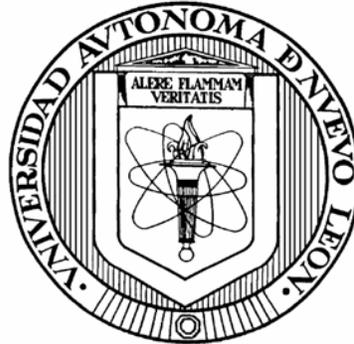


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**“RNA total de trofozoítos y quistes de *Entamoeba histolytica*
cultivados en presencia de extractos metanólicos de plantas con
potencial amebicida”**

Por:

Q.B.P. JORGE ARMANDO GARZA SÁENZ

Como requisito parcial para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

con Acentuación en Microbiología



“RNA total de trofozoítos y quistes de *Entamoeba histolytica* cultivados en presencia de extractos metanólicos de plantas con potencial amebicida”

Por:

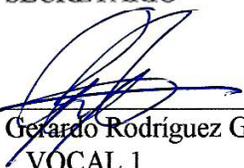
Q.B.P. JORGE ARMANDO GARZA SÁENZ

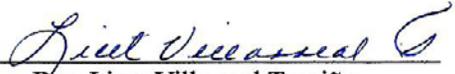
Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

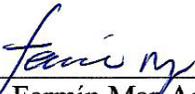
COMISIÓN DE TESIS


Dra. María Porfiria Barrón González
DIRECTOR


Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta
SECRETARIO


Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza
VOCAL 1


Dra. Licet Villarreal Treviño
VOCAL 2


Dr. Fermín Mar Aguilar
VOCAL 3

Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L.

Enero de 2014

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo se realizó en las instalaciones y con los equipos del Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer sinceramente todo el apoyo que he recibido de todas las personas involucradas de alguna manera en la realización y culminación de este trabajo de tesis de Maestría. Agradezco en primer lugar la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial del Laboratorio de Biología Celular por permitirme el uso de las instalaciones, equipo y reactivos necesarios para la ejecución del trabajo experimental realizado tan arduamente durante 2 años. Además agradezco el apoyo económico que el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) ha proporcionado tanto al proyecto como a un servidor.

Agradezco el apoyo y guía de la Dra. María Porfiria Barrón González como asesora del proceso experimental y científico que se llevó a cabo durante la elaboración de esta tesis, también expreso mi agradecimiento a la Dra. María Eufemia Morales Rubio, al Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza y a la Dra. Ruth Amelia Garza Padrón por la identificación, el asesoramiento del manejo y facilitación de las especies vegetales trabajadas en esta tesis, así como el equipo necesario para las pruebas fitoquímicas de los extractos de plantas y el ensayo de letalidad de *Artemia salina*, que también fue proporcionada por ellos. Le brindo mi agradecimiento al Dr. Javier Vargas Villarreal del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, por la donación del reactivo de extracto de hígado y páncreas. El apoyo del Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores y de la QBP. Enriqueta Monreal Cuevas, así como de la QBP. Marcela Martínez Valenzuela por facilitarme las instalaciones y reactivos para la extracción y cuantificación de RNA a partir de trofozoítos como de estructuras semejantes a quistes.

Agradezco a mis padres y a todos mis seres queridos por apoyarme moralmente en el transcurso de mis estudios, del trabajo experimental y en la elaboración de esta tesis.

¡Muchas Gracias a Todos!

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso,
Fuente de Vida y Dios del Conocimiento.

A mis padres a quienes quiero mucho y a toda mi familia

A quienes con un granito de arena ayudan a que en el mundo exista un poquito más de luz que de oscuridad.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIA	V
LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
NOMENCLATURA	XI
RESUMEN	1
1.1 ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
5. ANTECEDENTES	5
5.1 <i>Entamoeba histolytica</i>	5
5.1.1 Generalidades.....	5
5.1.2 Epidemiología.....	6
5.1.3 Ciclo de vida.....	7
5.1.4 Proceso de enquistamiento de <i>E. histolytica</i>	10
5.1.5 Vías de transmisión.....	14
5.1.6 Patogénesis.....	15
5.1.7 Diagnóstico.....	20
5.1.8 Genoma.....	22
5.1.9 Elementos extracromosomales.....	23
5.1.10 Generalidades de los ácidos ribonucleicos.....	24
5.1.11 Transcripción del RNA.....	27
5.1.12 Cuerpos cromatoidales.....	33
5.1.13 Aplicaciones del estudio del RNA en especies de Entamoeba.....	34
5.2 HERBOLARIA.....	36
5.2.1 Generalidades.....	36
5.2.2 Compuestos químicos identificados en plantas.....	37
5.2.3 Especies vegetales.....	43
5.3 <i>Artemia salina</i>	49
3. HIPÓTESIS	51
4. OBJETIVOS.....	52

4.1 OBJETIVO GENERAL.....	52
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
6. MATERIAL Y MÉTODOS	54
6.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	54
6.2 <i>Entamoeba histolytica</i>	55
6.3. EXTRACTOS METANÓLICOS A PARTIR DEL MATERIAL VEGETAL.....	57
6.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO A PARTIR DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS.....	59
6.5 PRUEBA DE TOXICIDAD CON NAUPLIOS DE <i>A. salina</i>	62
6.6 BIOENSAYOS.....	63
6.6.1 Evaluación de la actividad biológica del extracto metanólico de las especies vegetales sobre el crecimiento axénico <i>in vitro</i> de <i>E. histolytica</i>	63
6.6.3 Evaluación de la actividad biológica del extracto metanólico de las especies vegetales sobre la inducción de ESQ <i>in vitro</i> de <i>E. histolytica</i>	64
6.6.4 Determinación del efecto biológico de los extractos metanólicos del material vegetal sobre el RNA total de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	64
6.6.5 Determinación del efecto biológico de los extractos metanólicos del material vegetal sobre el RNA total de ESQ de <i>E. histolytica</i>	65
6.6.6. Medición de la concentración de RNA total obtenido de trofozoítos y ESQ de <i>E. histolytica</i>	66
6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	67
6.8 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	68
7. RESULTADOS.....	69
7.1 <i>Entamoeba histolytica</i>	69
7.1.1 Cinética de crecimiento.....	69
7.1.2 Cinética de enquistamiento de <i>E. histolytica</i> axénico <i>in vitro</i>	70
7.2. MATERIAL VEGETAL.....	71
7.2.1. Determinación del perfil fitoquímico de los extractos metanólicos.....	71
7.3 BIOENSAYO DE LETALIDAD EN <i>A. salina</i>	73
7.4 BIOENSAYOS.....	76
7.4.1 Actividad biológica de los extractos metanólicos de <i>C. texana</i> , <i>F. splendens</i> , <i>P. americana</i> y <i>A. retusus</i> sobre el	

crecimiento de <i>E. histolytica</i>	76
7.4.2 Determinación de la IC ₅₀ de los extractos metanólicos de <i>C. texana</i> , <i>P. americana</i> , <i>A. retusus</i> y <i>F. splendens</i> sobre <i>E. histolytica</i>	76
7.4.3 Ensayo de inhibición de la inducción de ESQ de <i>E. histolytica</i>	79
7.5 CUANTIFICACIÓN DE RNA TOTAL EN TROFOZOÍTOS Y ESQ DE <i>E. histolytica</i>	82
8. DISCUSIÓN	85
8.1 IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS FITOQUÍMICOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE LAS ESPECIES VEGETALES.....	85
8.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE LAS ESPECIES VEGETALES SOBRE <i>A. salina</i>	89
8.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE LAS ESPECIES VEGETALES SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>E. histolytica</i>	93
8.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE LAS ESPECIES VEGETALES SOBRE EL PROCESO DE FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS SEMEJANTES A QUISTES(ESQ) DE <i>E. histolytica</i>	96
8.5 CUANTIFICACIÓN DE RNA TOTAL EN TROFOZOÍTOS Y ESQ DE <i>E. histolytica</i> EN PRESENCIA DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE ESPECIES VEGETALES.....	98
9. CONCLUSIONES	103
10. PERSPECTIVAS.....	105
11. LITERATURA CITADA	106
11.1 ARTÍCULOS DE REVISTAS CIENTÍFICA.....	106
11.2 CONGRESOS.....	119
11.3 DOCUMENTOS ELECTRÓNICOS EN LA WEB.....	119
11.4 LIBROS.....	121
11.5 TESIS.....	122

LISTA DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Pruebas de tamizaje fitoquímico.....	59
2	Comparación de grupos fitoquímicos presentes entre los extractos metanólicos.....	72
3	Porcentaje de Mortalidad y Dosis Letal Media de los Extractos Metanólicos sobre <i>A. salina</i>	74
4	Comparación de la actividad biológica de los extractos metanólicos de <i>C. texana</i> , <i>F. splendens</i> , <i>P. americana</i> y <i>A. retusus</i> sobre el crecimiento de <i>E. histolytica</i>	77
5	Actividad biológica del proceso de enquistamiento de los extractos metanólicos sobre <i>E. histolytica</i>	80
6	RNA total sobre <i>E. histolytica</i> en presencia de los extractos metanólicos de las especies vegetales.....	83
7	Recopilación de los efectos biológicos de los extractos vegetales sobre el crecimiento, formación de ESQ, toxicidad y determinación de la concentración de RNA total sobre <i>E. histolytica</i>	84

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Cinética de crecimiento de <i>E. histolytica</i>	69
2	Cinética de formación de estructuras semejantes a quistes de <i>E. histolytica</i>	70
3	Dosis Letal Media de los extractos metanólicos sobre <i>A. salina</i>	75
4	Concentración inhibitoria media de los extractos metanólicos sobre <i>E. histolytica</i>	78
5	Efecto inhibitorio del proceso de enquistamiento de <i>E. histolytica</i> por parte de los extractos metanólicos.....	81
6	Concentración de RNA total en trofozoítos y quistes en presencia de los extractos metanólicos.....	83

NOMENCLATURA

Símbolo	Significado
DNA	--- Ácido desoxirribonucléico
RNA	--- Ácido Ribonucléico
H ₂ SO ₄	--- Ácido sulfúrico
cDNA	--- Cadena complementaria de ácido desoxirribonucléico
K ₂ Cr ₂ O ₇	--- Dicromato de Potasio
DEPC	--- Dietilpirocarbonato
CO ₂	--- Dióxido de Carbono
IC ₅₀	--- Concentración inhibitoria media
ESQ	--- Estructuras semejantes a quistes
EMCTH	--- Extracto metanólico de hoja de <i>C. texana</i>
EMARR	--- Extracto metanólico de raíz <i>A. retusus</i>
EMCTR	--- Extracto metanólico de raíz de <i>C. texana</i>
EMPACS	--- Extracto metanólico de semilla de <i>P. americana</i> var Criollo
EMPAHS	--- Extracto metanólico de semilla de <i>P. americana</i> var. Hass
EMART	--- Extracto metanólico de tallo <i>A. retusus</i>
EMFST	--- Extracto metanólico de tallo <i>F. splendens</i>
DL ₅₀	--- Dosis letal media
°C	--- Grados Celsius
g	--- Gramos
h	--- Hora
µg/mL	--- Microgramo por mililitro
µg	--- Microgramos
µL	--- Microlitros
µM	--- Micromolar
mL	--- Mililitros
mm	--- Milímetros
mM	--- Milimolar
min	--- Minutos
M	--- Molaridad
ng	--- Nanogramos
ng/mL	--- Nanogramos por mililitro
N	--- Normalidad
No.	--- Número
KMnO ₄	--- Permanganato de Potasio
rpm	--- Revoluciones por minutos
seg	--- Segundos

RESUMEN

Entamoeba histolytica afecta a por lo menos 500 millones de personas alrededor del mundo. Este parásito posee dos estadios principales en su ciclo de vida: el trofozoíto y el quiste. En este trabajo se plantea el uso de extractos metanólicos de *P. americana* var Hass y Criollo, *A. retusus*, *F. splendens* y *C. texana* sobre el crecimiento y enquistamiento del parásito *E. histolytica*, y además observar el comportamiento de la concentración de RNA total en presencia de estos extractos vegetales. Para alcanzar este objetivo se realizaron los extractos metanólicos de las especies vegetales anteriormente mencionadas, luego dichos extractos se sometieron a un ensayo de toxicidad sobre el modelo *A. salina*, posteriormente se realizó el bioensayo de actividad biológica sobre el crecimiento del parásito para determinar así la IC_{50} de cada extracto, posteriormente en el proceso de enquistamiento por el método de inducción por dióxido de carbono se utilizó esta dosis para determinar el porcentaje de inhibición de las Estructuras Semejantes a Quistes, mediante la cuantificación en cámara de Neubauer de las estructuras resistentes a tritón X-100 0.15% por 10 min finalmente se realizó la extracción y cuantificación del RNA total mediante el método de TRIZOL tanto de trofozoítos como ESQ utilizando solo los extractos vegetales que presentaron tanto actividad contra el parásito como una menor toxicidad. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: utilizando las pruebas fitoquímicas se observó que los extractos presentaron distintos grupos de compuestos químicos que presentan actividad biológica en algunos microorganismos, tales como cumarinas, saponinas, flavonoides y alcaloides. Todos los extractos presentaron sobre *A. salina* una DL_{50} menor a 1000 ppm, en donde los extractos con mayor toxicidad en este organismo fueron los extractos de hoja (22.46 ± 5.10 ppm), tallo (35.06 ± 5.82 ppm) y raíz (56.52 ± 8.39 ppm) de *C. texana* y de semilla de *P. americana* var. Hass (0.88 ± 0.70 ppm) y Criollo (11.27 ± 1.73 ppm). En cuanto a su actividad contra el parásito los extractos con mayor actividad en el estadio de trofozoíto fueron los extractos de tallo (IC_{50} de 0.0020 ± 0.0001 mg/mL) y raíz (IC_{50} de 0.0080 ± 0.0004 mg/mL) de *A. retusus* y tallo de *F. splendens* (IC_{50} de 0.0060 ± 0.0002 mg/mL); mientras que en el proceso de enquistamiento todos los extractos presentaron cierto grado de inhibición (superior al 30%) sin embargo, los extractos de hoja ($96.2 \pm 2\%$), tallo ($95.3 \pm 4\%$) y raíz ($93.9 \pm 4.4\%$) de *C. texana* tuvieron mayor actividad. Además se observó una disminución de la concentración de RNA total obtenido en los trofozoítos en presencia de los extractos, en donde *C. texana* presentó la menor concentración de este ácido nucleico ($1,930.00 \pm 152.88$ ng/ μ L); y un incremento en el mismo durante el proceso de enquistamiento en donde el extracto de *F. splendens* presentó la mayor concentración del mismo ($2,466.66 \pm 94.86$ ng/ μ L). Se concluye que los extractos de raíz de *C. texana*, tallo de *F. splendens* y tallo de *A. retusus* tuvieron actividad sobre el parásito en ambos estadios con una menor toxicidad y que estos extractos tienen un efecto sobre la concentración de RNA total tanto en trofozoítos como en ESQ.

1.1 ABSTRACT

Entamoeba histolytica is a protozoon that causes disease at least on 500 million people worldwide. The cycle life of this microorganism is divided in two main stages: trophozoite and cyst. This research proposes the quantification of total RNA from *E. histolytica* trophozoites and encystation in the presence of methanol extracts of the plants *P. americana* var Hass and Criollo, *A. retusus*, *F. splendens* and *C. texana*. To achieve this goal the previously mentioned plants were submerged in methanol for 7 days after that the methanol was evaporated until the extracted solids were dry, then it was made a toxicity test on the animal model *A. saline*, after that, the bioassay of biological activity on parasite growth was made to determine the IC₅₀ of each extract, later this dose was applied in the encystation induction by carbon dioxide method to determine the inhibition percent of Cyst-like structures by counting the resistant structures to 0.15% triton X-100 during 10 minutes in Neubauer chamber finally the extraction and quantification of the total RNA using the TRIZOL method was performed in both CLS and trophozoites using only plant extracts that had activity against the parasite and showed less toxicity. The results obtained were as follows: using the phytochemical tests was stated that extracts had groups of chemical compounds which have biological activity in some microorganisms such as coumarins, saponins, flavonoids and alkaloids. All extracts presented an LD₅₀ of less than 1000 ppm on *A. salina*, wherein the extracts with increased toxicity in this organism were leaf extracts (22.46 ± 5.10 ppm), stem (35.06 ± 5.82 ppm) and root (56.52 ± 8.39 ppm) of *C. texana* and *P. americana* var. Hass seed (0.88 ± 0.70 ppm) and Criollo seed (11.27 ± 1.73 ppm). Extracts with high activity in the trophozoite stage were stem (IC₅₀ is 0.0020 ± 0.0001 mg / mL) and root (IC₅₀ is 0.0080 ± 0.0004 mg / mL) of *A. retusus* and *F. splendens* stem (IC₅₀ is 0.0060 ± 0.0002 mg / mL), while in the encystation induction all extracts showed some inhibition percent (greater than 30%) however, leaf (96.2 ± 2%), stem (95.3 ± 4%) and root (93.9 ± 4.4%) extracts of *C. texana* had major activity. Besides a decrease in the concentration of total RNA was showed in the trophozoites in the presence of all extracts, parasites exposed to *C. texana* extracts had the lowest concentration of this nucleic acid (1930.00 ± 152.88 ng / μL), but during encystation induction an increase of total RNA was showed wherein *F. splendens* extract had the highest concentration of this biopolymer (2466.66 ± 94.86 ng / μL). We concluded that root extracts of *C. texana* root, *F. splendens* stem and *A. retusus* root were active on the parasite in both stages with a lower toxicity and had an effect on the concentration of total RNA in both trophozoites and CLS of *E. histolytica*.

2. INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica es uno de los protozoarios parásitos más frecuentes en todo el mundo. Este parásito es agente causal de la disentería amebiana, así como de condiciones de parasitosis extraintestinales como el absceso hepático amebiano (Marshall *et al.*, 1997) y en algunos casos en órganos como cerebro, riñones y genitales. La amebiasis es la parasitosis intestinal más extendida en el mundo, ya que afecta a por lo menos 500 millones de personas, en los países cercanos a los trópicos existe una prevalencia de hasta un 20 por ciento de la población, mientras que en los países europeos y en Estados Unidos existe una prevalencia de por lo menos del 3 por ciento. La amebiasis intestinal ocupó el sexto lugar como causa de morbilidad por casos nuevos en México (SSA, 2011).

El tratamiento de elección para la amibiasis es la droga sistémica metronidazol (Calvopiña, 1997). Sin embargo, este medicamento ha demostrado tener efectos colaterales tales como náusea, diarrea, cuadros de tromboflebitis (Tripathi, 2008) e incluso se ha correlacionado el consumo prolongado de este medicamento con un incremento en la probabilidad de desarrollar algún tipo de cáncer. Esta necesidad nos lleva a la búsqueda de nuevos agentes antiparasitarios inocuos y confiables, despertando interés en la investigación de los componentes naturales de las plantas.

En la actualidad se ha retomado el conocimiento empírico de la utilización de plantas medicinales para curar diferentes padecimientos, buscando tener un mejor entendimiento de los metabolitos que puedan presentar actividad biológica benéfica en el organismo. La extracción de estos metabolitos son una fuente de compuestos activos para la industria farmacológica (Bruneton, 2001). Existen reportes en donde se han analizado los extractos de plantas, tales como *Codiaeum variegatum* y *Cuphea pinetorum*, que demostraron un efecto inhibitor del crecimiento del trofozoíto de esta amiba (Moundipa *et al.*, 2005) y (Calzada, 2005).

La interacción de estas sustancias inhibitorias en *E. histolytica* no es del todo claro. En el caso del metronidazol se ha observado un incremento modesto en el RNA mensajero codificante para las enzimas superóxido dismutasa, peroxirredoxina, ferredoxina, tiorredoxina reductasa y las cadenas pesada y ligera de las lectinas específicas de galactosa/N-acetilgalactosamina (Tazreiter *et al.*, 2008). Sin embargo, no existen estudios de análisis similares con otras sustancias reportadas en la literatura. Por lo que este trabajo tiene como objetivo: Determinar la actividad amebicida de *Castela texana*, *Persea americana*, *Ariocarpus retusus* y *Fouquieria splendens*, sobre el crecimiento y el proceso de enquistamiento de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS y posteriormente la cuantificación de la síntesis de RNA total en aquellos tratamientos con actividad antiamebiano para determinar el efecto sobre el proceso de crecimiento y formación de estructuras semejantes a quistes.

5. ANTECEDENTES

5.1 *Entamoeba histolytica*

5.1.1 Generalidades

Entamoeba histolytica es uno de los protozoarios parásitos patógenos intestinales más frecuentes en todo el mundo, pertenece a la superclase Rhizopoda del subfilo Sarcodina (Culbertson, 1971). Este microorganismo es el agente causal de diversas patologías en el humano, como son la disentería amebiana y del absceso hepático amebiano, y en algunos casos puede parasitar órganos como los riñones, el cerebro y los genitales (Citronberg y Semel, 1995) y (Cornejo Juárez y Avilés-Salas, 2003). Algunos de estos padecimientos fueron estudiados desde la antigüedad; sin embargo era desconocido su agente etiológico, el descubrimiento de este se le atribuye a Frederick Lösch en 1873, en Rusia (Cox, 2002).

Entamoeba histolytica presenta dos fases principales: un trofozoíto, de 10 a 60 μm de diámetro (Culbertson, 1971), con capacidad de alimentarse y replicarse, que en condiciones desfavorables, se transforma en un quiste latente para completar el ciclo biológico, de 10 μm de diámetro (Marshall *et al.*, 1997).

5.1.2 Epidemiología

La amebiasis afecta a por lo menos 500 millones de personas, en los países cercanos a los trópicos existe una prevalencia de hasta un 20% de la población, mientras que en los países europeos y en Estados Unidos existe una prevalencia de por lo menos del 3% (Burch *et al.*, 1991). En estos países entre el 1 al 20% de los sujetos parasitados presentan signos de la enfermedad, mientras que en Europa el porcentaje disminuye en menos de un caso por cada cien mil habitantes (Villalobos *et al.*, 2010) y (Conde y de la Mora, 1992).

Según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía, la amebiasis intestinal ocupó el séptimo lugar como causa de morbilidad por casos nuevos en México en el 2008 (INEGI, 2008). Sin embargo en datos más recientes, en el año 2011 la amebiasis intestinal ascendió al sexto lugar como causa de morbilidad en México (SSA, 2011) y representó el 5% de las causas de gastroenteritis en la población adulta y el 3% en niños menores de 5 años (Hernández Cortez *et al.*, 2011), en nuestro estado se reportaron 5,884 casos nuevos y una tasa de incidencia de 129.18 casos por cada 100,000 habitantes en el mismo año.

Alrededor del 85 al 95% de las infecciones humanas con *E. histolytica* son asintomáticas (Bracha *et al.*, 1990) por lo que en muchas ocasiones no son atendidas de forma oportuna y los individuos se convierten en focos de infección para las personas a su alrededor. El periodo de incubación de la amebiasis intestinal aguda es de 1 a 14 semanas. La penetración de los trofozoítos amebianos

en las células epiteliales del aparato digestivo ocasiona el cuadro clínico (Marshall *et al.*, 1997). Aproximadamente el 10% de las personas infectadas presentan algún padecimiento de mayor o menor impacto en su salud que van desde una colitis, disentería o hasta abscesos hepáticos. Los síntomas de la disentería amebiana incluyen diarrea con cólicos, dolor en la parte baja del abdomen, fiebre y presencia de sangre y moco en las heces. Las úlceras provocadas por la invasión de los trofozoítos pueden evolucionar a las úlceras con forma de botella típicas de la colitis amebiana. *Entamoeba histolytica* puede invadir otras partes del organismo, como el hígado, los pulmones y el cerebro, en ocasiones con desenlace mortal (Marshall *et al.*, 1997).

5.1.3 Ciclo de vida

El trofozoíto mide entre 10 a 60 μm , presenta un ectoplasma bien delimitado, así como un endoplasma finamente granulado con un núcleo excéntrico y un cariosoma central puntiforme, presenta motilidad debido a la presencia de seudópodos digitiformes, y puede adherirse a las células epiteliales del recubrimiento interno del intestino delgado o bien dirigirse hacia un vaso sanguíneo y comenzar el proceso de formación de un absceso hepático. Los seudópodos también le permiten al parásito envolver las partículas alimenticias hacia el citoplasma (Tanyuksel y Petri, 2003).

E. histolytica se caracteriza por tener en su citoplasma frecuentemente una gran cantidad de glóbulos rojos que ha ingerido (Tanyuksel y Petri, 2003), esta característica permite diferenciar a este parásito de *Entamoeba dispar* (Bracha *et al.*, 2006) en las muestras tomadas de pacientes.

El metabolismo del trofozoíto difiere de los organismos eucarióticos superiores en varios aspectos, entre ellos se encuentran que estos organismos son incapaces de generar la biosíntesis *de novo* de las purinas, se ha reportado que no poseen glutatión e inclusive utiliza el compuesto pirofosfato, en lugar del ATP como fuente de energía química (Tanyuksel y Petri, 2003).

El trofozoíto es la forma activa y la más lábil en el medio ambiente, por lo cual este estadio debe cambiar su estructura en faz de lograr una mayor resistencia, al emigrar con el flujo de las heces fecales, se transforma en un prequiste, una estructura de un solo núcleo hasta que finalmente en el colon madura en su forma quística tetranucleada (Solórzano-Peña y Martínez-Membreño, 2005).

El prequiste es una estructura redondeada u ovoide de 10 a 20 μm de diámetro, inmóvil e incoloro con una membrana quística de quitina en vías de formación, contiene agregados de ribosomas, denominados cuerpos cromatoidales, así como vacuolas de alimento, compuestas por glucógeno, que terminan por disminuir en volumen en cuanto el quiste ha terminado de madurar. Además de eso, en esta transición tienen lugar dos procesos continuos de división nuclear hasta que el

quiste contiene 4 núcleos, y ya no se pueden observar ni los cuerpos cromatoidales ni las vacuolas de glucógeno. En este punto la estructura ya es denominada quiste, mide entre 5 y 20 μm , y puede permanecer viva fuera del hospedero durante semanas o meses (Solórzano-Peña y Martínez-Membreño, 2005).

El quiste, la fase infectiva del parásito, comienza el proceso de desenquistamiento luego de ser ingerida por un hospedero y encontrarse en el lumen de la sección terminal del íleon en el intestino delgado. Donde se convierte en una estructura intermedia entre el quiste y el trofozoíto denominada metaquiste (Chávez-Munguía *et al.*, 2003).

El metaquiste es una estructura en la que únicamente se pueden observar los cuatro núcleos en el interior; los cuerpos cromatoidales y las vacuolas alimenticias no pueden apreciarse. Debido a que este estadio se desarrolla debido al proceso de desenquistamiento, por lo que la pared de esta estructura desaparece (Solórzano-Peña y Martínez-Membreño, 2005).

