



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

### Efecto in vitro de la Pinocembrina de la resina de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. sobre *Acanthamoeba castellanii*.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

GUERRERO RANGEL MARIBEL

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY

Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2014.





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.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	2
ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS.....	4
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
Amibas de vida libre .....	7
Generalidades de <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	8
Enfermedades que produce .....	9
Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG) .....	10
Histopatología de la EAG .....	11
Queratitis Amibiana (QA).....	11
Factores de riesgo de la Queratitis Amibiana .....	12
Tratamiento.....	13
Generalidades de flavonoides .....	15
ANTECEDENTES.....	17
JUSTIFICACIÓN.....	18
OBJETIVOS .....	19
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS PARTICULARES .....	19
MATERIAL Y MÉTODOS .....	20
Recursos biológicos .....	20
Amibas .....	20
Ratones.....	20
Bioensayos preliminares.....	20
Cultivo de amibas.....	20
Reactivación de la virulencia .....	20

Curva patrón para los ensayos de viabilidad de los trofozoítos de <i>A. castellanii</i> con la Pinocebrina .....	21
Determinación de la concentración letal (CL) y letal media (CL <sub>50</sub> ) de la Pinocebrina .....	21
Prueba de toxicidad general: método de toxicidad general (McLaughlin, 1991) .....	22
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
Efecto de la Pinocebrina sobre <i>A. castellanii</i> .....	23
Efecto amebostático de la Pinocebrina sobre <i>A. castellanii</i> .....	24
Prueba de Toxicidad General .....	25
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>28</b>
<b>APÉNDICE. <i>Gymnosperma glutinosum</i></b> .....	<b>29</b>
Familia <i>Asteraceae</i> .....	29
<i>Gymnosperma glutinosum</i> (Spreng.) Less. <i>Asteraceae</i> .....	29
Clasificación .....	31
Etnobotánica y antropología .....	31
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>32</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Cuadro de abreviaturas .....	5
Fig. 1. Biosíntesis de los flavonoides .....	16
Fig. 2. <i>Gymnosperma glutinosum</i> (Spreng.) Less. Asteraceae .....	30
Gráfica 1. Curva patrón de los ensayos de viabilidad de <i>A. castellanii</i> contra Pinocembrina.....	23
Gráfica 2. Efecto de Pinocembrina sobre la curva de crecimiento de <i>A. castellanii</i> .....	24
Gráfica 3. Prueba de Toxicidad General de <i>Artemia salina</i> contra Pinocembrina.....	25
Tabla 1. Interpretación de la actividad tóxica general según el método modificado de Niño et al., 2006.....	22

## CUADRO DE ABREVIATURAS

AVL	Amibas de vida libre
<i>A. castellanii</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
CL	Concentración Letal
CL <sub>50</sub>	Concentración Letal Media
CyMA	Conservación y Mejoramiento del Ambiente
EAG	Encefalitis Amibiana Granulomatosa
<i>G. glutinosum</i>	<i>Gymnosperma glutinosum</i>
HCT116	Línea Celular de Cáncer de Colón
INC	Instituto Nacional de Cardiología
LNCaP	Células Epiteliales Humanas derivadas de Cáncer de Próstata
NHI	National Institutes of Health
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
QA	Queratitis Amibiana
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

# RESUMEN

---

*Gymnosperma glutinosum* (*G. glutinosum*) pertenece a la familia *Asteraceae*, considerada una de las familias botánicas de mayor importancia en la medicina tradicional de México. Actualmente se ha logrado identificar que el principal componente de la resina de *G. glutinosum* es la Pinocembrina, un metabolito secundario perteneciente al grupo de los flavonoides de los cuales se han descrito propiedades muy apreciadas en medicina, siendo éstas: antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas, antiagregantes, antihemorrágicas, hepatoprotectoras y antiprotozoarias. Además, se ha determinado que la toxicidad de esta flavonona no es alta. Siendo así un excelente recurso para actuar contra diferentes enfermedades entre las que se encuentran las causadas por protozoarios como lo es *Acanthamoeba castellanii*, agente etiológico de la Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG) y Queratitis Amibiana (QA). Ambas enfermedades con un diagnóstico fatal en la mayoría de los casos a pesar de seguir un tratamiento convencional. Es por eso que en este trabajo se probó por primera vez el efecto *in vitro* de la Pinocembrina de la resina de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. sobre *Acanthamoeba castellanii*, encontrándose que la Pinocembrina exhibió una relación dosis-dependiente, con una concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de 0.552 mg/ml. Además presentó actividad amebostática y su toxicidad fue moderada. Algo sumamente importante si se toma en cuenta la agresividad de los tratamientos con fármacos de alta toxicidad, ineficaces en la mayoría. Lo que hace imperante proponer nuevas alternativas terapéuticas, siendo la flavonona pinocembrina candidato idóneo.

# INTRODUCCIÓN

---

## *Amibas de vida libre*

Las amibas de vida libre (AVL) se pueden encontrar en toda la biósfera incluyendo los casquetes polares, el suelo, el agua y la atmósfera (Rivera et al., 1987), principalmente donde hay agua, ocupando un lugar importante en la cadena alimenticia y las comunidades naturales, alimentándose de bacterias, hongos, algas y otros protozoarios (Wellings et al., 1979; Pelczar et al., 1982).

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

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

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

El estudio de las AVL ha demostrado que sólo un grupo pequeño provoca infecciones humanas (John y Howard, 1993; Visvesvara et al., 1993). Existen numerosas amibas de vida libre en el suelo y en el agua, pero solamente especies de los géneros *Naegleria*, *Balamuthia*, *Sappinia pedata* y *Acanthamoeba* han sido encontrados en pacientes humanos. Dentro de *Acanthamoeba*, se encuentra la especie *Acanthamoeba castellanii* (*A. castellanii*), la cual figura en la lista de las especies más importantes en medicina humana.

## Generalidades de *Acanthamoeba castellanii*

El ciclo de vida de las diferentes especies de acantamebas presenta una forma vegetativa o trofozoito y una forma quística o quiste.

- Trofozoíto, o forma vegetativa, que es la fase del ciclo en la que se alimenta y reproduce.
- Quiste, que es la forma de resistencia.

*Trofozoíto.* Presenta un pseudópodo anterior, ancho hialino, con producción de filopodios (acantopodios), proyecciones más o menos cortas y se pueden extender a lo largo de toda la membrana celular, ensanchando su superficie. Los acantopodios son de gran importancia en la adhesión a superficies (biológicas o inertes), en sus movimientos celulares y en la captura de sus presas. Normalmente los trofozoitos son uninucleados, con un gran nucléolo rodeado de un halo claro. Hay diferencia entre ectoplasma y endoplasma, con numerosas vacuolas digestivas. Su movimiento es lento, con emisión de 1 ó 2 pseudópodos, los cuales se alargan y ensanchan lentamente. Presenta una vacuola contráctil generalmente hacia el exterior posterior (Pérez et al., 2012). El trofozoíto en movimiento mide en promedio 22  $\mu\text{m}$  de longitud; en forma inactiva, redondeada, mide de 9 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro (John y Howard, 1993).

La división celular es asexual y ocurre por fisión binaria. *Acanthamoeba* puede mantenerse en forma vegetativa con abundante comida, pH neutro y temperatura apropiada (30 °C). Al no cumplirse estas condiciones el trofozoito pasa a forma quística (Khan, 2006).

*Quiste.* Consta de una parte interna, endoquiste, el cual es más o menos poliédrico o estrellado, presentando puntas. La capa externa, ectoquiste, el cual es generalmente arrugado. De forma biconvexa o poliédrica dependiendo de la distribución de las puntas del endoquiste. Presenta un solo núcleo y se observan gránulos en la periferia del citoplasma. Tiene un diámetro de 7 a 15  $\mu\text{m}$  (Pérez et al., 2012).

El proceso de enquistamiento consiste de tres fases: inducción, síntesis de la pared y latencia. Durante la fase de inducción, los trofozoitos comienzan a perder su apariencia ameboide. La primera barrera que se forma da lugar al ectoquiste; esta pared es de 0.3 a 0.5  $\mu\text{m}$  de grueso y consiste principalmente de proteínas insolubles en ácido. El endoquiste es formado después de la aparición de una capa bien definida cuyo componente principal es la celulosa. La síntesis de la pared celular es usualmente acompañada por una disminución de la masa citoplasmática de aproximadamente un 80 % , a través de una deshidratación progresiva de la amiba, causando retracción del protoplasma de la pared celular. Un poco después, los autolisosomas aparecen y

permanecen en el citoplasma durante todo el proceso de enquistamiento. A la luz de estos cambios en la fisiología de la célula, la célula enquistada puede detener y revertir el proceso hasta 15 h después de la inducción. Pasado este tiempo, la célula se compromete a completar el proceso de enquistamiento (Leitsch et al., 2010).

El desenquistamiento se produce a través de algún poro de los que existen en los puntos de contacto del endoquiste con el ectoquiste (Pérez et al., 2012). En quistes analizados con la técnica de microscopía electrónica, se observan al menos dos poros (u ostiolos) con tapón y una pared relativamente delgada, característica que hace a esta especie muy susceptible a la desecación (Bonilla, 2000).

### *Enfermedades que produce.*

Durante la primera mitad del siglo XX, las AVL eran conocidas como amibas del suelo y se consideraban protozoos no patógenos. En el año 1958 Culbertson demostró el potencial patógeno de *Acanthamoeba*.

