

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DETERMINACION DE LA CONCENTRACION
INHIBITORIA MEDIA (CI_{50}) DEL EXTRACTO
ETANOLICO OBTENIDO DEL *Agave lophantha*
SOBRE EL CRECIMIENTO *In vitro* DE *Entamoeba*
histolytica, *Trichomonas vaginalis* Y *Giardia lamblia*.

T E S I S

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

PRESENTA:

JUAN JOSE GUTIERREZ GARCIA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

ENERO DEL 2002

TL

RC119

.G8

2002

c.1



1080124437

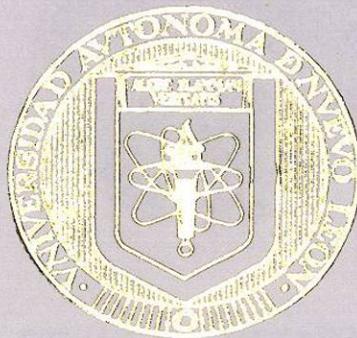
Con respeto y cariño:

Dedico esta tesis, a la DAA- Catalina Rivas,
por su gran apoyo en este humilde esfuerzo
¡ Muchas Gracias!

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DETERMINACION DE LA CONCENTRACION
INHIBITORIA MEDIA (CI_{50}) DEL EXTRACTO
ETANOLICO OBTENIDO DEL *Agave lophantha*
SOBRE EL CRECIMIENTO *In vitro* DE *Eutamoeba*
histolytica, *Trichomonas vaginalis* Y *Giardia lamblia*.

T E S I S

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

PRESENTA:

JUAN JOSE GUTIERREZ GARCIA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

ENERO DEL 2002



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INHIBITORIA MEDIA (CI₅₀) DEL EXTRACTO ETANOLICO OBTENIDO DEL *Agave lophantha* SOBRE EL CRECIMIENTO *In vitro* DE *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* Y *Giardia lamblia*.

TESIS
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

PRESENTA:

JUAN JOSE GUTIERREZ GARCIA

TL

RC119

068

2002

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INHIBITORIA MEDIA
(CI_{50}) DEL EXTRACTO ETANOLICO OBTENIDO DEL *Agave lophantha* SOBRE
EL CRECIMIENTO *In vitro* DE *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* Y
Giardia lamblia

COMISION DE TESIS:

PRESIDENTE: _____

DRA. AZUCENA GRANDAY CARDENAS

SECRETARIO: _____

DRA. CATALINA RIVAS MORALES

VOCAL: _____

DR. MARIO R. MORALES VALLARTA

SUPLENTE: _____

DRA. LETICIA AMIRA HAUAD MARROQUIN

ASESOR INVITADO: _____

DR. BENITO D. MATA CARDENAS

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INHIBITORIA MEDIA
(CI_{50}) DEL EXTRACTO ETANOLICO OBTENIDO DEL *Agave lophantha* SOBRE
EL CRECIMIENTO *In vitro* DE *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* Y
Giardia lamblia

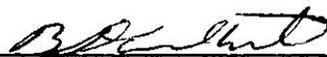
Presentado por:

Juan José Gutiérrez García

Este trabajo se realizó en los Laboratorios Química de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y bajo la asesoría de la Dra. Azucena Oranday Cárdenas y en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste, bajo la asesoría de Dr. Benito D. Mata Cárdenas. Apoyado parcialmente por el Programa PAICYT 238.



Dra. Azucena Oranday Cárdenas
Director Interno



DR. Benito D. Mata Cárdenas
Director Externo

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

Con todo respeto, a quien le debo lo que no soy, gracias a su ejemplo y dedicación, a mi padre el Sr. Pedro Gutiérrez Hernández, y con todo el amor del universo, para la persona que me enseñó a tener integridad humana, ejemplo de progreso, humildad y amor a quien le debo todo en la vida, a mi madre Doña Fidela García de la Rosa, que Dios me los conserve siempre.

A MIS HERMANOS:

Al Ing. Julio César Gutiérrez García, así como a su esposa la Lic. Claudia Macías de Gutiérrez, por apoyarme y brindarme su hogar para la redacción de este trabajo y por su amistad de años; también muy especialmente a mi querida sobrina la niña Claudia Fernanda Gutiérrez Macías por traer al mundo un motivo más de felicidad en nuestras vidas.

Al Lic. Pedro Iván Gutiérrez García mi "carnalito" y a su novia por los alientos que me dan para seguir adelante, en cada ocasión en que podemos frecuentarnos. A todos les deseo lo mejor de la vida. Gracias por ser, todo lo que tengo.

A MIS AMIGOS:

Al BQ. Ernesto I. Rodríguez Torres, al MVZ Gabriel Muñoz Sánchez, al Tte. Javier Carrillo Antonio, que a pesar del tiempo y la distancia nuestra amistad sigue íntegra, como en la infancia en nuestro querido "pueblo" CD. Naranjos Ver. De donde pertenezco con mucho orgullo.

A los QBP's Arnulfo Díaz Trujillo y Jesús Ernesto Martínez y al MC Adrián Giovanni Rosas, por compartir una amistad sincera durante nuestra formación profesional.

Que con una sonrisa encierro lo que significan los amigos en mi vida.

A MIS MAESTROS:

A todos de quien recibí cátedra en la carrera de Químico Bacteriólogo Parasitólogo, de quienes guardo un fragmento de su ser en mi desarrollo profesional, y a quienes aun sin ser mis catedráticos entablaron una profunda amistad y aportaron consejos para la redacción de esta tesis.

Especialmente a la DRA. Azucena Oranday Cárdenas y al DR. Benito Mata, de quienes he recibido apoyo incondicional y de quienes guardo un absoluto respeto y admiración como personas y como investigadores.

A ALGUIEN MUY ESPECIAL:

Le dedico esta tesis a alguien muy especial: a mi compañía en mis horas de desvelo, a mi consejo cuando existió la duda, a mi motivación para seguir adelante. Gracias por no dejarme solo ni un solo segundo, a mi gran amigo: chuchito

INDICE

	Resumen.....	III
	Lista de Abreviaturas.....	IV
	Lista de Figura.....	V
	Lista de Tablas.....	VI
1	Introducción.....	1
2	Antecedentes.....	3
2.1	Antecedentes del <i>Agave lophantha</i>	3
2.1.1	Descripción del <i>Agave lophantha</i>	3
2.1.2	Afinidades.....	4
2.1.3	Distribución y hábitat.....	5
2.1.4	Clasificación taxonómica.....	5
2.1.5	Composición química.....	6
2.1.6	Usos en medicina tradicional.....	7
2.2	Antecedentes de <i>Entamoeba histolytica</i>	8
2.2.1	Definición e importancia epidemiológica.....	8
2.2.2	Clasificación taxonómica.....	9
2.2.3	Ciclo de vida.....	9
2.2.4	Tratamiento.....	9
2.3	Antecedentes de <i>Trichomonas vaginalis</i>	12
2.3.1	Microbiología y epidemiología.....	12
2.3.2	Clasificación taxonómica.....	13
2.3.3	Tratamiento.....	14
2.4	Antecedentes de <i>Giardia lamblia</i>	16
2.4.1	Ciclo de vida.....	16
2.4.2	Distribución.....	17
2.4.3	Aspectos clínicos.....	18
2.4.4	Clasificación taxonómica.....	18
2.4.5	Consideraciones terapéuticas.....	19
3	Justificación.....	20
4	Hipótesis y Objetivos.....	21
4.1	Hipótesis.....	21
4.2	Objetivo General.....	21
4.3	Objetivos específicos.....	21

5	Material y Métodos.....	22
5.1	Material biológico.....	22
5.2	Origen de los reactivos.....	22
5.3	Equipo.....	22
5.4	Preparación de los medios de cultivo.....	23
5.4.1	Medio PEPHS.....	23
5.4.2	Medio TYI-S-33.....	23
5.5	Obtención del extracto etanólico.....	24
5.5.1	Maceración.....	24
5.6	Preparación de la concentración del extracto etanólico.....	24
5.7	Preparación de la concentración del metronidazol.....	24
5.8	Condiciones de cultivo.....	25
5.9	Cinéticas de crecimiento.....	25
5.10	Determinación del efecto de las drogas.....	26
5.10.1	Curva Dosis-respuesta de la concentración del extracto etanólico.....	26
5.10.2	Curva Dosis-respuesta de la concentración del metronidazol.....	27
5.11	Determinación del análisis Probit.....	27
5.12	Métodos químicos de identificación.....	27
5.12.1	Prueba de Liebermann-Burchard.....	27
5.12.2	Prueba de Salkowski.....	27
5.12.3	Prueba de Shinoda.....	28
5.12.4	Prueba de H ₂ SO ₄	28
5.12.5	Prueba de Baljet.....	28
5.12.6	Prueba de coumarinas.....	28
5.12.7	Prueba de Dragendorff.....	28
5.12.8	Prueba de KMNO ₄	29
5.12.9	Prueba de FeCl ₃	29
5.12.10	Prueba de 2,4-dinitrofenilhidracina.....	29
5.12.11	Prueba de Molisch.....	29
5.12.12	Prueba de NaHCO ₃	29
6	Resultados.....	30
7	Discusión.....	32
8	Conclusiones.....	38
9	Perspectivas.....	39
10	Referencias Bibliográficas.....	40
11	Figuras y Tablas.....	47
12	Apéndice A.....	58

RESUMEN

Se realizaron curvas Dosis-respuesta para determinar el efecto del extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha* en un rango de concentraciones de 1120-18.57 µg/ml y como control positivo se utilizó el metronidazol en un rango de concentraciones de 0.4-0.05 µg/ml sobre los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* cepa HM1:IMSS y *Trichomonas vaginalis* cepa GT-15 cultivadas en 5 ml de medio PEPHS con 0.5 ml de suero bovino (Saíd Fernández *et al*, 1998) con un inóculo de 20,000 y 100 trofozoítos/ml respectivamente y la cepa IMSS:0989 de *Giardia lamblia* se cultivó en 5 ml de medio TYI-S-33, (Diamond *et al*, 1978) 0.5 ml de suero y 0.1 ml de bilis bovinas con un inóculo de 10,000 trofozoítos/ml incubadas a 36.6°C hasta un tiempo de 72 horas. (Keister, 1983)

Cada concentración se probó en tres eventos independientes por triplicado, comparándose contra el crecimiento de las cepas sin la adición de las drogas como control negativo. Finalizado el tiempo de incubación se procedió a contar el número de trofozoítos/ml utilizando un hemocitómetro, graficándose para obtener la concentración inhibitoria media (CI₅₀) en el eje de la X el logaritmo de la concentración y en el eje de la Y los valores Probit.

Los resultados demuestran la mayor susceptibilidad de la cepa IMSS:0989 de *Giardia lamblia* al extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha* seguido de la cepa GT-15 de *Trichomonas vaginalis*, en tres veces menos susceptible al extracto que *Giardia lamblia* y la cepa HM1:IMSS de *Entamoeba histolytica* resultó ser la menos susceptible en dos veces a *Trichomonas vaginalis* y seis veces a *Giardia lamblia* al extracto etanólico. Para el control positivo, la susceptibilidad fue equivalente en *Entamoeba histolytica* cepa HM1:IMSS y *Trichomonas vaginalis* cepa GT-15 y la menor susceptibilidad la presentó la cepa IMSS:0989 de *Giardia lamblia*.

LISTA DE ABREVIATURAS

CI ₅₀	Concentración Inhibitoria Media
g	gramos
mg	miligramos
µg	microgramos
h	horas
min	minutos
L	litros
ml	mililitros
Lb	libras
°C	grados centígrados
pH	potencial de hidrógenos
PBS	solución salina isotónica
EHP	extracto de hígado páncreas
mOsm	miliosmoles

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	NOMBRE	PAGINA
1	Cinética de crecimiento de <i>Entamoeba histolytica</i>	47
2	Cinética de crecimiento de <i>Trichomonas vaginalis</i>	48
3	Cinética de crecimiento de <i>Giardia lamblia</i>	49
4	Curva Dosis-respuesta del extracto etanólico obtenido del <i>Agave lophantha</i> sobre el crecimiento <i>In vitro</i> de <i>Entamoeba histolytica</i>	50
5	Curva Dosis-respuesta del extracto etanólico obtenido del <i>Agave lophantha</i> sobre el crecimiento <i>In vitro</i> de <i>Trichomonas vaginalis</i> .	51
6	Curva Dosis-respuesta del extracto etanólico obtenido del <i>Agave lophantha</i> sobre el crecimiento <i>In vitro</i> de <i>Giardia lamblia</i> .	52
7	Curva Dosis-respuesta del metronidazol sobre el crecimiento <i>In vitro</i> <i>Entamoeba histolytica</i>	53
8	Curva Dosis-respuesta del metronidazol sobre el crecimiento <i>In vitro</i> de <i>Trichomonas vaginalis</i> .	54
9	Curva Dosis-respuesta del metronidazol sobre el crecimiento <i>In vitro</i> de <i>Giardia lamblia</i> .	55

LISTA DE TABLAS

TABLA	NOMBRE	PAGINA
1	Preparación de las concentraciones utilizadas del metronidazol.	56
2	Estudio fitoquímico preliminar del extracto etanólico obtenido del <i>Agave lophantha</i> .	57

1. INTRODUCCION

Aunque la terapéutica actual sobre las parasitosis cuenta con diversos medicamentos para combatir estas enfermedades, ninguno está exento de producir efectos tóxicos indeseables en el humano. (Rollo, 1970)

El hombre de épocas pasadas, mediante cuidadosas observaciones registró los efectos de las plantas medicinales heredando a la humanidad un tesoro invaluable que constituye la hipótesis etnobotánica. El conocimiento herbolario de la medicina tradicional que posee la población puede ser compatible con la medicina oficial si se compagina con una adecuada investigación científica. La selección de una planta basada en su uso etnomédico es un criterio importante, además de un factor predictivo, utilizado en la identificación de nuevos agentes antiinfectivos. Al introducimos en la búsqueda de nuevos recursos terapéuticos de origen vegetal debemos apoyarnos en esta hipótesis etnobotánica, que es un cúmulo de experiencias legadas de nuestros antepasados, ofreciéndonos un futuro prometedor en el campo médico. (Greulach, 1970)

En México existe la costumbre de utilizar plantas para solucionar problemas de salud, además la flora en nuestro país es única ya que todos los biomas descritos en la superficie de este planeta están representados en sus 2 millones de Km² de extensión territorial, los cuales contienen un terreno accidentado con una complicada topografía que origina un mosaico climático que redundo en una gran variedad florística. (Rzedowski, 1994)

De las 3,000 especies de plantas medicinales reportadas, Ferraro-González en 1988 asegura que 300 se desarrollan en la región noreste de México y de ellas 10% se han estudiado científicamente. (Ferraro-González, Broussalis, 1988)

La organización mundial de la salud estima que el 80 % de la gente que vive en países en desarrollo utilizan casi exclusivamente la medicina tradicional. Esto indica que 3,300 millones de personas usan plantas medicinales. En 1984 el 25 % de las drogas prescritas utilizadas en Estados Unidos y Canadá fueron derivados de productos naturales. (Eloff, 1998)

Dentro de la diversidad de plantas mexicanas mencionadas tenemos la familia Agavaceae de la cual se tienen antecedentes de su uso en medicina tradicional desde épocas prehispánicas, por lo que se eligió *Agave lophantha*, para la evaluación de su actividad biológica *In vitro*. La familia Agavaceae tiene cerca de 140 especies nativas de América. Los Agaves se incluyen en el matorral xerófilo que es el más vasto de todos los tipos de vegetación en México ya que ocupa el 40% de la superficie territorial, crecen en la región noreste conformando el paisaje característico de las zonas semidesérticas. (Rzedowski, 1994)

Las pruebas *In vitro* representan una etapa importante al estudio farmacológico de nuevos medicamentos previos a las pruebas *In vivo*; ya que estas pruebas son relativamente más económicas, se pueden efectuar en un periodo más corto de tiempo y son altamente sensibles. Además, si tomamos en cuenta que en el estudio de principios naturales extraídos a partir de plantas en muchas ocasiones se nos presenta el inconveniente de no contar con suficiente muestra para realizar los estudios con animales. Las pruebas realizadas en cultivos de células son muy útiles ya que ofrecen un micrométodo, a partir del cual se pueden obtener resultados preliminares aún y cuando la cantidad del principio activo aislado corresponda a una micromuestra, de tal manera que pudieran realizarse ensayos para demostrar la actividad que se espera tenga *In vivo*. (Hsu, 1977)

