



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Efecto *in vitro* del extracto metanólico de pétalos y hojas de la Rosa de Castilla (*Rosa centifolia* L.), sobre *Naegleria fowleri* y caracterización de algunas de sus propiedades medicinales.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA
PRESENTA:

LORENZO ANDRES GRACIELA

BAJO LA DIRECCIÓN DEL Dr. MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY

JULIO 2013, LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A LA UNAM POR LOS APOYOS RECIBIDOS:

UNAM PAPIIT IN213713-RR213713, IN218511

AL JURADO TUTORAL:

DR. MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY

DRA. PATRICIA BONILLA LEMUS

DRA. MA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ

DRA. SILVIA LETICIA VERDÍN TERÁN

BIOL. LUIS ANTONIO HERNÁNDEZ GONZALEZ

A LA DRA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ, POR LOS EXTRACTOS
PROPORCIONADOS.

A LA DRA. PATRICIA BONILLA LEMUS POR LAS AMIBAS FACILITADAS.
AL BIÓL. RAFAEL EMILIANO QUINTANAR ZUÑIGAPOR LAS FACILIDADES EN
LA TOMA DE FOTOGRAFÍAS.

DEDICATORIA

Al creador de todo lo que vemos y somos, en los momentos más difíciles solo la fe en él me ha reconfortado.

A la UNAM por brindarme un lugar y con ello la oportunidad de estudiar y ser una profesionista.

A mis padres por brindarme todo su apoyo, por darme la oportunidad de estudiar y prepararme. Mamicha te amo y gracias por cada una de tus palabras y también por esos jalones de orejas a tiempo, por siempre estar para mí; Papicho para mí eres un ejemplo por ser bien trabajador, por ser noble y por ser comprensivo conmigo, te amo con todo mi corazón tu mejor herencia es tu ejemplo. A ambos muchas gracias por acompañarme en este camino académico.

A mi conejito ya casi 10 años juntos (y los que faltan), superando obstáculos y con harto amor gracias por confiar en mí, gracias por ser pieza fundamental e indispensable para que ser bióloga, gracias por ser mi "patrocinador". Gracias por amarme tanto, Memito te amo.

A mi hermana Verini, manita muchas gracias porque te convertiste en mi confidente y a apoyo incondicional TQM y EPM.

A mis hermanas Yasmín, Teresita y Valerita, mis niñas hermosas gracias por todos los momentos divertidos y no tanto son parte fundamental de este logro.

A mis niños pequeños, Saúl te quiero mucho y yo sé que superarás cada prueba que la vida te ponga, se que con fé en Dios y la ayuda de la familia saldrás adelante te amo hermano. Isaac, mi niño mi compañero de embarazo te quiero mucho.

A Memito Jr. Eres la luz de mi carretera y te lo he dicho muchas veces: "Gracias por salvarme", te amo mi niño hermoso.

A mi suegra, la señora Guille usted ha sido como una segunda madre, gracias por todo su apoyo, por sus palabras y consejos. Sin su ayuda no se que hubiera hecho, el título es de las dos: la quiero mucho. A mi suegro Braulio, a pesar de nuestras discrepancias ha estado para mí en todo momento, muchas gracias por su apoyo.

A mi cuñado Edgar, gracias por ser paciente y apoyarme en estos últimos años. A mi hermano postizo Gabriel eres el mejor hermano que nunca tuve.

A mi abuelo, gracias por esos lindos recuerdos de niña y por tu legado, a tío Chano que con su mal genio me impulso a ser una mejor persona. Se me adelantaron pero en un ratote los volveré a ver.

A mis amigas de años lejanos y cercanos: Angy, Adriana y Lucero, gracias por estar conmigo en cada momento de relajó, de sufrimiento, de logros y por su apoyo las quiero mucho chicas; Guadalays te quiero mucho y gracias por regresarme a la tierra muchas veces; Lupis, comadrta gracias por ser mi apoyo en tiempos difíciles y estar conmigo siempre, Fátima, Almiux y Candis chicas gracias por su amistad.

Al mejor asesor que pude tener gracias por transmitirme su conocimiento y experiencia, por su paciencia y por creer en mí.

A la dra. Verdín es usted un ángel, gracias por siempre arrancarme una sonrisa, por ser tan comprensiva y por ser tan linda persona.

A los compañeros de laboratorio Fátima, Oscar, Mary, Claudia, Cecy, Carlos, Xime, etc. No cabe duda que no pude tener mejores colegas.

***“Algunas personas quieren
que algo ocurra, otras
sueñan con lo que pasará,
otras hacen que suceda”-
Michael Jordan.***

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	1
Introducción.....	2
Características morfológicas y ciclo de vida de <i>Naegleria fowleri</i>	3
Ubicación taxonómica	6
Meningoencefalitis amebiana primaria (map). Manifestaciones clínicas y evolución de la enfermedad.	7
Antecedentes.....	16
Objetivo general	17
Objetivos particulares	17
Material y métodos	18
Efecto in vitro del extracto metanólico de <i>R.centifolia</i> sobre <i>N. fowleri</i> . Se realizó lo siguiente:.....	21
Toxicidad celular	22
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Análisis fitoquímico.....	23
Ensayo de efecto anti-inflamatorio utilizando el modelo de carragenina.	24
Microscopía óptica y electrónica de barrido.....	26
Resultados.....	27
Efecto <i>in vitro</i> de los extractos metanólicos de <i>R. centrifolia</i> sobre <i>N. fowleri</i>	29
Toxicidad celular	32
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del extracto de hojas y pétalos de <i>Rosa centrifolia</i>	34
Ensayo del efecto anti-inflamatorio empleando el modelo de edema plantar por carragenina.	38
Conclusiones.....	45
Apéndice 1.....	46
Apéndice 2.....	47
Bibliografía.....	50

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Estadios morfológicos de <i>N. fowleri</i>	3
Fig. 2 Amebostomas en <i>N. fowleri</i>	4
Fig. 3 Ciclo de Vida de <i>N. fowleri</i>	8
Fig. 4 Estructura de la Anfoterizina B.....	11
Fig. 5 Detalle de la rosa de Castilla.....	14
Fig. 6 Diluciones finales de los extractos.....	21
Fig. 7. Ensayo de HPLC de la rosa de Castilla.....	23
Fig. 8. Administración de los extractos de la rosa de Castilla, Inyección de carragenina (1%).	24
Fig. 9 Ratones inoculados con <i>N. fowleri</i> para reactivar su virulencia.	28
Fig. 10 Fotografía del cultivo control de <i>N. fowleri</i> , en donde se observan numerosos trofozoitos y su forma típica.....	31
Fig. 11 a) Extracto de pétalos y con cultivo control de células CaSki.....	33
Fig. 12 Estructura química básica de flavonoides.....	36
Fig. 13 Estructura química de la quercetina.....	36
Fig. 14 Pata izquierda- control positivo y Pata derecha-control negativo.....	39
Fig. 15 Pata de la izquierda con Carragenina y pata derecha extracto de pétalos (500mg/kg) de la rosa de Castilla.....	39
Fig. 16 Cultivo de <i>N. fowleri</i> con numerosas vacuolas.....	46
Fig. 17 Se observa el cultivo de <i>N. fowleri</i> a través del contraste de fases.....	46
Fig.18 Se observa al centro un trofozoíto dividiéndose de <i>N. fowleri</i>	46
Fig. 19 Se observa un trofozoíto dividiéndose con la forma típica de “pesa”.....	46
Fig. 20 Se observa numerosos trofozoitos de <i>N. fowleri</i> del cultivo normal.	47
Fig. 21 Se muestra una unión que existe entre células de <i>N. fowleri</i>	47
Fig. 22 Se observa el detalle de un trofozoíto de <i>N. fowleri</i> se muestran al menos cuatro amebostomas.	47
Fig. 23 Se muestra un trofozoíto que probablemente se estaba dividiendo, se observan al menos tres trofozoitos de <i>N. fowleri</i>	47
Fig. 24 Trofozoíto de <i>N. fowleri</i> de cultivo control.	48
Fig. 25 Detalle de un trofozoíto de <i>N. fowleri</i> con los signos evidentes del daño ocasionado por el extracto MeOH de pétalos de la rosa de Castilla.....	48
Fig. 26 Daño evidente ocasionado por el extracto MeOH (P) en trofozoíto típico.....	48
Fig. 27 Redondeo de trofozoito y estructuras apoptóticas provocado por el efecto de extracto MeOH de pétalos.....	48
Fig. 28 Trofozoíto de <i>N. fowleri</i> de cultivo control con amebostomas.....	49
Fig. 29 Trofozoíto muy alargado.....	49
Fig. 30 Acercamiento de una probable estructura apoptótica.	49
Fig. 31 Trofozoíto de <i>N. fowleri</i> dañada por el extracto de hojas	49

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfico 1. Curva patrón de viabilidad celular	28
Gráfico 2. Interacción del extracto metanólico de Hojas de <i>R. centifolia</i> sobre <i>N. fowleri</i> .	29
Gráfico 3. Interacción del extracto metanólico de pétalos de <i>R. centifolia</i> sobre <i>N. fowleri</i>	30
Gráfico 4. Cromatograma del extracto de Pétalos.....	35
Gráfico 5. Cromatograma del extracto de Hojas de <i>R. centifolia</i>	37
Gráfico 6. Efecto de las concentraciones de pétalos de la Rosa de Castilla, Carragenina y Dexametasona.....	38
Gráfico 7. Efecto antiinflamatorio del extracto de hojas.....	40

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Toxicidad de los extractos de hojas y pétalos de <i>R. centifolia</i>	32
Tabla 2. Cromatograma del extracto de Pétalos	34
Tabla 3. Cromatograma del extracto de Hojas de <i>R. centifolia</i>	34
Tabla 4. Datos de inflamación de extractos MeOH de la rosa de Castilla y controles.....	39

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. <i>N. fowleri</i> , amiba de vida libre	9
---	---

RESUMEN

Los protozoos son organismos cosmopolitas y de formas muy variadas, algunos son anfitrónicos (de vida libre y también endoparásitos) como la ameba *Naegleria fowleri*, la cual produce la enfermedad llamada Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP) en humanos. La MAP es una enfermedad fulminante y difícil de diagnosticar, además el tratamiento a base de Anfoterizina B (antifúngico) es sumamente tóxico y provoca insuficiencia renal crónica. México es un país con una gran diversidad en plantas medicinales, una de ellas es la rosa de Castilla que ha sido empleada en diversos padecimientos en la piel y estomacales, recientemente se determinó el efecto antifúngico de la rosa de Castilla calidad primordial para combatir a la MAP.

En este trabajo mediante la realización de una curva patrón se determinó el efecto antiamebiano del extracto de pétalos y hojas de la rosa de Castilla sobre *N. fowleri*, obteniéndose la CL_{50} para ambos extractos: para pétalos 2.5mg/ml y para hojas 0.039 mg/ml. Así mismo para determinarse la toxicidad de dichos extractos se emplearon células CaSki y de acuerdo con el CNI de E. U., la Concentración Inhibitoria 50 (CI_{50}) que para pétalos fue de 375 μ g/ml y para hojas >40 μ g/ml. Por lo que los extractos de la rosa de Castilla no son tóxicos, sin embargo el extracto de hojas presentó una CI_{50} muy cercana al límite de toxicidad del CNI.

Se determinó la composición química de los extractos de rosa de Castilla mediante el ensayo de HPLC, encontrándose que para ambos extractos los principales compuestos son fenilpropanoides como polifenoles, flavonoides, flavonoles para ambos extractos y en el extracto de pétalos también se determinó la presencia de quercetina.

Mediante el modelo de edema plantar por carragenina se determinó el efecto antiinflamatorio de los extractos de la rosa de Castilla, la concentración que presentó un mayor efecto antiinflamatorio fue la de 500 mg/kg para ambos extractos de pétalos y hojas de la rosa de Castilla. El extracto de pétalos presentó un porcentaje inflamación de 29% y el extracto de hojas 39%, por lo que el mejor extracto fue el de pétalos debido a que se comportó de forma parecida a la Dexametasona (antiinflamatorio).

INTRODUCCIÓN

Los protozoos son organismos unicelulares, microscópicos –aunque algunos pueden alcanzar algunos milímetros–, cosmopolitas, de formas muy variadas, con material genético envuelto en una membrana (eucariotas) y muchos orgánulos que les permiten realizar funciones fisiológicas como otros organismos más grandes (reproducción sexual o asexual, alimentación, sensibilidad). A los protozoos se les ha distinguido principalmente por su apariencia exterior y forma de locomoción en tres grandes grupos: ciliados, flagelados y amibas, (Gallegos *et al*, 2012). De este último grupo, las amibas de vida libre (AVL) se pueden encontrar en toda la biósfera incluyendo los casquetes polares, el suelo, la atmósfera y 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 (Marciano-Cabral y Cabral, 2007).

Particularmente en el estudio de las AVL se ha demostrado que sólo un grupo muy restringido provoca infecciones en humanos incluyendo a los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y probablemente *Harmanella* (John y Howard, 1993). En el caso del género *Naegleria* se han aislado más de 30 especies a partir de fuentes ambientales, sólo *Naegleria fowleri* ha sido aislada de humanos. *N. fowleri* es agente causal de la Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP) la cual es un enfermedad rápida y mortal del Sistema Nervioso Central. Otras dos especies de *Naegleria*, *N. australiensis* y *N. italica* pueden causar infección en animales en el laboratorio pero no han sido asociados como causantes de alguna enfermedad en humanos (Marciano-Cabral y Cabral, 2007). El tratamiento para la MAP se basa principalmente en la administración de Anfoterizina B, sin embargo también se administra Azitromicina, ambas son antimicóticos pero la primera provoca graves daños colaterales, de los cuales se hablará más adelante. Por lo anterior es necesario buscar nuevas alternativas para su tratamiento, como lo son las plantas empleadas en la medicina tradicional sobre todo si se toma en cuenta que el uso de las plantas para combatir ciertas enfermedades ofrece una disminución de los efectos secundarios además

de ser productos que están al alcance de un gran porcentaje de la población mundial (Rates, 2001).

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y CICLO DE VIDA DE *Naegleria fowleri*

Naegleria fowleri tiene tres estadios morfológicos: trofozoíto, flagelado y quiste (Fig.1). Al ser capaces de sobrevivir en el ambiente y como endoparásitos se les describe como organismo anfizoicos (del griego *amphi*, que significa: de ambos lados). El trofozoíto se alimenta, divide y presumiblemente es el estadio que infecta a los humanos, sin embargo es posible que los quistes también puedan entrar en las fosas nasales, en donde se convierten en trofozoítos y posteriormente invaden el cerebro.



Fig. 1 Estadios morfológicos de *N. fowleri*

Los trofozoítos de *N. fowleri* y *N. australiensis* (patógena en ratones) poseen estructuras fagocíticas conocidas como amebostomas, los cuales son empleados para ingerir bacterias y hongos del medio ambiente, así como el tejido en el huésped infectado y varían en número de una a doce por ameba. Aparentemente no existe correlación entre el grado de virulencia y el número de amebostomas, sin embargo la patogenicidad si parece estar correlacionada con su presencia, ya que las dos únicas especies patógenas de *Naegleria* los poseen (Fig. 2) (John y Howard, 1993).

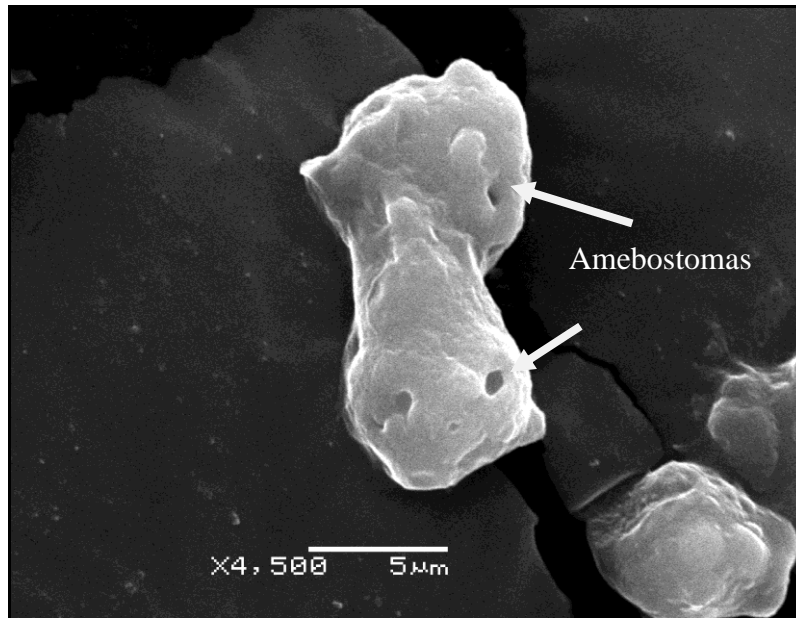


Fig. 2 Amebostomas en *N. fowleri*.