Los primeros casos en los cuales claramente se establece como agente causal *Acanthamoeba*, fueron reportados a principios de los setenta. La primera infección humana por *Acanthamoeba* fue descrita por Jager y Stamm (1972). Martínez y colaboradores (1980), designaron como encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), a la infección provocada por amibas del género *Acanthamoeba*; una infección de curso subagudo a crónico que se caracteriza por causar lesiones granulomatosas en el encéfalo.

En 1973 se reportó en E.U.A. el primer caso de infección en la córnea denominada queratitis amibiana (QA), producida por amibas del género *Acanthamoeba*, el cual correspondió a un paciente masculino de 41 años de edad del sur de Texas, con traumatismo corneal y exposición con agua contaminada en su ojo (Khan, 2006; Nagington et al., 1974).

Posteriormente en Gran Bretaña fueron reportados los primeros casos de queratitis por *Acanthamoeba*. Las especies encontradas fueron *A. castellanii* y *A. polyphaga*, las cuales se identificaron a través de inmunofluorescencia. En 1984 sólo se habían registrado 11 casos; donde la mayoría de ellos se consideraron relacionados con traumatismo oculares menores. A partir del segundo lustro de los ochenta, se comenzaron a registrar cientos de casos de queratitis por *Acanthamoeba*, de los cuales el 85% aproximadamente, se presentaron en usuarios de lentes de contacto (Schaumberg et al., 1998). En nuestro país, en 1997 se reportaron casos de queratitis por *Acanthamoeba*, relacionados con usuarios de lentes de contacto (Omaña, 1997).

La mayoría de los reportes de casos proceden de países desarrollados, probablemente porque en éstos se toma en consideración a las amibas en los diagnósticos presuntivos, más que por una elevada incidencia que pueda haber en estos países.

Hoy se sabe, que las especies patógenas de *Acanthamoeba* son capaces de producir diversas infecciones en el hombre a nivel de sistema nervioso central, riñón, pulmón, piel y ojos (Marciano-Cabral y Cabral, 2003)

### *Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG)*

Por lo general los pacientes que padecen las infecciones que provocan las amibas del género *Acanthamoeba* son personas que cursan enfermedades inmunitarias (diabetes, alcoholismo, lupus eritematoso), con deficiencias inmunitarias (enfermos de VIH), por lo que se considera que las amibas son organismos oportunistas. Si bien, las infecciones causadas por amibas del género *Acanthamoeba* no son un problema de salud pública, si son de importancia clínica por las patologías que ocasionan, entre las que destaca la EAG (Martínez, 1981; Martínez y Visvesvara, 1997).

La enfermedad corresponde a una encefalitis necrosante y hemorrágica aguda, subaguda o crónica, multifocal con angeítis necrótica, algunas células macrofágicas y células gigantes multinucleadas, con presencia de trofozoítos y quistes parasitarios característicos. A pesar del nombre de encefalitis granulomatosa, el componente granulomatoso suele ser irrelevante o estar ausente.

La puerta de entrada es el tracto respiratorio o la piel, desde donde y siguiendo la vía hematógica, o una progresión local siguiendo vías nerviosas, las amebas llegan al sistema nervioso central (Oddó, 2006). El período de incubación varía de semanas a meses, con un diagnóstico fatal en la mayoría de los casos. Hasta el momento se han detectado alrededor de 200 casos de EAG a nivel mundial, ocasionados por *Acanthamoeba* (Schuster y Visvesvara, 2004).

## *Histopatología de la EAG.*

Se caracteriza por presentar lesiones necrotizantes y pequeños abscesos en el cerebro, mesencéfalo y tronco encefálico. Los hemisferios cerebrales muestran edema y ablandamiento, se presentan lesiones granulomatosas con presencia de células gigantes, además de un exudado purulento que cubre la materia gris compuesto por leucocitos y monocitos. El fluido cerebroespinal contiene un rango de 30-2960 leucocitos-mm<sup>2</sup>, del cual los linfocitos comprenden del 6-8% de las células. A través de estudios post-mortem, se han visto trofozoítos y quistes en cortes de cerebro, método por el cual se ha diagnosticado la EAG por *Acanthamoeba* (Martínez, 1981).

## *Queratitis Amibiana (QA).*

Se define a la QA como una infección corneal de curso crónico de difícil resolución, caracterizada por una necrosis progresiva del epitelio corneal y destrucción de la lamela estromal. La infección se presenta en individuos saludables con pequeños traumas en los ojos, exposición con aguas contaminadas y en la mayoría de los casos en usuarios de lentes de contacto principalmente de tipo blando. La infección da inicio a través del contacto directo de la amiba con la córnea, donde la amiba es capaz de penetrar el epitelio intacto de córneas humanas (Alizadeh et al., 2001).

De manera general, los principales signos y síntomas de los pacientes son: Infección de difícil resolución que no se resuelve con tratamientos terapéuticos convencionales (antibacterianos y virales), lagrimeo constante así como un severo dolor ocular en desproporción con respecto a la lesión corneal que se observa, y fotofobia. La infección ocurre en dos fases, la primera de éstas se restringe al epitelio corneal con un mejor pronóstico. En la segunda fase, los parásitos invaden el estroma, donde inicia la fagocitosis de queratocitos y se propaga gradualmente hasta afectar toda la córnea. En esta fase, se produce un extenso daño a la matriz de colágena y una inflamación intensa (Garner, 1993). Se produce opacidad corneal que impide la visión, llegando a provocar ceguera, haciendo necesaria la remoción quirúrgica de la córnea y en casos más graves la remoción del ojo mismo (Willcox y Holden, 2001; Salazar, 2007).

La severidad de la QA en los pacientes, no es homogénea, ya que, se han reportado variaciones inter-específicas dentro del género, donde *A. castellanii* y *A. polyphaga* muestran diferencias en la adherencia a diversos sustratos con respecto a otras especies lo que explicaría en parte, la mayor incidencia de casos de QA reportados con esas dos especies (Morton et al., 1991; Omaña 1997), sin embargo, a la lista de especies causantes de QA también se suman: *A. rhyodes*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. quina* y *A. culbertsoni* (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

## Factores de riesgo de la Queratitis Amibiana.

Se considera que el 85% de los casos de QA corresponde a usuarios de lentes de contacto de uso prolongado, un 30% de éstos corresponde a pacientes con algún traumatismo corneal con introducción de cuerpos extraños y en el 2% no hay razón aparente de presencia. La incidencia de QA en usuarios de lentes de contacto es en gran medida causada por la mala desinfección de los lentes, así como el uso de soluciones salinas caseras que favorecen el desarrollo de las amibas en los lentes. Sin embargo, esta infección puede presentarse en individuos sanos que hayan estado expuestos con aguas contaminadas y/o con daño corneal (Seal et al., 1994).

En el caso de lentes de contacto, se ha determinado que la adherencia de trofozoítos y quistes a los lentes, se incrementa en función del contenido hídrico, ionicidad y la composición de los polímeros utilizados en su manufactura, además, del tiempo de interacción, ya que son suficientes 10 segundos de contacto, para que las amibas se adhieran. Por esto el lavado mecánico y físico de los lentes, disminuye la oportunidad de las amibas a colonizarlos, ya que remueve un gran número de trofozoítos. Aunque ciertas soluciones limpiadoras como el peróxido de hidrógeno y la clorhexidina se usen, después de 17 horas no afectan en absoluto la viabilidad de trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba* (Cancrini et al., 1998; Sehgal et al., 2002).

Las amibas que se adhieren a los lentes de contacto, se transfieren principalmente a zonas del epitelio corneal que presenten daño, penetrando hacia las capas más profundas de la córnea (Salazar, 2007). Los cambios morfológicos que se llevan a cabo en la córnea de usuarios de lentes de contacto, lo hacen más vulnerable a la QA por *Acanthamoeba*. Los lentes de contacto estimulan la expresión de glicoproteínas en el epitelio corneal, exacerbando el proceso de infección, promoviendo la unión a receptores de manosa presentes en la membrana de la célula amibiana (Panjwani et al., 1997; Yang et al., 1997; Hurt et al., 2003; Imbert-Bouyer et al., 2004; Alizadeh et al., 2005).

## Tratamiento

En general se usan tratamientos combinados, donde las biguanidas como la polihexametilbiguanida 0.02%, clorhexidina 0.02% y las diamidas son los antiamebianos más eficaces. Sin embargo estos fármacos no están disponibles en el mercado farmacéutico de América, solamente en el europeo, lo que limita su uso. El tratamiento inicial debe ser intensivo ya que los microorganismos son más sensibles antes de enquistar y a su vez son más sensibles los quistes inmaduros que aquellos que ya han madurado. El tratamiento frente a un organismo enquistado es limitado, se emplea principalmente imidazoles, miconazol 1% y clotrimazol al 1% por vía tópica (Salazar, 2007).

La agresividad de los tratamientos con fármacos de alta toxicidad, ineficaces en la mayoría de los casos, hace imperante proponer alternativas terapéuticas. Una de estas posibilidades se puede encontrar en la medicina tradicional, sobre todo si se toma en cuenta que el uso de las plantas medicinales para combatir ciertas enfermedades, ofrece una disminución de los efectos colaterales además de ser productos que están al alcance de un gran porcentaje de la población mundial (Rates, 2001).

Las plantas medicinales han sido una parte fundamental en la farmacopea de todas las culturas del mundo. A nivel mundial, el estudio multidisciplinario de las plantas medicinales ha recibido un gran apoyo por organizaciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud (OPS), National Institutes of Health (NIH) y el Instituto Nacional de Cardiología (INC). 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; Houghton, 1999).

En el caso 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).