Al llegar a la parte baja del intestino delgado bajo la influencia de los jugos digestivos neutros o alcalinos, rompen las paredes del quiste, liberando los cuatro núcleos que finalmente se dividen en ocho trofozoítos metaquísticos. Estas amibas inmaduras pasan al intestino grueso. La estasis intestinal permite a veces que la amiba cree un foco infeccioso en la región del ciego; pero aún pueden ser llevadas hasta el recto sigmoide, y ser expulsadas (Chávez-Munguía *et al.*, 2003).

5.1.4 Proceso de enquistamiento de *E. histolytica*

El enquistamiento se define como el proceso en el cual muchos organismos adoptan una etapa latente y altamente resistente, denominada quiste, precedida de una etapa reproductiva. Durante la etapa de enquistamiento se llevan a cabo una gran cantidad de cambios morfológicos coordinados en donde se disminuye la actividad metabólica pero se realiza la biosíntesis de la pared celular. Se han realizado estudios en varios grupos de parásitos tanto humanos como no humanos, como son *E. histolytica*, *E. invadens* (Picazarri *et al.*, 2008) y *Acanthamoeba castellanii* (Lloyd *et al.*, 2001) y se han encontrado grandes similitudes en cuanto a este proceso se refiere (Eichinger, 2001).

Ahora se sabe que el proceso se puede dividir en dos fases sincronizadas. Durante la fase temprana el trofozoíto pleomórfico se redondea y se vuelve incapaz de adherirse a ninguna superficie como consecuencia de cambios en el citoesqueleto del parásito. Además del cambio morfológico se hacen cambios en los patrones de expresión génica, transporte de proteínas, metabolismo y división celular, resultando en una estructura tetranucleada (Chávez-Munguía *et al.*, 2003).

Otro cambio importante en esta etapa es la formación de los componentes de la pared celular y transportarlo hacia la membrana celular en vesículas pinocíticas. Los precursores N-acetilgalactosamina son incorporadas en la pared celular y copolimeriza formando una red fibrilar de 120 a 150 nm de grosor. Además de la red de polisacáridos, también existen las glicoproteínas Jacob y Jessie que se unen

a la red de polisacáridos y son responsables del entrecruzamiento de la red de quitina, así como aglutininas que se unen al germen de trigo y que son reconocidos como anticuerpos monoclonales antiquísticos (Ghosh *et al.*, 2010).

La cascada de señalización de estos precursores comienza con la enzima glucosamina-6-fosfato isomerasa, continúa con la glucosamina-6-fosfato-N-acetilasa, fosfoacetil-glucosamina mutasa, la UDP-glucosamin-N-acetil-pirofosforilasa, y por último la quitin sintetasa, denominada B-glicosil-transferasa. (Das S y Gillin FD, 1991).

En el caso de *Giardia duodenalis*, se ha observado que algunos elementos de estrés influyen en el proceso de enquistamiento. La depleción de colesterol o bien la presencia de micelas de sales biliares, interactúan con el receptor para LDL y activan los marcadores tempranos de enquistamiento e inducen el proceso completo. Por lo que la expresión inducible de enzimas, lectinas y otras proteínas involucradas en la señales de transducción, resulta en la alteración de la respuesta al proceso de enquistamiento (Reiner *et al.*, 1995). Mientras que en *Entamoeba invadens* (amiba causante de la amibiasis en reptiles) solamente se han relacionado las señales que se desencadenan por interacción con los receptores de Gal-lectina y el receptor B1 adrenérgico (Coppi *et al.*, 2002).

Hasta hace unos años no existían estudios sobre enquistamiento en *E. histolytica* dado que no existía un procedimiento eficaz de enquistamiento del mismo. Algunos de los primeros trabajos en donde se trató de diseñar un método de enquistamiento en donde se utilizaban medios difásicos, consistente en un agar pico de flauta de infusión de hígado con un sobrenadante de suero de caballo salino (Balamuth, 1951), a partir de esto se estudiaron los componentes del medio de cultivo para obtener un mejor rendimiento. Actualmente se han publicado algunos métodos distintos utilizando medios monofásicos en los que se observa la producción de estructuras semejantes a quistes: un método de reducción del medio de cultivo, utilizando dióxido de carbono (Barrón-González *et al.*, 2008), mientras que otro método utiliza la incorporación de una serie de iones divalentes en el medio de cultivo (Said-Fernández *et al.*, 2001) en donde se observó que en presencia de tales iones existe un incremento entre 120 a 180 veces en la cantidad de N-acetilglucosamina con respecto a los trofozoítos estudiados, mientras que en otro experimento además de la presencia de estos iones se le agrega la presencia de peróxido de hidrógeno logrando también un incremento en la producción de estructuras semejantes a quistes (Aguilar-Díaz *et al.*, 2010). Sin embargo, este último método presentó un porcentaje de formación de ESQ del 30%, mientras que el método de reducción con dióxido de carbono en 91.4% de rendimiento de los mismos.

Además de los estudios en donde se analizaron los factores estimulantes de la formación de estructuras quísticas, también existen reportes en donde se busca la inhibición del proceso. En uno de estos reportes se observa la inhibición generada por los metabolitos producidos por la raíz de la especie vegetal *C. texana*, en

donde se alcanzó un porcentaje de inhibición del 46% (Barrón-González (Barrón-González *et al.*, 2010); mientras que en otro reporte se observó el efecto biológico del medio condicionado con metabolitos producidos por *Lactococcus lactis*, logrando un porcentaje de 50% de inhibición en la formación de estructuras semejantes a quistes a una dosis de 20 mg/mL (Barrón-González *et al.*, 2012). En ambos casos se utilizó el método de enquistamiento utilizando dióxido de carbono.

En cuanto a la regulación génica que existe del proceso, en las especies de *Entamoeba* se ha descrito un factor de transcripción denominado SHAQUY perteneciente a la familia *Myb*, que interactúa con motivos ricos en citocina presentes en promotores de genes específicos de enquistamiento tales como la quitin sintasa, la quitinasa, una quinasa y la hierro-hidrogenasa (Aguilar-Díaz *et al.*, 2011). Sin embargo, además de los factores de transcripción, se ha demostrado que el silenciamiento de una de las enzimas, la glucosamin-6-fosfato isomerasa, la cual es esencial para convertir la fructosa-6-fosfato en glucosamina-6-fosfato involucradas en la biosíntesis del polímero de quitina, puede inhibir la formación de estructuras semejantes a quistes de manera importante. Esto se demostró mediante la introducción de RNA de interferencia de este gen y generó en una disminución en la producción de ESQ dependiente de la concentración del iRNA utilizado, alcanzando hasta un 95% de inhibición de estas estructuras (Aguilar-Díaz *et al.*, 2013). Esto le otorga una similitud en cuanto a otros protozoarios como *G. lamblia*, en el que esta enzima también es importante en el proceso de enquistamiento.

5.1.5 Vías de transmisión

El ser humano es el principal reservorio conocido para *E. histolytica*, aun cuando se ha encontrado evidencia de que algunos animales pueden soportar la infección, solamente el ser humano tiene las condiciones necesarias para esparcir la infección (Tanyuksel M y Petri WA, 2003). En la fase aguda de la infección, los pacientes excretan únicamente trofozoítos, vulnerables a las condiciones del medio ambiente, por lo que no son infecciosos; sin embargo, los enfermos crónicos y los portadores asintomáticos pueden excretar hasta 1.5×10^7 quistes diariamente que son la principal vía de transmisión ya que pueden contaminar tanto agua como alimentos (Tanyuksel y Petri, 2003) .

La contaminación de los alimentos se lleva a cabo por la mala manipulación por personas portadoras o bien por la ingestión de vegetales irrigados con agua contaminada con materia fecal (Castro-Buendía *et al.*, 1995).

Se ha confirmado la transmisión de *E. histolytica* por agua de consumo contaminada con quistes que pueden mantenerse viables durante varios meses. Se calcula que la posibilidad de transmisión por el agua es mayor en los trópicos, donde es mayor la cantidad de portadores, que en zonas más templadas (Solórzano-Peña y Martínez-Membreño, 2005). Los quistes son relativamente resistentes a la desinfección y pueden no ser inactivados mediante los tratamientos de cloración aplicados generalmente en la producción de agua de consumo (Marshall *et al.*, 1997) y (Tanyuksel y Petri, 2003).

Otra forma de infección es mediante la dispersión de los quistes a través de artrópodos como moscas y cucarachas, estos actúan como un medio de transporte de los quistes de forma mecánica sin que se produzca la infección en estos. Se sabe que los insectos anteriormente mencionados ocupan uno de los lugares principales en la transmisión del parásito mediante esta vía (Tanyuksel y Petri, 2003).

También se ha documentado la transmisión del parásito por vía sexual, sobre todo entre homosexuales varones (Marshall *et al.*, 1997). Además se han sugerido vías de transmisión zoonótica, esto es porque existe evidencia de experimentos en donde se realizaron infecciones exitosas en algunos animales de convivencia muy cercana al ser humano, tales como perros, gatos, ratas, monos y otros animales de laboratorio, además de hallazgos de este parásito en primates localizados en Kenia; sin embargo, no se han registrado casos donde se observe la transmisión entre animales infectados y el ser humano (Tanyuksel y Petri, 2003).

5.1.6 Patogénesis

Entre los factores que contribuyen a la generación de un estado patológico causado por *E. histolytica*, se encuentra el número de trofozoítos activos inicialmente presentes. Al incrementar el número de estos, se incrementa la posibilidad de que los trofozoítos entren en contacto con la mucosa o se aloje en las criptas glandulares para alimentarse y multiplicarse (Solórzano-Peña y Martínez-Membreño, 2005).

La adherencia que posean estos trofozoítos es también un factor importante en la virulencia y patogénesis del parásito (Sehgal *et al.*, 1996).

La adherencia de los trofozoítos a las células blanco es un paso determinante para la citotoxicidad del parásito (Trejos-Suárez y Castaño-Osorio, 2009), esto se observa al incubar al parásito con células ováricas de hámster chino (células CHO), en presencia de una solución al 10% de dextrano de alto peso molecular, en donde no se observó la presencia de lisis celular debida a que el polisacárido previno la adherencia del trofozoíto a las células blanco. Otros inhibidores de la adherencia del parásito que disminuyen su virulencia son las citocalasinas B y D así como bloqueadores de canales de calcio como Bepridil. Ambos involucrados en las funciones del microfilamento amebiano, necesario para el proceso de adherencia (Martínez-Palomo *et al.*, 1974). Además se ha observado que en presencia de estos compuestos existe un cambio en los valores de impedancia, lo que refleja un cambio en la distribución de carga eléctrica de la membrana del parásito y relacionándose con la capacidad de adherencia del mismo (Ravdin *et al.*, 1985).

Además se han identificado dos moléculas superficiales responsables de la adherencia a ese nivel, una molécula que se inhibe en presencia de Galactosa o N-acetil-D-Galactosamina denominada GalNAc (Pacheco-Yépez *et al.*, 2006) y otra que posee una inhibición cuando se utilizan polímeros de N-acetil-glucosamina, GlcNAc (Sehgal *et al.*, 1996).

Debido a la falta de un modelo animal que reproduzca tanto el ciclo biológico completo del parásito como las manifestaciones clínicas de la enfermedad, el absceso hepático amebiano experimental en hámster (AHAH) es el modelo más utilizado para estudiar los mecanismos moleculares de patogenicidad de *E. histolytica*. Este modelo consiste en la inyección intraportal o intrahepática de trofozoítos axénicos virulentos de la cepa HM-1:IMSS (Guzmán-Silva *et al.*, 2013).

Las lesiones tisulares son evidentes a las 24 h y se extienden a casi todo el hígado en aproximadamente 7 días, lo que ocasiona la muerte del animal. A nivel microscópico, a las 6h las amibas se rodean de abundantes leucocitos polimorfonucleares (PMN) los cuales, después de 48 h, de forma paulatina son sustituidos por infiltrado leucocitario de tipo mononuclear y linfocitario (Ramírez-Emiliano *et al.*, 2007).

Además, al igual de lo que sucede en otros modelos experimentales de enfermedad, la anexina 1 o las lipoxinas generadas por las ciclooxigenasas desempeñen un papel importante en la inhibición de la migración de los PMN (Sim *et al.*, 2010).

Durante el desarrollo del AHAH se observa una destrucción masiva de las amibas (aproximadamente el 70%), solamente durante las etapas iniciales (12 h), ocasionada muy probablemente por el oxígeno tisular y por algunas moléculas generadas por la respuesta inmune innata (sistema de complemento, peróxido de

hidrógeno, ácido hipocloroso y óxido nítrico). Es posible que, igual a lo que sucede en condiciones *in vitro*, las amibas sobrevivientes induzcan degranulación e inhiban el estallido oxidativo de los PMN (Olivos-García *et al.*, 2011).

Después de este periodo y a pesar de una buena respuesta humoral, la carga parasitaria aumenta de forma continua y termina con la muerte del animal. Durante mucho tiempo se sostuvo que la patogenicidad del parásito se debía a su capacidad de destruir tejidos (histolítica) ya que numerosos experimentos *in vitro* demostraron que *E. histolytica* produce moléculas que causan citólisis (fosfolipasas y ameboporos) (Romero *et al.*, 2007) o apoptosis (adhesinas) en células blanco, así como proteólisis de algunos componentes de la matriz extracelular (proteasas de cisteína) (Solórzano-Peña y Martínez-Membreño, 2005).

Durante el curso de la parasitosis la inflamación, además de ser la principal responsable de la destrucción tisular, es una condición necesaria para la sobrevivencia del parásito (Campbell y Chadee, 1997).

Con la isquemia que produce la inflamación, se crea un microambiente favorable para la sobrevivencia del parásito al reducirse el acceso de moléculas potencialmente tóxicas como son el complemento, los anticuerpos y el oxígeno junto con sus especies reactivas (ROS) tales como superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo (Olivos-García *et al.*, 2011).

Por otra parte, se sabe que en condiciones *in vitro* los macrófagos ejercen su actividad amebicida mediante la generación de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno, generados por la sintetasa de óxido nítrico (iNOS) y la nicotinamida adeninucleótido fosfato reducido (NADPH) oxidasa, respectivamente (Romero *et al.*, 2007).

Sin embargo los macrófagos que están en vecindad con las amibas podrían reducir su producción de ROS por estar en condiciones hipóxicas, además de que no expresan la iNOS. Esto último sucede debido a la sobreproducción de interleucina 10, factor inhibidor de la locomoción de monocitos, presencia del factor 15D-PGJ2 y la activación de genes regulados por la hipoxia. Se ha reportado además que *E. histolytica* es capaz de producir en baja cantidad moléculas de óxido nítrico que le permite actuar como antioxidante y defenderse de los radicales libres producidos por el sistema inmune (Hernandez-Campos *et al.*, 2003).

También se ha observado que la interacción de trofozoítos axénicos no virulentos con la flora bacteriana intestinal, como *Escherichia coli* (Kim *et al.*, 1998), o *Salmonella entérica*, puede restablecer su condición patogénica. Sin embargo, dichas bacterias deben encontrarse viables, ya que los experimentos con bacterias muertas por calor o fijadas con glutaraldehído no incrementaron la virulencia de los trofozoítos (Bracha y Mirelman, 1984).

Sin embargo, la exposición del trofozoíto a las bacterias previamente descritas durante 30 minutos, incrementó la virulencia del parásito al colocarse *in vivo*. La asociación bacteria-parásito y su incremento de virulencia se relaciona con un cambio en la arquitectura de la superficie de la célula llevando a propiedades alteradas de la célula (Sehgal *et al.*, 1996).

5.1.7 Diagnóstico

El diagnóstico de laboratorio de *E. histolytica* se basa comúnmente en microscopía y método inmunoenzimáticos como la ELISA (Gallego *et al.*, 2003), el ensayo de hemaglutinación indirecto y la aglutinación con látex; además se han desarrollado procedimientos para la detección del parásito mediante técnicas de biología molecular. Un diagnóstico preciso es importante no solamente para los pacientes con disentería, sino para pacientes asintomáticos que representan cerca del 90% de los casos y son considerados de alto riesgo al transmitir la infección de manera más sencilla en condiciones de baja higiene (Tanyuksel y Petri, 2003).

El examen microscópico ha permitido históricamente la observación de la morfología del parásito; sin embargo, no permite la diferenciación entre organismos que posean características morfológicas muy similares, disminuyendo su sensibilidad y especificidad cuando se somete a identificación a distintas especies de *Entamoeba* en muestras de heces (Tanyuksel y Petri, 2003).

Mediante esta técnica no es posible diferenciar entre *E. dispar* y *E. histolytica*, a menos que se observe al trofozoíto de esta última con los gránulos de eritrocitos fagocitados en el citoplasma; sin embargo, generalmente se realiza el diagnóstico observando la morfología de los quistes en el examen coproparasitológico, confundiéndose entre sí ambas especies, la mayoría de las veces. El entrenamiento y experiencia del observador son indispensables para un diagnóstico correcto del parásito (Rivero *et al.*, 2009).

Entre otras métodos de diagnóstico desarrollados, se encuentran las técnicas mediante la detección de anticuerpos en el suero del paciente (Javier-Zepeda, 1978) y (Mendoza *et al.*, 1985); sin embargo, debido a que las personas que viven en regiones endémicas del parásito han sido expuestas al mismo, la identificación de anticuerpos contra *E. histolytica* no precisa una infección actual. Este método es de mayor utilidad en los países desarrollados donde el porcentaje de incidencia es menor. Sin embargo, en todos los casos la combinación de métodos serológicos con alguna técnica de detección del parásito permite una aproximación muy significativa de diagnóstico (Tanyuksel y Petri, 2003).

También se ha utilizado técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa ((Fotedar *et al.*, 2007) y (Rivero *et al.*, 2009)), que permite la identificación del parásito, ofreciendo al mismo tiempo tanto sensibilidad como especificidad. La elevada especificidad de la técnica permite la distinción entre *E. histolytica* y *E. dispar*, permitiendo incluso determinar una coinfección de ambas especies en un solo hospedero (Núñez *et al.*, 2001).

Sin embargo la presencia de algunos factores presentes en las heces fecales puede inhibir la reacción en cadena de la polimerasa, por lo que en algunas ocasiones existe la posibilidad de tener un resultado falso negativo. Algunas de las desventajas de esta técnica es que requiere de mucho tiempo, tiene un grado mayor de complicación y resulta en un mayor costo (Tanyuksel y Petri, 2003).

5.1.8 Genoma

El genoma de la cepa HM1:IMSS de *E. histolytica* ha sido secuenciado encontrando aproximadamente 23, 751, 783 pares de bases repartidos en 14 cromosomas (Loftus *et al.*, 2005). El contenido de DNA que se encuentra en *E. histolytica* en cultivos axénicos es diez veces mayor que cuando se cultiva esta amiba en cultivos xénicos (Mukherjee *et al.*, 2008).

Este fenómeno también se observa cuando se realiza el cambio de estadio en *E. histolytica* de quiste a trofozoíto (Das y Lohia, 2002). Existe evidencia de que este fenómeno ocurre por un proceso de acumulación de múltiples copias de genes en su genoma que se originan como una necesidad de la célula de generar los metabolitos que en cultivo xénico tomaba de los microorganismos circundantes, aunque tampoco se descarta algún otro tipo de rearrreglo que explique este evento (Caler *et al.*, 2010) y (Lohia, 2003).

Se han encontrado 9,938 genes con un tamaño aproximado de 1.17 Kb y comprenden el 49% del genoma, estos genes se encuentran muy próximos, separados únicamente por secuencias que tienen desde 400 pares de bases hasta 2.3 kilobases de longitud. Se destaca que el 31.8% de las proteínas encontradas no poseen secuencias homologas con ninguna otra especie (Lorenzi *et al.*, 2010).

El 25% de los genes conocidos del parásito contienen intrones, de los cuales el 6% contienen múltiples secuencias de estos. Las secuencias intrónicas del parásito son de 46 a 115 pb de extensión y contienen como sitios de "splicing" dinucleótidos de Guanina-Uracilo y Adenina-Guanina (Gómez *et al.*, 2010). Alrededor del 10% del genoma corresponde a genes codificantes de RNA de transferencia organizados en arreglos continuos de longitud de 490 a 1775 pares de bases y que contienen de 1 a 5 genes codificantes para tRNA (Gómez *et al.*, 2010).

5.1.9 Elementos extracromosomales

El material genético de *E. histolytica* no se encuentra totalmente incluido en los cromosomas, sino que posee entre 175 a 200 copias por célula de estructuras semejantes a plásmidos de 24.5 kb en donde también se guarda información genética importante tal como las secuencias que codifican los RNA's ribosomales del parásito (Grodberg *et al.*, 1990), estas regiones se denominan rDNA.

Estas secuencias presentan dos regiones invertidas codificantes para RNA ribosomal separadas por segmentos de 3.9 Kb a 10.3 Kb. Estas estructuras poseen segmentos ricos en Adenina y Timina, lo cual le otorga una homología con los orígenes de replicación de otros organismos eucarióticos inferiores, presentando características de autorreplicación (Grodberg *et al.*, 1990).

Se ha observado la presencia de dos tipos de construcciones de estos materiales extracromosomales, una puede ser digerida por la enzima de restricción PvuI y otra BamHI, ambas estructuras se han observado tanto en cepas patógenas como no patógenas de *E. histolytica*, y que dependiendo de las condiciones de crecimiento, así como de la presencia o ausencia de ciertas bacterias se desencadena la amplificación de una estructura sobre otra (Mirelman *et al.*, 1990).

5.1.10 Generalidades de los ácidos ribonucleicos

El ácido ribonucleico es un biopolímero que junto con el ácido desorribonucleico forma parte del grupo de biomoléculas llamadas ácidos nucleicos. Es el ácido nucleico más abundante en la célula. Una célula típica contiene 10 veces más RNA que DNA (Söll *et al.*, 2001).

El polímero está constituido por un residuo de azúcar de 5 carbonos, un grupo fosfato y una base nitrogenada. El azúcar presente en el RNA es la ribosa. Esto indica que en la posición 2' del anillo del azúcar hay un grupo hidroxilo (OH)

libre. Por este motivo, el RNA es químicamente inestable, de forma que en una disolución acuosa se hidroliza fácilmente. El RNA posee cuatro bases nitrogenadas denominadas Adenina, Guanina, Citosina y Uracilo, aun cuando también se han encontrado otros tipos de bases nitrogenadas tales como ácido pseudouridílico y el ácido inosílico, que son poco usuales. Las bases nitrogenadas se aparean en parejas específicas, en el RNA la base que se aparea con la A es U, a diferencia del DNA, en el cual la A se aparea con T (Webster-Bortner, 1952).

El grupo fosfato de este polímero posee cargas parciales negativas a un pH fisiológico dentro de la célula. Este grupo proviene de los monómeros utilizados en la construcción del biopolímero que corresponden a moléculas de alta energía como el ATP, GTP, CTP y UTP. A través de un proceso enzimático en donde se utiliza la energía química de estos compuestos para generar el biopolímero (Vörtler *et al.*, 1998).

En la mayor parte de los casos es un polímero monocatenario, pero en ciertos casos puede presentar zonas en su secuencia con apareamientos intracatenarios. Cuando se realiza la extracción de este biopolímero, se obtiene el RNA total, que en realidad son un conjunto de distintos tipos de RNA con funciones y pesos moleculares distintos (Cabrejos M. *et al.*, 2001):

- RNA heterogéneo nuclear (RNAhn). Es un RNA de alto peso molecular, también conocido como transcrito primario del RNA, ya que es el RNA recién sintetizado por la RNA polimerasa en el proceso de transcripción.
- RNA pequeño nuclear (RNAsn) El RNA pequeño nuclear (RNAsn) está presente en el núcleo. Está implicado en los procesos de maduración del RNAhn. En este proceso, el RNAsn se asocia a proteínas formando las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (RNPsn) que se encargan de eliminar los intrones durante el proceso de “splicing”.
- RNA de transferencia (RNAt) Las moléculas de RNA transferente (RNAt) tienen entre 75 y 90 nucleótidos, y su peso molecular es de unos 25000 Dalton. Se conocen unos 60 RNAt distintos, y se encuentran en todas las células. Intervienen en la síntesis de proteínas, ya que van unidos a un aminoácido. Su estructura secundaria presenta un plegamiento complejo y presenta una zona de unión a aminoácidos y otra región que reconoce los codones del RNAm.
- RNA ribosómico (RNAr) El RNA ribosómico (RNAr) está presente en los ribosomas, implicados en la síntesis de proteínas. Se conocen 3 ó 4 tipos distintos de RNAr. Su estructura secundaria y terciaria presenta

un plegamiento complejo que le permite asociarse tanto a las proteínas integrantes de los ribosomas como a otros RNAr y participar en el proceso de síntesis proteica.

- RNA mensajero (RNAm) El RNA mensajero (RNAm) se sintetiza sobre un molde de DNA y sirve de pauta para la síntesis de proteínas (traducción). Su peso molecular es alto y contiene únicamente los nucleótidos A, U, G y C. Además de contener codificada la secuencia de una proteína, contiene señales para la iniciación (codón AUG, que codifica al aminoácido metionina) y terminación de la síntesis (codones UAA, UAG o UGA) (Brown, 2011).

Sin embargo, cada uno de los tipos de RNA's anteriormente mencionados se originan a partir de la información contenida en el DNA, a partir de un proceso denominado transcripción (Cabrejos M. *et al.*, 2001).

5.1.11 Transcripción del RNA

En todos los organismos, la información guardada en el genoma debe convertirse en polipéptidos con una función específica que le permita a la célula continuar con vida. Esta información genética se transcribe en un mensajero que lleva al ribosoma el código genético necesario para la generación de un polipéptido (King, 2011).

La transcripción, proceso por el cual se forma una sola hebra de RNA a partir de DNA, comienza con el reconocimiento de la RNA polimerasa de secuencias específicas denominadas promotores, luego esta polimerasa junto con los Factores de Transcripción (FT's) generan un transcrito denominado pre-mRNA. Una vez que la transcripción ha empezado, algunos de los FT's permanecen en el promotor, otros permanecen con la RNA polimerasa, y los restantes son separados de la RNA polimerasa (Cabrejos M. *et al.*, 2001).

Una vez formado el transcrito se procede a modificaciones post-transcripcionales, en donde se reconocen sitios de “splicing” (Churbanov *et al.*, 2006) y se cortan los intrones, dejando únicamente los exones, una región poliadenilada y una región 5' modificada, denominada cap (Cabrejos M. *et al.*, 2001).

En *E. histolytica* el evento de transcripción no es muy diferente. La transcripción de genes que codifican proteínas se realiza de forma monocistrónica, en donde el tamaño de la región promotora se encuentra entre 200 y 900 pares de bases. La proteína de unión a la caja TATA (TBP) es el único miembro de la maquinaria basal de transcripción que se ha descrito detalladamente, y posee un 55% de homología con la TBP humana (Gómez *et al.*, 2010).

Los promotores de la transcripción de *E. histolytica* poseen tres elementos conservados que son la caja TATA que se encuentra en el lugar -35 a -25 pb enriquecida con las bases Adenina-Timina, una secuencia iniciadora, Inr, AAAAATTCA que se superpone en el sitio de inicio transcripcional; y el elemento GAAC que controla la tasa y el sitio de inicio de la transcripción y modula la activación transcripcional (Gómez *et al.*, 2010).

