



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA

Efecto *in vitro* del extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera*
Kunth sobre *Naegleria fowleri*.

Tesis

Que para obtener el Título de Bióloga

PRESENTA

CLAUDIA CUELLAR DÍAZ

ASESOR: DR. MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY

Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2015.





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 Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy, Dra. Ma. Margarita Canales Martínez, Dra. Patricia Bonilla Lemus, M. en C. Luis Antonio Hernández González y M. en C. Karla Stephanie Martínez Elizalde a quienes expreso mi más sincero agradecimiento por su colaboración y observaciones para la redacción de mi tesis.

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), con los proyectos: PAPIIT IN213713, IN211614

DEDICATORIAS

A mis padres Lucía y Mario por apoyarme incondicionalmente, por creer en mí y por ser mi ejemplo. Por enseñarme a ser perseverante y superarme.

A mis hermanas Andrea y Vanessa gracias por su tiempo y apoyo, sin su ayuda no lo hubiera logrado.

A mi pequeña Sofía que sin su consentimiento le he robado tiempo, eres lo más importante de mi vida y mi motivación.

A Juan por confiar en mí, por apoyarme, por tener paciencia y por acompañarme siempre.

A mis amigos de clases y del laboratorio Isaura, Geraldine, Osvaldo, Karla, Cinthya, Oscar, Ruth, Isabel, Cecilia, Mary, Grace y Oscar por los buenos momentos que pasamos. Los quiero y los estimo mucho a todos.

Y finalmente al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy por haberme guiado en la realización de este trabajo, muchas gracias por su inmenso apoyo, confianza, paciencia, por motivarnos a concluir nuestros proyectos y por transmitir sus conocimientos. Lo quiero y lo estimo mucho.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA DE <i>Naegleria fowleri</i>	3
ECOLOGÍA DE LAS AMIBAS DE VIDA LIBRE	4
<i>Naegleria fowleri</i>	4
INFECCIONES EN HUMANOS	5
VÍAS DE EXPOSICIÓN	7
LA MEDICINA TRADICIONAL	8
LAS PLANTAS MEDICINALES	8
METABOLITOS SECUNDARIOS	9
FAMILIA ANACARDIACEAE.....	11
ANTECEDENTES.....	13
OBJETIVOS	15
MATERIAL Y MÉTODO	16
RECURSOS BIOLÓGICOS	16
Cultivo de células de cérvix humano cancerígenas, CaSki	17
Reactivación de la virulencia de trofozoítos de <i>N. fowleri</i>	17
Curva patrón para los ensayos de viabilidad Celular por Cristal Violeta	17
Bioensayos del extracto de <i>C. procera</i>	19
Ensayo de citotoxicidad.....	19
Caracterización química	20
Tratamiento estadístico.	20
RESULTADOS.....	21
Curva patrón para los ensayos de viabilidad de los trofozoítos de <i>N. fowleri</i>	21

Efecto <i>in vitro</i> del extracto metanólico de <i>C. procera</i> sobre <i>N. fowleri</i>	22
Curva de Anfotericina B	23
Citotoxicidad celular	24
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del extracto de <i>Cyrtocarpa procera</i>	26
DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIONES.....	30
Referencias.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadios morfológicos de <i>N. fowleri</i>	3
Figura 2. Ciclo de vida de <i>N. fowleri</i>	6
Figura 3. Hojas de <i>C. procera</i>	11
Figura 4. Fotografías tomadas con el microscopio óptico	25

ÍNDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1. Curva patrón de viabilidad celular.....	21
Gráfico 2. Interacción del extracto metanólico de <i>C. procera</i> sobre <i>N. fowleri</i>	22
Gráfico 3. Curva patrón de la Anfotericina.....	23
Gráfico 4. Interacción del extracto metanólico de <i>C. procera</i> sobre células CaSki.....	24
Gráfico 5. Cromatograma del extracto metanólico de <i>C. procera</i>	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de células por pozo para el ensayo de Viabilidad Celular por Cristal Violeta.	18
--	----

RESUMEN

Los protozoos son organismos cosmopolitas y de formas muy variadas, algunos son anfizóicos (de vida libre y también endoparásitos) como la amiba *Naegleria fowleri*, que es el agente etiológico de la Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP) que es una infección con un cuadro agudo, fulminante y difícil de diagnosticar; el tratamiento a base de Anfotericina 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 *Cyrtocarpa procera* que ha sido empleada en diversos padecimientos en la piel y estomacales, se ha determinado el efecto antifúngico de *C. procera* y esta cualidad es primordial para combatir la MAP.

Se determinó el efecto del extracto metanólico de la corteza de *C. procera* sobre *N. fowleri* donde se obtuvo una CL_{50} de 1.103 mg/mL. Así mismo para determinar la citotoxicidad de dicho extracto se emplearon células CaSki y de acuerdo con el CNI de E.U., la concentración Inhibitoria 50 (CI_{50}) fue de 0.66 mg/mL por lo que el extracto no es citotóxico. Se determinó la composición química del extracto mediante el ensayo de HPLC, encontrándose que los principales compuestos son fenilpropanoides como catequinas.

INTRODUCCIÓN

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoos, anfizóicos de distribución cosmopolita que han sido aislados de suelos, agua y en muestras de aire de todo el mundo, cuyas dimensiones varían desde unos micrómetros hasta algunos milímetros (Schuster y Visvesvara, 2006; Gallegos *et al.*, 2014).

Las temperaturas elevadas favorecen la proliferación de las AVL patógenas, por lo que se les encuentra comúnmente en aguas termales, naturales y en aguas contaminadas por descargas industriales (De Jonckheere, 1977).

Su mecanismo de protección ante los cambios ambientales es la formación de quistes, de esta manera sobreviven a la ausencia de humedad, cambios extremos de temperatura, pH, falta de oxígeno, escasez de alimento o algún otro factor adverso (Schuster, 1979; Marciano-Cabral, 1988).

Las AVL tienen importancia ecológica ya que ocupan un lugar importante en la cadena alimenticia y las comunidades naturales del suelo y agua, ya que se alimentan de bacterias, hongos, algas y otros protozoos (Wellings *et al.*, 1979).

Se ha demostrado que sólo un grupo muy restringido provoca infecciones humanas incluyendo a los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Sappinia* y probablemente *Hartmannella* (John y Howard, 1993; Visvesvara *et al.*, 1993).

Algunas especies del género *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris*, y recientemente *Sappinia pedata*, producen encefalitis amebiana granulomatosa, que se presenta de forma subaguda o crónica; generalmente parasitan a individuos inmunosuprimidos. Estas amibas también causan infecciones severas en pulmones, oídos, piel y nariz (Beltrán y Uyema, 1997).

Entre las enfermedades graves, peligrosas y de gran importancia epidemiológica se encuentran la meningitis y la encefalitis, que pueden llevar a invalidez o muerte. Los agentes etiológicos que las producen generalmente son bacterias, virus y hongos. En cuanto a los protozoos causantes de meningitis y encefalitis, se encuentra *Naegleria*

fowleri que parasita a individuos aparentemente saludables, niños o jóvenes y es la causante de meningoencefalitis amebiana primaria (MAP), que se caracteriza por su rápida evolución y luego la muerte (Peralta y Ayala, 2009).

MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA DE *Naegleria fowleri*

El género *Naegleria* consta de tres estadios durante su ciclo de vida en el ambiente. El primer estadio es el trofozoíto o forma vegetativa, fase donde se alimenta y reproduce, el segundo estadio es el quiste que es la forma de resistencia, y por último la forma flagelada que es un estado transitorio en el que no se alimenta, ni se multiplica y después de un tiempo regresa a la fase trófica (Page, 1988).

Los trofozoítos son alargados y se mueven por medio de un pseudópodo llamado lobópodo, el núcleo posee nucléolo o cariosoma y una membrana nuclear sin cromatina granular. La reproducción es por fisión binaria (Martínez y Visvesvara, 1997).

El trofozoíto se transforma en el flagelado cuando la concentración iónica del medio ambiente cambia. Se cree que juega un papel en la dispersión de las amibas en su hábitat natural de suelo o agua (Visvesvara *et al.*, 2007).

El quiste es una estructura de resistencia; es esférico, con un diámetro de 7 a 15 μm . El trofozoíto se transforma cuando el alimento es escaso y/o cuando las condiciones de crecimiento se vuelven adversas (Schuster y Visvesvara, 2004).

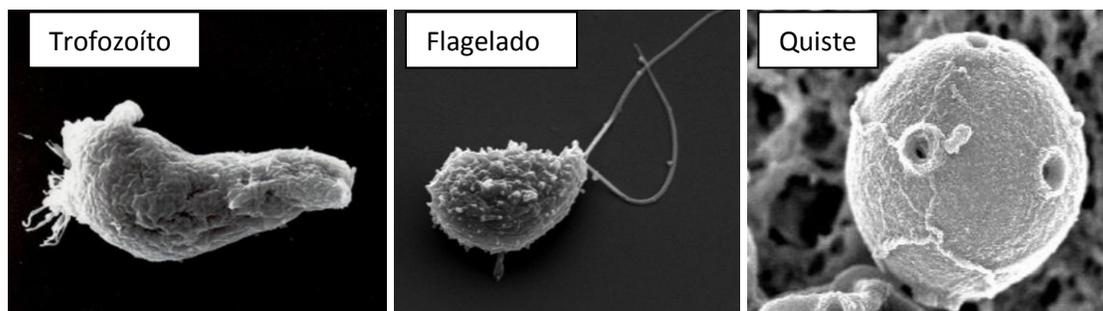


Figura 1. Estadios morfológicos de *N. fowleri*.

