformo se evaporó bajo presión reducida, obteniendo así solo la resina (Urzúa *et al.*, 1993).

1.2.2 CULTIVO DE LAS AMIBAS

Se cultivaron axénicamente en frascos Corning de 75cm² con 30mL de medio Bactocastona al 2% (DIFCO), enriquecido con suero fetal de bovino (SFB) al 10%, y se mantuvieron en incubación a 37°C para promover el óptimo crecimiento.

1.2.3 REACTIVACIÓN DE VIRULENCIA

Se realizó en tres ratones anestesiados con éter, a los que se les inocularon por vía intranasal 2×10^5 trofozoítos de *N. fowleri* a cada ratón, utilizando una micropipeta. Se tuvieron en observación durante 9 días aproximadamente, que fue el tiempo durante el cual aparecieron los primeros síntomas y evolucionó la enfermedad, tomando nota de los cambios de comportamiento que se presentaron durante este tiempo y haciendo a los ratones pruebas de reacción a estímulos externos. Al momento de la muerte se extrajo el cerebro para recuperar las amibas, estas se cultivaron nuevamente y se realizó un nuevo pase por ratón. Este procedimiento se repitió tres veces, y las amibas recuperadas se cultivaron axénicamente para las pruebas posteriores, ver figura 4.



Figura 1. Obtención de cerebro para recuperación de amibas.

1.2.4 CURVA PATRÓN PARA LOS ENSAYOS DE VIABILIDAD DE LOS TROFOZOÍTOS DE *Naegleria fowleri* CON LA RESINA DE *Gymnosperma glutinosum*.

Para probar el efecto de la resina se realizó una curva patrón de la siguiente manera: en una placa de cultivo de 96 pozos se colocaron diferentes cantidades de trofozoítos de *N. fowleri* (desde 2.5×10^5 hasta 122 amibas) en $200 \mu\text{L}$ de medio de cultivo, posteriormente a todos los pozos se les agregó $25 \mu\text{L}$ de MTT (3-[4,5 dimetilazol-2 y 1]-2,5 difeniltetrasolio bromuro) (5mg/mL), y se incubaron por un tiempo de 4 horas a una temperatura de 37°C . Al término de este tiempo se desechó el sobrenadante y se agregaron $100 \mu\text{l}$ de dimetil sulfóxido (DMSO), dejando reposar la placa por 15 min en oscuridad. Como último paso

del procedimiento, se leyó la absorbancia a 595nm en un lector para ELISA. Con los datos de número de células y los valores de absorbancia se graficó y se obtuvo la curva patrón.

1.3 DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL (DL) Y LETAL MEDIA (DL₅₀) DE LA RESINA DE *G. glutinosum* SOBRE *N. fowleri*.

Para probar el efecto de la resina sobre las amibas, se colocaron en una placa de cultivo de 96 pozos 2×10^4 trofozoítos por pozo en 200µL de medio de cultivo (Goswick y Brenner 2003), a todos los pozos se agregaron diferentes concentraciones de la resina (10, 50, 100 y 150 µg/mL) (Mendiola *et al.*, 1991; Tona *et al.*, 1998; Guerra *et al.*, 2001 y Groswick y Brenner, 2003) y se incubaron a 37°C por un tiempo de 24 horas.

Después, se retiró el medio con una micro pipeta y se agregaron 200µL de medio más 25 µL de MTT, se dejó incubar durante 4 hrs. Transcurrido este tiempo se centrifugó la placa a 1500 rpm por 10 min, se retiró el sobrenadante y se agregaron 100 µL de, DMSO, siguiendo el procedimiento antes mencionado.

Los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en la curva patrón y se graficaron, para así obtener el resultado de el número de trofozoítos que sobrevivieron al contacto con la resina.

Para el control positivo se utilizó como referencia el fármaco conocido y empleado para el tratamiento de la **MEAP AMB**, para el que se realizó el procedimiento anterior empleando las concentraciones siguientes de 0.01, 0.1 y 1 µg/mL (Groswick y Brenner, 2003).

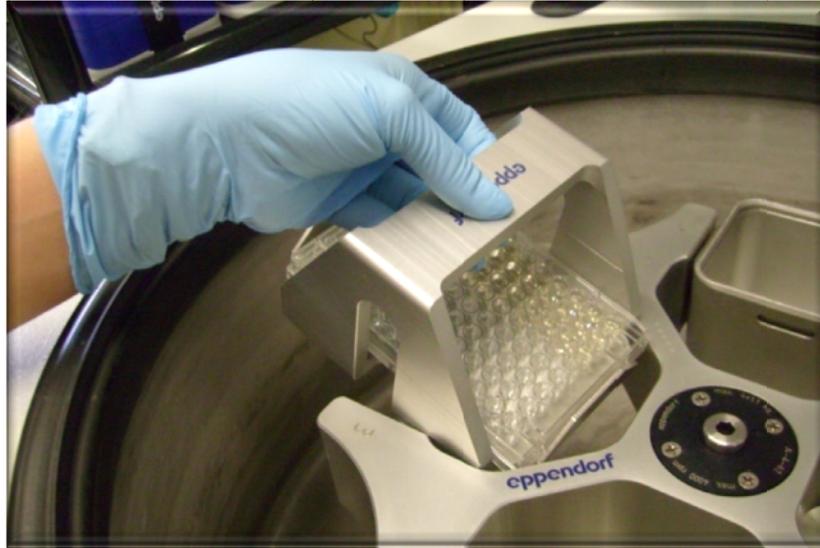


Figura 2. Placa de cultivo para centrifugar.

1.4 PRUEBA DE TOXICIDAD GENERAL: MÉTODO DE TOXICIDAD GENERAL (MCLAUGHLIN, 1991).

El ensayo se realiza con larvas nauplio II de *Artemia salina* (Leach). En frascos de vidrio transparentes se colocaron 10mL de NaCl al 0.5 %; posteriormente se colocaron 10 larvas por frasco. Las concentraciones del problema a ensayar fueron 1,000, 100 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

1.4.1 CONTROL NEGATIVO.

Como control negativo se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO), el cual fue el disolvente empleado para la disolución del problema, se empleó el mismo volumen en el que se disolvió la concentración más alta del extracto.

1.4.2 CONTROL POSITIVO.

Como control positivo se utilizó ácido gálico en concentraciones de 1,000, 100 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

1.4.3 INCUBACIÓN.

Los cultivos se mantuvieron iluminados con luz blanca a una temperatura de 23-25 °C durante 24 horas.

1.4.4 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Se contaron el número de larvas sobrevivientes, las cuales se desplazaban de la misma manera que las del grupo testigo.

La dosis letal media (DL_{50}) se determinó interpolando en gráficas de porcentaje de mortalidad contra la concentración en $\mu\text{g/mL}$ y a través del análisis de regresión lineal.

La interpretación de la actividad tóxica general se realiza con base al siguiente criterio (McLaughlin, 1991):

La actividad tóxica general se considera débil cuando la DL_{50} se encuentra entre 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$, moderada cuando se encuentra entre 100 y 500 $\mu\text{g/mL}$, y fuerte entre 0 y 100 $\mu\text{g/mL}$ (ver cuadro 1) (McLaughlin, 1991).