Se han estudiado pocos promotores de transcripción de *E. histolytica*, estas secuencias pertenecen a los genes *hgl-2*, *hgl-5* de las lectinas Gal/GalNac, las proteínas de resistencia a multidroga EhPgp-1 y EhPgp-5, el complejo EhADHCP y la GTPasa, EhRabB (Gómez *et al.*, 2010). El promotor del gen *hgl-2* posee dos elementos regulatorios, una secuencia localizada a 100 pb “río arriba” del sitio de inicio de la transcripción, el cual es muy similar a la caja CCAAT encontrada en eucariotes superiores; así como una secuencia de 15 pb situada a -520 pb (Gómez *et al.*, 2010).

En el caso del promotor del gen *hgl-5*, se observan 5 elementos regulatorios, de los cuales 4 actúan como promotores positivos de la transcripción, mientras que el elemento restante tiene un control negativo de la transcripción. Uno de los elementos positivos, el URE-4 actúa como potenciador de la transcripción del gen *hgl-5*. Este elemento es reconocido por los polipéptidos EhEBP-1 y EhEBP-2, en donde el primero al ser sobreexpresado se reduce la expresión del gen reportero controlado por el promotor *hgl-5* (Gómez *et al.*, 2010).

El promotor del gen EhPgp-1, tiene una secuencia Inr y secuencias semejantes a algunos elementos *cis* de regulación de eucariotas superiores tales como C/EBP, GATA-1, OCT y HOX (Gómez *et al.*, 2010). El gen EhPgp-5 posee una secuencia de caja TATA y una secuencia Inr, localizada a tres nucleótidos “río arriba” del primer codón. Este gen es inducido por el fármaco emetina (Gómez *et al.*, 2010).

La proteína EhRabB es una GTPasa que está localizada en vesículas pequeñas que son traslocados a la membrana plasmática y hacia la hendidura formada durante la fagocitosis. Esta proteína es parte de los productos generados por el complejo EhCPADH el cual se encuentra relacionado con el mecanismo patogénico de *E. histolytica*. El gen EhrabB no contiene ni secuencias de la caja TATA ni las secuencias Inr, sino que tiene el elemento GAAC así como secuencias similares a C/EBP, GATA-1 y elementos del choque térmico, así como secuencias relacionadas con el elemento URE-1 del gen promotor *hgl-5* (Gómez *et al.*, 2010).

Además de los anteriores, se han descubierto otros factores transcripcionales en *E. histolytica*, algunos de estos son generados bajo condiciones de estrés, denominados factores de transcripción del choque térmico, los cuales aseguran la supervivencia de la célula bajo condiciones estresantes. Así como también de otro factor transcripcional similar a la proteína p53, el cual presenta un 50 a 57% de homología con la proteína humana (Gómez *et al.*, 2010).

El RNA mensajero del parásito es sintetizado por una RNA polimerasa poco usual que es resistente al α -amanitina (Gómez *et al.*, 2010), el cual normalmente tiene un efecto negativo sobre las RNA polimerasa encontradas en otros organismos (Nair *et al.*, 1973).

Una vez formado el transcrito es posible reconocer secuencias “consensus“. En *E. histolytica* la región 5' que no se traduce es comúnmente corta, de 5 a 20 nucleótidos, mientras que el extremo 3' posee elementos conservados ricos en bases Adenina-Uracilo que corresponden con la señal de poliadenilación (Gómez *et al.*, 2010). La región poliadenilada le otorga una estabilidad al RNA mensajero, como en otros organismos. Esta característica es regulada por la presencia de algunos factores, como es el caso de la emetina y el gen EhPgp-5, que actúan favorablemente en el transcrito incrementando su vida (Gómez *et al.*, 2010).

Otra particularidad del RNA de este parásito es la existencia de cadenas poliadeniladas de este material genético que no poseen ninguna polipéptido codificado en él, sino que la secuencias de marco abierto de lectura (ORF's) poseen una gran cantidad de codones “stop”, generando péptidos cortos. Estos transcritos inusuales se clasifican en cuatro tipos distintos, IE, Tr, ehapt-2 y UEE-1 (Bhattacharya *et al.*, 1999).

El transcrito Tr es aquel que resulta de la transcripción de los elementos extracromosomales denominados rDNA, este transcrito posee una cola poliadenilada, y se presume que posee una función regulatoria de la transcripción, tomando una estructura secundaria funcional (Bhattacharya *et al.*, 1999).

El transcrito UEE-1, es otra cadena de RNA poliadenilada que se encuentra tanto en *E. histolytica* como en *E. dispar*, encontrándose en por lo menos 4 copias del mismo por genoma haploide, y representa el 8% de todos los cDNA generados por *Entamoeba dispar* (Bhattacharya *et al.*, 1999).

Los transcritos IE son los más abundantes ya que es posible encontrar hasta 500 copias por genoma. Este transcrito es en realidad una familia de 7 miembros que poseen una alta homología entre sí, pero una muy baja con respecto a secuencias de otros organismos. No se tiene evidencia de alguna función de esta familia de transcritos (Bhattacharya *et al.*, 1999).

Los transcritos ehapt-1 y ehapt-2 han sido los más recientemente descubiertos. El primero de ellos tiene una similitud muy grande con la familia IE, mientras que el segundo es completamente distinto a los demás. Estos transcritos como los anteriores no poseen secuencias ORF largas y se especula de su función regulatoria; sin embargo, no existe evidencia suficiente que permita reconocer una función de esta familia de transcritos (Bhattacharya *et al.*, 1999).

5.1.12 Cuerpos cromatoidales

A través de estudios de microscopía óptica y microscopía electrónica realizados a *E. histolytica* se han podido apreciar diferentes subestructuras microscópicas en el interior del citoplasma, entre ellas los denominados cuerpos cromatoidales, que están compuestos por agregados proteicos, principalmente de ribosomas y RNA (Sarkisyan, 1967). En sus estados iniciales los cuerpos cromatoidales se generan por agregados de las formas semicristalinas de riboproteínas con un tamaño de 200 a 300 Å, y una vez formados se han llegado a considerar como reservas cristalinas de ribosomas (Sarkisyan, 1967).

Los cuerpos cromatoidales son observables sólo durante las fases de prequiste y quiste inmaduro del parásito, además presentan una forma, tamaño y número característicos, lo que permite el diagnóstico e identificación de especie en muestras fecales de pacientes (Sarkisyan, 1967). Sin embargo, en cuanto a esto último no existe un consenso, considerando que existen autores que describen a los quistes jóvenes como estructuras que poseen uno o dos núcleos, en donde se observan cuerpos cromatoidales, de manera degradada ya que van disminuyendo conforme madura el quiste (Pumarola *et al.*, 1987) y (Pérez-Arellano *et al.*, 2002), o bien otro grupo describe los quistes como estructuras con 1 a 4 núcleos y en donde se observan dichos cuerpos cromatoidales (Martínez-Palomo, 1987).

Durante la fase de trofozoíto no se aprecian los cuerpos cromatoidales, pero mediante microscopía electrónica se pueden observar las partículas que los conforman dispersas en el citoplasma amebiano. En algunos casos estas partículas se encuentran unidas a vesículas digestivas, generando estructuras elongadas complejas (Sarkisyan, 1967).

5.1.13 Aplicaciones del estudio del RNA en especies de *Entamoeba*

El RNA es una de las moléculas que permiten conocer el flujo de información existente desde el núcleo hasta el citoplasma. Se ha investigado la expresión de ciertos elementos durante la fase de enquistamiento como las sintetasas de quitina, tales como EICHit-1, EICHit-2 y EICHit-3, en *E. invadens*, (de la Vega *et al.*, 1997) sin embargo, se han encontrado genes homólogos en *E. histolytica* denominados EhCHS-1 y EhCHS-2, que codifican para la quitin sintetasa (Van Dellen *et al.*, 2006); sin embargo la sobreexpresión de estos genes en trofozoítos, por sí mismos, no permiten que se complete el proceso de enquistamiento, aun cuando se observa un incremento en el número de vacuolas que secretan quitina (Ghosh *et al.*, 1999), pero probablemente al no sobreexpresarse otros genes involucrados como el gen polimórfico Jacob-2, no se puede llevar a cabo la unión estructural del polímero en la superficie del parásito (Ghosh *et al.*, 2010).

De manera similar, se ha estudiado la inducción de proteínas de choque térmico, permitiendo observar los procesos de plegamiento y resistencia del parásito, así como relacionarlos incluso con algunos genes expresados durante el enquistamiento de *E. invadens* (Field *et al.*, 2000).

Aun cuando la fase de enquistamiento no se estudie directamente en *E. histolytica*, existen numerosos estudios sobre la expresión de genes en el trofozoíto de ésta. Existen reportes sobre la expresión de ciertos genes, en donde ciertos genes exhiben una alta tasa de expresión de ciertas proteínas por este organismo pero que se encuentran en forma disminuida en cepas no virulentas como *E. dispar* (Núñez *et al.*, 2001). La sobreexpresión de estos elementos se considera como un factor de virulencia (Baxt y Singh, 2008).

La función de ciertas proteínas y genes importantes en la virulencia del parásito se han estudiado mediante técnicas de silenciamiento genético. Se ha logrado silenciar la expresión de polipéptidos como la lectina GalNac, que favorece la adherencia del parásito a las células así como la cisteínproteínasa, entre otros (Bracha *et al.*, 2006). Adicionalmente se han investigado otros de los mecanismos de regulación de procesos importantes en el metabolismo celular del parásito, como la transcripción. Existen estudios en donde se analiza la forma en que se lleva a cabo los procesos post-transcripcionales, descubriendo que debido a la homología de las proteínas que intervienen, tal maquinaria se encuentra evolutivamente entre las levaduras y los mamíferos, con los que fue comparado (López-Camarillo *et al.*, 2005).

El RNA permite reconocer la respuesta del organismo hacia algún factor de su entorno que haya inducido alguno de los genes del organismo como respuesta a este estímulo. En el caso del metronidazol, el fármaco utilizado en el tratamiento de esta parasitosis, al encontrarse en contacto con *E. histolytica* se ha observado un incremento modesto en el RNA mensajero codificante para las enzimas superóxido dismutasa, peroxirredoxina, ferredoxina, tiorredoxina reductasa y las cadenas pesada y ligera de las lectinas específicas de galactosa/N-acetilgalactosamina (Tazreiter *et al.*, 2008). Esto otorga algo de conocimiento sobre como el organismo interactúa con su entorno; sin embargo, arroja cuestionamientos sobre el comportamiento del mismo ante otro tipo de moléculas.

5.2 Herbolaria

5.2.1 Generalidades

Aun cuando se han hecho investigaciones utilizando otros compuestos ya identificados y purificados que han demostrado tener actividad biológica en contra de trofozoítos de *E. histolytica*, tales como la ivermectina o el tindazol. Existe también un interés en la comunidad científica en los años recientes por la búsqueda de compuestos químicos de origen natural que igualen o rebasen el efecto de los fármacos convencionales, en este caso el metronidazol (Peláez y Genilloud, 2004).

Las plantas producen sustancias químicas que no se encuentran relacionadas con su metabolismo básico, pero que le otorgan una ventaja con respecto a las demás. Estos compuestos se denominan metabolitos secundarios. Se han identificado varios grupos de compuestos tales como saponinas, flavonoides, quinonas, cumarinas, terpenos, taninos, alcaloides (Rivera *et al.*, 2011).

5.2.2 Compuestos químicos identificados en plantas

Saponinas y sapogeninas: Las saponinas son glicósidos en los cuales varias unidades de monosacáridos se enlazan mediante un enlace glicosídico a un resto denominado aglicón. El aglicón puede ser de naturaleza triterpénica o esteroidal y en función de esto las saponinas se clasifican en saponinas triterpénicas y saponinas esteroidales respectivamente (Cheeke, 1970).

El aglicón en las saponinas esteroidales (sapogenina) presenta el esqueleto tetracíclico característico de este tipo de compuestos, denominado gonano (ciclopentanoperhidrofenantreno) en el caso de ser saturado. La característica estructural fundamental de estas sapogeninas radica es la presencia de dos anillos adicionales que se originan a partir del carbono 17 del esqueleto base y están contenidos respectivamente en dos planos perpendiculares entre sí (Guerra de León *et al.*, 2007).

Flavonoides: Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, entre otros. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

Quinonas: Las quinonas son muy abundantes en la naturaleza, en el reino vegetal se encuentran tanto en vegetales superiores como en hongos y bacterias. Dependiendo del grado de complejidad de su estructura química pueden clasificarse en benzoquinonas, naftoquinonas o antraquinonas si son estructuras monocíclicas, bicíclicas o tricíclicas (Monks y Lau, 1992).

El grupo de las benzoquinonas tiene escaso interés desde el punto de vista de la fitoterapia, aunque sí es necesario conocer su importante poder alergizante. Muchas benzoquinonas y algunas naftoquinonas se comportan como haptenos, que al combinarse con los grupos amino o tiol de las macromoléculas pueden inducir dermatitis por sensibilización (Ahlfors *et al.*, 2003).

Las naftoquinonas, localizadas preferentemente en vegetales superiores, se encuentran en las plantas frescas en forma heterosídica, liberándose la genina durante el proceso de desecación. Pueden presentar actividades farmacológicas de aplicación a la terapéutica, como es el caso de la plumbagina de la drosera, que parece ser eficaz en el tratamiento de la tos, o la juglona (5-hidroxi-1,4-

naftoquinona) de las hojas y fruto del nogal (*Juglans regia* L., Fam. Juglandaceae) que presenta actividad antibacteriana y fungicida. También algunas naftoquinonas pueden ser empleadas en cosmética como colorantes naturales, como ocurre con la lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) también con actividad fungicida, presente en las hojas de alheña o henna (*Lawsonia inermis* L. *lythraceae*) que además de ser un importante fungicida se fija a los grupos tiólicos de la queratina capilar proporcionándoles un color rojo-anaranjado (Carretero Accame, 2000).

Cumarinas: Con el nombre de cumarinas se conoce a un grupo muy amplio de principios activos fenólicos que se encuentran en plantas medicinales y tienen en común una estructura química de 2H-1-benzopiran-2-ona, denominada cumarina. Sobre esta estructura, que se origina biosintéticamente por lactonización del ácido cumarínico (2-hidroxi-Z-cinámico), se disponen sustituyentes de distinta naturaleza química lo que da lugar a distintos tipos de cumarinas: sencillas y complejas (Musa *et al.*, 2008).

Prácticamente todas las cumarinas, a excepción de la cumarina propiamente dicha, poseen un sustituyente hidroxílico en posición 7, ya sea libre, como sucede en la umbeliferona, o combinado (metilo, azúcares, etc). Las cumarinas sencillas pueden poseer además hidroxilos adicionales también libres o combinados. Ejemplo de ellas son el esculetol del castaño de Indias con dos hidroxilos libres sobre los carbonos 5 y 7 o el escopoletol presente en algunas Solanáceas (belladona) que posee un hidroximetilo en C-5 y un hidróxilo libre en C-7. Es frecuente, que sobre el anillo cumarínico básico, generalmente hidroxilado en C-7,

se sitúen sobre los carbonos 6 u 8 radicales isoprenílicos de 5, 10 o más raramente de 15 átomos de carbono, que por su alta reactividad pueden originar anillos adicionales de tipo furánico o piránico. A este grupo de cumarinas isopreniladas se les conoce en conjunto como cumarinas complejas debido a la gran variabilidad química de sus estructuras (González-Elizondo *et al.*, 1997).

Ejemplo de este tipo de principios activos es la visnadina, piranocumarina con efectos vasodilatadores presente en el *Ammi visnaga*. Como grupo, su interés farmacológico no es muy grande, sin embargo debemos mencionar sus efectos sobre el sistema vascular tanto en territorio arterial como venoso y su utilidad en el tratamiento de algunas alteraciones de la piel como por ejemplo la psoriasis debido a sus propiedades fotosensibilizantes (Carretero Accame, 2000).

Terpenos: Con el nombre de terpenos se conoce a un grupo importante de componentes vegetales que tienen un origen biosintético común. Todos, aunque con estructuras químicas muy distintas, proceden de la condensación, en número variable, de unidades isoprenílicas. Los diterpenos constituyen un grupo muy amplio de componentes de los vegetales cuya característica común es la de poseer una estructura básica con 20 carbonos y proceder biosintéticamente del ácido mevalónico aunque existan un gran número de estructuras distintas (Paduch *et al.*, 2007).

Desde el punto de vista de su aplicación directa a la terapéutica, las plantas que contienen diterpenos, carecen hoy por hoy de interés. Sin embargo, dentro de este grupo figuran importantes compuestos naturales de aplicación en terapéutica. Un ejemplo típico es el caso del taxol, también conocido como paclitaxel, compuesto obtenido a partir de las cortezas de tejo americano (*Taxus brevifolia* Nutt.) que ha mostrado una elevada eficacia en el tratamiento de algunos tipos de cánceres. Este compuesto es un diterpeno tricíclico con una función amida por lo que en ocasiones se considera como un pseudoalcaloide (Yoshikawa *et al.*, 1996).

Taninos: Los taninos son compuestos fenólicos que abundan en muchas plantas y frutos. Son hidrosolubles, de sabor áspero y amargo. Su composición química es variable pero poseen una característica común, la de ser astringentes y coagular los alcaloides, albúminas y metales pesados. En medicina se prescriben por su acción astringente, hemostática, antiséptica y tonificante (Chung *et al.*, 1998).

La propiedad ya comentada de coagular las albúminas de las mucosas y de los tejidos, crean una capa seca, aislante y protectora que reduce la irritación y el dolor sobre la piel. Externamente, los preparados a base de drogas ricas en taninos, como las decocciones, se emplean para detener pequeñas hemorragias locales; en inflamaciones de la cavidad bucal, catarros, bronquitis, quemaduras, hemorroides, etc. Internamente, son útiles contra la diarrea, enfriamiento intestinal y afecciones vesiculares, aunque pueden producir alguna intolerancia en personas con estómago delicado, por ello es conveniente administrar en forma de tisanas maceradas, con

objeto de extraer también de la planta otras sustancias activas (Schofield *et al.*, 2001).

Los taninos también son útiles como contraveneno en caso de intoxicación por alcaloides vegetales. No es aconsejable consumir plantas con alto contenido en taninos durante un periodo prolongado de tiempo, ya que inhiben la absorción por el organismo de determinadas vitaminas y minerales, tales como el calcio y el hierro (ASOCAE, 2011b).

Alcaloides: Los alcaloides son sustancias orgánicas nitrogenadas, con propiedades básicas, de origen vegetal en su mayoría y acción fisiológica enérgica (medicinal o venenosa), como la morfina, la cafeína o la nicotina. Los alcaloides poseen una complejidad molecular que causa algunos potentes efectos fisiológicos; en su mayor parte son venenos vegetales muy activos, y pequeñas dosis producen grandes efectos en el organismo (Phillipson *et al.*, 1978).

Su verdadero valor solo puede ser asegurado en manos de un médico, pues aunque pueden ser excelentes medicamentos, que incluso resuelven enfermedades muy graves, su uso inadecuado puede causar intoxicaciones graves, e incluso la muerte. Muchas de ellas se utilizan en terapéutica como estimulantes cardíacos y cerebrales; al aumentar la dosis disminuye la actividad motora provocando sueño (acción narcótica). Si la dosis sigue aumentándose puede provocarse un estado de inconsciencia. Su ingesta produce dependencia (ASOCAE, 2011a).

5.2.3 Especies vegetales

Persea americana: Esta especie pertenece a la Familia de las Lauraceae, es una planta de América Central aunque se ha demostrado fácil adaptación a otras regiones tropicales. Sus frutos se conocen comúnmente como aguacates y tienen piel gruesa de color verde oliva y su pulpa es de consistencia pastosa de color amarillo pálido a verde, rica en aceites vegetales y es apreciada por sus atributos sensoriales cuenta con una semilla grande de color claro con un tegumento café pardo está dividida en dos cotiledones (Leite *et al.*, 2009).

La variedad Hass surgió de la variedad guatemalteca, al cultivarse en Estados Unidos, dando como resultado un árbol más abierto que alto, cuyo fruto posee una piel gruesa y rugosa de color morado oscuro, de pulpa con un 19% de aceite y de semilla chica adherida al mesocarpio (Leite *et al.*, 2009).

Tradicionalmente se han utilizado tanto las hojas como las semillas de aguacate como fuente de agentes fitoterapéuticos, desde el siglo XVI Francisco Hernández escribe que el aceite obtenido por prensado de las semillas favorece la salud de los disentéricos. En el siglo XVIII, Gregorio López refiere que la semilla es útil para el tratamiento de la estranguria y la disentería (Madsen, 1955).

En el siglo XIX, el Dr. Eleuterio González recomienda el polvo de la semilla contra las diarreas atónicas. En el siglo XX, Maximino Martínez reporta las propiedades de la semilla del aguacate como antidiarréico y antiparasitario. En Perú se utiliza el extracto acuoso de semillas secas contra la disentería amebiana,

como antidiarréico y astringente. Incluso hoy día se sigue utilizando para tratar la diarrea (Pamplona-Roger, 2000), e infecciones parasitarias (Romero, 2003). Además, las preparaciones de semillas de aguacate se sabe que tienen efectos anestésicos locales que disminuyen el dolor muscular (del Refugio Ramos *et al.*, 2004).

Anteriores estudios fitoquímicos en las semillas de aguacate han identificado varias clases de productos naturales, tales como fitoesteroles, triterpenos, ácidos grasos, ácido furanólico, flavonoides, proantocianidinas y el ácido abscísico. Algunos de ellos están relacionados con la actividad antifúngica (Leite *et al.*, 2009) con el efecto larvicida (de Morais *et al.*, 2007).

Además presentan al β -sitosterol como un posible agente activo en su actividad antifúngica y antimicrobiana (Ovesná *et al.*, 2004). Por otro lado se ha investigado las propiedades de los extractos de las hojas y raíz de esta planta demostrando sus propiedades amebicidas en el estadio de trofozoíto de *E. histolytica*, cercana al 50% de mortalidad a una dosis de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Moundipa *et al.*, 2005).

Castela erecta ssp. texana: Es un arbusto ramoso, espinoso, de 1 a 2.5 m con la corteza muy amargosa, hojas angostamente obovada o elípticas caedizas, de 0.5 a 1.5 centímetros, flores rojas o moradas de 3 mm su fruto es una drupa (Martínez, 1979). Tradicionalmente se consume su corteza, tallo y raíz en preparados en gotas

o jarabes para tratar la disentería, la amebiasis, la fiebre y la diarrea (Lozoya, 2000).

Es un arbusto utilizado tradicionalmente en infusiones y cápsulas de planta seca para el tratamiento de las infecciones intestinales de origen amebiano. Se recomienda tomar una taza tres veces al día hasta obtener mejoría. Es ampliamente utilizada como antihelmíntica y amebicida por poseer un sabor amargo, se toma en ayunas durante nueve días, se descansan siete días y se inicia el tratamiento nuevamente (Osuna-Torres *et al.*, 2005).

De este arbusto se han aislado varios compuestos como cuasinoídes, chaparrina, castamargina, glucaruboleno, 11-O-trans-p-cumarilamarolido, chaparrinona, holocanthona, glucósidos cuasinoídes: 15-o-B-D-glucopiranosil glaucarubol, glaucarubolona, castelina, resinas, ceras, grasas, taninos, flavonoides, saponinas, carbohidratos: celulosa, materiales albuminoídes, sales minerales, ácido tánico. Específicamente se han aislado de la corteza cuasinoídes, chaparrina, chaparrinona, glaucaruboleno, chaparramarina, glaucarubol, glucósidos cuasinoídes: castelósido-A, castelósido-B, castelósido-C, castelalina, glaucarubolona. Mientras que de la raíz se ha identificado el cuasinoide chaparrina(Osuna-Torres *et al.*, 2005).

Existen reportes en donde se ha probado su actividad bactericida contra *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (Solís-Díaz *et al.*, 2009), así como su actividad antiparasitaria contra protozoarios como *Trichomona vaginalis*

(Calzado-Flores *et al.*, 1998) y su capacidad inhibitoria del enquistamiento en *E. invadens* (Calzada-Flores *et al.*, 2007).

La planta presenta un grupo cuasinoides biológicamente activos entre ellos la chaparrina, así como el marólido y castelanólido, otras sustancias activas son la simaroubolidano-X y el simaroubolidano glicosilado. Tanto las partes aéreas como la raíz han sido evaluadas en diferentes modelos biológicos, los extractos íntegros y cinco compuestos puros han demostrado tener actividades antibacterianas y amebicidas.

Estos compuestos fueron la chaparrina, castelina, castelagenina, castelamarina y glaucarbolona, todos demostraron tener actividad contra *E. histolytica* (Osuna-Torres *et al.*, 2005).

En estudios previos se analizó un extracto acuoso que resultó no ser mutagénico, ni genotóxico; mostró actividad antimutagénica. Además, fue capaz de proteger las células hepáticas contra la síntesis de DNA no programada inducida por 2-acetilaminofluoreno a una concentración de 6.77 mg/mL. La actividad efectiva quimioprotector de este extracto puede ser debido a la capacidad antioxidante de los componentes del extracto de *C. texana*. Se demuestra que el producto antiamebiano natural, *C. texana*, también es antimutagénica y protege contra la inducción de lesiones preneoplásicas en hígado de rata (Reyes-López *et al.*, 2005) y (Silva *et al.*, 1996).

Ariocarpus retusus: Es una especie del género *Ariocarpus* en la familia Cactaceae oriundo de Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y San Luis Potosí, México. Es un cacto más globoso respecto a los otros de su género, gris verdoso. Llega a 25 cm de alto y 30 cm de diámetro. Tubérculos divergentes, proyectados sobre el nivel de tierra, erecta, apiñada en la base, aguda terminalmente, aplanada en el medio, 2-4 cm de largo y 1-3,5 cm de ancho (Martínez-Peralta, 2007).

Las areolas están presentes en las puntas de los tubérculos. Flores color crema, amarillo claro o blancas y ocasionalmente tienen bandas rojas en el medio, de 3-5 cm de diámetro. Frutos de 2,5 cm, alargados (Britton y Rose, 1963). Contiene diez alcaloides psicoactivos. Se lo conoce como “Chaute”, "Peyote cimarrón" o “Tsuwiri” (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Todas las especies de *Ariocarpus* son conocidas en México con el nombre vernáculo de chaute. *A. retusus* es considerado por los huicholes como un falso peyote y se le atribuyen propiedades mágicas (Batis y Rojas, 2002) y (Neal *et al.*, 2006).

Se ha reportado la presencia de grupos carbonilo, oxidrilos fenólicos, esteroides y metilesteroides, cumarinas, sesquiterpenlactonas, saponinas, flavonoides y alcaloides en los extractos metanólicos de *Ariocarpus*. Además de que el extracto metanólico de *A. retusus* mostró actividad contra *B. subtilis* con inhibición de 2.16 cm a 100 mg/mL y una IC₅₀ de 263.68 mg/mL (Rodríguez Garza, 2010). También

se reporta la presencia de los alcaloides Hordenina y N-metiltiramina, el cual se cristalizó a partir de extractos del cactus *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire) Schumann (Neal *et al.*, 2006).