Actualmente se han registrado en México 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 fitoquímico, 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 de los países en desarrollo como en los industrializados. La abundancia y diversidad de los recursos naturales del país, son fuente potencial para el hallazgo de estos compuestos con aplicación terapéutica (Shu, 1998; OMS, 2002).

Un ejemplo de lo anterior es *Gymnosperma glutinosum* (que pertenece a la familia Asteraceae y que Heinrich et al., 1998, la considera como una de las familias botánicas de mayor importancia en la medicina tradicional de México), ya que actualmente, se ha demostrado que los extractos de esta planta presentan una alta actividad antimicrobiana (Canales et al., 2007). Se han probado en bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Sarcina lutea* y *Bacillus subtilis*) como 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., 2007). Además, se ha demostrado recientemente que dichos extractos presentan también una importante actividad antifúngica sobre hongos patógenos que pueden afectar riñones (*Fausarium sporotrichum*), pulmones (*Aspergillus níger*), piel (*Trichophyton mentagrophytes*) y en mucosas como la vaginal y la oral (*Candida albicans*) (Canales et al., 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 (Mendoza, 2011).

## Generalidades de flavonoides

Las plantas mediante la fotosíntesis producen metabolitos primarios, dado que se encuentran en prácticamente todas las formas de vida, cumpliendo funciones básicas para la misma, existen otros que no se encuentran tan distribuidos y que se hallan restringidos sólo a ciertas especies, géneros o familias como son los alcaloides, las saponinas esteroides, los aceites esenciales, los terpenoides, etc., a los cuales se les denomina metabolitos secundarios. Dentro de este último grupo están los flavonoides, éstos se encuentran distribuidos en las plantas verdes (especialmente las angiospermas), y sólo algunos pocos se han detectado en hongos y algas (Martínez, 2005).

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 hoy día, es el grupo de polifenoles más estudiado (Álvarez y Orallo, 2003).

En relación a los flavonoides 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 (C<sub>15</sub>). La biosíntesis de esta unidad C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>, deriva de dos rutas separadas (Fig. 1). Los anillos A que provienen de la condensación de dos unidades malonil coenzima A y acetil coenzima A. La otra ruta está dirigida a la formación del anillo B y los átomos de carbono 2, 3 y 4; derivado de un precursor, el ácido cinámico.

El primer intermediario estable, es la chalcona. 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 (Mabry et al., 1970; 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; Sakakibara et al., 2003).

Las flavanonas, flavonas y flavonoles son los flavonoides presentes en los cítricos. Estos compuestos han mostrado ser potentes antioxidantes, secuestradores de radicales libres con acción anticancerígena y cardioprotectora (Kale y Adsule., 1995; Martínez-Valverde et al., 2000; Sakakibara et al., 2003).

Los flavonoides han adquirido notoriedad pública a raíz de actividad biológica en el hombre, que los consume con los vegetales, además, que como se mencionó anteriormente poseen varias propiedades medicinales.

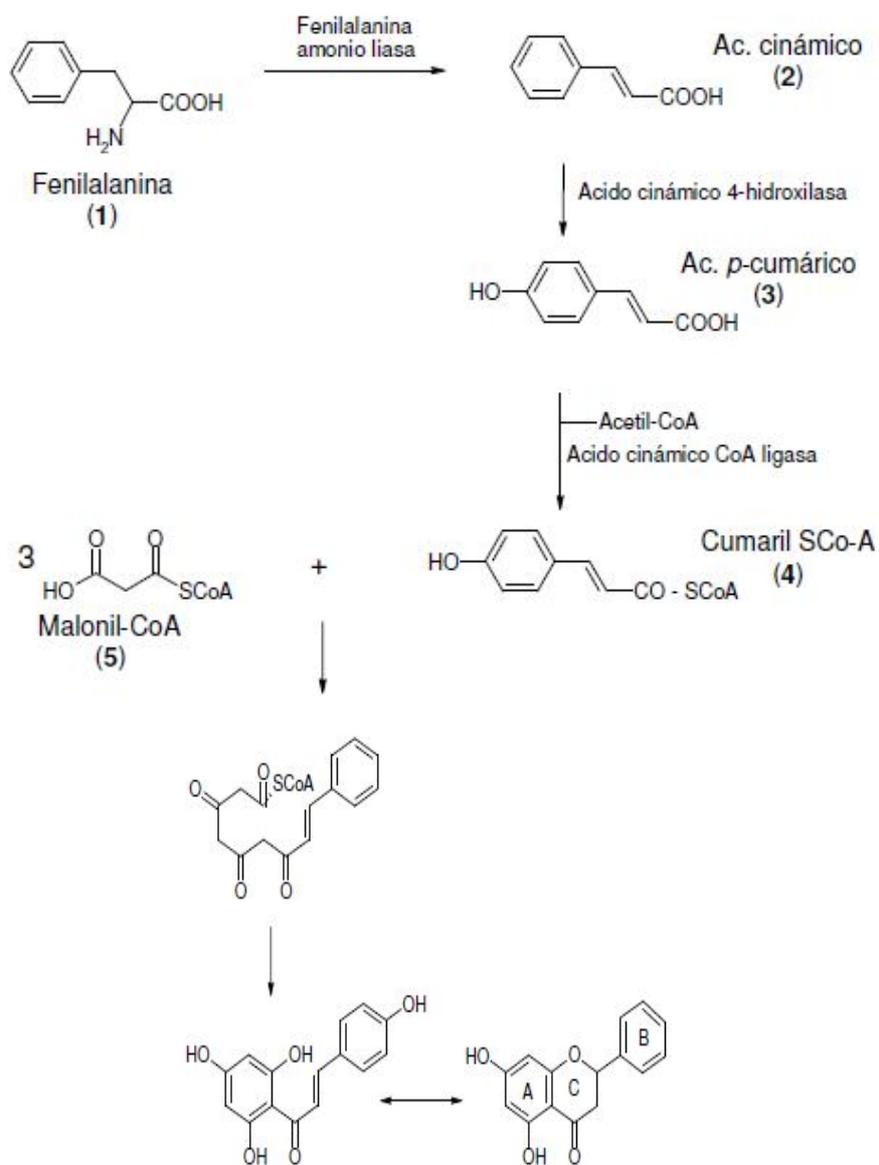


Fig. 1. Biosíntesis de los flavonoides.

# ANTECEDENTES

---

En trabajos recientes se ha comprobado que la resina de *Gymnosperma glutinosum* (*G. glutinosum*) tiene actividad amebicida y amebostática sobre trofozoítos de *Naegleri. fowleri*, además se determinó que la toxicidad de esta resina no es alta (Peña-Juárez, 2009; Mendoza, 2011).

Actualmente se ha logrado identificar que el principal componente de la resina de *G. glutinosum* es la Pinocebrina, un metabolito secundario perteneciente al grupo de los flavonoides de los cuales se han descrito propiedades muy apreciadas en medicina, como antioxidantes, antiinflamatorias, antiagregantes, antihemorrágicas antiprotozoarias y hepatoprotectoras ( Havsteen, 1984; Kaul et al., 1985; Mori et al., 1987; Nishino et al., 1987; Abdalla et al ., 1988; Descher et al., 1993; Heo et al., 1994; Kuo et al., 1995; Calzada et al., 1995,1999; Martínez et al., 2002).

# JUSTIFICACIÓN.

---

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

Tomando en cuenta que *Gymnosperma glutinosum* presenta una alta actividad antibacteriana y antifúngica (Serrano, 2004; Canales, 2005; Canales, 2007) y que se ha comprobado que la resina de esta planta tiene actividad amebicida y amebostática sobre trofozoítos de *N. fowleri* (Peña, 2009; Mendoza, 2011), es importante determinar si uno de sus principales componentes como lo es la Pinocebrina, es la responsable de estas propiedades medicinales y si tiene algún efecto sobre *A. castellanii*.

Sobre todo, porque se ha reportado que la Pinocebrina exhibe actividad fasciolicida, ovocida y larvicida en quistes recién formados de *Fasciola hepatica*, sobre huevos de *Ascaridi galli* y sobre el estadio tres de la larva de *Stomoxys calcitrans* (Del Rayo Camacho et al., 1991). Aunado a esto, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica por transporte pasivo conducido por P-glucoproteínas, actuando contra el daño celular, protegiendo primariamente las neuronas corticales contra el decremento de oxígeno y glucosa, y reduce el área de infarto cerebral. Además, tiene un potente efecto neuroprotector por edificar la función mitocondrial, disminuir el daño oxidativo, reducir la apoptosis neuronal e inhibir respuestas inflamatorias en la oclusión de arterias cerebrales en modelos murinos.

Recientemente se ha encontrado que calma las deficiencias de aprendizaje y de memoria en ratones con demencia vascular, por medio de la protección mitocondrial, lo cual sugiere que la pinocebrina tiene efectos terapéuticos potenciales para las disfunciones cognitivas (Liu et al., 2012). Además, otros estudios indican que no es tóxica ni mutagénica en hígados de ratas, además, exhibe una fuerte actividad antimutagénica contra las aminas heterocíclicas mutagénicas (Punvittayagul et al., 2012). Importantes cualidades que le pueden permitir actuar contra *A. castellanii*.

# OBJETIVOS

---

## OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad *in vitro* de la Pinocebrina, obtenida de *Gymnosperma glutinosum* sobre la amiba *Acanthamoeba castellanii*.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar una curva patrón para los ensayos de viabilidad de los trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* en cultivo axénico, mediante la técnica de MTT.
- Determinar la concentración letal (CL) y la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de la Pinocebrina sobre *Acanthamoeba castellanii* mediante la técnica de MTT.
- Determinar la toxicidad de la Pinocebrina mediante la prueba de toxicidad general de McLaughlin.

