



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

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

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

ROBERTO MENDOZA GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY



Los Reyes Iztacala, Edo. De México 2012.



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

A la FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA por brindarme la oportunidad de adentrarme al mundo fascinante de lo que es la Biología, por darme la oportunidad de aprender y forjarme como profesional.

Este trabajo de tesis no hubiera sido posible sin el apoyo recibido por el proyecto PAPIIT IN219310 y PAPCA 2010-2011 Proyecto 5.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy director de este trabajo una de las personas que admiro por su vasto conocimiento, a quien debo su confianza en mi persona, amistad y por su valiosa ayuda desde mis primeros pasos por el laboratorio.

Mi más profundo agradecimiento a cada uno de los miembros de mi comité tutorial, Dra. Ma. Margarita Canales Martínez por su exigencia, así como por el apoyo, por sus comentarios en todo el proceso de elaboración de la Tesis así como por el ánimo que me brindó, a la M. en C. Ma. De los Ángeles Sanabria Espinoza por la atenta lectura de este trabajo y sus valiosas observaciones, por último pero no menos importante al M. en C. Ricardo Ortiz Ortega así como al Biólogo Antonio Muñoz Torres quienes me ayudaron con su asesoría para culminar de la mejor manera este trabajo.

Sin lugar a duda todo esto nunca hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de la gente que, sin esperar nada a cambio, estuvo presente en este camino que decidí recorrer, y que recién comienza. Gracias a todos!

Con todo mi cariño a mis padres, como un tributo más del invaluable amor y educación que han sembrado en mi, de ellos es este triunfo y para ellos es todo mi agradecimiento. Su hijo que los ama Roberto ...

A mi familia. Mi hermana Sandra, eres la mejor hermana que un hermano pudo tener, gracias. A mi sobrino Axel que algún día entenderá todo esto, también te dedico esta tesis, te quiero muppet. Esto también es de ustedes.

De manera muy especial a Antonia quien ha estado a mi lado compartiendo mis alegrías y angustias. Solo quiero darte las gracias por todo el apoyo que me has dado para continuar y seguir con mi camino, recuerda que eres muy importante para mí, te quiero mucho.

Finalmente reservo estos últimos momentos de expresión profunda a mis compañeros y amigos* (la pandilla). Ya que sin su compañía y amistad no hubiera sido lo mismo transitar esta etapa de mi vida. Por las cosas que vivimos juntos, esos momentos y emociones siempre estarán grabados en el corazón.

A los futuros Biólogos y quienes ya lo son, personas especiales que estuvieron presentes en la que hasta hoy ha sido la mejor etapa de mi vida mis amigos* Fatimux, Rouse, Blanca, Ari, RBK, Tomas, Mane, Kike, mil gracias por todo y lo que aun nos resta por compartir, porque han estado conmigo aunque sea solo para dar lata y molestar. Solo me queda decirles que son geniales!

ÍNDICE GENERAL

1	RESUMEN	9
2	INTRODUCCIÓN.....	11
2.1	Generalidades de las amibas de vida libre	11
2.2	Ecología de las amibas de vida libre.....	11
2.3	<i>Naegleria fowleri</i>	12
2.4	Infecciones en Humanos	13
2.5	Antecedentes.....	14
2.6	Importancia de las plantas medicinales en la búsqueda de nuevos fármacos	15
2.7	Generalidades de Flavonoides	17
2.8	Biosíntesis de flavonoides	17
2.9	Actividad biológica	20
3	JUSTIFICACIÓN.....	22
4	HIPÓTESIS.....	24
5	OBJETIVO GENERAL	26
6	OBJETIVOS PARTICULARES	26
7	MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
7.1	RECURSOS BIOLÓGICOS.....	28
7.1.1	Amibas	28
7.1.2	Ratones.....	28
7.1.3	Bioensayos preliminares.....	28
7.2	CULTIVO DE AMIBAS	28
7.3	REACTIVACIÓN DE LA VIRULENCIA.....	28
7.4	CURVA PATRÓN PARA LOS ENSAYOS DE VIABILIDAD DE LOS TROFOZOÍTOS DE <i>N. fowleri</i> CON LA FLAVANONA ERIDICTIOL	29
7.5	DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL (DL) Y LETAL MEDIA (DL ₅₀) DE LA FLAVANONA ERIDICTIOL	29
7.6	PRUEBA DE TOXICIDAD GENERAL: MÉTODO DE TOXICIDAD GENERAL (McLaughlin, 1991).....	30
7.7	CONTROL NEGATIVO	30

7.8	CONTROL POSITIVO	30
7.9	INCUBACIÓN	30
7.10	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	30
8	RESULTADOS Y ANÁLISIS	33
8.1	REACTIVACIÓN DE VIRULENCIA DE LOS TROFOZOÍTOS DE <i>Naegleria fowleri</i> 33	
8.2	ENSAYO DEL EFECTO DE LA ANFOTERICINA B.....	33
8.3	ENSAYO DEL EFECTO DE LA FLAVANONA ERIODICTIOL SOBRE <i>Naegleria fowleri</i> 33	
8.4	CURVA PATRÓN PARA LOS ENSAYOS DE VIABILIDAD DE LOS TROFOZOÍTOS DE <i>N. fowleri</i> CON LA FLAVANONA ERIODICTIOL	34
9	DISCUSIÓN.....	39
10	CONCLUSIONES	42
11	APÉNDICE	44
11.1	Familia Asteraceae	44
11.2	<i>Gymnosperma glutinosum</i> (Spreng.) Less. Asteraceae.....	44
11.3	Sinonimia popular.....	45
11.4	Botánica y ecología.....	45
11.5	Clasificación	46
11.6	Etnobotánica y antropología.....	46
12	BIBLIOGRAFÍA	49

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

FIGURAS

Fig. 1 Ciclo de vida de <i>Naegleria fowleri</i>	13
Fig. 2 Biosíntesis de flavonoides	19
Fig. 3 Curva patrón de <i>N. fowleri</i> , datos de los resultados obtenidos de tres repeticiones del ensayo de MTT.	34
Fig. 4 Microscopía electrónica de transmisión donde se observa los daños que presentan los trofozoítos de <i>N. fowleri</i> al interactuar con las diferentes concentraciones de la flavanona Eriodictiol.....	35
Fig. 5 Actividad de la flavanona Eriodictiol sobre la curva de crecimiento de <i>N. fowleri</i>	36
Fig. 6 Resultados de la prueba de toxicidad general.....	37
Fig. 7 <i>G. glutinosum</i> (Spreng.) Less.....	45

CUADROS

Cuadro 1. Interpretación de la actividad tóxica general según el método modificado de Niño et al., 2006.	31
Cuadro 2. Dosis letal y letal media obtenidas en los ensayos de Anfotericina B y Eriodictiol sobre <i>N. fowleri</i>	33
Cuadro 3. Resultados del ensayo de toxicidad general y de la DL ₅₀ de Eriodictiol.....	36
Cuadro 4. Resultados de la prueba de toxicidad general	37

ABREVIATURAS

MEAP	Meningoencefalitis Amebiana Primaria
MTT	(3-[4,5dimetilazol-2y1]-2,5difenil tetrasolio bromuro
DL	Dosis Letal
DL ₅₀	Dosis Letal Media
µg/mL	microgramos / mililitro
µL	microlitro
AVL	Amibas de vida libre
°C	Grados centígrados
cm ²	Centímetros cuadrados
SNC	Sistema nervioso central
PAL	Fenilalanina amonioliasa
SFB	Suero fetal de bovino
DMSO	Dimetil sulfóxido
NaCl	Cloruro de sodio
AMB	Anfoterisina B
mg/mL	miligramos / mililitro
rpm	revoluciones por minuto
nm	nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
DNA	Ácido desoxirribonucleico

RESUMEN

1 RESUMEN

Naegleria fowleri es el agente etiológico de la Meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP). Este protozooario invade a su hospedero penetrando al epitelio de la mucosa olfatoria. Durante las etapas iniciales de la infección, la respuesta del hospedero se caracteriza por una extensa secreción de moco que atrapa a los trofozoítos, seguida de infiltrado inflamatorio. A pesar de esta respuesta, algunos trofozoítos son capaces de adherirse y penetrar el epitelio. En el presente trabajo se probó el efecto antiamebiano de la flavanona Eriodictiol obtenida de la resina de la especie *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less., por ser una planta que tiene múltiples usos en la medicina tradicional mexicana, y que en recientes años se ha comprobado que la resina de esta planta presenta actividad amebicida contra el *N. fowleri*.