Fouquieria splendens: Arbusto o árbol bajo, de 2 a 3 m de altura, tronco basal corto, de 15 a 25 cm de diámetro, ramificado cerca de la base en 6 a 30 tallos erectos o recurvados, corteza externa verde a café-amarillenta, exfoliante en pequeñas tiras, espinas de 15 a 25 mm de largo, rectas o curvas; hojas de los brotes cortos 4 a 11, lineares patuladas ampliamente obovadas, de 17 a 35 mm de largo, por 5 a 11 mm de ancho, agudas a redondeadas y marginadas en el ápice, cuneadas en la base; panícula estrechamente cónica a cilíndrica. En las hojas de *Fouquieria* se presentan muchas traqueidas almacenadoras de agua, poco comunes en la mayoría de las especies de dicotiledóneas las cuales se asocian con las venas menores y las venas terminales. Estos elementos traqueales podrían considerarse como adaptación a las condiciones de baja humedad por las que pasan estas especies en condiciones de sequía (Lernsten y Carrey, 1974) y (Henrickson, 1969).

F. splendens ssp. breviflora se distribuye en zonas áridas, desde el suroeste de Estados Unidos, incluyendo parte de los estados de California, Arizona, Nevada, Nuevo México y partes del suroeste de Texas, se les encuentra al norte de México, en los desiertos de Sonora y Chihuahua, desde San Luis Potosí y Tamaulipas hasta la parte sur de Zacatecas, Querétaro e Hidalgo, entre los 700 y 2100 m.s.n.m., se encuentra asociada con especies como *Yucca*, *Agave*, *Hechtia*, *Myrtillocactus*, *Opuntia*, *Echinocactus*, *Cephalocereus* y arbustos deciduos (Henrickson, 1972).

La parte utilizada de la planta son las hojas y las flores, que sirven para tratar los malestares renales y la tos (Morales *et al.*, 2002). Se dice también que puede ser usada para el tratamiento de cansancio, inflamaciones y tos, siendo su principio activo los triterpenos (Johnson-Gordon, 2004). En otros estudios se pudieron identificar alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, quinonas y cumarinas (Valerdi-Madrigal *et al.*, 2001).

5.3 *Artemia salina*

Artemia salina es una especie de crustáceo braquiópodo del orden Anostraca propia de aguas salobres continentales, de distribución cosmopolita. Los huevos pueden permanecer metabólicamente inactivos durante largos períodos (incluso de 10 años) en condiciones de total ausencia de agua y oxígeno, y a temperaturas por debajo del punto de congelación (Brown, 1980).

Esta característica inusual es llamada criptobiosis o diapausa; una vez que el entorno es adecuado, la eclosión puede comenzar transcurridas las primeras ocho horas, emergiendo los nauplios. El adulto de *A. salina* alcanza un centímetro de largo en promedio, y su vida media es de un año. Este rápido desarrollo y la habilidad de sus huevos para soportar largos períodos en condiciones desfavorables, la han hecho un modelo invaluable en investigaciones biológicas algunas incluso desarrolladas en el espacio exterior (Tizol-Correa, 2006).

En 1998 el Dr. Jerry L. McLaughlin, de la Universidad de Purdue deseando un bioensayo rápido, barato y fácil de realizar para el fraccionamiento y búsqueda de extractos de plantas fisiológicamente activos, utilizó un bioensayo en el que se utilizó un crustáceo, para la detección de productos naturales bioactivos, conocido como “Bioensayo de letalidad de las larvas de *Artemia salina*”.

A. salina solo había sido utilizada en varios bioensayos, como: análisis de pesticidas, micotoxinas, contaminantes de corrientes, anestésicos, toxinas de dinoflagelados, compuestos parecidos a la morfina, toxicidad de aceites dispersantes, entre otros. El bioensayo con larvas de *A. salina* en la determinación de la DL_{50} menor a $1000\mu\text{g/mL}$. Muy probable que contenga uno o varios compuestos activos, por lo que es necesario fraccionarlos para realizar el ensayo a concentraciones menores, una vez que se hayan obtenido la o las fracciones activas, se aísla el o los productos para determinar su DL_{50} e investigar su actividad biológica específica (Meyer *et al.*, 1982).

3. HIPÓTESIS

Los compuestos activos que se encuentran en los extractos metanólicos de *Castela texana*, *Persea americana*, *Ariocarpus retusus*, y *Fouquieria splendens* tendrán un efecto biológico durante el crecimiento del trofozoíto y/o bien en el proceso de enquistamiento de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS, presentando también una diferencia en la concentración de RNA total entre el trofozoíto y las estructuras semejantes a quistes.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar la actividad amebicida del extracto metanólico de *Castela texana*, *Persea americana*, *Ariocarpus retusus* y *Fouqueria splendens* sobre el crecimiento y la formación de estructuras quísticas de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS y cuantificación de la síntesis de RNA total en los dos estadios.

4.2 Objetivos Específicos

Entamoeba histolytica

1. Establecer la cinética de crecimiento de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS en cultivo axénico *in vitro* empleando el medio MPT.
2. Establecer la cinética de enquistamiento de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS bajo condiciones axénicas *in vitro* empleando el medio TYI-S-33.

Especies Vegetales

1. Recolección e identificación de las plantas que se utilizadas en los bioensayos:
Castela erecta ssp. texana, *Persea americana*, *Ariocarpus retusus*, y *Fouqueria splendens*.

2. Realizar el proceso de extracción metanólica de las especies vegetales por agitación constante.
3. Determinar el perfil fitoquímico mediante pruebas coloridas de los extractos metanólicos obtenidos de cada planta.
4. Determinar la toxicidad de cada uno de los extractos metanólicos de cada planta en el modelo biológico de *Artemia salina*.

Bioensayos

1. Determinar el efecto biológico del extracto metanólico de *Castela texana*, *Persea americana*, *Ariocarpus retusus* y *Fouqueria splendens* sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS.
2. Determinar el efecto biológico del extracto metanólico de *Castela texana*, *Persea americana*, *Ariocarpus retusus*, y *Fouqueria splendens* sobre el proceso de enquistamiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS.
3. Realizar la extracción y cuantificación de RNA total a partir de los quistes y trofozoítos sometidos a los extractos metanólicos que presentaron un mayor porcentaje de inhibición y la menor toxicidad.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Cepa de *Entamoeba histolytica*: Se utilizó la cepa HM1:IMSS de *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903), cual se mantiene en cultivo en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Especies vegetales: En este trabajo se estudiaron las propiedades de los extractos metanólicos de las siguientes plantas: *Castela erecta ssp texana*, *Persea americana*, *Ariocarpus retusus* y *Fouquieria splendens*.

Suero bovino: El suero bovino empleado en este trabajo se obtuvo de la casa comercial DIBICO el cual se descomplementó a 56°C/30 min, agitándolo suavemente cada 5 min, posteriormente se le realizó la prueba de esterilidad en tres tubos estériles de borosilicato con tapón de rosca y se incubaron a 37°C por 72h, una vez corroborada su esterilidad se almacenó a -20°C hasta el momento de su empleo.

Solución concentrada de penicilina: A un frasco ampula de 1, 000, 000 U de Penicilina-G sódica cristalina, se le colocó con aguja y jeringa estéril 5.0 mL de agua desionizada para disolver la penicilina.

Solución patrón de penicilina- estreptomicina: A un frasco ampula de sulfato de estreptomicina, se le añadió bajo condiciones de esterilidad, la solución concentrada de penicilina y se mezclarán.

Solución de trabajo de penicilina-estreptomicina (100X): Se transfirió asepticamente toda la solución patrón de penicilina-estreptomicina del frasco ampula a un tubo cónico estéril de 50 mL y se aforó a 20 mL con agua desionizada estéril. Se almacenó a 4°C cubiertos con papel aluminio.

Artemia salina: Fue proporcionada por la Dra. María Eufemia Morales Rubio y el Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza del Laboratorio de Biología del Desarrollo del Departamento de Biología Celular y Genética de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.2 *Entamoeba histolytica*

Mantenimiento

La cepa se mantuvo mediante resiembras sucesivas, inoculando 10,000 trofozoítos/mL a un tubo 16 X 150 mm con tapón de rosca, conteniendo 10 mL de medio MPT (Barrón-González *et al.*, 2008) adicionado con 0.1ml de solución de penicilina-estreptomicina y 1.0 mL de suero bovino, la cepa se incubó a 37°C por 72h. Antes de cada resiembra los cultivos se observaron en un microscopio invertido para comprobar el buen estado de las amibas. El cultivo que mostró la mejor densidad y el mejor aspecto, se colocó en agua-hielo por 15 min, para

despegar las células adheridas al tubo, este se agitó diez veces por inversión suave y el número de trofozoítos se determinó tomando una alícuota del cultivo, se colocó en una cámara de Neubauer y se determinó el número de trofozoítos/mL. Las resiembras y bioensayos se realizaron cuando las células se encontraban en la mitad de su fase logarítmica de crecimiento.

Cinética de crecimiento

Se inocularon 1×10^4 trofozoítos/mL a 28 tubos con medio de cultivo MPT enriquecido con suero bovino adulto y suplementado con el 1% de la solución de antibióticos. Se incubaron a 37 °C durante 7 días. Cada 24h se cosecharon las células de 4 tubos, mediante un enfriamiento previo de los tubos en agua-hielo a 4° C, y se hizo el conteo en cámara de Neubauer, se analizaron y graficaron los datos obtenidos.

Cinética de enquistamiento:

El enquistamiento se llevó a cabo a partir de un cultivo que se encuentre en etapa logarítmica de crecimiento, se inocularon 2×10^4 trofozoítos/mL a 84 tubos con medio, suplementado con suero bovino adulto y la solución de antibióticos luego se gaseó cada tubo con una alta tensión de dióxido de carbono a saturación, se incubó a 37° C por 7 días. Posteriormente cada 24h se cosecharon las células de 4 tubos, mediante un enfriamiento en agua-hielo a 4°C por 20 min, se centrifugaron a 4,000 rpm por 5 min, se hizo el conteo de células totales en cámara de Neubauer, enseguida se agregó el detergente Tritón X-100 al 0.15% por 30 min, y se

determinó las estructuras resistentes mediante un conteo en cámara de Neubauer (Barrón-González *et al.*, 2008).

6.3. Extractos metanólicos a partir del material vegetal

Obtención del material vegetal:

La recolección de las especies se realizó con el permiso de la Corporación para el Desarrollo Agropecuario de Nuevo León Oficio N° 139.0.DDR2.22 (2006). La especie vegetal *Fouquieria splendens* se colectó en el municipio de Mina y la colecta de *Ariocarpus retusus* se realizó en el ejido El Potosí del municipio de Galena en Nuevo León.

Las especies vegetales de *C. texana* y *P. americana* tanto la variedad Hass como Criolla se colectaron en el municipio de Villa Hidalgo, San Luis Potosí, el cual se encuentra al norte del estado. La cabecera municipal se encuentra a 100°41' longitud oeste y 22°27' latitud norte a una altura de 1,670 m sobre nivel del mar. Se encuentra limitando hacia el norte Villa de Guadalupe, al este, Guadalcázar y Cerritos; al sur, Armadillo de los Infante; al oeste, Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, Villa de Arista, Moctezuma y Venado. La distancia de este municipio a la capital del estado es de 47 km, presenta 1,558.65 km² y representa el 2.57% del territorio estatal.

La precipitación pluvial que presenta anualmente es de 336 mm y presenta una temperatura media anual de 18.6° C con máxima de 40°C y mínima de 8°C. El municipio presenta una vegetación típica de zona árida incluyendo matorral desértico micrófilo, matorral espinoso, nopalera, izotal, cardonal y pastizal, presentándose algunas especies como gobernadora, mezquite, castela, corolaria, lechuguilla, sotol, nopalera, yucas, cardones, garambullos, teteches, pasto navajita, lobero, salado y banderilla (INAFED, 2010).

Procesamiento del material vegetal: Una vez recolectado el material vegetativo se procesó de la siguiente manera:

1. Lavado: Se enjuagó el material vegetal al chorro de agua corriente, hasta eliminar cualquier residuo ajeno al material vegetativo.
2. Secado: Se extendió el material vegetal y se dejó secar a temperatura ambiente del Laboratorio de Biología Celular.
3. Trituración: Se trituró el material seco empleando un molino manual.
4. Extracción. La obtención de extractos a partir de cada espécimen vegetal se realizó agregando a 300 mL de metanol. Se mantuvieron en matraces cubiertos en un agitador orbital por 7 días a temperatura ambiente.
5. Después de ese tiempo se filtró cada extracto en filtros Whatman No. 1.
6. El solvente se dejó evaporar hasta sequedad en un rotavapor a 40°C. Se obtuvo el extracto mediante un raspado de los residuos y se almacenó en frascos de vidrio oscuro hasta su uso.

6.4 Tamizaje fitoquímico a partir de los extractos metanólicos

Al extracto metanólico de cada espécimen vegetal se les realizaron las siguientes pruebas con la finalidad de identificar sus componentes químicos, cada una de éstas pruebas fue llevada a cabo en placas de porcelana con varios pozos, cada pozo será utilizado para una prueba en específico, ver Tabla 1.

Tabla 1
Pruebas de tamizaje fitoquímico (Domínguez, 1973),

Detección de:	Prueba de:	Procedimiento
Insaturaciones	KMnO ₄	Se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua o metanol y se añade, gota a gota, una solución de KMnO ₄ al 2% en agua. La prueba es positiva si se observa decoloración o formación de precipitado café en menos de 1 minuto, resultado de la formación de dióxido de magnesio.
Grupo carbonilo	2-4-Dinitrofenilhidracina	Se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua o metanol y se añade, gota a gota, una solución de KMnO ₄ al 2% en agua. La prueba es positiva si se observa decoloración o formación de precipitado café en menos de 1 minuto, resultado de la formación de dióxido de magnesio.
Oxhidrilos fenólicos (taninos vegetales)	FeCl ₃	Se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua o etanol y después se añaden unas gotas de cloruro de hierro al 12.5% en agua. La aparición de un precipitado rojo, azul-violeta o verde, es considerada positivo.

Esteroles y Triterpenos	Liebermann-Burchard	Se mezcla 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo, ésta mezcla se enfría a 0°C y se les añade una gota de ácido sulfúrico. Se añade, gota a gota, este reactivo a la muestra, o su solución clorofórmica. Si hay formación de los colores azul, verde, rojo, naranja, etc., los que cambien con el tiempo, la prueba es positiva. El orden de aparición (0, 1, 5, 20,60 minutos) tiene cierto valor diagnóstico; así, una coloración amarilla después de 15 minutos, parece corresponder a C-14-metilo y una variación -7 instauración. La prueba es positiva con estroles que contienen 2 enlaces conjugados, que los pueden formar por una o dos deshidrataciones con isomerización.
Carbohidratos	Salkowski	Similar a la prueba de Liebermann-Burchard, la muestra (1-2mg) en contacto con 1ml de ácido sulfúrico, se desarrollan colores amarillo o rojo para esteroides y metilesteroides.
	Molish	A 1-2 mg de la muestra se le agrega, gota a gota, el reactivo de Molish (alfa-naftol 1% en etanol), luego 1 mL de ácido sulfúrico por las paredes de un tubo de ensayo. La prueba es positiva cuando se forma un anillo coloreado en la interface de color púrpura.
	Cumarinas	Se disuelven 1-2 mg de la muestra en NaOH al 10%; si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular es positiva.
	Lactonas	Se disuelven de 1-2 mg de muestra en solución alcohólica de NaOH al 10%. Al agregar unas gotas de HCl si aparece un color amarillo o anaranjado que se pierde o desaparece, esto indica la presencia de un anillo lactónico.

Sesquiterpen- lactonas	Baljet	A 2-3 mg de la muestra se le agregan 34 gotas de la solución mezcla, siendo positiva si se torna color naranja a rojo oscuro. La solución mezcla 1:1 consiste de una solución A (ácido pícrico al 1% en etanol) y Solución B (NaOH 10%).
Flavonoides	H ₂ SO ₄	Una pequeña cantidad de la muestra se disuelve en H ₂ SO ₄ y se observa coloración amarilla para flavonoles; naranja-guinda para flavonas; rojo-azuloso para chalconas y rojo-púrpura para quinonas.
Alcaloides	Drangendorff	Modificación Munier y Machelobuf. Se hacen 2 soluciones. Para preparar la solución A, se disuelven 0.85 gr. de nitrato de bismuto, en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua. Para la solución B, se disuelven 8 gr. de yoduro de potasio en 20 mL de agua. El reactivo se prepara mezclando 5 mL de la solución A, 4 mL de la solución B y 100 mL de agua. El reactivo es estable por un año y la prueba es positiva para alcaloides al dar color rojo o naranja, persistentes por 24 h (Pérez-Cepeda, 2000).
Saponinas	Bicarbonato de sodio	El bicarbonato de sodio se prepara al 10% en agua. Se disuelven de 1-2 mg de la muestra disuelta en agua o etanol y se le agregan 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se agita ligeramente. Luego se agregan 2-3 gotas de la solución del bicarbonato de sodio. La aparición de burbujas y su permanencia por más de 1 minuto indica la presencia de saponinas. Ésta prueba se realiza en un tubo de ensayo.
Saponinas	Salkowski	Se disuelven de 1-2 mg de la muestra en 1 mL, de cloroformo y se añade 1 mL de ácido sulfúrico. La prueba es positiva si hay aparición de color rojo.

Aromaticidad	Ácido sulfúrico- formaldehído	Se prepara una mezcla de 1 mL de ácido sulfúrico concentrado con una gota de formaldehído. Se agregan de 1-5 mg de la muestra y se añaden unas gotas de la mezcla anterior. Si aparece un color rojo-violeta, la prueba es positiva (Treviño-Tamez, 2001.).
--------------	----------------------------------	---

Procedimiento de las Pruebas fitoquímicas

6.5 Prueba de toxicidad con nauplios de *A. salina*

Este bioensayo se realizó para obtener una DL_{50} de los extractos metanólicos de cada espécimen vegetal, aquellos que presenten una DL_{50} menor de 1000 ppm es probable que contengan uno o varios compuestos tóxicamente activos. Se incubaron 0.1 g de huevecillos de esta especie en una solución de 40g de sal de mar, junto con 0.006g de levadura de cerveza por litro de agua destilada y se estabilizó a pH 7.8, se incubaron en un recipiente de plástico dividido, con un espacio en la parte baja de 2mm, se mantuvieron condiciones de oscuridad en uno de los compartimentos y oxigenación. Posteriormente en una placa de 96 pozos se agregaron en cada pozo 10 nauplios y a cada pozo se le agregaron las concentraciones de extractos mediante micro dilución 1:2, partiendo de la concentración de 1000 ppm. Luego de 24h de incubación se realizó un conteo de nauplios vivos al microscopio estereoscopio.

6.6 Bioensayos

6.6.1 Evaluación de la actividad biológica del extracto metanólico de las especies vegetales sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica*

En 270 tubos de 13x100 mm de 5 mL de medio MPT suplementado con suero bovino adulto y la solución de antibióticos, se añadió las concentraciones a ensayar (1.0, 2.0 y 3.0 mg/mL), se inocularon 1×10^4 trofozoítos/mL, posteriormente se incubaron a 37° C por 3 días, y enseguida se cosecharon las células y se contaron en la cámara de Neubauer, los eventos se realizaron en tres eventos independientes por triplicado.

6.6.2 Determinación de la Concentración inhibitoria media (IC₅₀)

La concentración inhibitoria media (IC₅₀) corresponde a la concentración requerida para reducir a un 50% el crecimiento de la población a la dosis analizada. La IC₅₀ de cada extracto representó la media de tres experimentos realizados por triplicado. Se determinó la IC₅₀ empleando el método PROBIT para cada réplica mediante el análisis estadístico de regresión lineal empleando el programa SPSS versión 17.

6.6.3 Evaluación de la actividad biológica del extracto metanólico de las especies vegetales sobre la inducción de ESQ *in vitro* de *E. histolytica*

En 270 tubos de 16x150 mm de 10 mL de medio TYI-S-33 suplementado con suero bovino adulto y la solución de antibióticos se inocularon 2×10^4 trofozoítos/mL a 84 tubos con medio, suplementado con suero bovino adulto y la solución de antibióticos, enseguida se gaseó cada tubo con una alta tensión de dióxido de carbono a saturación, se incubaron a 37° C por 7 días, cada 24h se cosecharon las células de 4 tubos, mediante un enfriamiento en agua-hielo a 4°C por 20 min, se centrifugaron a 4,000 rpm por 5 min, se hizo el conteo de células totales en cámara de Neubauer, enseguida se agregó el detergente Tritón X-100 al 0.15% por 10 min, y se determinó las estructuras resistentes mediante un conteo en cámara de Neubauer.

6.6.4 Determinación del efecto biológico de los extractos metanólicos del material vegetal sobre el RNA total de trofozoítos de *E. histolytica*.

En 40 tubos de 16x150 mm de 10 mL de medio TYI-S-33 suplementado con suero bovino adulto y la solución de antibióticos, se añadió la concentración inhibitoria media de los extractos metabólicos que presentaron mayor actividad inhibitoria y menor toxicidad (los extractos metabólicos de *Castela texana*, *Ariocarpus retusus*, *Persea americana* y *Fouquieria splendens*), se inocularon 1×10^4 trofozoítos/mL, posteriormente se incubaron a 37° C por 3 días de incubación. Posteriormente se cosecharon las células y se contaron en la cámara de

Neubauer y se ajustaron para obtener una concentración de 1×10^6 trofozoítos/mL. Se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min y se realizaron tres lavados con medio TYI-S-33 fresco, enseguida se centrifugó nuevamente dejando únicamente el pellet de células a extraer, enseguida se le adicionaron 1 ml de TRIZOL[®]. Se procedió a una agitación vigorosa mediante vortex durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un eppendorf al cual se le adicionaron 200 μ L de cloroformo frío, se agitó durante 15 seg y se incubó en hielo por 3 min. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4° C. Se separó la fase acuosa y se adicionaron 500 μ L de isopropanol. La pastilla de RNA seóla los veces con etanol al 75% y se centrifugó por 5 min a 7500 a 4°C. El etanol se eliminó y se dejó secar por 5 minutos. Se disolvió la pastilla en 100 μ L de agua DEPC estéril, posteriormente se sometieron a la lectura de la concentración de RNA y luego se almacenó a -80° C.

6.6.5 Determinación del efecto biológico de los extractos metanólicos del material vegetal sobre el RNA total de ESQ de *E. histolytica*

En 55 tubos de 16x150 mm de 10 mL de medio TYI-S-33 suplementado con suero bovino adulto y la solución de antibióticos, se añadió la dosis letal media de los extractos metabólicos que presentaron mayor actividad inhibitoria y menor toxicidad (los extractos metabólicos de *Castela texana*, *Ariocarpus retusus*, *Persea americana* y *Fouqueria splendens*), se inocularon 1×10^4 trofozoítos/mL, posteriormente se gaseó con dióxido de carbono hasta saturación y luego se

incubaron a 37° C por 7 días de incubación, y enseguida se cosecharon las células y se contaron en la cámara de Neubauer y se ajustaron para obtener una concentración de 1×10^6 células/mL. Se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min y se realizaron tres lavados con medio TYI-S-33 fresco dejando únicamente el pellet de células a extraer, se le adicionaron 1 ml de TRIZOL[®]. Se procedió a una agitación vigorosa mediante vortex durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un eppendorf al cual se le adicionaron 200 μ L de cloroformo frío, se agitó durante 15 seg y se incubó en hielo por 3 min. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4° C. Se separó la fase acuosa y se adicionaron 500 μ L de isopropanol. La pastilla de RNA se lavó dos veces con etanol al 75% y se centrifugó por 5 min a 7500 a 4°C. Luego el etanol se eliminó y se dejó secar por 5 minutos. Se disolvió la pastilla en 100 μ L de agua estéril posteriormente se sometieron a la lectura de la concentración de RNA y luego se almacenó a -80° C.

6.6.6. Medición de la concentración de RNA total obtenido de trofozoítos y ESQ de *E. histolytica*

Una vez que se obtuvo el RNA total pelletizado correspondiente a las células expuestas a cada extracto metanólico, se solubilizó en agua DEPC a la totalidad. En caso de que la concentración de RNA fuera superior al límite permitido por el equipo se realizaron diluciones 1:2 (hasta alcanzar una dilución 1:64), hasta que se encontrara dentro del rango de lectura y posteriormente se realizaron los cálculos para determinar la concentración de RNA total utilizando el factor de dilución utilizado. Tanto las muestras, las diluciones y la solución blanco (que

consistía de agua DEPC) se mantuvieron en un termomixer sin agitación a 4°C. Antes de la lectura se realizó la limpieza del equipo utilizando 3µl de agua DEPC por triplicado antes de la calibración, luego se calibró el equipo tomando 2µl del blanco, obteniendo una lectura de 0 ng/µl. Las lecturas se realizaron en el equipo NanoDrop ND 1000 Spectrophotometer, disponible en la Unidad de Inmunobiología y Acarreadores de Drogas, en Laboratorio de Inmunología y Virología. Antes de comenzar la lectura del RNA total de cada muestra, cada uno de los tubos eppendorf se homogenizó mediante pipeteo. Las lecturas se realizaron por triplicado en cada caso, bajo las siguientes condiciones: Se configuró el software del equipo para la lectura de RNA para determinar la concentración en las unidades ng/µl, se utilizaron las longitudes de onda de 260 y 280 nm para determinar la cuantificación en cada una de las repeticiones, antes y después de la lectura de cada muestra se realizó la limpieza del electrodo utilizando agua DEPC y papel de arroz ultrabsorbente para retirar trazas de la muestra anterior, finalmente se realizó la limpieza del equipo nuevamente.

6.7 Análisis estadístico

Los datos para determinar las dosis letales (DL_{50}) en los ensayos de toxicidad, y la IC_{50} en los bioensayos de determinación de acción biológica en el crecimiento de *E. histolytica* y en el proceso de enquistamiento se analizarán mediante el análisis PROBIT. Se utilizó un diseño experimental estadístico completamente al azar en donde los datos de cuantificación se sometieron a un Análisis de Varianza

mediante el paquete de software estadístico SPSS versión 17.0, para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos utilizados ($P < 0.05$), posteriormente la diferencia significativa entre los tratamientos se sometieron a una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey.

6.8 Diseño experimental

Para evaluar la actividad biológica de los extractos metanólicos de las especies vegetales a estudiar sobre el crecimiento y enquistamiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica*, se utilizó un diseño factorial de $6 \times 4 \times 2 \times 1$ con tres repeticiones independientes por triplicado, así se evaluó la actividad biológica del extracto metanólico de cuatro especies vegetales, evaluando tres dosis de cada extracto metanólico a partir de cada espécimen vegetal, fue evaluada la actividad biológica tanto en el estadio de trofozoíto como de ESQ de *E. histolytica* HM1:IMSS bajo condiciones axénicas *in vitro*.