Cuadro 1. Interpretación de la actividad tóxica general.

Toxicidad	Concentración de DL_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Débil	501 a 1000
Moderada	100 a 500
Alta	0 a 99

1 RESULTADOS Y ANÁLISIS

1.1 OBTENCIÓN DE LA RESINA POR INMERSIÓN DE LA PLANTA EN CLOROFORMO

La resina se obtuvo como fue descrito anteriormente en la metodología. Terminado el procedimiento se dejó evaporar el cloroformo y se solidificó la resina, tomando una consistencia chiclosa, pegajosa. Se almacenó en un recipiente de cristal con tapa de rosca (cuadro 2).

Cuadro 1. Rendimiento de la resina.

Cantidad de planta fresca.	Tiempo de inmersión en cloroformo	Rendimiento de la resina
3.5kg	15s	131.60 g

1.2 REACTIVACIÓN DE VIRULENCIA DE LOS TROFOZOÍTOS DE *Naegleria fowleri*.

Una vez realizada la inmunización, se hizo un seguimiento de la enfermedad a partir del día de infección hasta el momento de la muerte, con lo que se pudo observar claramente la sintomatología que los ratones presentaron y el decaimiento en la salud y comportamiento de los mismos (cuadro 3).

Cuadro 2. Sintomatología de la MEAP.

Día	Observaciones	
1	Infección (inóculo de 2×10^5 trofozoítos por vía intranasal).	
2	Actúa de forma normal, reactivo, consiente, activo, come normal.	
3	Reactivo, activo, come y bebe normal.	
4	Responde a chasquido de dedos, come normal, activo	
5	Primeros signos de enfermedad, poco reactivo, ausente, aturdido	
6	Poco reactivo, ausente, tembloroso, come muy poco	
7	Muy tembloroso, intenta moverse, torpe, poco reactivo, no come ni bebe	
8	Recostado, columna encorvada, convulsiona, respiración agitada, no come ni bebe agua.	
9	Muerte	

1.3 CURVA PATRÓN PARA LOS ENSAYOS DE VIABILIDAD DE LOS TROFOZOÍTOS DE *N.fowleri* CON LA RESINA DE *G. glutinosum*.

Los resultados obtenidos de la curva patrón de *N. fowleri* se observan en la figura 6.

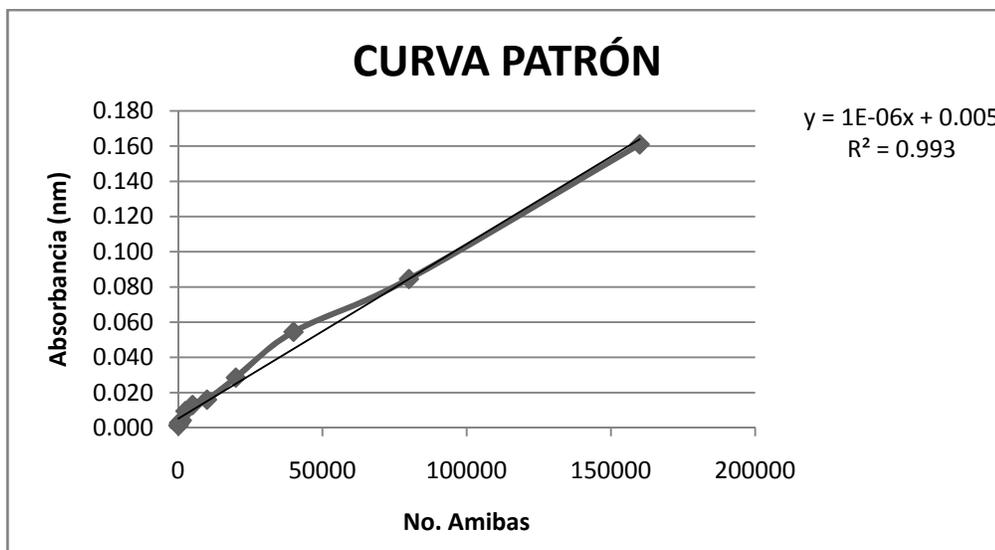


Figura 1. Curva patrón de *N. fowleri*, datos de los resultados obtenidos de tres repeticiones del ensayo de MTT.

1.4 ENSAYO DEL EFECTO DE LA ANFOTERICINA B.

De las diferentes concentraciones ensayadas de la AMB sobre *N. fowleri*, se determinó que la dosis letal media (DL₅₀) obtuvo un valor de 0.156µg/mL y la dosis letal de (3µg/mL) (cuadro 4).

1.5 ENSAYO DEL EFECTO DE LA RESINA DE *Gymnosperma glutinosum*, sobre la amiba *Naegleria fowleri*.

Por último se realizaron los ensayos con la resina de *Gymnosperma glutinosum* sobre *Naegleria fowleri* para probar el efecto antiamebiano que tiene y poder sugerir el empleo de la misma como alternativa dentro de la medicina tradicional.

Cuadro 3. Dosis letal y letal media obtenidas en los ensayos de anfotericina B y *G. glutinosum* sobre *N. fowleri*.

	DOSIS LETAL (DL)	DOSIS LETAL MEDIA (DL ₅₀)
Anfotericina B (AMB)	3µg/mL	0.156µg/mL
Resina de <i>Gymnosperma</i>	90µg/mL	62.5µg/mL

En el cuadro anterior se muestran las concentraciones a las que la resina de *Gymnosperma glutinosum* tiene un efecto letal, es decir, en donde la concentración empleada tiene un efecto amebicida sobre *Naegleria fowleri*, así como la dosis letal media en donde solo tiene efecto letal sobre la mitad de la población de amibas empleadas en el ensayo.

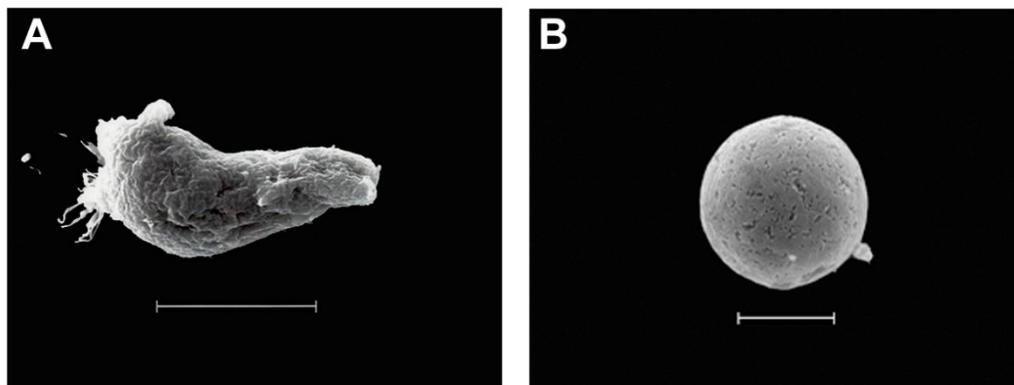


Figura 2. Microscopía electrónica de barrido. [A] *N. fowleri* control, Barra = 10 μ m; B) *N. fowleri* después de someterse a una concentración de 0.90 mg/mL de resina de *G. glutinosum*, durante un lapso de tiempo de 60 min. se observan la distorsión en la forma tradicional el trofozoíto al interactuar con la resina y el daño en la membrana, Barra = 5 μ m].