Con el fin de conocer si la flavanona Eriodictiol confiere tal efecto se realizaron ensayos de viabilidad con amibas de la especie *N. fowleri*, mediante la técnica de MTT, para posteriormente determinar las Dosis letal (DL) y Letal media (DL₅₀), de la flavanona Eriodictiol; como medicamento de referencia se utilizó Anfotericina B. La actividad amebicida se determinó por medio del efecto de la flavanona sobre la curva de crecimiento de *N. fowleri*.

Los resultados indican que la flavanona Eriodictiol tiene actividad sobre *N. fowleri* (DL₅₀= 74.5µg/mL), que puede ser utilizada in vitro como amebicida (117.9µg/mL). En el análisis estructural usando microscopia electrónica de transmisión mostró cambios morfológicos en los trofozoítos a nivel de membrana y que sobre el modelo de *Artemia salina* mostró una toxicidad media (462µg/mL).

INTRODUCCIÓN

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

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades de las amibas de vida libre

Las amibas de vida libre (AVL) presentan en general una distribución cosmopolita y son ubicuas en la naturaleza. Las especies patógenas son mayormente termotolerantes (Martínez, 1985). Su hábitat principal es el suelo y desde ahí pueden llegar a los cuerpos de agua arrastradas por escurrimientos o a través del aire (Rivera *et al.*, 1994). Desempeñan un papel fundamental en el flujo energético y en el reciclado de los nutrimentos. Su crecimiento rápido, así como el hecho de ser un enlace fundamental entre desintegradores y niveles tróficos superiores, las convierten en un eslabón importante en las cadenas alimentarias acuáticas (Fenchel, 1987). Las AVL se encuentran en mayor proporción en la microcapa superficial, debido a la abundancia de nutrimentos y al establecimiento de quistes aéreos (Kyle y Noblet, 1986).

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).

2.2 Ecología de las amibas de vida libre

Las amibas de vida libre del género *Naegleria* y *Acanthamoeba* han sido identificadas en distribuciones amplias alrededor del mundo, y se han aislado de diversos materiales tales como: agua de río, piscinas, agua mineral, unidades de aire acondicionado, equipos de diálisis, lentes de contactos e incluso de las secreciones nasales y exudados faríngeos de pacientes con enfermedades respiratorias, pero también de pacientes sanos (John, 1982).

La mayoría de las enfermedades infecciosas en el hombre involucran la interacción de los patógenos con las superficies mucosales. Una de estas enfermedades es la Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MEAP) una infección del sistema nervioso central, provocada por *Naegleria fowleri* una amiba de vida libre que infecta a través del epitelio olfatorio. De ahí viaja a través de los plexos nerviosos hasta llegar al cerebro donde provoca la enfermedad, la cual se caracteriza por ser aguda y rápidamente mortal (Jarolim *et al.*, 2000).

2.3 *Naegleria fowleri*

Es un amoeboflagelado de vida libre que crece normalmente en climas tropicales o subtropicales a temperaturas de 37°C (Marciano-Cabral, 1988).

El trofozoíto es el estadio invasivo, su periodo de incubación varía de dos días a tres semanas, dependiendo del tamaño del inóculo y de 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 por donde penetran directamente a la cavidad craneal a través del nervio olfatorio, constituyéndose de esta manera la ruta de diseminación de las amibas a otras partes del encéfalo y del espacio subaracnoideo vascular (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.

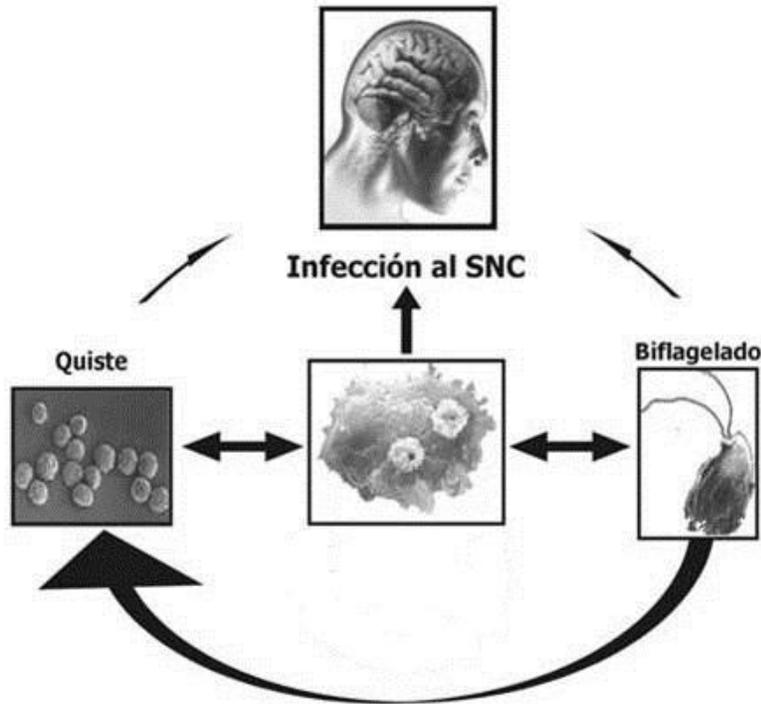


Fig. 1 Ciclo de vida de *Naegleria fowleri*

2.4 Infecciones en Humanos

La infección causada por *N. fowleri* (MEAP), se presenta en individuos jóvenes y sanos, con el antecedente reciente de haber realizado actividades deportivas en el agua (Ferreira *et al.*, 1994).

Es una infección aguda que afecta al sistema nervioso central (SNC). Debido a la amplia distribución de estos organismos, cualquier cuerpo de agua cálida, no tratada adecuadamente, puede representar un riesgo de infección. La ameba entra por las fosas nasales y viaja a través del neuropitelio olfatorio hasta alcanzar el SNC (Jarolim *et al.*, 2000).

El periodo de incubación se calcula entre uno y quince días. Los síntomas de la MEAP se presentan de 1 a 2 días después de la exposición al agua contaminada (Cervantes, 2009).

El cuadro clínico tiene un inicio súbito, con curso rápido y fulminante, caracterizado por cefalea frontal, bitemporal intensa, fiebre (de 38.2 a más de 40°C), náusea, vómito (proyectil), y signos de irritación meníngea: rigidez de nuca, encefalitis, fotofobia, edema cerebral, convulsiones, hipertensión intracraneal, progreso rápido a letargia, confusión y coma (Ferreira *et al.*, 1994).

2.5 Antecedentes

El tratamiento es agresivo, con fármacos de alta toxicidad, ineficaz en la mayoría de los casos. El fármaco de elección contra *N. fowleri* es principalmente el antimicótico Anfotericina B, pero solamente es efectivo cuando se administran al inicio de la infección (Martínez y Visvesvara, 1997; John, 1993; Martínez, 1985).