Las variables de respuesta fueron el porcentaje de inhibición del crecimiento y enquistamiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* en presencia del extracto metanólico de cada espécimen vegetal. Los datos se analizaron mediante análisis de Regresión PROBIT para determinar la dosis letal media así como el análisis de varianza (ANOVA) para la cuantificación de RNA. Las diferencias entre los pares de medias de las variables que mostraron diferencias significativas se analizaron mediante la prueba de diferencia significativa de Tukey. El diseño se analizó con un nivel de confianza del 95%.

7. RESULTADOS

7.1 *Entamoeba histolytica*

7.1.1 Cinética de crecimiento

Se realizó una cinética de crecimiento de *E. histolytica* que se observa en la Figura 1, el cultivo de partida consistió en 20,000 células/mL, a partir del cual se puede apreciar que no existe una fase de adaptación de las células al medio de cultivo, sino que se presenta un crecimiento exponencial durante los primeros tres días de incubación en el medio de cultivo MPT. Al analizar la fase de crecimiento logarítmico es posible ubicar la mitad de tal fase a las 48 h de incubación. Al término de la fase logarítmica se alcanzó un máximo número de células de 1.4×10^5 células/mL. Posteriormente no se observó una fase estacionaria propiamente, sino un decaimiento paulatino del número de células a partir de esta cifra hasta alcanzar la muerte en su totalidad.

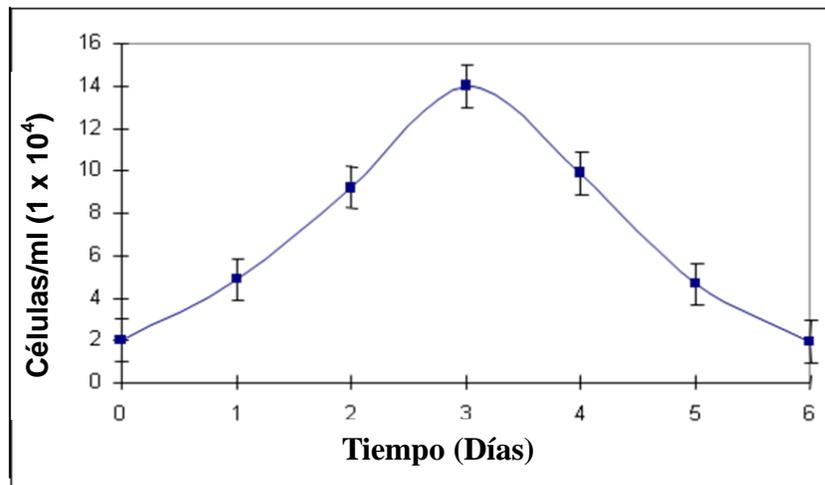


Figura 1. Cinética de crecimiento de *E. histolytica*. Se observa el incremento del número de células expresadas en factores de 10^4 células/mL de *E. histolytica* conforme pasa el tiempo de incubación a 37°C , expresado en días. Los conteos se realizaron cada 24 h por triplicado y corresponden a cada punto en la gráfica.

7.1.2 Cinética de enquistamiento de *E. histolytica* axénico *in vitro*

Se realizó una cinética de formación de Estructuras Semejantes a Quistes en *E. histolytica*, y estos datos se muestran en la Figura 2. Los datos que se muestran se refieren a estructuras resistentes a la solución de detergente Tritón-X 0.15% durante 10 min. Los datos muestran que durante los primeros tres días de incubación no se apreciaron estructuras resistentes, sino que a partir del cuarto día ocurre un incremento de las mismas a 24.9%, a partir de este momento se presentó un incremento repentino y rápido de la formación de dichas estructuras, triplicándose la cantidad de ESQ al pasar del cuarto al quinto día de incubación alcanzando un 70.2%, posteriormente la formación de ESQ disminuye paulatinamente hasta que se obtuvo un porcentaje máximo acumulativo de ESQ al séptimo día, alcanzando un 95.7%.

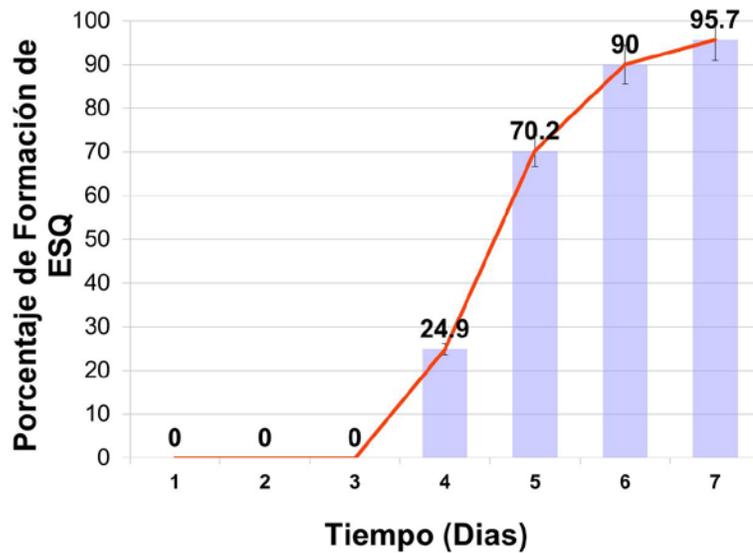


Figura 2. Cinética de formación de estructuras semejantes a quistes (ESQ) de *E. histolytica*. Se observa la formación de ESQ, resistentes al detergente Tritón-X, expresado en porcentaje y como se acumula la formación de los mismos durante el paso del tiempo, expresado en días, extendiéndose hasta 7 días la cinética realizada. Los conteos se realizaron cada 24 h por triplicado correspondiendo a cada punto en la gráfica.

7.2. Material vegetal

7.2.1. Determinación del perfil fitoquímico de los extractos metanólicos

Se realizó la extracción metanólica de las especies vegetales *P. americana* variedad Hass (semilla), *P. americana* var. Criollo (semilla), *C. texana* (tallo, hoja y raíz), *F. splendens* (tallo) y *A. retusus* (tallo y raíz) y posteriormente se les realizaron pruebas fitoquímicas para identificar sus grupos funcionales. Los resultados se observan en la Tabla 2. Los grupos fitoquímicos que se encontraron en *C. texana* fueron casi la totalidad de los buscados a excepción de los compuestos de tipo alcaloide, flavona y quinonas. También se observaron diferencias de los compuestos fitoquímicos encontrados entre los órganos de la misma: la hoja y el tallo no presentaron grupos insaturados ni aromáticos pero se apreciaron compuestos del grupo de las chalconas; a diferencia de la raíz de esta planta que si presenta los primeros, pero que presentan flavonas en lugar de las últimas.

En cuanto a lo observado en *A. retusus* se observó la presencia de todos los grupos fitoquímicos buscados a excepción de los compuestos del tipo chalcona y quinona.

Los órganos de este espécimen también presentaron diferencias entre los compuestos detectados, observándose la presencia de taninos en el tallo de este cactus a diferencia de la raíz del mismo que no lo presenta. Por otro lado la especie vegetal *F. splendens* presentó en el tallo los compuestos estudiados

excluyendo los compuestos de tipo alcaloide, compuestos aromáticos y aun cuando si se presentan flavonoides estos no corresponden a los grupos de flavonas, quinonas ni chalconas. También se realizaron las pruebas fitoquímicas a las variedades Hass y Criolla de *P. americana*, en los que se observa la presencia de casi todos los compuestos químicos buscados, sin la presencia de chalconas. Además no se observaron diferencias de compuestos entre las variedades.

Tabla 2

Comparación de grupos fitoquímicos presentes entre los extractos metanólicos

Grupo funcional	<i>Castela texana</i>			<i>A. retusus</i>		<i>F. splendens</i>	<i>P. americana</i> (var. Criollo)	<i>P. americana</i> (var. Hass)
	Hoja	Tallo	Raíz	Tallo	Raíz	Tallo	Semilla	Semilla
Insaturaciones	-	-	+	+	+	+	+	+
Grupo carbonilo	+	+	+	+	+	+	+	+
Taninos	+	+	+	+	+	+	+	+
Esteroides	+	+	+	+	+	+	+	+
Carbohidratos	+	+	+	+	+	+	+	+
Cumarinas	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactonas	+	+	+	+	+	+	+	+
Sesquiterpenlactonas	+	+	+	+	+	+	+	+
Alcaloides	-	-	-	+	+	-	+	+
Saponinas (NaHCO ₃)	+	+	+	+	+	+	+	+
Saponinas (Salkowski)	-	-	+	+	+	+	+	+
Aromaticidad	-	-	+	+	+	-	+	+
Flavonoides	+	+	+	+	+	+	+	+
Flavona	-	-	-	+	+	-	+	+
Chalcona	+	+	+	-	-	-	-	-
Quinonas	-	-	-	-	-	-	+	+

La reactividad de los grupos funcionales de cada extracto metanólico se observó conforme lo indicado en la literatura (Domínguez, 1973).

7.3 Bioensayo de letalidad en *A. salina*

Se realizaron los ensayos para determinar la toxicidad de los sólidos extraídos sobre el organismo *A. salina*. En la Tabla 3 se observa que todos los extractos metanólicos utilizados tuvieron actividad biológica sobre este organismo. Los extractos de hoja de *C. texana*, raíz de *A. retusus* y la semilla de ambas variedades de *P. americana*, mostraron porcentajes de mortalidad importantes a las dosis más bajas ensayadas; mientras que los extractos metanólicos de tallo de *F. splendens* y tallo de *A. retusus*, mostraron menor actividad a las mismas dosis. En cuanto al compuesto Metronidazol se obtuvieron actividades muy bajas incluso a las dosis más elevadas empleadas.

A estos datos obtenidos, se les realizó un análisis estadístico utilizando la prueba PROBIT, se obtuvieron las regresiones lineales de cada uno de los tratamientos utilizados sobre *A. salina* así como la Dosis Letal media de cada uno de los mismos, en donde se observa en la Gráfica 1 que todos los extractos ensayados presentaron una DL_{50} son menores a 1000 ppm y por lo tanto potencialmente tóxico, a excepción del metronidazol cuya actividad es mayor a este valor.

Los extractos metanólicos que presentaron las DL_{50} más bajas son los que corresponden a la semilla de *P. americana* var. Hass, seguido por *P. americana* var. Criollo, la hoja, el tallo y la raíz de *C. texana*, el tallo de *F. splendens*, y por último la raíz y el tallo de *A. retusus*, consecutivamente. En la Tabla 3, se puede apreciar los valores de chi-cuadrada y significancia estadística, presentando en

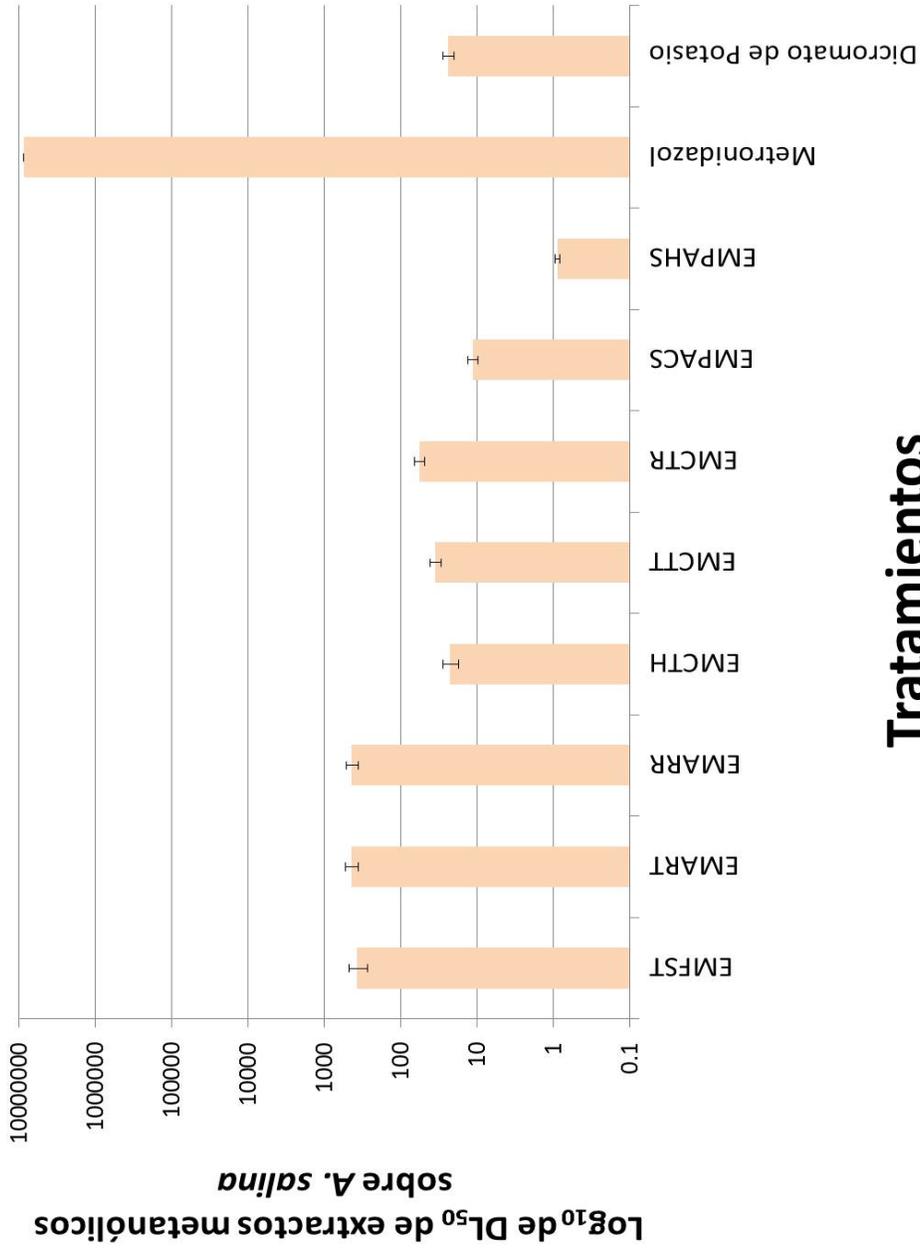
todos los casos un nivel de significancia mayor a una probabilidad de 0.05. Además al realizar la regresión lineal del modelo matemático se obtuvo un valor de coeficiente de correlación cercano a 1.

Tabla 3

Determinación de mortalidad (%) y DL₅₀ de extractos metanólicos sobre *A. salina*

Tratamiento	Muestra	Dosis (ppm)	% Mortalidad	DL ₅₀ (ppm)	χ^2	Significancia	R ²
Control	--	0.0	0.0 ± 3.8	N/A	N/A	N/A	N/A
Extracto Metanólico de <i>F. splendens</i>	Tallo	1000.0	64.95 ± 2.96	368.91 ± 100.65	5.986*	0.200	0.904
		500.0	48.61 ± 4.71				
		250.0	43.7 ± 3.39				
		125.0	41.22 ± 4.28				
Extracto Metanólico <i>A. retusus</i>	Tallo	1000.0	66.72 ± 2.47	442.33 ± 87.42	5.435*	0.489	0.963
		500.0	57.14 ± 6.31				
		250.0	33.58 ± 5.56				
		125.0	23.87 ± 7.99				
	Raíz	1000.0	86.36 ± 3.24	434.65 ± 81.5	3.760*	0.439	0.968
		500.0	66.11 ± 11.23				
		250.0	31.15 ± 5.25				
		125.0	25.78 ± 14.39				
Extracto Metanólico de <i>C. texana</i>	Hoja	1000.0	100 ± 0	22.46 ± 5.10	5.435*	0.489	0.968
		62.5	55.58 ± 4.02				
		31.3	44.44 ± 7.85				
		15.6	43.98 ± 4.54				
	Tallo	1000.0	98.21 ± 3.57	35.06 ± 5.82	7.977*	0.240	0.982
		62.5	74.58 ± 4.68				
		31.3	39.31 ± 5.61				
		15.6	31.61 ± 6.55				
	Raíz	1000.0	98.21 ± 3.57	56.52 ± 8.39	8.841*	0.183	0.982
		125.0	67.15 ± 2.46				
		62.5	54.79 ± 9.37				
		31.3	43.41 ± 2.54				
Extracto Metanólico de <i>P. americana</i> var. Criollo	Semilla	125.00	100 ± 0	11.27 ± 1.73	9.128*	0.166	0.945
		62.50	98.43 ± 3.12				
		31.30	80.5 ± 3.26				
		15.60	73.2 ± 6.28				
Extracto Metanólico de <i>P. americana</i> var. Hass	Semilla	31.30	100 ± 0	0.88 ± 0.70	1.817*	0.969	0.978
		15.60	97.05 ± 5.88				
		7.80	92.06 ± 8.36				
		3.90	87.02 ± 4.12				
Metronidazol	--	1000.00	14.52 ± 4.15	8;754,116.47 ± 40,895.85	0.152*	0.997	0.96
		500.00	13.33 ± 4.71				
		250.00	11.68 ± 3.67				
		125.00	8.88 ± 8.38				
Dicromato de Potasio	--	100.00	93.07 ± 2.24	23.68 ± 3.78	2.538*	0.281	0.982
		50.00	72.04 ± 12.75				
		25.00	48 ± 8.71				
		12.50	18.16 ± 11.47				

La determinación de la DL₅₀ obtenida mediante el análisis PROBIT y el asterisco (*) marca los datos cuya chi-cuadrada tiene una alta significancia (P > 0.05).



Tratamientos

Figura 3. Dosis Letal media de los extractos metanólicos sobre *A. salina*. Se muestran los valores en escala logarítmica de base 10, las DL₅₀ obtenidos luego del análisis PROBIT, en donde se observa el efecto de los tratamientos: Extracto metanólico del tallo de *F. splendens* (EMFST), extracto metanólico del tallo de *A. retusus* (EMART), extracto metanólico de raíz de *A. retusus* (EMARR), extracto metanólico de hoja de *C. texana* (EMCTH), extracto metanólico del tallo de *C. texana* (EMCTT), extracto metanólico de raíz de *C. texana* (EMCTR), extracto metanólico de semilla de *P. americana* var Criollo (EMPACS), extracto metanólico de semilla de *P. americana* var. Hass (EMPAHS), Metronidazol, sustancia utilizada como tratamiento antiamebiano y el Dicromato de potasio, que se utilizó como un control de mortalidad del ensayo.

7.4 Bioensayos

7.4.1 Actividad biológica de los extractos metanólicos de *C. texana*, *F. splendens*, *P. americana* y *A. retusus* sobre el crecimiento de *E. histolytica*

Se obtuvieron los porcentajes de mortalidad de cada uno de los extractos metanólicos de cada una de las especies vegetales sobre los trofozoítos de *E. histolytica* HM1:IMSS. Todos los extractos ensayados presentaron actividad biológica sobre el crecimiento de la amiba a las concentraciones más bajas utilizadas, en donde se destacan los extractos de hoja y tallo de *A. retusus*, tallo de *F. splendens*, hoja de *C. texana* y ambas variedades de *P. americana* presentaron y se puede observar en la Tabla 4. Se realizó posteriormente el análisis PROBIT para generar las regresiones de las respuestas de cada uno de los extractos ensayados y se graficaron (Figura 3). Las concentraciones inhibitorias medias más bajas obtenidas fueron las que corresponden a los extractos de hoja de *C. texana*, seguido por el tallo de *A. retusus*, el tallo de *F. splendens*, la raíz de *A. retusus*, la semilla de ambas variedades de *P. americana*, el tallo y la raíz de *C. texana*, consecutivamente. Además del valor de IC_{50} , se obtuvieron los valores de chi-cuadrada y su significancia, en donde se observa que los valores obtenidos presentan una significancia con probabilidad mayor al 0.05% y además presentaron un valor de correlación entre 0.8 y 1.

7.4.2 Determinación de la IC_{50} de los extractos metanólicos de *C. texana*, *P. americana*, *A. retusus* y *F. splendens* sobre *E. histolytica*

Mediante el paquete de software estadístico de SPSS y realizando el análisis estadístico PROBIT se obtuvieron los datos de las Concentraciones Inhibitorias medias de cada uno de los extractos metanólicos de las especies vegetales ensayadas sobre *E. histolytica*. La comparación de estos resultados se muestra en la Figura 4, en donde se aprecia que todos los extractos ensayados tuvieron efecto a una concentración inhibitoria media menor a 1 mg/mL.

Los extractos metanólicos con IC₅₀ más bajas los presentaron los obtenidos de las especies vegetales de *C. texana*, *F. splendens* y *A. retusus*, aunque también se observó un efecto importante de la especie vegetal *P. americana* variedad Hass sobre *E. histolytica*. El extracto metanólico que presentó menor actividad se obtuvo de la raíz de *C. texana*. Ninguno de los extractos metanólicos ensayados tuvo una actividad similar a la reportada para el metronidazol, en donde su IC₅₀ es de 0.1442 µg/mL, sobre este parásito.

Tabla 4

Comparación de la actividad biológica de los extractos metanólicos de *C. texana*, *F. splendens*, *P. americana* y *A. retusus* sobre el crecimiento de *E. histolytica*

Extracto Metanólico	Muestra	Dosis (mg/mL)	Mortalidad %	IC ₅₀ (mg/mL)	χ ²	Significancia	R ²
<i>C. texana</i>	Raíz	0.50	41.15 ± 5.35	0.7180 ± 0.0157	3.582	0.167*	0.941
		1.00	58.08 ± 11.61				
		2.00	75.00 ± 13.5				
		3.00	91.91 ± 7.35				
<i>C. texana</i>	Tallo	0.50	68.38 ± 5.47	0.0400 ± 0.0021	0.15	0.928*	0.961
		1.00	72.05 ± 8.64				
		2.00	75.73 ± 13.63				
		3.00	80.14 ± 6.41				
<i>C. texana</i>	Hoja	0.50	85.29 ± 6.82	0.0012 ± 0.0001	0.00025	1.000*	1.000
		1.00	86.76 ± 11.27				
		2.00	88.23 ± 7.05				
		3.00	88.96 ± 19.57				
<i>P. americana</i> var. Criollo	Semilla	0.50	90.43 ± 10.85	0.0170 ± 0.0093	0.103	0.950*	0.983
		1.00	93.38 ± 7.47				
		2.00	96.32 ± 8.66				
		3.00	97.79 ± 7.82				
<i>P. americana</i> var. Hass	Semilla	0.50	83.50 ± 6.68	0.0290 ± 0.0010	0.95	0.622*	0.879
		1.00	88.96 ± 9.78				
		2.00	90.44 ± 7.23				
		3.00	95.58 ± 17.20				
<i>A. retusus</i>	Tallo	0.01	72.50 ± 5.80	0.0020 ± 0.0001	2.448	0.294*	0.899
		0.10	86.71 ± 6.93				
		0.15	94.8 ± 7.58				
		0.25	94.89 ± 7.59				
<i>A. retusus</i>	Raíz	0.01	52.68 ± 4.21	0.0080 ± 0.0004	2.046	0.360*	0.887
		0.10	72.7 ± 5.81				
		0.15	68.7 ± 7.55				
		0.25	80.28 ± 16.05				
<i>F. splendens</i>	Tallo	0.01	64.91 ± 5.19	0.0060 ± 0.0002	0.291	0.865*	0.992
		0.10	95.96 ± 7.67				
		0.15	98.62 ± 9.86				
		0.25	99.38 ± 5.96				

Se realizó la determinación de la DL₅₀ obtenida mediante el análisis PROBIT y el asterisco (*) marca los datos cuya chi-cuadrada tiene una alta significancia (> 0.05). Se compararon con la IC₅₀ del metronidazol de 0.1442 µg/mL.

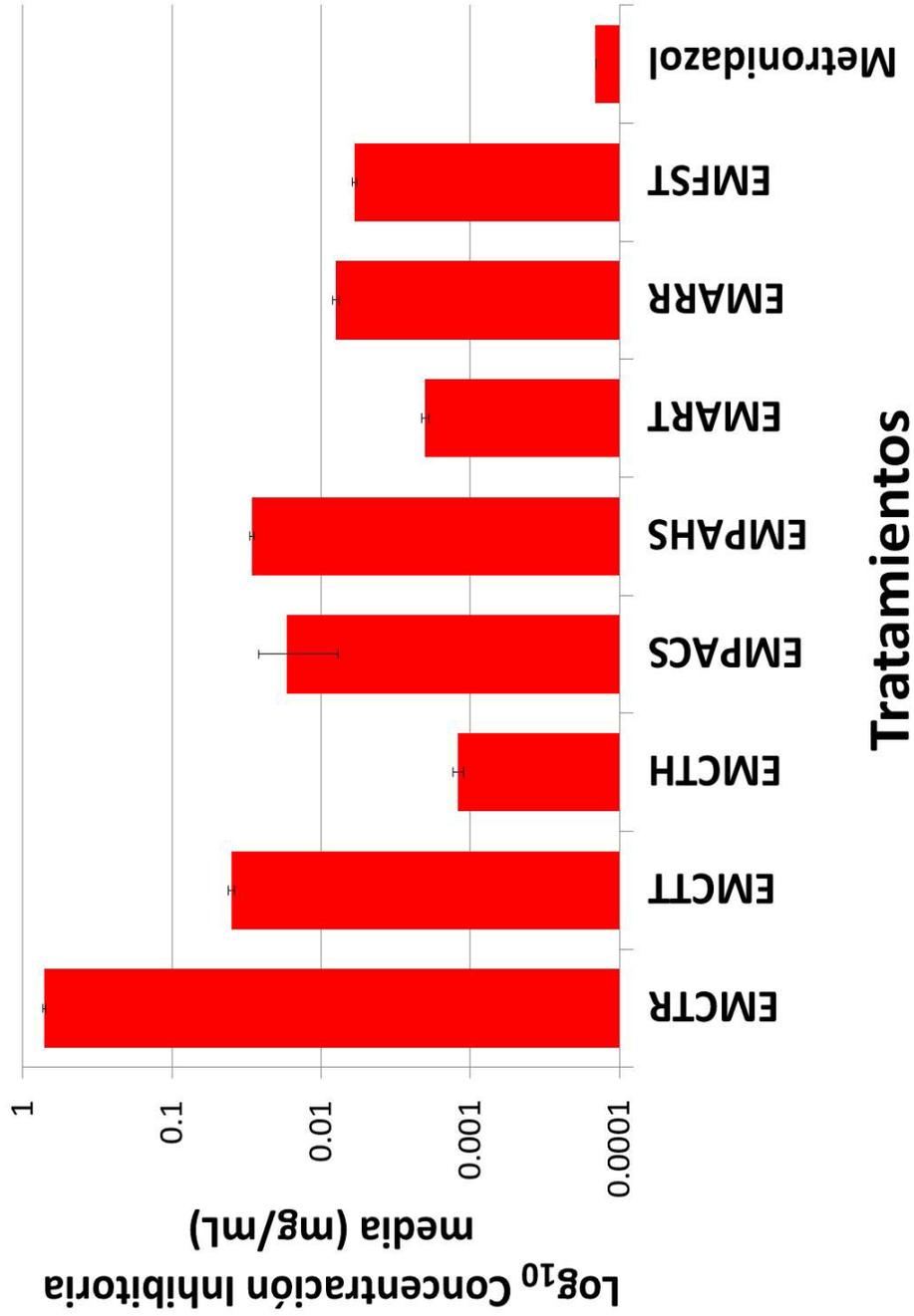


Figura 4. Concentración inhibitoria media de los extractos metanólicos sobre *E. histolytica*. Se muestran los valores en escala logarítmica de base 10, las IC₅₀ obtenidos luego del análisis PROBIT, en donde se observa el efecto de los tratamientos Extracto metanólico del tallo de *F. splendens* (EMFST), extracto metanólico del tallo de *A. retusus* (EMART), extracto metanólico de raíz de *A. retusus* (EMARR), extracto metanólico de hoja de *C. texana* (EMCTH), extracto metanólico del tallo de *C. texana* (EMCTT), extracto metanólico de raíz de *C. texana* (EMCTR), extracto metanólico de semilla de *P. americana* var Criollo (EMPACS), extracto metanólico de semilla de *P. americana* var. Hass (EMPAHS).