# MATERIAL Y MÉTODOS

---

## *Recursos biológicos*

### **Amibas**

Las amibas que se utilizaron para probar la Pinocembrina, pertenecen a la especie *A. castellanii* (donadas por la Dra. Patricia Bonilla del Laboratorio de Conservación y Mejoramiento del Ambiente CyMA de la 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.

### **Bioensayos preliminares**

La Pinocembrina se obtuvo de la resina de *G. glutinosum*, fue proporcionada por la Dra. Canales del Laboratorio de Farmacognosia UBIPRO, UNAM FES Iztacala.

## *Cultivo de amibas*

Se cultivaron axénicamente en frascos Corning de 75 cm<sup>2</sup> con 30 ml de medio Bactocasitona al 2% (DIFCO), enriquecido con suero fetal de bovino (SFB) al 10% y se mantuvieron en incubación a 30°C para promover el óptimo crecimiento.

## *Reactivación de la virulencia*

Se realizó en 1 ratón anestesiado con éter, al que se le inoculó por vía intranasal  $2 \times 10^5$  trofozoítos de *A. castellanii*, utilizando una micropipeta. Se mantuvo en observación durante 21 días aproximadamente, 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.

## *Curva patrón para los ensayos de viabilidad de los trofozoítos de A. castellanii con la Pinocebrina*

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

## *Determinación de la concentración letal (CL) y letal media (CL<sub>50</sub>) de la Pinocebrina*

Para probar el efecto de la Pinocebrina sobre las amibas, se colocó en una placa de cultivo de 96 pozos  $2 \times 10^4$  trofozoítos por pozo en 200  $\mu$ L de medio de cultivo (Goswick y Brenner 2003), a todos los pozos se agregó diferentes concentraciones de la flavanona (2.5 -0.019 mg/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 y posteriormente se agregó 200  $\mu$ L de medio más 25  $\mu$ 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 agregó 100  $\mu$ 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 del número de trofozoítos que sobrevivieron al contacto con la flavanona.

Para el control positivo se utilizó como referencia Anfotericina B, para el que se realizó el procedimiento anterior empleando las concentraciones siguientes de 0.01, 0.1 y 1  $\mu$ g/mL (Groswick y Brenner, 2003).

## Prueba de toxicidad general: método de toxicidad general (McLaughlin, 1991)

El ensayo se realizó 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 µg/mL

Para el control negativo se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO), el cual fue el disolvente empleado para la disolución del problema, se empleó el mismo volumen en el que se disolvió la concentración más alta de la Pinocebrina. Mientras que para el control positivo se utilizó ácido gálico en concentraciones de 1,000, 100 y 10 µg/mL. Todos los cultivos se mantuvieron iluminados con luz blanca a una temperatura de 23-25 °C durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se contaron el número de larvas sobrevivientes de la prueba de toxicidad general, las cuales se desplazaron de la misma manera que las del grupo testigo.

La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) 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 realizó con base al siguiente criterio (McLaughlin, 1991):

La actividad tóxica general se consideró débil cuando la CL<sub>50</sub> se encontraba entre 500 y 1000µg/mL, moderada cuando estaba entre 100 y 500 µg/mL, y fuerte entre 0 y 100 µg/mL (Tabla 1).

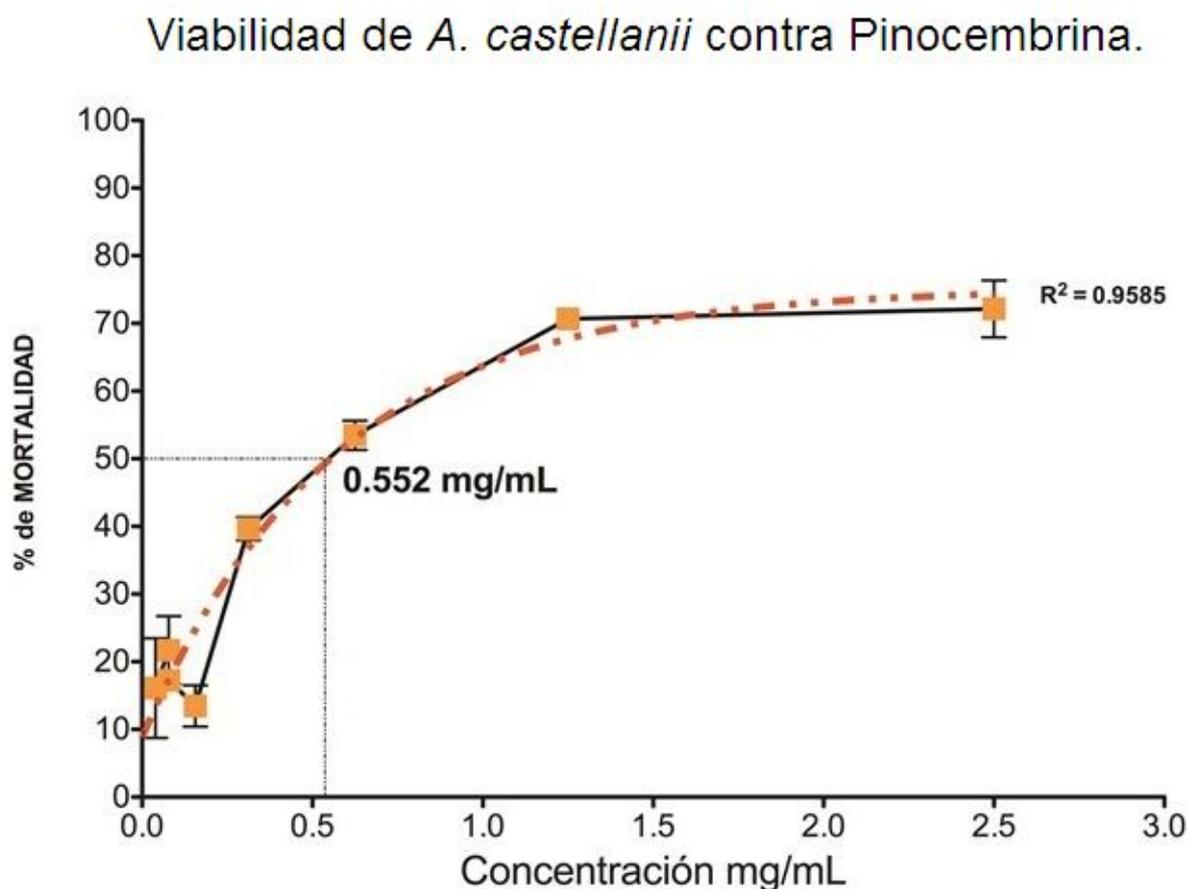
Toxicidad	Concentración de CL <sub>50</sub> (µg/mL)
Débil	501 a 1000
Moderada	100 a 500
Alta	0 a 99

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

# RESULTADOS

## *Efecto de la Pinocebrina sobre A. castellanii.*

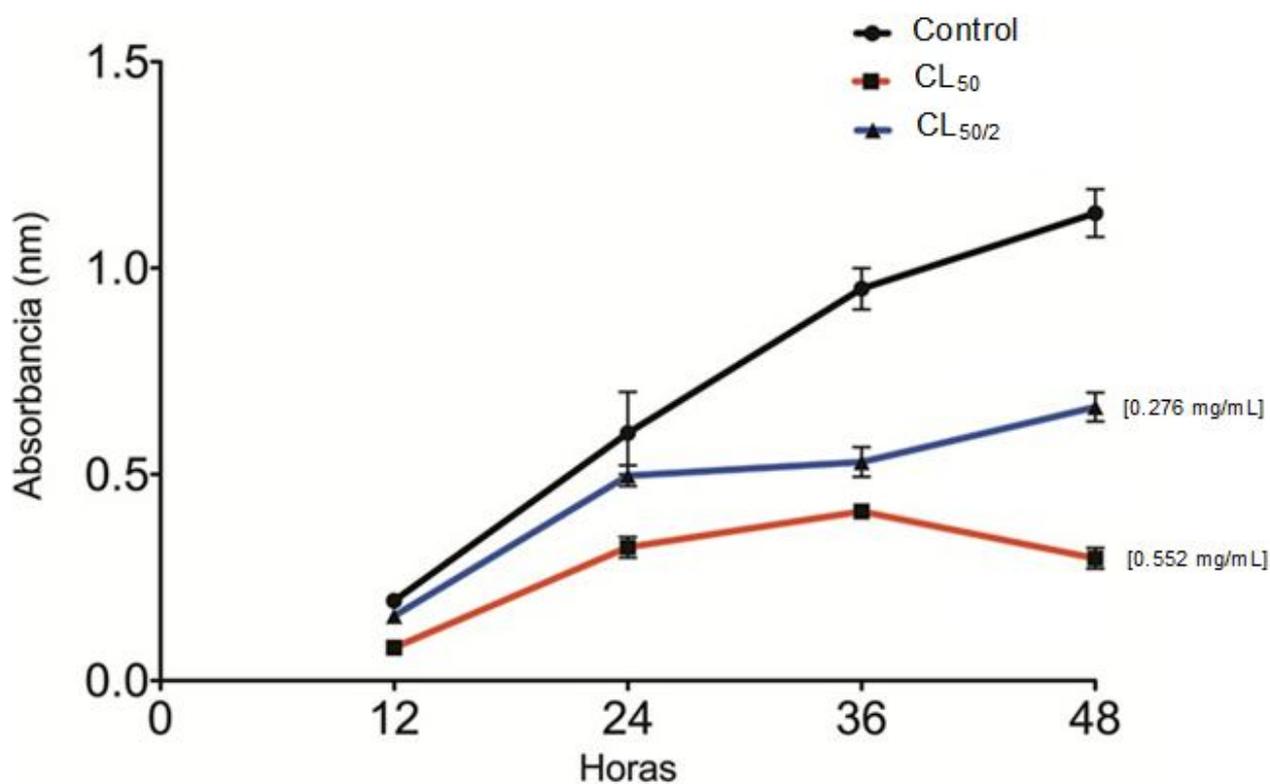
Con el fin de probar el efecto amebicida, fueron realizados los ensayos utilizando la Pinocebrina sobre trofozoítos de *A. castellanii*. Encontrándose una relación dosis-dependiente, con una concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de 0.552 mg/ml. Esta concentración fue calculada interpolando en la curva patrón los valores de absorbancia (Gráfica 1).