El mecanismo de acción de este fármaco señala la unión a los esteroides de la membrana de las células eucariotas, con mayor afinidad al ergosterol de los hongos, provocando la muerte del mismo.

Aunque la Anfotericina B es el medicamento más usado para tratar la MEAP, su uso y la evolución de la misma, han demostrado que no es totalmente eficaz. Lo anterior, más el hecho de que este medicamento es nefrotóxico, debido a que también presenta afinidad por el colesterol, un esteroide común en células humanas (Cervantes, 2009).

El problema del uso de la Anfotericina B, radica 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 Anfotericina B tanto en eficacia como en la disminución de los efectos colaterales.

2.6 Importancia de las plantas medicinales en la búsqueda de nuevos fármacos

En la actualidad, aproximadamente un 80% de los medicamentos considerados en los programas de salud primaria, provienen de plantas por lo que resulta evidente que las plantas medicinales siguen siendo una fuente importante de principios activos de interés terapéutico (Lozoya, 1989). La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce el valor de esta práctica terapéutica y le otorga gran importancia en los esquemas o sistemas públicos para la salud.

En el caso particular de México, el uso de plantas medicinales para tratar una gran variedad de enfermedades tiene sus orígenes en la época prehispánica (Guevara, 1997). El rescate y la validación de estos conocimientos y recursos biológicos son recientes, pues datan apenas de hace 25 años (Aranda *et al.*, 2003). De 1930 a 1970 se produjo una drástica disminución en el uso de sustancias naturales con propiedades medicinales. Esto fue provocado por la producción, a gran escala, de productos sintéticos con características similares aparentemente de mayor eficacia curativa.

Sin embargo, al presentarse un surgimiento de enfermedades que se creían erradicadas (paludismo, parasitosis, tuberculosis, etc.), así como la creciente incidencia de cáncer y la aparición del SIDA, se ha considerado necesario y urgente intensificar la búsqueda de nuevas sustancias particularmente en las plantas de las que se tiene pruebas de sus virtudes medicinales (Romero *et al.*, 2005). En México se han registrado alrededor de 4500 especies con atributos medicinales, de estas especies sólo el 11% se ha estudiado químicamente, el 2.6% de forma biodirigida y sólo el 1.9% a nivel farmacológico y toxicológico (Mata, 2002). Las plantas medicinales no son inocuas; tienen efectos terapéuticos en el ser humano e implican riesgos cuando se emplean de forma inapropiada.

Por esta razón es necesario realizar el estudio fotoquímico, farmacológico, toxicológico y clínico de las plantas, que resulten en el conocimiento y validación de las propiedades terapéuticas de los productos naturales, como una alternativa para la obtención de compuestos activos, útiles en el desarrollo de fármacos que permitan resolver problemas de salud tanto en los países en desarrollo como en los industrializados. La abundancia y diversidad de los recursos naturales de México, son fuente potencial para el hallazgo de estos compuestos con aplicación terapéutica (OMS, 2002).

En cuanto al tratamiento de las amebiasis, las investigaciones con respecto a la creación de nuevos fármacos ha sido constante en los últimos 25 años. Esta ha sido una tarea que a nivel mundial ha llevado al estudio de las plantas que se utilizan en la medicina tradicional en todo el mundo, sobre todo en aquellos países de tercer mundo donde este conocimiento es amplio y se mantiene hasta la actualidad.

Muchos trabajos están enfocados a probar extractos que presenten efectos en contra del agente patógeno y al mismo tiempo también se busca aislar sustancias cuya actividad sea similar o comparable con los fármacos convencionales usados en el tratamiento (Olvera-Bautista, 2008).

Una de las plantas que ha reportado una alta actividad antimicrobiana es *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), (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.*, 2005). 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).

El trabajo llevado a cabo por Peña-Juárez (2009) donde comprobó que la resina de *Gymnosperma glutinosum* tiene actividad amebicida y amebostática sobre trofozoítos de *N. fowleri*, además determinó que la toxicidad de esta resina no es alta. Recientemente, en el laboratorio de Farmacognosia de la FES Iztacala se ha logrado caracterizar uno de los componentes que conforman la resina de *G. glutinosum*. Este metabolito secundario corresponde al grupo de las flavanonas.

2.7 Generalidades de Flavonoides

Los flavonoides son la subclase de polifenoles más grande y abundante del mundo vegetal. Se distribuyen en las plantas y la variedad de sus propiedades biológicas ha llamado poderosamente la atención de los investigadores, de modo que es el grupo de polifenoles más estudiado (Álvarez y Orallo, 2003).

Son compuestos de bajo peso molecular y comparten el esqueleto común de difenilpiranos: dos anillos bencénicos unidos a través de un anillo de pirona. Su estructura molecular consiste en un esqueleto de 15 átomos de carbono (C₁₅). La biosíntesis de esta unidad C₆C₃C₆, deriva de dos rutas separadas.

2.8 Biosíntesis de flavonoides

Los flavonoides se biosintetizan en las plantas a partir de la ruta mixta malonil-CoA – ácido siquímico. Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina (1) y 3 moléculas de malonil-CoA.

La fenilalanina por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) se transforma en ácido cinámico (2), que luego es transformado en ácido *p*-cumárico (3) por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel de anillo aromático, y por acción de una CoA ligasa lo transforma en cumaril-SCoA (4), el precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal, entre los que se encuentran los flavonoides, posteriormente se condensa con tres unidades de malonil-CoA (5), con la posterior ciclación se obtiene la estructura de los flavonoides, donde el anillo A se forma por vía del malonil-CoA, mientras que en anillo B y C se forman por vía del ácido siquímico (Wagner y Farkas, 1975), (Figura 2).