ECOLOGÍA DE LAS AMIBAS DE VIDA LIBRE

Dentro de los cuerpos de agua las amibas viven sobre la superficie, adheridas a partículas flotantes, en la columna de agua, o en los sedimentos. Las AVL tienen un papel importante dentro del ciclo de los nutrientes, porque estimulan el incremento en la tasa de transformación bacteriana del fósforo y del nitrógeno a formas aprovechables para las plantas (Fenchel, 1987; Tyndal *et al.*, 1989)

En su forma de quiste, las AVL pueden ser acarreadas hacia la atmósfera mediante corrientes de convección, sistemas frontales, turbulencias o burbujas de aire (Rivera *et al.*, 1987, Rodríguez *et al.*, 1993). Lo cual es de gran importancia ya que la mayoría de AVL pueden ser transportadas por el viento a grandes distancias incluso entre continentes (Rondanelli, 1987). En contraste, en la mayoría de las áreas geográficas donde se ha aislado *N. fowleri* en el ambiente se ha detectado una fuerte influencia de los ciclos estacionales, con números altos de amibas en el verano y el otoño y bajos en invierno y primavera (De Jonckheere, 1979).

Aunque las AVL patógenas tienen velocidades de crecimiento inferiores a las no patógenas, las primeras pueden crecer e incrementar paulatinamente su número hasta llegar a niveles infectivos (Griffin, 1983).

Naegleria fowleri

Es un ameboflagelado que ha sido aislado de muestras de albercas con agua clorada, lagos, aguas termales y depósitos de agua doméstica (Marciano-Cabral, 1988).

Esta especie puede invadir a animales y al ser humano, siendo el trofozoíto el estadio invasivo, su periodo de incubación varía de dos a tres semanas, lo cual depende del tamaño del inóculo y la virulencia de las amibas. La infección inicia con la inhalación de los trofozoítos presentes en agua o polvo, luego, a través de la mucosa nasal, atraviesan el bulbo olfatorio y llegan al sistema nervioso central (Peralta y Ayala, 2009).

INFECCIONES EN HUMANOS

La MAP es una enfermedad aguda, rápidamente progresiva y fatal debido a que la invasión es muy rápida, provoca necrosis hemorrágica en gran parte del encéfalo (Martínez, 1985).

El cuadro clínico es muy parecido a la meningitis bacteriana; sin embargo en la infección por *Naegleria* existe el antecedente de que los pacientes, en su mayoría son jóvenes y previamente sanos, que nadaron en algún cuerpo de agua contaminada con *Naegleria fowleri* (Gutiérrez, 2000).

Los signos y síntomas de la MAP consisten en presión intracraneal elevada, cefalea intensa, irritación de la mucosa nasal, fiebre, irritación meníngea y encefalitis; en algunos casos crisis convulsivas, pérdida de apetito, trastornos del gusto, olfato y alucinaciones, coma profundo y finalmente la muerte. La mayoría de los pacientes mueren de la primera o segunda semana después de la aparición de los primeros síntomas, dependiendo del manejo y resistencia del paciente, así como la virulencia de las amibas (Martínez y Visvesvara, 1997).

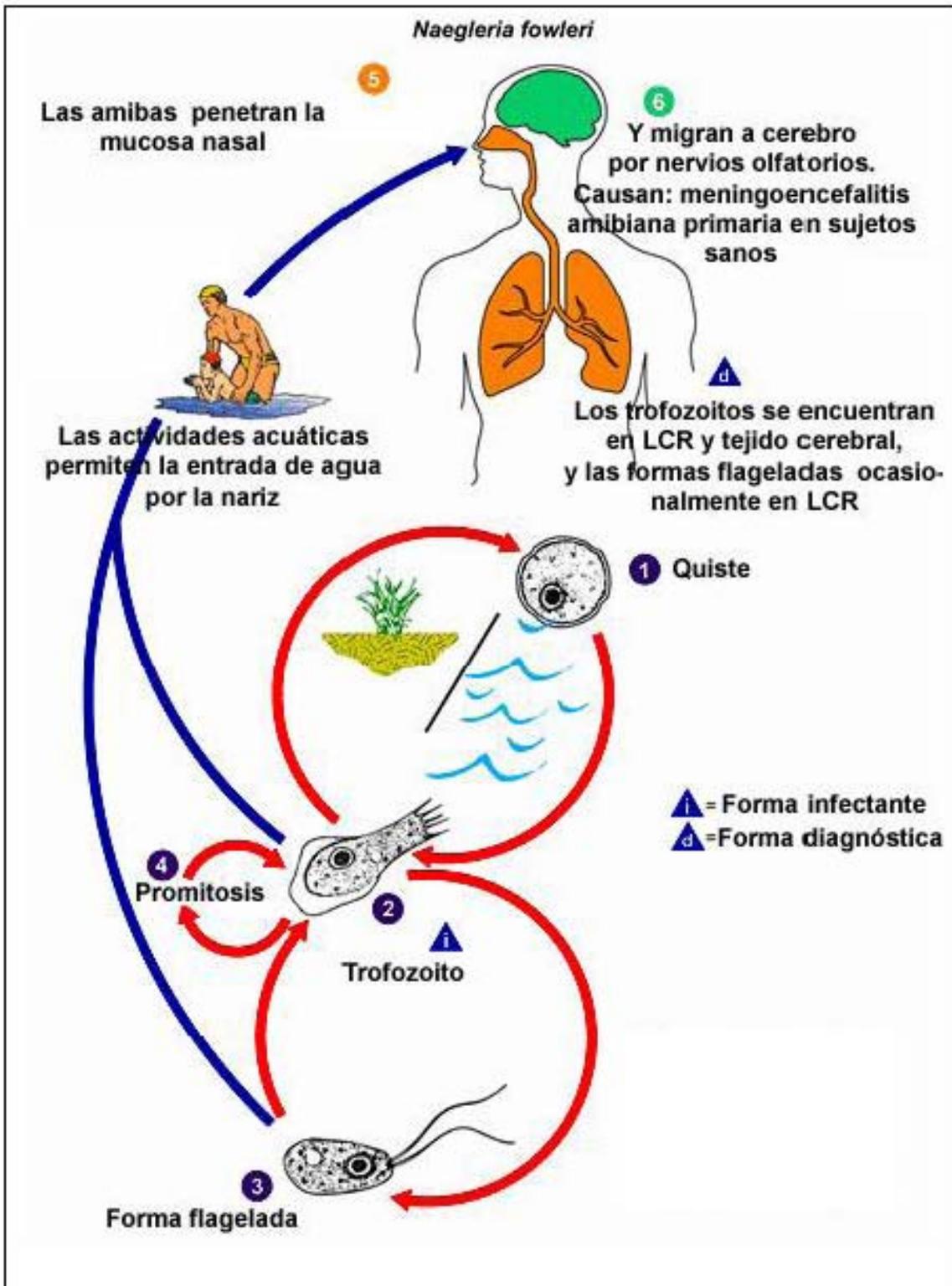


Figura 2. Ciclo de vida de *N. fowleri*.

VÍAS DE EXPOSICIÓN Y TRATAMIENTO

La infección por *N. fowleri* se contrae casi exclusivamente por la exposición de las fosas nasales a agua contaminada. Esta infección se asocia sobre todo al uso recreativo del agua, como en piscinas y balnearios, así como con aguas superficiales calentadas de forma natural por el sol, aguas de refrigeración industrial y los manantiales geotérmicos. En unos pocos casos, no se ha establecido un nexo con la exposición a aguas recreativas. La frecuencia de MAP es más alta durante los cálidos meses de verano, cuando muchas personas realizan actividades recreativas acuáticas y cuando la temperatura del agua facilita la proliferación de este organismo. No se ha reportado el consumo de agua o alimentos contaminados ni el contacto entre personas como vías de transmisión (Martínez y Visvesvara, 1997).

Hasta el momento no existe un tratamiento satisfactorio para la meningoencefalitis amebiana primaria. Son pocos los pacientes que han sobrevivido a la MAP. El tratamiento de elección para las infecciones por *N. fowleri* es anfotericina B (AMB) en combinación con miconazol y rifampicina (Rodríguez-Pérez, 1984).

Existen otros compuestos que han mostrado cierta protección en modelos de ratones infectados con *N. fowleri* como por ejemplo la ciclofosfamida, Δ^9 -tetrahidrocanabinol (Pringle *et al.*, 1979) y combinaciones de AMB y miconazol, o con rifampicina (Vargas *et al.*, 2004), con tetraciclina, voriconazol e incluso con el anticancerígeno miltefosina, empleada en concentraciones arriba de 80 μg (Schuster y Visvesvara, 2006).