Los trofozoítos, característicamente, sufren una transformación de amiba a flagelado bajo condiciones de privación de nutrientes en el agua y de quiste bajo condiciones adversas del medio ambiente. 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).

La reproducción del trofozoíto es por fisión binaria, la división nuclear es promitótica, lo cual indica que el núcleo y la membrana nuclear persisten durante la división nuclear. El núcleo 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.

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 (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 *et al*, 1987). Los quistes pueden sobrevivir a las sequias, cambios de pH y falta casi total de de oxígeno. Algunos investigadores han propuesto que el incremento brusco de temperatura, más que una temperatura elevada constante, es lo que realmente favorece la predominancia de *N. fowleri*. El intervalo de pH que las amibas pueden soportar está entre 5.5 y 8.6. 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, por lo general las especies patógenas son termo tolerantes. 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).

UBICACIÓN TAXONÓMICA

Las especies del género *Naegleria* son amibas muy primitivas, tienen generalmente, de uno a cuatro flagelos temporales en algunas etapas de su ciclo de vida, por lo que reciben el nombre de ameboflagelados. La siguiente clasificación es la correspondiente al género *Naegleria* (Martínez- Visvesvara, 1997):

Reino: Protista. (Haeckel, 1866)

Subreino: Protozoa (Golfuss 1818; von Siebold, 1846)

Phylum: Sarcomastigophora (Honigberg y Balamuth, 1963)

Subphylum: Sarcodina (Schmarda, 1871)

Superclase: Rizopodea (von Siebold, 1845)

Clase: Acarpomyxea

Orden: Schyzopyrenida. (Singh, 1952).

Familia: Vahlkampflidae. (Jollos, 1917).

Género: *Naegleria*, (Alexeieff, 1912)

Especies:

N. gruberi. Schardinger, 1899.

N. fowleri, Carter, 1970.

N. jadini. Willaert-Le Ray, 1973.

N. lovaniensis. Willaert, 1980.

N. anderson. De Jonckheere, 1981.

N. australiensis. De Jonckheere, 1981.

MENINGOENCEFALITIS AMEBIANA PRIMARIA (MAP). MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.

La MAP es una enfermedad transmitida por el agua, la mayoría de los casos se han producido en asociación con la natación y el buceo o en las piscinas cloradas inadecuadamente, balnearios contaminados y canales, o de la exposición a las fuentes de agua ambientales durante las actividades recreativas como el esquí acuático (Marciano-Cabral y Cabral, 2007).

La MAP fue reportada por primera vez en 1965 por Carter en Australia, desde entonces se han reportado esporádicamente algunos casos en Norte y Sudamérica, República Checa, Reino Unido, Australia, Nueva Zelanda y Tailandia (Wang *et al*, 1993). En México hasta 2007, se tenía un registro de 29 casos de MAP, 23 en Mexicali, B. C; 3 en Sonora; 1 en Monterrey, N.L; 1 en Michoacán y uno en Tamaulipas. Sin embargo es importante señalar que existe la posibilidad de que existan más casos no reportados, debido a que para algunos médicos es difícil diagnosticar la MAP *ante mortem* y la diagnostican inicialmente como meningoencefalitis viral o bacteriana. Hasta 2007 se tenía un registro de 200 casos de MAP en todo el mundo (Romero, 2007). La MAP se presenta en individuos inmunocompetentes y provoca una enfermedad muy rápida y mortal, la infección con *N. fowleri* inicia con la introducción de agua contaminada con trofozoítos o quistes, al interior de la cavidad nasal del hospedero (Fig. 3). *N. fowleri* ataca la mucosa nasal, migrando a lo largo de los nervios olfatorios, a través de la placa cribiforme entrando así al cerebro, una vez en este compartimiento, la amiba causa extenso daño en tejidos y una gran inflamación, los trofozoítos lisan e ingieren eritrocitos y otros tipos de células como las nerviosas, la destrucción del tejido y necrosis hemorrágica del cerebro son acompañadas por un infiltrado inflamatorio que consiste de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos (Marciano-Cabral y Cabral, 2007). En el SNC, *N. fowleri* degrada la mielina y produce edema y necrosis hemorrágica fulminante en el tejido cerebral mediante la producción de hidrolasas

lisosomales y fosfolipasas que degradan mielina y provocan daños graves e irreversibles en el individuo infectado (Romero, 2007; Da Rocha *et al*, 2009).

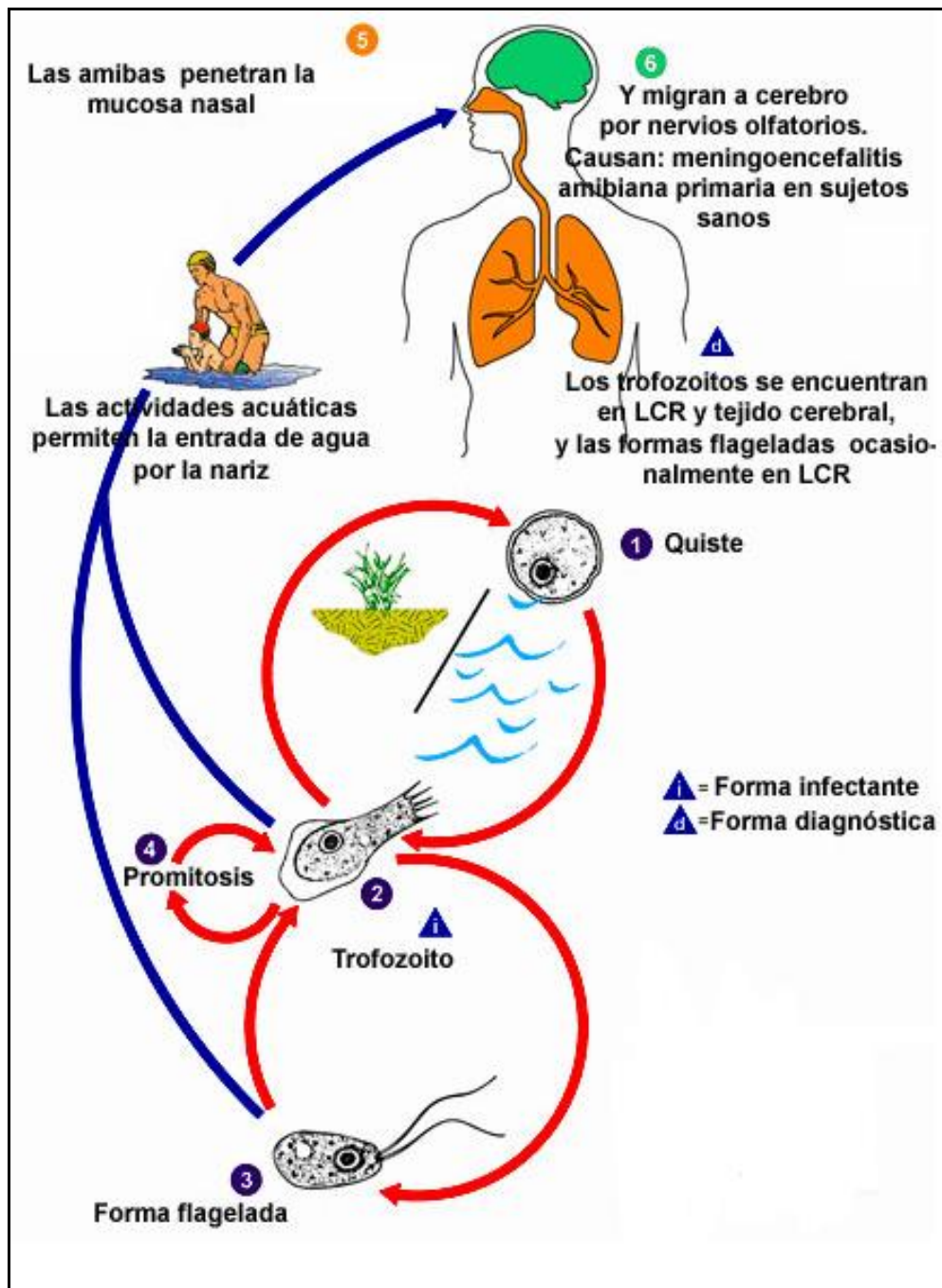
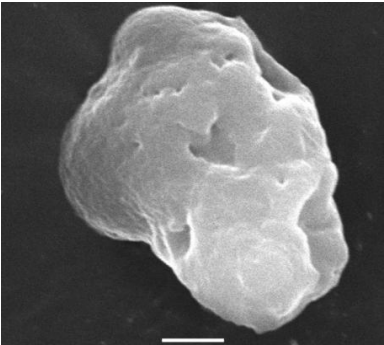



Fig. 3 Ciclo de Vida de *N. fowleri*, Disponible: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/FreeLivingAmebic.htm>.

La MAP se caracteriza por severos dolores de cabeza, fiebre, náuseas y vómito, rigidez en el cuello, convulsiones ocasionales, cambios de personalidad (Cuadro 1). Por lo general después de la invasión al SNC generalmente la muerte resulta de 7-10 días posteriores a la infección (Marciano-Cabral y Cabral, 2007).

Amiba	Enfermedad	Características
<p><i>Naegleria fowleri</i></p> 	<p>Meningoencefalitis Amebiana Primaria</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Cefalea bifrontal, bitemporal ➤ Fiebre elevada. ➤ Náuseas y vómito. ➤ Cambios en la conducta (irritabilidad, conductas aberrantes) ➤ Datos de irritación meníngea. ➤ Confusión ➤ Convulsiones ➤ Parálisis pares craneales (III, IV, VI) x edema cerebral ➤ Progreso rápido hacia el coma ➤ Muerte en 7 días aproximadamente.

Cuadro 1. *N. fowleri*, amiba de vida libre que parasita al hombre. (Urribarren, 2012)

La capacidad de adhesión que poseen los trofozoítos de *N. fowleri* a las células del huésped y la respuesta quimiotáctica a los componentes de las células nerviosas son factores determinantes para la progresión de la enfermedad. Durante la invasión de los tejidos, los trofozoítos parecen tener acceso a glicoproteínas de la matriz extracelular, como la fibronectina, colágeno y la laminina, que se encuentra en la lámina basal y en las células en el tejido circundante. Las amibas se alimentan por medio de la fagocitosis y son capaces de ingerir bacterias completas, por medio de las vacuolas digestivas que se forman en la parte anterior a partir de unos pseudópodos que rodean a la presa, originando una cavidad circular llamada copa de alimentación o amebostoma (Vivas, 2010). Los amebostomas 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 tan evidentes como en *N. fowleri* (Rodríguez, 2003).

DIAGNÓSTICO

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 flagelado) del LCR o del tejido de biopsia cerebral.

El diagnóstico definitivo está basado en la detección óptica de los trofozoítos en muestras de líquido cefalorraquídeo o en tejido cerebral. La movilidad del trofozoíto se observa a través del microscopio de luz, con contraste de fases, el diagnóstico también puede realizarse utilizando técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos anti- *Naegleria* marcados con peroxidasa ó fluorescencia, (Bonilla *et al.*, 2000)

TRATAMIENTO

El tratamiento para la MAP es agresivo, con alta toxicidad o ineficaz en la mayoría de los casos, los fármacos contra *N. fowleri* son principalmente el antimicótico Anfotericina B (AMB) y la Azitromicina, pero solamente son efectivos cuando se administra al inicio de la infección. La AMB es un polieno que actúa sobre la membrana plasmática perturbando su permeabilidad selectiva, causando poros y por ende, fuga de los componentes celulares (Kobayashi y Medoff, 1977).

A pesar de que la Anfotericina B (Fig. 4) es el medicamento más usado, este es altamente tóxico debido a que se ha reportado que produce daño renal el cual generalmente resulta irreversible y puede evolucionar a una insuficiencia renal, además de que ocasiona otros daños, insuficiencia hepática aguda y alteraciones hematopoyéticas (Belofsky *et al*, 2005).

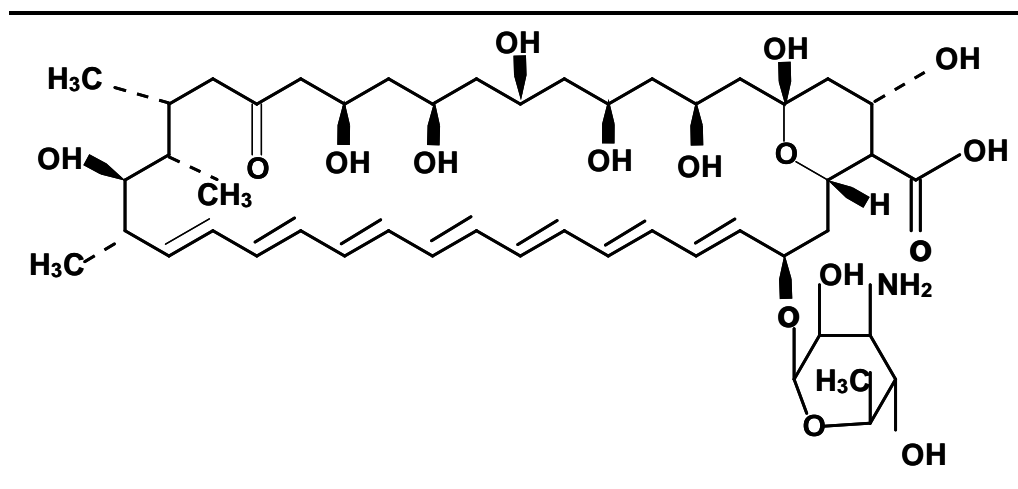


Fig. 4 Estructura de la Anfotericina B

Los estudios 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. La AMB es administrada vía intravenosa o intratecal a alta concentración: 1-1.5 mg por Kg de peso diariamente por 3 días y después 1 mg por Kg al día, durante 6 días (Kobayashi y Medoff, 1977). De igual manera se ha reportado el tratamiento con una combinación de medicamentos como Dexametasona 0.6 mg / k / día, cada 6 h por vía intravenosa (i.v), Ceftriaxona 100 mg / k / día, cada 8 h (i.v), Rifampicina 10 mg / k / día cada 24 horas y Anfotericina B 0.25 mg / k / día, cada 24 h (i.v) (diariamente 0,25 mg / k aumento de la Concentración hasta 1 mg / k / día y Fluconazol 10 mg / k / día, cada 24 horas Los tratamientos ya mencionados fueron eficaces sin embargo si en las primeras 48 hrs los pacientes no mejoraban, se les administraba intratecalmente AMB (Kemble *et al*, 2012).

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. 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, una alternativa la puede ofrecer el uso de plantas medicinales.

IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS MEDICINALES

En México las plantas curativas son el recurso terapéutico por excelencia de la medicina tradicional mexicana, que en gran parte es aún rescatable y puede constituir un importante elemento para implementar nuevos planes de salud, que combinen el conocimiento popular con el científico (Canales, *et al* 2005). La actividad medicinal que presenta una planta se debe a la presencia en el tejido de ésta, de una o algunas sustancias químicas (principio activo) que ejercen una acción farmacológica en los seres vivos en general (Sepúlveda, *et al* 2003).

Los productos terapéuticos de origen biológico, también llamados naturales pueden ser sustancias producidas por microorganismos que en muy bajas concentraciones tienen la capacidad de inhibir, detener o destruir otros microorganismos. Para el control de enfermedades de las plantas podemos incluir a ciertas sustancias producidas naturalmente por algunas plantas superiores, gracias a ello estas plantas pueden emplearse como insecticidas, control de enfermedades, contra depredadores, etc., (Sepúlveda, *et al* 2003). Estas sustancias son llamadas metabolitos secundarios (MS), los cuales son compuestos químicos que cumplen funciones no esenciales para la planta, de forma que su ausencia no es fatal para la planta, ya que no intervienen en el metabolismo primario o sea en su crecimiento y desarrollo, sin embargo juegan un papel fundamental en el éxito ecológico de estas especies (Kuklinski, 2000; Croteau *et al*, 2000; Taíz, y Eduardo, 2006).