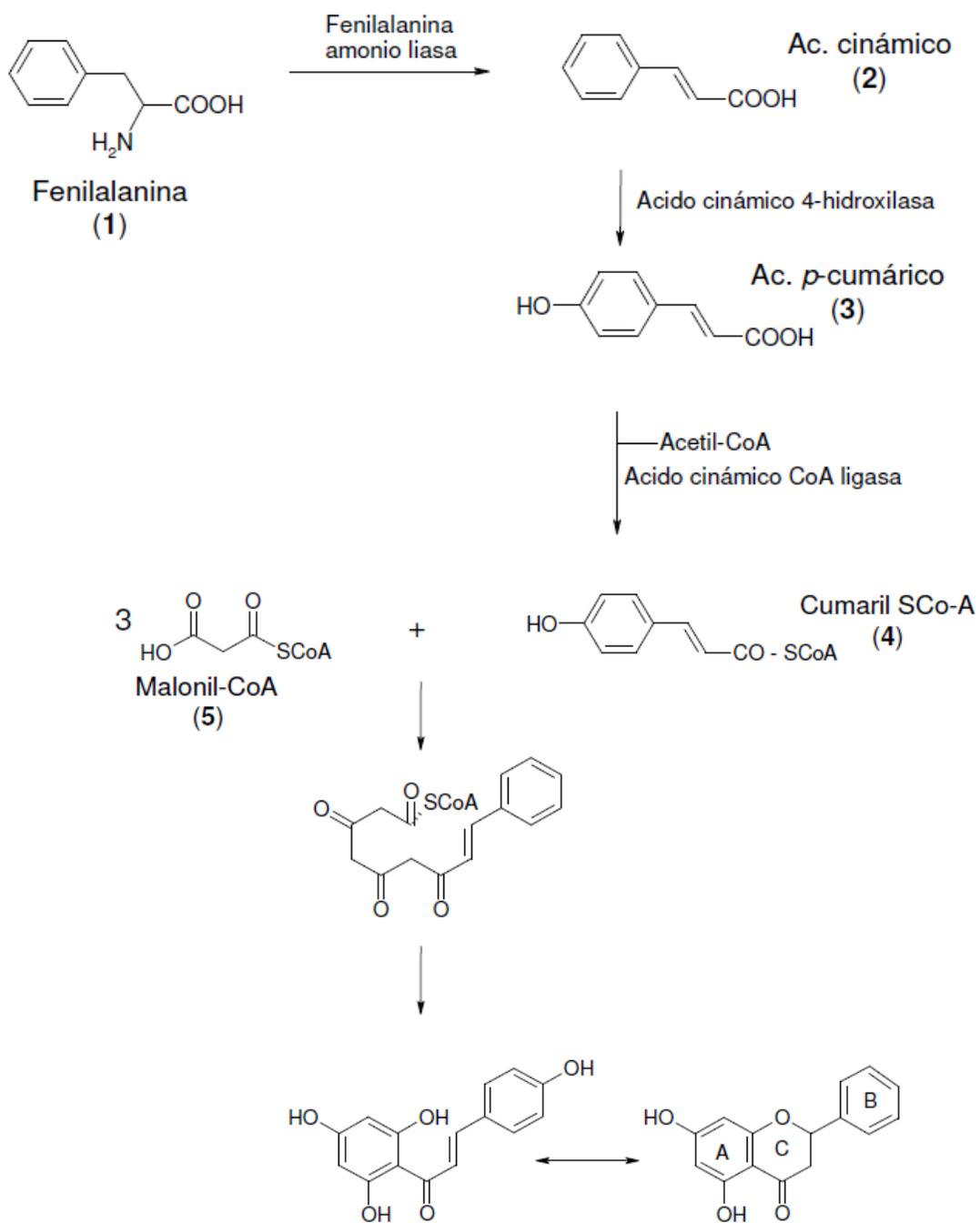


Fig. 2 Biosíntesis de flavonoides

Los pasos subsecuentes conducen a la formación de varios flavonoides, los cuales controlan los patrones de hidroxilación, los niveles de oxidación, las posiciones de O-metilación y la glicosilación (Albornoz, 1980). Dependiendo de las posiciones de las hidroxilaciones y/o grupos metoxilos se pueden subclasificar en: flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas y chalconas (Harborne y Williams, 2000).

Las flavanonas, flavonas y flavonoles son los flavonoides presentes en los cítricos. Estos compuestos han mostrado ser potentes antioxidantes, secuestrantes de radicales libres o agentes que contribuyen a la acción anticancerígena y cardioprotectora entre otras (Moreno *et al.*, 2007).

2.9 Actividad biológica

Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que contribuye al fenómeno de polinización (Soto, 2008).

Los flavonoides han adquirido notoriedad pública a raíz de actividad biológica en el hombre, que los consume con los vegetales. Se han descrito para los flavonoides propiedades muy apreciadas en medicina, como antioxidantes, antiinflamatorias, antiagregantes, antihemorrágicas antiprotozoarias y hepatoprotectoras (Barbosa, 2007).

JUSTIFICACIÓN

3 JUSTIFICACIÓN

Dada la importancia médica que presenta la MEAP enfermedad aguda, rápidamente progresiva y fatal que tiene como agente causal a *N. fowleri*. Los antibióticos usados para tratar la MEAP no son efectivos en una infección por *N. fowleri*, además de presentar efectos adversos. Por ello ha habido interés en la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas derivadas de la medicina tradicional.

Dicha búsqueda ha llevado al aislamiento de compuestos derivados de plantas con actividad anti amebicida, cabe destacar que dentro de los compuestos, en donde se han encontrado dicha actividad contra *N. fowleri* se encuentra la resina de *G. glutinosum*. Sin embargo hasta el momento no existen trabajos dirigidos a determinar qué compuesto es el causante de dicha actividad.

Aunque cabe mencionar la importancia de los flavonoides y su acción antiprotozoaria.

Flavonoides como exiguaflavanona A y B aisladas de *Artemisia indica*, exhiben *in vitro* actividad contra *P. falciparum*. Los extractos ricos en flavonoides aislados de propóleo, fueron reportados por exhibir *in vitro* actividad contra *Trypanosoma cruzi*. Otros flavonoides, aislados de *Helianthemum glomeratum* y de *Geranium mexicanum*, exhiben *in vitro*, actividad contra *Giardia lamblia* (Ramírez, 2010).

Dado a los estudios referidos y al antecedente presentado por Peña-Juárez en 2009 donde se confirma que la resina de *G. glutinosum* en estudios *in vitro* tiene actividad antiamebiana sobre *Naegleria fowleri*, por esta razón y con el fin de determinar, si existe una relación entre tal efecto con la presencia de la flavanona Eridictiol presente en la resina de *G. glutinosum* por lo que es necesario la realización del presente trabajo.

HIPÓTESIS

4 HIPÓTESIS

Si se ha demostrado que la resina de *Gymnosperma glutinosum* en estudios *in vitro* tiene actividad antiamebiana sobre *Naegleria fowleri* por lo cual debe ser una fuente de compuestos como lo son diterpenos y flavonas que están presentes en la mayoría de las resinas de las plantas de la familia *Asteraceae* como en el caso de la especie *Gymnosperma glutinosum*, se ha logrado caracterizar uno de los componentes que conforman la resina. Este metabolito secundario corresponde al grupo de las flavanonas denominado Eriodictiol, por lo cual dicha flavanona confiera la actividad amebicida a la resina de *G. glutinosum* que ha demostrado en trabajos previos.

OBJETIVOS

5 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad *in vitro* de la flavanona *Eriodictiol*, obtenida de *Gymnosperma glutinosum* sobre la amiba *Naegleria fowleri*.

6 OBJETIVOS PARTICULARES

- 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 flavanona Eriodictiol sobre *Naegleria fowleri* mediante la técnica de MTT.
- Determinar la toxicidad de la flavanona Eriodictiol mediante la prueba de toxicidad general de McLaughlin.

MATERIAL Y MÉTODOS

7 MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 RECURSOS BIOLÓGICOS

7.1.1 Amibas

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

7.1.2 Ratones

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

7.1.3 Bioensayos preliminares

La flavanona Eriodictiol fue obtenida y proporcionada por la Dra. Canales del Laboratorio de Farmacognosia UBIPRO, UNAM FES Iztacala.

7.2 CULTIVO DE AMIBAS

Se cultivaron axénicamente en frascos Corning de 75 cm² con 30 ml 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.

7.3 REACTIVACIÓN DE LA VIRULENCIA

Se realizó en 1 ratón anestesiado con éter, al que se le inoculó por vía intranasal 2×10^5 trofozoítos de *N. fowleri*, utilizando una micropipeta. Se tuvo en observación durante 9 días aproximadamente, que fue el tiempo durante el cual aparecieron los síntomas y evolucionó la enfermedad. 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.

7.4 CURVA PATRÓN PARA LOS ENSAYOS DE VIABILIDAD DE LOS TROFOZOÍTOS DE *N. fowleri* CON LA FLAVANONA ERIODICTIOL

Para probar el efecto de la flavanona 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 μ L de medio de cultivo, posteriormente a todos los pozos se les agregó 25 μ 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 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO), dejando reposar la placa por 15 min en oscuridad. Como último paso del procedimiento, se leyó la absorbancia a 595 nm 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.

7.5 DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL (DL) Y LETAL MEDIA (DL₅₀) DE LA FLAVANONA ERIODICTIOL

Para probar el efecto de la flavanona sobre las amibas, se colocaron en una placa de cultivo de 96 pozos 2×10^4 trofozoítos por pozo en 200 μ L de medio de cultivo (Goswick y Brenner 2003), a todos los pozos se agregaron diferentes concentraciones de la flavanona (10, 50, 100 y 150 μ g/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, posteriormente se agregaron 200 μ L de medio más 25 μ L 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 μ L 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 flavanona.