La AMB es la droga más activa contra *N. fowleri*, su administración intraventricular debe ser cuidadosa por el efecto tóxico celular que presenta; el uso de este no radica en su eficacia, si no 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, insuficiencia hepática aguda y alteraciones hematopoyéticas (Belofsky *et al.*, 2006).

Es por esto que 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.

LA MEDICINA TRADICIONAL

México es un país de gran diversidad florística ya que cuenta con muchas especies de plantas con flor que contienen sustancias de valor medicinal (Rzedowski, 1987).

Se estima que en el mundo existen entre 310,000 y 422,000 especies de plantas; dentro de esa vasta diversidad, se estima que existen 20,000 especies vegetales con propiedades de interés para la investigación y el descubrimiento de nuevos productos. Sin embargo, se calcula que menos del 10% de las plantas han sido evaluadas en la búsqueda de actividad biológica (Céspedes *et al.*, 2006).

Las propiedades farmacológicas de las plantas son producidas por una amplia variedad de metabolitos secundarios (Salisbury, 1992). De los cuales se han aislado alrededor de 50,000 estructuras y todavía hay por describirse miles de compuestos (Pichersky y Gang, 2000).

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).

Cabe mencionar que la población posee un profundo conocimiento de su medio ambiente ya que a través del tiempo y de un largo proceso de aprendizaje, ha sabido apropiarse de esos recursos naturales y ha encontrado numerosos usos a las plantas como por ejemplo el medicinal (Ankli *et al.*, 2002; Frei *et al.*, 1998; Henrich *et al.*, 1998). El uso de plantas ofrecen una disminución de los efectos colaterales y son recursos que están al alcance de un gran porcentaje de la población (Rates, 2001).

METABOLITOS SECUNDARIOS

Actualmente, el 25% de los principios activos derivados de las plantas, se consideran como drogas importantes en uso en varios países. La mayoría de estos compuestos químicos se derivan de plantas medicinales las cuales principalmente fueron descubiertas a través de la investigación etnobotánica, y los compuestos tienen el mismo o similar uso como las plantas de las cuales se derivaron (Newman y Cragg, 2007). Estos compuestos son denominados metabolitos secundarios y/o productos naturales.

Se llama metabolismo primario de las plantas, a los procesos químicos que intervienen en forma directa en su supervivencia, crecimiento y reproducción. Estos son la fotosíntesis, la respiración, el transporte de solutos, la síntesis de proteínas, la asimilación de nutrimentos, la diferenciación de tejidos, y en general la formación de carbohidratos, lípidos y proteínas que intervienen en estos procesos o son parte estructural de las plantas (Ortiz, 2009).

En contraposición, los metabolitos secundarios de las plantas son compuestos químicos que cumplen funciones ecológicas, de forma que su ausencia no es fatal para la planta, ya que no intervienen en el metabolismo primario, es decir en su crecimiento y desarrollo (Taiz y Zeiger, 2006).

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser divididos en 3 grandes grupos, con base a sus orígenes biosintéticos.

TERPENOIDES: Son derivados del compuesto IPP (Isopentenil pirofosfato-) que se forman en la vía del ácido mevalónico. Están distribuidos ampliamente en las plantas y muchos de ellos tienen funciones fisiológicas primarias. La distribución de unos pocos de ellos en las plantas es más restringida, como los que forman los aceites esenciales, entre otros. El modo de acción de terpenos y aceites esenciales no ha sido dilucidado por completo, aunque actualmente se investiga sus posibles efectos antibacterianos y otros usos farmacéuticos (Ortiz, 2009).

COMPUESTOS FENÓLICOS (Fenilpropanoides y derivados): Están formados por la vía del malonato/acetato; muchos son productos de defensa contra herbívoros y patógenos, otros proveen soporte mecánico a la planta, también atraen polinizadores, algunos de

ellos absorben la radiación ultravioleta, o actúan como agentes alelopáticos. Algunos de estos compuestos presentan actividad antibacteriana, antifúngica y antioxidante (Cartaya, 2001).

ALCALOIDES (compuestos nitrogenados): Contienen uno o más átomos de nitrógeno, son biosintetizados principalmente a partir de aminoácidos. Son fisiológicamente activos en los animales, aún en bajas concentraciones, por lo que son muy usados en medicina. Se han mostrado efecto antimicrobiano, antioxidante y antibacteriano (Kuklinski, 2000; Taiz y Zeiger, 2006).

FAMILIA ANACARDIACEAE

Particularmente la especie *Cyrtocarpa procera* (Chupandilla) cuenta con pocos registros de uso medicinal por lo que es de importancia el estudio de la misma.

C. procera se usa comúnmente en el Estado de México para resolver trastornos del aparato digestivo, tales como diarrea y disentería. La corteza es la parte de la planta que más se utiliza. En el Estado de Nayarit es preparada en cocimiento junto con cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) y se emplea para lavar heridas y llagas, para lograr una cicatrización más rápida; es administrada por vía oral, también se usa para quitar el dolor de cintura. En Michoacán la utilizan para aliviar el dolor de muelas y la tos. También se refiere útil para bajar la fiebre y contra la lepra (Canales, 2005; Argueta y Cano, 1994).

Cyrtocarpa procera* Kunth.*A) CLASIFICACIÓN:**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Burserales

Familia: *Anacardiaceae*

Género: *Cyrtocarpa*

Especie: *Cyrtocarpa procera* Kunth



Figura 3. Hojas de *C. procera*.

B) NOMBRE COMÚN:

Estado de México: chucum-pum. Michoacán: chucumpuz, chupandia. Nayarit: chocote, puei (cora) (Argueta y Cano, 1994). Puebla: Chupandilla (Canales *et al.*, 2005)

C) DESCRIPCIÓN:

C. procera es un árbol de aproximadamente 6 m. de altura, la corteza está cubierta con vellos. Las hojas parecen plumas; tienen un soporte que las une a los tallos (Figura 1). Presenta racimos de flores blancas. Los frutos están cubiertos de pelos y miden 2 cm. de largo (Argueta y Cano, 1994).

D) HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN:

Es una especie originaria de México. Habita en climas cálidos, semicálidos, semisecos y templados entre los 600 y los 1100 m.s.n.m. Es una planta silvestre, asociada a bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosque de encino y de pino. Se encuentra ampliamente distribuida en: Colima, Michoacán, Estado de México, Puebla y Oaxaca (Argueta y Cano, 1994).

ANTECEDENTES

Se ha examinado la actividad antiinflamatoria, analgésica y antidiabética del extracto acuoso de la corteza y tallo de *Mangifera indica*, un miembro de la familia *Anacardiaceae*. Esta especie presentó estas actividades, y se reportó que los diferentes componentes químicos de la planta, son especialmente polifenoles, flavonoides, triterpenoides, mangiferina y otros compuestos químicos (Ojewole, 2005).

Al respecto de la actividad antibacteriana Canales *et al.*, en 2005 realizaron un estudio sobre actividad antibacteriana de la flora medicinal de San Rafael, en el Municipio de Coxcatlán, Puebla, los estudios revelaron que la corteza de *C. procera* fue activa sobre 6 cepas bacterianas.

En el 2006 Canales *et al.*, realizaron un estudio sobre el conocimiento tradicional de la flora medicinal de San Rafael, en el Municipio de Coxcatlán, Puebla, encontrando que la corteza de *C. procera* se utiliza como té para aliviar dolor de riñones. También en 2009 Martínez, evaluó la actividad antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* y concluyó que *C. procera* presenta actividad antibacteriana y antioxidante y demostró que el extracto metanólico de *C. procera* presenta actividad antifúngica sobre *T. mentagrophytes*.

Finalmente Orozco en 2010 realizó un estudio comparativo de algunas actividades biológicas de diferentes cortezas entre ellas *C. procera* donde reportó actividad antibacteriana, actividad antifúngica sobre *T. mentagrophytes* y *R. solani*, y en fracciones activas del extracto metanólico de *C. procera* reporta presencia de ácido gálico, catecol, catequina y algunos fenilpropanoides.

JUSTIFICACIÓN

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

Las plantas medicinales son el recurso terapéutico por excelencia y forman parte importante de la medicina tradicional por lo que representa una alternativa para la implementación de nuevos planes de salud; tal es el caso de la corteza de *Cyrtocarpa procera* (Chupandilla) que se ha demostrado que es poseedora de una variedad de metabolitos secundarios, los cuales le atribuyen a la planta una diversidad de actividades biológicas.

Actualmente, se ha demostrado que la familia *Anacardiaceae* a la cual pertenece *C. procera* presenta una alta actividad antibacteriana y antifúngica. También se han realizado evaluaciones de actividad antibacteriana del extracto metanólico mostrando actividad inhibitoria en cepas bacterianas, por lo que es muy probable que actúe de la misma forma contra otros microorganismos.

Al ser *C. procera* una especie poco estudiada de la familia *Anacardiaceae* hace importante el estudio que se realice con la misma porque permitiría enriquecer los pocos estudios que se han realizado, además de conocer si presenta la misma actividad contra *N. fowleri* que es un microorganismo altamente patógeno.