Los MS son sustancias que la planta ha sintetizado y almacenado en el curso de su crecimiento, estas sustancias no se distribuyen de manera uniforme por toda la planta, ya que se concentran preferentemente en las hojas o raíces, aunque en ocasiones también se pueden encontrar en semillas, frutos y corteza (Tyler, 1979). Algunos MS son responsables de los olores y colores característicos de los vegetales, otros proporcionan a la planta sus virtudes culinarias, medicinales o tóxicas (Trease y Evans, 1991). Así mismo otros cumplen funciones en las interacciones ecológicas de la planta y su ambiente, por ejemplo, defensa contra predadores y patógenos, agentes alelopáticos, atracción de polinizadores o dispersores de semillas, entre otros. Cada uno de ellos tiene una distribución restringida en el vegetal, a veces a sólo una especie o un grupo de ellas. Diversos MS han mostrado efecto antimicrobiano y pueden ser divididos en 3 grandes grupos, con base en sus orígenes biosintéticos: terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos.

La medicina tradicional mexicana puede ser una de las posibilidades para aliviar la infección por *N. fowleri* 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). Una de las especies más utilizadas en la medicina tradicional mexicana es *Rosa centifolia*., que pertenece a la Familia *Rosaceae*, esta familia a influenciado a muchas culturas desde el punto de vista estético, económico, médico, religioso y espiritual debido a que las personas han podido oler y apreciar su fragancia (Hirulkar y Agraval, 2010).

DESCRIPCIÓN *R. centifolia* L. (rosa de Castilla)

Rosa centifolia, (Fig. 5) es un arbusto de 1 a 2 m de altura, el tallo presenta espinas como agujijones, las hojas están divididas en pequeñas hojitas las cuales también tienen espinas, sus flores las podemos encontrar solitarias con muchos pétalos de color rosa fuerte y de olor fragante, los frutos son pequeños y secos. Esta es una especie originaria de la región del Cáucaso, está presente en clima semicálido, semiseco y templado desde los 100 hasta los 3900 msnm. *R. centifolia* L., es cultivada en huertos familiares con fines ornamentales y medicinales, en sitio con vegetación circundante de bosque tropical subcaducifolio, matorral xerófilo, bosque mesófilo de montaña, bosque de encino, de pino y mixto de pino-encino, (Argueta y Cano, 1994).



Fig. 5 Detalle de la rosa de Castilla

Ubicación taxonómica de *R. centifolia* (Disponible en:
<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:OAX93929>.)

Reino Plantae

Phylum Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Orden Rosales

Familia Rosaceae

Género Rosa

Especie *Rosa centifolia*

Autor del nombre Lineo.

La Rosa de Castilla es empleada en diferentes estados del país para disminuir la fiebre o calentura. En Guanajuato muelen la flor y la aplican por vía cutánea. En el estado de Michoacán se consume molida en la boca y mezclada con atole blanco de maíz. En el Estado de México, preparada en té sin endulzar o en cocimiento se usa las veces que sean necesarias, para dar un baño general o un lavado rectal, (Argueta y Cano, 1994).

ANTECEDENTES

Al respecto de la actividad antimicrobiana de la Familia *Rosaceae*, se ha reportado en el extracto de pétalos, una gran cantidad de Antocianinas las cuales son conocidas por su gran capacidad para fortalecer el sistema vascular, es un poderoso antioxidante y que posee actividad antibacteriana y antiinflamatoria (Hirulkar y Agraval, 2010). Particularmente *Rosa centifolia*, ha sido empleada en varias partes del país contra padecimientos de la piel probablemente ocasionados por algún microorganismo (Canales *et al.*, 2005 y 2006), en problemas intestinales, de riñones, de cabeza, pulmones, pecho, garganta, vómito, bilis, fiebre y estreñimiento (Argueta y Cano, 1994).

Existe poca información en particular sobre *R. centifolia*, sin embargo sobre la Familia *Rosaceae* se ha reportado la actividad antibacteriana de *R. gallica* contra *Bordetella bronchiseptica* y *Bacillus cereus* (Bonjar, 2004); la actividad antifúngica sobre *Candida albicans* y *Xantomonas anoxopodis* de *R. damascena* (Basim y Basim, 2003; Marcos *et al.*, 2011). Específicamente sobre *R. centifolia*, se ha reportado su actividad contra *Listeria monocytogenes*, además es capaz de inhibir el crecimiento de *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Sarcina lutea*, *Vibrio cholerae* así como la actividad antifúngica sobre *Trichophyton mentagrophytes* y *C. albicans* (Hirulkar y Agraval, 2010; Kaoutar *et al.* 2010; Rivera, 2010) esto último es muy importante debido a que es el primer reporte sobre la actividad antimicótica del extracto metanólico de *R. centifolia*, por lo que este podría ser una alternativa para el tratamiento para la MAP que está basado en la administración del antimicótico AMB y que como ya se mencionó anteriormente la amiba *N. fowleri* es muy susceptible a este fármaco

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto *in vitro* del extracto metanólico de pétalos y hojas de la rosa de Castilla (*Rosa centifolia*) sobre *Naegleria fowleri*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Reactivar la virulencia de la cepa de *Naegleria fowleri*.
- Realizar una curva patrón para los ensayos de viabilidad de los trofozoítos de *N. fowleri* en cultivo axénico mediante la Técnica de Viabilidad Celular por Cristal Violeta.
- Determinar la Concentración Letal (CL) y Concentración Media (CL₅₀) del extracto metanólico de pétalos y hojas de *Rosa centifolia* en *N. fowleri* mediante la Técnica de Viabilidad Celular por Cristal Violeta.
- Determinar la toxicidad del extracto metanólico de *R. centifolia*. en células CaSki mediante la técnica de Viabilidad Celular por Cristal Violeta.
- Determinar la composición química de los extractos de pétalos y hojas de la rosa de Castilla, por medio de la técnica de HPLC.
- Determinar el efecto anti-inflamatorio del extracto metanólico de pétalos y hojas de la Rosa de castilla mediante el modelo de edema plantar por carragenina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Extracto de *R. centifolia*. El extracto metanólico de hojas y pétalos de *R. centifolia*, fue proporcionado por la Dra. Margarita Canales Martínez del Laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO), FES Iztacala. Esta planta fue comprada en el mercado de Ajalpa, Puebla e identificada en el Herbario de la FES-Iztacala con el número de colecta MCM39.

Amibas. Las amibas que se utilizaron para probar el efecto del extracto metanólico de *R. centifolia* son de la cepa ATCC-30808, de la especie *Naegleria fowleri* (donadas por la Dra. Patricia Bonilla Lemus, del laboratorio de Conservación y Mejoramiento del Ambiente CyMA de la UIICSE, FES Iztacala).

Ratones. Para reactivar la virulencia de las amibas se utilizaron ratones (*Mus musculus*) machos de la cepa BALB/c de seis semanas de edad. Para el ensayo de anti-inflamación se utilizaron ratas Wistar (180-200gr) las cuales tuvieron una alimentación estándar, a una temperatura de 20-25 °C y se formaron 6 grupos, 3 ratas por grupo.

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

Cultivo de Células de Cérvix Humano Cancerígenas, CaSki. Se cultivaron en frascos Corning con filtro de 75cm² con 30ml de Medio DMDM enriquecido con suero fetal bovino al 10%, posteriormente se incubaron con CO₂ al 5% y a 37°C. Estas células fueron donadas por el Dr. Alberto Parra de la ESM del IPN.

Reactivación de la virulencia de trofozoitos de *N. fowleri*. Esta se realizó en tres ratones anestesiados con éter, a los que se les inocularon por vía intranasal 2.5×10^4 trofozoitos de

N. fowleri a cada ratón, utilizando una micropipeta. Se mantuvieron en observación durante 7 días aproximadamente, tiempo en el cual se observaron los síntomas propios de la enfermedad. Al morir los ratones se extrajeron el cerebro y se recuperaron las amibas, las cuales se sembraron nuevamente y se pasaron por ratón. Este procedimiento se repitió tres veces, y las amibas recuperadas se cultivaron axénicamente para las pruebas posteriores (Rodríguez, 2003).

Curva Patrón para el ensayo de Viabilidad Celular por Cristal Violeta. Para probar el efecto del extracto sobre los trofozoítos de *N. fowleri*, se realizó una curva patrón de la siguiente manera: se “cosecharon” los trofozoítos de *N. fowleri* confirmando que se tuviera una monocapa con las células. Se desechó el medio de las cajas Corning, después se les agregó un poco de PBS 1x estéril, se colocó la caja en el congelador por 10 minutos esto para que las células se despegaran de la superficie de la caja. Pasados los 10 minutos se llevó la caja a la campana de huso laminar y se le dieron unos golpes y se recuperó en tubos estériles, esto 2 veces. Se centrifugaron los tubos con las amibas por 10 minutos a 2500 rpm, se decantó el PBS1X cuidando que la pastilla obtenida no se deseche. A dicha pastilla se le agregó un volumen conocido de medio y se realizó el conteo con ayuda de una cámara de Neubauer y un microscopio óptico. Posteriormente en una placa de 96 pozos para cultivo celular, se agregaron a cada pozo de la placa 100 µl de medio. Excepto en el primer pozo. Se ajustó la suspensión de amibas a 2×10^6 en 200 µl y se agregaron al primer pozo. Se mezclaron las amibas del primer pozo con la micropipeta entre 5 y 10 veces procurando no hacer burbujas. Se tomaron 100 µl y se pasaron al segundo pozo. Se mezclaron las amibas del segundo pozo con la micropipeta entre 5 y 10 veces procurando no hacer burbujas. De este se tomaron 100 µl y se pasaron al tercer pozo. Se repitió este procedimiento hasta llegar al pozo 12 (Rodríguez, 2003). Al terminar este paso se obtuvo lo siguiente:

POZO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
No. de CÉLULAS	1 000 000	500 000	250 000	125 000	62 500	31 250	15 625	7 812	3 906	1 953	976	488

Posteriormente se incubó la placa a 37°C por 30 min. Se eliminó el medio sacudiendo la placa. Se lavó suavemente con solución salina o PBS 1X estéril (dos veces). Se fijaron las células con 100 µl de metanol por 30 segundos. Se retiró el resto de metanol. Se agregaron 100 µl de solución de Cristal Violeta al 0.1% a todos los pozos y se dejaron incubar de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se eliminó el colorante, sacudiendo la placa. Se lavó suavemente con solución salina o PBS 1X. Se solubilizaron las células agregando 100 µl de SDS al 1% y finalmente la placa se leyó en el lector de ELISA, marca Thermo E.C., modelo Multiskan Ex a una longitud de onda de 570nm. La curva patrón obtenida se empleo para determinar la CL y la CL₅₀, de cada extracto metanólico de *R. centifolia.*, siguiendo la Técnica de Viabilidad Celular por Cristal Violeta, los valores de absorbancia se graficaron contra el número de amibas.

EFFECTO IN VITRO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *R. centifolia* SOBRE *N. fowleri*. Se realizó lo siguiente:

N. fowleri. Se “cosecharon” las células de la misma forma descrita para obtener la curva patrón. Se realizó el ajuste para poder tener 1.5×10^4 trofozoítos en 100 μ L. En una placa de 96 pozos de cultivo celular, se colocaron 1.5×10^4 trofozoítos en 100 μ L de medio, en una fila. Lo anterior por triplicado.

Extracto. En una placa de de 96 pozos de cultivo celular, se añadieron en el primer pozo (P1) 40 μ L de extracto+ 160 μ L de medio. Concentración inicial (40mg/ml). En los siguientes pozos se agregaron 100 μ L de medio (P2, P3,..., P12). Se pipetearon 100 μ L de P1 y se agregaron a P2, de este último se volvieron a pipetear 100 μ L y se agregaron a P3, así consecutivamente hasta P12 con una concentración final de 0.019 mg/ml. Al concluir este paso se obtuvieron las siguientes concentraciones en 100 μ l:

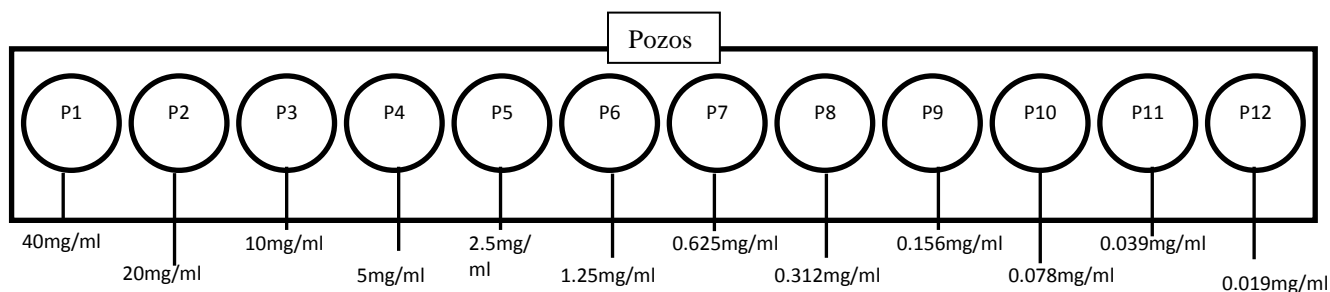


Fig. 6 Diluciones finales de los extractos.

Lo anterior por triplicado y para cada uno de los extractos (pétalos y hojas).

Una vez concluido lo anterior: Las diluciones de cada extracto se pipetearon y se añadieron a los pozos con las 1.5×10^4 amibas. Las placas de de 96 pozos de cultivo celular, se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente se lavaron suavemente con solución salina o PBS 1X a 37°C estéril (dos veces). Se fijaron las células con 100 μ l de metanol por 30 segundos. Se retiró el resto de metanol. Se agregaron 100 μ l de solución de Cristal Violeta al 0.1% a todos los pozos y se dejaron incubar de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente

en oscuridad. Se eliminó el colorante, sacudiendo la placa. Se lavaron suavemente con solución salina o PBS 1X. Se solubilizaron las células agregando 100 µl de SDS al 1%. La placa se leyó en el lector de ELISA a una longitud de onda de 570nm.

Los valores que se obtuvieron se interpolaron en la curva patrón y se graficaron para obtener el resultado del número de trofozoítos en cada pozo y así se determinó la CL₅₀. Para el control positivo se utilizó se empleó AMB para lo cual se realizó el procedimiento anterior empleando las concentraciones siguientes 0.01, 0.1 y 1 µg/ml (Goswick y Brenner, 2003).

TOXICIDAD CELULAR

Extracto. En una placa de 96 pozos de cultivo celular, se añadieron en el primer pozo (A1) 5µL de extracto con la concentración doble de la CL₅₀ + 195 µL de medio. Se tomaron 100µL de esta mezcla y se realizaron las diluciones correspondientes en los siguientes pozos. Se añadieron 1.5×10^4 células CaSki en 100 µL de medio a los pozos 1-12 de las filas A, B y C. Una vez concluidas las diluciones, estas se pipetearon y añadieron a las filas A, B y C, respectivamente. Lo anterior para cada extracto. Las placas de incubaron a 37°C con CO₂ al 5 % por 72 horas. Posteriormente se lavaron suavemente con solución salina o PBS 1X estéril (dos veces). Se fijaron las células con 100 µl de metanol por 30 segundos. Se retiró el resto de metanol. Se agregó 100 µl de solución de Cristal Violeta al 0.1% a todos los pozos y se dejó incubar de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se eliminó el colorante, sacudiendo la placa. Se lavó suavemente con solución salina o PBS 1x a 37°C. Se solubilizaron las células agregando 100 µl de SDS al 1%. La placa se llevo al lector de ELISA a una longitud de onda de 540nm.

De los valores obtenidos se calcularon los porcentajes, esto para determinar la concentración de extracto que eliminó a la mitad del número total de células CaSki, utilizando la ecuación siguiente:

$$CI_{50} = \frac{\bar{X} C - \bar{X} \text{Exp}}{\bar{X} C} \times 100$$

X C= Promedio de las absorbancias de los controles

X Exp= Promedio de las absorbancias de los pozos con células

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC). ANÁLISIS FITOQUÍMICO.

