

Evaluación de la actividad frente a amebas de vida libre del ácido ursólico y sus derivados

Trabajo Fin de Máster

Alumno: Rubén L. Rodríguez Expósito

Tutores: Dr. José E. Piñero Barroso y Dra. Ines Sifaoui

Facultad de Ciencias de la Salud. Sección de Farmacia

Departamento de Obstetricia y Ginecología, Pediatría, Medicina Preventiva y Salud Pública, Toxicología,
Medicina Legal y Forense y Parasitología

Universidad de La Laguna

Máster Universitario en Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Tropicales

Curso académico 2017-2018



Agradecimientos

Atteneri López Arencibia y María Reyes Batlle por su ayuda la consecución de los ensayos *in vitro* de este TFM. Ignacio Antonio Jiménez Díaz por su contribución para sintetizar los derivados en el Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González (IUBO-AG).

Índice

Abstract	1
Resumen	2
Introducción	3
Objetivos.....	7
Materiales y Métodos.....	8
Componentes Químicos	8
Cultivos	8
Efecto <i>in vitro</i> frente a los trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> spp.	8
Ensayo de citotoxicidad.....	9
Actividad quística	9
Resultados y Discusión.....	11
Conclusiones	15
Referencias	16

Abstract

Acanthamoeba spp. is a genus of opportunistic parasites classified as free-living amoebas (FLA) that can be found in a multitude of environments and that can generate ocular pathologies such as *Acanthamoeba* keratitis (AK), or nervous ones such as granulomatous amebic encephalitis (GAE). The great resistance to disinfectants and drugs of the trophozoites and cysts of this parasite is a therapeutic problem. In addition, the compounds that are currently used to treat *Acanthamoeba* infections are toxic to human tissues. Recently, the study of biologically active principles of plant origin shows that they are effective for the treatment of various diseases, including antiprotozoal. In this way, ursolic acid (UA) is a bioactive substance present in plants for medicinal use and has shown in several studies to be a good candidate for the development of antiparasitic drugs. In this study the amoebicidal activity of several UA derivatives against trophozoites and cysts of two strains of *Acanthamoeba*, *A. castellanii* Neff and *A. griffini* was evaluated, based on the activity shown by the UA in previous studies. All derivatives presented a major amoebicidal activity and a lower cytotoxicity than the UA. The molecules UA5D and UA8 showed a low cytotoxicity and a better amoebicidal activity with IC₅₀ of 9.67 ± 1.46 and 10.41 ± 1.36 μM for *A. castellanii* Neff and 8.90 ± 1.55 and $8,59 \pm 1.76$ μM for *A. griffini*, respectively. Taking all the results into account, this study shows that ursolic acid is a good candidate for the alternative development of future amoebicidal drugs.

Key words: *Acanthamoeba*, *Acanthamoeba* keratitis, granulomatous amebic encephalitis, *A. castellanii* Neff, *A. griffini*, antiprotozoal, ursolic acid.

Resumen

Acanthamoeba spp. es un género de parásitos oportunistas clasificado como amebas de vida libre (FLA) que se pueden encontrar en multitud de entornos y que pueden generar patologías oculares como la queratitis por *Acanthamoeba* (AK), o nerviosas como la encefalitis granulomatosa amebiana (GAE). La gran resistencia a los desinfectantes y fármacos de los trofozoítos y los quistes de este parásito supone un problema terapéutico. Además, los compuestos que se utilizan actualmente para tratar las infecciones por *Acanthamoeba* resultan tóxicos para los tejidos humanos. Recientemente, el estudio de principios biológicamente activos de origen vegetal muestra que son efectivos para los tratamientos de diversas enfermedades, incluido el antiprotozoario. De esta manera, el ácido ursólico (UA) es una sustancia bioactiva presente en plantas de uso medicinal y que ha demostrado en varios estudios ser un buen candidato para el desarrollo de fármacos antiparasitarios. En este estudio se evaluó la actividad amebicida de diversos derivados del UA frente a trofozoítos y quistes de dos cepas de *Acanthamoeba*, *A. castellanii* Neff y *A. griffini*, basándose en la actividad mostrada por el UA en estudios previos. Todos los derivados presentaron una actividad amebicida mayor y una menor citotoxicidad que el UA. Las moléculas UA5D y UA8 presentaron una baja citotoxicidad y una mejor actividad amebicida con unas CI_{50} de $9,67 \pm 1,46$ y $10,41 \pm 1,36$ μ M para *A. castellanii* Neff y $8,90 \pm 1,55$ y $8,59 \pm 1,76$ μ M para *A. griffini*, respectivamente. Teniendo en cuenta todos los resultados, este estudio demuestra que el ácido ursólico es un buen candidato para el desarrollo alternativo de futuros fármacos amebicidas.