HIPÓTESIS

Si *Naegleria fowleri* es susceptible al antimicótico anfotericina B, y el extracto metanólico de *C. procera* presenta una actividad antifúngica importante, entonces cabe esperar que este extracto tenga actividad contra *N. fowleri*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad *in vitro* del extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera* sobre *Naegleria fowleri*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la concentración letal (CL) y la concentración letal media (CL₅₀) del extracto de *Cyrtocarpa procera* sobre *Naegleria fowleri* mediante la técnica de viabilidad celular con Cristal Violeta.
- Determinar la citotoxicidad del extracto de *Cyrtocarpa procera* en células CasKi (células de cáncer cervico-uterino) mediante la técnica de cristal violeta.
- Determinar la composición química del extracto de *C. procera* por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

MATERIAL Y MÉTODO

RECURSOS BIOLÓGICOS

Extracto

El extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera* fue proporcionado por la Dra. Canales del Laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO), F.E.S Iztacala.

Amibas

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

Cultivo de amibas

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

Ratones

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

Cultivo de células de cérvix humano cancerígenas, CaSki

Se cultivaron en frascos Corning con filtro de 75 cm² con 30 ml de medio DMEM 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 trofozoítos de *N. fowleri*

Se realizó en tres ratones anestesiados con éter, a los que se les inocularon por vía intranasal con 2.5x10⁴ trofozoítos 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 los cerebros y se recuperaron las amibas, las cuales se sembraron nuevamente y se inocularon a otro ratón. Este procedimiento se repitió y las amibas recuperadas se cultivaron axénicamente para pruebas posteriores (Rodríguez, 2013).

Curva patrón para los ensayos de viabilidad Celular por Cristal Violeta

Para probar el efecto del extracto sobre 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, posteriormente se desechó el medio de los frascos Corning y se agregó PBS 1X estéril y frío, se colocó el frasco en el congelador por 10 minutos para que las células se despegaran de la superficie del frasco Corning. Transcurrido los 10 minutos se llevó el frasco a una campana de flujo laminar y se dieron unos golpes al frasco y se recuperó el contenido en tubos estériles, esto procedimiento fue repetido en 2 ocasiones. Posteriormente los tubos con las amibas se centrifugaron por 10 minutos a 2500 rpm y se recuperó la pastilla con el fin de preparar una muestra y realizar el conteo con ayuda de una cámara de Neubauer y un microscopio óptico.

Posteriormente en una placa de 96 pozos para cultivo celular, se agregó a cada pozo de la placa 100 µl de medio. Excepto en el primer pozo. Se ajustó la suspensión de amibas a 2 X10⁶ en 200 µl y se agregó 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 μ l y se pasaron al tercer pozo. Se repitió este procedimiento hasta llegar al pozo 12 (Rodríguez, 2003). Al terminar ese paso se obtuvo lo siguiente:

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

Tabla 1. Número de células por pozo para el ensayo de Viabilidad Celular por Cristal Violeta.

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 μ l de metanol por 30 segundos y se retiró el resto de metanol. Se agregaron 100 μ l de solución de Cristal Violeta a todos los pozos (la solución se preparó al 0.1% y se disolvió en agua destilada). Se Incubó de 10 a 15 min 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 μ l de SDS al

1% (la solución se prepara con 1g de SDS y se disuelve en 100 ml de etanol al 50%). Se leyó en el lector de ELISA a una longitud de onda de 570 nm. La curva patrón obtenida se empleó para determinar la CL y la CL₅₀ del extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera*, siguiendo la técnica de viabilidad celular por Cristal Violeta, los valores de absorbancia se graficaron contra el número de amibas.

Bioensayos del extracto de *C. procera*

Para probar el efecto del extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera*, se colocó en una placa de 96 pozos 15,000 trofozoítos por pozo (de la misma forma como se explicó anteriormente) en 150 µL de medio de cultivo, a los pozos se les agregó diferentes concentraciones del extracto (de 40 a 0.020 mg/mL) y se incubaron a 37°C por un periodo de 24 horas.

Posteriormente, se realizó la prueba de Viabilidad Celular por Cristal Violeta siguiendo el mismo procedimiento que se explicó para la curva patrón.

Los valores que se obtuvieron se interpolaron en la curva patrón y se graficaron para obtener el resultado del número de trofozoítos, y de esta manera saber la concentración letal (CL) y concentración letal media (CL₅₀) del extracto metanólico.

Ensayo de citotoxicidad.

La citotoxicidad se realizó mediante la técnica de cristal violeta, en la cual se utilizaron células CaSki (células humanas de cáncer cervicouterino) éstas se cultivaron en medio de cultivo DMEM enriquecido con suero fetal bovino al 10%, y se incubaron con CO₂ al 5% a una temperatura de 37°C. Una vez saturada la caja de cultivo se despegaron las células agregando tripsina y dejando reposar 5 minutos a 37°C, una vez obtenidas las células se centrifugaron por 10 min a 1500 rpm para ser contadas en la cámara de Neubauer. En placas de cultivo celular de 96 pozos, se colocaron 1.5x10⁴ células CaSki en 100 µL de medio las cuales se dejaron reposar por 30 minutos para que se adhirieran a la placa. Posteriormente se añadieron las diferentes concentraciones del extracto de *C. procera* partiendo de la concentración doble de la CL₅₀ que se obtuvo y se realizaron diluciones seriadas para los siguientes pozos. Una vez realizado lo anterior, la placa se dejó incubar

por un periodo de 72 horas a 37°C. La placa se lavó suavemente con solución salina o PBS 1 X estéril a 37° C (2 veces). Se fijaron las células con 100 µL de metanol por 30 segundos. Se desechó el metanol y 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 y se lavó suavemente con solución salina o PBS 1 X estéril a 37° C (2 veces). Se solubilizaron las células agregando 100 µL de SDS al 1%. La placa se leyó en un lector de ELISA a una longitud de onda de 540nm.

Se determinó la CI_{50} (Concentración inhibitoria del 50% de la población) mediante un análisis de Regresión no lineal exponencial.

Caracterización química

Se realizó una caracterización química por medio de un análisis con una 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 200-400 nm. En la cual se inyectó 30 µL del extracto.

Tratamiento estadístico.

Los datos se graficaron y se realizaron análisis de regresión que permitieron determinar la mejor relación funcional entre las variables y también se realizó el análisis de correlación, para conocer el grado de asociación de las mismas y que se obtuviera con precisión el valor de una de ellas.

RESULTADOS

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

Se realizó mediante la técnica de viabilidad celular por cristal violeta, donde la curva se obtuvo al graficar diferentes números de trofozoítos contra sus absorbancias (gráfico 1) y fue empleada para interpolar los datos obtenidos de las absorbancias de las interacciones del extracto metanólico de *C. procera* sobre *N. fowleri*.

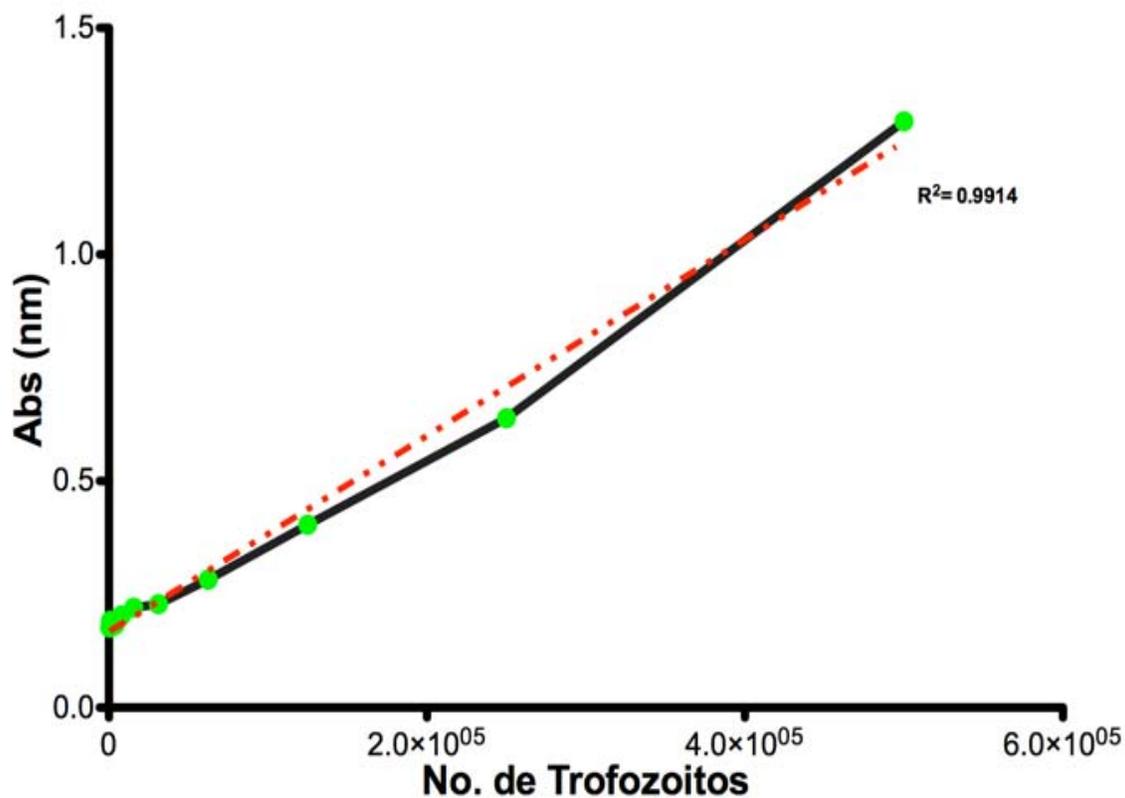


Gráfico 1. Curva patrón de viabilidad celular, datos obtenidos en tres repeticiones.