Se realizó una caracterización química preliminar de los extractos de pétalos y hojas *R. centifolia*, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando una columna Discovery C-18, de 250 x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm. Corrida isocrática con mezcla de MeOH-acetonitrilo-agua (25-25-50), flujo de 1 mL/min. Detector de arreglo de diodos (DAD) a longitud de onda de 260 nm con barrido completo de 200-400 nm.



Fig. 7. Ensayo de HPLC de la rosa de Castilla

ENSAYO DE EFECTO ANTI-INFLAMATORIO UTILIZANDO EL MODELO DE CARRAGENINA.



Fig. 8. a) Administración de los extractos de la rosa de Castilla con la ayuda de una cánula, b) Inyección de carragenina (1%) en la pata de cada rata, una hora después de la administración de los extractos a diferentes concentraciones.

A los seis grupos de ratones (n=3) en ayuno de 8 h, con acceso libre de agua, se les administró oralmente, mediante cánula: 200, 100, 50 y 25 mg/kg del extracto metanólico de pétalos y hojas de la rosa de Castilla. El grupo de referencia recibió Dexametasona (10 mg/kg, vía oral) disuelta en solución salina estéril, el grupo control negativo recibió solución salina estéril (10mL/kg, vía oral) Una hora después se les inyectó 50 μ L de carragenina al 1 % en el cojinete plantar de la pata derecha trasera. El volumen de la pata se midió antes y después de la inyección de carragenina o solución salina, esto por el método de desplazamiento del mercurio (Van Arman y Begany, 1965).

El grosor de la pata se midió a los tiempos 0, 1, 2, 3 y 4 horas después de la inyección de la carragenina. Después se sacrificaron los ratones en cámara de CO₂. Se utilizó la siguiente ecuación para el cálculo del porcentaje de inhibición de la inflamación:

$$\% \text{Inhibición} = \frac{[(Ct - Co)_{\text{control}} - (Ct - Co)_{\text{tratado}}]}{(Ct - Co)_{\text{control}}} \times 100$$

Donde:

Ct = es el valor del desplazamiento de volumen al tiempo X

Co = es el valor del desplazamiento de volumen al tiempo cero

A los resultados obtenidos se les sometió a una ANOVA de dos vías con una $P > 0.05$.

MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Se tomó como referencia la técnica descrita en el artículo de Omaña *et al*, 2004. Para obtener las fotografías de las amibas a una placa de 24 pozos se les colocó un portaobjetos circular en el fondo de cada pozo y se añadieron 300µl de medio con 250 mil amibas, la placa se incubó por 30 minutos para que las amibas se adhirieran en el portaobjetos, pasados estos minutos se les agregó el extracto metanólico de pétalos y hojas correspondiente a la CL₅₀. Se incubó la placa por 24 horas, esto para observar con mayor claridad el efecto de los extractos sobre las amibas. Pasadas las 24 horas se eliminó con una pipeta y con mucho cuidado el medio de cada pozo y se lavó suavemente cada pozo con PBS 1x a 37°C (dos veces) y se les añadió 300µl de Glutaraldehído al 2.5% en 0.1 M de buffer de cacodilato y pH 7.2 a 37°C; después se incubó por 30 minutos a 37°C. Posteriormente con una pipeta se retiró el fijador y con mucho cuidado se realizó el proceso de deshidratación de las células de cada pozo con alcoholes a 50%, 60%, 70% y 90% por intervalos de 5 minutos entre cada concentración, finalmente las células se conservaron en alcohol al 90% y así se llevaron al microscopio electrónico de barrido, en donde cada muestra se cubrió con una fina capa de polvo de oro para obtener a detalle la morfología de las células (Laboratorio de Fisiología Vegetal de la UBIPRO, en la FES Iztacala con el apoyo del profesor Rafael Quintanar). Así mismo se tomaron fotografías con el microscopio óptico del laboratorio de Microbiología Ambiental de la UIICSE de la FES-Iztacala. La fijación de *N. fowleri* también se llevó a cabo con los extractos MeOH de pétalos y hojas de *R. centifolia*. Se obtuvieron dos catálogos de fotografías, Apéndice 1 y 2.

RESULTADOS

Reactivación de la virulencia de *N. fowleri*. Una vez realizada la inoculación se hizo un seguimiento de los síntomas que presentaron los ratones desde el día uno hasta su muerte que fue el día 8 (Fig. 8), se observó el decaimiento y clara inflamación en la cabeza de los organismos. En el día 1 se observó que los ratones estaban sanos y respondieron claramente a las estimulaciones que se les realizaron; día 2 se les encontró muy activos y respondiendo a las estimulaciones que se les realizaron; día 3 se observan que están menos reactivos y comieron menos; día 4 y 5 se les observó con el pelaje erizado (probablemente por la fiebre) y se habían alimentado muy poco; día 6 y 7 los ratones ya no se desplazaron y no respondieron a ningún estímulo, se les observó con el pelaje sumamente erizado y con la cabeza claramente inflamada. Día 8 a los ratones se les sacrificó para recuperar el cerebro en 1 caja Corning en donde se colocó el cerebro con medio Bactocistona 2% (adicionada con suero fetal bovino y Antibac), posteriormente se le cambió dicho medio cada 30 minutos durante 3 horas a 37°C.

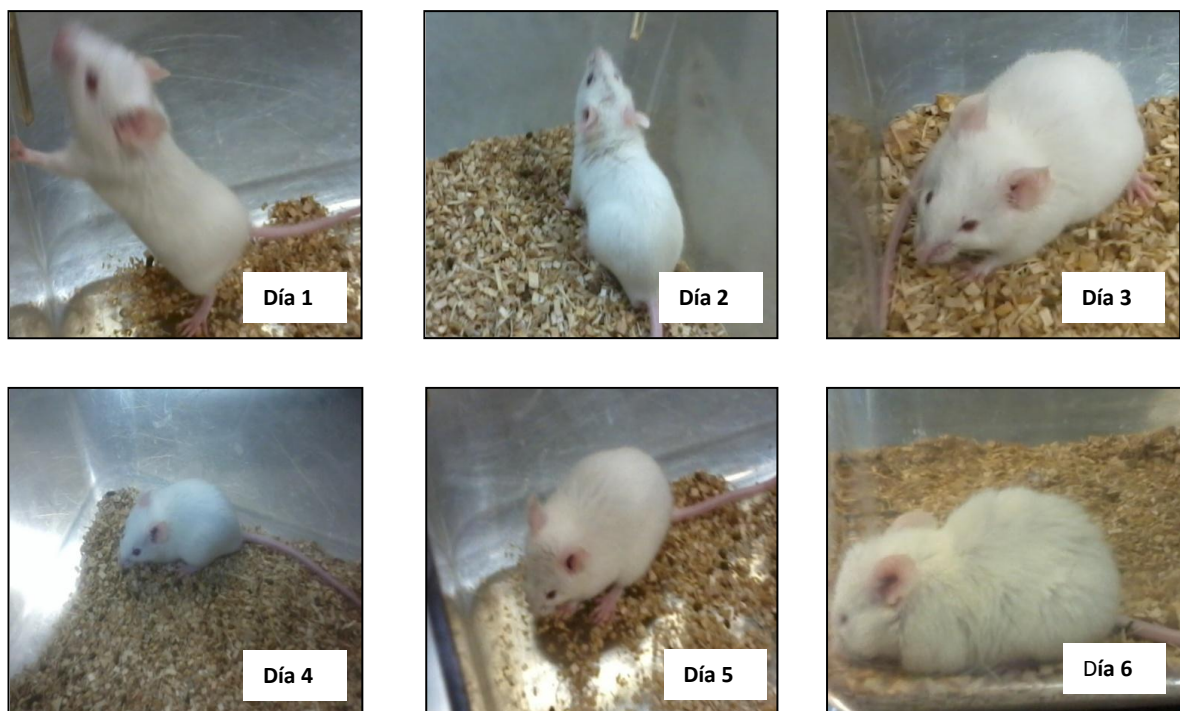


Fig. 9...



Fig. 9 Ratones inoculados con *N. fowleri* para reactivar su virulencia.

Una vez que se realizó la siembra de los trofozoitos de *N. fowleri* y se formó una monocapa para poder realizar una curva patrón de viabilidad celular por cristal violeta.

Curva patrón para los ensayos de Viabilidad de los trofozoítos de *N. fowleri*.

La curva obtenida (Gráfico 1) fue empleada para interpolar los datos obtenidos de las absorbancias de las interacciones de los extractos metanólicos de *R. centifolia* sobre *N. fowleri*.

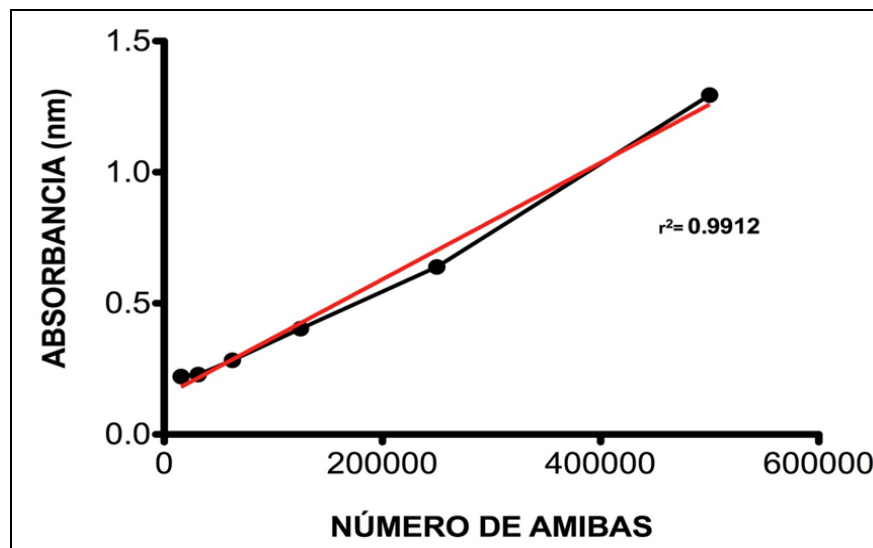


Gráfico 1. Curva patrón de viabilidad celular, datos obtenidos en tres repeticiones.

EFFECTO *in vitro* DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE *R. centifolia* SOBRE *N. fowleri*.

Los dos extractos metanólicos presentaron efecto sobre *N. fowleri*, sin embargo el extracto de hojas es el que mostró una actividad mayor, lo cual se observa en el gráfico 2. Como se puede observar el extracto de hojas tiene una mayor actividad antiamebiana que el de pétalos ya que la CL₅₀ del extracto de hojas fue de 0.039 mg/ml (39 µg/ml) contra 2.5 mg/ml de pétalos.

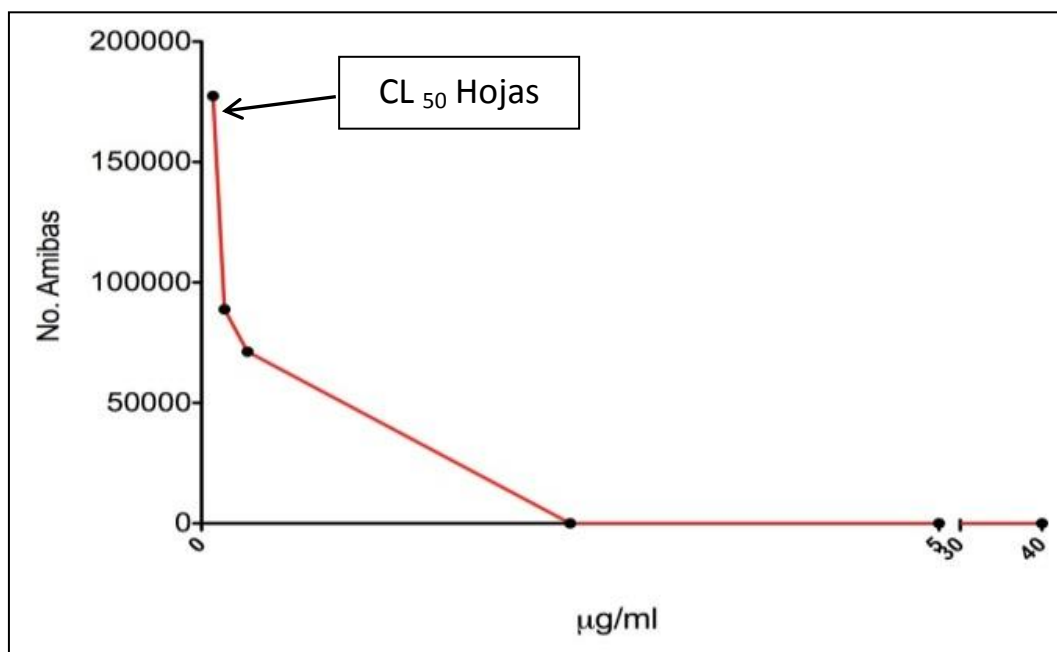


Gráfico 2. Interacción del extracto metanólico de Hojas de *R. centifolia* sobre *N. fowleri*, mediante la Técnica de Viabilidad Celular por Cristal Violeta donde la concentración de la CL₅₀ se obtuvo interpolando en la curva patrón, la cual fue de 39 µg/ml.

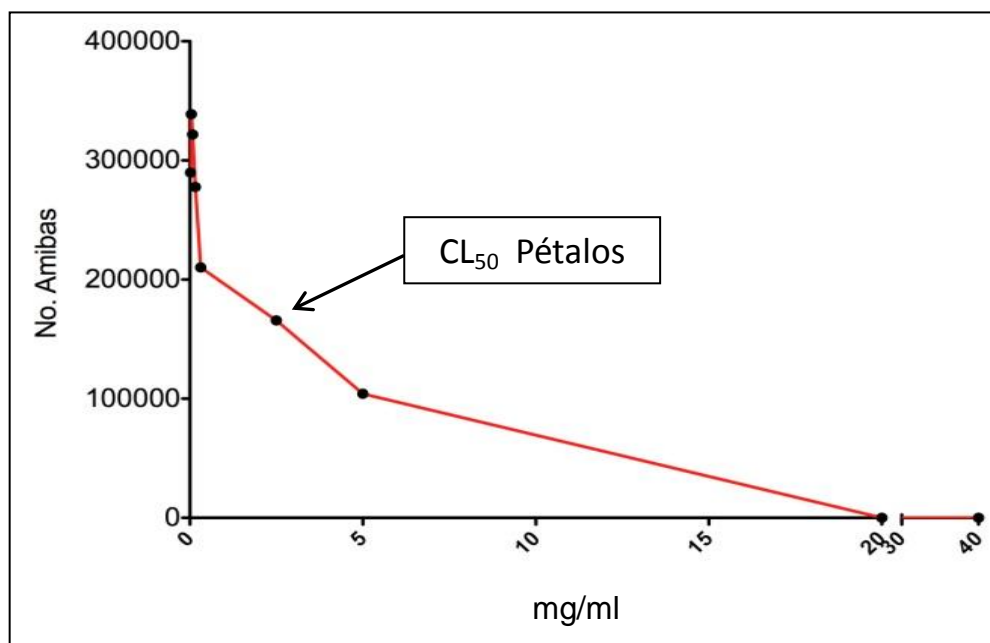


Gráfico 3. Interacción del extracto metanólico de pétalos de *R. centifolia* sobre *N. fowleri*, mediante la Técnica de Viabilidad Celular de Cristal Violeta donde la concentración de la CL_{50} se determinó interpolando el resultado obtenido en la curva patrón, la cual fue de 2.5 mg/ml.

Por microscopía óptica, se pueden apreciar el efecto que tienen los extractos sobre los trofozoitos de *N. fowleri* ya que producen formas redondeadas además de una disminución del número de células (Fig. 9). La interacción entre *N. fowleri* y el extracto de pétalos de rosa de Castilla presentó una CL_{50} mayor (Gráfico 2) respecto a la obtenida con el extracto de hojas, es importante mencionar que se observaron numerosas amibas flagelando a las 24 horas de incubación (no se pudieron capturar en fotografías).