Palabras clave: *Acanthamoeba*, queratitis por *Acanthamoeba*, encefalitis granulomatosa amebiana, *A. castellanii* Neff, *A. griffini*, antiprotozoario, ácido ursólico.

Introducción

Acanthamoeba es un género de protozoos conocido por ser patógenos oportunistas de humanos y otros animales causando diversas patologías oculares, nerviosas y dérmicas. De esta manera, uno de los problemas más comunes derivados de su infección es la queratitis por *Acanthamoeba* (AK). Esta se caracteriza por una ulceración de la córnea, la cual sino se trata a tiempo puede llevar a un daño ocular severo perdiendo progresivamente la agudeza visual, ceguera o a una posible enucleación (Johnston *et al.*, 2009; Panjwani, 2010; Page y Mathers, 2013; Lorenzo-Morales *et al.*, 2013, 2015; Magnet *et al.*, 2018). Además, puede producir encefalitis granulomatosa amebiana (GAE), una infección progresiva del sistema nervioso central que generalmente resulta fatal en la mayoría de los pacientes que la sufren (Marciano-Cabral, 2009; Chan *et al.* 2011; Siddiqui y Khan 2012; Di Cave *et al.* 2014; Khan, 2015).

Existe un riesgo mayor a la exposición y la infección por *Acanthamoeba* spp. en individuos inmunodeprimidos, generalmente aquellos que padecen enfermedades inmunosupresoras, como los infectados por VIH, aumentando en los últimos años el número de casos de infecciones por *Acanthamoeba*. Este hecho, posiblemente también esté influenciado por el calentamiento global y el aumento progresivo de las temperaturas (Feher *et al.*, 2009; Marciano-Cabral, 2009; Alkharashi *et al.*, 2015; Hadaś, *et al.*, 2017).

Actualmente, el género *Acanthamoeba* está clasificado en 20 genotipos diferentes (T1 a T22), basándose en análisis de secuencias de ARN ribosómico (Stothard *et al.*, 1999; Horn *et al.*, 1999; Gast *et al.*, 2001; Booton *et al.*, 2002; Hewett *et al.*, 2003; Corsaro and Venditti, 2010; Nuprasert *et al.*, 2010; Qvarnstrom *et al.*, 2013; Magnet *et al.*, 2014; Tice *et al.*, 2016). Sin embargo, en las infecciones amebianas el genotipo T4 es el más común, siendo también el genotipo aislado más frecuentemente en el medio (Khan, 2006; Siddiqui y Khan, 2012; Risler *et al.*, 2013).

Acanthamoeba está clasificada como una Ameba de Vida Libre (FLA), la cual puede vivir libremente en múltiples entornos (Khan, 2015). Según los reportes, se puede encontrar en el suelo (Sawyer, 1989; Tsvetkova *et al.*, 2004; Lorenzo-Morales *et al.*, 2005), en varios medios acuáticos tanto naturales como artificiales (agua de manantiales, piscinas, agua marina, y en las aguas residuales de las industrias textiles), refrigeradores, aires acondicionados y, en general, en varios medios artificiales (Marciano-Cabral *et al.*, 2000; Maghsood *et al.*, 2005; Huang y Hsu 2010; Astorga *et al.*, 2011; Ithoi *et al.*, 2011; Lasjerdi *et al.* 2011; Wink *et al.*, 2011; Siddiqui y Khan 2012; Trabelsi *et al.*, 2012; Kuk *et al.* 2013; Tanveer *et al.*, 2013; Geisen *et al.*, 2014;

Mahmoudi *et al.*, 2015). Además, estos protistas se han encontrado en los hospitales, sobre las superficies del equipamiento y de los instrumentos de cirugía, también han sido aislados de las unidades de irrigación dentales, unidades de diálisis y tanto de lentillas como de líquido limpiador de lentillas (Martinez y Visvesvara, 1997; Walochnik *et al.*, 2000; Aksozek *et al.*, 2002; Khan, 2015; Lorenzo-Morales *et al.*, 2013, 2015; Thammaratana *et al.*, 2016). De esta manera, la presencia y la fase en estos múltiples medios de las amebas está condicionada por las necesidades nutricionales del protozoo y su ciclo de vida.