2. ANTECEDENTES

2.1 ANTECEDENTES DEL *Agave lophantha*

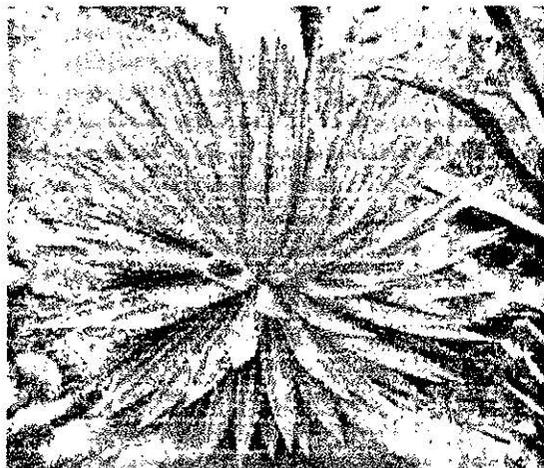
El nombre de "Agave" fue otorgado por Linneo a fines del siglo XVIII y proviene del griego y significa "admirable". El periodo generativo de la progenie sexual es de 8 a 25 años. Los Agaves son plantas que florecen a los 10-20 años y antes de morir producen nuevas plantas en forma vegetativa. Se cree que por eso han perdurado por siglos en este planeta. (Howard, Darrow, 1990)

La diseminación de estas plantas la ejecutan también los insectos polinizadores. La evolución de los Agaves enfatiza que sus especies se componen de poblaciones. Los híbridos son muy comunes de generarse entre estas plantas y suceden no solo entre especies sino entre géneros. Entre los Agaves hay especies diploides y poliploides y clones que cambian sus cariotipos. Las variaciones se expresan fenotípicamente en células, órganos, hábitos y fisiologías en desconcertantes secuencias a través del género. La reproducción vegetativa en plantas o por raíces tiene la ventaja sobre la reproducción por semilla que no altera las características genéticas de la nueva planta. Además llevan a cabo el metabolismo ácido crasuláceo, lo que les permite ahorrar agua ya que capturan el CO₂, solo de noche para no perderla por apertura de estomas durante el día, cuando la temperatura es alta y la atmósfera seca. (Romo de Vivar, 1989)

2.1.1 DESCRIPCION DEL *Agave lophantha*

Planta pequeña radiada, rosetas simples o surculosas, de 30-60 x 50-100 cm. las maduras algunas veces con tallos visibles: hojas numerosas, generalmente de 30-70 x 3-5 cm, espatuladas, verde brillante a verde amarillentas, con o sin una línea media pálida, lineal o lanceolada, más bien delgada, flexible algo gruesa hacia la base y redondeada abajo, plana a cóncava arriba; márgenes córneos, ondulados a crenados, los dientes simples u ocasionalmente dobles sobre anchas y cortas mamilas, rectos o ligeramente encorvados, delgados, la mayoría de 4-8 mm de largo y 1-2 cm de distancia entre ellos. Espinas pequeñas de 1-2 cm de longitud,

subuladas, café oscuro a gris, aplanada cerca de la base: inflorescencia espigada de 3-4.5 m de alto, delgada, con flores en la mitad superior del escapo, flores solas o en pares sobre pedicelos simples o dicotómicos, de 5-10 mm de largo, o en grupos de 3-7 sobre pedúnculos laterales cortos. Flores glaucas brillantes, gris a verde amarillento, de 35-47 mm de longitud; ovario fusiforme, de 18-22 mm largo con cuello corto o largo (5-7 mm) y constricto; tubo corto, abierto, de 2-4 mm de longitud x 8-10 mm de ancho; tepalos desiguales, erectos a ascendentes de, 14-20 mm de longitud, persistiendo erecto alrededor de los filamentos: filamentos de 30-45 mm de largo, verdosos o lavanda, extendidos, insertados al nivel de los tepalos internos sobre el margen del tubo; anteras de 15-20 mm largo, amarillo pálido; fruto oblongo de 18-24 x 10-12 mm u orbiculares de 15-20 x 12-18 mm sésiles o sobre un estipe delgado corto (2-3 mm): semillas semicirculares, de 5-6 x 3-4 mm, las caras con crestas onduladas, los bordes con márgenes levantados (Fotografía N° 1). (Gentry, 1982)



Fotografía N° 1. *Agave lophantha*

2.1.2 AFINIDADES

Agave lophantha tiene varios parientes cercanos. Se distingue de *A. lechuguilla* por sus hojas más planas con bordes firmes sinuosos a ondulados, usualmente los márgenes presentan mamilas con por lo menos un juego doble de dientes. *A. xylonacantha*, es una planta más tosca con relativamente pocas hojas, los márgenes altamente dentados y con dientes

flexibles de diferente longitud. Algunas formas de *A. lophantha* con hoja ancha tienen márgenes crenados con dientes grandes que se parecen mucho a *A. xylonacantha* y de hecho pueden ser indistinguibles. Los dientes de *A. lophantha* son consistentemente más delgados y más cercanos que en *A. lechuguilla* y *A. xylonacantha* y se parece mas a los dientes finos del margen recto de *A. funkiana*. Estos cuatro taxa forman un complejo cercanamente relacionado.

Todos ellos tienen formas de la hoja con centro ancho pálido estriado, pero no están constantemente presentes en ninguno de ellos. Algunas poblaciones de *A. lophantha* muestran hábitos principalmente simples, mientras las otras crecen en grupos, todas desarrollan tallos aparentes. (Gentry, 1982)

2.1.3 DISTRIBUCION Y HABITAT

La distribución natural de *Agave lophantha* se extiende desde el sureste de Texas hacia el sur en México a lo largo de la costa hasta el centro de Veracruz. Es frecuente sobre piedra caliza, así como en los precipicios y los afloramientos rocosos, donde los bosques tropicales no son demasiado densos y pueden proporcionar la luz del sol adecuada para estas plantas, se encuentran en elevaciones de 30 -1,500 m de altitud.

A. lophantha ha crecido bien en los Jardines Botánicos del suroeste de Estados Unidos. Algunas de las formas tropicales pueden ser sensibles a la escarcha, pero en el Desert Botanical Garden se tienen plantas colectadas de San Luis Potosí y de otras partes que han sobrevivido a la escarcha y (-7°C) sin daño. (Gentry, 1982)

2.1.4 CLASIFICACION TAXONOMICA (Gentry, 1982, Dahlgren *et al*, 1985.)

Agave lophantha Schiede, Linnea 4:582, 1829. kunth, Enum. Plantarum 5:838, 1850.

Agave univittata Haw., Phil. Mag. 10:415, 1831

Agave heteracantha Zucc., Act. Acad. Caes. Leop. Carol. 16(2): 675, 1833?

Agave vittata Regel, Gartenflora 7:312, 1858.

Agave mezortillo Hort.

Reino: Plantae
División: Spermatophyta
Clase: Angiospermae
Subclase: Monocotiledoneae
Orden: Asparagales
Familia: Agavaceae
Subfamilia: Agavoideae
Tribu: Agaveae
Género: *Agave*
Subgénero: *Littaea*
Sección: *marginatae*
Especie: *lophantha*

2.1.5 COMPOSICION QUIMICA

Los componentes de estas plantas varían en contenido químico con la edad, época de recolecta, ubicación geológica, clima etc. Sus carbohidratos no estructurales aumentan en concentración en los meses de lluvia y decrecen en meses secos cuando se requieren para mantener la respiración. Se ha reportado entre su contenido químico la presencia de esteroides, terpenos, vitaminas y saponinas en sus hojas. (Wall *et al*, 1957)

La química de la hoja de los Agaves es compleja y solamente unos pocos de los constituyentes de la hoja se han identificado. (Pennington, 1958. Bye *et al*, 1975)

Su contenido lipídico ha sido investigado y los ácidos grasos encontrados son el oléico y linoleico, contenidos en mayor proporción en las semillas. (Howard, Darrow, 1990)

Las saponinas son compuestos elementales de los que pueden sintetizarse cortisona y las químicamente relacionadas hormonas sexuales. Basándose en el análisis del U.S Department of Agriculture (USDA), *A. lophantha* tiene de 0-1.5% de saponinas, (Wall *et al* 1957) las sustancias presentes en las hojas causantes de la dermatitis en el humano. (García-Mendoza, 1998) En el fruto es donde se ha encontrado un mayor contenido de saponinas. La manogenina se ha aislado de 18 especies de Agaves. La

hecogenina se ha encontrado en 16 diferentes especies de Agaves nativos de México. La hecogenina, una de las sapogeninas, que aparece los Agaves de fibra, se ha extraído y usado en la fabricación de drogas esteroides, (Wall *et al* 1957) la esmilogenina esta presente en *Agave lophantha* de 0.5 a 5%, (Romo de Vivar, 1989)

2.1.6 USOS EN MEDICINA TRADICIONAL

Los Agaves se han utilizado desde la época prehispánica como alimento, bebida, construcción, producción de fibras y medicina. Las hojas de varias especies, o el jugo de la hoja, todavía se usa ampliamente en México como jabón. (García-Mendoza, 1998)

El uso terapéutico de estas plantas en México es múltiple ya que se ha utilizado contra el cáncer, diabetes, mordeduras de serpientes, espasmos estomacales, calentura, golpes, heridas, depurativo de la sangre y como diurético. (Mendieta, 1981)

En la India se utiliza el jugo de la hoja como antisifilítico, las raíces como antiescorbútico y la goma de la hoja contra el dolor de cabeza. En Africa se ha utilizado contra el reumatismo, como diurético, purgativo y emenagogo. Además el jugo de la hoja se ha utilizado en papel de pared contra las termitas. (Mitchell, 1962)

Como ensilaje las hojas se han encontrado adecuadas para el ganado. El jugo es rico en azúcares y cuando se tratan adecuadamente puede emplearse en bebidas refrescantes. Una forma pasteurizada del jugo, "la miel del maguey", se ha exportado a los Estados Unidos. Una forma del jugo lleva azúcar fructosa que es aceptable a los diabéticos y puede, por consiguiente, tener posibilidades de formula como un alimento saludable para los diabéticos. (Marroquín A. Sánchez, 1966)

Los indígenas usaron las hojas, como cataplasmas para las comezones, llagas, moretones y heridas. Pennington y Bye reportaron que varios Agaves son empleados por los indígenas Tarahumaras como venenos de peces. (Pennington, 1958. Bye *et al*, 1975)

Los Tlaxcaltecas usaban los extremos secos de las hojas del maguey como combustible para cocinar, entre los indios del suroeste de Estados

Unidos las hojas se ha usado como cataplasmas para el reumatismo y el lumbago. (Felger *et al* 1970)

En Agaves aunque hay antecedentes empíricos de su papel antifúngico poco se ha investigado científicamente (Wall *et al* 1957)

2.2 ANTECEDENTES DE *Entamoeba histolytica*

2.2.1 DEFINICION E IMPORTANCIA EPIDEMIOLOGICA.

La amibiasis es una infección parasitaria ocasionada por *E. histolytica*. (OMS, 1997) La infección es de distribución universal, pero la mayor incidencia ocurre en las comunidades pobres y con mal saneamiento ambiental. La infección es endémica y ocurre tanto en los países desarrollados de clima templado o frío, como en los países tropicales en vías de desarrollo, sin embargo, es mas frecuente en estos últimos. La incidencia mundial de la amibiasis ha sido estimada en 12 %, (Martínez-Palomo, 1989) hay regiones que presentan tasas de prevalencia elevadas, por ejemplo México, donde un estudio seroepidemiológico reciente mostró un 8.4% de prevalencia en todo el país. (Caballero-Salcedo *et al*, 1994)

A nivel mundial, la amibiasis está catalogada como la tercera parasitosis causante de muerte. Alrededor de 10 a 20% de la población mundial se considera infectada y el 10% de esta población sufre de esta enfermedad, con una letalidad que oscila entre el 0.1 y 0.25% (en números: 500 millones de enfermos y entre 40 y 110 mil muertes). (Walsh, 1986)

La amibiasis intestinal afecta y es más letal en los extremos de la vida, mientras que el absceso hepático es mas frecuente en varones entre 30 y 45 años, y se asocia con una alta mortalidad. (Carranda-Bravo, 1989)

2.2.2 CLASIFICACION TAXONOMICA (Carliss *et al*, 1969) (Levine *et al*, 1980):

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Sarcodina

Superclase: Rhizopoda

Clase: Lobosea

Subclase: Gymnamoebida

Orden: Amoebida

Suborden: Acanthophodina

Familia: Endamoebidae

Genero: *Entamoeba*

Especie: *histolytica*

2.2.3 CICLO DE VIDA

La *E. histolytica* se define morfológicamente como un eucariote unicelular con trofozoítos uninucleados de 20 a 40 μm de diámetro y quistes de 10 a 16 μm , teniendo 4 núcleos. La infección se adquiere por la ingestión del quiste maduro, que es resistente a los jugos gástricos. El desenquistamiento ocurre en el intestino delgado. Del quiste sale una ameba tetranucleada que multiplica sus núcleos para formar una ameba de 8 núcleos. Posteriormente esta se fragmenta en 8 pequeñas amebas, llamadas amébulas metaquísticas. Estas se transforman en los trofozoítos que finalmente se establecen en el colon, donde se alimentan de bacterias y restos celulares. (Reed, Ravdin, 1995)

2.2.4 TRATAMIENTO

La respuesta clínica a la amibiasis es sumamente variable según la localización e intensidad de la infección y aunque la terapéutica moderna es de elevada proporción de curaciones, en caso de exposición continua e infecciones bacterianas secundarias, en una región de amibiasis endémica, son muy pocas las probabilidades de cura permanente. (Goth, 1975)

En primer lugar se da tratamiento médico a los enfermos agudos de amibiasis intestinal, enfermedad diarrea aguda y disentérica (10% del total de cuadros de gastroenteritis o enfermedad diarrea aguda). El tratamiento se prescribe basándose en el diagnóstico y al criterio clínico del médico tratante, sobre todo si se dispone de laboratorio y hay leucocitos sugestivos en moco fecal o se tiene el hallazgo de *E. histolytica* en trofozoito (diferenciado con micrómetro ocular).

En segundo lugar también se piensa que por salud pública es recomendable dar tratamiento médico a los convalecientes de enfermedad amibiana aguda, que se sabe son importante factor de excreción de quistes infectantes de *E. histolytica* y que podemos suponer son francamente patógenos.

En tercer lugar se piensa que deben tratarse los portadores sanos que se comprueben excretan quistes de *E. histolytica* (descartando con micrómetro *E. hartmanni*) o los adultos con enfermedad amibiana crónica y que son manejadores de alimentos (en expendios públicos o puericultores en guarderías o casas de cuna, o madres que cuidan a sus pequeños hijos). (Gutiérrez, 1991)

Sin embargo considerando que el 90% de los infectados son portadores sanos, no enfermos y que siendo este un problema de salud predominante del tercer mundo, sería económicamente imposible, incosteable e ilógico intentar dar tratamiento a los 500 millones de portadores de *E. histolytica* (además estos suelen ser en su evolución intermitente o pueden dejar de ser portadores sin tratamiento específico). Ahora, si contemplamos la posible sobreestimación y la falta de discriminación en el laboratorio de *E. hartmanni*, el problema es más grave aún. Esto se vuelve de importancia capital ya que el examen coproparasitológico es de los más rutinarios y fundamental para conocer el estado general de salud de un individuo en la evaluación clínica.

El tratamiento de amibiasis intestinal es fundamentalmente farmacológico, basado en medicamentos que pueden subdividirse en tres grandes grupos:

- a) Los que actúan en el lumen intestinal, como las quinoleínas, la diloxanida, el sulfato de paromicina y, recientemente, las quinifamidas.
- b) Los amebicidas tisulares, como la emetina, dehidroemetina y la cloroquina.
- c) Los que actúan en ambos niveles, como el metronidazol y sus derivados.
(Webster, 1990)

La respuesta al tratamiento farmacológico es adecuada en mas del 90% de los casos a dosis terapéuticas. (Webster, 1990)

El tratamiento de la amebiasis cólica, disentérica e invasora debe seguirse secuencialmente frente a los trofozoítos con amebicidas tisulares, y luego, de forma obligada, frente a los quistes localizados en el colon con los amebicidas de contacto. Los medicamentos tisulares más eficaces son los 5-nitroimidazoles, y entre ellos el metronidazol, el ornidazol, el tinidazol y el secnidazol, el más utilizado es el metronidazol, a razón de 750 mg por vía oral cada ocho horas durante diez días en personas de más de 60 kg y 500 mg/8 horas en los de menor peso. Se puede administrar por vía intravenosa en los casos más graves. El metronidazol está contraindicado en caso de hipersensibilidad, en el primer trimestre del embarazo, durante la lactancia y si existe alcoholismo; su administración debe interrumpirse si se detectan neuropatías periféricas, ataxia o alteraciones del sistema nervioso central. Se deben vigilar los tratamientos con warfarina. La ingestión de alcohol debe evitarse con los imidazoles por el efecto antabús, así como la leche y sus derivados por la atelectasia asociada. A los pacientes con historia previa de discrasia sanguínea se les tienen que efectuar recuentos periódicos de las series hemáticas. Este medicamento tiñe la orina de color oscuro, produce sabor metálico y en animales se ha demostrado su potencial carcinogénico, aunque no se ha probado en el humano. (Khaw, Panosian, 1995)

2.3 ANTECEDENTES DE *Trichomonas vaginalis*

Aunque no amenaza la vida, la tricomoniasis es un problema mayor de salud, sobre todo en mujeres. Es transmitida sexualmente y tiene una incidencia mundial muy alta. Deben hacerse esfuerzos para identificar este patógeno en todos los casos sospechosos. El método más sensible para detectar *T. vaginalis*, es utilizando a los anticuerpos monoclonales fluorescentes y hacer posible el diagnóstico de una infección con alta sensibilidad y especificidad y tratar al paciente en la misma visita. El tratamiento es eficaz, acercándose a un 100% en la tasa de éxito cuando también se trata a los consortes sexuales. Sólo con intentos agresivos de diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad se puede parar su diseminación. (Obstet Gynecol 74:536, 1989)

2.3.1 MICROBIOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA

Hay sólo tres especies de tricomonadas que infectan a los seres humanos, y son extremadamente sitio-específicos. (Honigberg, 1978) *Trichomonas tenax* sólo vive en la cavidad oral, *Pentatrichomonas hominis* solamente en el tracto intestinal y *T. vaginalis* solamente en el tracto inferior genito-urinario. Solamente *T. vaginalis* es considerado patógeno, (Thomason *et al*, 1984) los seres humanos son su hospedero natural.