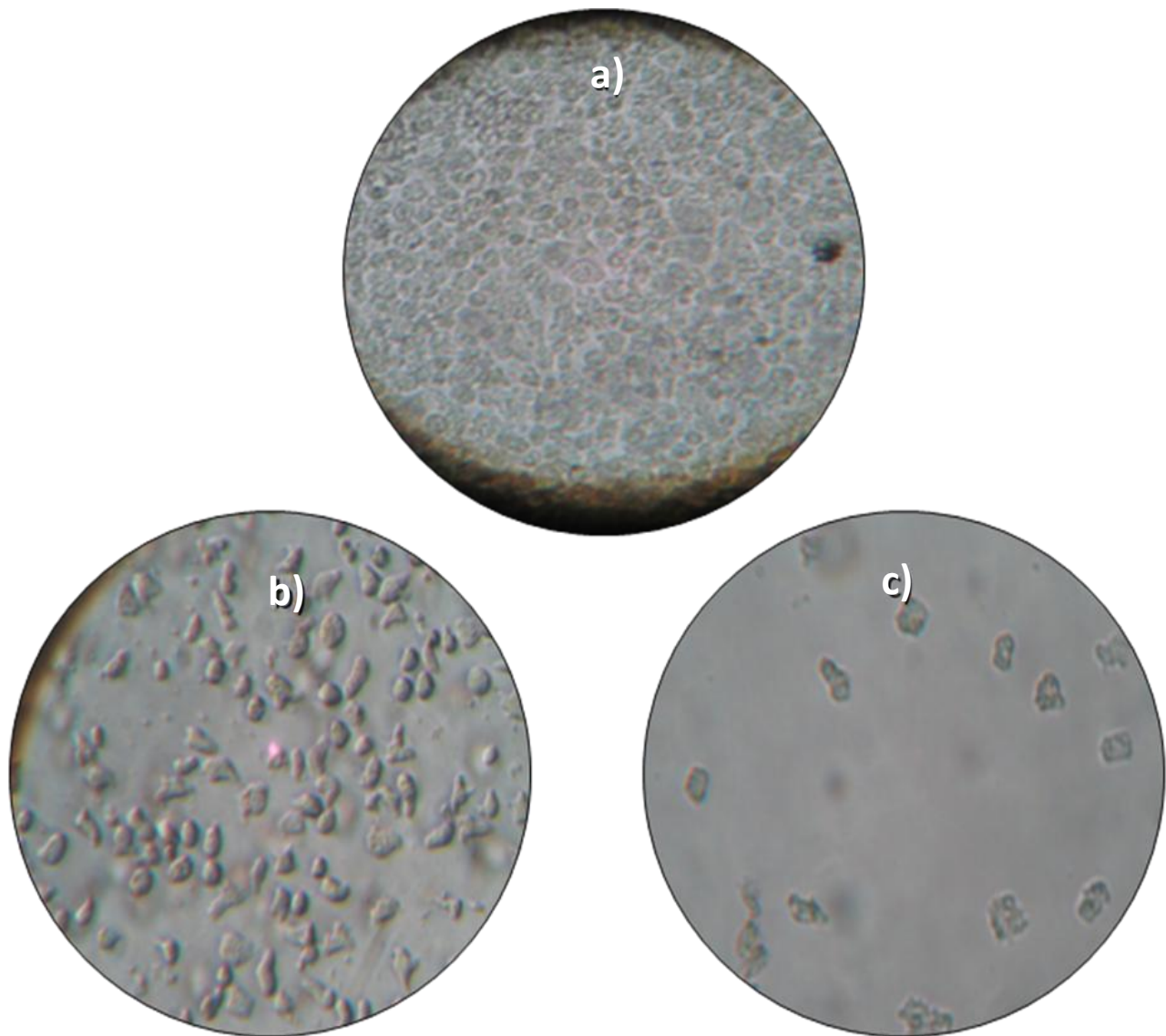


Fig. 10 a) Fotografía del cultivo control de *N. fowleri*, en donde se observan numerosos trofozoitos y su forma típica; b) Fotografía de la interacción de *N. fowleri* y el extracto de pétalos de *R. centifolia* [39 µg/ml], se observan menor número de trofozoitos y en su mayoría redondeados probablemente por el efecto del extracto; c) Fotografía de la interacción de *N. fowleri* y el extracto de hojas [2.5 mg/ml], en b) y c) se observa claramente la diferencia en el efecto amebicida de cada extracto. Observación en microscopio invertido marca Zeiss a 40X.

Toxicidad Celular

Una vez que se demostró que los extractos metanólicos tanto de hojas como de pétalos presentaron un efecto amebicida contra *N. fowleri*, se considero importante evaluar si estos extractos eran tóxicos ya que como se mencionó anteriormente la Anfotericina B es muy efectiva contra *N. fowleri* pero muy tóxica. Para esta técnica se empleo la línea celular CaSki (Células de Cáncer Cervicouterino Humano) se determinó que la CI_{50} (Concentración Inhibitoria del 50% de la población) mediante la técnica de viabilidad celular por Cristal Violeta.

Los datos obtenidos se reportaron como la concentración inhibitoria (CI_{50}) como se muestra en la tabla 1.

Toxicidad Celular	
Extracto	CI_{50}
Pétalos	375µg/ml, no tóxico.
Hojas	>40 µg/ml, no tóxico.

Tabla 1. Datos obtenidos de toxicidad de los extractos de *R. centifolia*.

Tomando en cuenta el criterio del Instituto Nacional de Cáncer (NCI) que menciona que para que un extracto se considere tóxico la concentración debe ser igual o menor a 20µg/ml. (Geran *et al* 1972; Swanson y Pezzuto, 1990; Sri *et al*, 2009), lo anterior indica que los extractos de *R. centifolia*, no son tóxicos debido a que superaron por mucho la concentración de referencia. En el cultivo control de células caSki se observó un gran número de células formando una monocapa, mientras que en la interacción con los extractos de pétalos se observó una disminución importante dichas células con la

CL₅₀ (obtenida en la interacción con *N. fowleri*) y en caso de la CL₅₀ del extracto de hojas se observó una disminución mucho mayor el número de células caSki (Fig. 9).

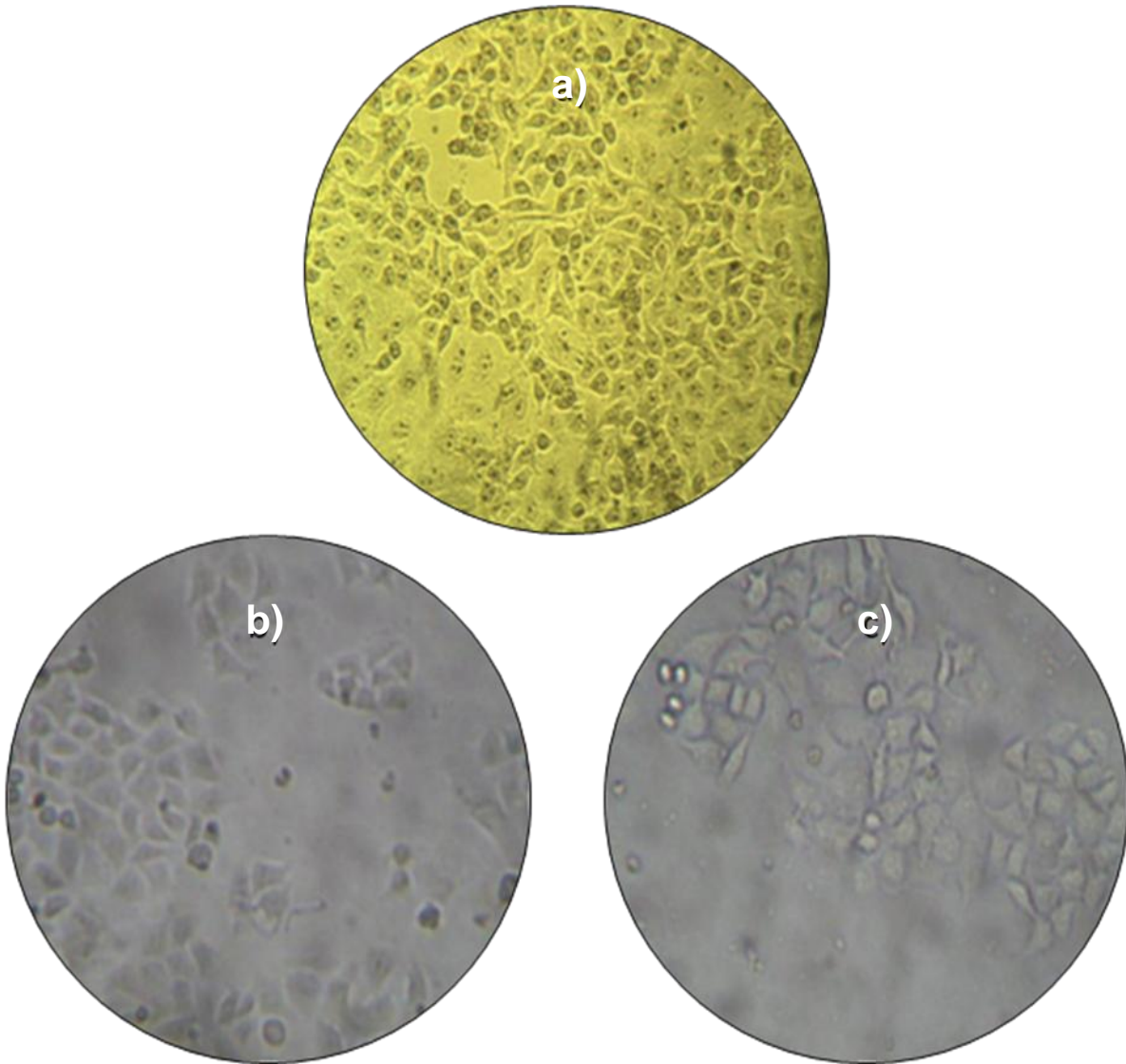


Fig. 81 a) Extracto de pétalos y con cultivo control de células CaSki, observada a 20X; b) Interacción del extracto de pétalos de la rosa de Castilla [2.5 mg/ml] y células CaSki; c) Interacción del extracto de hojas de la rosa de Castilla [0.039 mg/ml] y células CaSki, obsérvese menor cantidad de células con la interacción con el extracto de hojas; b) y c) observadas a 40X.

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) DEL EXTRACTO DE HOJAS Y PÉTALOS DE *Rosa centifolia*.

Mediante esta técnica se determinó la composición química de los extractos de pétalos y hojas, tal como se aprecia en los cromatogramas de los gráficos 3 y 4. Así mismo se observan con mayor claridad las lecturas de Tiempo de retención y UV máxima de ambos extractos, en las tablas 2 y 3.

Los extractos de pétalos y hojas de la rosa de Castilla contienen una gran cantidad de fenilpropanoides, los cuales tienen el mismo origen, la ruta de ácido Shikimico.

PÉTALOS		
Tiempo de retención mins.	Uv λ_{\max} (nm)	Compuesto
2.44	216 270 360	Fenilpropanoide
3.19	264 352	Flavonoide
3.32	258 356	Flavonol
3.95	256 352	Quercetina
4.92	264 344	Flavonoide

Tabla 2. Valores del Cromatograma del extracto de Pétalos.

HOJAS		
Tiempo de retención mins.	Uv λ_{\max} (nm)	Compuesto
1.92	268	Fenol
2.42	216 272	Polifenol
3.31	258 354	Flavonol
3.94	254 352	Flavonol
4.82	264 346	Flavonoide

Tabla 3. Valores del Cromatograma del extracto de Hojas de *R. centifolia*.

Los compuestos encontrados en el extracto de pétalos son fenilpropanoides relacionados con la ruta de Acido Shikimico. Algunos como la quercetina son compuestos con alta actividad antioxidante.

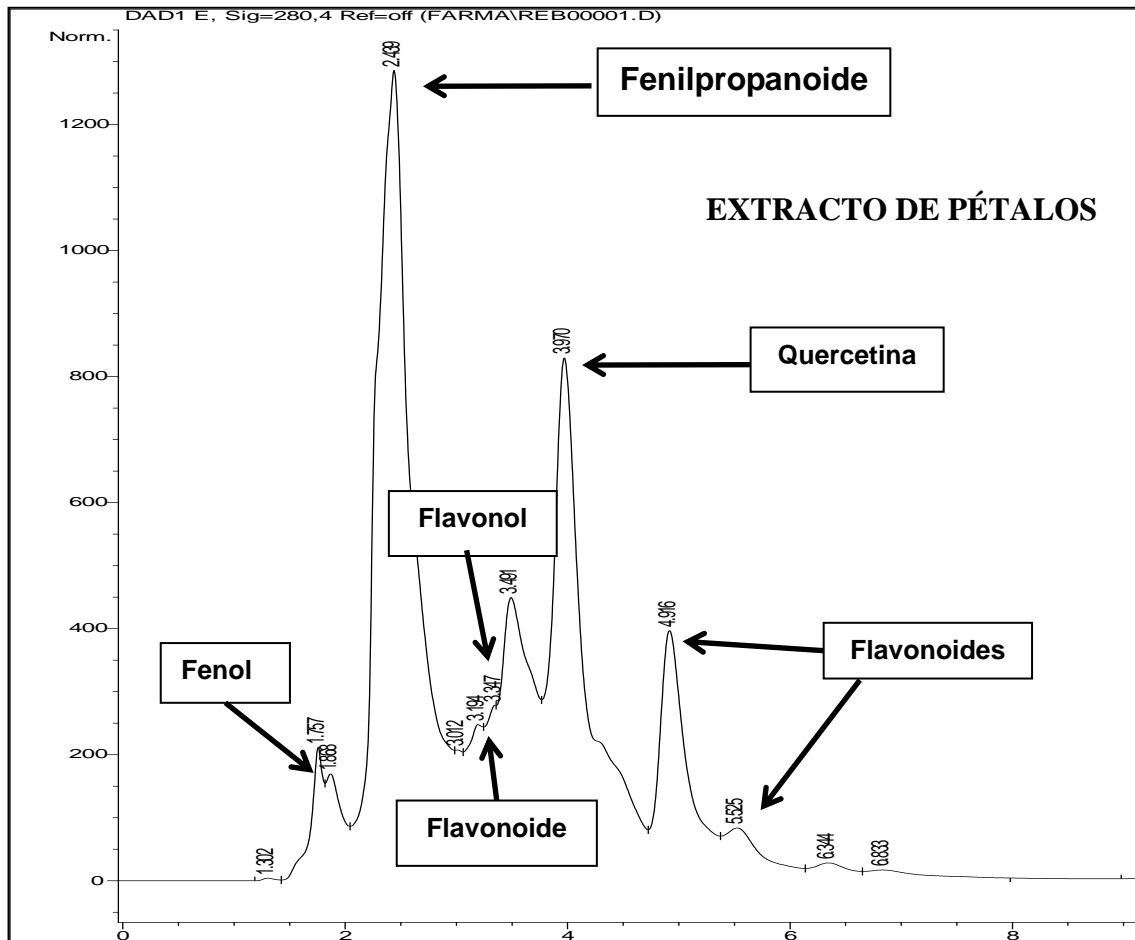


Gráfico 4. Cromatograma del extracto de Pétalos.

El extracto de pétalos presentó diversos fenilpropanoides entre ellos quercetina, la cual es uno de los flavonoides polifenólicos más comunes presentes en las plantas, (Fonseca *et al.*, 2011).

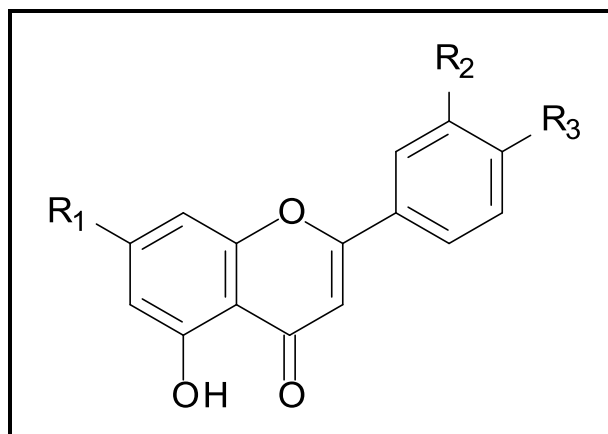


Fig. 12 Estructura química básica de flavonoides

Al igual que en el extracto de Pétalos los compuestos identificados provienen de la ruta del Acido Shikímico

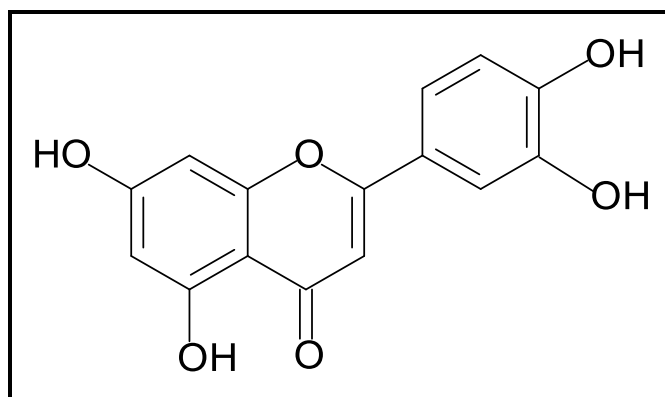


Fig. 93 Estructura química de la quercetina.