Efecto *in vitro* del extracto metanólico de *C. procera* sobre *N. fowleri*

La interacción del extracto metanólico de *C. procera* sobre *N. fowleri* se realizó mediante la Técnica de Viabilidad por Cristal Violeta donde la CL_{50} se obtuvo interpolando las absorbancias en la curva patrón. Se observó que el extracto tuvo un efecto dosis dependiente sobre *N. fowleri*, en el gráfico 2 se muestra la CL_{50} del extracto que fue de 1.103 mg/mL.

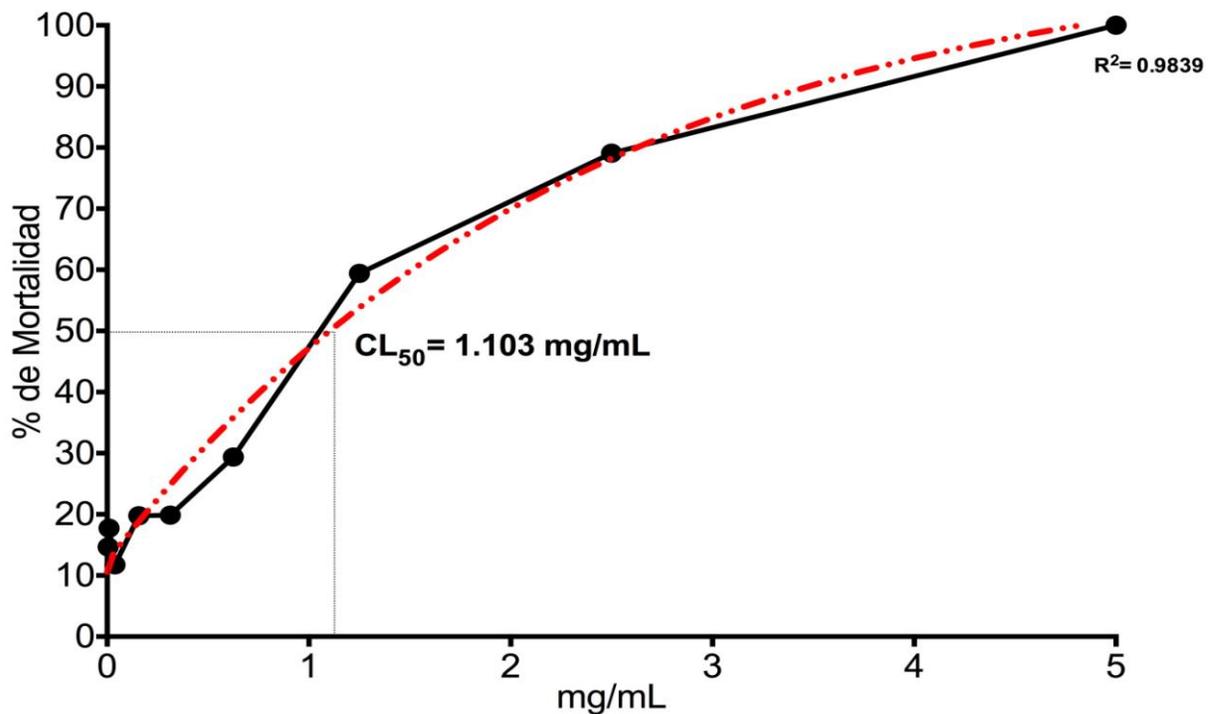


Gráfico 2. Interacción del extracto metanólico de *C. procera* sobre *N. fowleri*, donde la concentración de la CL_{50} es de 1.103 mg/mL.

Curva de Anfotericina B

Se realizó una curva para determinar el efecto de la AMB sobre trofozoítos de *N. fowleri*, donde se obtuvo una CL_{50} de $0.113 \mu\text{g/mL}$, y comparando la CL_{50} obtenida del ensayo del extracto metanólico de *C. procera* sobre *N. fowleri* que fue de 1.103 mg/mL podemos decir que *N. fowleri* es más susceptible a la AMB que al extracto metanólico de *C. procera* (grafico 3).

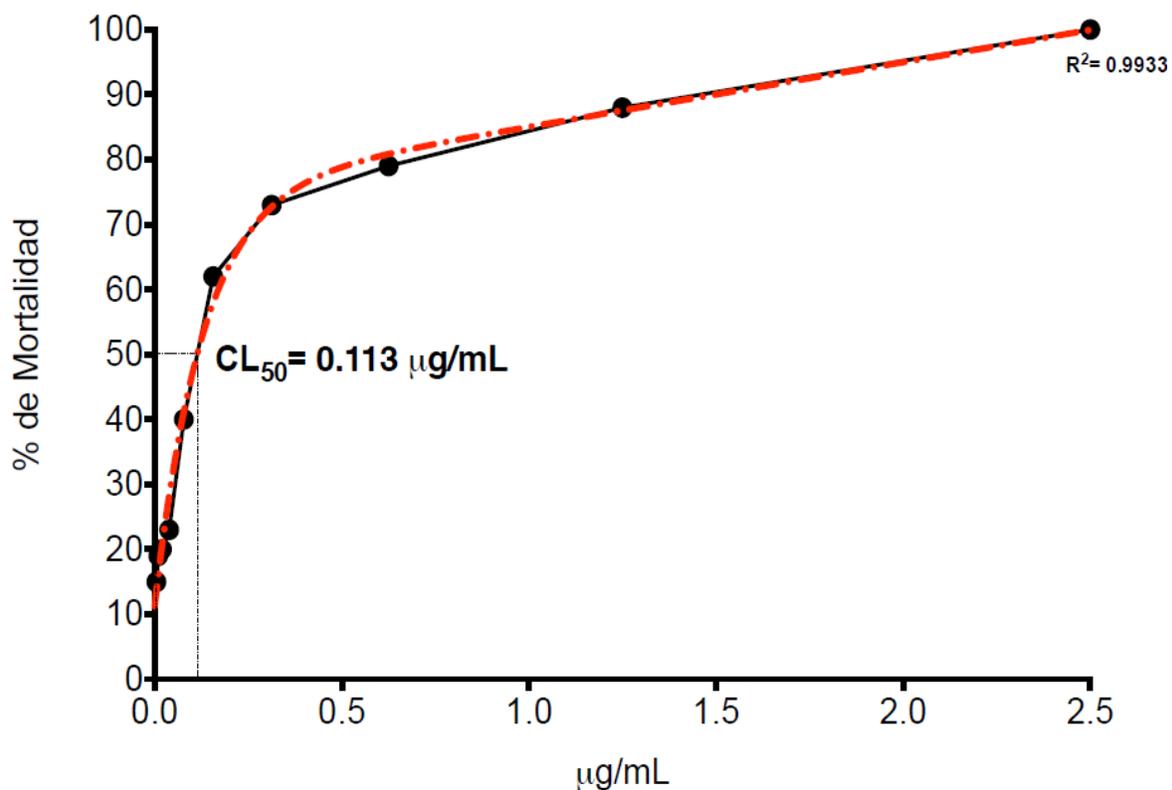


Gráfico 3. Curva patrón de la Anfotericina.

Citotoxicidad celular

Una vez que se demostró que el extracto presentó un efecto contra *N. fowleri*, se consideró importante evaluar si el extracto es citotóxico. Para esta técnica se empleó la línea celular CaSki (Células de Cáncer Cervicouterino Humano) donde se determinó la CI_{50} (Concentración Inhibitoria del 50% de la población) mediante la técnica de viabilidad celular por Cristal Violeta, en el gráfico 4 se observa que la CI_{50} fue de 0.66 mg/mL, y tomando en cuenta el criterio del Instituto Nacional de Cáncer (NCI) que menciona que para que un extracto se considere citotóxico la concentración debe ser igual o menor a 20 μ g/mL. Por lo tanto lo anterior indica que el extracto de *C. procera* no es citotóxico debido a que superó por mucho la concentración de referencia.