Gráfica 1. Curva patrón de los ensayos de viabilidad de *A. castellanii* contra Pinocebrina.

Al ser encontrada la  $CL_{50}$ , el siguiente paso fue determinar si el efecto de la Pinocebrina era amebostático o sólo amebicida para lo cual se realizó una cinética de 48 horas (Gráfica 2), encontrando que la  $CL_{50/2}$  tiene efecto amebostático sobre *A. castellanii*. En relación con el efecto amebicida de la  $CL_{50}$  sobre la cinética de crecimiento, se tendría que haber realizado durante más tiempo la cinética para saber si con la concentración empleada se presenta un decaimiento considerable del número de trofozoítos de *A. castellanii*.

### Efecto amebostático de Pinocebrina.

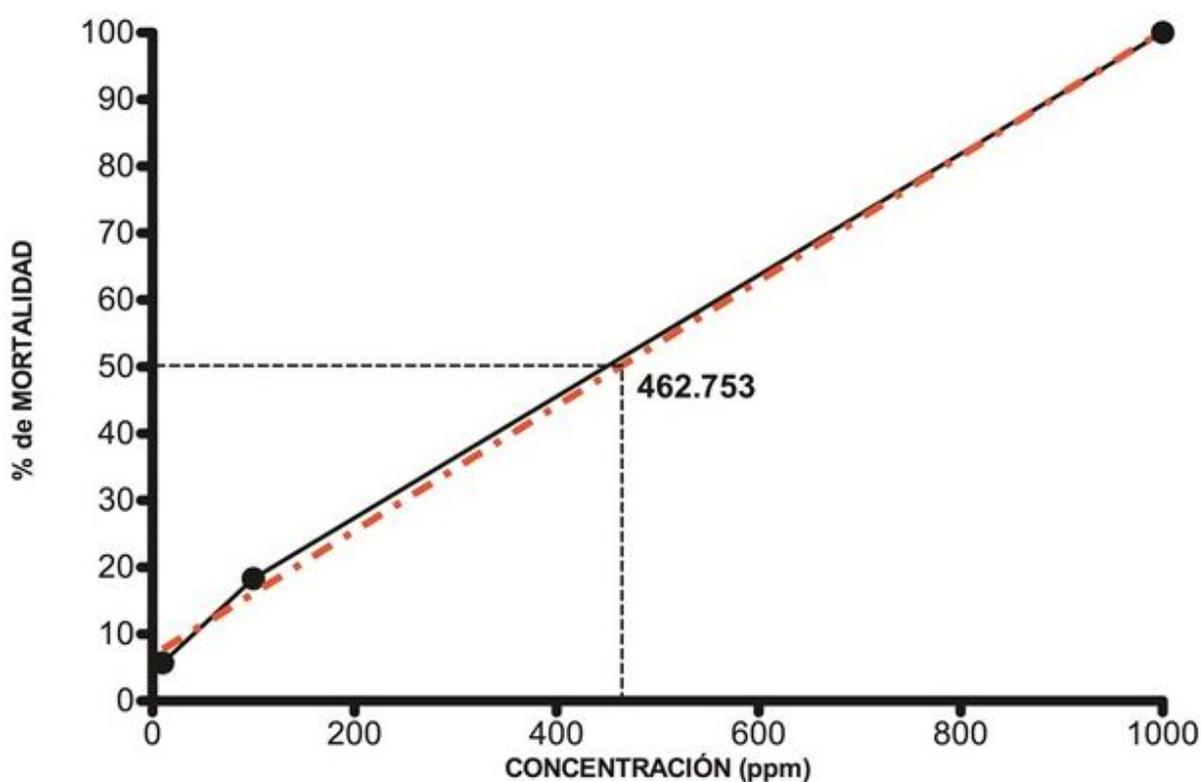


Gráfica 2. Efecto de Pinocebrina sobre la curva de crecimiento de *A. castellanii*.

### Prueba de Toxicidad General.

Los porcentajes de mortalidad obtenidos de las larvas nauplio II de *Artemia salina* (Leach) con Pinocembrina fueron: 100%, 18.3% y 5.7%, para concentraciones de 1000, 100 y 10  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente (Gráfica 3). Se interpoló el porcentaje de mortalidad mediante la ecuación del gráfico, para obtener la concentración de la dosis letal media Pinocembrina, la cual resultó ser 462.753  $\mu\text{g/ml}$ . Al hacer la comparación de este resultado con la tabla de Toxicidad General se obtuvo una toxicidad moderada, misma que va de 100 a 500  $\mu\text{g/ml}$ .

### Prueba de Toxicidad General.



Gráfica 3. Prueba de Toxicidad General de *Artemia salina* contra Pinocembrina.

# DISCUSIÓN

---

Es importante destacar que actualmente no existe un tratamiento satisfactorio contra las infecciones causadas por *A. castellanii*, a pesar de que se han utilizado antibióticos, antifúngicos, antivirales, antiprotozoarios, antipsicóticos y anticancerígeno (Mattana et al., 2004; Osato et al., 1991; Schuster y Visvesvara, 1998; Walochnik et al., 2002), e incluso, combinaciones de éstos contra diferentes cepas de esta amiba (Chu et al. 1998). Entre los más importantes figura el isotianato de propamidina y dibromopropamidina, sin embargo, los resultados en algunos casos son alentadores y en otros siempre hay recaídas de la infección en pacientes tratados con estos compuestos (Auran et al., 1987; Binder, 1989; Aksozek et al., 2002).

Encontrar nuevos antiparasitarios, requiere tomar en cuenta, entre otras cosas, los siguientes problemas: hay muy pocos fármacos en el mercado para el tratamiento de muchas enfermedades parasitarias; la especificidad de un fármaco hace que su uso sea mejor desde el punto de vista biológico y bioquímico, y debe contemplar las características del parásito como las del huésped para lograr una alta eficacia, pero lo que ocurre, es que la mayoría de los fármacos de uso clínico tienen una eficacia muy variable, efectos tóxicos severos y requieren ser administrados por tiempos prolongados (Phillipson y Wright, 1991; Dan-My & Ngyuen, 1998; Corona et al., 2000; Kayser et al., 2002 ). Por lo tanto, es imperioso el desarrollo de fármacos y terapias dinámicas que faciliten la continuación del tratamiento para los pacientes. En este contexto, la investigación de las plantas medicinales ha resultado ser un excelente sitio para encontrar nuevas sustancias (Ródio et al., 2008; El-Sayed et al., 2012)

Actualmente existe una gran cantidad de nuevos productos naturales de los cuales se ha demostrado tener propiedades antiparasitarias y que son sorprendentemente muy eficaces y selectivos. Por tal motivo, es importante presentar el efecto antiamebiano de un metabolito secundario que pudiera ser una futura alternativa terapéutica contra este tipo de infecciones, como es el caso de la Pinocebrina.

Existen reportes de que la flavonona Pinocebrina tiene actividad antiparasitaria, en particular, una actividad antimalárica, anti-giardica y antileishmánica (Katerene et al., 2012; Rufino-González et al., 2012; Salvador et al., 2009; Rasul et al., 2013; Degerli et al., 2012). También se ha reportado actividad importante contra infecciones micóticas como las producidas por *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* (Ruddock et al., 2011; Lago et al., 2012; Ramírez et al., 2013)

Estos reportes coinciden con nuestros resultados, ya que, en este trabajo se presenta por primera vez resultados que demuestran la actividad de la flavonona Pinocebrina sobre trofozoítos de *A. castellanii*. Se encontró que la CL<sub>50</sub> (dosis a la cual se logra eliminar la mitad de la población) fue de 0.552 mg/ml, mientras que en otros reportes, al probarse la actividad de esta flavonona contra otros protozoarios como *Leishmania*, la CL<sub>50</sub> fue de 1 mg/ml (Salvador et al., 2009). Nuestros resultados mostraron una acción dosis dependiente, que nuevamente se reflejó en la concentración con efecto amebostático, siendo ésta de 0.276 mg/ml. Si bien es cierto que con esta dosis no se logra eliminar a todos los trofozoítos, si se detiene su crecimiento. Se impide el enquistamiento, puesto que, es una dosis no agresiva que puede ser útil en combinación de fármacos a dosis más bajas para reducir los efectos colaterales.

Es bien sabido que las amibas de vida libre son muy susceptibles a la acción de antimicóticos, uno de los mecanismos de acción de un agente antifúngico está basado en la interacción o en la inhibición del ergosterol, el mayor componente de las paredes celulares de los hongos. Los derivados poliénicos tales como la anfotericina B y algunos azoles como el fluconazol son fármacos usados contra protozoarios por sus efectos sobre la membrana celular (Raederstorff y Rohmer, 1985; Mehdi et al., 1988; Gregorí, 2005; Schuster et al., 2006; Allevato et al., 2007; Ródio et al., 2008). La presencia de ergosterol y otros esteroides en la membrana de *A. castellanii* puede explicar la sensibilidad ante estos fármacos y la sensibilidad que presenta esta amiba ante la flavonona Pinocebrina.