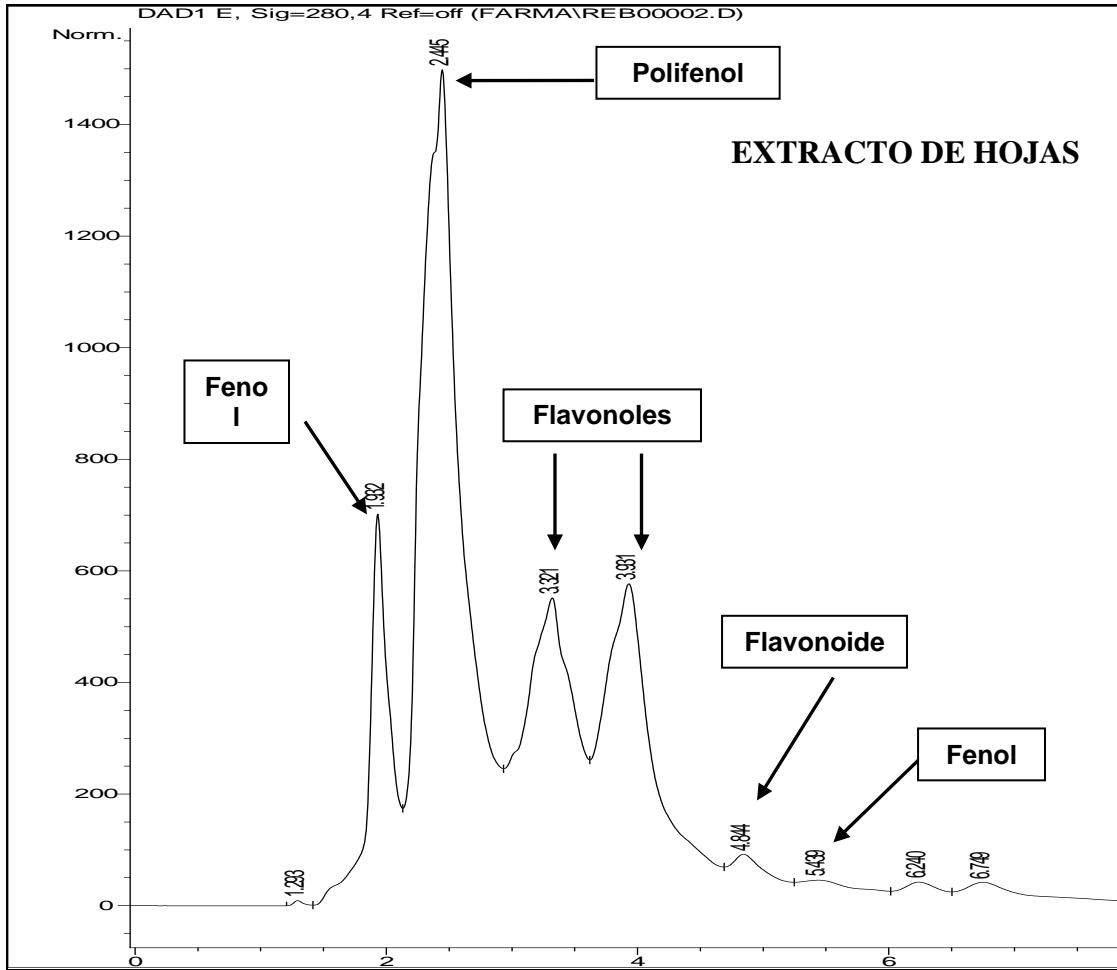


Gráfico 5. Cromatograma del extracto de Hojas de *R. centifolia*.

ENSAYO DEL EFECTO ANTI-INFLAMATORIO EMPLEANDO EL MODELO DE EDEMA PLANTAR POR CARRAGENINA.

Mediante esta técnica se determinó el efecto anti-inflamatorio de tres concentraciones (250, 500 y 750 mg/kg) de la Rosa de Castilla tanto del extracto de pétalos (gráfico 6) como de hojas (gráfico7). Para pétalos se observó la formación del edema inducido por carragenina a diferentes horas, la inflamación llegó al máximo a las cuatro horas. En el gráfico 6 se muestra que la concentración de 500 mg/ml fue la mejor debido a que se acercó más a la Dexametasona. Las concentraciones de 250 y 750 mg/kg se comportaron de forma similar en el tiempo máximo de inflamación (4hrs), no existió diferencia significativa entre ellas.

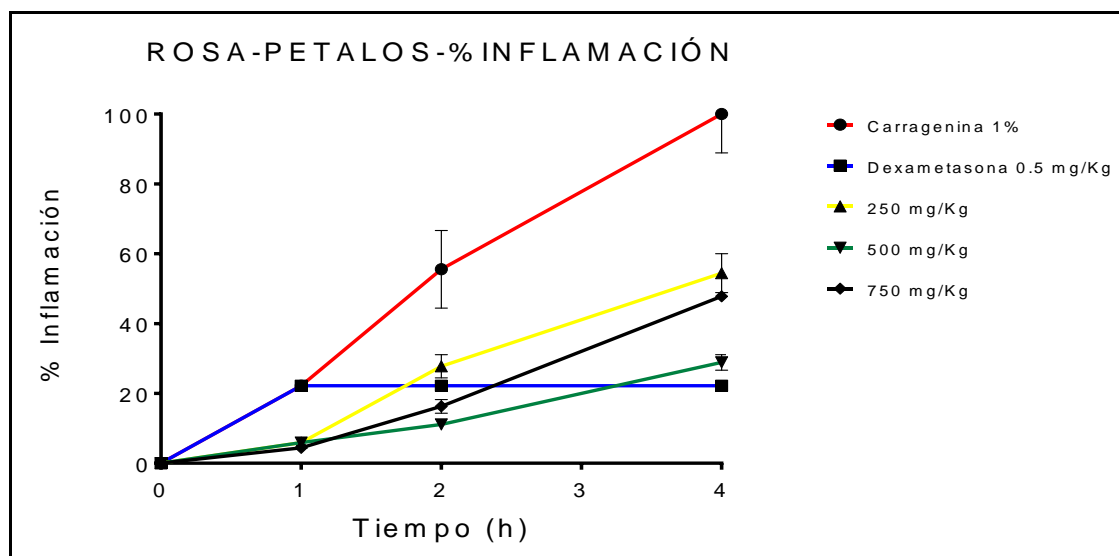


Gráfico 6. Se observa efecto de las concentraciones de pétalos de la Rosa de Castilla, así como los de Carragenina y Dexametasona.

La carragenina (1%) se tomó como control positivo, en donde se observó una inflamación considerable, y como control negativo la Dexametasona (1mg/kg) los cuales se muestran en las Figuras 13 y 14. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 4.

% DE INFLAMACIÓN			
CARRAGENINA	DEXAMETASONA	PÉTALOS [500 mg/kg]	HOJAS [500 mg/kg]
100	22	29	39

Tabla 4. Datos de inflamación de extractos MeOH de la rosa de Castilla y controles.



Fig. 14 Pata izquierda- control positivo (Carragenina) y Pata derecha-control negativo (Dexametasona).



Fig. 15 Pata de la izquierda con Carragenina y pata de la derecha extracto de pétalos (500mg/kg) de la rosa de Castilla

Con el extracto de hojas se observó que las concentraciones de 500 y 750 mg/kg no presentaron diferencia significativa entre ellas, mostrando un mayor efecto antiinflamatorio el extracto a 500 mg/kg fue la mejor ya que fue la más efectiva a una menor concentración, lo cual implica administrar menor cantidad de extracto.

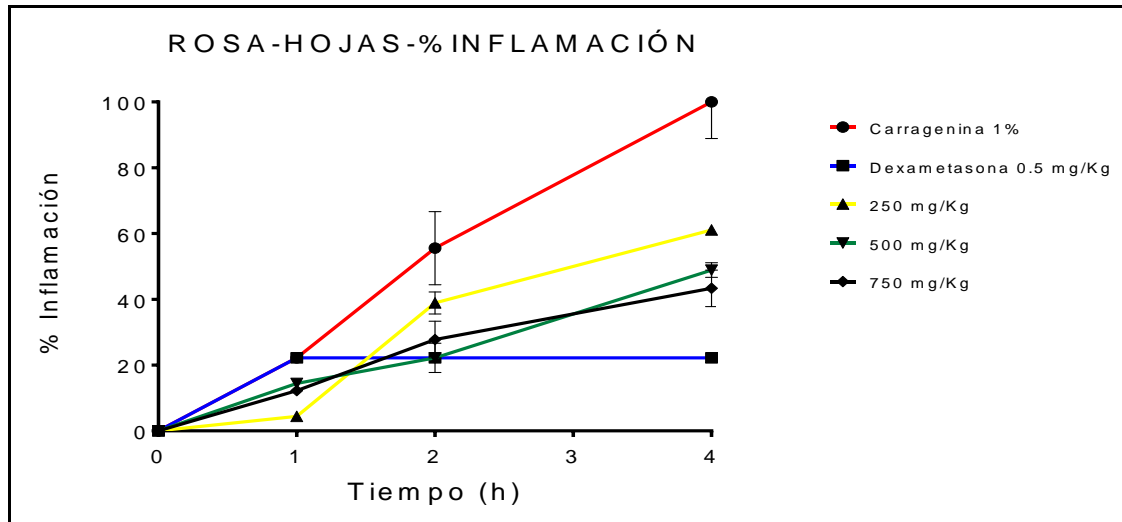


Gráfico 7. Se muestra el efecto antiinflamatorio del extracto de hojas a diferentes concentraciones así como del control positivo, después de haber inyectado Carragenina y el control negativo suministrándoles Dexametasona (1mg/kg) a cada grupo de ratas, esto a diferentes horas.

DISCUSIÓN

Con base a los resultados obtenidos se puede afirmar que en este trabajo se presentan por primera vez evidencias de que los extractos tanto de hojas como de pétalos de la rosa de Castilla (*R. centifolia*) tienen actividad contra *N. fowleri*. Es importante recalcar que son muy pocos los trabajos sobre la Rosa de Castilla y este es el primero que reporta su actividad contra amibas de vida libre. El extracto que presentó efecto amebicida con una menor concentración fue el de Pétalos **DL50=2.5 mg/ml** y el de Hojas **DL50=0.039 mg/ml**, estos resultados se pueden atribuir a la presencia de fenilpropanoides como flavonoides, flavonoles, quercetina, entre otros, los cuales están ampliamente distribuidos en plantas y en zonas específicas de la planta y que por sus propiedades se han usado en la medicina antigua y en la actualidad también reciben el nombre de productos naturales (Ávalos y Pérez, 2009). Se conocen más de 8 000 fenilpropanoides los cuales son formados por las vías del ácido shikímico o vía del malonato/acetato, además de que protegen a la planta contra herbívoros y patógenos, otros proveen soporte mecánico, otros atraen polinizadores o dispersores de frutos, algunos de ellos absorben la radiación UV o actúan como agentes alelopáticos por ejemplo los isoflavonoides, furanocumarinas y estilbenos han demostrado tener propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngica (Tyler, 1979; Vivas, 2010).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Belosfky en 2006 en donde demostró el efecto de isoflavonas presentes en *Dalea aurea* sobre *N. fowleri*, sin embargo su estudio sólo consistió en ver como afectaba el crecimiento en el cultivo de la amiba además que no se determinaron las dosis letales medias y en el presente estudio se evaluaron otros aspectos como las propiedades antiinflamatorias y toxicidad de los extractos de la Rosa de Castilla.

En el tratamiento de enfermedades provocadas por protozoos, como *N. fowleri*, se ha comprobado el efecto de los extractos metanólicos ricos en fenilpropanoides de diversas plantas mexicanas contra trofozoitos de *Trichomonas vaginalis*, así mismo se ha reportado el efecto de flavonoides contra *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* (Calzada *et al.*, 2005) así como la efecto *in vitro* de fenilpropanoides como fenoles y fitoalexinas sobre

Trypanosoma cruzi, *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trichomonas* y gusanos intestinales (Barbosa *et al.*, 2007; Calzada *et al.*, 2005; Mezenzev *et al.*, 2009; Wink, 2012) y efecto *in vivo* sobre *Plasmodium falciparum* y *T. brucei rhodesiense* así mismo se ha reportado el efecto de flavonoides y flavanonas sobre *C. albicans* y *C. krusei* (Belofsky *et al.*, 2004; Deliorman *et al.*, 2010; dos Santos *et al.*, 2008; Peralta *et al.*, 2012).

En el presente trabajo se confirma lo señalado por Rivera en 2010 en donde determinó el efecto antifúngico del extracto metanólico de *R. centifolia* sobre *C. albicans* y *T. mentagrophytes*, lo cual es un antecedente importante para combatir a *N. fowleri* debido a que la AMB es un antifúngico y es el fármaco más efectivo contra *N. fowleri*.

La quercetina es otro flavonoide encontrado en el extracto de pétalos de la Rosa de Castilla, este compuesto es de gran interés como compuesto farmacéutico debido a su amplia gama de usos terapéuticos como antioxidantes, así como su efecto anti-hipertensivo, anti-inflamatorio y actividad antimicrobiana y anti-protozoaria. La quercetina y sus derivados son compuestos muy comunes y presentes en diferentes plantas, estos tienen la característica de ser absorbidos fácilmente por el ser humano además de presentar actividad *in vitro* y en modelos experimentales (Fonseca *et al.*, 2011; Mamani *et al.*, 2004) entre estos efectos se ha reportado su actividad contra parásitos de la sangre como *Trypanosoma brucei*, *Leishmania donovani* así como su efecto *in vitro* sobre el crecimiento de *Leishmania amazonensis* esto debido a que la quercetina afecta el potencial de la membrana mitocondrial, lo cual afecta el metabolismo energético y esto es crítico para la supervivencia de cualquier célula (Fonseca *et al.*, 2011) además de afectar el metabolismo del hierro sobre *L. donovani* (Sen *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la quercetina promueve directamente la apoptosis de *T. gambiense*, agente causal de la Enfermedad del sueño, además de suprimir el desarrollo *in vitro* de los bradizoítos de *Toxoplasma gondii* (Mamani *et al.*, 2004).

En base a estos resultados se puede demostrar que los extractos metanólicos de *R. centifolia* tienen actividad amebicida contra *N. fowleri*, sin embargo era importante evaluar si estos extractos son tóxicos ya que como se ha mencionado anteriormente el problema con la AMB no radica en su efectividad sino en su alta toxicidad y efectos colaterales que lo acompañan.

Se determinó que para el extracto de hojas la $CI_{50} = >40 \mu\text{g/ml}$ y pétalos $CI_{50} = 375 \mu\text{g/ml}$ y tomando como referencia el criterio del CNI de E. U., en el cual se considera que para que un extracto tenga un efecto citotóxico activo el valor de CI_{50} , tras la incubación entre 48 y 72 horas, debe ser de $20 \mu\text{g/ml}$ o menos y para un compuesto puro es de $4 \mu\text{g/ml}$ o menos (Geran *et al.*, 1972; Swanson y Pezzuto, 1990; Sri *et al.*, 2009), lo anterior demuestra que los extractos de *R. centifolia* no son tóxicos. Aunque cabe resaltar que hay diferencias muy importantes entre el extracto de pétalos y hojas, ya que este último mostró un resultado muy cercano al límite de la toxicidad, estos resultados coinciden con Rivera, 2010 quien reportó una toxicidad moderada del extracto metanólico de dicho extracto además de reportar que el extracto de hojas es el que requirió una menor concentración para la actividad antimicótica.