7.4.3 Ensayo de inhibición de la inducción de ESQ de *E. histolytica*

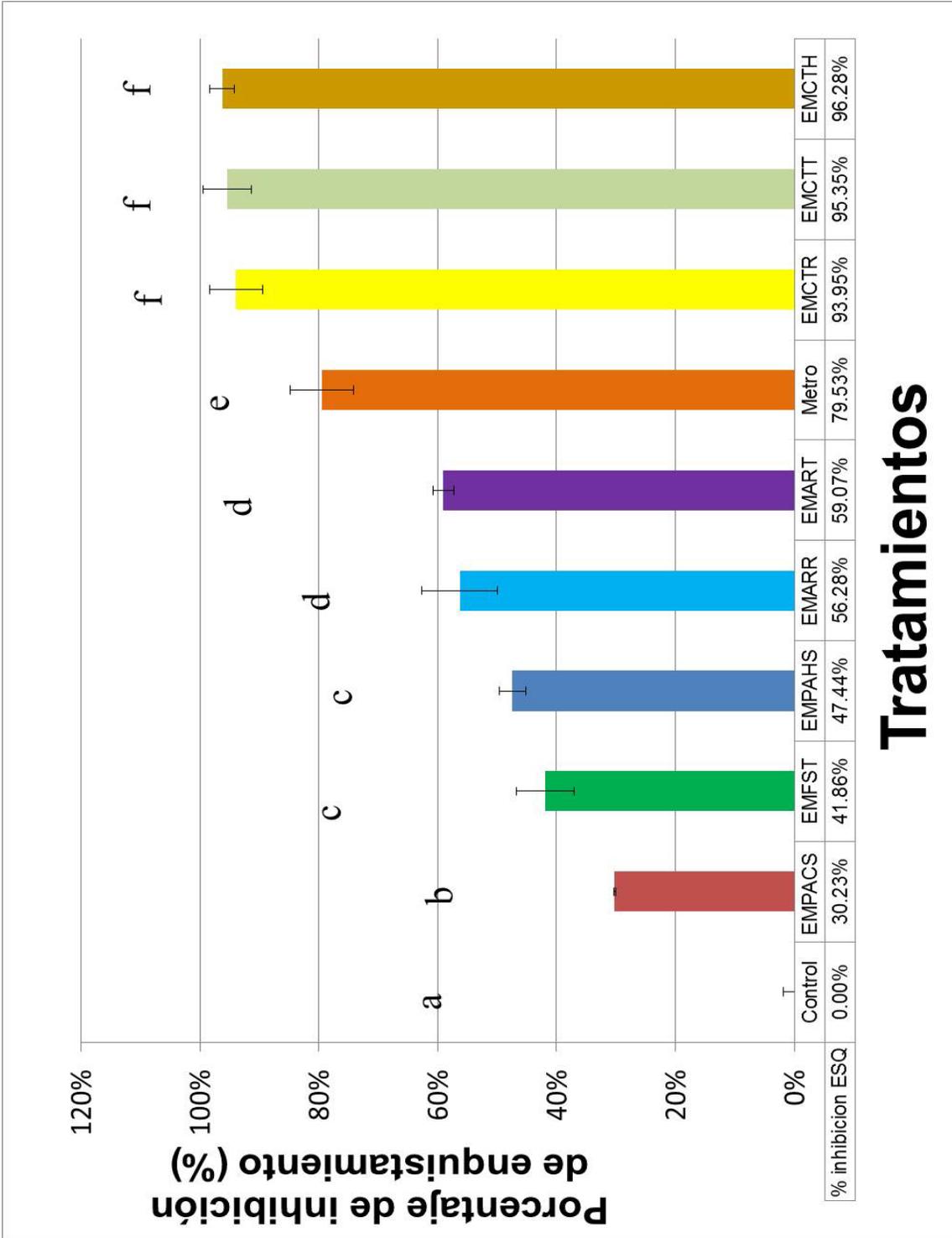
Se realizó el ensayo de inhibición de ESQ mediante los extractos metanólicos de las especies vegetales, en donde se observó que todos los extractos metanólicos tuvieron un efecto sobre el proceso de enquistamiento, con respecto al control y se observa en la Tabla 6. Los extractos que tuvieron un porcentaje mayor de inhibición corresponden a la hoja, tallo y raíz de *C. texana*, que superaron el efecto del metronidazol sobre los mismos y posteriormente se ubicaron los extractos metanólicos de tallo y raíz de *A. retusus*; mientras que el extracto con menor actividad fue la semilla de *P. americana* var. Criollo.

Al realizar el análisis estadístico de los datos se observa que existe diferencia significativa entre los tratamientos y se establecen los grupos de valores que no presentan diferencia significativa entre sí. Estos datos observados en la Figura 5, constatan que todos los tratamientos son diferentes al control, los extractos metanólicos de *P. americana* var Criollo tiene una actividad en la inhibición de las ESQ semejante al extracto del tallo de *F. splendens*. A pesar de tratarse de la misma especie, las variedades Criollo y Hass presentaron una diferencia significativa entre sí; sin embargo, entre los órganos de una misma planta no ocurre tal diferencia ya que se observa que tanto el tallo como la raíz de *A. retusus* no existe diferencia estadística significativa; así como en el caso de la actividad mostrada por los órganos de *C. texana* en donde se observa que la hoja, el tallo y la raíz tampoco presentan diferencias significativas entre sí. Además los tres órganos de esta especie vegetal tienen una actividad sobre ESQ mayor que la del metronidazol, mientras que el resto de los extractos tuvieron una actividad estadísticamente diferente e inferior al mismo.

Tabla 5
Actividad biológica de los extractos metanólicos
sobre la inducción de ESQ de *E. histolytica*

Tratamiento	Muestra	Inhibición ESQ (%)
Control		0.00 ± 0.018
Metronidazol		79.5 ± 0.053
<i>P. americana</i> var criollo	Semilla	30.2 ± 0.1
<i>P. americana</i> var Hass	Semilla	47.4 ± 2.2
<i>A. retusus</i>	Raíz	56.2 ± 6.3
	Tallo	59.0 ± 1.7
<i>C. texana</i>	Raíz	93.9 ± 4.4
	Tallo	95.3 ± 4
	Hoja	96.2 ± 2
<i>F. splendens</i>	Tallo	41.8 ± 4.8

Se observaron las estructuras resistentes a la solución de Tritón-X 0.15% durante 10 min después del tratamiento con cada extracto metanólico para determinar los porcentajes de inhibición de ESQ de los mismos. Los conteos se realizaron por triplicado al finalizar del proceso de enquistamiento.



Tratamientos

Figura 5. Efecto inhibitorio del proceso de enquistamiento de los extractos metanólicos sobre *E. histolytica*. Se muestran los valores de inhibición de formación de Estructuras semejantes a quistes por los extractos metanólicos ensayados. Las letras (a-f) representan los grupos de medias significativamente distintas arrojados por análisis de ANOVA y Tukey ($P < 0.05$).

7.5 Cuantificación de RNA total en trofozoítos y ESQ de *E. histolytica*

Se utilizaron los extractos metanólicos que presentaron al mismo tiempo mayor actividad sobre el crecimiento y la producción de ESQ de *E. histolytica*; así como presentaron una menor toxicidad en el organismo *A. salina*. Los resultados se observan en la Tabla 6, en donde se observa que en el caso de los trofozoítos el Control presentó una mayor concentración de RNA total y fue significativamente diferente al resto de los tratamientos; el metronidazol tuvo la menor cantidad de RNA total de forma significativa.

Todos los tratamientos presentan diferencia significativa entre sí a excepción del extracto metanólico de la raíz de *C. texana* y el tallo de *F. splendens* no presentan diferencia significativa entre sí. En cuanto a las Estructuras Semejantes a Quistes (ESQ) se observó que el Control no tenía diferencia significativa entre el extracto metanólico de raíz de *C. texana* y el metronidazol, y que estos tampoco tienen diferencia significativa entre sí, ni con el extracto metanólico de tallo de *A. retusus*; sin embargo el extracto de *A. retusus* y el control son estadísticamente distintos; mientras que el extracto de *F. splendens* es significativamente distinta a todos los anteriores y mayor que incluso el Control. Los grupos estadísticamente distintos se observan en la Figura 6. Los resultados resumidos se encuentran en la tabla 7, en donde se observan los extractos seleccionados para la extracción de RNA tanto de trofozoítos y quistes.

Tabla 6

RNA total en trofozoítos y ESQ de *E. histolytica* en presencia de extractos metanólicos de especies vegetales

Tratamiento	Muestra	RNA total (ng/μL)	
		Trofozoítos	ESQ
Control		2,391.11 ± 48.33	1,580.00 ± 151.07
Metronidazol		1,884.44 ± 77.31	1,747.77 ± 227.69
Extracto metanólico de <i>A. retusus</i>	Tallo	1,947.77 ± 91.75	1,836.66 ± 149.49
Extracto metanólico de <i>F. splendens</i>	Tallo	2,156.66 ± 10.86	2,466.66 ± 94.86
Extracto metanólico de <i>C. texana</i>	Raíz	1,930.00 ± 152.88	1,677.77 ± 48.16

RNA total presente en los trofozoítos y en ESQ en presencia de los tratamientos.

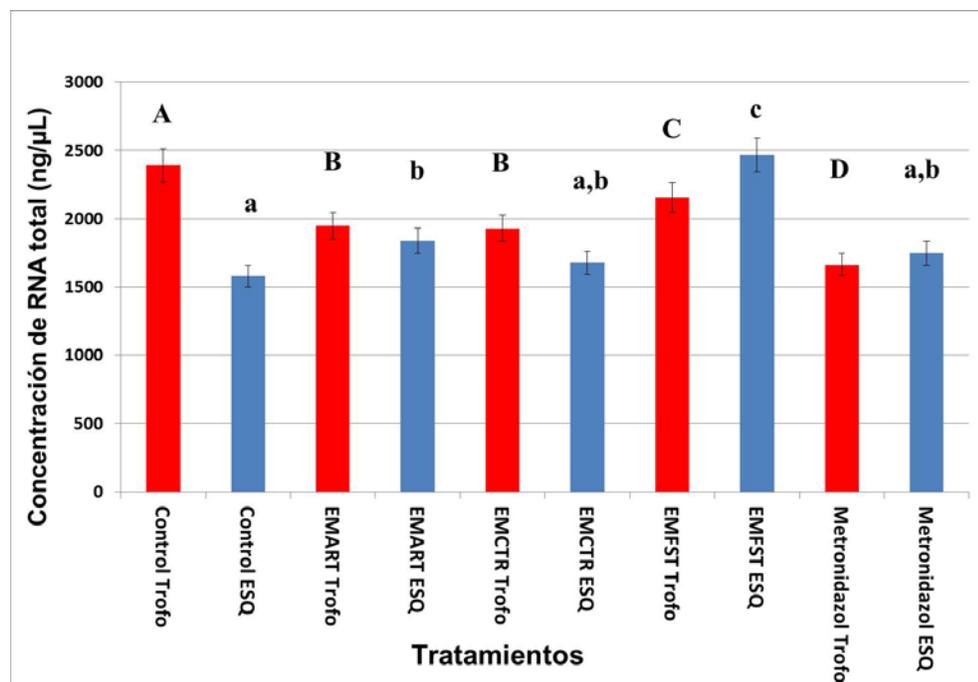


Figura 6. Concentración de RNA total sobre *E. histolytica* en presencia de los extractos metanólicos. Se

muestran los valores de RNA total presente tanto en los trofozoítos en presencia de los tratamientos Extracto metanólico del tallo de *F. splendens* (EMFST), extracto metanólico del tallo de *A. retusus* (EMART), extracto metanólico de raíz de *C. texana* (EMCTR) y Metronidazol, comparado con un grupo Control, en donde se colocan los grupos distintos significativamente en mayúsculas (A-D), así como en las Estructuras Semejantes a Quiste(ESQ) con los tratamientos Extracto metanólico del tallo de *F. splendens* (EMFST ESQ), extracto metanólico del tallo de *A. retusus* (EMART ESQ), extracto metanólico de raíz de *C. texana* (EMCTR ESQ) y Metronidazol ESQ, comparado con un grupo Control ESQ en donde se colocan los grupos distintos significativamente en minúsculas (a-c).

Tabla 7

Recopilación de los efectos biológicos de los extractos vegetales sobre el crecimiento, formación de ESQ, toxicidad y determinación de la concentración de RNA total sobre *E. histolytica*

Especie Vegetal	Órgano vegetal	Dosis Letal Media sobre <i>A. salina</i> (mg/mL)	Concentración inhibitoria media sobre <i>E. histolytica</i> (mg/mL)	Inhibición de ESQ (%)	Concentración de RNA total (ng/ul)	
					Trofozoíto	ESQ
<i>C. texana</i>	Raíz	0.056 ± 0.008	0.7180 ± 0.0157	93.9 ± 4.4	1930 ± 152.88	1677.77 ± 48.16
	Tallo	0.035 ± 0.005	0.0400 ± 0.0021	95.3 ± 4	---	---
	Hoja	0.022 ± 0.005	0.0012 ± 0.0001	96.2 ± 2	---	---
<i>A. retusus</i>	Raíz	0.43 ± 0.08	0.0080 ± 0.0004	56.2 ± 6.3	---	---
	Tallo	0.44 ± 0.08	0.0020 ± 0.0001	59.0 ± 1.7	1947.77 ± 91.75	1836.66 ± 149.49
<i>F. splendens</i>	Tallo	0.368 ± 0.100	0.0060 ± 0.0002	41.8 ± 4.8	2156.66 ± 10.86	2466.66 ± 94.86
<i>P. americana</i> var. Criollo	Semilla	0.011 ± 0.002	0.0170 ± 0.0093	30.2 ± 0.1	---	---
<i>P. americana</i> var. Hass	Semilla	0.00088 ± 0.0007	0.0290 ± 0.0010	47.4 ± 2.2	---	---
Metronidazol	N/A	8754.11 ± 40.89	0.0001442 ± 0.00002	79.5 ± 0.053	1884.44 ± 77.31	1747.77 ± 227.69
Control	N/A	N/A	N/A	0.00 ± 0.018	2391.11 ± 48.33	1580 ± 151.07

Se seleccionaron los extractos vegetales que tuvieran menor efecto tóxico, y que al mismo tiempo tuvieran actividad biológica considerable en el crecimiento y en la inhibición de ESQ para la extracción y determinación de RNA total de trofozoítos y ESQ de *E. histolytica*.

8. DISCUSIÓN

8.1 Identificación de grupos fitoquímicos presentes en los extractos metanólicos de las especies vegetales

Se realizaron las extracciones metanólicas de las especies vegetales, una vez obtenidos los sólidos extraídos se realizaron una serie de pruebas químicas para determinar la presencia de grupos químicos reactivos característicos de ciertos compuestos con actividad biológica conocida. Los compuestos identificados en las pruebas fitoquímicas en el caso de *C. texana* se corrobora con la literatura (Osuna-Torres *et al.*, 2005). Uno de los compuestos identificados de esta planta le otorga además su sabor amargo la castelina, la castelamarina y la chaparrina que son compuestos degradados de origen triterpénico denominados quassinoides, cuya estructura cíclica altamente oxigenada y se asemeja a los compuestos lactónicos. Además de la presencia de estos compuestos también se ha detectado un compuesto esteroideo en otras especies de Castela, como el compuesto 3α , 17α , $20(S)$ -trihidroxipregnano-6,16-dieno encontrado en *C. peninsularis* (Grieco *et al.*, 1994), sin embargo es posible encontrar un compuesto similar en otras especies por lo que es posible explicar la detección de ambos tipos de compuestos en las pruebas fitoquímicas de lactonas y esteroides en esta especie. También se hizo notoria la presencia de compuestos del tipo saponinas por su actividad espumante, que probablemente se encuentre formado por un componente esteroideo detectado también. Los taninos son comúnmente encontrados en plantas de sabor amargo y

son una adaptación de las plantas que evita su consumo por los depredadores (Silanikove *et al.*, 1996), al formar parte de un ecosistema desértico, este tipo de compuestos le otorga una ventaja adaptativa. No se encontraron flavonoides, flavonas en los órganos aéreos, sin embargo si se encontraron en la raíz. Las condiciones del medio ambiente que enfrenta cada órgano de la planta permite la existencia de los diferentes compuestos encontrados en los órganos de la especie vegetal. En el caso de las hojas y tallos de *C. texana* que se encuentran expuestos a condiciones de temperatura, deshidratación, presencia de patógenos, depredadores, entre otros; a diferencia de la raíz que se encuentra expuestos a condiciones de temperatura, presión osmótica, microbiota del suelo, entre otros factores distintas a las partes aéreas. La raíz de algunas plantas produce una serie de metabolitos con actividad biológica alelopática o bien fungicida, que le permite sobrevivir a un ecosistema adverso (Mahall y Callaway, 1991).

En el caso de *A. retusus* se observó la similitud entre los grupos químicos reactivos buscados entre ambos órganos de la planta. El tallo de la planta no sobresale en gran medida del suelo, por lo que la exposición a condiciones similares explica la existencia de sustancias similares producidas, la única diferencia encontrada corresponde al grupo de compuestos denominados taninos, grupo que en las plantas tiene función de bactericida, antioxidante y como sustancia antiherborismo, por lo que la existencia de tal sustancia en un órgano de la planta que se encuentra al alcance de muchos organismos, como una forma adaptativa de sobrevivencia concuerda con la evidencia de su presencia; Algunos compuestos que se pueden aislar de esta planta es la Hordenina, N-metiltriamina, N-metil-3,4-

dimetoxi- β -fenetilamina, y N-metil-4- β - fenetilamina, así como la flavona llamada retusina, o bien la 3,3',4',7-tetrametoxi-5-hidroxi-flavona (Braga y McLaughlin, 1969). Los compuestos Hordenina y N-metiltriamina son sustancias dentro de la categoría de los alcaloides por lo que esto explica que la prueba de Dragendorff sea positiva.

En el caso de *F. splendens* se observó la presencia de la gran mayoría de los compuestos a excepción de los grupos aromáticos. Esto se reafirma con la presencia de flavonoides y grupos fenólicos que explican la presencia de insaturaciones en la planta (Scogin, 1977) (Scogin, 1978) (Martínez *et al.*, 2008). Los flavonoides son sustancias muy importantes para este organismo vegetal, componen la gran mayoría de sus pigmentos, protegen la planta contra la luz UV y son mensajeros químicos. Las plantas desérticas producen este tipo de sustancias como una forma de adaptación al medio ambiente. La presencia de taninos también puede explicarse de la misma forma para evitar el herborismo de los depredadores (Silanikove *et al.*, 1996). En otros estudios se observa asimismo la presencia de otros compuestos que confirma los resultados obtenidos (Rodríguez Garza, 2010) y (Valerdi-Madriral *et al.*, 2001) en donde también se obtuvo la presencia positiva de compuestos alcaloides en el extracto vegetal.

En el caso de la especie de *P. americana* se observa en la literatura que existe evidencia de compuestos extraídos denominados alcanoles, también denominadas acetogeninas alifáticas, glucósidos terpenoides, derivados furanosos aromáticos, flavonoides y cumarinas. Algunos alcanoles aislados de esta especie son 1,2,4-trihidroxinonadecano, 1,2,4-trihidroxiheptadeca-16-eno y 1,2,4-trihidroxiheptadeca-16-ino (Yasir *et al.*, 2010).

También se han identificado otros compuestos dentro del grupo de polifenoles corresponden a monómeros flavonoles, proantocianidinas, ácido hidroxicinámico y derivados glicosilado de flavonoles. Algunos compuestos son ácido 3-O-caffeoilquinico, ácido 3-O-p-cumaroilquinico y trímeros de procianidina A (Kosińska *et al.*, 2012).

Se ha reportado el contenido de 13.6% de taninos, 13.2% de almidón, ácidos grasos dentro de los cuales el 0.6% de ácido cáprico, 1.7% ácido mirístico; 23.4 % de ácido palmítico, 8.7% de ácido esteárico, 15.1% de ácido oleico, 24.1% ácido linoléico y 2.5% ácido linolénico. Además de lo anterior de cera amarilla que contenía esteroides y ácidos orgánicos (Ikhuoria y Maliki, 2007).

También se ha observado la presencia del compuesto (2R,12Z,15Z)-2-hidroxi-4-oxoheneicosa-12,15-dienilacetato, también llamado Persina, así como derivados de este compuestos denominados Persinonas (Oelrichs *et al.*, 1995). Por otro lado, se ha realizado la extracción de compuestos de variedades de esta especie, presentándose en la semilla de ambas variedades a pesar de que las condiciones ambientales en donde crece son diferentes; sin embargo, la similitud de los tipos de

compuestos puede explicarse debido a que el metabolismo de la semilla, así como su función biológica; aun cuando probablemente los compuestos individualmente sean diferentes y que la cantidad y proporción en que se produzcan puedan ser muy diferentes.

8.2 Actividad biológica de los extractos metanólicos de las especies vegetales sobre *A. salina*

Se realizó un ensayo a distintas dosis de los extractos metanólicos de las especies vegetales sobre la viabilidad de *A. salina*, comparando las dosis letales medias de cada extracto ensayado. La utilización de este organismo en los ensayos de toxicidad se debe a que el cultivo de los nauplios es sencillo, rápido y permite determinar de manera preliminar la presencia de sustancias tóxicas (Sorgeloos, 1978).

En el presente trabajo se observó que la dosis letal media más baja se presentó en el extracto metanólico de semilla de *P. americana*. Una posible explicación de este comportamiento tóxico podría deberse a la presencia de la sustancia Persina. La Persina puede encontrarse en las hojas de esta especie y es considerada una sustancia tóxica para el ganado lactante generando en estos una mastitis no infecciosa y su consumo prolongado puede generar necrosis en el tejido mamario. En cuanto a la semilla se han realizado estudios en donde se ha observado cierto efecto tóxico sobre algunas especies de roedores, al alimentarlas con semillas molidas en el alimento, aunque en otros estudios no se logró observar tal toxicidad al utilizar un consumo de 7g/kg de peso del organismo; sin embargo al

incrementar el consumo de 10 a 14g, presentaron una mortalidad en ratones a los 2 ó 3 días posteriores (Singh *et al.*, 2012). Esto confirma la actividad tóxica que se observó de esta especie vegetal en sus dos variedades ante *A. salina*.

Se ha observado un efecto tóxico sobre líneas celulares tumorales de cáncer de mama tales como MCF-7, T-47D y MDA-MB-231. En donde se observa que las células detienen su ciclo celular en el punto G2-M. Este arresto celular se debe a la capacidad de unirse a la tubulina, formando cúmulos de microtúbulos estabilizados que generan un arresto mitótico y debido a lo cual se produce la apoptosis. Este efecto es semejante a otros compuestos inhibidores de microtúbulos como los taxoles, como el paclitaxel que se utiliza como tratamiento para algunas neoplasias (Butt *et al.*, 2006).

Ambas variedades de *P. americana* presentaron esta elevada toxicidad sobre *A. salina*, debido probablemente a que ambas variedades producen diferentes cantidades de Persina, que produce una variación en la dosis letal media sobre este organismo.

Por otra parte, *C. texana* también presentó una toxicidad elevada en cuanto a este organismo, en donde el extracto metanólico de la hoja resultó poseer la dosis letal media más baja de los tres órganos procesados de esta planta. En otros estudios se ha demostrado la existencia de cierta toxicidad de algunos compuestos derivados de esta planta, tal como la chaparrina, que en fibroblastos humanos ha presentado una toxicidad cercana al 27% a una concentración de 100 μ M (Calzado-Flores,

1995), aun cuando se presenta toxicidad a esta dosis, no significa que exista el mismo efecto en el organismo completo, dada la presencia de órganos y sistemas con funciones desintoxicantes que protegen al mismo de una intoxicación aguda. Se han realizado estudios de la actividad de esta planta en organismos completos en donde se observó cierta toxicidad, al aplicar una mezcla inyectable de tres compuestos aislados de esta planta (castelina, castelagenina y castelamarina) provocando muerte al ser aplicada por vía cutánea en dosis superiores a 1g/kg en cobayos y 0.25g/kg en perros, mientras que en estos últimos al ser aplicada de forma intravenosa, una dosis superior a 0.10g/kg es considerada mortal (Osuna-Torres *et al.*, 2005). Sin embargo, en otro estudio se realizó administrando de forma intragástrica el extracto metanólico de la raíz de la planta, no presentándose efecto notable aún a la dosis más alta ensayada de 30 mg/kg (Calzado-Flores *et al.*, 1998). Por otro lado, el extracto acuoso completo obtenido de esta misma planta no presenta efecto inhibitorio en el crecimiento de células hepáticas de ratón incluso a una dosis de 108 µg/mL (Reyes-López *et al.*, 2005). La toxicidad en dosis tan elevadas de compuestos o de los extractos de ésta planta en otros organismos más complejos que *A. salina*, hace pensar en la existencia de cierta predisposición de que algunos de los compuestos de esta planta posean una toxicidad más elevada en este organismo que en las células de otros, tales como se demuestra en los estudios realizados en mamíferos.

Los extractos vegetales con dosis letales medias más altas fueron los obtenidos a partir de las especies vegetales de *F. splendens* y *A. retusus*, estos datos son muy similares a los obtenidos en la literatura (Rodríguez Garza, 2010). El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norte América declara que la especie vegetal *F. splendens* no posee toxicidad alguna, a pesar de que es una planta desértica, no se conoce compuestos derivados de esta planta que tengan un efecto tóxico sobre seres humanos (USDA, 2013). Esto concuerda con los resultados obtenidos en el ensayo de toxicidad en *A. salina*, en donde presentó una de las dosis letales medias más altas (0.368 ± 0.100 mg/mL) y por lo tanto con menor toxicidad sobre este organismo; sin embargo, esta cifra representa una toxicidad moderada en el modelo biológico seleccionado que podría deberse a la presencia de compuestos antinutricionales presentes como los taninos (Silanikove *et al.*, 1996) o bien un efecto biológico producido por la presencia de alcaloides en el extracto vegetal, tal como se observó mediante las pruebas fitoquímicas realizadas.