Para el control positivo se utilizó como referencia Anfotericina B el fármaco empleado para el tratamiento de la MEAP, para el que se realizó el procedimiento anterior empleando las concentraciones siguientes de 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{g/mL}$ (Groszcki y Brenner, 2003).

7.6 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 10 ml de NaCl al 0.5%; posteriormente se colocaron 10 larvas por frasco. Las concentraciones del problema a ensayar fueron 1,000, 100 y 10 $\mu\text{g/mL}$.

7.7 CONTROL NEGATIVO

Como control negativo se utilizó dimetil sulfóxido (DMSO), el cual es disolvente empleado para la disolución del problema, se empleó el mismo volumen en el que se disolvió la concentración más alta de la flavanona Eriodictiol.

7.8 CONTROL POSITIVO

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

7.9 INCUBACIÓN

Los cultivos se mantuvieron iluminados con luz blanca a una temperatura de 23-25 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

7.10 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 (DL₅₀) se determinó interpolando en gráficas de porcentaje de mortalidad contra la concentración en µg/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 DL₅₀ se encuentra entre 500 y 1000µg/mL, moderada cuando se encuentra entre 100 y 500 µg/mL, y fuerte entre 0 y 100 µg/mL (Cuadro 1).

Toxicidad	Concentración de DL₅₀ (µg/mL)
Débil	501 a 1000
Moderada	100 a 500
Alta	0 a 99

Cuadro 1. Interpretación de la actividad tóxica general según el método modificado de Niño et al., 2006.

RESULTADOS

8 RESULTADOS Y ANÁLISIS

8.1 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.

8.2 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 0.166 µg/mL y la dosis letal de (2.6µg/mL) (Cuadro 2).

8.3 ENSAYO DEL EFECTO DE LA FLAVANONA ERIODICTIOL SOBRE *Naegleria fowleri*

Por último se realizaron los ensayos con la flavanona Eriodictiol 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.

	Dosis Letal (DL)	Dosis Letal Media (DL₅₀)
Eriodictiol	117.9 µg/mL	74.5 µg/mL
Anfotericina B (AMB)	2.6 µg/mL	0.166 µg/mL

Cuadro 2. Dosis letal y letal media obtenidas en los ensayos de Anfotericina B y Eriodictiol sobre *N. fowleri*

En el cuadro anterior se muestran las concentraciones a las que Eriodictiol 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 sólo

tiene efecto letal sobre la mitad de la población de amibas empleadas en el ensayo.

Todas estas concentraciones fueron calculadas a partir de la interpolación de los valores de absorbancia dentro de la curva patrón.

8.4 CURVA PATRÓN PARA LOS ENSAYOS DE VIABILIDAD DE LOS TROFOZOÍTOS DE *N. fowleri* CON LA FLAVANONA ERIODICTIOL

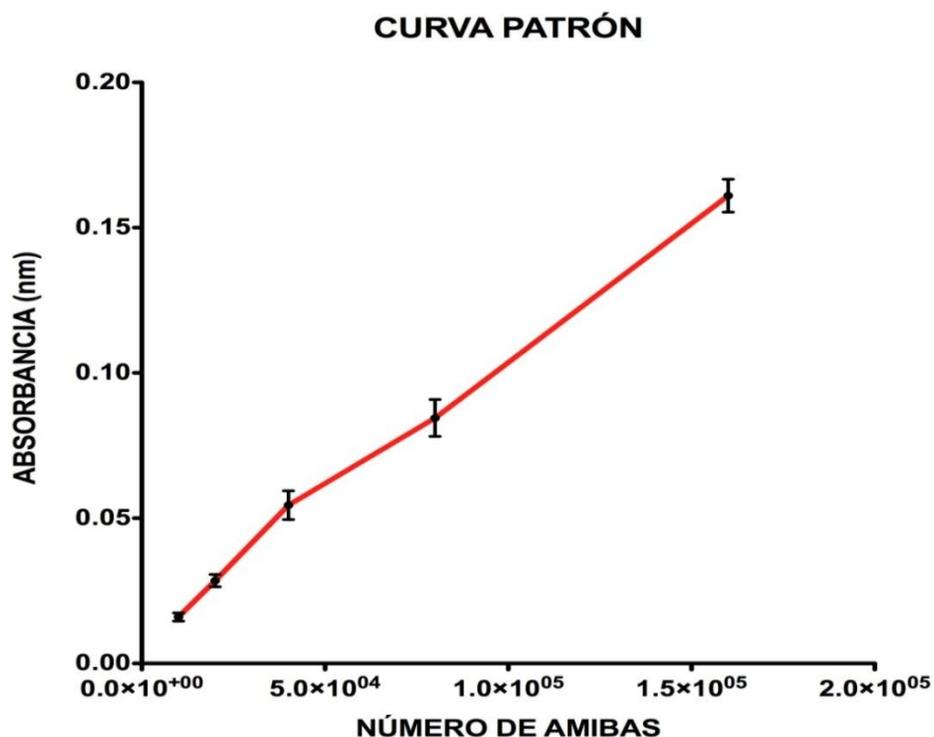


Fig. 3 Curva patrón de *N. fowleri*, datos de los resultados obtenidos de tres repeticiones del ensayo de MTT.

En la Figura 4. Se observa por microscopía electrónica de transmisión, los daños causados por la flavanona Eriodictiol a la membrana de los trofozoítos, (A) control, B) tratamiento DL, C) tratamiento DL₅₀ observándose el daño que causó el Eriodictiol a una concentración de 117.9 mg/mL (DL) y 74.5 mg/mL (DL₅₀)

sobre los trofozoítos de *N. fowleri*, después de haber interactuado durante 4 horas. Se observa la presencia de lesiones en la superficie de la membrana.

El mecanismo de acción de la flavanona Eriodictiol 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.

Estos resultados se corroboraron mediante microscopía electrónica de transmisión, en la Fig. 4. se puede apreciar en A) el trofozoito del grupo control, en B) el efecto de la interacción con 74.5 mg/mL después de 1 h, en donde se observa un aumento en el número de vacuolas así como una disminución considerable del núcleo y del número de mitocondrias. En C) con la concentración de la DL (117.9 mg/mL), después de 1 hora hay pérdida total de la integridad de la membrana.

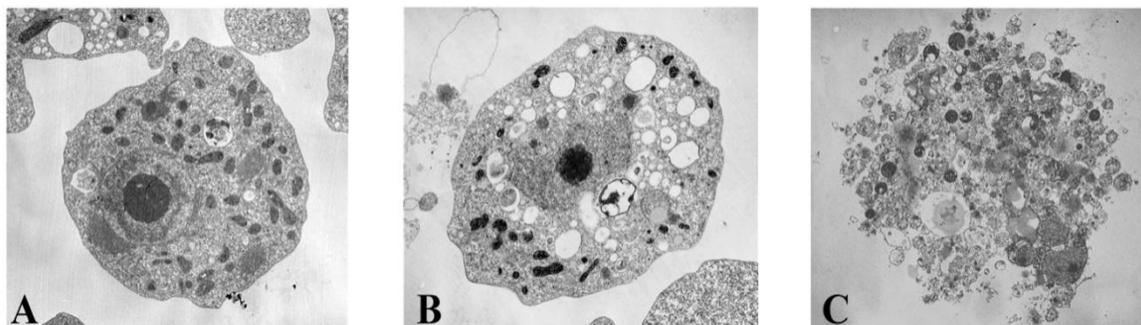


Fig. 4 Microscopía electrónica de transmisión donde se observa los daños que presentan los trofozoítos de *N. fowleri* al interactuar con las diferentes concentraciones de la flavanona Eriodictiol.