En la figura 8 se observa la diferencia en forma, tamaño y apariencia de los trofozoítos, (A. control y B. tratamiento) observándose el daño que causó la resina de *G. glutinosum* a una concentración de 0.90 mg/mL sobre los trofozoíto de *N. fowleri* (B), después de haber interactuado durante 1 hora. El trofozoíto redondeado es la evidencia que muestra el daño que la resina les produce, así como se observa la presencia de lesiones en la superficie de la membrana. El mecanismo de acción de la resina de *Gymnosperma glutinosum* es que, tal vez, al igual que la Anfotericina B, presenta alta afinidad por los esteroides de la membrana celular de los trofozoítos de *N. fowleri*, formando poros o canales en las membranas, ocasionando la pérdida de moléculas y componentes celulares, hacia el exterior de la célula

Una vez obtenida la concentración letal media se determinó si el efecto de la resina era amebostático o amebicida para lo que se realizó una cinética de 24 horas, los resultados se muestran en la figura 8.

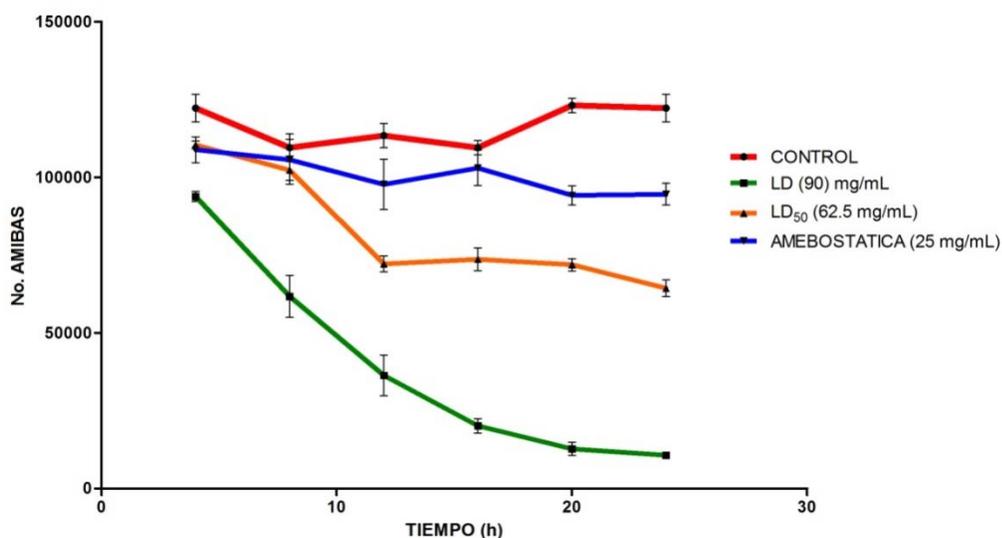


Figura 3. Actividad de la resina de *G. glutinosum* sobre la curva de crecimiento de *N. fowleri*.

De acuerdo a la figura 8 se observa que la concentración de 90µg/ml de la resina de *Gymnosperma glutinosum* resultó ser amebicida, mostrando una actividad constante en un lapso de 24 horas, sin que se observara una recuperación en el crecimiento de las amibas, mientras que la actividad de la resina a una concentración de 25µg/mL tiene una actividad amebostática, ya que durante las primeras 12 horas de actividad se observa un decremento considerable de la población de *N. fowleri* y llegando a las 16 horas (4 horas más tarde) se observa claramente la recuperación en el crecimiento de amibas, aunque posteriormente no permitió que se incrementara el número, con lo que se puede decir, que el efecto de la resina a esta concentración durante las primeras 12 horas del ensayo tuvo un comportamiento amebicida pero con un efecto menor que el de la concentración de 90µg/ml y que un tiempo posterior solo actuó como un regulador de crecimiento con un efecto amebostático.

También se observa el efecto letal sobre la mitad del total de los trofozoítos ($DL_{50}=62.5$ mg/mL), en donde la actividad de la resina muestra un comportamiento muy similar al que se presenta con la dosis correspondiente a la amebicida o letal y que a pesar de que hubo una ligera recuperación del crecimiento celular llegadas las 16 h, esta concentración resultó ser eficiente para matar al 50% de las amibas.

Se considera importante determinar estas concentraciones para que, a partir de ellas, se puedan hacer determinaciones sobre su uso y eficacia en el tratamiento de la enfermedad *in vivo*, independientemente de que sea conveniente o no administrar en dosis elevadas y que esto sea dependiente del grado de toxicidad que resulte de la interacción con células de linajes de mamíferos y humanas, además de conocer si se pudiese emplear para erradicar por si sola y por completo la enfermedad o dependiendo el grado y avance de la enfermedad para solo detener el crecimiento amebiano y permitir al sistema inmune su participación.

1.6 PRUEBA DE TOXICIDAD GENERAL.

A continuación se muestran los resultados de la prueba de toxicidad general obtenidos de la resina de *Gymnosperma glutinosum* (Cuadro 5), a partir de ellos se determinó la dosis letal media para este ensayo de toxicidad (444 μ g/mL) y se consideró a la resina como una sustancia de toxicidad moderada, al compararla con los datos representados en la tabla de interpretación de resultados de toxicidad general (Cuadro 1).

Cuadro 4. Resultados del ensayo de toxicidad general y de la DL₅₀ de la resina de *G. glutinosum*.

Concentración de la resina de <i>G. glutinosum</i> (μ g/mL)	% de Mortalidad
1000	100
100	23.3
10	6.7

Cuadro 5. Actividad tóxica de la resina (DL₅₀ de la resina de *G. glutinosum* en el ensayo de toxicidad).

	DOSIS LETAL MEDIA (DL ₅₀) μ g/mL.	ACTIVIDAD TÓXICA GENERAL
Resina de <i>Gymnosperma glutinosum</i>	444	Débil a Moderada

A partir de los resultados anteriores obtenidos del ensayo de toxicidad general mostrados a continuación en el cuadro 5, se interpoló en la misma gráfica el porcentaje de mortalidad mediante la ecuación del gráfico, para obtener la concentración de la dosis letal media (DL₅₀) de la resina, la cual resultó ser de 444μg/mL como ya se ha mencionado. Posteriormente se hizo la comparación de este resultado en la tabla de toxicidad general, para determinar el rango de toxicidad al que corresponde el resultado anterior.