Trichomonas vaginalis es un flagelado unicelular, aproximadamente de 20 x 14 μm , que generalmente aparece piriforme debido a las características del movimiento ameboide, aunque también puede parecer ovoide. Es un parásito extracelular, el organismo tiene cuatro flagelos anteriores y un quinto flagelo posterior que se extienden a lo largo del cuerpo del parásito. Todos están involucrados en la locomoción. *Trichomonas vaginalis* es un anaerobio estricto. No se puede multiplicar excepto bajo condiciones anaeróbicas.

El parásito existe sólo forma de trofozoíto. No puede formar quiste. Ingiere bacterias, levaduras y eritrocitos por fagocitosis y puede transportar moléculas pequeñas cruzando por la membrana de la célula que tiene receptores para muchas proteínas del plasma y lipoproteínas necesarias para su crecimiento. (Honigberg, 1978)

La tricomoniasis es considerada la enfermedad no viral sexualmente transmitida más común. (McLellan *et al*, 1982) Mundialmente, la Organización Mundial de la Salud estima que 180 millones de personas son infectadas anualmente. (Krieger, 1981) Infecta a ambos, hombres y mujeres.

En los Estados Unidos, no existe la incidencia exacta porque la enfermedad no se reporta a las autoridades de la salud. Usando una estimación conservadora de un 5% de predominio en la población general, basada en varios informes, por lo menos se infectan 6 millones de mujeres y sus consortes anualmente en los Estados Unidos. (Thomason *et al*, 1984)

En mujeres en edad reproductiva, *Trichomonas vaginalis* es secundado solamente por la vaginosis bacteriana como una causa de vaginitis. La incidencia de la tricomoniasis en este grupo varía de 2% en el sector privado a 56% de pacientes atendidos de enfermedades clínicas sexualmente transmitidas. En el estudio de un hospital en el interior de la ciudad en Milwake, 42% de los pacientes asintomáticos tenían *T. Vaginalis*. (Thomason *et al*, 1988) La edad media (\pm SD) de los pacientes con tricomoniasis era 20.9 ± 7.2 años, con edad promedio de 17. El pico de incidencia esta reportado entre edades de 16-35, con ninguna variación estacional. (Charles, 1980) La incidencia más alta está en adolescentes con compañeros sexuales múltiples.

2.3.2 CLASIFICACION TAXONOMICA (Levine *et al*, 1980):

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophorea

Superorden: Parabasalidea

Orden: Trichomonadida

Familia: Trichomonadidae

Genero: *Trichomonas*

Especie: *vaginalis*

2.3.3 TRATAMIENTO

La tricomoniasis no debe ignorarse aun cuando el paciente no tenga ningún síntoma. El tratamiento es necesario para prevenir la transmisión a parejas sexuales y evitar problemas más tarde. Las únicas drogas que han demostrado ser eficaces son los 5-nitroimidazoles. Entre estos se incluye al metronidazol, ornidazol y tinidazol, con las dos últimas drogas solamente disponibles en Europa. Si en la pareja ambos son tratados, las proporciones de curación se acercan al 100%. (Lossick, 1982)

Una sola dosis de 2 g y un régimen más extendido de 5 y 7 días de 250 mg tres veces al día, han sido efectivas ambas. (Lossick, 1982) A causa de las complicaciones en pacientes con terapia de una sola dosis que es más alta, este régimen es preferido clínicamente, pero la terapia extendida puede ser más efectiva. Debido a que es difícil detectar *T. vaginalis* en varones asintomáticos, la prueba de curación en varones es inestable. A causa de que la pareja femenina se vuelve a reinfectar, el consorte masculino debe ser vuelto a tratar.

La mayoría de las cepas de *T. vaginalis* son altamente susceptibles al metronidazol, pero se han aislado cepas resistentes. La resistencia es considerada como un evento raro. (Meingasser, Thurner, 1979) La mayoría de los fracasos del tratamiento son el resultado de la reinfección del compañero no tratado o representar pocas complicaciones al tomar el medicamento.

No hay actualmente ningún lineamiento en la dirección del manejo terapéutico de la tricomoniasis refractaria. (Lossick *et al*, 1986) Pacientes con quienes fracasa una sola dosis de 2 g deben ser tratados con terapia extendida. Aquél régimen que fracasa de 7-10 días de 250 mg tres veces pueden tratarse con dosis más altas por periodos extendidos. Lossick *et al* (Lossick *et al*, 1986) trató con éxito los casos refractarios tratados con arriba de 1 g administrado oralmente tres veces al día durante 14 días e incluso agregó 500 mg/día intravaginalmente para este régimen, aunque no hay ninguna evidencia que esto sea esencial. La mayoría de los pacientes tratados con tales dosis altas de metronidazol experimentan náusea significativa y un sabor metálico. Las sensaciones cambian como ligero dolor

de cabeza y la cefalgia también son comunes. Un paciente sufrió neuropatía inestable. Una alternativa de alta dosis de metronidazol en casos refractarios es otro compuesto 5-nitroimidazol conocido como tinidazol. Aunque existe la resistencia cruzada, hay datos que sugieren que esta droga puede ser efectiva. (Meingasser, Thurner, 1979) Desgraciadamente, estas drogas no están actualmente disponibles en México. Claramente, en cualquier decisión para el tratamiento con dosis diarias de metronidazol que excede 3 g, los riesgos deben ser considerados. No hay ventajas por usar metronidazol intravenoso excepto en pacientes incapaces de tolerar la droga por boca. (Lossick *et al*, 1986)

El metronidazol rápidamente cruza la placenta y los niveles fetales igualan a los de la madre. (Amon, Amon, 1980) La droga ha demostrado ser carcinogénica en ratas y ratones, pero no en hámsters, cuando se dio en altas dosis por periodo extendidos. Generalmente, el metronidazol no se da durante el primer trimestre debido al posible efectos teratogénicos, aunque ésta no se ha reportado todavía en seres humanos.

Otros medicamentos pueden usarse para aliviar los síntomas. El clotrimazol, un imidazol fuera del grupo 5-nitro, elimina síntomas pero no erradican la infección tan eficazmente como el metronidazol. (Lossick, 1982) Se muere *T. vaginalis* después de 48 horas de exposición a 100 µg/ml *In vitro*, pero una crema intravaginal de 100 mg cura sólo del 48-66% de los pacientes cuando la curación es determinada por un cultivo. (Schnell, 1974)

Aunque este medicamento es menos efectivo lejos del metronidazol oral, puede jugar un papel relevando síntomas en casos refractarios al metronidazol y en el primer trimestre de embarazo. (Rein, Muller, 1984) Otros medicamentos también se han evaluado. Sulfanilamida-aminacrina-alantoina mostraron no ser mejor que el placebo. (Rein, Muller, 1984) Ha habido informes de curación por lavado con varios químicos diseñados para acidificar la vagina; aunque éstos medios podrían relevar incomodidad por la baja en los números de protozoarios, generalmente no eliminan el organismo completamente. (Lossick, 1982) Optimamente, el paciente debe ser aconsejado de no ducharse durante 2 días antes de su examen porque

ducharse bajaría el número de organismos viables, haciendo más difícil la detección de los tricomonadas. (Kean *et al*, 1954)

2.4 ANTECEDENTES DE *Giardia lamblia*

Giardia lamblia es potencialmente patógeno para el humano, considerando que este protozoario aparece frecuentemente con la ausencia de síntomas, y a veces es capaz de causar un leve síndrome intestinal autolimitado, y más aun raramente es responsable de una enfermedad seria. En el pasado la opinión de prevalencia médica fue que *Giardia lamblia* era parásito comensal de humanos y que su habilidad para causar enfermedad era cuestionable porque (Monat *et al* 1946) *Giardia* actualmente es de los parásitos intestinales mas frecuentemente identificados en laboratorios de salud pública en los Estados Unidos (Intestinal parasites ranging far afield in the USA) y el Reino Unido. (Communicable Disease Weekly Reportes)

2.4.1 CICLO DE VIDA

El ciclo de vida en humanos incluye una forma de trofozoíto y de quiste. El hábitat usual de los trofozoítos flagelados binucleados es el epitelio en borde de cepillo del segundo tercio superior del intestino delgado (duodeno y yeyuno) donde los organismos atacan por un disco ventral adhesivo; allí los parásitos se reproducen por fisión binaria.

Algunas de las formas vegetativas destacan del borde de cepillo por razones desconocidas y entre el arroyo fecal. En el intestino delgado comienza el enquistamiento, (Iwanczuck, 1968) con el trofozoíto redondeado y elaborando una pared quística; el quiste resultante es excretado con las heces.

Como los quistes de éstos organismos sobreviven al pasar fuera del hospedero, y los nuevos hospederos adquieren la infección por ingerir estos quistes.

Cada uno de los dos núcleos en el quiste sufre una sola división, así que el quiste maduro contiene cuatro núcleos. En el momento del desenquistamiento un trofozoíto cuadrinucleado en los procesos de la

división surgen de la pared quística, (Bingham, *et al* 1979) y rápidamente completa el proceso de la división, produciendo dos trofozoítos binucleados.

A veces la transición en el intestino de trofozoíto a quiste no ocurre. Esto puede pasar, por ejemplo, en instancias de intenso tránsito intestinal donde no está disponible el tiempo suficiente para formar el quiste. Las muestras diarreicas de pacientes con giardiasis son de este modo particularmente probables que contengan trofozoítos. La transformación de trofozoíto a quiste aparentemente nunca ocurre fuera del hospedero; más bien, los trofozoítos excretados son desintegrados.

Los quistes de *Giardia lamblia* son resistentes a la destrucción en soluciones hipotónicas tales como el agua. La longitud de su supervivencia en agua varía grandemente, dependiendo a la temperatura. Por ejemplo, a 8°C los quistes de *Giardia* sobreviven por más de 2 meses, mientras que a 21°C y 37°C sobreviven cerca del mes y cuatro días respectivamente. (Bingham, Meyer, 1979)

2.4.2 DISTRIBUCION

Los organismos dentro del género *Giardia*, se han reportado como habitantes intestinales de una variedad de mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces óseos, deben ser considerados entre los protozoarios parásitos de presencia intestinal más amplia. (Kulda, Nohynkova, 1978)

Las infecciones humanas con este organismo aparecen en el mundo endémicamente y han sido reportado de los Trópicos (Dancinger, López, 1975) al Artico. (Babbott *et al*, 1961) En resumen del promedio de prevalencia generalmente va de 1.1 a 12.5 %, aunque se encontraron porcentajes más altos en algunas localidades. (Petersen, 1972) La prevalencia fue mas alta en los Trópicos y subtrópicos, probablemente reflejando los bajos estándares higiénicos en estas áreas.

En el mundo la prevalencia de infección endémica de *Giardia lamblia* se ha encontrado siendo más alta entre los bebés y niños (Meuwissen *et al*, 1977), y esto puede relacionarse 1) inversamente en estándares higiénicos disminuidos en grupos socioeconómicos bajos y 2) al hecho que este grupo no ha sido previamente infectado e inmunológicamente estimulado por estos

organismos. Esta infección se encuentra frecuentemente en instituciones para niños. (Black *et al*, 1977)

2.4.3 ASPECTOS CLINICOS

A la luz de numerosos reportes de estudios que involucran humanos (Duncombe *et al*, 1978) y animales, (Roberts-Thomson *et al*, 1976) en ambos se mantiene la duda de que los organismos de *Giardia* sean considerados patógenos potenciales.

La giardiasis sintomática puede presentarse con una variedad de signos y síntomas, que incluyen el dolor epigástrico, diarreas o pérdidas de líquidos, calambres abdominales, malestar, pérdida de peso, y esteatorrea. En el más severo de los casos, mala absorción (Ridley, Ridley, 1976), y puede ocurrir el síndrome de dolor intestinal y crecimiento retardado. (Burke, 1975)

La giardiasis asintomática parece presentarse más frecuentemente, y puede ser epidemiológicamente más significativa, que la giardiasis sintomática. Individuos con infecciones asintomáticas por *Giardia lamblia* son detectados probablemente muy poco o al intentar el tratamiento como en aquellos con infección sintomática y, por consiguiente, servir probablemente más como portadores o diseminadores de la enfermedad. El portador de *Giardia* puede excretar quistes por meses o años. (Dancinger, López 1975)

2.4.4 CLASIFICACION TAXONOMICA (Levine *et al*, 1980):

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophorea

Orden: Diplomonadida

Suborden: Diplomonadina

Familia: Hexamitidae

Genero: *Giardia*

Especie: *lamblia*

2.4.5 CONSIDERACIONES TERAPEUTICAS.

Existe alguna controversia con respecto a las opciones de drogas para tratar la giardiasis. Actualmente en EE.UU, la quinacrina es la droga mas ampliamente prescrita, (Drugs for parasitic infections, 1978) aunque también se prescriben metronidazol y la furazolidina.

Ambos, quinacrina y metronidazol se han reportado por causar efectos adversos. La administración de quinacrina es frecuentemente acompañada por vértigo, dolor de cabeza y vomito; reacciones psicóticas y el manchando azul o amarillo de la piel, aunque frecuente, no son reacciones adversas importantes. (Drugs for parasitic infections, 1978) La ingestión frecuente del metronidazol produce náusea y dolor de cabeza, ocasionalmente vomito y diarrea. Además, desde que esta droga se informó ser carcinogénica, teratogénica y mutagénica en, sujetos de prueba no humanos, (Rustia, Shubik, 1972) se contraindica para el tratamiento de mujeres embarazadas; (Drugs for parasitic infections, 1978) sin embargo, mantiene un método de tratamiento alternativo para un porcentaje relativamente pequeño de pacientes sin embarazo que no son curados por la quinacrina.

La furazolidina es el único agente anti giardial disponible en los Estados Unidos en una suspensión; es particularmente útil para tratar a los niños pequeños. (Wolfe, 1978) Sin embargo, su eficacia para erradicar la giardiasis -cerca del 80%- realmente no es tan grande como el de la quinacrina o el metronidazol.

El tinidazol, un nitroimidazol relacionado al metronidazol, se usa ampliamente en Europa y en otras partes. (Pettersson, 1975)

El tratamiento de la giardiasis asintomática debe considerarse fuertemente para prevenir la perpetuación de los estados de portador y diseminador y la posible presencia de síntomas tardíos. (Keystone *et al*, 1978)

La observación de que ninguna de las drogas anti giardiales usadas en este país son capaces de curar todas estas infecciones aumenta la posibilidad de que pueda existir resistencia a drogas de las cepas de *Giardia lamblia*, como se ha observado con otros microorganismos. (Wolfe, 1978)

3. JUSTIFICACION

El metronidazol es un 5-nitroimidazol que tiene una potente actividad contra *E. histolytica*, *G. lamblia*, y *T. vaginalis*. Es la droga de elección en contra de la giardiasis y el tratamiento inicial de la amibiasis invasiva y los efectos laterales comunes en el hombre pueden ser: dolor abdominal leve, dolor de cabeza, náusea, un sabor metálico persistente y más raramente colitis pseudomembranosa (facq, Dereux, 1984) gastritis, vómito, vértigo, depresión, insomnio, somnolencia, molestia uretral y oscurecimiento de la orina. (Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 1993) Se usa ampliamente en prácticas gastroentéricas y ginecológicas, no ha sido considerado neurotóxico hasta ahora, por algunos informes de casos que han demostrado claramente que el metronidazol puede causar neuropatía periférica sensorial motora, en donde al excederse por mas de 15 días con una dosis de 400 mg tres veces al día la relación de causa-efecto fortalece el diagnóstico que el metronidazol induce neuropatía. El mecanismo y la dosis a la cual el metronidazol causa neuropatía periférica no se ha establecido todavía. (Takeuchi *et al* 1988)

La acción del metronidazol y derivados del 5-nitroimidazol se caracteriza por provocar muerte selectiva de anaerobios procariotes y eucariotes. Por otra parte se ha demostrado en algunos estudios que el metronidazol es tanto mutagénico como carcinogénico. (Legator *et al*, 1975; Rustia y Shubik, 1972)

Es por eso que la búsqueda de nuevos fármacos que eliminen o reduzcan los efectos laterales del metronidazol se hace patente, y cobra importancia la base de la hipótesis etnobotánica que en este caso se enfoca al estudio del efecto del extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha* sobre tres de las principales parasitosis en México.

4. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

4.1 HIPOTESIS

El extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha* tiene efecto inhibitorio sobre *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* y *Giardia lamblia*.

4.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar la concentración inhibitoria media (CI₅₀) que ejerce el extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha* sobre el crecimiento *In vitro* de *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* y *Giardia lamblia*.

4.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la concentración inhibitoria media (CI₅₀) del extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha* para *Entamoeba histolytica*.
- Determinar la concentración inhibitoria media (CI₅₀) del extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha* para *Trichomonas vaginalis*.
- Determinar la concentración inhibitoria media (CI₅₀) del extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha* para *Giardia lamblia*.
- Realizar un estudio fitoquímico preeliminar del extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha*.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* cepa HM1:IMSS, *Trichomonas vaginalis* cepa GT-15 y *Giardia lamblia* cepa IMSS:O989 y las hojas de la planta *Agave lophantha* Schiede.

5.2 ORIGEN DE LOS REACTIVOS

El extracto de levadura y peptona de caseína se obtuvieron de Bioxon de México. Glucosa y L-cisteína fueron obtenidas de Sigma Chemical Co. (St Louis MO, USA). Cloruro de sodio, citrato férrico amónico, hidróxido de sodio, ácido ascórbico, de Reactivos Monterrey. La solución de vitaminas de Diamond fue obtenida de JRH Biosciences. (Lenexa, KS)

5.3 EQUIPO

Agitador magnético marca Magne stir, Lab. Line Instruments Inc. Melrose Park ILL USA.

Balanza analítica marca Sartorius. N° de serie 3101029. Alemania

Baño de agua con regulador de temperatura marca VWR Scientific, modelo 1120, N° Serie 300716

Campana de transferencia

Cámara de cristal para contar células (Neubauer) con dos compartimentos de mm de profundidad rayado de línea brillante marca MCA Hausser scientific. USA.

Filtros Millipore: 0.22 µm

Incubadora Napco, modelo 5100, Portland Oregon, USA.

Mechero modelo TOUCH-O-MATIC.

Microscopio invertido marca Reich, N° de serie WI-54220.

Micro-osmometer, modelo 3MO Plus, Advanced Instruments Inc, Norwood, Massachusetts USA.

Potenciómetro 50 pH Meter marca Beckman, Fullerton CA. USA.

Pipetas serológicas cortas de 0.2, 1.0 y 2.0 ml marca Bellico Vineland NJ USA

Pipetas Pasteur marca chase Instruments. Glens Falls NJ. USA.

Tubos 13 x 100 mm con tapón de rosca marca Pirex.

5.4 PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

5.4.1 MEDIO PEPHS

Se realizó de la siguiente manera: Extracto de hígado y páncreas (EHP) 250 ml, Peptona de caseína 10.00 g, D-glucosa 6.00 g, L-cisteína 1.00, Acido ascórbico 0.20 g, KH_2PO_4 0.60 g, K_2HPO_4 1.00 g. Se mezclan los componentes, y se disuelven en 250 ml de EHP y se agregan 650 ml de agua desionizada. El pH se ajusta a 7.0 con NaOH 10 N y se afora a 1000 ml con agua desionizada. El medio se distribuye en alícuotas de 5 ml en tubos para cultivo de 13 x 100 mm con tapón de rosca (Kimble, Vineland NJ, USA). El medio se esteriliza en autoclave por 15 min. a 15 lb de presión a 121°C y se almacena a temperatura ambiente, añadiendo 48 h antes de sembrar 0.5 ml de suero bovino estéril más vitaminas. (Saíd-Fernández *et al*, 1988)

5.4.2 MEDIO TYI-S-33

Se realizó de la siguiente manera: Peptona de caseína 20.00 g, Extracto de levadura 10.00 g, D-glucosa 10.00 g, NaCl 3.30 g, L-cisteína 1.00, Acido ascórbico 0.20 g, KH_2PO_4 0.60, K_2HPO_4 1.00 g, Citrato férrico amónico 0.028. Se mezclan los componentes, se disuelven y se afora a 850 ml de agua desionizada. El pH se ajusta a 7.0 con NaOH 10 N y se afora a 1000 ml con agua desionizada. El medio se distribuye en alícuotas de 5 ml en tubos para cultivo de 13 X 100 mm con tapón de rosca (Kimble, Vineland NJ, USA). El medio se esteriliza en autoclave por 15 min. a 15 lb de presión a 121°C y se almacena a 4°C. 48 h antes de inocular se añade 0.5 ml de suero bovino más vitaminas y 0.1 ml de bilis bovina (0.5 g/10 ml de agua desionizada), ambas soluciones esterilizadas por filtración. (Diamond *et al*, 1978)

5.5 OBTENCION DEL EXTRACTO ETANOLICO

Las hojas de la planta *Agave lophantha* Schiede, se recolectaron de la colección particular del MC Jorge Verduzco, del Departamento de Biología

Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL quien también realizó la clasificación de la especie estudiada.

5.5.1 MACERACION

Las hojas frescas del *Agave lophantha* se cortan en fracciones pequeñas, pesándose 50 g de este producto y mezclándose con 150 ml de alcohol etílico absoluto, macerándose durante 5 días a temperatura ambiente en el aparato tipo shaker, después de este tiempo la solución se filtró y el sólido se desechó. El filtrado se evaporó en una estufa a 45°C y el residuo totalmente seco se pesó y se almacenó en un lugar fresco y oscuro hasta su uso. (Ríos, 1987)

5.6 PREPARACION DE LA CONCENTRACION DEL EXTRACTO ETANOLICO

Se pesó 1 g del extracto obtenido del *Agave lophantha* y se disolvió en PBS hasta un volumen de 60 ml (16.66 mg/ml) y se esterilizó por filtración, tomándose volúmenes de esta solución de 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 ml para ser evaluados en los cultivos de *E. histolytica* y *T. vaginalis*, en el medio PEPHS, que equivalen a las concentraciones de 1120, 580, 290 y 150 µg/ml respectivamente.

De la misma solución stock, se tomaron los volúmenes de 50, 25, 12.5 y 6.25 µl para ser evaluados en los cultivos de *G. lamblia* en el medio TYI-S-33 que equivalen a las concentraciones de 147.43, 74.04, 37.10 y 18.57 µg/ml respectivamente.

5.7 PREPARACION DE LA CONCENTRACION DEL METRONIDAZOL

Se disolvió 50 mg de metronidazol (sigma) en 5 ml de medio PEHPS o TYI-S-33 según correspondió a los requerimientos de cada cepa (10 mg/ml) y posteriormente se esterilizó por filtración. Diluyendo basándose en la Tabla N° 1, a partir de la dilución 1:100:

5.8 CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas, HM1-IMSS de *Entamoeba histolytica*, y GT-15 de *Trichomonas vaginalis* se mantuvieron cultivadas en 5 ml de medio PEPHS con 0.5 ml de suero bovino (Saíd Fernández *et al*, 1998) y un inóculo de 20,000 y 100 trofozoítos/ml respectivamente, la cepa IMSS:0989 de *Giardia lamblia* se cultivó en 5 ml de medio TYI-S-33, (Diamond *et al*, 1978) 0.5 ml de suero y 0.1 ml de bilis bovinas con un inóculo de 10,000 trofozoítos/ml. (Keister BD, 1983)

Todas las cepas fueron incubadas a 36.6° C, en tubos de 13 x 100 mm con tapón de rosca. Antes de cada resiembra los cultivos se observaron en un microscopio invertido para comprobar el buen estado de las células. *Entamoeba histolytica* se resembró a las 72 horas, *Trichomonas vaginalis* y *Giardia lamblia* cada 48 horas. Ajustándose el número de trofozoítos para la siguiente resiembra.

El cultivo que mostró la mejor densidad y el mejor aspecto fue colocado en agua-hielo por 10 minutos para despegar las células adheridas y agitadas 10 veces para homogeneizarlas, el número de células se determinó tomando una alícuota del cultivo, contadas en un hemocitómetro.

Las resiembras y bioensayos, se realizaron cuando las células se encuentran en su fase logarítmica de crecimiento.

5.9 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

Entamoeba histolytica. Después de enfriarse en agua-hielo por 10 minutos el tubo fuente de inóculo, y agitarse 10 veces suavemente para homogeneizarse, se inocularon 63 tubos de cultivo conteniendo el medio PEPHS, con 20,000 trofozoítos/ml de *Entamoeba histolytica*. Cada 24 h se determinó la densidad de 9 tubos de cultivo en un hemocitómetro durante 7 días.

Trichomonas vaginalis. De la misma forma se inocularon 45 tubos de cultivo conteniendo el medio PEPHS con 100 trofozoítos/ml de *Trichomonas vaginalis* cepa GT-15. Contándose 9 tubos diarios durante 5 días.

Giardia lamblia. También se inocularon 45 tubos de cultivo conteniendo el medio TYI-S-33, donde se inocularon 10,000 trofozoítos/ml, contándose 9 tubos diarios durante 5 días.

Para cada cepa se graficó el número de trofozoítos por ml contra el tiempo en horas.

5.10 DETERMINACION DEL EFECTO DE LAS DROGAS

Se realizaron curvas Dosis-respuesta para determinar el efecto de las concentraciones del extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha* y como control positivo se utilizó metronidazol sobre los trofozoítos de las tres cepas; que crecieron en sus respectivos medios de cultivo e inóculos, hasta un tiempo de 72 horas. Cada concentración se probó en tres eventos independientes por triplicado, comparándose contra el crecimiento de las cepas sin la adición de las drogas como control negativo, finalizado el tiempo de incubación se procedió a contar el número de trofozoítos/ml utilizando un hemocitómetro.

En ambas curvas Dosis-respuesta, el valor de la CI_{50} se obtuvo mediante la interpolación de la gráfica en el punto donde se encuentra el número 5 del Probit por un análisis de regresión.

5.10.1 CURVAS DOSIS-RESPUESTA DE LA CONCENTRACION DEL EXTRACTO ETANOLICO

Inoculados los tubos de cultivo con 20,000 trofozoítos/ml de *Entamoeba histolytica* y con 100 trofozoítos/ml de *Trichomonas vaginalis*, en el medio de cultivo PEPHS, se evaluaron las concentraciones de 1120, 580, 290 y 150 $\mu\text{g/ml}$ del extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha*.

De la misma manera, se evaluaron las concentraciones de 147.43, 74.04, 37.10 y 18.57 $\mu\text{g/ml}$ del extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha* sobre los cultivos de *Giardia lamblia*, en el medio TYI-S-33.

5.10.2 CURVAS DOSIS-RESPUESTA DE LA CONCENTRACION DEL METRONIDAZOL

Inoculados los tubos de cultivo con 20,000 trofozoítos/ml de *Entamoeba histolytica* y con 100 trofozoítos/ml de *Trichomonas vaginalis* en el medio de cultivo PEPHS, y con 10,000 trofozoítos/ml de *Giardia lamblia* en tubos conteniendo el medio TYI-S-33. Se evaluaron las concentraciones del metronidazol de 0.4, 0.2, 0.1 y 0.05 µg/ml.

5.11 DETERMINACION DEL Probit

La obtención de la CI_{50} se realizó al obtener el logaritmo base 10 de las concentraciones de las drogas, determinando el número de trofozoítos vivos en cada una de las dosis probadas, obteniendo el número de trofozoítos muertos, restando el número de trofozoítos de cada concentración probada al testigo, calculando la relación existente entre trofozoítos muertos y vivos, mediante la división del número de trofozoítos del testigo entre el número de trofozoítos muertos en cada concentración, esto dió un número menor que uno; el número que se obtuvo de la división anterior se buscó en las tablas Probit, el Probit obtenido de las tablas se graficó en papel semilogaritmico, donde el eje de las Y se representaron los valores Probit y en el eje de las X el logaritmo base 10 de las concentraciones de las drogas. (Finney, 1977)

5.12 METODOS QUIMICOS DE IDENTIFICACION

(Domínguez, 1973)

5.12.1 Prueba de Liebermann-Burchard: Para triterpenos y compuestos esteroidales. Se disuelven 1.5 mg de muestra en cloroformo y luego se le añaden unas gotas del reactivo, observándose cambios de coloración; el reactivo se prepara agregando una gota de ácido sulfúrico a una mezcla de 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de cloroformo.

5.12.2 Prueba de Salkowski: Para esteroides y metilesteroides. De 1 a 2 mg de la muestra en 1 ml de cloroformo se pone en contacto con 1 ml de ácido sulfúrico, se desarrollan colores amarillo o rojo.

5.12.3 Prueba de Shinoda: Para compuestos de tipo flavonoide. A 1 mg de muestra disuelta en etanol y con limaduras de magnesio, se le aplica calor (60°C) y después unas gotas de HCl por las paredes. Se considera positiva con la aparición de coloraciones, naranja, rojo, rosa, azul y violeta.

5.12.4 Prueba de ácido sulfúrico: Para flavonoides. Una pequeña cantidad de muestra se disuelve en ácido sulfúrico concentrado y se observan coloraciones: amarillo para flavonas y flavonoles; naranja-guinda para flavonas; rojo–azuloso para chalconas. También detecta quinonas con coloración roja-púrpura.

5.12.5 Prueba de Baljet: Para sesquiterpenlactonas. Se utilizan dos soluciones que se mezclan en volúmenes iguales antes de usarse, solución A, 1 g de ácido pícrico en 100 ml de etanol; solución B, 10 g de hidróxido de sodio en 100 ml de agua. Para la prueba se ponen 2 a 3 mg de compuesto y unas 3 a 4 gotas del reactivo, siendo positiva si se forma una coloración naranja o roja oscura.

5.12.6 Prueba para coumarinas: Como las coumarinas son lactonas, se pueden disolver en soluciones alcalinas acuosas o alcohólicas con aparición de una coloración amarilla, la cual desaparece al acidular.

5.12.7 Prueba de Dragendorff: Para alcaloides. Modificación de Munier y Machelobuf. En la solución A, se disuelven 0.85 g de nitrato de bismuto en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 ml de agua, en la solución B, se disuelven 8 g 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, la prueba es positiva para alcaloides si al colocar 2 a 3 mg del compuesto y unas 3 a 4 gotas del reactivo, la placa da coloraciones rojas o naranjas persistentes por 24 horas.

5.12.8 Prueba de permanganato de potasio: Para dobles enlaces. Se prepara una solución de permanganato de potasio al 2% en agua, se disuelve 0.2 mg de muestra en agua acetona o metanol y se toma en capilar agregándole la solución de permanganato de potasio. La prueba es positiva si hay decoloración del reactivo.

5.12.9 Prueba de cloruro férrico: Para oxhidrilos fenólicos. Se disuelve una pequeña cantidad de muestra en etanol y se añade una gota de solución de cloruro férrico en agua (2.5%). La aparición de una coloración o precipitado rojo, azul, violeta o verde se considera positiva. En algunos casos es necesario utilizar una solución no acuosa de cloruro férrico a la que se le añade una base débil, por ejemplo cloroformo-piridina, para hacer más sensible la determinación.

5.12.10 Prueba de 2,4-dinitrofenilhidracina: Para identificar el grupo carbonilo. En un tubo de ensaye se disuelven 50 mg de 2,4-Dinitrofenilhidracina en 1 ml de etanol caliente, se agregan 50 mg del compuesto carbonílico y se calienta a baño María por 10 a 15 min. Se deja en reposo y luego se enfría en baño de hielo, la aparición de un precipitado naranja indica la presencia de un grupo carbonilo.

5.12.11 Prueba de Molisch: Para azúcares. En un tubo de ensaye se coloca la muestra y se le añade 3 gotas del reactivo de Molisch y agitar. Luego inclinar el tubo y depositar por la pared 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. Es positivo cuando se forma un anillo coloreado en la interfase. El reactivo se prepara disolviendo 1 g de α -naftol en 100 ml de etanol al 95%.

5.12.12 Prueba de bicarbonato de sodio: Para saponinas. La sal se preparó al 10 % en agua, uno ó 2 mg de la muestra disuelta en agua o etanol se mezcla con unas gotas de la solución de bicarbonato y la aparición de burbujas indica su presencia.

6. RESULTADOS

El porcentaje de rendimiento del extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha* fue de 5.37%.