Aun cuando las especies del género *Ariocarpus* poseen sustancias del tipo alcaloide que pueden producir en dosis muy pequeñas alteraciones importantes en las células, *A. retusus*, no presentó una toxicidad tan elevada como se esperaba, esto puede deberse a que la concentración de alcaloides presentes en el tejido no es tan elevada como el caso de otras especies de *Ariocarpus*, ya que su contenido de Hordenina no excede el 0.02% de su contenido seco (Batis y Rojas, 2002), aun cuando puede provocar una respuesta neurofarmacológica en seres humanos (Díaz, 2003).

En cuanto a la baja toxicidad aguda mostrada por el fármaco Metronidazol, ya se ha reportado en la literatura; sin embargo, este organismo tiende a acumular altas concentraciones de este compuesto si se expone de manera crónica. Se ha reportado que puede acumular hasta entre 137–143 mg/kg sin generar en este organismo ningún tipo de daño (Rodríguez *et al.*, 2011), por lo que se ha utilizado esta vía como una forma de medicación de organismos acuáticos que las consuman. Este proceso se le determina bioencapsulación de metronidazol. Sin embargo, se ha reportado casos en seres humanos en donde el uso prolongado del fármaco ha provocado daños hepáticos, leucopenia, convulsiones, daño en el sistema nervioso periférico, entre otros problemas de salud (Kapoor *et al.*, 1999).

8.3 Actividad biológica de los extractos metanólicos de las especies vegetales sobre el crecimiento de *E. histolytica*

Los extractos metanólicos que tuvieron la concentración inhibitoria media más baja en los ensayos realizados corresponden a la hoja de *C. texana* (0.0012 ± 0.0001 mg/ml), el tallo de *F. splendens* (0.0060 ± 0.0002 mg/ml) y al tallo de *A. retusus* (0.0020 ± 0.0001 mg/ml). En cuanto a la actividad biológica de *C. texana* sobre el trofozoíto de *E. histolytica* se corrobora con los datos reportados en otros trabajos (Calzado-Flores *et al.*, 2002). Sin embargo, aun cuando existen reportes en donde la raíz de la planta es la que presenta actividad en contra del parásito, en este trabajo es la hoja que presenta una mayor actividad parasiticida. Esto se comprueba en otro estudio realizado anteriormente (Barrón-González *et al.*, 2010).

En cuanto a la actividad presentada por *A. retusus* sobre *E. histolytica* también se ha descrito en la literatura (Rodríguez Garza, 2010). Es posible que la presencia de compuestos con actividad microbicida como las saponinas, cuya actividad amebicida ha sido demostrada en otras plantas, como *Albizzia anthelmintica* (Subki-Khalid, 1991), e inclusive podría tratarse de la actividad de compuestos de tipo alcaloide, tal como el caso de la emetina que es un conocido amebicida (Náquira, 1997).

El hecho de que los extractos de tallo y raíz se comportaran distintos, podría deberse a que a pesar de poseer perfiles fitoquímicos similares, la diferencia en la concentración de los compuestos activos en la matriz del extracto de ambos órganos haya permitido observar tales diferencias.

Por otro lado el extracto metanólico de *F. splendens* también demostró toxicidad sobre *E. histolytica*, esta actividad también se ha demostrado en la literatura (Rodríguez Garza, 2010) y (Barrón-González *et al.*, 2010). En las pruebas fitoquímicas este extracto resultó tener compuestos como cumarinas y saponinas, dentro de las cuales se sabe que algunas poseen efecto antiparasitario. Las cumarinas se sabe que también tienen un efecto sobre el parásito, dado que se han extraído compuestos activos de importancia como la 7-hidroxycumarina y la 7-b-D-glucosilcumarina, obtenidos a partir de la planta *Adina cordyfolia* (Rani, 2011).

Otro de los extractos que demostró tener una actividad sobre los trofozoítos de *E. histolytica* es *P. americana* tanto su variedad Hass como la Criolla, que aun cuando no tuvo una concentración inhibitoria media menor que la obtenida por *C. texana*, si presentó una inhibición importante sobre el crecimiento del parásito.

Esta actividad se ha reportado en extractos de hoja y corteza de esta planta, sin embargo se utilizó una extracción utilizando metanol:cloruro de metileno (Moundipa *et al.*, 2005). Otro reporte en donde se ha realizado un extracto etanólico de las semillas de *P. americana*, en donde se observa una actividad importante del extracto sobre *E. histolytica* y *Giardia lamblia*, similar a la actividad encontrada en el presente trabajo. El efecto tóxico sobre *G. lamblia* observado se atribuye a la presencia de un compuesto denominado epicatequina (Jiménez-Arellanes *et al.*, 2013); sin embargo, se desconoce si este compuesto tiene actividad amebicida también. Existen otros estudios en donde se involucra el extracto con otro tipos de actividades biológicas, tal como el caso de un efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas inducidas por aplicación del fármaco Alloxan (Alhassan *et al.*, 2012). Esta tipo de actividad le otorga un valor agregado a la semilla de esta planta que normalmente es desechada, luego de ingerir la pulpa carnosa del fruto. Por lo que estos compuestos surgen como una nueva perspectiva que se suma a otras en la búsqueda de un uso de este subproducto de consumo.

Entre otras investigaciones, se ha buscado una utilidad económica a la semilla de aguacate, obteniéndose plásticos derivados de los compuestos presentes (Biofase, 2012), así como se ha utilizado como estabilizante en la elaboración de cárnicos (Rodríguez-Carpena, 2011).

8.4 Actividad biológica de los extractos metanólicos de las especies vegetales sobre el proceso de formación de Estructuras Semejantes a Quistes(ESQ) de *E. histolytica*

Los extractos metanólicos que demostraron un mayor porcentaje de inhibición de Estructuras Semejantes a Quistes (ESQ) fueron los extractos obtenidos a partir de los órganos de *C. texana* (el extracto de hoja produjo una inhibición del $96.2\% \pm 2$, la raíz mostró una inhibición del $93.9\% \pm 4.4$ y el tallo, $95.3\% \pm 4$) y posteriormente los obtenidos a partir de *A. retusus* (observando una inhibición del $56.2\% \pm 6.3$. en el extracto de raíz y un $59.0\% \pm 1.7$). En la literatura se pueden encontrar que *C. texana* presenta porcentajes superiores al 50% de inhibición de quistes producidos por *E. invadens*, lo cual corrobora los datos obtenidos en este trabajo a pesar de no tratarse de la misma especie. Debido a la dificultad del proceso de enquistamiento en *E. histolytica*, existen muy pocos reportes sobre el mismo, por lo que los datos que se obtienen en la literatura corresponden a *E. invadens* (Calzada-Flores *et al.*, 2007).

Se han reportado otros inhibidores del proceso de enquistamiento tal como la micotoxina afidicolina producida por *Cephalosporium aphidicola* (Kumagai *et al.*, 1998). Por otra parte, se han realizado estudios con distintos compuestos tales como NaF, cicloheximida y actinomicina-D. Estos compuestos tienen la capacidad de detener la síntesis de proteínas por las primeras dos (Collado *et al.*, 1982), (Colombo *et al.*, 1965), (Ravel *et al.*, 1966) y material genético de la última (Reich *et al.*, 1962) y (Goldberg y Reich, 1964).

Sin embargo, se observó que la presencia de tales sustancias induce de forma lenta la formación de compuestos cromatoidales, los cuales se encuentran relacionados con el proceso de enquistamiento en *E. invadens* (Kusamrarn *et al.*, 1975); sin embargo, no siempre se observan en quistes aislados de *E. histolytica*.

Algunos compuestos alcaloides tienen la capacidad de unirse al ribosoma (Grollman, 1966), inhibiendo la producción de proteínas en la célula, sin embargo a pesar de la presencia de compuestos alcaloides en *A. retusus*, no se observó un incremento en la formación de estructuras semejantes a quistes, como el caso de los compuestos anteriormente mencionados que promovían el proceso de enquistamiento en *E. invadens*.

Otro factor que se ha demostrado que influye sobre el proceso de enquistamiento son una serie de compuestos que son sintetizados por la flora presente en el colon, denominados ácidos grasos de cadena corta. Un incremento en la síntesis de estos compuestos disminuye significativamente la producción de quistes en *E. invadens* (Byers *et al.*, 2005). Si bien los extractos anteriores fueron los que produjeron un porcentaje de inhibición mayor, todos los extractos ensayados presentaron actividad inhibitoria importante sobre *E. histolytica*.

En la literatura se observa que un compuesto lipídico presenta una inhibición en el proceso de enquistamiento en *E. invadens* es la wartmannina, un compuesto esteroideo que sirve de inhibidor de una ruta de señalización de la fosfoinositidil quinasa (Makioka *et al.*, 2001). Debido a que todos los extractos fueron positivos

para la presencia de compuestos esteroideos, es posible que en los extractos obtenidos exista un compuesto similar, o bien con una geometría molecular semejante que pudiera actuar de esa forma.

A pesar de que el extracto de *P. americana* había presentado actividad importante en el estadio trofozoíto del parásito, ninguna variedad superó el 50% en la inhibición de la inducción de Estructuras semejantes a Quistes (ESQ). Este fenómeno también se observó en el caso del extracto de *F. splendens*. Es probable que este fenómeno se deba a que el compuesto parasiticida puede ser algún tipo de saponinas o algún compuesto que afectara la membrana plasmática; por lo que la producción de una pared de quitina resistente a la acción detergente, por lo que no tuvo un gran efecto sobre la inhibición del proceso de enquistamiento.

8.5 Cuantificación de RNA total en trofozoítos y ESQ de *E. histolytica* en presencia de los extractos metanólicos de especies vegetales

Para el ensayo de cuantificación de RNA total a partir de trofozoítos y quistes, se seleccionaron los extractos metanólicos de las especies vegetales que no tuvieron una alta toxicidad, y que demostraron tener actividad tanto en el estadio trofozoíto como en la inhibición del proceso de enquistamiento. Así que se utilizaron los extractos metanólico obtenido de la raíz de *C. texana*, el extracto de tallo de *A. retusus* y el extracto obtenido de tallo de *F. splendens*.

Se observó que el cultivo de trofozoítos sin extracto metanólico de las especies vegetales presentó una mayor concentración de RNA total que el cultivo que atravesó el proceso de enquistamiento sin tratamiento alguno. Este dato es posible al considerar que aun cuando las Estructuras Semejantes a Quistes (ESQ) comiencen a almacenar material genético para el momento en el que ocurra el desenquistamiento, el trofozoíto como una célula activa, presenta una mayor concentración de RNA mensajero.

Mientras que en el caso del metronidazol se observa una disminución importante de material genético con respecto a los demás tratamientos. Este fenómeno se explica dado que el compuesto blanco del metronidazol son las bases guanina-citosina (G-C) del material genético, que afectó en mayor medida al estadio de trofozoíto (Knight *et al.*, 1978).

Todos los tratamientos presentaron un efecto inhibitor en el estadio trofozoíto. El extracto de *C. texana* y *A. retusus* presentaron una disminución de RNA total sin diferencia significativa entre ambos. Al buscar en la literatura se observa que *C. texana* tiene un efecto antimutagénico identificado mediante la prueba de Ames, en células hepáticas de ratón utilizando norfloxacin como mutágeno (Reyes-López *et al.*, 2005); por lo que el extracto no podría ejercer su actividad mediante la alteración del material genético; sin embargo, las cumarinas presentes en esta planta, pueden unirse a la proteína DNA girasa y a otras proteínas que interactúan con el DNA, disminuyendo su actividad (Maxwell, 1993).

En el caso de la disminución de RNA en células expuestas al extracto metanólico de *A. retusus*, se podría explicar debido a que algunos alcaloides pueden inhibir la producción de proteínas y enzimas, que podrían estar involucradas en el proceso de transcripción (Arlt *et al.*, 2012) y (Yoon *et al.*, 2005).

En cuanto al proceso de enquistamiento se observó un aparente incremento en la concentración de RNA total en todos los extractos metanólicos con respecto al control, a excepción del tratamiento con metronidazol que es similar al control. Así como la concentración de RNA total del control es menor 1.5 veces que la concentración alcanzada por el cultivo de trofozoítos sin extracto vegetal. Esto se explica debido a que se ha observado en *E. invadens* que durante el proceso de enquistamiento se produce una serie de cambios estructurales en la célula; además de una disminución en los metabolitos relacionados con la vía de glicólisis, de los aminoácidos presentes, así como un incremento breve en las primeras 2 horas del proceso de enquistamiento en los nucleótidos fosfatados (incluyendo las mono, di y trifosfatados) utilizados tanto como energía química como precursores en la biosíntesis de los ácidos nucleicos; sin embargo, luego de este tiempo existe un decremento drástico hasta alcanzar una concentración de un nmol por cada millón de células analizadas, este fenómeno se puede explicar dado que los metabolitos de glicólisis producen la energía química necesaria para la biosíntesis de quitina (Jeelani *et al.*, 2012); sin embargo, en un estudio se observa una disminución importante en la actividad de la DNA polimerasa durante el proceso de enquistamiento de *E. invadens* (Kumagai *et al.*, 1998); mientras que en otra especie de amiba *Acanthamoeba castellanii*, se ha observado que durante la fase

de enquistamiento tanto desarrollado de forma espontánea al llegar el cultivo a la fase estacionaria así como el inducido experimentalmente, se aprecia una disminución drástica en la concentración de RNA total en quistes maduros (Stevens y Pachler, 1973), esto explicado dado que se ha observado un decremento en la actividad de la RNA polimerasa dependiente de DNA en este organismo durante la fase de quiste (Rudick y Weisman, 1973). Esta disminución de RNA en la fase quística se observó también en otro estudio (Barrón (Barrón-González *et al.*, 2008).

Estadísticamente se observó que el extracto de *F. splendens* ($2,466.66 \pm 94.86$) y *A. retusus* ($1,836.66 \pm 149.49$), poseen un incremento de la concentración de RNA total obtenido con respecto al control ($1,580.00 \pm 151.07$). Mientras que *C. texana* ($1,677.77 \pm 48.16$) y el metronidazol ($1,747.77 \pm 227.69$) no tuvieron una diferencia significativa entre ellos ni con el control. En la literatura se menciona que algunos compuestos del tipo flavonoide pueden unirse al material genético tanto del DNA como del RNA y protegerlo del ataque de radicales libres, por lo que es probable que los flavonoides presentes en *F. splendens* haya protegido al DNA y RNA de la degradación de radicales libres y presenta una concentración de RNA semejante al cultivo de trofozoítos sin tratamientos (Kanakakis *et al.*, 2007). Es posible que la presencia de estos compuestos permita la protección del RNA de las ESQ en otros extractos vegetales, ya que probablemente la disminución del material genético se deba a que se deje de producir en alguna etapa del proceso de inducción del enquistamiento y el RNA restante soporta las reacciones de degradación del mismo. Mientras que en el caso de los trofozoítos ocurre un efecto

opuesto. El trofozoíto metabólicamente activo probablemente es afectado si alguno de los compuestos interfiere en la biosíntesis de RNA, debido a que en este estadio no se disminuye la producción de material genético de forma inherente.

9. CONCLUSIONES

Se obtuvieron los extractos metanólicos de las especies vegetales *A. retusus*, *F. splendens*, *C. texana* y *P. americana*. Al realizarse las pruebas fitoquímicas a cada uno de los extractos se obtuvo una gran variedad de compuestos químicos. La presencia de alcaloides, flavonoides, cumarinas y saponinas en algunos extractos vegetales indica una posible actividad biológica.

En este trabajo se observó que los extractos de *P. americana* tanto la variedad Hass como Criolla presentaron la toxicidad más elevada en el modelo biológico de *A. salina*; mientras que los extractos metanólicos de *A. retusus* y *F. splendens* presentaron la menor toxicidad.

Se observó que los extractos metanólicos de tallo y raíz de *A. retusus* y el tallo de *F. splendens* presentaron una mayor actividad biológica sobre el crecimiento axénico de *E. histolytica* HM1:IMSS *in vitro*.

Se observó que todos los extractos ensayados (excepto *P. americana* var. Criollo) tuvieron un porcentaje inhibitorio de las estructuras semejantes a quistes aproximadamente del 50% o superior. Los extractos metanólicos de tallo, raíz y hoja de *C. texana* presentaron una mayor actividad biológica sobre el proceso de enquistamiento axénico de *E. histolytica* HM1:IMSS *in vitro*.

Se concluye que los extractos metanólicos tuvieron un efecto sobre la concentración de RNA total celular tanto en durante el crecimiento como el proceso de enquistamiento de *E. histolytica*. Los extractos vegetales disminuyeron la concentración de RNA total presente en el cultivo de trofozoítos de *E. histolytica* HM1:IMSS con respecto al control, en donde los extractos de *A. retusus* y *C. texana* presentaron la mayor disminución.

Se concluye que en el proceso de enquistamiento de *E. histolytica* HM1:IMSS, todos los extractos metanólicos permitieron un incremento del RNA extraído, con respecto al control. El extracto metanólico de *F. splendens* presento el mayor incremento de RNA total extraído.

10. PERSPECTIVAS

En esta investigación se dieron respuestas a algunas de las incógnitas planteadas; sin embargo, deja algunas preguntas que podrían averiguarse en el futuro. Alguno de los aspectos que podrían dilucidar de mejor manera los compuestos activos involucradas en las actividades biológicas observadas, sería la separación de tales compuestos mediante cromatografía en capa fina u otra técnica de separación. Al probar cada fracción y determinar su efecto, se puede determinar la identidad de los compuestos presentes mediante técnicas de resonancia magnética nuclear.

Para determinar si existe un efecto tóxico importante, se pueden exponer el modelo biológico de *A. salina* a las fracciones de compuestos activa y determinar la toxicidad de los mismos. Por otro lado, estos compuestos y fracciones se deben probar en otros modelos biológicos más complejos y más relacionados a los seres humanos para determinar si existe toxicidad en estos modelos también. Además las fracciones que mayor actividad poseen pueden someterse a técnicas de cromatografía capilar para determinar las diferencias metabólicas entre el cultivo del parásito sin tratamiento y a las células expuestas a esta fracción, y de esta forma determinar el posible mecanismo de acción de la fracción tanto del estadio trofozoíto y del quiste. Para determinar el efecto sobre la expresión genética en presencia de la fracción activa, se determinaría mediante técnicas de qPCR sobre genes relacionados con el proceso de enquistamiento y observar si el efecto inhibitorio se observa por la desregulación de alguno de estos genes.

11. LITERATURA CITADA

11.1 Artículos de Revistas Científicas

- Aguilar-Díaz H, Carrero JC, Argüello-García R, Laclette JP, Morales-Montor J. 2011. Cyst and encystment in protozoan parasites: optimal targets for new life-cycle interrupting strategies? *Trends in Parasitology*. 27: 450-458.
- Aguilar-Díaz H, Díaz-Gallardo M, Laclette JP, Carrero JC. 2010. *In vitro* induction of *Entamoeba histolytica* cyst-like structures from trophozoites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 4: e607.
- Aguilar-Díaz H, Laclette JP, Carrero JC. 2013. Silencing of *Entamoeba histolytica* glucosamine 6-phosphate isomerase by RNA interference inhibits the formation of cyst-like structures. *Biomed Research International*. 2013: 758341.
- Ahlfors SR, Sterner O, Hansson C. 2003. Reactivity of contact allergenic haptens to amino acid residues in a model carrier peptide, and characterization of formed peptide-hapten adducts. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* 16: 59-68.
- Alhassan A, Sule M, Atiku M, Wudil A, Abubakar H, Mohammed S. 2012. Effects of aqueous avocado pear (*Persea americana*) seed extract on alloxan induced diabetes rats. *Greener Journal of Medical Sciences* 2: 5 - 11.
- Arlt A, Sebens S, Krebs S, Geismann C, Grossmann M, Kruse ML, Schreiber S, Schäfer H. 2012. Inhibition of the Nrf2 transcription factor by the alkaloid trigonelline renders pancreatic cancer cells more susceptible to apoptosis through decreased proteasomal gene expression and proteasome activity. *Oncogene*. 10.1038/onc.2012.493
- Balamuth W. 1951. Biological studies on *Entamoeba histolytica*. III. Induced encystation in several mediums, including an account of a new procedure. *Journal of Infectious Diseases* 88: 230-236.

- Barrón-González M, Mata-Cárdenas B, Villarreal-Treviño L, Morales-Rubio M, Morales-Vallarta M. 2012. Inhibición del enquistamiento de *Entamoeba histolytica* por *Lactococcus lactis*. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas* 43: 31 - 37.
- Barrón-González MP, Villarreal-Treviño L, Reséndez-Pérez D, Mata-Cárdenas BD, Morales-Vallarta MR. 2008. *Entamoeba histolytica*: cyst-like structures in vitro induction. *Experimental Parasitology*. 118: 600-603.
- Batis A, Rojas M. 2002. El peyote y otros cactus alucinógenos de México. CONABIO. *Biodiversitas*. 40: 12 - 17.
- Baxt LA, Singh U. 2008. New insights into *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Current Opinion on Infectious Diseases*. 21: 489-494.
- Bhattacharya A, Bhattacharya S, Ackers JP. 1999. Nontranslated polyadenylated ribonucleic acids from the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Current Science* 77: 564-567.
- Bracha R, Diamond LS, Ackers JP, Burchard GD, Mirelman D. 1990. Differentiation of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* by using specific DNA probes. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 680-684.
- Bracha R, Mirelman D. 1984. Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole. *Journal of Experimental Medicine*. 160: 353-368.
- Bracha R, Nuchamowitz Y, Anbar M, Mirelman D. 2006. Transcriptional silencing of multiple genes in trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathogens*. 2: e48.
- Braga DL, McLaughlin JL. 1969. Cactus alkaloids. V. Isolation of hordenine and N-methyltyramine from *Ariocarpus retusus*. *Planta Médica*. 17: 87-94.
- Brown R. 1980 Competition experiments between parthenogenetic and asexual strains of the brine shrimp, *Artemia salina*. *Ecology*. 61:471-474.
- Burch D, Li E, Reed S, Jackson F, Stanley S. 1991. Isolation of a Strain-Specific *Entamoeba histolytica* cDNA Clone. *Journal of Clinical Microbiology*. 29: 696 – 701.
- Butt AJ, *et al.* 2006. A novel plant toxin, persin, with in vivo activity in the mammary gland, induces Bim-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapy*. 5: 2300-2309.

- Byers J, Faigle W, Eichinger D. 2005. Colonic short-chain fatty acids inhibit encystation of *Entamoeba invadens*. *Cell Microbiology*. 7: 269-279.
- Cabrejos M. ME, Tamayo C. E, Maldonado M. E. 2001. Análisis molecular del proceso de transcripción de genes en eucariontes. *Revista chilena de pediatría* 72: 401-407.
- Calzada F. 2005. Additional antiprotozoal constituents from *Cuphea pinetorum*, a plant used in Mayan traditional medicine to treat diarrhoea. *Phytotherapy Research*. 19: 725-727.
- Calzada-Flores C, Verde-Star J, Morales-Vallarta M, Segura-Luna J. 2007. Inhibición del proceso de enquistamiento de *Entamoeba invadens* por *Castela texana*. *Revista Ciencia UANL* 10: 44-48.
- Calzado-Flores C, Guajardo-Touche EM, Carranza-Rosales MP, Segura-Luna JJ. 1998. In vitro anti-trichomonoc activity of *Castela texana*. *Proceedings of Western Pharmacology Society*. 41: 173-174.
- Campbell D, Chadee K. 1997. Survival strategies of *Entamoeba histolytica*: Modulation of cell-mediated immune responses. *Parasitology Today*. 13: 184-190.
- Carretero Accame M. 2000. Lípidos. *Panorama actual del medicamento*. 24: 122-125
- Castro-Buendía M, Rojas-Wastavino G, De Haro-Arteaga I, Salazar-Schettino P. 1995. Búsqueda de quistes y huevos de parásitos intestinales humanos en vegetales y frutas. *Revista Mexicana de Patología Clínica* 42: 129-135.
- Chávez-Munguía B, Cristóbal-Ramos AR, González-Robles A, Tsutsumi V, Martínez-Palomo A. 2003. Ultrastructural study of *Entamoeba invadens* encystation and excystation. *Journal of Submicroscopy, Cytology and Pathology*. 35: 235-243.
- Cheeke P. 1970. Nutritional and physiological implications of saponins: A review. *Canadian Journal of Animal Science* 51: 621-632.
- Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y. 1998. Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38: 421-464.
- Churbanov A, Rogozin IB, Deogun JS, Ali H. 2006. Method of predicting splice sites based on signal interactions. *Biology Direct* 1: 10.

- Citronberg R, Semel J. 1995. Severe vaginal infection with *Entamoeba histolytica* in a woman who recently returned from Mexico: case report and review. *Clinical Infectious Disease*. 20: 700-702.
- Collado ML, Garibay A, Barroeta O, Kretschmer RR. 1982. Effect of cycloheximide on the inhibition of chemotaxis in human monocytes caused by products of *E. histolytica*. *Archivos de Investigación Médica (Mex)* 13 Suppl 3: 273-276.
- Colombo B, Felicetti L, Baglioni C. 1965. Inhibition of protein synthesis by cycloheximide in rabbit reticulocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 18: 389-395.
- Conde M, de la Mora C. 1992. - *Entamoeba histolytica*: un desafío vigente. *Salud Pública de México*. 34(3): 335-341.
- Coppi A, Merali S, Eichinger D. 2002. The enteric parasite *Entamoeba* uses an autocrine catecholamine system during differentiation into the infectious cyst stage. *Journal of Biology and Chemistry*. 277: 8083-8090.
- Cornejo Juárez P, Avilés-Salas A. 2003. Vulvar amebiasis. Report of a case and review of the literature. *Ginecología y Obstetrica de México*. 71: 71-74.
- Cox F. 2002. History of Human Parasitology. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 595-612.
- Culbertson C. 1971. The pathogenicity of soil amebae. *American Review of Microbiology* 25: 231-254.
- Das S, Lohia A. 2002. Delinking of S phase and cytokinesis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiology*. 4: 55-60.
- de la Vega H, Specht CA, Semino CE, Robbins PW, Eichinger D, Caplivski D, Ghosh S, Samuelson J. 1997. Cloning and expression of chitinases of *Entamoebae*. *Molecular and Biochemistry in Parasitology*. 85: 139-147.
- de Morais SM, Facundo VA, Bertini LM, Cavalcanti ESB, Anjos Júnior JFD, Ferreira SA, de Brito ES, de Souza Neto MA. 2007. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species. *Biochemical Systematics and Ecology* 35: 670-675.