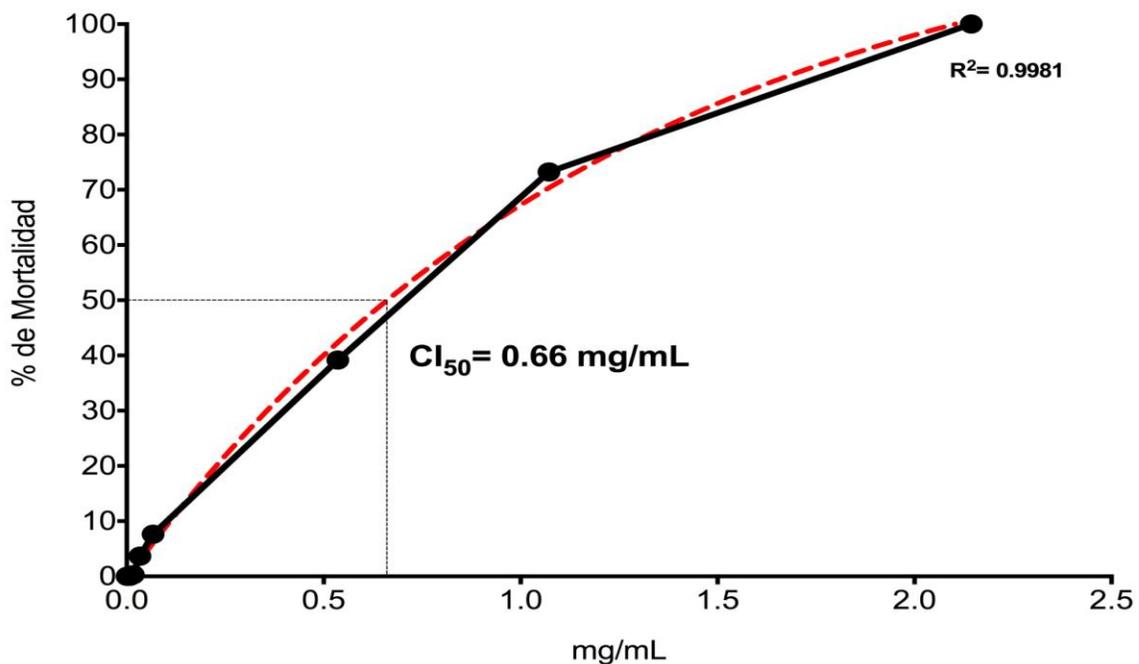


Gráfico 4. Interacción del extracto metanólico de *C. procera* sobre células CaSki, donde se observa que la CI_{50} es de 0.66 mg/mL.

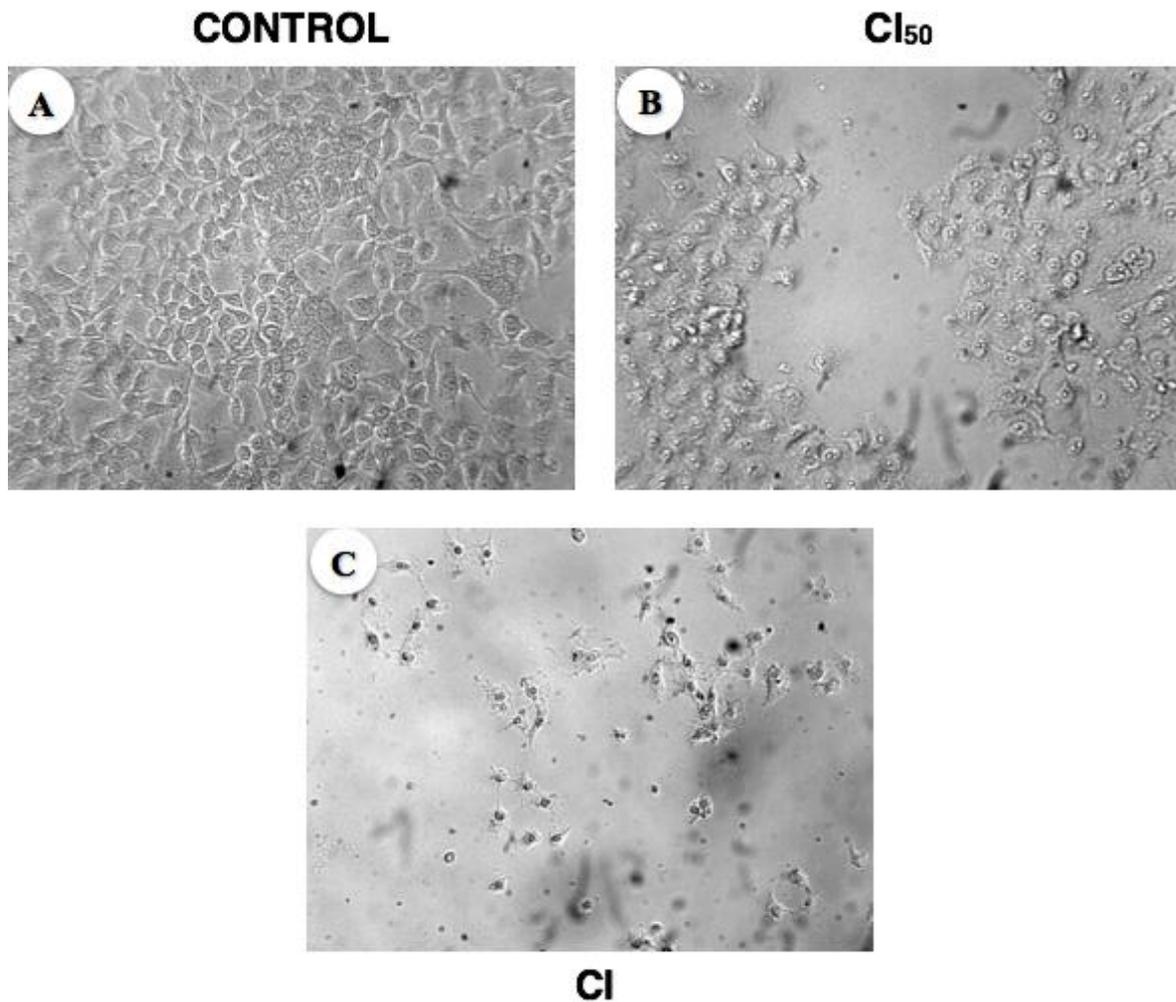


Figura 4. Fotografías tomadas con el microscopio óptico, y observadas a 40x. **A)** Se observa una monocapa de células CaSki adheridas al pozo. **B)** Se observa el pozo donde la CI_{50} es de 0.66 mg/mL y se presenta el 50% mortalidad de células CaSki. **C)** Pozo con la CI, es decir donde se presenta el 100% de mortalidad y a simple vista se observan restos de células que se despegaron de la placa.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del extracto de *Cyrtocarpa procera*.

Mediante esa técnica se determinaron algunos de los grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto, en el gráfico 5 se observa el cromatograma obtenido. El pico que se observa con un tiempo de retención de 2.449 min se identificó como catequina, ya que se comparó con el espectro de luz UV y tiempo de retención del estándar y coincide con un 98.72% de similitud.

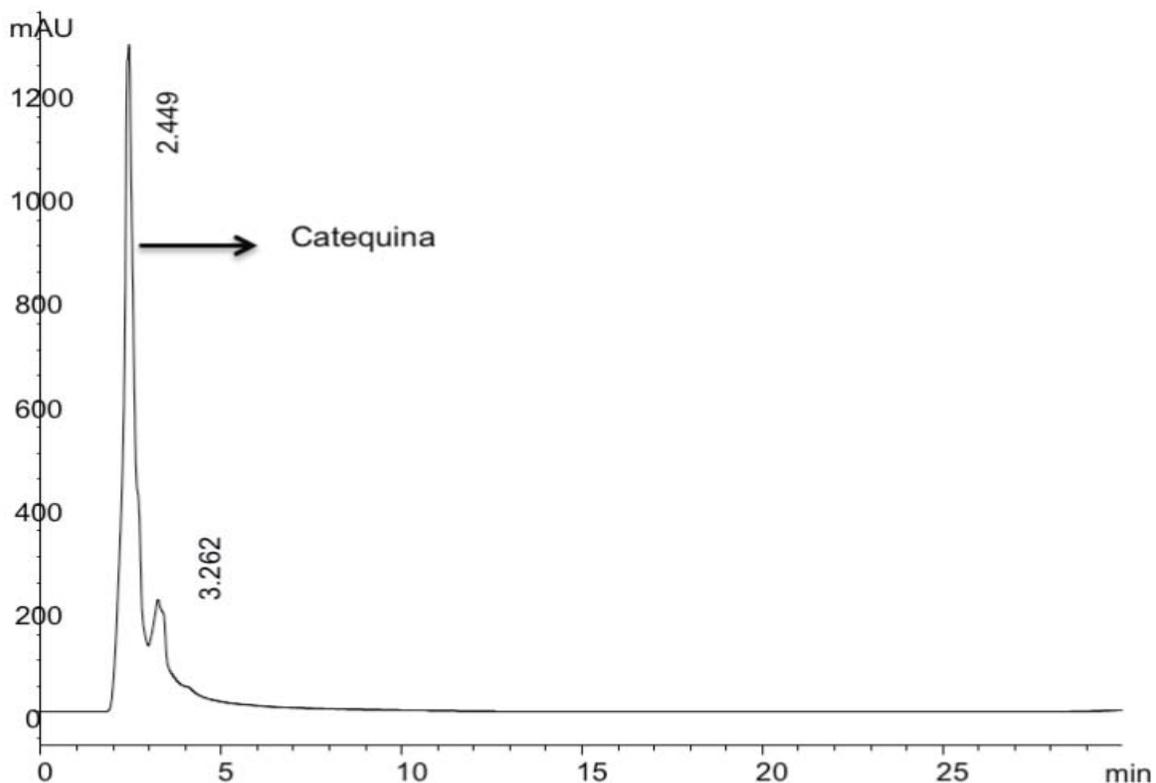


Gráfico 5. Cromatograma del extracto metanólico de *C. procera*

DISCUSIÓN

Con base en los resultados se puede afirmar que en este trabajo se presentan por primera vez evidencias de que el extracto de *C. procera* tiene actividad contra *N. fowleri*. Es importante mencionar que son muy pocos trabajos sobre *C. procera* y este es el primero que reporta su actividad contra amibas de vida libre.