Se realizaron curvas de crecimiento para determinar el tiempo de duplicación de *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis* en el medio PEHPS y, *Giardia lamblia* en el medio TYI-S-33. Para determinar este parámetro, utilizamos la fase de crecimiento exponencial de cada protozoario, tratándolos estadísticamente con el análisis de regresión, utilizando la ecuación de la recta.

Para determinar el tiempo de duplicación se utilizó la fórmula $0.693/\mu$ donde μ es la pendiente de la recta. (López-Revilla y Rodríguez-Báez, 1981)

Para *E. histolytica* el tiempo de duplicación fue de 19.85 h. (Figura N° 1) cuya ecuación de la recta fue $y = 0.0349x + 9.8408$, para *T. vaginalis* el tiempo de duplicación fue de 5.26 h, con la ecuación de la recta $y = 0.1315x + 5.6461$ (Figura N° 2) y el tiempo de duplicación para *G. lamblia* fue de 10.11 h, con ecuación de la recta $y = 0.0685x + 9.053$. (Figura N° 3)

Una vez establecido el tiempo de duplicación en cada cepa, se procedió a realizar curvas Dosis-respuesta para evaluar el efecto del extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha* sobre las tres cepas en sus respectivos medios de cultivo, utilizando el análisis estadístico Probit, estableciendo así la concentración inhibitoria media (CI_{50}).

Para determinar la CI_{50} se graficó en el eje de la Y los valores de las tablas Probit y en el eje de la X el logaritmo de la concentración utilizada del extracto etanólico, utilizando el análisis de regresión se obtuvo la CI_{50} al sustituir el valor del Probit 5 en la ecuación de la recta.

La CI_{50} establecida por el efecto del extracto etanólico del *Agave lophantha* sobre el crecimiento *In vitro* de *E. histolytica* fue de 353.50 $\mu\text{g/ml}$ (Figura N° 4) determinada con la ecuación de la recta $y = 3.3516x - 3.5412$. La CI_{50} establecida por el extracto etanólico sobre el crecimiento *In vitro* de *T. vaginalis* fue de 177.78 $\mu\text{g/ml}$, (Figura N° 5) determinada con la ecuación $y = 2.5455x - 0.7271$. La CI_{50} establecida por el extracto etanólico sobre el

crecimiento *In vitro* de *G. lamblia* fue de 58.608 µg/ml, (Figura N° 6) determinada con la ecuación $y = 1.6743x + 2.0399$.

Para comparar el efecto del extracto etanólico del *Agave lophantha* se realizaron curvas Dosis-respuesta de la droga comúnmente utilizada para el tratamiento de estas parasitosis, el metronidazol, sobre los tres protozoarios en sus respectivos medios de cultivo, utilizando el análisis estadístico Probit y así establecer la concentración inhibitoria media (CI₅₀).

La CI₅₀ establecida por el efecto del metronidazol sobre el crecimiento *In vitro* de *E. histolytica* fue de 0.1306 µg/ml, (Figura N° 7) determinada con la ecuación de la recta $y = 3.4326x + 8.0342$. La CI₅₀ establecida por el efecto del metronidazol sobre el crecimiento *In vitro* de *T. vaginalis* fue de 0.1239 µg/ml, (Figura N° 8) determinada con la ecuación de la recta $y = 1.1093x + 6.006$. La CI₅₀ establecida por el efecto del metronidazol sobre el crecimiento *In vitro* de *G. lamblia* fue de 0.2402 µg/ml, (Figura N° 9) determinada con la ecuación de la recta $y = 1.7457x + 6.0813$.

El análisis fitoquímico preliminar del extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha*, reveló la presencia de los compuestos químicos, resumidos en la Tabla N° 2.

7. DISCUSION

Desde que los aztecas trataban al absceso hepático amibiano masticando la raíz de la planta llamada ipeca o ipecacuana, de la cual se sabe se extrae la emetina (Cervantes, 1992) y además utilizaban las puntas de maguey para puncionar los abscesos como un tratamiento evacuador según consta en sus códices. (Carmona y Valle, 1880) También se han usado los extractos de las plantas para contrarrestar los desordenes gastrointestinales o de sus agentes causales. La emetina y otros fármacos como el metronidazol se han ido reemplazado por otros fármacos o compuestos activos de plantas con efectos laterales reducidos y de baja toxicidad. (Segura, López, 1976) Es por eso que el estudio de los extractos obtenidos de las plantas sobre el efecto que exhiben sobre los principales agentes causales de las parasitosis ha aumentado.

Meckes *et al* en 1999, probaron el efecto de la planta *Helianthemum glomeratum*, usada por el pueblo Maya en el sureste de México, para el tratamiento de desordenes gastrointestinales. Usaron los extractos metanólicos obtenidos de las hojas-tallo para determinar el efecto sobre el crecimiento de *E. histolytica*, con una $CI_{50} = 7.98 \mu\text{g/ml}$, teniendo un efecto deficiente sobre *G. lamblia*. Mientras el extracto metanólico obtenido de la raíz, mostró una $CI_{50} = 5.98 \mu\text{g/ml}$ sobre *E. histolytica*, que también tuvo un efecto deficiente sobre *G. lamblia*. El metronidazol usado como control positivo obtuvo una $CI_{50} = 0.04 \mu\text{g/ml}$ en contra de *Entamoeba histolytica* y una $CI_{50} = 0.20 \mu\text{g/ml}$ para *Giardia lamblia*. (Meckes *et al*, 1999)

El trabajo de Meckes *et al* aporta la posibilidad de que los extractos obtenidos de diversas partes de la misma planta, puedan variar en cuanto a su efecto y constitución, por ejemplo *Agave lophantha*, aumenta su contenido de azúcares no estructurales en épocas de lluvia (Wall *et al*, 1957) y por lo que se sabe la mayor proporción de lípidos se encuentra en las semillas (Howard, Darrow, 1990) y las saponinas en el fruto.(Wall *et al*, 1957) Los datos reportados por Meckes *et al* asemejan el efecto del extracto etanólico del *Agave lophantha*, debido a que fortalece el hecho que la

concentración del metronidazol que se utiliza en contra de *E. histolytica* es menor a la concentración utilizada para inhibir el crecimiento de *G. lamblia*.

Youvraj *et al* en 1994, obtuvieron los extractos etanólicos de cinco plantas utilizadas en los sistemas de medicina tradicional de la India, prescritas para desordenes intestinales, mezclados o individuales, en contra del crecimiento de *E. histolytica*. Solo los extractos de *Tinospora cordifolia* y *Berberis aristata* inhibieron el crecimiento de *E. histolytica* con una CMI de 1000 µg/ml y 100 µg/ml respectivamente; mientras que la mezcla de ambos extractos obtuvo una CMI de 1000 µg/ml, mientras que el metronidazol tuvo una CMI del 10 µg/ml. (Youvraj *et al*, 1994)

En este reporte, es notorio el hecho que los extractos etanólicos por separado exhiban efectividad diferente y que el efecto de sus mezclas no supere a los individuales, lo que indica posiblemente la existencia en la mezcla de extractos, sustancias que tengan efectos antagónicos entre sí, por lo tanto se hace necesario la búsqueda de los componentes principalmente activos.

También en la búsqueda de nuevos fármacos se han aislado algunos compuestos puros que se han obtenido de extractos de plantas, que tienen mayor efecto *In vitro* que el metronidazol, en su estudio sobre las parasitosis.

González-Garza *et al* en 1991 demostró que el gopisol, un compuesto polifenólico extraído de semilla del algodón, tuvo efecto sobre el crecimiento de la cepa HM-1 de *E. histolytica*, y al compararse con tres de las drogas más ampliamente utilizadas en contra de la amibiasis: emetina, metronidazol, y diyodohidroxiquinoleína, resultó ser 11, 39 y 980 veces respectivamente más potente; aunque se sabe que el gopisol tiene efectos negativos sobre la fertilidad en humanos. (González-Garza *et al*, 1991)

Mata-Cárdenas *et al* en 1998, comprobó que la concentración del gopisol que inhibe la curva de crecimiento de *G. lamblia* corresponde a 69.74 µM. mostrando que *Giardia lamblia* como otros protozoarios parasitarios, es susceptible al efecto tóxico *In vitro* del gopisol. No obstante, *G. lamblia* es la especie más resistente al gopisol de los cinco organismos probados a la fecha. (Mata-Cárdenas *et al*, 1998) Aunque el gopisol se reporta por sus efectos sobre la fertilidad humana, se ha realizado ensayos donde al mezclar

el gopipol y el metronidazol se ha encontrado (Cruz Vega *et al* 1996) que se reducen sus CI_{50} , y por ende sus efectos laterales.

Calzado Flores en 1995 determinó el efecto de un compuesto puro que se extrae a partir de la planta llamada *Castela texana*: la chaparrina, sobre el crecimiento de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS, resultando tener una CI_{50} , similar a las drogas más utilizadas, en las concentraciones de 1-1000 mM; y la chaparrina solo tuvo efecto citostático sobre los fibroblastos diploides humanos, sugiriendo que en un futuro también podría ser posible identificar a este quassinóide como un agente antiamebiano.

También dentro de los 5-nitroimidazoles existen drogas que exhiben una menor concentración efectiva al utilizarse en contra de *E. histolytica* y *G. lamblia*, con la posibilidad de no tener los mismos efectos laterales que el metronidazol.

Cedillo-Rivera y Muñoz O en 1992 estudiaron el efecto de algunos 5-nitroimidazoles sobre el crecimiento de *Giardia lamblia* *In vitro*. Encontrando que el ornidazol fue el más efectivo $CI_{50}=0.12 \mu\text{g/ml}$, seguido por el tinidazol $CI_{50}=0.14 \mu\text{g/ml}$ y metronidazol $CI_{50}=0.21 \mu\text{g/ml}$. (Cedillo-Rivera and Muñoz, 1992)

Mata-Cárdenas BD *et al* en 1996 determinaron que el secnidazol $CI_{50}=0.013 \mu\text{g/ml}$, y el dimetridazol $CI_{50}=0.014 \mu\text{g/ml}$, mostraron una potencia antiamebica de 8, 10 y 15 veces más grande que el ornidazol, metronidazol y tinidazol respectivamente en contra de *Entamoeba histolytica*. (Mata-cárdenas *et al*, 1996)

Los resultados arrojados por los trabajos de Cedillo-Rivera, Muñoz O y Mata-Cárdenas, coinciden con la determinación de la CI_{50} del metronidazol en nuestro trabajo al compararse como control positivo sobre *E. histolytica* y *G. lamblia* contra el extracto etanólico del *Agave lophantha*.

La familia Agavaceae con mas de 480 especies con una distribución, principalmente en los trópicos y subtropicos (Mahato *et al*, 1982), forman parte de las especies poco estudiadas fitoquímicamente y menos aún sus efectos sobre microorganismos *In vitro*.

Tona *et al* en 1998, demostraron la actividad antiamebica *In vitro* de algunos extractos de plantas del Congo usados como antidiarreicos en

medicina tradicional indicaron que de 45 extractos de plantas probadas en contra de *E. histolytica*, 35 (77.78%) exhibieron una actividad antiamebica y 10 (22.22%) fueron inactivos. Los extractos más inactivos eran de las hojas, El metronidazol fue usado como control positivo, demostrando una actividad más pronunciada a la de todos los extractos de las plantas probadas con una CMI de 2.5 µg/ml. Dentro de estas 45 plantas con efecto se incluyen a *Dracaena reflexa*, planta perteneciente a la familia Agaveceae, que exhibió una CMI sobre *E. Histolytica* de 62.5 µg/ml, detectándose en el extracto obtenido del cocimiento de sus hojas: flavonoides, esteroides y terpenos, saponinas y alcaloides. (Tona *et al*, 1998)

A excepción de los alcaloides, los compuestos encontrados en *Dracaena reflexa*, son los mismos encontrados en *Agave lophantha*, lo cual indica la similitud en cuanto a composición química se refiere con relación a la filogenia de las plantas.

Verástegui Montemayor, en el 2000 evaluó el potencial antimicrobiano de los extractos etanólicos obtenidos del *Agave lophantha* y de otras tres especies de Agaves sobre hongos y bacterias entéricas, encontrando que, el extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha*, presentó la mayor actividad sobre el dimorfismo, gemación y la mayor inhibición del crecimiento de *Candida albicans*, con una CMI de 1.5 mg/ml, sobre el crecimiento bacteriano. También mediante métodos cromatográficos y espectroscópicos, determinó que el compuesto responsable de la actividad biológica sobre estos microorganismos, correspondió a las saponinas esteroidales espirostánicas presentes en las hojas de las plantas.

Obviamente, el análisis fitoquímico preliminar coincide con nuestro trabajo al detectar en el *Agave lophantha*, los compuestos: triterpenos, esteroides, flavonoides, coumarinas, azúcares y principalmente saponinas que Verástegui Montemayor, determinó como los compuestos responsables de la actividad biológica; nosotros además detectamos grupos funcionales: dobles enlaces, Grupo carbonilo y oxihidrilo fenólicos.

Por lo que en estudios posteriores del efecto de los extractos obtenidos del *Agave lophantha* sobre otros microorganismos, el análisis fitoquímico debe ser más detallado, probando y determinado cual de los

constituyentes químicos es el encargado de la actividad biológica y la concentración a la que lo hace.

El mecanismo de acción del metronidazol en eucariotes como *Entamoeba histolytica*, principia al penetrar en sus células, después se presenta una reducción de los grupos nitro, seguido de un efecto citotóxico de los productos reducidos y finalmente se presenta una liberación de los productos que son inactivos. El metronidazol ataca principalmente en los intermediarios del RNA, DNA o proteínas del organismo. (Muller, 1983) Por lo que se deduce que el mecanismo por el cual actúa el metronidazol sobre *E. histolytica*; comparado con el efecto del extracto etanólico, se lleva a cabo con muy poca eficiencia por los componentes presentes en el extracto etanólico del *Agave lophantha*; ya que mostraron la menor susceptibilidad sobre este parásito que sobre *G. lamblia* y *T vaginalis*.

En los organelos unidos a membrana llamados hidrogenosomas en *Trichomonas vaginalis*, se transfieren los electrones del piruvato en un reacción de descarboxilación oxidativa catalizada por la enzima PFO (piruvato:ferredoxina oxidoreductasa) a la proteína ferredoxina con la formación de ATP, que en presencia del metronidazol, la enzima reduce la droga a su forma citotóxica. La pérdida de la actividad de la PFO produce completa resistencia al metronidazol perceptible *In vitro* bajo condiciones anaeróbicas. (Vázquez, 2001) Por lo que algunos de los compuestos del extracto etanólico del *Agave lophantha*, pudo haber tenido analogía con la acción de la enzima PFO, ya que el extracto etanólico mostró una actividad intermedia sobre *T. vaginalis* en comparación a *E. histolytica* y *G. lamblia*.

Giardia lamblia es muy susceptible a un derivado del benzimidazol, el albendazol *In vitro*. El modo de acción del albendazol no está completamente entendido; pero su efecto está directamente asociado con la división de la célula, el complejo cinetosomal y los núcleos no asumen la posición mutua requerida para la cariocinesis apropiada. Los microtúbulos de los axonemas flagelares son resistentes al albendazol mientras que el ensamblaje de los microtúbulos del huso mitótico y del disco adhesivo se bloquean por la droga. El inmunomanchado de los microtúbulos resistentes al albendazol de los axonemas flagelares revelan que los microtúbulos

resistentes a ésta droga contienen alfa-tubulina tirosinada. En contraste, los microtúbulos susceptibles a la droga reaccionaron con anticuerpos monoclonales contra la alfa-tubulina acetilada. (Nohynková E, Kulda J, 1998) Por lo que se presume, que algunos de los compuestos presentes en el extracto etanólico del *Agave lophantha* tienen una analogía con el efecto del albendazol, sobre el ensamblaje de los microtúbulos de huso mitótico y del disco adhesivo de *Giardia lamblia*.

8. CONCLUSIONES

- La cepa IMSS:0989 de *Giardia lamblia*^X mostró la mayor susceptibilidad^λ al extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha*.
- La cepa GT-15 de *Trichomonas vaginalis*^X mostró tres veces menos susceptibilidad que *Giardia lamblia* al extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha*.
- La cepa HM1:IMSS de *Entamoeba histolytica* mostró seis veces menos susceptibilidad que *G. lamblia* y dos veces menos que *T. vaginalis*, al extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha*.
- La cepa IMSS:0989 de *Giardia lamblia*, mostró ser dos veces menos susceptible al metronidazol, en comparación a las cepas de *T. vaginalis* y *E. histolytica*, cuya susceptibilidad entre ambas fue equivalente.