Una vez obtenida la concentración letal media se determinó si el efecto de la flavanona era amebostático o amebicida para lo que se realizó una cinética de 24 horas, los resultados se muestran en la Figura 5.

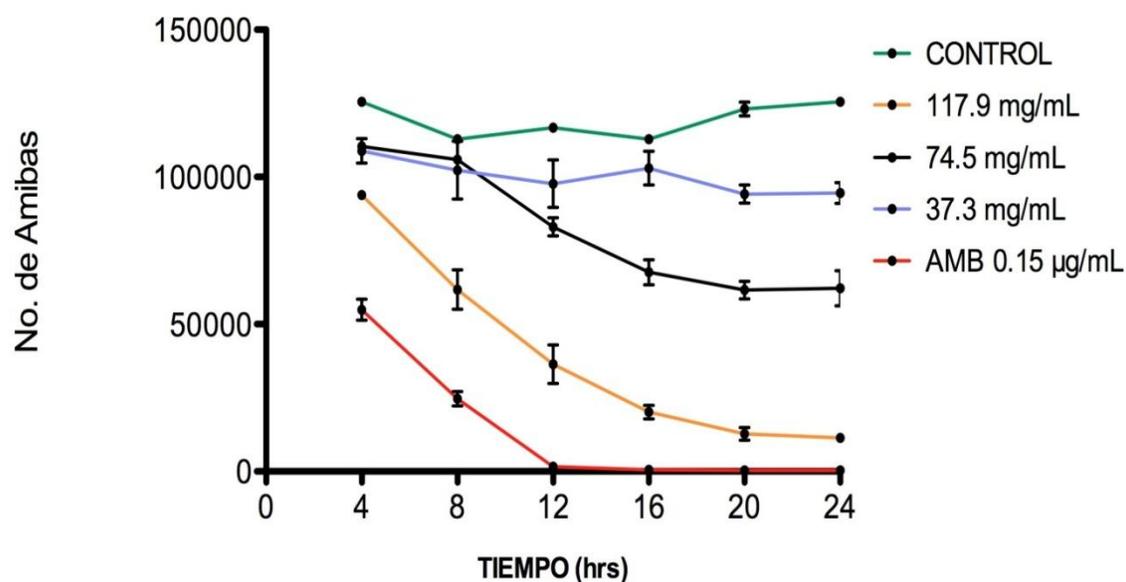


Fig. 5 Actividad de la flavanona Eriodictiol sobre la curva de crecimiento de *N. fowleri*

PRUEBA DE TOXICIDAD GENERAL

A continuación se muestran los resultados de la prueba de toxicidad general obtenidos de la interacción de larvas nauplio II de *Artemia salina* (Leach) con la flavanona Eriodictiol (Cuadro 3).

Concentración de flavanona (µg/mL)	% de Mortalidad
1000	100
100	18.3
10	5.7

Cuadro 3. Resultados del ensayo de toxicidad general y de la DL₅₀ del Eriodictiol

A partir de los resultados anteriores obtenidos del ensayo de toxicidad general mostrados 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 Eriodictiol, la cual resultó ser de 462µg/mL.

Posteriormente se hizo la comparación de este resultado en la tabla de toxicidad general, para determinar el rango de toxicidad. Determinando que la toxicidad de la flavanona entra dentro del rango de débil a moderada. Cuadro 4.

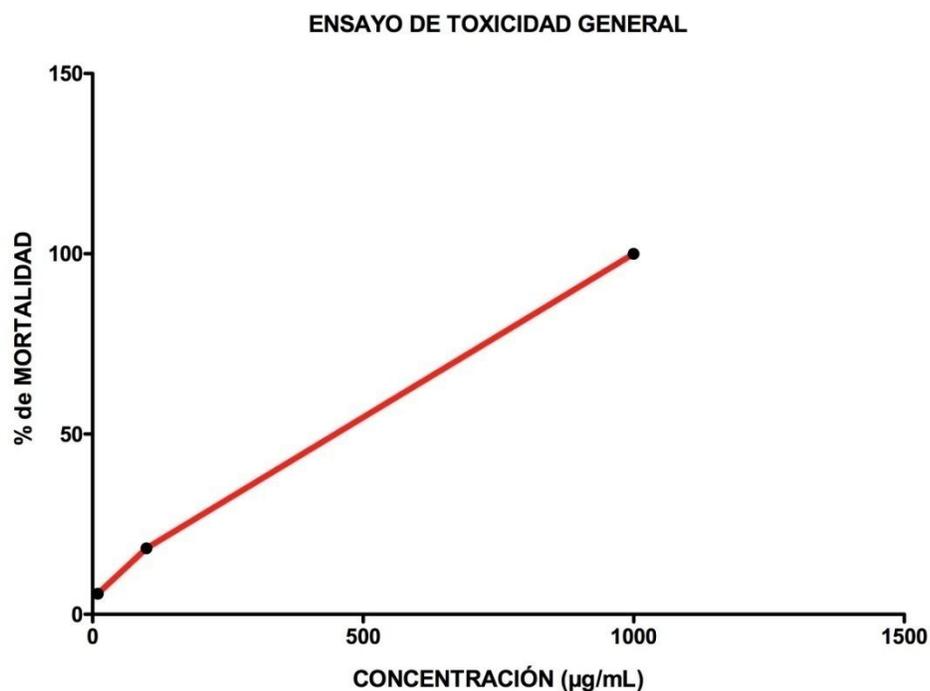


Fig. 6 Resultados de la prueba de toxicidad general.

	Dosis Letal Media (DL ₅₀) µg/mL.	Actividad tóxica general
Eriodictiol	462	Débil a Moderada

Cuadro 4. Resultados de la prueba de toxicidad general

DISCUSIÓN

9 DISCUSIÓN

En este trabajo se presenta por primera vez, resultados que demuestran la actividad anti-amebiana del Eriodictiol, una flavanona presente en la resina de *G. glutinosum*, contra la ameba de vida libre *N. fowleri*, la cual es la causante de una enfermedad letal y fulminante conocida como meningoencefalitis amebiana primaria.

Peña-Juárez (2009), demostró que la resina de *G. glutinosum* presentaba actividad amebicida y amebostática sobre *N. fowleri* en estudios in vitro.

Un dato importante de resaltar es que utilizando el compuesto puro, se requiere de una mayor concentración (74.5 µg/ml) para lograr los mismos efectos que con la resina (62.5 µg/ml). Esto puede deberse a que además del Eriodictiol, la resina tiene otros componentes que juntos pueden actuar sinérgicamente, por lo que se requiere menor concentración. Entre estos compuestos puede estar metabolitos secundarios como lo reporta (Urzua *et al.*, 1995, 1998, 2001) donde al estudiar resinas de diferentes Asteraceas, concluye que los metabolitos más abundantes son diterpenos y flavonas.

El hecho de que el Eriodictiol sea uno de los compuestos más abundantes de la resina, coincide con los efectos observados en las membranas de *N. fowleri*, ya que como reportaron Wollenweber y Dietz (1981), la actividad lipofílica de las flavonas, las sitúa como uno de los metabolitos secundarios más importantes para desempeñarse como agentes protectores contra diversos microorganismos ya que le facilita la ruptura de las membranas.

Además de otras funciones que se han reportado como actividad anti-inflamatoria, inhibición enzimática y actividad antioxidante entre otros (Havsteen, 1983; Harborne and Baxter, 1999; Malaudzi *et al.*, 2011).