Sobre la toxicidad de la rosa de Castilla existe poca información, sin embargo sobre la Familia Rosaceae y en especial de *Rosa sericea* se aislaron tres flavonoides, entre ellos la quercetina, y se reportó que el extracto presentó una toxicidad moderada sobre células cancerígenas MCF-7 (Li *et al.*, 2013). Se ha reportado el potencial de inhibir el crecimiento de células A549 (células basales epiteliales de adenocarcinoma) de flavonoles y quercetina, esto inhibiendo a la flavoproteína TrxR (Tio redoxin reductasa) la cual, entre otras, ejerce una amplia gama de actividades en el control redox celular como la viabilidad y la proliferación (Lu *et al.*, 2006). En 2011 Mattarei *et al.*, reportaron un efecto de apoptosis temprana en células Jurkat en ensayos *in vitro* con quercetina y derivados de ella. Sin embargo estos estudios se realizaron con los compuestos aislados y en el presente trabajo se realizó con un extracto metanólico crudo que contenía diversos fenilpropanoides y no solo quercetina, por lo que en futuros ensayos es conveniente aislar y evaluar el efecto citotóxico, así como el sinergismo entre cada compuesto presente en la rosa de Castilla.

Respecto al efecto antiinflamatorio el extracto de pétalos con la concentración de 500 mg/kg presentó un mayor efecto antiinflamatorio muy cercano a la Dexametasona, sin embargo las concentraciones de 250 y 750 mg/kg no mostraron diferencias significativas y presentaron un comportamiento similar. En el caso del extracto de hojas, las concentraciones de 500 y 750 mg/kg mostraron un efecto antiinflamatorio similar y sin diferencias significativas, sin embargo, se puede decir que la concentración de 500 mg/kg fue la mejor ya que con una

concentración baja tuvo el mismo efecto que [750mg/ml]. Tomando en cuenta que los principales compuestos son fenilpropanoides, esto explica el efecto antiinflamatorio antes mencionado. Estos resultados coinciden con Agyare *et al.*, 2013; Lotito *et al.*, 2011; quienes reportaron las cualidades antiinflamatorias de diversos flavonoides (fenilpropanoides) entre ellos quercetina. Así mismo Hämäläinen *et al.*, 2007 y Mamani *et al.*, 2004 reportaron el efecto anti-inflamatorio de fenilpropanoides como flavonoides y la quercetina, en donde reporta que estos inhiben la liberación de TNF- α así como de derivados de oxido-nítrico-sintetasa (*i*NOS), esta última juega un papel fundamental en el proceso de inflamación. Lo anterior coincide con el efecto antiinflamatorio obtenido del extracto de pétalos de la rosa de Castilla, debido a que en este extracto se determinó la presencia de quercetina.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se concluye lo siguiente:

- Los extractos MeOH de pétalos y hojas de *R. centifolia* presentaron efecto amebicida sobre *N. fowleri*.
- El extracto MeOH de hojas presentó un efecto amebicida con una menor concentración.
- Los extractos MeOH de hojas y pétalos de *R. centifolia* no son tóxicos; aunque el extracto de hojas está muy cercano al límite de la toxicidad.
- Los compuestos principales presentes en los extractos de *R. centifolia* pertenecen al grupo de los fenilpropanoides, entre ellos quercetina.
- Los compuestos MeOH de hojas y pétalos presentaron efecto antiinflamatorio.
- El extracto MeOH de pétalos presentó un mayor efecto antiinflamatorio, muy similar a la Dexametasona

APÉNDICE 1. Fotografías tomadas con microscopio óptico marca Motic observada a 40x. Preparación con Glutaraldehído al 2.5%, en la fotografías se observan el cultivo normal de trofozoítos de *N. fowleri*.

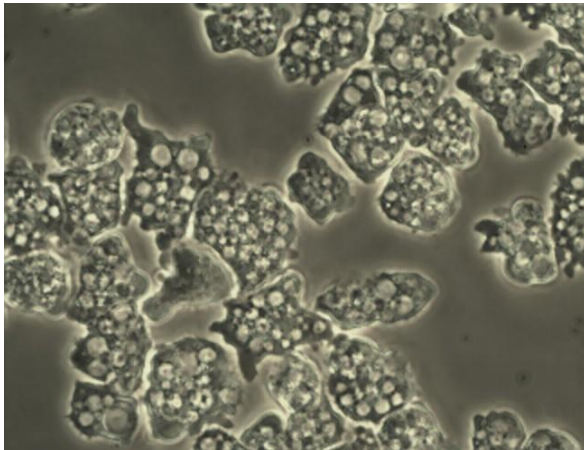


Fig. 16 Se muestra el cultivo de *N. fowleri* con numerosas vacuolas probablemente por el tiempo y las múltiples resiembras.

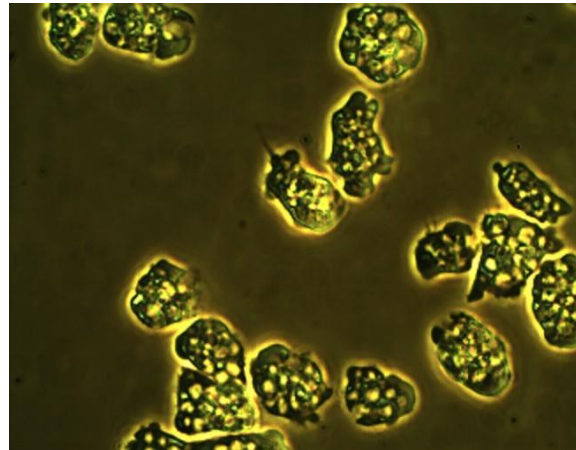


Fig. 17 Se observa el cultivo de *N. fowleri* a través del contraste de fases.

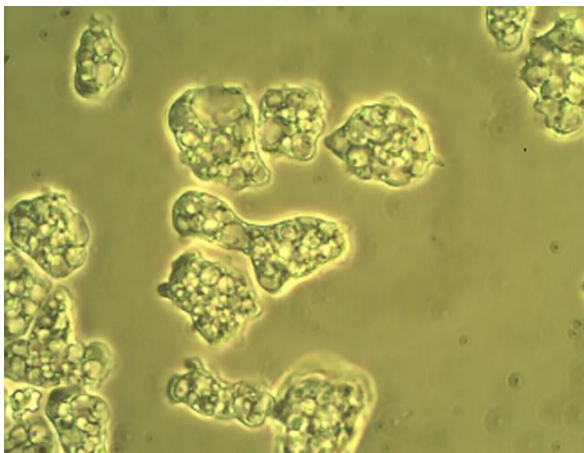


Fig.18 Se observa al centro un trofozoíto dividiéndose de *N. fowleri*.

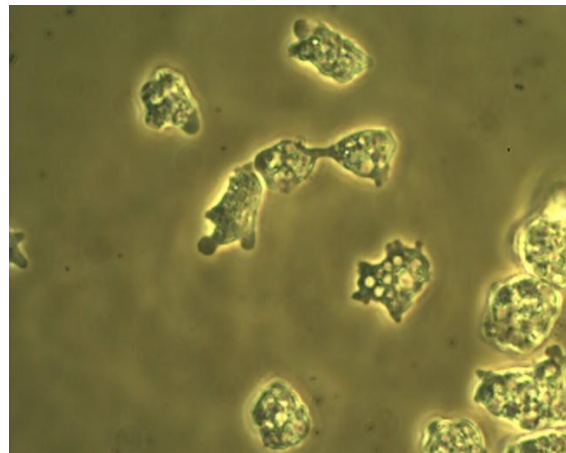


Fig. 19 Se observa un trofozoíto dividiéndose con la forma típica de “pasa”.

APÉNDICE 2. Fotografías tomadas el 16/05/12 con el microscopio electrónico de barrido de la UBIPRO en la FES-Iztacala. Las imágenes muestran el cultivo normal de *N. fowleri*.

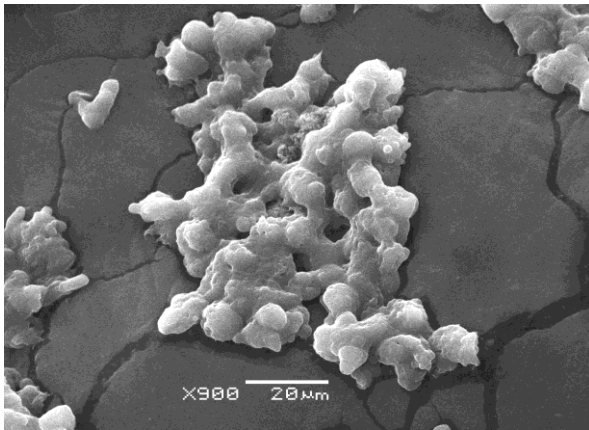


Fig. 20 Se observa numerosos trofozoitos de *N. fowleri* del cultivo normal.

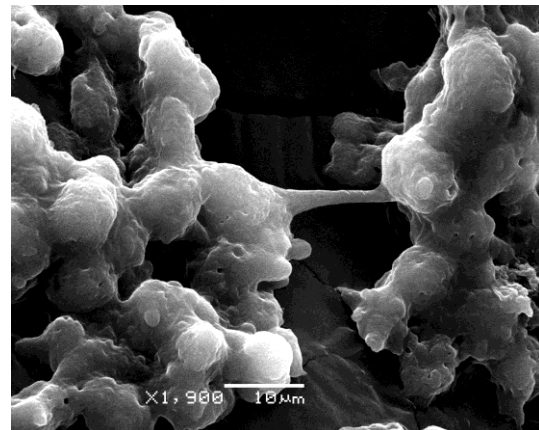


Fig. 21 Se muestra una unión que existe entre células de *N. fowleri*.

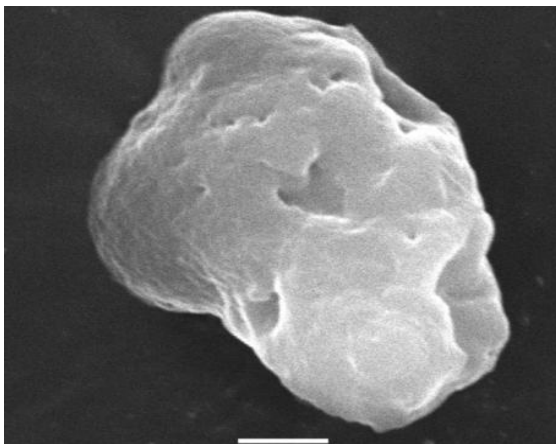


Fig. 22 Se observa el detalle de un trofozoíto de *N. fowleri* se muestran al menos cuatro amebostomas.

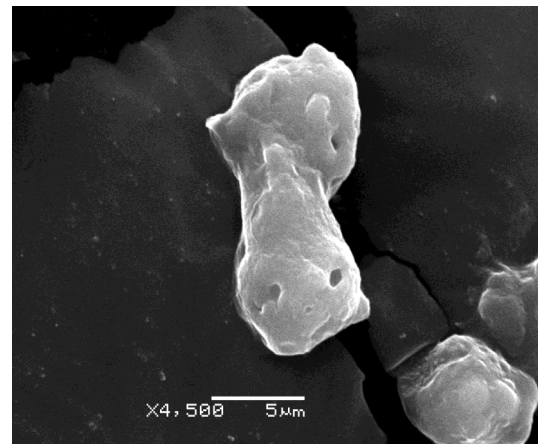


Fig. 23 Se muestra un trofozoíto que probablemente se estaba dividiendo, se observan al menos tres trofozoitos de *N. fowleri*.

Fotografías obtenidas con el microscopio electrónico de barrido en la UBIPRO en la FES-Iztacala. Muestran los efectos del extracto MeOH de pétalos (P) de *R. centifolia* sobre *N. fowleri*.

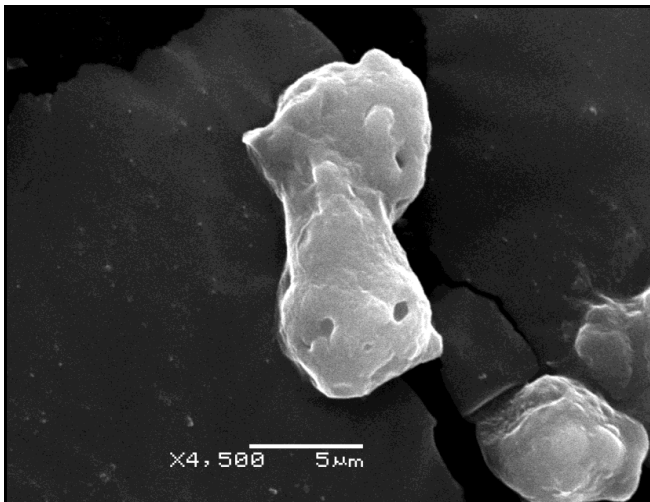


Fig. 24 Trofozoíto de *N. fowleri* de cultivo control.

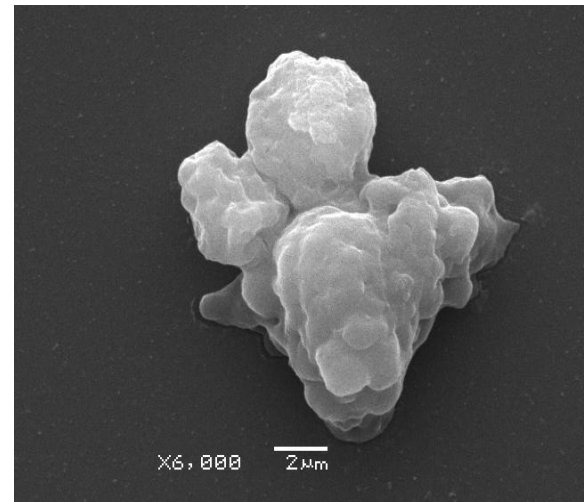


Fig. 25 Se observa detalle de un trofozoíto de *N. fowleri* con los signos evidentes del daño ocasionado por el extracto MeOH de pétalos de la rosa de Castilla.

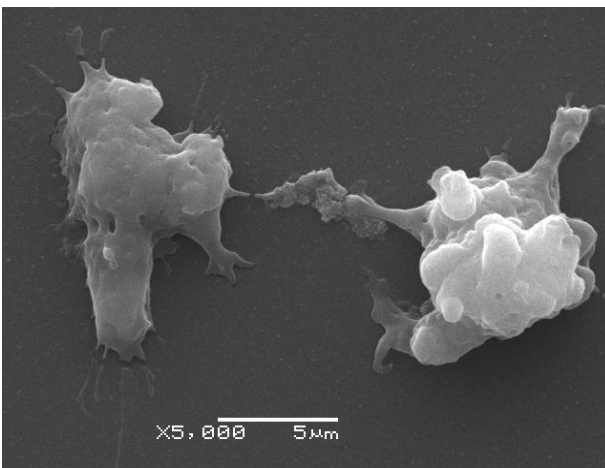


Fig. 26 Se observa a la derecha un trofozoíto con daño evidente ocasionado por el extracto MeOH (P) e contraste con la célula de la izquierda que conserva aún su forma típica.

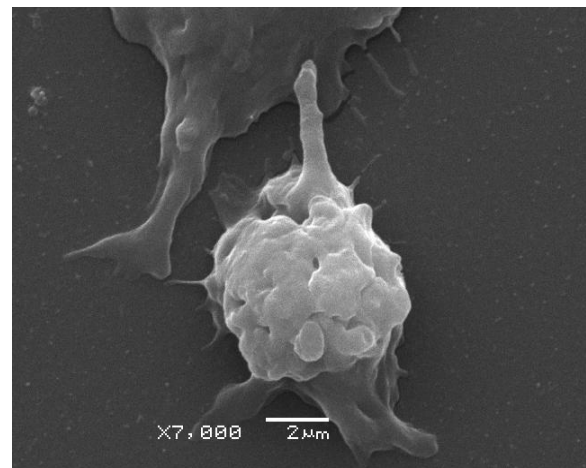


Fig. 27 Se muestra el redondeo de la célula provocado por el efecto de extracto MeOH (P), probablemente se observan estructuras apoptóticas.