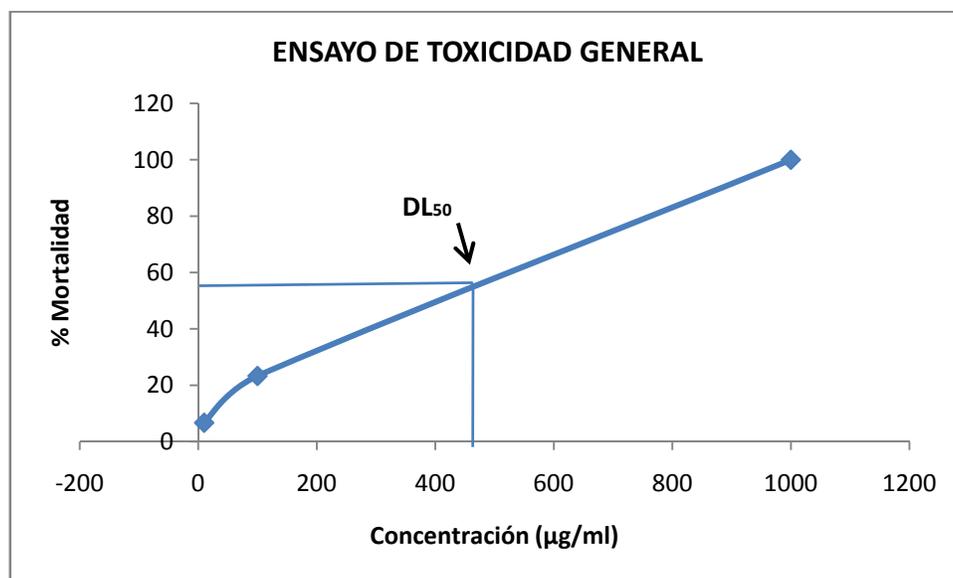


Figura 4. Resultados de la prueba de toxicidad general.

2 DISCUSIÓN

La importancia de este trabajo radica, en que por primera vez se demuestra el efecto de la resina de *Gymnosperma glutinosum* sobre la amiba de vida libre *Naegleria fowleri*, un organismo patógeno responsable de producir la meningoencefalitis amebiana primaria, enfermedad para que hasta la fecha no hay medicamento eficaz que la erradique. Los resultados indican que la resina de *Gymnosperma glutinosum* tiene actividad contra *Naegleria fowleri* ($DL_{50} = 62.5\mu\text{g}$), que puede ser utilizada *in vitro* como amebicida ($90\mu\text{g/ml}$) o amebostática ($25\mu\text{g/ml}$), que al estar en contacto con los trofozoítos de *Naegleria fowleri* los redondea y les produce lesiones a nivel de membrana, y que sobre el modelo de *Artemia salina* mostró una toxicidad media ($444\mu\text{g/ml}$).

Han sido varios los trabajos que han tratado de encontrar un tratamiento adecuado para esta enfermedad, pero los resultados no son muy satisfactorios debido a que la enfermedad presenta un tiempo muy corto de incubación y tiene un desenlace fatal entre los 7 y 10 días por lo que el tiempo entre el diagnóstico y el inicio de la terapia antimicrobiana son críticos para que la terapia tenga efecto (Schuster, 2006).

Hasta el momento se sabe que la *Naegleria fowleri* es altamente sensible a la anfotericina B (Duma, 1971), sin embargo, existen muchos inconvenientes para poder instaurar un tratamiento en base a esta droga, primero porque se tiene que administrar en los primeros días de la infección para poder asegurar una recuperación del paciente y segundo, porque es una droga altamente tóxica que puede producir incluso daño renal (Duma, 1971) y además de que no todos los pacientes tratados con anfotericina B han sobrevivido (Goswik y Brenner 2003). Debido a esto han sido varios los esfuerzos por encontrar nuevas alternativas para el tratamiento de la enfermedad, administrando diferentes concentraciones de AMB o combinándola con otros antimicrobianos como la rifampina, ornidazol, miconazol o cloramfenicol, por mencionar algunos (Apley, 1970; Brown, 1991; Jain, 2002; Seidel, 1982; Wang, 1993); sin embargo no se ha logrado un tratamiento universal para combatir la infección ya que como es un organismo anfizoico existen diferencias entre la virulencia de las diferentes cepas.

Por tal razón en este trabajo se investigó la actividad *in vitro* de la resina de *Gymnosperma glutinosum* contra *Naegleria fowleri*. La búsqueda de nuevos agentes terapéuticos contra los microorganismos es importante, ya que en la actualidad se habla de que un alto porcentaje de los nuevos medicamentos aprobados anualmente son obtenidos a partir de plantas medicinales, extraídos para cumplir funciones antibacterianas y citotóxicas. Esta actividad puede obtenerse de la planta ya sea a partir de procesos de extracción y purificación de principios activos o directamente de la planta misma, mediante formas relativamente simples como la obtención de infusiones, aceites esenciales, tinturas, extractos o a partir de la obtención de jugos de algunos frutos (Harvey, 2000).

Belofsky 2006, reportó que un extracto de la planta *Dalea aurea* perteneciente a la familia *Fabaceae*, que contenía dos tipos de isoflavonas, presentaba actividad contra *Naegleria fowleri* en estudios *in vitro* e *in vivo*, sin embargo no realizó ninguna prueba de toxicidad de los extractos empleados ni se obtuvieron las dosis letal y letal media.

Gymnosperma glutinosum es empleada como una planta medicinal en varias localidades de México (Argueta y Cano, 1994, Hernández 2003, Canales 2005, 2006) y en estudios recientes se ha demostrado que esta planta tiene principios activos que presentan actividad antimicrobiana contra diferentes cepas de bacterias y hongos (Canales, 2007). De esta especie se han aislado metabolitos secundarios del grupo de los diterpenos y flavonas que tienen actividad antibacteriana y antifúngica (Serrano, 2007).

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que la resina presenta actividad *in vitro* contra *Naegleria fowleri* a concentraciones bajas ($DL_{50}=62.5\mu\text{g/ml}$) en estudios *in vitro* y que esta resina produce daños a nivel de membrana en los trofozoitos, lo que hace sospechar que los componentes de la resina puedan ser de naturaleza de diterpenos o flavonas, ya que estos se caracterizan por romper las membranas (Urzua 1998; Cowan 1999;) además de la actividad quelante de las flavonas para formar poros en las membranas (Cowan 1999,.) ya que en las fotografías de microscopia electrónica de barrido (Figura 6) se observa que hay un cambio en la estructura del trofozoíto mostrando la tendencia a redondearse además de la presencia de lesiones en la membrana.

En cuanto a su toxicidad es importante destacar que ante la prueba realizada de toxicidad general con larvas Nauplio II de la especie *Artemia salina*, la resina presentó un valor de toxicidad de moderada a baja (444µg/ml), lo que abre la posibilidad de realizar estudios in vivo para probar su efectividad ante esta infección.

También es necesario estudiar a fondo los componentes de la resina para determinar si estos tienen un comportamiento aditivo o sinérgico.

Por otra parte, se considera que es importante seguir investigando nuevas plantas y la función de sus metabolitos secundarios, para poder ser ofertados como agentes antimicrobianos.