Se ha comparado en estudios anteriores, los efectos antifúngicos de un grupo de flavonoides, encontrándose que sólo la Pinocebrina exhibe una actividad antifúngica lo cual demostró que la presencia del grupo hidroxilo en el carbono 7 (C7) en la estructura de la Pinocebrina tiende a ser más activa que el grupo metoxilo en el C7 presente en Pinostrobrina (Ramírez et al., 2013). Otro estudio sobre la toxicidad en células leucémicas murinas P-388 también muestra que el grupo hidroxilo de carbono siete es necesario para la actividad biológica (Tanjung et al., 2013). En otros reportes se sugiere que puede haber una relación entre la actividad biológica, como es el efecto inhibitorio de células cancerígenas y el efecto antileishmánico, con el número y disposición de los grupos hidroxilos de los flavonoides (Salvador et al., 2009; Pouget et al., 2001)

Otro efecto importante a destacar es la moderada toxicidad de la flavonona Pinocebrina, y a pesar de que no existen suficientes reportes sobre la toxicidad de esta flavonona, nuestros resultados coinciden con los presentados por Charoensin y colaboradores en el 2010, quienes encontraron que la Pinostrobrina ni la Pinocebrina son tóxicas. Resultados también apoyados por lo reportado por Chen et al., 2013, donde la Pinocebrina induce apoptosis en células LNCaP

(Células epiteliales humanas derivadas de cáncer de próstata) y arresta el ciclo celular en la fase S,G2 -M, y que también está involucrada en la disociación de la membrana mitocondrial a una concentración 150  $\mu$ M (Chen et al., 2013). Estos resultados son importantes debido al efecto tóxico que causan las drogas sintéticas, por lo que es muy importante identificar nuevos productos naturales, los cuales tengan una toxicidad baja o moderada pero que además sean capaces de inducir apoptosis y determinar el crecimiento en células cancerígenas.

A este respecto se sabe que la Pinocebrina tiene una actividad citotóxica contra la línea celular de cáncer HCT116 (Línea celular de cáncer de colón) (Kumar et al., 2007). También es capaz de promover la diferenciación de células epiteliales (Punvittayagul et al., 2012). Sin embargo, cabe aclarar que todos estos resultados provienen de experimentos *in vitro* por lo que es necesario realizar estos *in vivo* para comprender mejor su acción y los mecanismos moleculares que la Pinocebrina induce no sólo en las células cancerígenas, sino también sobre parásitos. Hacen falta más estudios de este metabolito para poder aprovechar al máximo sus propiedades (Charoensin et al., 2010; Rasul et al. 2013).

## CONCLUSIONES

---

- En esta investigación se comprobó por primera vez el efecto antiamebiano de la flavonona Pinocebrina.
- La Pinocebrina presenta un efecto amebostático sobre trofozoitos de *A. castellanii*.
- La Pinocebrina presenta una toxicidad moderada.

# APÉNDICE.

## *Gymnosperma glutinosum.*

---

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

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

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

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

Se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta Guatemala y en México es una especie nativa. Es una planta herbácea o sufrútice (herbácea con base leñosa), perene, erecta glabra o casi glabra, pegajosa, que alcanza tallas de hasta 1m de alto, sus tallos son más o menos ramificados y estriados, las hojas son lineares lanceoladas de 1 a 8.5 cm. de largo y de 1 a 9 mm de ancho, son agudas o acuminadas en el ápice, tienen un margen entero, están trinervadas y densamente punteadas en ambas caras, son sésiles o casi sésiles (Fig. 2). Su distribución latitudinal va de los 1200 a los 2850 m.s.n.m., y su 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 y Rzendowski, 1985; SEMARNAT, 2001).



Fig. 2. *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. Asteraceae

## Clasificación:

REINO: Plantae

DIVISION: Spermatophyta

SUBDIVISION: Angiospermae

CLASE: Dicotyledoneae

ORDEN: Asterales

FAMILIA: Asteraceae

TRIBU: Astereae

GENERO: *Gymnosperma*

ESPECIE: *Gymnosperma glutinosum*

NOMBRE CIENTIFICO:

*Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less

## Etnobotánica y antropología

Esta planta es empleada en el Estado de México, Durango y Guanajuato para el tratamiento del reumatismo y el dolor de pies (Argueta et al., 1994). Para esto, las hojas y tallo se maceran en alcohol y se conservan ahí de 3 a 8 días, con esta mezcla se frotan las partes a tratar; se puede beber, tomar baños con el cocimiento de las ramas, o aplicar en fomentos sobre las reumas o golpes. Se ha reportado el uso de las flores como antirreumático, como anti diarreico y analgésico (SEMARNAT, 2001). En el Valle de Tehuacán–Cuicatlán, Puebla, se utiliza la parte aérea preparada en té para combatir la diarrea (Canales, 2006). También en Puebla se usa para aliviar los dolores de cabeza, jiones y piquetes de hormiga, también se emplea para las roturas de huesos en animales. Otras de las aplicaciones que se le atribuyen son el tratamiento contra la diarrea, fiebre amarilla y para soldar huesos. Mientras en Guerrero, se utiliza también para hacer limpias a los animales (Argueta et al., 1994).

# REFERENCIAS

---

- Abdalla, S., Abu-Zarga, M., Afiti, T., Al-Khalil, S., Sabri, S. (1988). Effects of hispidulin, a flavone isolated from *Inula viscosa*, on isolated guinea-pig smooth muscle. *General Pharmacology*. 19: 559-563.
- Albornoz, A. (1980). Productos naturales, sustancias y drogas extraídas de las plantas. Universidad Central de Venezuela (UCV). Facultad de Ciencias. Caracas, Venezuela. 15:241.
- Aksozek, A., McClellan, K., Howard, K., Niederkorn, J. Y., Alizadeh, H. (2002). Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *Journal of Parasitology*. 88 (3): 621-623.
- Alizadeh, H.P., Apte, S.B., El-Agha, M.S.H., Li, L.M., Hurt, M.B., Howard, K.M., Cavanagh, H.D., McCulley, J.P.B., Niederkorn, J.Y. (2001). Tear IgA and serum IgG antibodies against *Acanthamoeba* in patients with *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea*. 20 (6): 622-627.
- Alizadeh, H.P., Neelam, S., Hurt, M., Niederkorn, J.Y. (2005). Role of contact lens wear, bacterial flora, and mannose induced pathogenic protease in the pathogenesis of amoebic keratitis. *Infection and Immunity*. 73(2): 1061-1068.
- Allevato, J. M. A., Negroni, R., Galimberti, R. (2007). Antifúngicos. Ayer, hoy y mañana. *Actualizaciones Terapéuticas Dermatológicas*. 30: 8-19.
- Álvarez, E., Orallo, 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.
- Argueta, V. A. y Cano, A. J., Rodarte, M. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista, México. 1193 pp.
- Auran, J. D., Star, M.B., Jakobiec, F. A., (1987). *Acanthamoeba* keratitis. A review of the

literature. *Cornea*. 6: 2-26.

- Binder, P. S. (1989). Cryotherapy for medically unresponsive *Acanthamoeba keratitis*. *Cornea*. 8:106- 114.
- Bonilla P. (2000). Heterogeneidad de las amibas de vida libre con potencial patógeno, aisladas de la atmósfera de la Ciudad de México. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 106 pp.
- Calzada, F., López, R., Meckers, M., Cedillo, R. (1995). Flavonoids of the aerial parts of *Hellianthemum glomeratum*. *International Journal of Pharmacognosy*, 33:351-352.
- Calzada, F., Meckers, M., Cedillo, R. (1999). Antiamoebic and anti giardial activity of plant flavonoids. *Planta Medica*. 65:78-80.
- 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 Ethnopharmacology*. 97: 429.
- Canales, M.M., Hernández, D.T, Caballero, N.J., Romo de Vivar, R.A., Durán, D.A., Lira, S.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.
- Canales, M., Hernández, T., Serrano, R., Hernández, L.B., Durán, A., Ríos, V., Sigrist, S., Hernández, H.L., García, A.M., Ángeles-López, O., Fernández-Araiza MA., Ávila G. (2007). Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: a comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*. 110(2): 343-7.
- Cancrini, G., Iori, A., Mancino, R. (1998). *Acanthamoeba* adherence to contact lenses, removal by rinsing procedure, and survival to some ophthalmic products. *Parasitologia*. 40 (3): 275-278.
- Carter, R.F. (1970). Description of a *Naegleria sp.* isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *Journal of Pathology*. 100: 217-244.
- Charoensin, S., Punvittayagul, C., Pompimon, W., Mevatee, U., Wongpoomchai, R. (2010). Toxicological and clastogenic evaluation of pinocembrin and pinostrobin isolated from

Boesenbergia pandurata in Wistar rats. *Thai Journal of Toxicology*. 25(1): 29-40.