Fotografías obtenidas con el microscopio electrónico de barrido de la UBIPRO en la FES-Iztacala. Las imágenes muestran los efectos del extracto MeOH de hojas (H) de *R. centifolia* sobre *N. fowleri*.

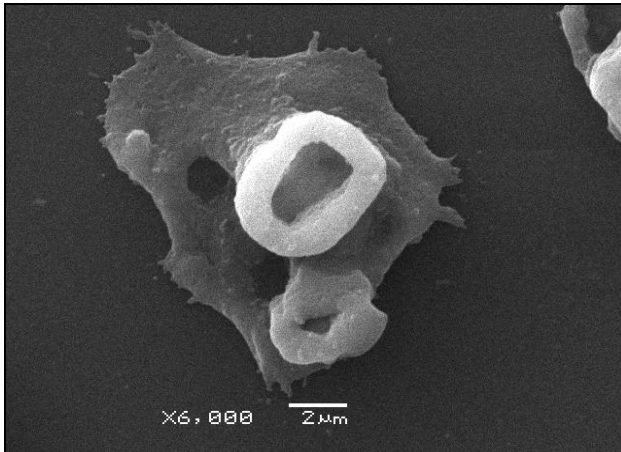


Fig. 28 Trofozoíto de *N. fowleri* de cultivo control, se observan 2 amebostomas muy evidentes.

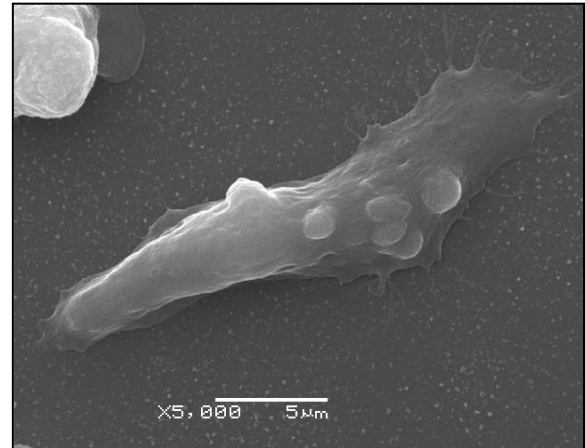


Fig. 29 Se muestra un trofozoíto muy alargado con lo que son probablemente estructuras apoptóticas causadas por la interacción con el extracto MeOH (H).

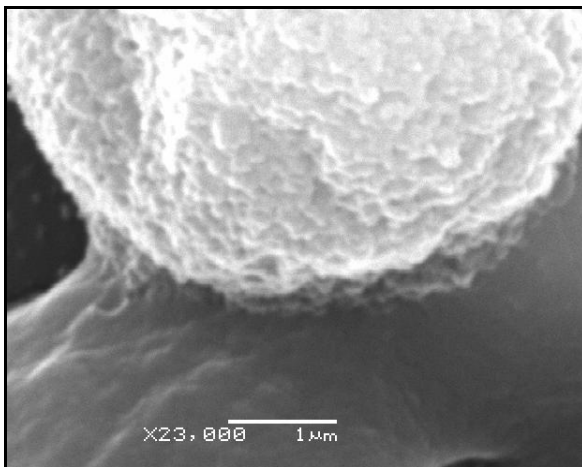


Fig. 30 Se observa un acercamiento de una probable estructura apoptótica.

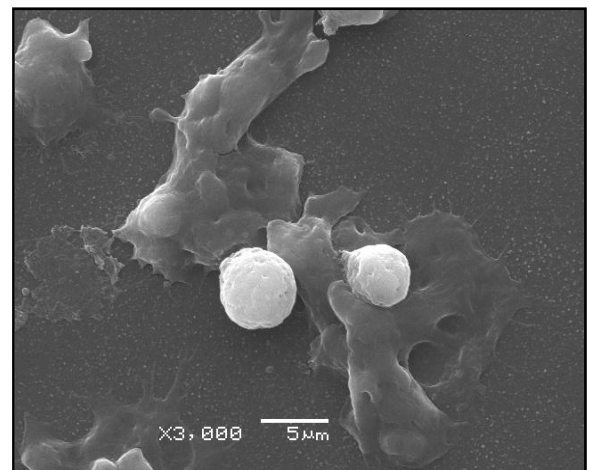


Fig. 31 Se observan dos trofozoítos de *N. fowleri* en donde se evidencia el daño ocasionado por el extracto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agyare, C., Asumeng, K. G., Duah, B. Y., Boadu, M. K. 2013. Antimicrobial and anti-inflammatory properties of *Funtumia elastic*. *Pharmaceutical Biology*. 1-8pp.
2. Argueta, A., Cano, L. M. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana Vol. III. Primera edición. Instituto Nacional Indigenista. 1228-1229.
3. Avalos G. A., Pérez-Urria, C. E., 2009 Metabolismo secundario de las plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.
4. Basim, E., Basim, H. 2003. Antibacterial activity of *Rosa damascena* essential oil. *Fitoterapia*, 74. 394-396.
5. Barbosa, E., Calzada, F., Campos. R. 2007. *In vivo* anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology* (109) 552- 554.
6. Belosky, G. Percivill, D., Lewis, K., Tegos, G. P., Ekart, J. 2004. Phenolic metabolites of *Dalea versicolor* that enhance antibiotic activity against model pathogenic bacteria. *Journal of natural products* [67, 3]. 481- 484.
7. Belofsky C., Carreño R., Groswick S., M., John D. T. 2006. Activity of isoflavans of *Dalea aurea* (Fabaceae) against the opportunistic ameba *Naegleria fowleri*. *Plant Med.* 72: 383-386.
8. Bonilla L., P., Ramírez F., E., Ortiz O., R. y Eslava C., C. 2007. Ecología de las amibas patógenas de vida libre en ambientes acuáticos. Instituto Nacional de Ecología, Semarnat. México.
9. Bonjar, S. 2004. Evaluation of antibacterial properties of some medical plants used in Iran *Journal of Ethnopharmacology* 94, 301-305.
10. Calzada, F., Cervantes, M. J.A., Yépez, M. L. 2005. *In vitro* antiprotozoal activity from the roots of *Geranium mexicanum* and constituents on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *Journal of ethnopharmacology*. 98. 191-193 pp.

11. Calzada, F., Yépez, M. L., Tapia, C. A. 2007. Effect of mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Journal of Ethnopharmacology* 113. 248–251 pp.
12. Canales M., Hernández T., Caballero J., Romo de Vivar A., Ávila 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 pp.
13. Canales, M., Hernandez, T., Caballero, J., Romo del Vivar, A., Avila,G., Duran, A. y 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 Ethnopharmacology* 97, 426-439.
14. 11. Canales, M., Hernández,T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Durán, A., Lira, R. 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana* 75, 21-43.
15. Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 10:564-582 pp.
16. Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis N., G. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants.* American Society of Plant Physiologists. Rockville, USA.
17. Da Rocha, A. B., Tanowitz H. and Marciano-Cabral C. F. 2009. *Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae.* Hindawi Publishing Corporation. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases.* 14 pp.
18. De Jonckheere J. F. 1977. Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Naegleria fowleri* isolates. *American Society for Microbiology.* 33: 751-757 pp.
19. De Jonckheere J. F. 1979. Pathogenic free-living amoebae in swimming pools: survey in Belgium. *Ann. Microbiol. Ins. Pasteur.* 130B:205 pp.
20. Deliorman, O. D., Özcelik, B., Özgen, S., Ergun, F. 2010. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research* 165. 496-504 pp.

21. Dos Santos, D. A. P., Braga, A. de B. P., Da Silva G.F. M. F., Fernandes B. J. Vieira, C., P. Magalhães, F. A., Marsaioli, J. A., De S. Moraes, R. V., Rattray, L., Croft, L. S. 2008. Anti- African trypanocidal and antimalarial activity of natural flavonoids, dibenzoylmethanes and synthetic analogues. *Journa of Pharmacy and Pharmacology* (61). 257-266 pp.
22. Fonseca, S. F., Inacio, D.F.J., Canto, C. M. M., Almeida, A. E. E. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. *Instituto Oswaldo Cruz, Brazil. Plos ONE* 6 (2) e14666.
23. Gallegos, N. E. M., Sánchez R. M. R., Calderón V. A., Lugo V. A. Diversidad de Protozoos. Consultado el 20/11/12: http://www.biodiversidad.gob.mx/region/EEB/pdf/EEB_EDOMEX_TomoII.pdf
24. Geran, R.I.; Greenberg, N.H.; McDonald, M.M.; Schumacher, A.M.; Abbott, B.J. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumor and other biological systems. *Cancer Chemother. Rep.* 1972, 3, 17-19.
25. 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.
26. Hämälääinen, M., Nieminem, R., Vuorela, P., Heinonen, M., Moilanen, E. 2007. Anti-Inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavones, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation*, Vol. 2007. Finland.1-10pp.
27. Hirulkar, N.B., Agraval, M. 2010. Antimicrobial activity of rose petals extract against some pathogenic bacteria. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives.* Mandsaur, India. Vol. 1(5):478-484p.
28. John, D.T., Howard, M. J. 1993. Opportunistically pathogenic free-living amebae. En: Kreier, J.P and Baker J.R. *Parasitic protozoa.* Academic Press. San Diego California, U.S.A. 283:143.

29. Kaoutar B., Tarik B., Driss M., Abdelaziz R., Abdelaziz S. 2010. Antibacterial activities of the ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9 (27), pp. 4251-4258.
30. Kemble S.K., Lynfield R., DeVries A.S., Drehner D.M., Pomputius W.F3rd., Beach M.J., Visvesvara G.S., da Silva A.J., Hill V.R., Yoder J.S., Xiao L., Smith K.E., Danila R. 2012. Fatal *Naegleria fowleri* Infection Acquired in Minnesota: Possible Expanded Range of a Deadly Thermophilic Organism. *Clin Infect Dis.* 54(6): 805-809.
31. Kobayashi G. S., Medoff G. 1977. Antifungal agents: Recent developments. *Ann Rev. Microbiol.* 31:291.
32. Kuklinski, C. 2000. *Farmacognosia*. Editorial Omega. Barcelona, España.
33. Li, J. R., Liu, J., He, D. H., Xu, H. X., Ding, L. S., Bao, W. K., Zhou, Z. Q., Zhou, Y. 2013. Three new phenolic compounds from the leaves of *Rosa sericea*. *Fitoterapia* Vol. 84.332-337 pp.
34. Lotito, S. B., Zhang, W. J., Yang, C. S., Crozier, A., Frei, B. 2011. Metabolic conversion of dietary flavonoids alters their anti-inflammatory and antioxidant properties. NIH, USA. 454-463pp.
35. Lu, J., Papp, L. V., Fang, J., Rodriguez, N. S., Zhivotovsky B., Holmgren, A. 2006. Inhibition of mammalian thioredoxin reductase by some flavonoids: implications for myricetin and quercetin. *Cancer Res.*, 66. 4410-4418 pp.
36. Mamani, M. M., Rambert, J., Malvy, D., Lejoly, B. H., Daulouède, S., Thiolat, D., Coves, S., Courtois, P., Vincendeau, P., Mossalaya, M. D. 2004. Quercetin induces apoptosis of *Trypanosoma brucei gambiense* and decreases the proinflammatory response of human macrophages.. *Antimicrobial agents and chemotherapy* , 48 [3]. France. 924-929 pp.
37. Mattarei, A., Sassi, N., Durante, C., Biasutto, L., Sandonia, G., Marotta, E., Garbisa, S., Gennaro, A., Paradisi, C., Zoratti, M. Redox properties and cytotoxicity of synthetic isomeric mitochondriotropic derivatives of the natural polyphenol quercetin. 2011. *European Journal of Organic Chemistry.* 5577-5586 pp.
38. Marciano-Cabral, F., Cline, M. L., Bradley, S.G., 1987. Specificity of antibodies from human sera for *Naegleria* species. *J. Clin. Microbiol.* 25, 692-697 pp.

39. Marciano-Cabral, C. F., Cabral, A., G. 2007. The immune response to *Naegleria fowleri* amebae and pathogenesis of infection. USA. FEMS Immunol Med Microbiol 51: 243–259.
40. Marcos, A. C., Eraso E., Madariaga L., Quindos, G. 2011. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. Complementary & alternative medicine. 11: 119p.
41. Martínez A. J., Visvesvara G. S., 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. Brain Pathology. 7: 583-598.
42. Mezencev, R., Galizzi, M., Kutschy, P., Docampo, R. 2009. *Trypanosoma cruzi*: antiproliferative effect of indole phytoalexins on intracellular amastigotes *in vitro*. National Institutes of health. University of Georgia. 66-69 pp.
43. Omaña, M. M., Navarro, G. F., González, R. A., Serrano, L. J.J., Campos R. R., Martínez P. A., Tsutsumi, V., Shibamaya M. 2004. Induction of morphological and Electrophysiological changes in hamster cornea after in vitro interaction with trophozoites of *Acanthamoeba* spp. Infection and immunity. Vol. 72, no. 6. 3245-3251 pp.
44. Page, F. C. 1988. A new Key to freshwater and soil *Gymnamoebae*. Freshwater biological association scientific publication, Londres. 122pp.
45. Peña M. C. (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, 62:3-16.
46. Peralta, M. A., Calise, M., Fornari, C., Ortega, G. M., Diez, R. A., Cabrera, J. L. 2012. A prenylated flavanone from *Dalea elegans* inhibits rhodamine 6 G Efflux and reverses fluconazole-resistance in *Candida albicans*. Planta Médica UNAM, 78. 981-987 pp.
47. Rates S.M.K. 2001. Plants as source of drugs. Toxicon 39: 603.
48. Rivera Y. C. R., 2010. Actividad Antimicrobiana y Toxicidad General De Rosa Centifolia L. Tesis de licenciatura. UBIPRO, FES- Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
49. Rodríguez, M. M. A. 2003. Reconocimiento de antígenos específicos para la identificación de la amiba de vida libre *Naegleria fowleri*. Tesis de maestría. FES Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

50. Romero C., R. 2007. Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. 762-769.
51. Schuster F.L., 1979. Small amebas and ameboflagellates. En Levandowsky M. y Hunter SH. Biochemistry and physiology of protozoa. 1(2): 215.
52. Sen G., Mukhopadhyay, S., Ray, M., Biswas, T. 2008. Quercetin interferes with iron metabolism in Leishmania donovani and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (61). 1066-1075 pp.
53. Sepúlveda, J. G., Porta D. H., Rocha, S. M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología. 21: 355-363.
54. Sri, N. A. M., Sim, K. S., Norhanom, A. W., Hashim, Y. 2009. Cytotoxic components of Pereskia bleo(Kunth) DC. (Cactaceae) leaves. Molecules 14. Malaysia. 1713-1724 pp.
55. Swanson, S.M. Pezzuto, J.M. 1990. Bioscreening technique for cytotoxicity potential and ability to inhibit macromolecule biosynthesis. In Drug bioscreening: drug evaluation techniques in pharmacology. Thompson, E.B., Ed. VCH Publishers, USA. 273-297 pp.
56. Trease, G.E y Evans, W. C. 1991. Farmacognosia. 13ª Ed. Editorial Interamericana, McGraw-Hill, Inc. España. Pp 901
57. Taiz, L. y Eduardo, Z. 2006. Plant Physiology. 4th edition. Sinauer Associates, Inc.
58. Tyler, V. E. 1979. Farmacognosia. 2a. Edición. El Ateneo Editorial. Buenos Aires, Argentina.
59. Urribarren B. T. Consultado el 18/11/2012, <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibas-vida-libre.htm>
60. Van Arman, C. G., Begany, L. M. 1965. Some details of inflammations caused by yeast and carrageeneen Exper. Therap. 150-328 pp
61. 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.

62. Vivas C., C. I. 2010. Meningoencefalitis Amibiana Primaria y sus Repercusiones en la Clínica Odontológica. Tesina de Licenciatura. Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
63. Wang, A., Kay R., Poon W. S., Ng, H. K. 1993. Successful treatment of amoebic meningoencephalitis in a Chinese living in Hong Kong. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 95. pp 249-252.
64. Wink, M. Medicinal Plants: A source of Anti-parasitic secondary metabolites. 2012. *Molecules*. 17. 12771-12791 pp.
65. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/FreeLivingAmebic.htm>, consultado en 09/12/2011.
66. Disponible en: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:OAX93929>, consultado en 8/01/13