El extracto presentó un efecto amebicida contra *N. fowleri*, lo que se puede atribuir a la presencia de fenilpropanoides como flavonoides, flavonoles, 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).

Los flavonoides son los compuestos polifenólicos mejor estudiados que se caracterizan por tener una estructura de tres anillos formada de dos centros aromáticos y un heterociclo central oxigenado. Dentro de los flavonoides se incluyen a las flavonas, flavanonas, catequinas y antocianinas (Drago *et al.*, 2006).

Se conocen más de 8 000 compuestos fenólicos los cuales son formados por las vías del ácido shikímico o vía del malonato/acetato. La función de los flavonoides es atraer polinizadores, proteger por ejemplo de patógenos fúngicos y de la radiación UV (Leyva *et al.*, 2011; Cushnie y Lamb, 2005).

Se ha reportado que los flavonoides poseen propiedades útiles como actividad antimicrobiana, actividad antioxidante, actividad anti-inflamatoria, actividad estrogénica y actividad antitumoral citotóxica (Cushnie y Lamb, 2005).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Belosfky *et al* en 2006 donde demostraron el efecto de isoflavonas presentes en *Dalea aurea* sobre *N. fowleri*, sin embargo su estudio solo consistió en observar como afectaba el crecimiento en el cultivo de la amiba.

Se ha comprobado el efecto de extractos metanólicos ricos en fenilpropanoides de diversas plantas mexicanas contra trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* (Calzada *et al.*, 2005 y 2007) así como también ha sido reportado el efecto *in vitro* antiplasmódico, antileishmanial y antitripanosomal de diversos flavonoides como catecol, catequinas, flavanos y flavanoles (Ramírez *et al.*, 2010), así mismo se ha reportado el efecto de flavonoides sobre *Candida albicans* y *Candida krusei* (Deliorman *et al.*, 2010; Peralta *et al.*, 2012). Por otro lado también se comprobó el efecto *in vivo* de tres flavonoides sobre *Giardia lamblia* (Barbosa *et al.*, 2007).

En el presente trabajo se confirma lo señalado por Martínez en 2009 donde reportó que el extracto metanólico de *C. procera* presentó actividad antibacteriana principalmente en cepas gram positivas y actividad antifúngica sobre el hongo dermatofito (*Trichophyton mentagrophytes*), estos resultados coinciden con Orozco (2010), lo cual es un antecedente importante para combatir a *N. fowleri* debido a que la AMB es un antifúngico y es el único fármaco efectivo contra *N. fowleri*.

La catequina es un flavonoide encontrado en el extracto de *C. procera*, este compuesto es de gran interés como compuesto farmacéutico debido a su amplia gama de usos terapéuticos como antioxidantes, así como su actividad antimicótica y antibacteriana. La catequina y sus derivados son compuestos muy comunes presentes en diferentes plantas, estos tienen la característica de ser absorbidos fácilmente por el ser humano (Martínez, 2005) entre sus efectos se ha reportado actividad *in vitro* contra parásitos de la sangre como *Trypanosoma cruzi* en dos diferentes estadios de su desarrollo (Ramírez *et al.*, 2010), así como el efecto antifúngico de las catequinas sobre *C. albicans* (Navarro *et al.*, 2006; Hirasawa y Takada, 2004). También se ha comprobado que las catequinas inducen fugas en las membranas lipídicas causando daño, lo cual afecta su metabolismo y eso es crítico para la supervivencia de cualquier célula (Tamba *et al.*, 2007). Por otro lado Ikigai *et al* en 1993 demuestra que las catequinas causan fuga rápida de pequeñas moléculas atrapadas en el espacio intraliposómico, debido a que las catequinas interactúan con la membrana e interrumpen la función de la barrera.

Con base a estos resultados se demuestra que el extracto metanólico de *C. procera* tiene actividad amebicida contra *N. fowleri*, sin embargo era importante evaluar si el extracto es tóxico 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 la acompañan.

Se determinó para el extracto de *C. procera* una CI_{50} = 0.66 mg/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 ente 48 y 72 horas, debe ser máximo de 20 μ g/mL o menos y para un compuesto puro es de 4 μ g/mL o menos (Geran *et al.*, 1972; Swanson y Pezzuto, 1990; Sri *et al.*, 2009), lo anterior demuestra que el extracto de *C. procera* no es citotóxico.

Sobre la toxicidad, de la familia *Anacardiaceae* se han aislado fenoles tóxicos como catecoles, resorcinoles y biflavonoides, estos compuestos inhiben el crecimiento de algunos hongos patógenos como son *Alternaria* y *Fusarium* (Aguilar- Ortigoza *et al.*, 2003). Por otro lado también se han aislado compuestos como polifenoles, flavonas, triterpenoides en la familia *Anacardiaceae* (Maiga *et al.*, 2006). Con respecto a *C. procera* existe poca información, sin embargo existen dos reportes (Martínez, 2009; Orozco, 2010) que señalan que el extracto obtenido de la corteza es altamente tóxico de acuerdo al ensayo de toxicidad general utilizando *Artemia salina*. Estos datos no concuerdan con nuestros resultados ya que mediante la técnica de viabilidad celular, utilizando células cancerígenas CaSki, y de acuerdo al criterio del CNI, no es citotóxico, esto se puede deber a factores como la resistencia de la línea celular también como lo menciona (Varó *et al.*, 1998) que existen diferencias en la biología y fisiología entre especies y cepas del género *Artemia* y éstas pueden provocar variaciones en las sensibilidades de las distintas formas a los mismos compuestos. Estas observaciones alertan sobre el uso indiscriminado de cualquier fuente de *Artemia* spp., e indican la importancia de reoptimizar el bioensayo general para cada nueva especie y/o cepa usando compuestos de referencia para establecer el grado de sensibilidad de la cepa empleada. También, debe corroborarse en cada caso la correspondencia entre la actividad frente a este organismo y la actividad plaguicida de interés, pues existen autores que sugieren que la ausencia y/o presencia en *A. salina* de estructuras desarrolladas como receptores puede generar la posibilidad de obtener falsos resultados (Serrano *et al.*, 1996). Sin embargo estos

estudios se realizaron con los compuestos aislados y en el presente trabajo se realizó con un extracto metanólico crudo que contenía fenilpropanoides y no solo catequina.

Cabe aclarar que todos estos resultados provienen de experimentos *in vitro* por lo que es necesario realizar pruebas *in vivo* para comprender mejor la acción del extracto y por otra parte realizar un fraccionamiento del mismo para conocer su composición química y tratar de elucidar los mecanismos moleculares de los compuestos no sólo sobre las células cancerígenas sino también sobre los trofozoítos de *N. fowleri*. Hacen falta más estudios sobre las propiedades biológicas del extracto metanólico de *C. procera* para poder proponer diversos usos potenciales.

CONCLUSIONES

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

- El extracto metanólico de *C. procera* presentó efecto amebicida sobre *N. fowleri*.
- El extracto metanólico de *C. procera* no presentó efecto citotóxico.
- Los compuestos principales presentes en el extracto de *C. procera* pertenecen al grupo de los fenilpropanoides, entre ellos catequinas.

Referencias

1. Aguilar-Ortigoza C.J., Sosa V., Aguilar-Ortigoza M. 2003. Toxic phenols in various Anacardiaceae species. *Economic Botany*. 57 (3): 354-364.
2. Ankli A., Heinrich M., Bork L., Wolfram P. 2002. Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology* 79:43-52.
3. Argueta V.A., y Cano A.J. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista, México. 1193.
4. Ávalos G.A., Pérez-Urria C. E., 2009. Metabolismo secundario de las plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 3:119-145.
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. Belosfky C., Carreno R., Groswick S., Shannon M., John D.T., 2006. Activity of isoflavans of *Dalea aurea* (Fabaceae) against the opportunistic ameba *Naegleria fowleri*. *Plant Med.* 72:383-386.
7. Beltrán de E. M y Uyema T. N. 1997. Amibas de vida libre. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 1(14):98-117
8. 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.
9. 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.

10. Canales M. M. M. 2005. Base Fitoquímica del Uso Tradicional de plantas para el tratamiento de enfermedades de posible origen bacteriano en San Rafael Coxcatlán, Puebla. Tesis de Doctorado, FES-Iztacala. UNAM. México. DF. 145.
11. Canales M., Hernández T., Caballero J., Romo de Vivar., Durán., Lira R. 2005 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.
12. Cartaya O., Reynaldo I. 2001. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*, 2(22): 5-14.
13. Céspedes C., Ávila G., Martínez A., Serrato B., Calderón-Mugica J., Salgado-Garciglia R. 2006. Antifungal and Antibacterial Activities of Mexican Tarragon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(10):3521-3527.
14. Cushnie T., Lamb A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26:343-356.
15. De Jonckheere J.F. 1977. Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and non pathogenic *Naegleria fowleri* isolates. *Applied and environmental Microbiology*. 33:751-757.
16. De Jonckheere J.F. 1979. Pathogenic free-living amoebae in swimming pools: survey in Belgium. *Ann Microbiology. Institute Pasteur* 130:205-225.
17. Deliorman O. D., Özcelik B., Özgen S., Ergun F. 2010. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research* 165:496-504.
18. Drago S.M.E, López L.M., Sainz E.T.R. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37(4): 58-68.