- Chen, Z., Rasul, A., Zhao, C., Millimouno, F. M., Tsuji, I., Yamamura, T., Iqbal, R., Malhi, M., Li, X., and Li, J. (2013) Antiproliferative and apoptotic effects of pinocembrin in human prostate cancer cells. *Journal of the Bangladesh Pharmacological Society*. 8: 255-262.
- Chu, D.M., Miles, H., Toney, D., Ngyuen, C., Marciano-Cabral, F. (1998). Amebicidal activity of plant extracts from Southeast Asia on *Acanthamoeba* spp. *Parasitology Research*. 84: 746-752.
- Corona, C. R. M., Croft, S.L., Phillipson, J.D. (2000). Natural products as sources of antiprotozoal drugs. *Current Opinion in Anti-Infective Investigational Drugs*. 2: 47-62
- Cronquist, A. (1977). On the taxonomic significance of secondary metabolites in angiosperms. *Plant Systematics and Evolution*. suppl 1: 179-189.
- Dan-My, C., Ngyuen, C. (1998). Amebicidal activity of plant extracts from Southeast Asia on *Acanthamoeba* spp. *Parasitology*. 84:746-752.
- Degerli, S., Tepe, B., Celiksoz, A., Berk, S., Malatyali, E. (2012). In vitro amoebicidal activity of *Origanum syriacum* and *Origanum laevigatum* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Experimental Parasitology*. 131: 20-24
- Del Rayo Camacho, M., Sánchez, B., Quiroz, H., Contreras, J.L., Mata, R. (1991). Pinocembrine: a bioactive flavanone from *Teloxys graveolens*. *Journal of Ethnopharmacol*. 31(3): 383-389.
- Descher, E., Ruperto, J., Wong, G., Newmark, L. (1993). The effect of dietary quercetin and rutin on AOM-induced acute colonic epithelial abnormalities in mice fed a high-fat diet. *Nutrition and Cancer*, 20:199-204.
- El-Sayed, N. M., Ahmed, I. K., Abd-El-Ghany, A. S., Hafez, H. M. (2012). In vitro amoebicidal activity of ethanol extracts of *Arachis hypogaea* L., *Curcuma longa* L. and *Pancreatum maritimum* L. on *Acanthamoeba castellanii* cysts. *Journal of Parasitology Research*. 110:1985-1992.
- Garner, A. (1993). Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis hypothesis based on histological analysis of 30 cases. *British Journal of Ophthalmology*. 77(6): 366-370.
- Goswick S.M., Brenner G.M. (2003). Activities of azithromycin and amphotericin B against

*Acanthamoeba castellanii* in vitro and in a mouse model of Primary Amebic Meningoencephalitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47:524.

- Gregorí, V. B. S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacología*. 39(2): 1- 15
- Guerra, O.M., Torres, I.D., Martínez, P.L. (2001). Validación del uso tradicional de plantas medicinales cultivadas en Cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2: 48.
- Guevara, I. (1997). Qué curan las plantas. *Guía México desconocido*. 34: 9-13.
- Harborne, J.B., Baxter, H. (1999). The Handbook of Natural Flavonoids, vols. 1 and 2. John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom.
- Harborne, J.B, Williams, C. (2000). Flavonoids, Advances in Research since 1992. *Phytochemistry*. 55: 481-504.
- Havsteen, B. (1984). Flavonoids: A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*. 32: 1141-1148.
- Heinrich, M., Robles, M., West, J.E., Ortiz de Montellano, B.R., Rodríguez, E. (1998). Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 38: 539.
- Heo, H., Lee S., Kwon, C., S., Sohn, D., Au, W. (1994). Anticlastogenic effect of galangin against bleomycin-induced chromosomal aberrations in mouse spleen lymphocytes. *Mutation Research*. 311:225-229.
- Heywood, V.H., Harbone, J.B. & Turner, B.L. (1977). The biology and chemistry of the Compositae. Academic Press. New York. U.S.A 619p.
- Houghton, P.J. (1999). Roots of remedies: plants, people and pharmaceuticals. *Chemistry and Industry*. 15-19.
- Hurt, M., Neelam, S., Niederkorn, J., Alizadeh, H. (2003). Pathogenic *Acanthamoeba* spp. secrete a mannose- induced cytolytic protein that correlates with the ability to cause disease. *Infection and Immunity*. 71 (11): 6243-6255.
- Imbert-Bouyer, S. A., Imbert, C., Daniault, G., Rodier, M. H. (2004). A mannose binding protein is involved in the adherence of *Acanthamoeba* species to inert surfaces. *Federation of European Microbiological Societies*. 238 (1): 207-211.

- Jager, B.V. Stamm, W.P. (1972). Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *Lancet*. 2(7791): 1343-1345.
- John, D.T. & Howard, M.J. (1993). Opportunistically pathogenic free-living amoebae. En: Kreier, J.P. & Baker, J.R. (eds.) Parasitic protozoa. Academic Press. San Diego California, U.S.A. 283: 143.
- Kale, P.N., Adsule, P.G. (1995). *Citrus* In Salunkhe D.K, Kadam,S.S. (Ed.). Handbook of Fruits Science and Technology; Production, Composition, Storage and Processing. Marcel Dekker Inc. New York. 39-65 pp.
- Katerere, D.R., Gray, A.I., Nash, R. J., Waigh, R. D. (2012). Phytochemical and antimicrobial investigations of stilbenoids and flavonoids isolated from three species of Combretaceae. *Fitoterapia*. 8(5): 932-940.
- Kaul, N., Middleton, E., Ogra, L. (1985). Antiviral effects of flavonoides on human viruses. *Journal Medical Virology*, 15: 71-79.
- Kayser, O., Kiderlen, A., Croft, S.L. (2002). Natural Products as potential antiparasitic drugs. In: Atta-Ur-Rahman. *Studies in Natural Product Research*. 26: 779-848.
- Khan, N. A. (2006) *Acanthamoeba* : Biology and increasing importance in human health. *Federation of European Microbiological Societies*. 30: 564-595
- Kuo, S., Chen, S., Chen, L., Wu, J., Wang, J., Teng, C. (1995). Potent antiplatelet, anti-inflammatory and antiallergic isoflavanones from the roots of *Abrus precatorius*. *Plante Medica*. 61(4)307-312.
- Kumar, M. A. S., Nair, M., Hema, P. S., Mohan, J., Santhoshkumar, T. R. (2007) Pinocembrin triggers Bax-dependent mitochondrial apoptosis in colon cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*. 46 (3): 231-241.
- Lago, J. H., Ito, A. T. Fernandez, C.M., Young, M. C., Kato, M. J. (2012). Secondary metabolites isolated from Piper chimonantifolium and their antifungal activity. *Natural Product Research*. 26 (8): 770-773.
- Leitsch, D., Kohler, M., Marchetti-Deschmann, M., Deutsch, A., Allmaier, G., Duchene, M., Walochnik, J. (2010) Major Role for Cysteine Proteases during the Early Phase of

*Acanthamoeba castellanii* encystment. *Eukaryotic Cell*. 9 (4): 611- 618.

- Lozoya, X. (1989). Función de las plantas medicinales en la medicina del siglo XXI. Secretaria de Salud, edición conmemorativa, México. 255-270 pp.
- Liu, R., Cai-xia, W., Dan, Z., Fan, Y., Shuo, T., Li, Z., Tian-tai, Z., Guan-hua, D. (2012). Pinocembrin protects against  $\beta$ -amyloid-induced toxicity in neurons through inhibiting receptor for advanced glycation end products (RAGE)-independent signaling pathways and regulating mitochondrion-mediated apoptosis. *Biomed Central Medicine*. 10 (105): 1 -21.
- Mabry, T., Markham, K., Thomas, B. (1970). The systematic identification on flavonoids. Springer-Verlag. New York, USA.
- Marciano-Cabral, F. (1988). Biology of *Naegleria* spp. *Clinical Microbiology Reviews*. 52:114.
- Marciano-Cabral, F., Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. As agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(2): 273-307
- Martínez, A. J. (1981). Is *Acanthamoeba* encephalitis and Opportunistic Infection? *Journal of Neurology*. 30(6): 567-574.
- Martínez, A. J., García, A. C., Halks-Miller, M., Arce-Vela. (1980). Granulomatous amebic encephalitis presenting as a cerebral mass lesion. *Acta Neuropathologica*. 51 (2): 85-91.
- Martínez, A. J., Visvesvara, G. (1997). Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathology*. 7(1): 583-598.
- Martínez, M. A. (2005). Flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín. 76 pp.
- Martínez, S., González, J., Culebras, J., Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6)271-278.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M.J., Ríos, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 50: 5-17
- Mata, R. (2002). Exploring natural products from Mexican biodiversity as source of potential medicinal agents. *Revista de Fitoterapia*. 50<sup>th</sup> International Congress. Society for Medicinal Plant Research. Barcelona. Septiembre. PL 12 Volumen 2. Suplemento 1.44.
- Mattana, A., Biancu, G., Alberti, L., Accardo, A., Delogu, G., Fiori, P.L., Cappuccinelli, P.,

- (2004). In vitro evaluation of the effectiveness of the macrolide rokitamycin and chlorpromazine against *Acanthamoeba castellanii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48:4520-4527.
- Mehdi, H., Garg, H.S., Garg, N.K., Bhakuni, D.S. (1988). Sterols of *Acanthamoeba culbertsoni* strain A-1. *Steroids*. 51:551-558.
  - Mendiola, J., Bosa, M., Pérez, N., Hernández, H., Torres, D. (1991). Extracts of *Artemisia abrotanum* and *Artemisa absinthium* inhibit growth of *Naegleria fowleri* in vitro. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 85:78.
  - Mendoza, G.R. (2011). Efecto in vitro de la flavanona Eriodictiol presente en la resina de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. Sobre *Naegleria fowleri*. Tesis de licenciatura (Biología). Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. 49 pp.
  - Mori, A., Nishino, Ch., Enoki, N., Tawata, S. (1987). Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoid against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 26:2231-2234.
  - Morton, L. D., McLaughlin, G. L., Whiteley, H. E. (1991). Adherence characteristics of three strains of *Acanthamoeba*. *Reviews of Infectious Diseases*. 13 (Suppl 15): S424.
  - McLaughlin J. L., (1991). Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassays for Higher Plant Screening and Fractionation. En Dey P. M., Harbone J. B. Hostettman K. (Ed.) *Methods in plant Biochemistry Assays for Bioactivity*. Academic Press USA. 6: 1-32
  - Nagington, J., Walson, P. G., Playfair, T. J., McGill, J. Jones, B. R., Steel, A. D. (1974). Amoebic infec of the eye. *Lancet*. 1537-1540.
  - Niño, J., Correa, Y.M., Mosquera, O.M. (2006). Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of 11 *Solanaceae* plants from colombia biodiversity. *Pharmaceutical Biology* 44 (1), 14-18
  - Nishino, Ch., Enoki, N., Tawata, S., Mori, A., Kobayashi, K., Fukushima, M. (1987). Antibacterial activity of flavanoids against *Staphylococcus epidermis*, a skin bacterium. *Agricolal Biology Chemistry*, 51:139-143.
  - Oddó, B. D. (2006) Infecciones por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anatómo-clínicos. *Revista Chilena de Infectología*.