Otro aspecto importante a destacar es la toxicidad del compuesto, que con la prueba realizada en *Artemia salina*, resulta que el Eriodictiol presenta una toxicidad de leve a moderada, lo que contrasta con la altísima que presenta la Anfotericina B. Este dato es importante ya que como reportaron otros autores, este tipo de compuestos también suele ser descritos como potencialmente quimioprotectores (Hertog *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1994; Benavente-García *et al.*, 1997; Kamdaswami *et al.*, 1991; Hiramio *et al.*, 1994; Elangovan *et al.*, 1994), e incluso con acción antitumoral ya que parecen ser capaces de actuar en todas las etapas del proceso carcinogénico, inhibir los daños en el DNA y en las enzimas implicadas en la traducción de señales (cinasas, fosfolipasas, fosfodiesterasas) (Middleton and Kandaswami 1986; Constantinon and Huberman 1995; Peterson 1995), regular enzimas críticas para el crecimiento celular (Bames *et al.*, 1994).

CONCLUSIONES

10 CONCLUSIONES

- La flavanona Eriodictiol induce cambios morfológicos en trofozoítos de *N. fowleri*, estos incluyen un aumento en el número de vacuolas así como una disminución considerable del núcleo y del número de mitocondrias; así como la pérdida total de la integridad de la membrana.
- Por lo que en estudios *in vitro* Eriodictiol tiene actividad antiamebiana sobre *Naegleria fowleri*.
- Eriodictio presenta una toxicidad que está en el rango de moderada a baja.

APÉNDICE

11 APÉNDICE

11.1 Familia Asteraceae

Se considera como la familia más grande dentro de las angiospermas también denominadas compuestas, ya que reúne alrededor de 23000 especies divididas en 13 tribus y en casi 1000 géneros, siendo entonces la de mayor riqueza y diversidad biológica. 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). 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).

11.2 *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.

Esta planta crece en zonas con perturbación asociación a vegetación secundaria y cultivos (Rzendowki y Rezendowki, 1985).

11.3 Sinonimia popular

Escobilla, pegajosa, zazal, popote, cerraja.

Estado de México: tezozotla

Guerrero: xonequiletl, zacayauchi

Puebla: xincuite



Fig. 7 *G. glutinosum* (Spreng.) Less.

Botánica y ecología

Es una planta herbácea o sufrútice (herbácea con base leñosa), perene, erecta glabra o casi glabra, 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.

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 (Rzendowski, 1985; SEMARNAT, 2001).

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

Presente en clima templado, entre los 2250 y los 3000 msnm. Asociada a bosques de encino, de pino, mixto de encino-pino y pino-encino.

11.4 Clasificación

Reino: Plantae

División: Spermatophyta

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Dicotiledoneae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Gymnosperma*

Especie: *Gymnosperma glutinosum*

Nombre científico: *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less

11.5 Etnobotánica y antropología

Es una planta utilizada en el Estado de México, Durango y Guanajuato para tratar el reumatismo, padecimiento que se caracteriza por el dolor de articulaciones, fiebre e inflamación.

Como remedio se aconseja macerar las hojas y el tallo en alcohol durante 3 y hasta 8 días, para posteriormente frotar con esto las partes doloridas; aunque también se usa el cocimiento de las ramas bebido, en baños o aplicado en fomentos sobre las reumas y los golpes. Cuando hay dolencia de los pies, las hojas frescas se colocan dentro de los zapatos a usar; o las ramas se sumergen en alcohol y se dejan reposar durante tres días, con este macerado se frotan los pies diariamente.

En Puebla, su aplicación medicinal abarca las siguientes enfermedades: el dolor de cabeza, contra el cual se muelen las yemas de xinecuite (*G. glutinosum*), chichiuiia (*Gonolobus uniflorus*) y romero (*Rosmarinus officinalis*) y se colocan en la frente a manera de emplasto, amarrados a la cabeza; los jotes, enfermedad de la piel caracterizada por manchas blanquecinas, sobre las cuales se aplican las yemas molidas; y los piquetes de hormiga que también se alivian frotando las yemas de esta planta en el área afectada.

También en Puebla, se ocupa cuando hay rotura de huesos en animales, en este caso las yemas de la planta se calientan y posteriormente se amarran con un trapo al hueso dañado.

Otros usos que se le asignan son: contra la diarrea, fiebre amarilla y para soldar huesos (V. quebradura), (UNAM, 2010).

BIBLIOGRAFÍA

12 BIBLIOGRAFÍA

- **Albornoz A.** (1980). Productos naturales, sustancias y drogas extraídas de las plantas. Universidad Central de Venezuela (UCV). Facultad de Ciencias. Caracas, Venezuela.15:241.
- **Álvarez E., Orrallo F.** (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Bioquímica*, 22 (10) 130-138.
- **Aranda A., Viesca C., Sánchez G., Sánchez G., Ramos M., Sanfilippo J.** (2003). La materia médica en el *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*. *Revista de la Facultad de Medicina*, UNAM 46 (1) 12-17.
- **Bames S., Peterson G., Grubbs C., Setchell K.** (1994). *Potentialroleofdietary isoflavones in the prevention of cancer* En: Jacobs MM. (Ed.). Diet and cancer: Markers, prevention and treatment. Plenum Presa, New York. 135-147.
- **Barbosa CR.** (2007). Evaluación *in vitro* de la actividad anti Giardia y biotransformación *in vitro* de tres flavonoides de origen natural: Camperol, (-)-Epicatequina y Tilirósido. Tesis profesional de Doctorado (Investigación en Medicina). Escuela Superior de Medicina. IPN, México, 137pp.
- **Belofsky C., Carreno R., Groswick Shannon M., John DT.** (2006). Activity of isoflavans of *Dalea aurea* (Fabaceae) against the opportunistic ameba *Naegleria fowleri*. *Plant Med.* 72: 383-386.
- **Benavente-García O., Castillo J., Marín FR., Ortuño A., Del Río JA.** (1997).Uses and properties of citrus flavonoids. *J AgricFoodChem.* 45: 4505-4515.
- **Bonilla P., Ramírez E., Ortiz R., Eslava C.** (2007). La ecología de las amibas patógenas de vida libre en ambientes acuáticos, <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/440/cap3.html> [citado en 22 de noviembre de 2010].
- **Buchanan BB., Gruissem W., Jones RL.** (2002). Biochemistry and Molecular Biology of plants. Ed. American society of plant biologists. USA. 1366pp.
- **Canales M., Hernández T., Serrano R., Hernández LB., Durán A., Ríos U., Sigrtist 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.
- **Canales M., Hernández T., Caballero J., Romo de Vivar A., Avila G., Durán A., Lira R.** (2005). 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.
- **Cervantes I.** (2009). Papel de las respuestas innatas de la Meningoencefalitis amibiana primaria experimental producida por *Naegleria fowleri*. Tesis profesional de Doctorado (Ciencias Quimiobiológicas). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN, México, 92 pp.