19. Fenchel T. 1987. Ecology of protozoa: The Biology of free-living Phagotrophic Protists. Springer Verlag, Wisconsin. 197.
20. Frei, B., M. Baltisberger, O. Sticher y M. Heinrich. 1998. Medical ethnobotany of the Zapotecs of the Isthmus-Sierra (Oaxaca, México): Documentation and assessment of indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology* 62:149-165.
21. Gallegos N.E.M., Sánchez R. M. R., Calderón V. A., Lugo V. A. 2014. Biodiversity of free living amoebid protists in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85:10-25.
22. Geran R. I., Greenberg N. H., McDonald M. M., Schumacher A. M., Abbott B.J. 1972. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumor and other biological systems. *Cancer Chemother. Rep.* 3:17-19.
23. Griffin J.L. 1983. The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: Isolations competitors, ecologic interactions and the flagellate-empty habitat hypothesis *J. Protozoology.* 30:403-411.
24. Gutiérrez Y. Free-Living Amebae. *Diagnostic Pathology of Parasitic Infections with Clinical Correlations.* Ed. Oxford University Press. New York. 114-42.
25. Heinrich M., Ankli A., Frei B y Weimann C. 1998. Medicinal plants in México: healers consensus and cultural importance. *Social Science and Medicine* 47:1859-1871.
26. Hirasawa M., y Takada K. 2004. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* 53:225-229.
27. Ikigai H., Nakae T., Hara Y. 1993. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et biophysica Acta* 1147:132-136.
28. John D.T y Howard, M.J. 1993. Opportunistically pathogenic free-living amebae. En: Kreier, J.P & Baker, J.R (eds.) *Parasitic protozoa.* Academic Press. San Diego California, U.S.A. 283:143-151.

29. Kuklinski C. 2000. Farmacognosia. Editorial Omega. Barcelona, España.
30. Leyva E., Navarro-Tovar G., Loredó-Carrillo S. E., Santos D. M. S. 2011. Biosíntesis y actividad biológica de fitoestrógenos y fotoesteroides. Boletín Sociedad Química de México, 5(2):35-43.
31. Maiga A., Malterud K. E., Diallo D., Paulsen B. S. 2006. Antioxidant and 15-lipoxygenase inhibitory activities of the Malian medicinal plants *Diospyros abyssinica* (Hiern) F. White (Ebenaceae), *Lannea velutina* A. Rich (Anacardiaceae) and *Crossopteryx febrifuga*. Journal of Ethnopharmacology 8:132-137.
32. Martínez M. A. Flavonoides. 2005. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia.
33. Marciano-Cabral F. 1988. Biology of *Naegleria spp.* Microbiological Rev. 52:114-119.
34. Martínez A.J. 1985. Free-living amebas: Natural history prevention, diagnosis, pathology and treatment of disease. CRC Press, Boca Ratón, Florida, U.S.A 156.
35. Martínez E.K.S. 2009. Evaluación de la actividad antimicrobiana de *Cyrtocpra procera* KUNTH (CHUPANDILLA). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM, México.
36. Martínez J.A., y Visvesvara G. 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas, Brain Pathology. 7:583-598.
37. Navarro M. M. D., García C. F., Rodríguez L. J. N. 2006. Tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits ergosterol synthesis by disturbing folic acid metabolism in *Candida albicans*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 57:1083-1092.

38. Newman, D. J., Cragg, G. M. 2007. Natural Products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*. 70:461-477.
39. Ojewole, J. A. 2005. Antiinflammatory, analgesic and hypoglycemic effects of *Mangifera indica* Linn. (Anacardiaceae) stem-bark aqueous extract. *Methods and findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27(8):547-549.
40. Ortiz V. A. I. 2009. Bioactividad del extracto etanólico de *Tagetes lucida* Cav. Sobre diversos hongos y bacterias fitopatógenos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM, México.
41. Orozco M.J., 2010. Estudio comparativo de algunas actividades biológicas de las cortezas de *Ceiba aesculifolia* subsp. *Parvifolia*, *Juliania adstringens* y *Cyrtocarpa procera* de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM, México.
42. Page F.C. 1988. A new Key to Freshwater and soil Gymnamoebae. *Freshwater Biological Association Scientific Publication*, Londres. 122 pp.
43. Peralta R. M y Ayala O. J. 2009. Amibas de vida libre en seres humanos. *Revista Salud Uninorte*. Salud, Barranquilla 25(2):62-77.
44. 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 6G Efflux and Reverses Fluconazole-Resistance in *Candida albicans*. *Planta Médica UNAM*, 78:981-987.
45. Pichersky E., Gang D. R. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in plant science perspectives* 5(10):439-445.

46. Pringle H.L, Bradley S.G y Harris I.S. 1979. Susceptibility of *Naegleria fowleri* to Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16:674-682.
47. Ramírez M. M. E., Mendoza A. J. A., Arreola R. H., Ordaz P. C., 2010. Flavonoides con actividad antiprotozoaria. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 41(1):6-21.
48. Rates S.M. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 39:603-613.
49. Rivera F., Sánchez M.R., Lugo A., Ramírez P. y Paulín A. 1987 Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *J. Environ. Res.* 42:149-158.
50. 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.
51. Rodríguez S., Rivera F., Bonilla P., Ramírez E., Gallegos E., Calderón A., Ortiz R. y Hernández D. 1993. Amoebological study of the atmosphere of San Luis Potosí, SLP. México. *J. Exp. Anal. Environ. Epidemiol.* 3:229-238.
52. Rodríguez-Pérez E. 1984. Meningoencefalitis por *Naegleria fowleri*. Informe de un caso. *Infectología.* 4:263-267.
53. Rondanelli E.G. 1987. Infectious Disensen. Amphizoic amoebae human pathology. Piccin Nuova Librería, Padua, Italia. 279.
54. Rzedowski J. 1987. Atlas cultural de México. Ed. Secretaría de Educación Pública. Instituto Nacional de Antropología e Historia. Dpo. Editorial Planeta. México. 14-16.
55. Salisbury R. 1992. Plant physiology. Ed. Hardcover. 4a ed. USA. 119-121.

56. Serrano C., Ortega T., Villar A. 1996. Biological activity of traditional medicines from Spain and Guatemala. *Artemia salina* Bioassays: A revision. *Phytotherapy Res.* 10:118-120.
57. Schuster F.L., 1979. Small amebas and ameboflagellates. En: Levandowsky M. y Hunter SH (eds) *Biochemistry and physiology of protozoa.* 1(2):215-221.
58. Schuster F.L, Visvesvara G.S. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International journal for parasitology.* 34:1001-1027.
59. Schuster F.L, 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*. *J. eucaryot Microbiology*, 53(29):121-126.
60. Sri N. A. M., Sim K. S., Norhanom A. W., Hashim Y. 2009. Cytotoxic components of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) leaves. *Molecules.* 14:1713-1724.
61. Swanson S.M., Pezzuto J.M., 1990. Bioscreening technique for cytotoxicity potential and ability to inhibit macromolecule biosynthesis. In Thompson EB, Ed VCH, editors. *Drug bioscreening: drug evaluation techniques in pharmacology.* New York, 273-297.
62. Taiz L., y Zeiger E. 2006. *Plant Physiology.* 4th edition. Sinauer Associates, Inc.
63. Tamba Y., Ohba S., Kubota M., Yoshioka H., Yoshioka H., Yamazaki M. 2007. Method reveals interaction of tea catechin (-) - epigallocatechin gallate with lipid membranes. *Biophysical Journal.* 92:3178- 3194.
64. Tyndall R.L, Ironside K.S., 1989. Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. *Appl. Environ. Microbiology.* 55:722-728.

65. Vargas J., Gómez A., Vazquez J., Licea L., De Jonckheere J., 2004. Successful treatment of Naegleria meningoencephalitis by using intravenous Amphotericin B. Fluconazole and Ramfampicic. Archives of Medical research 36:83-86.
66. Varó I., Serrano R., Navarro J.C., Lopez F.J., Amat F. Acute Lethal Toxicity of the Organophosphorus Pesticide Chlorpyrifos to Different Species and Strains of Artemia. Bull Environ Contam Toxicol. 61:778-785.
67. Visvesvara G.S., Schuster FL. y Martínez J.1993. *Balamuthia mandrillaris*, N.G., N Sp., Agent of amebic meningoencephalitis in humans and others animals. J. Euk. Microbiology, 40:504-5112.
68. Visvesvara G.S., Moura H., Schuster F.L. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae-. *Acanthamoeba spp.*, *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. FEMS immunology and medical microbiology. 50:1-26.
69. Wellings F.M., Amuso S.L. y Lewis A.L., Farmelo MJ. y Oiskowics CL. 1979. Pathogenic Naegleria, Distribution in nature enviromental protection agency, Cincinnati, EPA/600-1-79-018.