1 CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos se puede concluir que:

- La resina de *Gymnosperma glutinosum* en estudios *in vitro* tiene actividad antiamebiana sobre *Naegleria fowleri*.
- La resina produce lesiones en el trofozoíto a nivel de membrana.
- La resina tiene una toxicidad que está en el rango de moderada a baja.

1 APÉNDICE I

1.1 FAMILIA ASTERACEAE

Se considera como la familia más grande dentro de las angiospermas también denominadas compuestas, ya que reúne al rededor de 23000 especies divididas en 13 tribus y en casi 1000 géneros, siendo entonces la de mayor riqueza y diversidad biológica. Las Asteraceae presentan una considerable importancia ecológica y económica. Los miembros de esta familia se distribuyen desde las regiones polares hasta los trópicos, conquistando todos los hábitats disponibles, desde los desiertos secos hasta los pantanos y desde las selvas hasta los picos montañosos. (Cronquist, 1977). México se ha considerado como uno de los principales centros de diversificación de esta familia, ya que en su territorio se encuentra representada por el 13% del total de la flora Mexicana (Rzendowski, 1985), además de encontrarse la concentración más cuantiosa de géneros y especies de todo el mundo (Ortiz- Bermúdez, et al., 1993; Heinrich, *et al.*, 1998). La familia se caracteriza principalmente porque muchos de sus representantes son útiles para la población humana tanto por sus cualidades alimentarias como de uso medicinal (Reyes, 1993).

El interés medicinal por la familia se ha incrementado en los años recientes, debido al incremento en las investigaciones químicas de plantas que poseen actividad antitumoral y antibacteriana (Trease y Evans, 1993), además de que también muchos de los organismos pertenecientes a la familia elaboran sustancias tóxicas o muestran otra actividad fisiológica significativa que limite o condicione su uso alimenticio tanto para consumo humano como animal (Heywood *et al.*, 1977).

1.2 *Gymnosperma glutinosum (Spreng.) Less. Asteraceae*

Es una especie muy común en las tierras de cultivo en las regiones de la selva baja caducifolia y matorrales xerófilos ocasionalmente se encuentra en regiones de pino-encino. Forma poblaciones grandes sobre todo en parcelas de cultivo abandonadas o en descanso. Es conocida por los nativos de la zona donde se encuentra como tatalencho, escobilla, pegajosa, zacayauchi, xinecuite, popote, jarilla.

Se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta Guatemala, y en México es una especie nativa.

Es una planta herbácea o sufrútice (herbácea con base leñosa), perene, erecta glabra o casi glabra, pegajosa, que alcanza tallas de hasta 1m. de alto, sus tallos son más o menos ramificados y estriados, las hojas son lineares lanceoladas de 1 a 8.5 cm. de largo y de 1 a 9 mm de ancho, son agudas o acuminadas en el ápice, tienen un margen entero, están trinervadas y densamente punteadas en ambas caras, son sésiles o casi sésiles.

Su distribución latitudinal va de los 1200 a los 2850 m.s.n.m.

La inflorescencia está compuesta de numerosas cabezuelas, sésiles o sobre pedúnculos de hasta 3 mm de largo y dispuestas en densos conjuntos corimbiformes terminales.

Con respecto a los frutos y la semilla, el aquenio es oblongo, algo comprimido de 1 a 1.5 mm de largo con 4 a 5 costillas y con pelillos; en el ápice del fruto se puede o no presentar una estructura llamada villano que consiste de una inconspicua corona de diminutas escamas y tiene una sola semilla (4). (Rzendowski, 1985; SEMARNAT, 2004).

1.3 CLASIFICACION:

REINO: Plantae

DIVISION: Spermatophyta

SUBDIVISION: Angiospermae

CLASE: Dicotyledoneae

ORDEN: Asterales

FAMILIA: Asteraceae

TRIBU: Astereae

GENERO: *Gymnosperma*

ESPECIE: *Gymnosperma glutinosum*

NOMBRE CIENTIFICO: *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less



Figura 1. *G. glutinosum* (Spreng.) Less.

1.4 Etnobotánica y antropología

Esta planta es empleada en el Estado de México, Durango y Guanajuato para el tratamiento del reumatismo y el dolor de pies (Argueta et al., 1994). Se ha reportado el uso de las flores como antirreumático, como anti diarreico y analgésico (SEMARNAT, 2001). En Puebla se usa para aliviar los dolores de cabeza, jiones y piquetes de hormiga, también se emplea para las roturas de huesos en animales. Otras de las aplicaciones que se le atribuyen son el tratamiento contra la diarrea, fiebre amarilla y para soldar huesos, en Guerrero, se utiliza también para hacer limpias a los animales (Argueta et al., 1994). Las hojas y tallo se maceran en alcohol y se conservan ahí de 3 a 8 días, con esta mezcla se frota las partes a tratar; se puede beber, tomar baños con el cocimiento de las ramas, o aplicar en fomentos sobre las reumas o golpes.

2 APÉNDICE II

2.1 MEDIO DE CULTIVO

Medio Bactocasitona al 2%

Bactocasitona	20gr
Agua destilada	1 litro

Disolver la bactocasitona en un litro de agua, agitar hasta desaparecer grumos, y servir en frascos de vidrio con tapón de rosca de 250 ml. Esterilizar a 15 lb por un tiempo de 15mins. Dejar enfriar y refrigerar.

Antes de usar suplementar con 15ml de SFB al 10% y adicionar 25µl de Antibac en Earle 100x a cada frasco.

2.2 SOLUCION DE PBS 10X

Reactivo	1 litro
NaCl	80g
KCl	2g
Na ₂ HPO ₄	11.5g
KH ₂ PO ₄	2g

Disolver en agua bidestilada agregando uno a uno los reactivos y aforar a 1 litro, almacenar a 4°C.

2.3 SOLUCION DE PBS 1X

Reactivo	1litro
PBS 10x	50mL
Agua bidestilada	450mL

Diluir 50mL de PBS 10x en 450mL de agua bidestilada y servir en frascos de vidrio con tapón de rosca de 250mL y almacenar a 4°C. Antes de usar agregar 25µL de Antibac en Earle 100x

ABREVIATURAS

AVL	Amibas de Vida Libre
SNC	Sistema Nervioso Central
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MEAP	Meningoencefalitis Amebiana Primaria
EAG	Encefalitis Amebiana Granulomatosa
SFB	Suero fetal de bovino
AMB	Anfotericina B
MTT	(3-[4,5dimetilazol-2y1]-2,5difetil tetrasolio bromuro
pH	Potencial de Hidrógeno
μm	micrómetros
°C	Grados centígrados
ppm	partes por millón
rpm	revoluciones por minuto
cm ²	centímetros cuadrados
nm	nanómetros
min	minutos

$\mu\text{g/mL}$	microgramos / mililitro
m	metro
mm	milímetro
DL	Dosis letal
DL ₅₀	Dosis letal media