- **Constantinon A., Huberman E.** (1995). *Genistein as an inducer of tumor cell differentiation: Possible mechanisms of action*. Proc Soc Exp Biol Med. 208: 109-115.
- **Cronquist A.** (1977). "On the taxonomic significance of secondary metabolites in angiosperms". *Plant Syst Evol.*, suppl 1: 179-189.
- **Elangovan V., Seka V., Govindasamy S.** (1994). *Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis*. CancerLett. 87: 107-113.
- **Fenchel T.** (1987). *Ecology of Protozoa. The biology of free-living phagotrophic protists*, Springer-Verlag. New York, U.S.A. p. 197.
- **Ferrante A.** (1991). *Free-living amoebae: Pathogenicity and immunity*. *Parasitic Immunol.*, 13:31-47.
- **Ferreira EE., Lares F., Fernández G., Velázquez O., Tapia R.** (1994). *Manual para la vigilancia epidemiológica de la Meningitis por amibas de vida libre*. Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/infoepi/manuales/Man13-Mening/Man13.htm> [citado en 22 de noviembre de 2010].
- **Goswick SM., Brenner GM.** (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.
- **Guerra OM., Torres ID., Martínez PL.** (2001). *Validación del uso tradicional de plantas medicinales cultivadas en Cuba*. *Rev. Cubana Plant Med.* 2:48.
- **Guevara I.** (1997). *Qué curan las plantas*. Guía México desconocido. 34:9-13.
- **Harborne JB., Baxter H.** (1999). *The Handbook of Natural Flavonoids*, vols. 1 and 2. John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom.
- **Harborne JB., Williams C.** (2000). *Flavonoids, advances in research since 1992*. *Phytochem.* 55, 481-504.
- **Havsteen B.** (1983). *Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency*. *Biochemical Pharmacology* 32, 1141–1148.
- **Heinrich M., Robles M., West JE., Ortiz de Montellano BR., Rodriguez E.** (1998). *Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae)*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 38: 539.
- **Hertog MGL., Feskeems EJM., Hollman CH., Katan MB., Kromhout D.** (1993). *Dietary antioxidants flavonoids and risk of coronary heart disease*. *Lancet*; 342: 1007-1011. 6.
- **Heywood VH., Harbone JB. & Turner BL.** (1977). *The biology and chemistry of the compositae*. Academic Press. New York. U.S.A 619p.
- **Hirano T., Gotoh M., Oka K.** (1994). *Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemia HL-60 cells*. *Life Sci.* 55: 1061-1069. 10.
- **Hostettman K.** (Ed.) *Methods in plant Biochemistry Assays for Bioactivity*. Academic Press USA. 6. 1-32.

- **Jarolim KL., McCosh JK., Howard MJ., John DT.** (2000). A light microscopy study of the migration of *N. fowleri* from the nasal submucosa to the central nervous system during the early state of primary amebic meningoencephalitis in mice, *J. Parasitol.* 86:50-55.
- **John DT. & Howard MJ.** (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.
- **John DT.** (1993). Parasitic protozoa. 2nd edition. Edited by Julius P. Kreier and John R. Baker. Academic Press Inc., U.S.A.
- **John DT.** (1982). Primary Amebic Meningoencephalitis and the biology of *Naegleria Fowleri*. *Ann Rev Microbiol*; 36: 101-23.
- **Kamdaswami C., Perkins E., Soloniuk DS., Dyzewiecki G., Middletom E.** (1991). Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma in vitro. *Cancer Lett.* 56: 147-152. 9.
- **Kyle DE. and Noblet GP.** (1986). Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae I Willard's Pond, J. Protozool. 13: 422-434.
- **Lozoya X.** (1989). Función de las plantas medicinales en la medicina del siglo XXI. Secretaria de Salud, edición conmemorativa, México, pp. 255-260.
- **Marciano- Cabral F.** (1988). Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol Rev*, 52:114-133.
- **Martínez AJ., Visvesvara GS.** (1997). Free-living, Amphizoic and Opportunistic Amebas. *Brain Pathology*; 16: 583-598.
- **Martínez AJ.** (1985). Free-Living Amebic: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology and Treatment of Disease, CRC. Press, Boca Raton, Florida. 156p.
- **Mata R.** (2002). Exploring natural products from Mexican biodiversity as source of potencial medicinal agents. *Revista de Fitoterapia.* 50th *International Congress. Society for Medicinal Plant Research.* Barcelona. Septiembre. PL 12 Volumen 2. Suplemento 1.44.
- **McLaughlin JL.** (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.
- **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.
- **Middleton E., Kandaswami C.** (1986). *The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer* En: Harbone JH. (Ed.). *The flavonoids: Advances in research since.* New York 1993; 619-652.
- **Miller AB., Berrino F., Hill M., Pietimen P., Riboli E., Wahrendorf J.** (1994). *Diet and the actiology of cancer: a review.* *Eur J Cancer*; 30A: 207-220. 7.

- **Moreno JM., Ysabel C., Belén DR., García D., Medina CA.** (2007). Efecto de los extractos de flavonoides de harinas de cáscaras y semillas de pomelos sobre la estabilidad de aceite de soja. *Grasas y aceites*, 58 (4) 351-358.
- **Mulaudzi RB., Ndhala AR., Kulkarni MG., et al.** (2011). Antimicrobial properties and phenolic contents of medicinal plants used by the Venda people for conditions related to venereal diseases. *J. Ethnopharmacol.*, doi:10.1016/j.jep.2011.03.022
- **Olvera-Bautista JFY.** (2008). Efecto *in vitro* de los extractos de tres plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana contra *Entamoeba histolytica*. Tesis profesional de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias. UNAM., México, 133pp.
- **OMS** (2002). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005.
- **Page FC.** (1988). A new Key to Freshwater and soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association Scientific Publication, Londres. 122pp.
- **Peña-Juárez MC.** (2009). Efecto *in vitro* de la resina de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. Sobre *Naegleria fowleri*. Tesis profesional de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM., México, 53 pp.
- **Peterson G.** (1995). *Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells.* J Nutrition. 125: 784S-789S.
- **Ramírez MM., Mendoza AJ., Arreola GR., Ordaz PC.,** (2010). Flavonoides con actividad antiprotozoaria. En: *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Vol. 41, no. 1, p.4-16.
- **Reyes.** (1993). Estudio Florístico en el Municipio de San Juan Mixtepec, Distrito de Juxtlahuaca, Oaxaca. Tesis Biólogo. UNAM. Campus Iztacala, pp. 1, 58.
- **Rivera F., Bonilla P., Ramírez E., Calderón A., Gallegos E., Rodríguez S., Ortiz R., Hernández D. and Rivera V.** (1994). Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in Mexico City and its suburbs, water, air and soil pollution. 23: 65-87.
- **Romero C., Torres I., Torija B., Herrera A., Tortoriello J.** (2005). Conocimiento sobre fitófagos en médicos de atención primaria del estado de Morelos. *Revista Médica Del IMSS*, 43(4)281-286.
- **Rzendowski J., Rzendowski GC.** (1985). Flora Fanerogámica del Valle de México. Vol. II. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN e Instituto de Ecología, México, pp. 501, 581.
- **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.
- **Serrano PR.** (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.

- **Soto J.** (2008). Efecto del flavonoide Epicatequina sobre la expresión de genes de *Entamoeba histolytica*. Tesis profesional de Maestría (Ciencias Químico-biológicas). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN, México, 97 pp.
- **Tona L., Kambu K., Ngimbi K., Cimanga K., Vlietinck AJ.** (1998). Antiamebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *J. Ethnopharmacology*. 61:57.
- **Trease GE. y Evans WC.** (1993). Tratado de Farmacognosia. 15a ed. Ed. Interamericana. México, pp. 728-730.
- **Universidad Nacional Autónoma de México.** Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana; Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana
- **Urzua A., Torres R., Muñoz M., Palacios Y.,** (1995). Comparative antimicrobial study of the resinous exudate of some Chilean *Haplopappus* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 45, 71-74.
- **Urzua A., Caroli M., Vasquez L., Mendoza L., Wilkens M., Tojo E.,** (1998). Antimicrobial study of the resinous exudate and of diterpenoids isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 62, 251–254.
- **Urzua A., Mendoza L.,** (2001). Antibacterial activity of the resinous exudates from *Haplopappus uncinatus* and *H. foliosus*. *Fitoterapia* 72, 418–420.
- <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&i d=7775> [citado en 22 de noviembre de 2010].
- **Visvesvara GS., 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.
- **Wagner H., Farkas L.** (1975). Synthesis of flavonoids. In *The Flavonoids*. Part I, eds Harborne JB, Mabry TJ, Mabry H (Academic Press, New York), pp. 127-213.
- **Wollenweber E., Dietz V.** (1981). Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. *Phytochemistry* 20, 869 932.