23 (3): 200-214.

- Omaña, M. M. 1997. Estudio comparativo de 3 cepas del género *Acanthamoeba* responsables de los primeros casos detectados de queratitis amibiana en México. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México. 166 pp.
- OMS. (2002). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. 2002-2005.
- Ortiz – Bermúdez, E., Villaseñor, J.L., Téllez O (1993). La familia *Asteraceae* en el estado de Nayarit (México). *Acta Botánica Mexicana*. 44: 25-57.
- Osato, M.S., Robinson, N.M., Wilhelmus, K.R., Jones, D.B. (1991). In vitro evaluation of antimicrobial compounds for cysticidal activity against *Acanthamoeba*. *Reviews of Infectious Diseases*. 13 (Suppl. 5): S431-S435.
- Page, F.C. (1988). A new Key to Freshwater and soil *Gymnamoebae*. *Freshwater Biological Association Scientific Publication*. Londres. 122 pp.
- Panjwani, N., Zhoo, L., Baum, J., Hazlett, L.D., Yong, Z. (1997). *Acanthamoeba* bind to rabbit corneal epithelium in vitro. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 38 (9): 1858-1864.
- Pelczar, J.M., Reid, D.R.Y., Chan, S.C. (1982). Microbiología. Mc Graw Hill, Nueva York. 826 pp.
- Peña-Juárez MC. (2009). Efecto *in vitro* de la resina de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. Sobre *Naegleria fowleri*. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. 53 pp.
- Pérez, G. M. V., Galindo, M., Dorta, A., Guzmán, R. C., Wagner, C., Vethencourt, M.A., Nessi, A., Bermúdez, A., Pérez, S. E. (2012). Hallazgos de amibas de vida libre de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria*. Una experiencia venezolana. *Académica Biomédica Digital*. 51.
- Phillipson, J.D., Wright, C.W. (1991). Can ethnopharmacology contribute to the development of antimalarial agents? *Journal of Ethnopharmacology*. 32: 155- 165.
- Pouget, C., Lauthier, F., Simo, A., Fagnere, C., Jean-Philippe, B., Delage, C., Albert, C. (2001). Flavonoids: Structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer

- cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* .11: 3095-3097.
- Punvittayagul, C., Pompimon,W., Wanibuchi, H., Fukushima, Wongpoomchai, R. (2012). Effects of Pinocembrin on the initiation and promotion stages of rat hepatocarcinogenesis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 13(5): 2257-2261.
  - Ramírez, J., Cartuche, L., Morocho, V., Aguilar, S., Malagon, O. (2013). Antifungal activity of raw extract and flavanons isolated from *Piper ecuadorensis* from Ecuador. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 23(2): 370-373.
  - Rasul, A., Martin, M. F., Ali, E. W., Ali, M., Li, J., Li, X. (2013) Pinocembrin: A Novel Natural Compound with Versatile Pharmacological and Biological Activities. *BioMed Research International*. 2013: 1-9.
  - Raederstorff, D., Rohmer, M. (1985). Sterol biosynthesis de novo via cycloartenol by the soil amoeba *Acanthamoeba polyphaga*. *Journal of Biochemistry*. 231:609-615.
  - Rates, S.M.K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*. 39: 603–613.
  - Reyes, (1993). Estudio Florístico en el Municipio de San Juan Mixtepec, Distrito de Juxtlahuaca, Oaxaca. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. 158 pp.
  - Rivera, F., Sánchez, M.R., Lugo, A., Ramírez, P., Paulín, A. (1987). Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *Journal of Environmental Research*. 42:149.
  - Roberts, W.C., HERRIQUEZ, L. F. (2010). Drug target identification, validation, characterisation and exploitation for treatment of *Acanthamoeba* (species) infections. *Experimental Parasitology*. 126:91-96.
  - Ródio, C., Da Rocha, V. D., Passos, K. K., Ferreira, P. L., Von, P. G., Brittes, R. M. (2008). In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Parasitology Research*. 104:191-194.
  - Romero, C., Reyes, Morales., 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.

- Ruddock, P.S., Charland, M., Ramirez, R. (2011). Antimicrobial activity of flavonoids from *Piper lanceaefolium* and other Colombian medicinal plants against antibiotic susceptible and resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sexually Transmitted Diseases*. 38 (2): 82-88.
- Rufino-González, Y., Ponce-Macotela, M., González-Maciel, A. (2012). In vitro activity of the F-6 fraction of oregano against *Giardia intestinalis*. *Parasitology*. 139 (4): 434-440.
- Rzendowski, J., Rzendowski, G.C. (1985). Flora Fanerogámica del Valle de México. Vol. II. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN e Instituto de Ecología, México, 501, 581pp.
- Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H, Kanazawa K. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J. Agric. Food Chemistry*. 51: 571-581.
- Salazar, V. L. I (2007). Interacción de *Acanthamoeba spp.* con células MDCK, lentes de contacto y córneas de hámster. Tesis licenciatura (Biología). Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México.
- Salvador, M.J., Sartori, F. T., Sacilotto, A. C. B. C., Pral, E. M. F., Alfieri, S. C., Vichnewski, W. (2009). Bioactivity of flavonoids isolated from *Lychnophora markgravii* against *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Zeitschrift fur Naturforschung C*. 64 (7-8): 509-512.
- Schaumberg, D.A., Snow, K.K., Dana, M.R. (1998). The epidemic of *Acanthamoeba* Keratitis Where do we stand? *Corneal*. 17 (1): 3-10.
- Schuster, F.L. (1979). Small amebas and ameboflagellates. En: Levandowsky M. y Hunter SH (eds) *Biochemistry and physiology of protozoa*. 1(2):215.
- Schuster, F.L., Visvesvara, G.S. (1998). Efficacy of novel antimicrobials against clinical isolates of opportunistic amebas. *Journal of Eukaryot Microbiology*. 45: 612-618.
- Schuster, F.L. Visvesvara, G. S. (2004). Free-living amoebae as Opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*. 34(9): 1001-1027.
- Schuster, F.L., Guglielmo, B.J., Visvesvara, G. S. (2006). In-vitro activity of miltefosine and voriconazole on clinical isolates of free-living amebas: *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba spp.*, and *Naegleria fowleri*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 53:121-126.

- Seal, D.V., Hay, J. (1994). *Acanthamoeba keratitis*. *British Medical Journal*. 309: 1019.
- Sehgal, R., Saini, J., Singh, K.D., Batí, H. S. (2002). *Acanthamoeba* adherence to soft contact lens and human corneal stroma. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 45 (1): 63-67.
- SEMARNAT (2001). *Gymnosperma glutinosum*. Especies con usos no maderables en bosques de encino, pino y pino-encino en los estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca.
- Serrano, P.R. (2004). Estudio comparativo de la actividad antibacteriana de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. de dos localidades: San Rafael Coxcatlán, Puebla y Tepeji del Río, Hidalgo. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México.
- Shu, Y-Z. (1998). Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Journal Natural Products*. 61:1053-1071.
- Tanjung, M., Srie, T. T., Hadi, S. M. (2013). Antioxidant and cytotoxic agent from the rhizomes of *Kaempferia pandurata*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 3(5): 401-404.
- Tona L., Kambu K., Ngimbi K., Cimanga K., Vlietinck AJ. (1998). Antiamebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 61:57
- Trease, G. E. y Evans, W. C. (1993). Tratado de Farmacognosia. 15a ed. Ed. Interamericana. México. 728-730 pp.
- Visvesvara, G.S., Schuster, F.L., Martinez, J. (1993). *Balamuthia mandrillaris*, N.G., N. Sp., Agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 40:504.
- Walochnik, J., Duchêne, M., Seifert, K., Obwaller, A., Hottkowitz, T., Wiederman, G., Eibl, H., Aspöck, H. (2002). Cytotoxic activities of alkylphosphocholines against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Antimicrobiol Agents and Chemotherapy*. 46: 670-695.
- Wellings, F. M., Amuso, S. L., Lewis, A. L., Farmelo, M. J. Moody, D. J., Oiskowics, C. L. (1979). Pathogenic *Naegleria*, Distribution in Nature. Environmental Protection Agency,

Cincinnati, EPA/600-1-79-018

- Willcox, M. D., Holden, B. A. (2001). Contact lens related corneal infections. *Bioscience Reports*. 21 (4): 445-461.
- Yang, Z., Cao, Z., Panjwani, N. (1997). Pathogenesis of Acanthamoeba keratitis carbohydrate mediated host-parasite interactions. *Infection and Immunity*. 65(2): 439-445.