1 BIBLIOGRAFIA.

1. Ahmed A., Mahmoud H., Williams H., Scott A., Reibenspies J., Mabry T. 1993. New sesquiterpene a-methylene lactones Egyptian plant *Jansonia candicans*. *J. Nat. Prod.* **56**: 1276.
2. Anderson K., y Jamieson A. 1972. Primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet* **ii**: 379.
3. Andrade I. A., 2005. Efecto antimicrobiano de la raíz de *Gymnosperma glutinosum* (*Spreng.*) *Less.* Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.
4. Apley J., Clarke S., Roome A., Sandry SA., Saygi G., Silk G., y Warhurst DC. 1970. Primary amoebic meningoencephalitis in Britain. *Brit. Med. J.* **i**: 596.
5. Argueta, V. A., Cano, A. L., Roodsarte, M. E. 1994. Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana III. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. Pp. 1318-1319.
6. Barre J., Bowden B., Coll J., Jesus J., Fuente V., Janairo G., Ragasa C. 1997. A bioactive triterpene from *Lantana camara*. *Phytochemistry.* **45**: 321.
7. Belofsky C., Carreno R., Groswick Shannon M., John D. T., 2005. Activity of isoflavans of *Dalea aurea* (Fabaceae) against the opportunistic ameba *Naegleria fowleri*. *Plant Med.* **72**: 383-386.
8. Bonilla P. 2000. Heterogeneidad de las amibas de vida libre con potencial patógeno aisladas de la atmósfera de la Ciudad de México. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México. 106pp.
9. Brown, R.L., 1991. Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis. *Arch. Intern. Med.* **151**, 1201–1202.
10. Buchanan BB., Grissem W., Jones RL. 2002. *Biochemistry and Molecular Biology of plants.* Ed. American Society of Plant Biologists. USA. 1366 pp.
11. Butt C.G. 1966. Primary amoebic meningoencephalitis. *New Engl J. Med.* **274**:1473.
12. Butt CG. 1968. The pathology of amebic encephalitis. *J. Bull. Pathol.* **9**:83.
13. Calderón, J.E. 1997. Aplicación clínica de antibióticos y quimioterápicos. 7ª edición. Ed. Méndez editores. México. Pp. 7:47.

14. Callicott J.H.Jr. 1968. Amoebic meningoencephalitis due to free-living amebas of the Hartmanella (Acanthamoeba)-Naegleria group. *Am. J. Clin. Pathol.* **49**:84.
15. Canales M., Hernández T., Caballero J., Romo de Vivar A., Avila G., Durán A., Lira R. 2005a. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacol.* **97**: 429.
16. Canales M., Hernández T., Caballero J., Romo de Vivar A., Durán A., Lira R. 2005b. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacan-Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Bot. Mex.*
17. Canales M., Hernández T., Serrano R., Hernández LB., Durán A., Ríos U., Sigtist S., Hernández HL., García AM., Ángeles-López., Fernández-Araiza MA., Ávila G., 2007. Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: a comparative study. *J. Ethnopharmacol.* **21**;110(2):343-7.
18. Carter RF. 1970. Description of *Naegleria* sp. Isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and the experimental pathological changes induced by it. *J. Pathol.* **100**:217.
19. Cerva L., Kasprzak W. Y Mazur T. 1982. *Naegleria fowleri* in cooling waters of power plants. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **26**:152.
20. Coronado-Gutiérrez R. y López-Ochoterena E. 1980. Análisis protozoológico de diez piscinas localizadas en el Distrito Federal y el Estado de Morelos, México. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* **22**:157.
21. Cowan M. M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* p. 564–582.
22. Cronquist A. 1988. "On the taxonomic significance of secondary metabolites in angiosperms". *Plant Syst Evol.*, suppl **1**: 179-189.
23. Culbertson CG, Smith J. y Miner. J. 1958. Acanthamoeba: Observations on animal pathogenicity. *Science.* **127**:4506.
24. Davison College. www.le.ac.uk/ii/staft/sk46/simonacan3.jpg
25. De Jonckheere JF. 1977. Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and non pathogenic *Naegleria fowleri* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**:751.
26. De Jonckheere JF. 1978. Quantitative study of *Naegleria fowleri* in surface water. *Protistologica.* **14**:475.

27. De Jonckheere JF. 1979. Pathogenic free-living amoebae in swimming pools: survey in Belgium. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur.* **130B**:205.
28. De Jonckheere JF., Pernin P., Scaglia M. y Michel R. 1984. A comparative study of 14 strains of *Naegleria australiensis* demonstrates the existence of a highly virulent subspecies: *N. australiensis italica* n. spp. *J. Protozool.* **31**:324.
29. De Jonckheere JF. 1981. Pathogenic and non pathogenic *Acanthamoeba* spp. In thermally polluted discharges and surface waters. *J. Protozool.* **28**:56.
30. De Jonckheere JF., Pernin P., Scaglia M. y Michel R. 1984. A comparative study of 14 strains of *Naegleria australiensis* demonstrates the existence of a highly virulent subspecies: *N. australiensis italica* n. spp. *J. Protozool.* **31**:324.
31. Domingo, D., López- Brea, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia.* **16** (4): 385-393.
32. Duma RJ, Roseblum WI, McGehee RF, Jones MM, Nelson EC., 1971. Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria*. Two new cases, response to amphotericin B, and a review. **74**(6):923-31.
33. Fenchel T. 1987. Ecology of protozoa: The Biology of free-living Phagotrophic Protists. Springer Verlag, Wisconsin. 197pp.
34. Ferreira GE., Lares VF., Fernández QG., Nieburg P., Ruiz MC. 1997. Meningoencefalitis amibiana primaria: dos brotes en Mexicali, Baja California, México. *ITSON-DIEP.* **5**:43.
35. Fowler M. y Carter F. 1965. Acute pyogenic meningitis probable due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Brit. Med. J.* **2**:740.
36. Griffin JL. 1983. The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: Isolations competitors, ecologic interactions and the flagellate-empty habitat hypothesis *J. Protozool.* **30**: 403.
37. Goswick S. M., Brenner G. M. 2003. Activities of azithromycin and amphotericin B against *Naegleria fowleri* in vitro and in a mouse model of Primary Amebic Meningoencephalitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **47**:524.
38. Greenwood, D., Ogilvie M. M. 2002. Antimicrobial agents. In: Greenwood D., Slack C.B.R., Peutherer F. J. A guide to microbial infections: Medical microbiology pathogenesis. Immunity, laboratory diagnosis and control. 16^a edición. Ed. Churchill Livingstone. Pp 46-55.