9. PERSPECTIVAS

El estudio fitoquímico del extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha*, nos orienta sobre la naturaleza de sus componentes, para que en estudios posteriores se proceda a aislar, purificar, identificar y establecer los componentes que tengan actividad biológica sobre las principales parasitosis u otras infecciones intestinales en México.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Amon I, Amon K (1980). Placental transfer and fetal distribution of metronidazole in early human pregnancy. *Int J Biol Res Pregnancy* 1980;1:61-64
- Babbott FL, Frye WW, Gordon JE (1961). Intestinal parasites of man in arctic Greenland. *Am J Trop Med Hyg* 10:185-190
- Bingham AK, Jarrol EL, Meyer EA, *et al* (1979). *Giardia* sp. Physical factors of excystation *In vitro* and excystation Vs. Eosin exclusion as determinants of viability. *Exp Parasitol* 47:284-291
- Bingham AK, Meyer EA (1979). *Giardia* excystation can be induced *In vitro* in acidic solutions. *Nature* 277:301-302
- Black RE, Dykes AC, Sinclair SF, *et al* (1977). Giardiasis in day-care centers: Evidence of person to person transmission. *Pediatrics* 60:486-491
- Burke JA (1975). Giardiasis in Childhood. *Am J Dis Child* 129:1304-1310
- Bye, Robert A, Don Burges, and AB Tryan (1975). Ethnobotany of the western Tarahumara of Chihuahua. 1. Notes on the genus *Agave*. *Bot. Mus. Leafl., Cambridge* 24: 85-112
- Caballero-Salcedo A, Viveros-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepulveda-Amor J, Gutierrez G, Ortiz-Ortiz L (1994). Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*; 50:412-419
- Calzado Flores C (1995). Actividad citotóxica de la chaparrina *In vitro* sobre *E. histolytica* y fibroblastos diploides humanos. Tesis de maestría.
- Carliss JO, Gojodies M, Hall RD, Kudo RR, Levine ND, Loeblich AR, Jr, Weiser J and Wenrich DH (1969). A revised classification the phyllus protozoa *J. Protozool.* 11-17
- Carmona y Valle M (1880). Abscesos del hígado. Algunas observaciones relativas a los pus hepáticos, etc. *Gac Med Mex*; 6:121-136
- Carranda-Bravo T (1989). La amibiasis invasora como problema de salud pública. *Bol Med Hosp Infant Mex*; 46:139-148
- Cedillo-Rivera and Muñoz O (1992). *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J Med Microbiol.* Vol. 37: 221-224
- Cervantes LF (1992). Tratamiento Médico de Amibiasis. *Arch Invest Méd.* 3 (Supl 2): 415-426

Charles D (1980). Sexually transmitted diseases. In: Charles D, ed. Infections in obstetrics and gynecology. Philadelphia: WB Saunders,:39-43

Communicable Disease Weekly Reportes (1977). London Public Health Laboratory Service

Cruz-Vega DE, Campos-Gongora E, Saíd-Fernandez S, González-Garza MT (1996). In vitro additive synergistic anti-amoebic effect of a metronidazole-gossypol blend. Pharm. Sci. 2:509-511

Dahlgren R, TH Clifford & FP Yeo (1985). The families of the monocotyledons. Structure, evolution and taxonomy. Springer verlag Berlin Pp. 580

Dancinger M, Lopez M (1975). Number of *Giardia* in the feces of infected childrens. Am J Trop Med Hyg 24:237-242

Diamond LS, Harlow D and Cunnick CC (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans R Soc Trop Med Hyg 72:431-432

Diccionario de Especialidades Farmacéuticas (1993). Mex PLM 39ª Edición. México 580-581

Domínguez XA (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. Limusa. 2ª Ed. 149-159

Drugs for parasitic infections (1978). Medical Letter on Drugs and Therapeutics 20:17-24

Duncombe VM, Bolin Td, Davis Ae, *et al* (1978). Histopathology in giardiasis: A correlation with diarrhoea. Aust NZ j Med 8:392-396

Facq P, Dereux JF (1984). Peripheral neuropathy from metronidazol. Apropos of 2 new cases. Press Medicale; 13:1847-1848

Felger, Richard, and Mary B. Moser (1970). Seri use of Agave (century plant). The kiva 35:159-167

Ferraro González E, Broussalis AM (1988). Compuestos Polifenólicos Aislados de *Coyza bonariensis* (Compositae). Rev. Latinoamericana Quím 19: 141-143

Finney DL (1977). Probit Analisis. New York: Cambridge University Press

García Mendoza A (1998). Con sabor a Maguey. Guia de la Colección Nacional de Agavaceas y Nolináceas del Jardín Botánico del Instituto de Biología-UNAM. Pp114

Gentry HS (1982). Agaves of Continental North America. The university of Arizona Press. 1^a Ed. Pp 131- 197

González-Garza MT, Matlin SA, Mata-Cárdenas BD, Saíd-Fernández S (1991). In vitro evaluation of gossypol as potential antiamebic drug. Proc. West. Pharmacol. Soc. 34:359-361

Goth A (1975). Farmacología Médica. Principios y Conceptos. Editorial Interamericana. 7^a Edición. (México): 533-536

Gutiérrez G (1991). Amibiasis intestinal. Epidemiologia; 6:57-71

Honigberg BM (1978). Trichomonads of importance in human medicine. In: Kreier JP, ed. Parasitic protozoa. Vol 2. Orlando, Florida: Academic Press,:275-454

Howard J, Darrow K (1990). Effect of *Agave americana* "In vivo". J Engl Med 342:1678-1679

Hsu TC (1977). The Future of animals, Cells, Models and Systems in Research Development, Education and testinavg. Natl. Acad. Sci., Wash, D.C. 18

Intestinal parasites ranging far afield in the United States (1978). Medical News, JAMA 239:2756

Iwanczuck I (1968). Studies on the distribution of *Lambliia muris* in the alimentary tract of white mice. Acta Parasitol Pol 15:367-373

Kean BH, Day E, Wolinska W (1954). *Trichomonas vaginalis* infection: An evaluation of three diagnostic techniques with data on incidence. Am J Obstet Gynecol;68:1510-1518

Keister BD (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium suplemented with bile. Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg. 77: 487-488

Keystone JS, Kraiden S, Warren MR (1978). Person to person transmission *Giardia* in day-care nurseries. Can Med Assoc J 119:241-258

Khaw M, Panosian C.B (1995). Human antiprotozoal therapy: Past, present and future. Clin Microbiol Rev; 8: 427-439

Krieger JN (1981). Urologic aspects of trichomoniasis. Invest Urol;18:411-417

Kulda J, Nohynkova E (1978). Flagellates of the human intestine and of intestines of other species. In Kreier JP (ed): Protozoa of Veterinary and Medical Interest. Volumen II, New York and London, Academic Press, pp 69-104

Legator MS., Connor TH., Stoeckel M (1975). Detection of mutagenic activity of metronidazole and niridazole in body fluids of human and mice. *Science.*, 188:1118-1119

Levine ND, Carlis JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honingerg BM, Leedale GF, Loeblich AR, Lin D, Lom J, Merinfeld EG, Page FC, Poljanski G, Sprague V, Vavra J and Walalace FG (1980). A new Revised Classification of the Protozoa. *J. Protozool.* 7: 37

López-Revilla R, Rodríguez-Baez J (1981). Manual para el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México. 62

Lossick JG, 1982. Treatment of *Trichomonas vaginalis* infections. *Rev Infect Dis*;4(suppl):801-818

Lossick JG, Muller M, Gorrell TE (1986). *In vitro* drug susceptibility and doses required for cure in cases of refractory vaginal trichomoniasis. *J Infect Dis*;153:948-955

Mahato SB, Ganguly AN, Sahu NP (1982). *Phytochemistry*; 21:959

Marroquín A Sánchez (1966). Agaves de Mexico en la Industria Alimentaria. *Cent. Est. econ. Y Soc del tercer Mundo*, 256 (prepublication mock-up)

Martínez-Palomo A (1989). Amibiasis. Editorial Médica Panamericana. 1^a edición. (Méx): 147-159

Mata-Cárdenas BD, Vargas-Villarreal J, González-Garza MT, and Saíd Fernández S (1996). *In vitro* high anti-amoebic potency of secnidazol and dimetridazol. *Pharma Sci* 2:513-514

Mata-Cárdenas BD, Vargas-Villarreal J, Martínez-Rodríguez H, Navarro-Marmolejo L, González-Garza MT, and Saíd Fernandez S (1998). *In vitro* *Giardia lamblia* growth inhibition by gossypol. *Pharm Pharmacol Commun*; 4:361-363

McLellan R, Spence MR, Brockman M, Raffel L, Smith JL (1982). The clinical diagnosis of trichomoniasis. *Obstet Gynecol*;60:30-34

Meckes M, Calzada F, Tapia-Contreras A, Cedillo-Rivera R (1999). Antiprotozoal properties of *Helianthemum glomeratum*. *Phytother. Res* 13:102-105

Meingasser JG, Thurner J (1979). Strain of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazol and other 5-nitroimidazoles. *Antimicrob Agents Chemoter*;15:254-259

- Meuwissen JH, Tongeren JH, Werkman HP (1977). Giardiasis. *Lancet* 2:32-33
- Monat HA, McKinney WL (1946). Giardiasis: Question of pathogenicity. *Us Naval Med Bull* 46: 1204-1205
- Muller M (1983). Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. *Surgery.*, 93:165-171
- Nohynková E, Kulda J (1998) *Giardia intestinalis*: Effect of Albendazole on Cytoskeletal Systems. Czech Section Society of Protozoologists 28th Annual Meeting, May 4-7,
- OMS (1997). Amoebiasis - an expert consultation. *Weekly Epidemiological Record* No.14. Ginebra, Abril
- Pennington WC (1958). Tarahumara fish stupefaction plants. *Econ. Bot.* 12: 95-102
- Petersen H (1972). Giardiasis (Lambliasis). *Scand J Gastroenterol* 7(Suppl) 1-44
- Petersson T (1975). Single-dose tinidazole therapy for giardiasis. *Br Med J* 1:395
- Reed S.L. and Ravdin J (1995). Amebiasis. En Blaser M., Smith P. and Ravdin J.(editores) *Infections of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York
- Rein MF, Muller M (1984). *Trichomonas vaginalis* in: Holmes KK, Mardh P-A, Sparling PF, Weisner PJ, eds., *Sexually transmitted diseases*. New York: McGraw-Hill,:525-536
- Ridley M, Ridley D (1976). Serum antibodies and jejunal histology in giardiasis associated with malabsorption. *J Clin Pathol* 29:30-34
- Roberts-Thomson IC, Stevens DP, Mahmoud AA, *et al* (1976). Giardiasis in the mouse: An animal model. *Gastroenterology* 71:57-61
- Rollo IM (1970). Drugs used in the chemotherapy of amebiasis. En Godman LS y Gilman A (Eds.). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 4^a Ed. MacMillan Co. New York, New York. PP. 1125-1143
- Romo de Vivar A (1989). Productos naturales de la flora mexicana. Editorial LIMUSA. México Pp 183-194, 195-197
- Rustia M, Shubik P (1972). Introduction of lung tumors and malignant lymphomas in mice by metronidazole. *J Natl Cancer Inst* 48:721-729
- Rzedowski Jerzy (1994). Vegetación de México. Editorial LIMUSA México Pp. 237-261

Saíd-Fernández S, Vargas-Villarreal J, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas BD, Navarro-Marmolejo L, Lozano-Garza G and Martínez-Rodríguez H (1988). PEPHS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82: 249-253

Schnell JD (1974). The incidence of vaginal *candida* and *Trichomonas* infections and treatment of *Trichomonas vaginalis* with clotrimazol. *Postgrad Med J*;50 (suppl): 79-80

Segura JJ, y R López (1976). Inhibición de la síntesis de proteína por emetina en cepas axénicas de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba invadens*. Sepúlveda B. Y Diamond L. (eds)"Memorias de la conferencia internacional sobre amibiasis".112-119

Takeuchi H, Yamada A, Touge T *et al* (1988). Metronidazol neuropathy- a case report. *Japanese J Psych Neurol*; 42:291-295

Thomason JL, Gelbart SM, Sobun JF, Schullien MB, Hamilton PR (1988). Comparison of four methods to detect *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol*;26:1869-1870

Thomason JL, Wilcoski LM, McLaughlin CA (1984). Trichomoniasis. *Clin Microbiol Newsl* ;8: 9-12

Tona L, Kambu K, Ngimbi N, Vlietinck AJ (1998). Antiamoebic and phytochemical screening of some congolese medicinal plants. *J of ethnopharmacol*; 61:57-65

Vázquez F, García MJ, Pérez F, Palacio V (2001) *Trichomonas vaginalis*: tratamiento y resistencia a nitroimidazoles. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 19:114-124

Verástegui-Montemayor MA (2000). Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos de *Agaves* y su acción sobre el Tigmotropismo y Dimorfismo de *Candida albicans*. Tesis doctoral

Wall ME *et al* (1957). Steroidal sapogenins XLIII. *J. Am. Pharm. Assoc. (Sci. ed)* 46:653-84

Walsh JA (1986). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitud of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis*; 8:228-237

Webster LT (1990). Drogas empleadas en la quimioterapia de las infecciones por protozoarios: amibiasis, giardiasis y tricomoniasis. En: Goodman y Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*.7ª. ed. 3ª. Reimpresión. México: ed Panamericana; 1003-1018

Wolfe MS (1978). Giardiasis. N Engl J Med 298:319-321

Youvraj RS, Padmaja K, Ranjan MB (1994). Antiamoebic effect of a crude formulation of herbal extract against *E. histolytica* *In vitro* and *In vivo*. J. Ethnopharmacol. 45:43-52

11. FIGURAS Y TABLAS

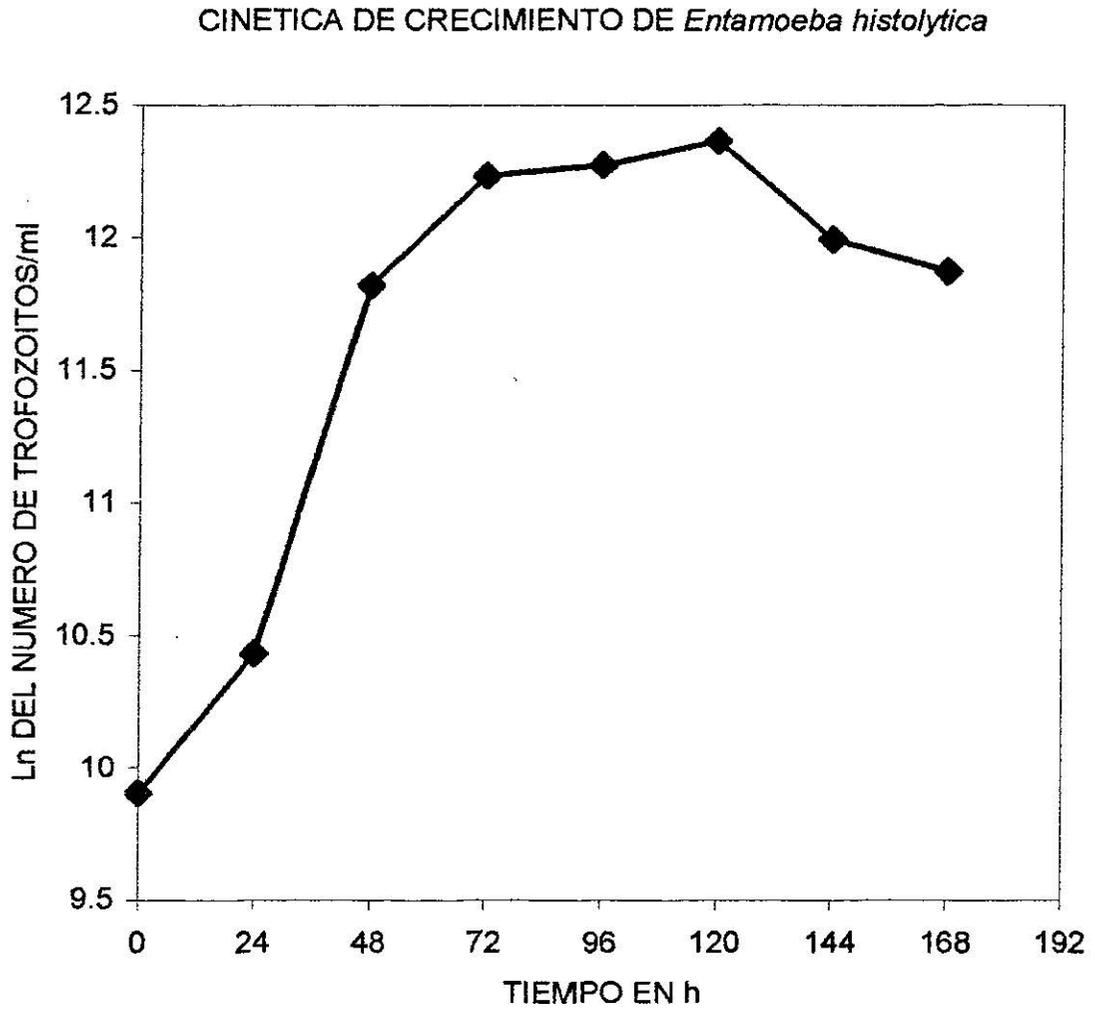


FIGURA N° 1. Cinética de crecimiento de *Entamoeba histolytica*.

CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Trichomonas vaginalis*

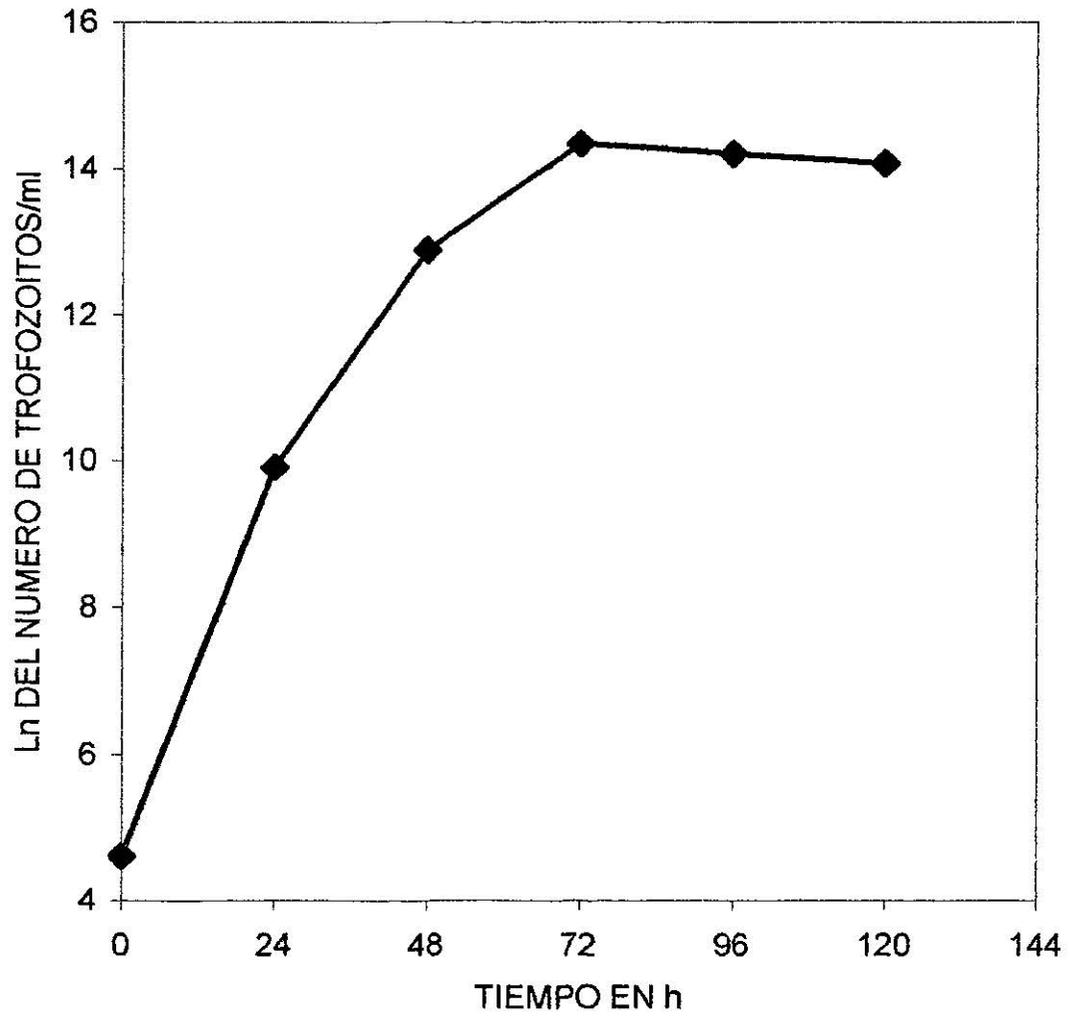


FIGURA N° 2. Cinética de crecimiento de *Trichomonas vaginalis*.

CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Giardia lamblia*

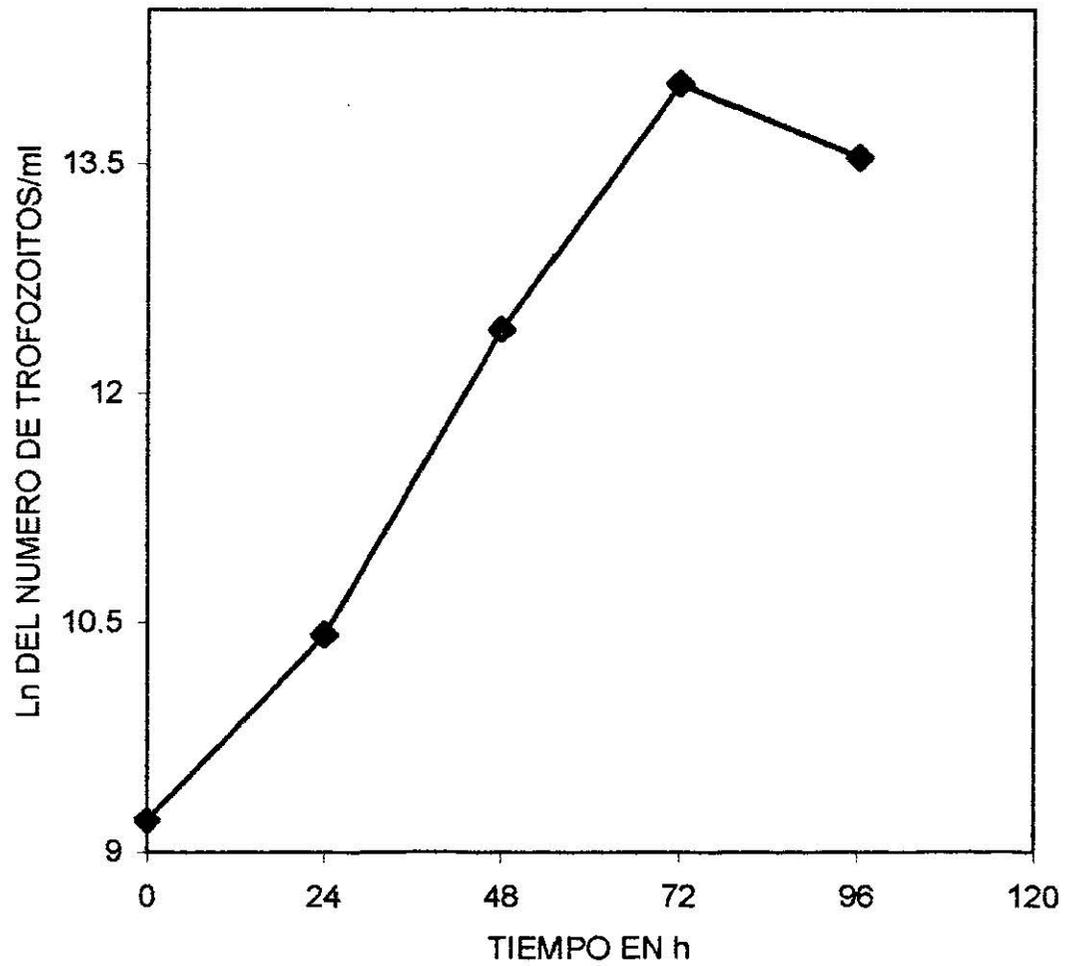


FIGURA N° 3. Cinética de crecimiento de *Giardia lamblia*.

EXTRACTO ETANOLICO Vs. *Entamoeba histolytica*

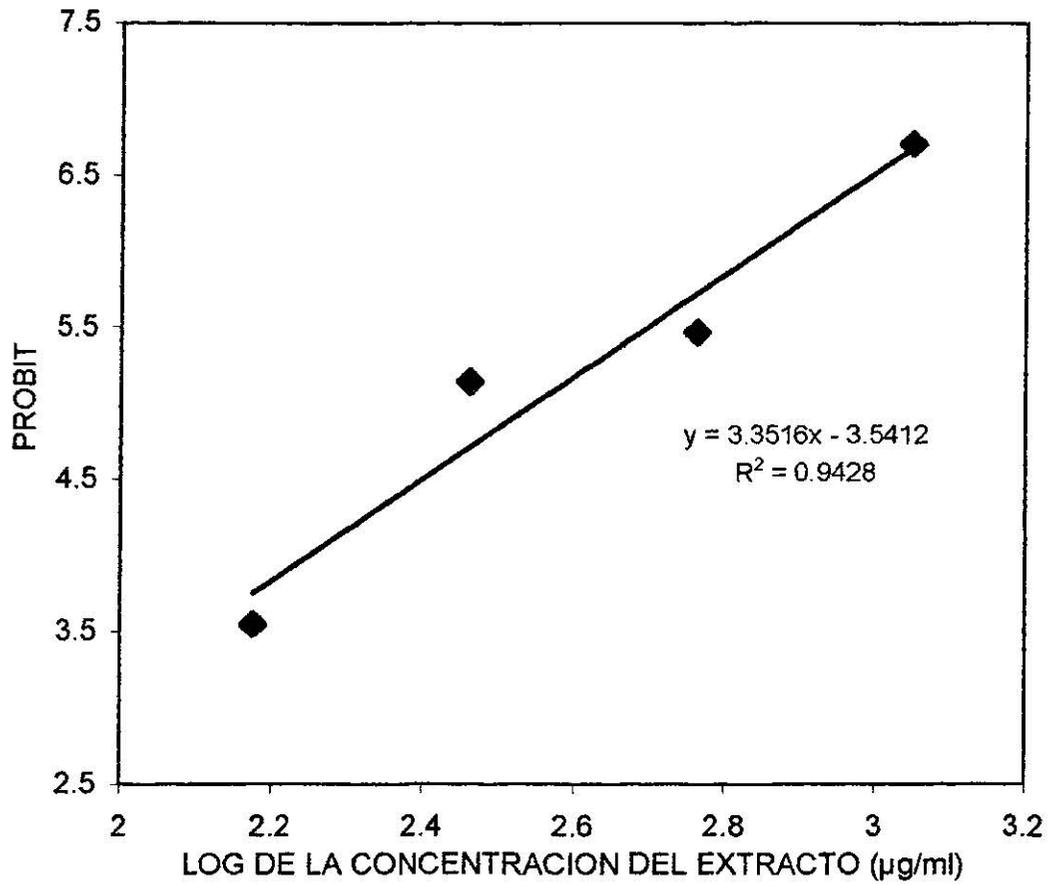


FIGURA N° 4. Curva Dosis-respuesta del extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha* sobre el crecimiento *In vitro* de *Entamoeba histolytica*.

EXTRACTO ETANOLICO VS. *Trichomonas vaginalis*

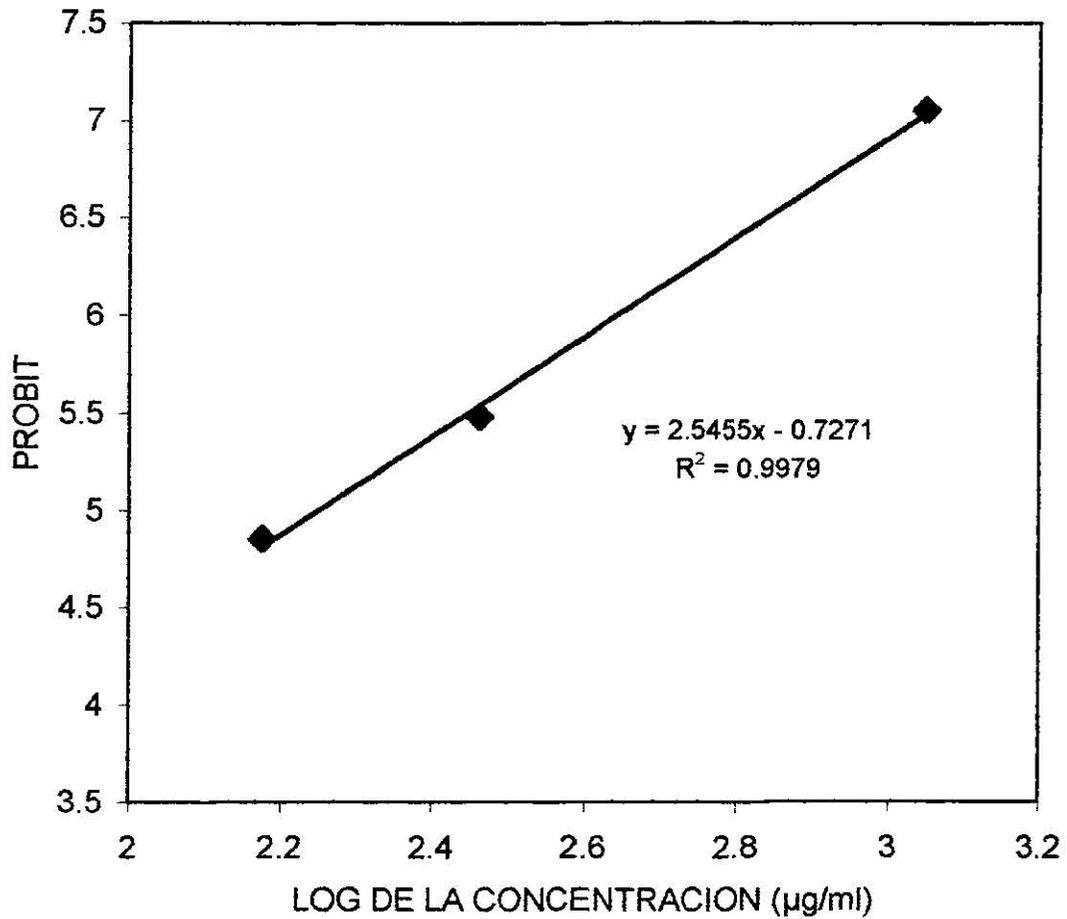


FIGURA N° 5. Curva Dosis-respuesta del extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha* sobre el crecimiento *In vitro* de *Trichomonas vaginalis*.

EXTRACTO ETANOLICO Vs. *Giardia lamblia*

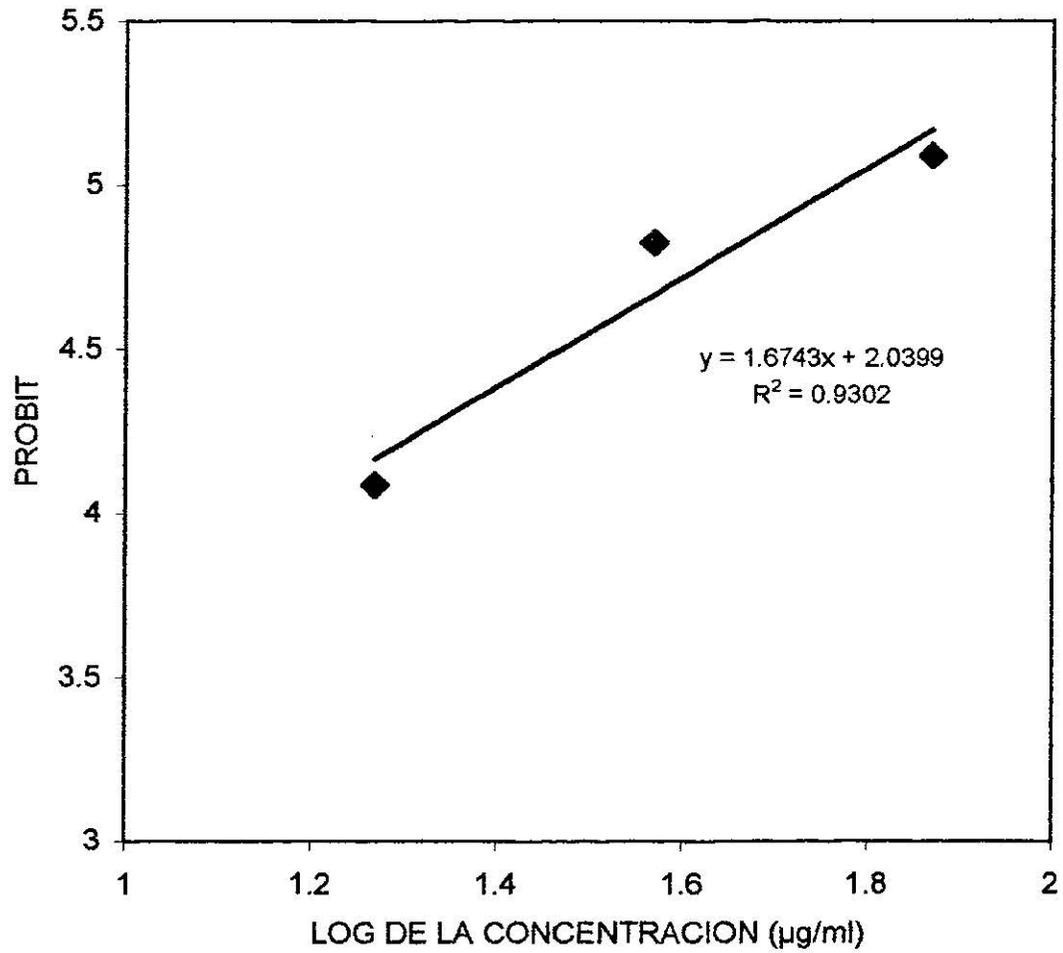


FIGURA N° 6. Curva Dosis-respuesta del extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha* sobre el crecimiento *In vitro* de *Giardia lamblia*.