- del Refugio Ramos M, Jerz G, Villanueva S, López-Dellamary F, Waibel R, Winterhalter P. 2004. Two glucosylated abscisic acid derivatives from avocado seeds (*Persea americana* Mill. Lauraceae cv. Hass). *Phytochemistry* 65: 955-962.
- Díaz J. 2003. Las plantas mágicas y las conciencias visionarias. *Arqueología Mexicana* 10: 17-25.
- Eichinger D. 2001. Encystation in parasitic protozoa. *Current Opinion in Microbiology*. 4: 421-426.
- Field J, Van Dellen K, Ghosh SK, Samuelson J. 2000. Responses of *Entamoeba invadens* to heat shock and encystation are related. *Journal of Eukaryotical Microbiology*. 47: 511-514.
- Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. 2007. PCR detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in stool samples from Sydney, Australia. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 1035-1037.
- Gallego M, Gomez-Marin J, Torres E, Lora F. 2003. Prevalencia de *Entamoeba histolytica* en asentamientos temporales post-terremotos de la ciudad de Armenia. *Infectology* 7: 190-194.
- Ghosh S, Van Dellen K, Chatterjee A, Dey T, Haque R. 2010. The Jacob2 Lectin of the *Entamoeba histolytica* Cyst Wall Binds Chitin and Is Polymorphic. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 4: e750.
- Ghosh SK, Field J, Frisardi M, Rosenthal B, Mai Z, Rogers R, Samuelson J. 1999. Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. *Infection and Immunity*. 67: 3073-3081.
- Goldberg IH, Reich E. 1964. Actinomycin inhibition of RNA synthesis directed by DNA. *Federation Proceedings*. 23: 958-964.
- Gómez C, Ramirez M, Calixto-Galvez M, Medel O, Rodríguez MA. 2010. Regulation of Gene Expression in Protozoa Parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010: 1 - 24.
- Grieco PA, Moher ED, Seya M, Huffman JC, Grieco HJ. 1994. A quassinoid (peninsularinone) and a steroid from *Castela peninsularis*. *Phytochemistry* 37: 1451-1454.

- Grodberg J, Salazar N, Oren R, Mirelman D. 1990. Autonomous replication sequences in an extrachromosomal element of a pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Nucleic Acids Research*. 18: 5515-5519.
- Grollman AP. 1966. Structural basis for inhibition of protein synthesis by emetine and cycloheximide based on an analogy between ipecac alkaloids and glutarimide antibiotics. *Proceedings of National Academy of Science in USA*.56: 1867-1874.
- Guerra de León J, Nogueiras-Lima C, Laguna-Granja A, De Rojas-Pérez M. 2007. Estudio de las ceras obtenidas de hojas del *Agave brittoniana t*. *Revista cubana de quimica* 19: 62-64.
- Guzmán-Silva MA, Santos HL, Peralta RS, Peralta JM, de Macedo HW. 2013. Experimental amoebic liver abscess in hamsters caused by trophozoites of a Brazilian strain of *Entamoeba dispar*. *Experimental Parasitology*. 134: 39-47.
- Henrickson J. 1969. Anatomy of periderm and cortex of Fouquieriaceae. *Aliso* 7: 97-126.
- Henrickson. 1972. A taxonomic revision of Fouquieriaceae. *Aliso* 7: 439-537.
- Hernández-Campos ME, Campos-Rodríguez R, Tsutsumi V, Shibayama M, García-Latorre E, Castillo-Henkel C, Valencia-Hernández I. 2003. Nitric oxide synthase in *Entamoeba histolytica*: its effect on rat aortic rings. *Experimental Parasitology*. 104: 87-95.
- Hernández-Cortez C, Aguilera-Arreola M, Castro-Escarpulli G. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiology*. 31: 137-151.
- Ikhuoria E, Maliki M. 2007. Characterization of avocado pear (*Persea americana*) and African pear (*Dacryodes edulis*) extracts. *African Journal of Biotechnology*. 6: 950-952.
- Javier-Zepeda C. 1978. Diagnóstico inmunológico de la amibiasis. *Revista Médica de Honduras*. 46: 113 – 114.
- Jeelani G, Sato D, Husain A, Escueta-de Cádiz A, Sugimoto M, Soga T, Suematsu M, Nozaki T. 2012. Metabolic profiling of the protozoan parasite *Entamoeba invadens* revealed activation of unpredicted pathway during encystation. *PLoS One*. 7: e37740.

- Jiménez-Arellanes A, Luna-Herrera J, Ruiz-Nicolás R, Cornejo-Garrido J, Tapia A, Yépez-Mulia L. 2013. Antiprotozoal and antimycobacterial activities of *Persea americana* seeds. *BMC Complementary and Alternative Medicine*.13: 109.
- Kanakis CD, Tarantilis PA, Polissiou MG, Diamantoglou S, Tajmir-Riahi HA. 2007. An overview of DNA and RNA bindings to antioxidant flavonoids. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 49: 29-36.
- Kapoor K, Chandra M, Nag D, Paliwal JK, Gupta RC, Saxena RC. 1999. Evaluation of metronidazole toxicity: a prospective study. *International Journal of Clinical Pharmacology Research*. 19: 83-88.
- Kim JM, Jung HC, Im KI, Song IS, Kim CY. 1998. Synergy between *Entamoeba histolytica* and *Escherichia coli* in the induction of cytokine gene expression in human colon epithelial cells. *Parasitology Research*. 84: 509-512.
- Knight R, Skolymowsky I, Edwards D. 1978. The interaction of reduced metronidazole with DNA *Biochemical Pharmacology* 27: 2089-2093
- Kosińska A, Karamać M, Estrella I, Hernández T, Bartolomé B, Dykæs GA. 2012. Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of *Persea americana* Mill. peels and seeds of two varieties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 60: 4613-4619.
- Kumagai M, Makioka A, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T. 1998. Inhibition of encystation of *Entamoeba invadens* by aphidicolin. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 23: 313-317.
- Kusamrarn T, Sobhon P, Bailey GB. 1975. The mechanism of formation of inhibitor-induced ribosome helices in *Entamoeba invadens*. *Journal of Cell Biology*. 65: 529-539.
- Leite JJ, Brito EH, Cordeiro RA, Brilhante RS, Sidrim JJ, Bertini LM, Morais SM, Rocha MF. 2009. Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 42: 110-113.
- Lernsten N, Carrey K. 1974. Leaf anatomy of ocotillo (*Fouquieria splendens*: Fouquieriaceae) specially vein endings and associated veinlet elements. *Canadian Journal of Botany* 52: 2017-2021.

- Lloyd D, Turner NA, Khunkitti W, Hann AC, Furr JR, Russell AD. 2001. Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: Development of Biocide Resistance. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48: 11-16.
- Loftus B. 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*. 433: 865-868.
- Lohia A. 2003. The cell cycle of *Entamoeba histolytica*. *Molecular Cell Biochemistry*. 253: 217-222.
- López-Camarillo C, Orozco E, Marchat LA. 2005. *Entamoeba histolytica*: comparative genomics of the pre-mRNA 3' end processing machinery. *Experimental Parasitology*. 110: 184-190.
- Lorenzi HA, Puiu D, Miller JR, Brinkac LM, Amedeo P, Hall N, Caler EV. 2010. New assembly, reannotation and analysis of the *Entamoeba histolytica* genome reveal new genomic features and protein content information. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 4: e716.
- Lozoya X. 2000. Plantas Medicinales Prehispánicas. *Arqueología Mexicana* 7: 14-21.
- Madsen W. 1955. Hot and Cold in the Universe of San Francisco Tecospa. *Journal of American Folklore*. 68: 123-138.
- Mahall BE, Callaway RM. 1991. Root communication among desert shrubs. *Proceedings of National Academy of Science of USA*. 88: 874-876.
- Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T. 2001. Inhibition of encystation of *Entamoeba invadens* by wortmannin. *Parasitology Research*. 87: 371-375.
- Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR. 1997. Waterborne protozoan pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*. 10: 67-85.
- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras J, Muñón J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* 17: 271.
- Martínez-Palomo A, González-Robles A, de la Torre M, de la Hoz R. 1974. In-situ fixation and embedding of *E. histolytica*: applications in morphological and ultramicroscopy cytochemical studies. *Archivos de Investigación Médica (Mex)*. 5 suppl 2: 283-292.
- Martínez-Palomo A. 1987. The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitology Today*. 3: 111-118.

- Martínez-Peralta C. 2007 *Ariocarpus fissuratus* (Engelmann) Schumann. *Cactáceas y suculentas mexicanas* 52: 64.
- Maxwell A. 1993. The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. *Molecular Microbiology*. 9: 681-686.
- Mendoza F, Ximénez C, Díaz de León L, Ortiz Ortiz L. 1985. Traducción de RNA obtenido de *Entamoeba histolytica* y su caracterización con un anticuerpo monoclonal específico. *Salud pública de México*. 27: 241-245.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*. 45: 31-34.
- Mirelman D, Bracha R, Rozenblatt S, Garfinkel LI. 1990. Repetitive DNA elements characteristic of pathogenic *Entamoeba histolytica* strains can also be detected after polymerase chain reaction in a cloned nonpathogenic strain. *Infection and Immunity*. 58: 1660-1663.
- Monks TJ, Lau SS. 1992. Toxicology of quinone-thioethers. *Critical Reviews in Toxicology*. 22: 243-270.
- Moundipa P, Melanie-Flore K, Bilong-Bilong C, Bruchhaus I. 2005. *In vitro* amoebicidal activity of some medicinal plants of the Bamun region (Cameroon). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*. 2: 113-121.
- Mukherjee C, Clark CG, Lohia A. 2008. Entamoeba shows reversible variation in ploidy under different growth conditions and between life cycle phases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2: e281.
- Musa MA, Cooperwood JS, Khan MO. 2008. A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer. *Current Medical Chemistry*. 15: 2664-2679.
- Nair KG, Umali T, Potts J. 1973. Ribonucleic acid (RNA) polymerase and adenylyl cyclase in cardiac hypertrophy and cardiomyopathy. *American Journal of Cardiology*. 32: 423-426.
- Náquira C. 1997. Amebiosis. *Revista de Gastroenterología del Perú*. 17: 1.

- Núñez YO, Fernández MA, Torres-Núñez D, Silva JA, Montano I, Maestre JL, Fonte L. 2001. Multiplex polymerase chain reaction amplification and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* DNA from stool samples. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 64: 293-297.
- Oelrichs PB, Ng JC, Seawright AA, Ward A, Schaffeler L, MacLeod JK. 1995. Isolation and identification of a compound from avocado (*Persea americana*) leaves which causes necrosis of the acinar epithelium of the lactating mammary gland and the myocardium. *National Toxins*. 3: 344-349.
- Olivos-García A, Saavedra E, Avendaño MN, Pérez-Tamayo R. 2011. Amibiasis: mecanismos moleculares de la patogenicidad de *Entamoeba histolytica*. *Amebiasis: Molecular mechanisms of Entamoeba histolytica pathogenicity*. 54: 10-11.
- Ovesná Z, Vachálková A, Horváthová K. 2004. Taraxasterol and beta-sitosterol: new naturally compounds with chemoprotective/chemopreventive effects. *Neoplasma*. 51: 407-414.
- Pacheco-Yépez J, Rondán-Zárate A, Shibayama M, Tsutsumi V, Campos-Rodríguez R. 2006. Daño a los hepatocitos por lectina inhibible por D-Galactosa/N-Acetil D-Galactosamina de *Entamoeba histolytica*. *Revista del Centro de Investigación. Universidad La Salle*. 7: 13-32.
- Paduch R, Kandefer-Szerszen M, Trytek M, Fiedurek J. 2007. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)*. 55: 315-327.
- Pérez-Arellano J, Muro-Álvarez A, Hernández-Caballero M, Martín-Sánchez A. 2002. Amebiasis. *Medicine*. 8: 3731-3741.
- Phillipson J, Hemingway S, Ridsdale C. 1978. Alkaloids of Uncaria. Part V. Their occurrence and chemotaxonomy. *Lloydia* 41: 503-570.
- Picazarri K, Nakada-Tsukui K, Nozaki T. 2008. Autophagy during proliferation and encystation in the protozoan parasite *Entamoeba invadens*. *Infection and Immunity*. 76: 278-288.
- Ramirez-Emiliano J, Flores-Villavicencio LL, Segovia J, Arias-Negrete S. 2007. Nitric oxide participation during amoebic liver abscess development. *Medicina (Buenos Aires)*. 67: 167-176.

- Rani D. 2011. Plant extracts with antiamebic properties: A theoretical study with reference to *Entamoeba histolytica*. International Journal of PharmTech Research. 3: 1113-1117.
- Ravdin JI, Murphy CF, Guerrant RL, Long-Krug SA. 1985. Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. Journal of Infectious Disease. 152: 542-549.
- Ravel JM, Mosteller RD, Hardesty B. 1966. NaF inhibition of the initial binding of aminoacyl-sRNA to reticulocyte ribosomes. Proceedings of National Academy of Science of USA. 56: 701-708.
- Reich E, Franklin RM, Shatkin AJ, Tatumel. 1962. Action of actinomycin D on animal cells and viruses. Proceedings of National Academy of Science of USA. 48: 1238-1245.
- Reiner DS, Hetsko ML, Gillin FD. 1995. A lipoprotein-cholesterol-albumin serum substitute stimulates *Giardia lamblia* encystation vesicle formation. Journal of Eukaryotic Microbiology. 42: 622-627.
- Reyes-López M, Villa-Treviño S, Arriaga-Alba M, Alemán-Lazarini L, Rodríguez-Mendiola M, Arias-Castro C, Fattel-Fazenda S, de la Garza M. 2005. The amoebicidal aqueous extract from *Castela texana* possesses antigenotoxic and antimutagenic properties. Toxicology In Vitro. 19: 91-97.
- Rivera A, Giono S, González M, Rodríguez N, Cedillo L. 2011. Antibacterial effect of *Morinda citrifolia* fruit juice against mycoplasmas. Annals of Biological Research 2: 491.
- Rivero Z, Bracho Á, Calchi M, Díaz I, Acurero E, Maldonado A, Chourio G, Arráiz N, Corzo G. 2009. Detección y diferenciación de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* mediante reacción en cadena de la polimerasa en individuos de una comunidad del Estado Zulia, Venezuela. Cadernos de Saúde Pública 25: 151-159.
- Rodríguez L, Livengood EJ, Miles RD, Chapman FA. 2011. Uptake of metronidazole in Artemia at different developmental life stages. Journal of Aquatic Animal Health. 23: 100-102.
- Romero HR, Rojas PN, Acuña CR, Sánchez LR, Barrios HR. 2007. Conceptos Actuales en Patogenia. Diagnóstico y Tratamiento de la Amibiasis. Current concepts in pathogenics, diagnosis and treatment of amebiasis. 9: 1.

- Rudick VL, Weisman RA. 1973. Effects of cycloheximide on RNA polymerase specific activity and encystment in *Acanthamoeba castellanii*. *Nature* 244: 220-222.
- Said-Fernández S, Campos-Góngora E, González-Salazar F, Martínez-Rodríguez HG, Vargas-Villarreal J, Viader-Salvado JM. 2001. Mg²⁺, Mn²⁺, and Co²⁺ stimulate *Entamoeba histolytica* to produce chitin-like material. *Journal of Parasitology*. 87: 919-923.
- Sarkisyan SA. 1967. Submicroscopic structure of the chromatoid body of *Entamoeba invadens* and *Entamoeba moshkovskii*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 63: 505-507.
- Schofield P, Mbugua D, Pell A. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 91: 21-40.
- Scogin R. 1977. Anthocyanins of the Fouquieriaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 5: 265-267.
- Scogin. 1978. Leaf phenolics of the Fouquieriaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 6: 297-298.
- Sehgal D, Bhattacharya A, Bhattacharya S. 1996. Pathogenesis of infection by *Entamoeba histolytica*. *Journal of Bioscience* 21: 423 – 432.
- Silanikove N, Gilboa N, Nitsan Z, Perevolotsky A. 1996. Effect of foliage-tannins on feeding activity in goats. *Options Mediterraneennes* 34: 43-46.
- Sim S, Yu JR, Lee YA, Shin MH. 2010. Involvement of Src family tyrosine kinase in apoptosis of human neutrophils induced by protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Korean Journal of Parasitology*. 48: 285-290.
- Singh W, Singh L, Devi I. 2012. Nutritional, medicinal and toxic substances of avocado (*Persea americana*). *North-East Veterinarian*.12: 9 - 10.
- Stevens AR, Pachler PF. 1973. RNA synthesis and turnover during density-inhibited growth and encystment of *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Cell Biology*. 57: 525-537.
- Tanyuksel M, Petri WA. 2003. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews*.16: 713-729.

- Tazreiter M, Leitsch D, Hatzenbichler E, Mair-Scorpio GE, Steinborn R, Schreiber M, Duchene M. 2008. *Entamoeba histolytica*: response of the parasite to metronidazole challenge on the levels of mRNA and protein expression. *Experimental Parasitology*. 120: 403-410.
- Trejos-Suárez J, Castaño-Osorio JC. 2009. Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. *Infectio*. 13: 100-110.
- Van Dellen KL, Bulik DA, Specht CA, Robbins PW, Samuelson JC. 2006. Heterologous expression of an *Entamoeba histolytica* chitin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*. 5: 203-206.
- Vörtler CS, Fedorova O, Persson T, Kutzke U, Eckstein F. 1998. Determination of 2'-hydroxyl and phosphate groups important for aminoacylation of *Escherichia coli* tRNA^{Asp}: a nucleotide analogue interference study. *RNA*. 4: 1444-1454.
- Yasir M, Das S, Kharya MD. 2010. The phytochemical and pharmacological profile of *Persea americana* Mill. *Pharmacognosy Reviews*. 4: 77-84.
- Yoon JW, Kang JK, Lee KR, Lee HW, Han JW, Seo DW, Kim YK. 2005. beta-Carboline alkaloid suppresses NF-kappaB transcriptional activity through inhibition of IKK signaling pathway. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 68: 2005-2017.
- Yoshikawa M, Murakami T, Yoshizumi S, Murakami N, Yamahara J, Matsuda H. 1996. Bioactive saponins and glycosides. V. Acylated polyhydroxyolean-12-ene triterpene oligoglycosides, camelliasaponins A1, A2, B1, B2, C1, and C2, from the seeds of *Camellia japonica* L.: structures and inhibitory activity on alcohol absorption. *Chemical and Pharmacological Bulletin of Tokyo*. 44: 1899-1907.

11.2 Congresos

- Calzado-Flores C, Hurtado-Ramírez M, Flores-Villanueva Z, Verde-Star J, Segura-Luna J. 2002. Estudio morfológico preliminar de los efectos producidos por la *Castela texana* en un modelo de animales experimentales. Presentado en la VI Reunión Delegacional de Investigación Médica del IMSS, Monterrey, N. L. Febrero 21-22
- Barrón-González M, Morales-Rubio M, Morales-Vallarta M. 2010. Actividad amebicida del extracto metanólico de *Castela texana* sobre *E. histolytica*. Presentado en el VII Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas. Sonora, México. Marzo 10 - 17
- Silva T, Montellano R, Ramos D, Villegas D. 1996. Estudio Etnobotánico, Fitoquímico y Toxicológico de *Sedum praealtum* DC. (Crassulaceae). Presentado en el Primer Congreso Nacional de Plantas Medicinales de México, México. Junio 24 - 30

11.3 Documentos Electrónicos en la Web

- ASOCAE. 2011a. Plantas Medicinales. Sustancias. Alcaloides. [Internet]. Disponible en el sitio de red: http://www.natureduca.com/med_sustanc_alcaloides.php, [Revisado el 29 de agosto de 2013], b)
- ASOCAE. 2011b. Plantas Medicinales. Sustancias. Taninos. [Internet]. Disponible en el sitio de red: http://www.natureduca.com/med_sustanc_taninos.php, [Revisado el 29 de agosto de 2013], a)
- Biofase. 2012. Bioplásticos y Polímeros BIOFASE S.A. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.biofase.com.mx/> [Revisado el 29 de agosto de 2013]
- Caler E, Petri W, Ibne-Karim A. 2010. Genome sequencing of clinical strains of *Entamoeba histolytica*. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://gsc.jcvi.org/> [Revisado el 29 de agosto de 2013]
- INAFED. 2010. Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.e-local.gob.mx/>. [Revisado el 29 de agosto de 2013]

- INEGI. 2008. Morbilidad hospitalaria. Tasa de morbilidad de los principales casos nuevos de enfermedades, 2000 a 2008. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.inegi.org.mx/> [Revisado el 29 de agosto de 2013]
- Johnson-Gordon D. 2004. Compendio Fitoquímico de la Medicina Tradicional Herbolaria de Sonora. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://millenium.itesm.mx/> [Revisado el 29 de agosto de 2013]
- King M. 2011. The Medical Biochemistry. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://themedicalbiochemistrypage.org> [Revisado el 29 de agosto de 2013]
- Martínez N, Provencio V, Jiménez C. 2008. Medicinal Plants of Southwest. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://medplant.nmsu.edu/> [Revisado el 29 de agosto de 2013]
- Morales J, Marx Carneir C, Serrano Olman A. 2002. Información y análisis para el manejo forestal sostenible: integrando esfuerzos nacionales e internacionales en 13 países tropicales en América Latina, Chile. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.sigguadua.gov.co/> [Revisado el 29 de agosto de 2013]
- Nealv J, Sato P, Johnson C, McLaughlin J. 2006. Cactus alkaloids X: Isolation of hordenine and N-methyltyramine from *Ariocarpus kotschoubeyanus*. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://onlinelibrary.wiley.com/> [Revisado el 29 de agosto de 2013]
- Solís-Díaz V, Abarca-Salinas A, Rojas-Alba M. 2009. Evaluación mediante antibiogramas del efecto bactericida de quina amarilla (*Hintonia latiflora* (Sessé et Moc. Ex DC.) Bullock), estafiate (*Artemisa ludoviciana ssp mexicana* (Willd. Ex. Spreng.) Keck), y chaparro amargo (*Castela erecta ssp texana* (Torr. Et Gray) Cronq.) en una cepa de *Salmonella typhimurium*. [Internet]. Disponible en el sitio de red: en <http://www.tlahui.edu.mx/> [Revisado el 29 de agosto de 2013]
- Sorgeloos P. 1978. The culture and use of brine shrimp, *Artemia salina*, as food for hatchery-raised larval prawns, shrimps and fish in southeast Asia. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.fao.org/> [Revisado el 29 de agosto de 2013]
- SSA (México). 2011. Morbilidad. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/>
- USDA. 2013. Plants Profile for *Fouquieria splendens*. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://plants.usda.gov/> [Revisado el 29 de agosto de 2013]

- Valerdi-Madrigal E, Rodríguez-Dorantes A, Silva-Torres R. 2001. Identificación de metabolitos secundarios producidos en cultivo de células en suspensión de *Fouquieria splendans ssp breviflora* y *Fouquieria diguetii*, bajo diferentes concentraciones de nitrógeno. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.smbb.com.mx/> [Revisado el 29 de agosto de 2013]
- Villalobos G, Ventura J, Muñoz-Ortega M, Campos-Rodríguez R, Quintanar S, Salinas M. 2010. Presencia de CD59 en *Entamoeba histolytica* y su papel patogenético en cultivo. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://bvs.insp.mx/rsp/> [Revisado el 29 de agosto de 2013]

11.4 Libros

- Bravo-Hollis H, Sánchez-Mejorada H. 1991. Las Cactáceas de México. 1 Ed. UNAM editorial: México. Pp. 345
- Brown TA. 2011. Introduction to Genetics: A Molecular Approach. 1 ed. Garland Science Editorial: EUA. Pp. 538
- Bruneton J. 2001. Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales. 2a ed. Acribia Editoriales: España. Pp. 1120
- Calvopiña M. 1997. Terapéutica antiparasitaria. Ecuador: Ministerio de Salud Pública del Ecuador. 1 ed. Nociones Editoriales: Ecuador. Pp. 306
- Domínguez X. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. 1a ed. Ed. Limusa Editoriales: México. pp. 584
- González-Elizondo M, López-Enríquez I, González-Elizondo M, Tena-Flores J. 1997. Plantas medicinales del estado de Durango y zonas aledañas. 1 ed. Instituto Politécnico Nacional Editoriales: México. Pp. 209
- Martínez M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. 1a ed. Fondo de Cultura Económica: México. Pp. 621
- Osuna-Torres L, Tapia-Pérez M, Aguilar-Contreras A. 2005. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales, estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Universitat de Barcelona Editorial: España. Pp.175

- Pamplona-Roger J. 2000. Enciclopedia de las plantas medicinales. Safeliz Editorial: España. Pp. 345
- Peláez F, Genilloud O. 2004. Nuevos fármacos de origen natural. In Nuevos Avances en medicamentos. Tamargo and Avedaño Editorial: España. Pp. 543
- Pumarola A, Rodríguez-Torres A, García-Rodríguez J, Piedrola-Angulo G. 1987. Microbiología y Parasitología Médica. Salvat Editoriales: España. Pp. 241
- Romero J. 2003. Integrative Photochemistry: From ethnobotany to molecular ecology. Peragamon Editorial: Reino Unido. Pp. 292
- Söll D, Nishimura S, Moore PB. 2001. RNA. Elsevier Editorials: United Kingdom. Pp. 354
- Tripathi K. 2008. Farmacología en Odontología. Médica Panamericana Editorial: Argentina. 1 ed. pp. 528
- Webster-Bortner H. 1952. The Chemistry of Ribonucleic Acid. Standford University Editorial: USA. pp. 257

11. 5 Tesis

- Calzado-Flores C. 1995. Actividad citotóxica de la chaparrina *in vitro* sobre *Entamoeba histolytica* y fibroblastos diploides humanos. Tesis (Maestría en Ciencias). Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León
- Pérez-Cepeda B. 2000. Estudio Fitoquímico de algas marinas con actividad biológica en larvas de *Aedes aegypti*. Tesis (Licenciatura) Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México.
- Rodríguez Garza R. 2010. Tamizaje fitoquímico y actividad biológica de *Fouquieria splendens* (Engelmann), *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) y *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire). Tesis (Doctorado). Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México

- Rodríguez-Carpena J. 2011. Utilización de subproductos de aguacate para la mejora de las características nutricionales y la estabilidad oxidativa de hamburguesas de cerdo. Tesis (Licenciatura). Universidad de Extremadura, España.
- Solórzano-Peña B, Martínez-Membreño E. 2005. Influencia de los factores sociales y ambientales en la prevalencia de amibiasis intestinal detectada en el análisis coprológico en los niños y niñas de 1 a 14 años de edad que residen en la colonia "El bosque dos" en el municipio de Nueva Guadalupe, del departamento de San Miguel, en el período de noviembre de 2004 a agosto de 2005. Tesis (Doctorado). Universidad Doctor Andrés Bello, Chile.
- Subki-Khalid H. 1991. Biological and Phytochemical studies on *Albizzia anthelmintica*. Tesis (Doctorado). Universidad de Khartoum.
- Tizol-Correa R. 2006. Contribución a la caracterización molecular, citogenética, morfométrica y bioquímica del camarón de salmuera *Artemia* de Cuba y sur de México. Tesis (Doctorado) Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, Baja California Sur, México.
- Treviño-Tamez R. 2001. Estudio fitoquímico de *Piper amalago*. Tesis (Licenciatura). Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México.