39. Gros, G.E., Polilio; A: B:, Seldes, M:A:, Burton, G. 1985. Intruucción al studio de los productos naturales. Ed. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Estados Unidos. 145 p.
40. Guerra OM., Torres ID., Martínez PL. 2001. Validación del uso tradicional de plantas medicinales cultivadas en Cuba. Rev. Cubana Plant Med. **2**:48.
41. Harvey, A. 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. Drug Discovery Today. **5**(7):294-300.
42. Heinrich M., Robles M., West J. E., Ortiz de Montellano B. R., Rodriguez E. 1998. Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). Annual Review of Pharmacology and Toxicology; Palo Alto. **38**: 539.
43. Helander IM., Alakomi HL., Latava-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E. J., Gorris LGM. y Von Wright A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. Journal of Agricultura and Food Chemistry. **46**: 3590.
44. Hernández, F. 1959-1960. Historia Natural de Nueva España. Ed. G Somolinos D'Ardois, México D.F. UNAM. Vols.2 y 3.
45. Heywood, V. H., Harbone, J. B. & Turner, B. L 1997. The Biology and chemistry of the Compositae. Academic Press. New York. U.S.A 619p.
46. Hopkins, G. W, 1995. Introduction to plant Physiology. Ed. John Wiley & Sons Inc. E. U. pp 267-284.
47. Jain, R., Prabhakar, S., Modi, M., Bhatia, R., Sehgal, R., 2002. *Naegleria* meningoencephalitis: a rare survival. Neurol. India 50, 470–472.
48. John, D.T. & Howard, M.J. 1993. Opportunistically pathogenic free-living amebae. En: Kreier, J.P. & Baker, J.R. (eds.) Parasitic protozoa. Academic Press. San Diego California, U.S.A. 283): 143.
49. Kasprzak W., Mazur T. y Cerva, L. 1982. *Naegleria fowleri* in thermally polluted waters. Folia Parasitol. Prague. **29**:211.
50. Kilvington S., Beeching JR. Y White GD. 1991. Differentiation of Acanthamoeba strains from infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestion of whole cell DNA. J. Clin. Microbiol. **29**:310.
51. Kobayashi GS. Y Medoff G. 1977. Antifungal agents: Recent developments. Ann Rev. Microbiol. **31**:291.

52. Kyle DE., y Noblet GP. 1986. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. I. Willard's Pond. J. Protozool. **33**:422.
53. Kyle DE., y Noblet GP. 1987. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. II. Lake Issaqueena. J. Protozool. **34**:10.
54. Lares VF. 2001. Free-Living amoebae infections in México. Ixth. International Meeting on the Biology and Pathogenicity of free-living amoebae. John Libbey Eurotext. Paria, Francia. 13.
55. Lee J.J., Hutner S.H., and Bovve E.C. 1985. An Illustrade Guide to the Protozoa. Allen Press. Inc. Lawrence, U.S.A.
56. Levin, DA. 1976. "The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores". *Ann Rev. Ecol. Syst.* 7: 121-159.
57. López-Corrella E., De Leon BB. Y De Jonckheere JF. 1989. Meningoencefalitis amibiana primaria por *Naegleria fowleri* en un adolescente de Huetamos Michoacán, México. Bol. Med. Hosp.. Inf. Mex. **9**:619.
58. Marciano-Cabral F. 1988. Biology of *Naegleria* spp. Microbiological Rev. **52**:114.
59. Martínez AJ. y Amado-Ledo E. 1979. Meningoencefalitis y encefalitis producidas por amibas de vida libre. Protozoología. Epidemiología y Neuropatología. Morfología Normal y Patológica. **3**:679.
60. Martínez AJ. 1985. Free-living amebas: Natural History prevention, diagnosis, pathology and treatment of disease. CRC Press, Boca Ratón, Florida. U.S.A. 156p.
61. Martínez JA., y Visvesvara G. 1997. Free-Living, amphizoic and opportunistic amebas, Brain Pathol. 7:583.
62. McLaughlin J. L., 1991. Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassays for Higher Plant Screening and Fractionation. En Dey P. M., Harbone J. B. Hostettman K. (Ed.) Methods in plant Biochemistry Assays for Bioactivity. Academic Press USA. 6. 1-32.
63. Mendiola J., Bosa M., Perez N., Hernandez H., Torres D. 1991. Extracts of Artemisia abrotanum and Artemisa absinthium inhibit growth of *Naegleria fowleri* in vitro. Transac R Soc Trop Med Hyg. **85**:78.
64. Mims, C., Playfair J., Roitt I., Wakelin D., Williams, R. 1990. Microbiología médica. Ed Harcourt. Barcelona, España. Pp. 430-540.

65. Morton, J. 1981. Atlas of Medicinal Plants Of Middle America, Bahamas to Yucatan. Springfield, IL: Thomas. 420 pp.
66. Ortiz – Bermúdez, E., Villaseñor, J.L., Téllez O- 1993. La familia Asteraceae en el estado de Nayarit (México). Acta Botánica Mexicana. 44: 25-57.
67. Pan NR. y Ghosh TN. 1971. Primary amoebic meningoencephalitis in two Indian children. J. Freshwater Biol. Assoc. **56**:134.
68. Page FC. 1974. To further study of taxonomic criteria for limax amoebae with descriptions of three new species and to key to generates. Arch. Protistenk. **116**:149.
69. Page FC. 1976. An illustrated key to freshwater and soil amoebae with notes on cultivation and ecology. Freshwater Biological Association Scientific Publication, Londres. 180 pp.
70. Page FC. 1988. A new Key to Freshwater and soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association Scientific Publication, Londres. 122pp.
71. Pelczar JM., Reid DR+. Y Chan SC. 1982. Microbiologia. Mc Graw Hill, Nueva York. 826pp.
72. Pringle HL, Bradley SG y Harris IS. 1979. Susceptibility of *Naegleria fowleri* to Δ^9 -tetrahydrocannabinol. Antimicrob. Agents Chemother. **16**:674.
73. Rates S.M.K. 2001 Plants as source of drugs. Toxicon **39**: 603.
74. Reyes, 1993. Estudio Florístico en el Municipio de San Juan Mixtepec, Distrito de Juxtlahuaca, Oaxaca. Tesis Biólogo. UNAM. Campus Iztacala. Pp 1, 58
75. Rivera F. y Paz ME. 1978. Criterios taxonómicos para las amebas limax. Arch. Mex. Anat. **15**:72.
76. Rivera F., Ortega A., López-Ochoterona E. y Paz m. 1979. A quantitative, morphological, and ecological study of protozoa polluting tap waters in Mexico City. Trans. Amer. Micr. Soc. **98**:465.
77. Rivera F., Galvan M., Robles R., Leal P., González L. y Lacy AM. 1981. Bottled mineral waters polluted by protozoo in Mexico. J. Protozool. **28**:54.
78. Rivera F., Ramírez P., Vilaclara G., Robles E., y Medina F. 1983. A survey of pathogenic and free-living amoebae inhabiting swimming-pool waters in Mexico City. J. Environ. Res. **32**:205.