METRONIDAZOL VS. *Entamoeba histolytica*

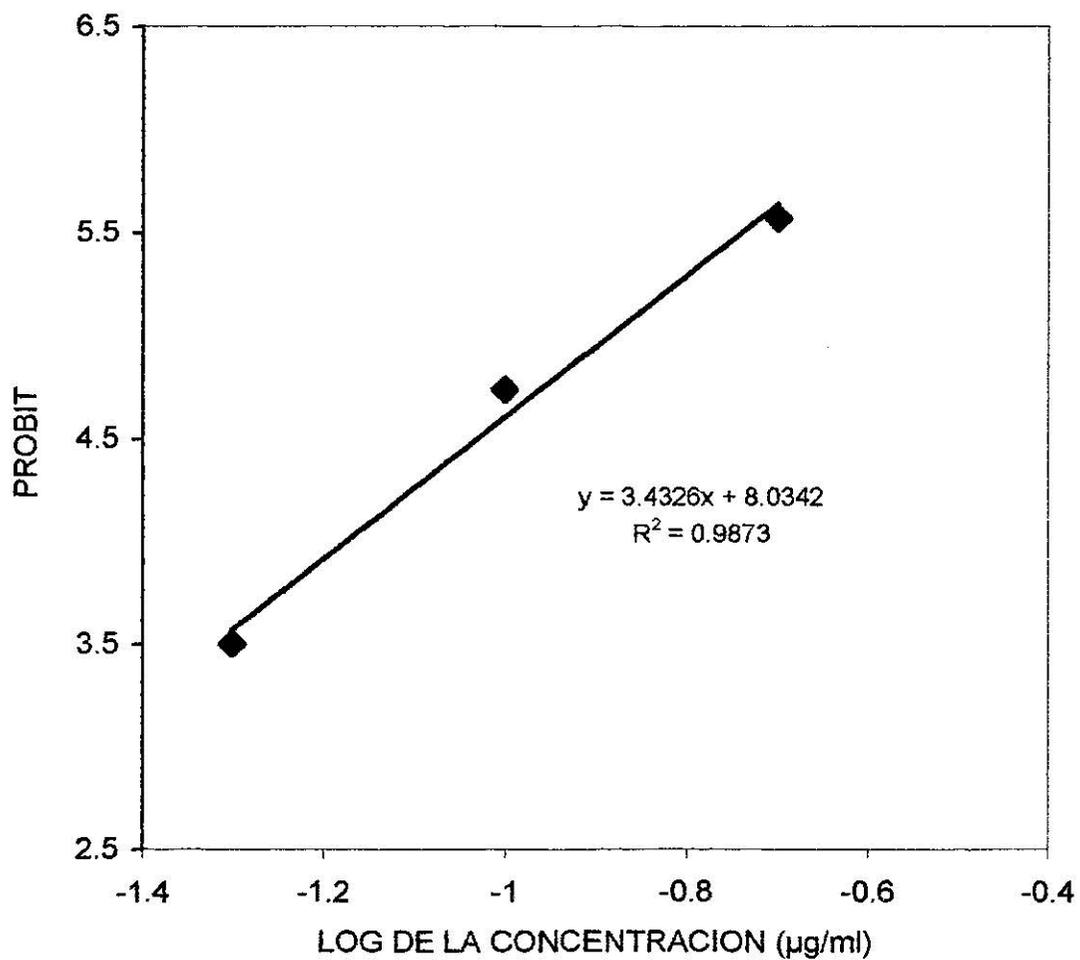


FIGURA N° 7. Curva Dosis-respuesta del metronidazol sobre el crecimiento *In vitro Entamoeba histolytica*.

METRONIDAZOL Vs. *Trichomonas vaginalis*

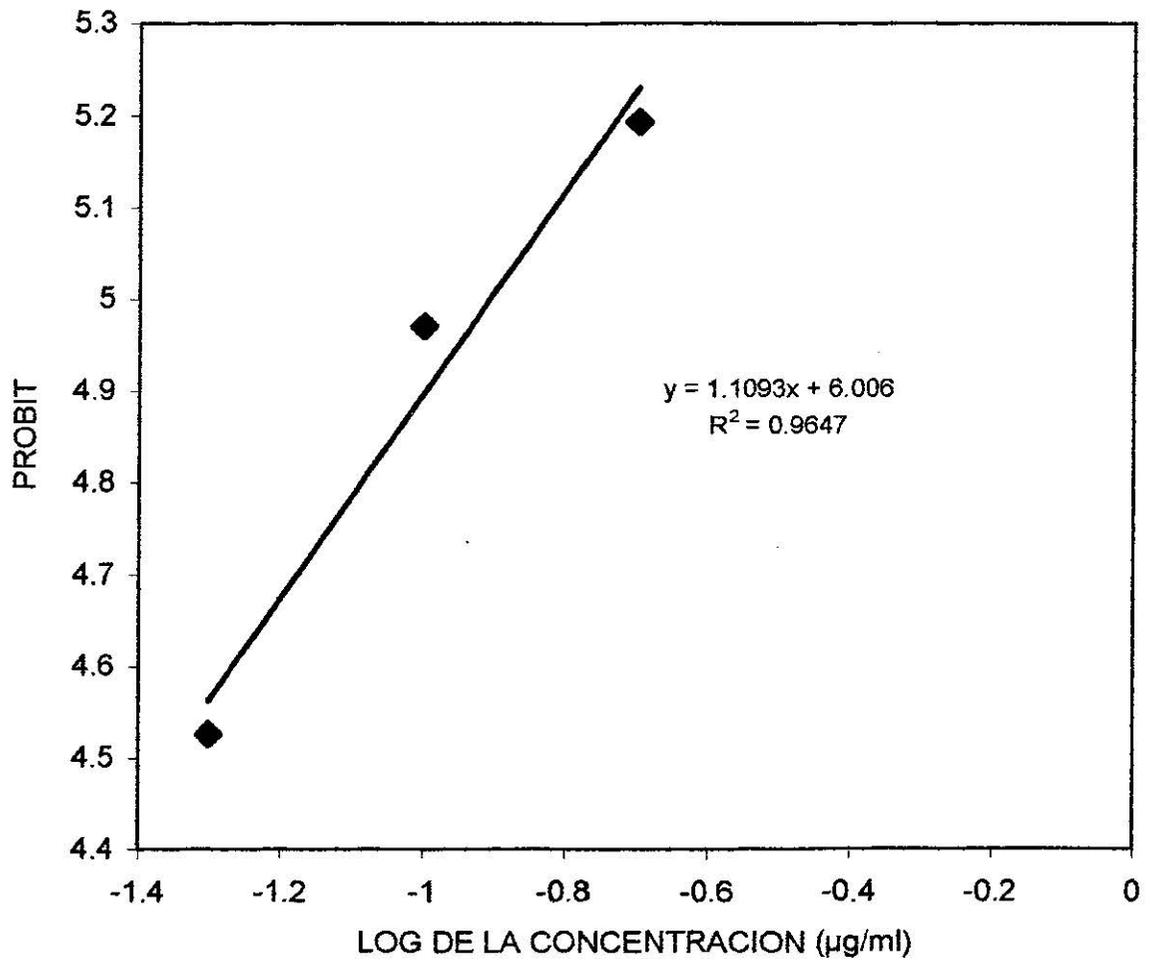


FIGURA N° 8. Curva Dosis-respuesta del metronidazol sobre el crecimiento *In vitro* de *Trichomonas vaginalis*.

METRONIDAZOL VS. *Giardia lamblia*

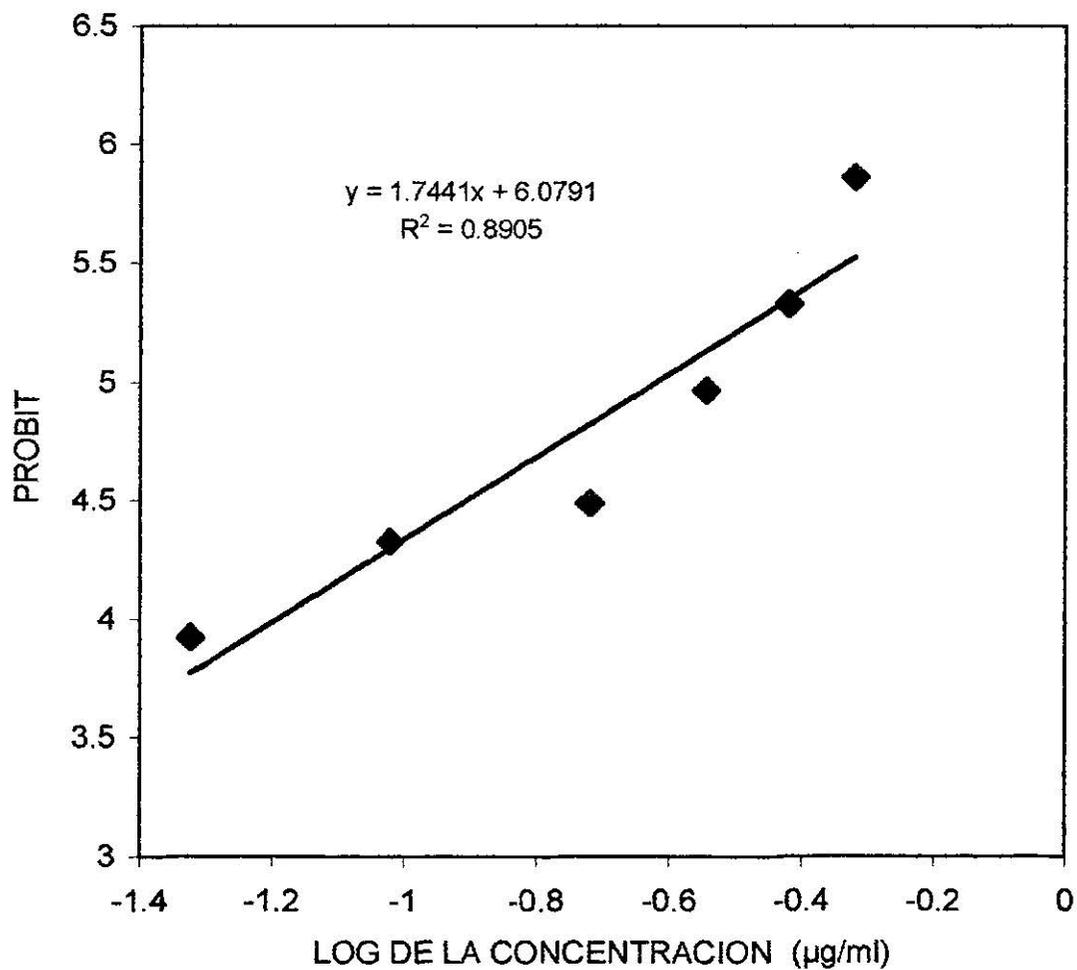


FIGURA N° 9. Curva Dosis-respuesta del metronidazol sobre el crecimiento *In vitro* de *Giardia lamblia*.

CONCENTRACION	ml DE MEDIO	ml DE SOLUCIONES
0.4 µg/ml	0.6 ml	4.4 ml de stock
0.2 µg/ml	2.0 ml	2.0 ml de 0.4 µg/ml
0.1 µg/ml	2.0 ml	2.0 ml de 0.2 µg/ml
0.05 µg/ml	2.0 ml	2.0 ml de 0.1 µg/ml

Tabla N° 1. Preparación de las concentraciones utilizadas del metronidazol.

PRUEBA COLORIDA	GRUPO DETECTADO	RESULTADO
Liebermann-Burchard	Triterpenos, esteroidales	Positivo
Salkowski	Esteroles y metilesteroles	Positivo
Shinoda	Flavonoides	Positivo
H ₂ SO ₄	Flavonoides	Positivo
Baljet	Sesquiterpenlactonas	Negativo
Coumarinas	Coumarinas	Positivo
Dragendorff	Alcaloides	Negativo
K ₂ MnO ₄	Dobles enlaces	Positivo
Cloruro férrico	Oxihidrilos fenólicos	Positivo
2,4-Dinitrofenilhidracina	Grupo carbonilo	Positivo
Molisch	Azúcares	Positivo

Tabla N° 2. Análisis fitoquímico preliminar del extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha*.

12. APENDICE A

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES

PREPARACION DE LA SOLUCION ISOTONICA (PBS)

Se pesan NaCl 6.50 g; K₂HPO₄ 2.80 g; Y KH₂PO₄ 0.40 g, se mezclan los componentes y se aforan hasta 1000 ml con agua desionizada en una probeta graduada. Ajustándose la osmolaridad a 300 mOsm con NaCl y se ajusta el pH a 7.4 con NaOH 10 N, añadido gota a gota. Se preparan alícuotas de 10 ml en tubos de 15 x 125 mm con tapón de rosca y se esterilizan por autoclave 15 min. a 15 lb. de presión a 121°C. Apretar los tapones y almacenar a temperatura ambiente.

HIDROXIDO DE SODIO 10 N:

Se disuelven 40 g de NaOH en 100 ml de agua destilada

ACIDO CLORHIDRICO 0.1 N:

Se prepara diluyendo hasta 50 ml con agua destilada 0.41 ml de HCl concentrado (12 N)

PREPARACION DEL SUERO BOVINO

Se obtiene el suero de la sangre colectada del rastro de la ciudad. La sangre se deja coagular y el suero se separa por sedimentación a 2000 x g por 15 min. Después se prefiltra con papel Whatman N° 1 y se filtra por una serie de filtros HAWP Millipore (Beford, MA, USA) de 5 a 0.22 µm. finalmente se esteriliza por filtración utilizando sistemas de filtración al vacío de un litro con filtros de 0.22 mm (Corning Inc. Corning NY, USA). El suero estéril se descomplementó por calentamiento a 56°C por 30 minutos, se deja enfriar a temperatura ambiente y se le añade 25 ml de mezcla de vitaminas (JRH Biosciences Lenexa, KS) por cada litro de suero. el suero se distribuye en alícuotas de 100 ml, en botellas ámbar, estériles de vidrio con tapón de rosca y se almacena a -20°C. (Saíd-Fernández *et al*, 1988)

EXTRACTO DE HÍGADO PANCREAS (EHP)

Se utilizan 4.0 Kg de hígado de bovino, fresco limpio, lavado y recortado.

1.4 Kg de páncreas bovino, lavado con agua, libre de tejido conectivo y grasa, guardarlo en el congelador y partirlo en trozos para el molino.

1.4 Kg de páncreas de cerdo, lavado con agua, libre de tejido conectivo y grasa, guardarlo en el congelador y partirlo en trozos para el molino.

Se corta en trozos todo el material biológico en el molino y molerlos (de preferencia repetir este paso una vez, para que el molido sea homogéneo y libre de grandes trozos de tejido. Licuar el molido con PBS, aproximadamente 1.3 volúmenes de PBS por volumen de tejido. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH 10 N, aproximadamente 10 ml de NaOH por cada 2,800 ml de licuado. Precalentar el licuado en la olla a 37°C utilizando el mechero e incubar a 37°C en la incubadora por 4 horas. Calentar la olla hasta que hierva, agitando en forma constante para evitar que la espuma se derrame, posteriormente cerrar la olla y esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar la olla en agua corriente y enfriar el contenido, para después vaciarlos en vasos Nalgene de 4 litros para dejarlos toda la noche en refrigeración. Por la mañana extraer el sobrenadante muy cuidadosamente y vaciarlo en la olla de presión y esterilizar de nuevo a 121°C por 15 min. Filtrar el homogenado siempre caliente en un sándwich de tierra de diatomeas. Colocar en un embudo Buchner un filtro Whatman N° 1. Vaciar tierra rosa (super cell) previamente homogeneizada en agua desionizada. 200 ml de tierra rosa con 350 ml de agua, pasarlo por el filtro con vacío sin permitir que la tierra se seque. En otro vaso colocar 100 ml de tierra blanca y mezclarlos con el extracto caliente y añadirlo a la cama de tierra rosa anteponiendo una espátula. Hacer vacío y parar en cuanto el líquido empiece a cambiar de color. Quitar lo que pasó primero y colocar otra vez al vacío. Añadir cuanto extracto se requiera hasta que el líquido de fluir en forma rápida, si esto ocurre habrá que cambiar la cama y empezar de nuevo desde el principio. Hay que cuidar que no se seque la cama. El extracto obtenido se guarda a – 20°C y se marca con la fecha. Cuando se hacen varios lotes, lo que se hace

es descongelarlos y juntarlos todos en un solo recipiente. Etiquetarlos con el número de lote y fecha de fabricación y guardarlo en alícuotas de 500 ml. Guardarlo a -20°C . (Saíd-Fernández *et al*, 1988)

Mezcla vitamínica Tween 80.

Se utiliza la mezcla comercial (JRH Biosciences)