79. Rivera F., Romero R. y Medina F. 1984a. Meningoencefalitis amibiana primaria producida por *Naegleria fowleri*. Rev. Fac. Med. Mexico. **27**:113.
80. Rivera F., Medina F., Ramirez P., Alcocer J., Vilaclara G. Robles E. 1984b. Pathogenic and free-living protozoo isolated by culture from nasopharyngeal and oral regions of odontological patients. Environ. Res. **33**:428.
81. Rivera F., García G., Lugo A., Zierold E., Islas J., Ramírez E. y Bonilla P. 1986. Amoebae in a waste stabilization pond system in Mexico. Water, Air and Soil Pollution Journal. **28**:185.
82. Rivera F., Sánchez MR., Lugo A., Ramírez P. y Paulín A. 1987a Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. J. Environ. Res. **42**:149.
83. Rivera F., Sánchez MR., Lugo A., Ramírez P., Ortiz R. y Calderon A. 1987b. Ciliates in a waste stabilization pond system in México. Water, air and Soil Pollution. **34**:245.
84. Rivera F., Lares F., Bonilla p., Ramírez E., Ramírez P. y Paulin A. 1988. Pathogenic amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and Environs. In: Hazardous Waste: Detection, control, treatment. Ed. Abbou, R. Elsevier Science, Amsterdam: 1175.
85. Rivera F., Lares F., Gallegos E., Ramírez E., Bonilla P., Calderon A., Martínez J., Rodríguez S. y Alcocer J. 1989. Pathogenic amoebae in natural termal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico. J. Environ. Res. **50**:289.
86. Rivera F., Bonilla P., Ramírez E., Calderon A., Rodríguez S., Ortiz R., Hernández D. y Rivera V. 1994. Seasonal distribution o air-borne pathogenic and free-living amoebae in Mexico City and its suburbs. Water, Air and Soil Pollution. **74**:65.
87. Robert VB. y Rorke LB. 1973. Primary amebic encephalitis, probable from *Acanthamoeba*. Ann. Intern. Med. **79**:174.
88. Rodríguez, E., Aregullin, M., Nishida, T., Vehara, S., Wrangham, B., et al., 1985. Thiarubine A, a bioactive constituent of *Aspilia* (Asteraceae) consumed by wild chimpanzees. *Experientia* **41**:419-20.
89. Rodríguez-Pérez E. 1984. Meningoencefalitis por *Naegleria fowleri*. Informe de un caso. *Infectologia*. **4**:263.
90. Rodríguez S., Rivera F., Bonilla P., Ramírez E., Gallegos E., Calderón A., Ortiz R. y Hernández D. 1993. Amoebological study of the atmosphere of San Luis Potosí, SLP. México. *J. Exp. Anal. Environ. Epidemiol.* **3**: 229.
91. Rondanelli EG. 1987. Infectious Disensen. 1. Amphizoic Amoebae Human Pathology. Piccin Nuova Libreria, Padua, Italia. 279 pp.

92. Rzedowski, J C de Rzedowski G. 1972. Flora Fanerogámica del Valle de México. Vol. Ii. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN. México., Pp. 501-581.
93. Scaglia M., Strosselli M., Grazioli V., Bernuzzi M. y De Jonckheere JF. 1983. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria australiensis* (Amoebida, Vahlkampfiidae) from a spa in northern Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**:1282.
94. Schuster FL., 1979. Small amebas and ameboflagellates. En: Levandowsky M. y Hunter SH (eds) *Biochemistry and physiology of protozoa*, 1(2):215.
95. Schuster FL., Guglielmo BJ., Visvesvara GS., 2006. In- vitro Activity of Miltefosine and Voriconazole on Clinical Isolates of Free-Living Amebas: *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba* spp., and *Naegleria fowleri*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 53(2) pp. 121-126.
96. Seidel J.S., Harmats P., Visvesvara G.S., Cohen A., Edwards J., and Turner J. 1982. Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis. *New Engl. J. Med.* **306**:346.
97. SEMARNAT 2001. *Gymnosperma glutinosum*. Especies con usos no maderables en bisques de Encino, pino y pino-encino en los estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca.
98. SEMARNAT. 2004. www.semarnat.gob.mx7pfnm/GymnospermaGlutinosum.html
99. Serrano P.R., 2004. Estudio comparativo de la actividad antibacteriana de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. de dos localidades: San Rafael Coxcatlán, Puebla y Tepeji del Río, Hidalgo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
100. Serrano P.R., 2007. Variación espacio temporal de metabolitos con actividad antifúngica de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. (Asteraceae), del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Estudios Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
101. Summer, J. 2001. *The natural history of medicinal plants*. Ed. Timber Press. Portland Oregón, USA. Pp 15-31, 89-99.
102. Swain, T (editor). 1973. *Chemistry in evolution and systematics*. Butterworth, Londres.
103. Sykora JL., Keleti G. y Martinez J. 1983. Occurrence and pathogenicity of *Naegleria fowleri* in artificial heated waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:974.

- 104.Thong YH. Rowan B, y Ferrante A. 1979. Treatment of experimental *Naegleria* meningoencephalitis with amphotericin B and rifamycin. Scand. J. Infect. Dis. **11**:151.
- 105.Tona L., Kambu K., Ngimbi K., Cimanga K., Vlietinck AJ. 1998. Antiamebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. J. Ethnopharmacology. **61**:57.
- 106.Trease, G. E. y Evans, W: C: 1993. Tratado de Farmacognosia. 15^a ed. Ed. Interamericana. México. Pp 728-730.
- 107.Tyndall RL., Ironside KS., Metler PL. Tan EL., Hazen TC. Y Fliermans CB. 1989. Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. Appl. Environ. Microbiol. **55**:722.
- 108.Urzúa A., Caroli M., Vasquez L., Mendoza L, Wilkens M., Tojo E. 1998. Antimicrobial study of the resinous exudates and diterpenoids isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). J. Ethnopharmacology. 62 (1998) 251-254.
- 109.Valenzuela G., López-Corella E. y De Jonckheere JF. 1984. Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern Mexico. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **78**-558.
- 110.Vargaz J, Gómez A., Vazquez J., Licea L., De Jonckheere J., Lares F., 2004. Successful treatment of *Naegleria* meningoencefalitis by using intravenous Amphotericin B, Fluconazole and Rimfampicic. Archives of Medical Research 36 (2005) 83-86.
- 111.Villada. M. M. 1888. Apuntes acerca de plantas de la familia de las compuestas empleadas en la medicina. Gaceta Med. México 23:147-55.
- 112.Visvesvara G.S., Martínez, A.J., Theodore, F.H., Daggett, P.M., and Sawyer T.K. 1990. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: Review. Reviews of Infectious Diseases. **12**:490.
- 113.Visvesvara G.S., Schuster FL. y Martinez J. 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N.G., N. Sp., Agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. J. Euk. Microbiol. **40**:504.
- 114.Wang, A., Kay, R., Poon, W.S., Ng, H.K., 1993. Successful treatment of amoebic meningoencephalitis in a Chinese living in Hong Kong. Clin Neurol. Neurosurg. 95, 249-252.
- 115.Wellings FM., Amuso SL. y Lewis AL. 1977. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida lakes. Appl. Environ. Microbiol. 34:661

116. Wellings FM., Amuso SL. y Lewis AL., Farmelo MJ. Moody DJ. y Oiskowics CL.
1979. Pathogenic *Naegleria*, Distribution in Nature. Environmental Protection Agency,
Cincinnati, EPA/600-1-79-018