Por un lado, La fase activa de *Acanthamoeba* es el trofozoíto, en la cual, realiza varias actividades fisiológicas como la fagocitosis, pinocitosis o la digestión de varias fuentes de nutrientes tales como otros microorganismos, sustancias del medio o tejidos animales que han infectado.

Por otro lado, si las condiciones ambientales son incompatibles para su desarrollo la ameba pasa a su forma latente o quiste. El quiste posee una doble pared muy resistente, de la cual su pared exterior es fibrosa y está compuesta principalmente por proteínas, mientras que su pared interior contiene más de un 30% de celulosa (Schuster and Visvesvara, 2004; Dudley, Alsam and Khan, 2007; Lorenzo-Morales *et al.*, 2008; Lemgruber *et al.*, 2010). De acuerdo con Paling *et al.* 2016, aislar del medio la fase de trofozoíto o la forma de quiste está influenciado por la presencia de nutrientes y el tiempo de incubación, lo que hace que este protozoo sea muy resistente a condiciones adversas y difícil de encontrar un tratamiento eficaz (Martin-Navarro *et al.*, 2008; Baltaza *et al.*, 2017; Magnet *et al.*, 2018; Paling *et al.* 2018).

El incremento de las resistencias de los trofozoítos y los quistes de *Acanthamoeba* a los químicos, desinfectantes y fármacos se cree que es la causa principal de la dificultad que existe a la hora de encontrar un manejo terapéutico adecuado (Gooi *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2008; Shoff *et al.*, 2008; Lorenzo-Morales *et al.*, 2013; Baltaza *et al.*, 2017). Actualmente, el tratamiento de las infecciones de *Acanthamoeba* sigue siendo un problema médico, ya que el enfoque terapéutico recomendado generalmente resulta tóxico para los tejidos humanos (Lorenzo-Morales *et al.*, 2013,2015). El tratamiento más utilizado en las AK incluye el uso de biguanidas (0,02% polihexametileno biguanida (PHMB) o 0,02% digluconato de clorhexidina) junto con diamidinas (0,1% isetionato de pentamidina, también conocido como Brolene, o 0,1% de hexamidina, Desomedine), mientras que en las EGA no existe tratamiento, pero se suelen emplear diferentes azoles y alquilfosfolípidos (Hay *et al.*, 1994; Schuster & Visvesvara, 2004; Khan, 2006; Lim *et al.*, 2008; Lorenzo-Morales *et al.*, 2013). Diferentes principios activos, con posible actividad frente a varias cepas clínicas y ambientales de *Acanthamoeba*, están siendo

aún estudiadas en el presente (Turner, 2000; Lloyd *et al.*, 2001; Aksozek *et al.*, 2002; Kopańska *et al.*, 2004; Risler *et al.*, 2013; Padzik *et al.*, 2014; Chomicz *et al.*, 2015; Khan, 2015; Lorenzo-Morales *et al.*, 2015; López-Arencibia *et al.*, 2017).

Recientemente, los estudio en principios activos antiprotozoarios se han centrado en la evaluación de sustancias de origen vegetal (Derda and Hadaś, 2014; Sifaoui *et al.*, 2014; Lorenzo-Morales *et al.*, 2015; Niyyati *et al.*, 2016). Diversos derivados biológicamente activos procedentes de plantas son efectivos para el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades, incluyendo el cáncer (Sehrawat *et al.*, 2017), diabetes (Diarra *et al.*, 2016), obesidad (de Freitas y de Almeida, 2017), enfermedades cardiovasculares (Croft *et al.*, 2017), cerebrales (Jiang *et al.*, 2017), hepáticas (Leake, 2013) y sarcopenia (Katashima *et al.*, 2017).

El ácido ursólico (UA) es una sustancia bioactiva presente en varias plantas medicinales usadas como un recurso natural en la medicina oriental y la medicina popular (Woźniak *et al.*, 2015). Se puede aislar de las hojas de diversas plantas (romero, orégano, lavanda, tomillo y en las hojas de olivo), frutas (piel de manzana), flores, y bayas (Jäger *et al.*, 2009; Sifaoui *et al.*, 2017). En este sentido, el UA (3β -3-hidroxi-urs-12-ene-28-oic-ácido) es un triterpénico pentacíclico (Fig. 1), con una fórmula química de $C_{30}H_{48}O_3$ y una masa molecular de 456.71 g/mol. Es soluble en ácido acético glacial caliente y en hidróxido de sodio alcohólico (Kashyap *et al.*, 2016).

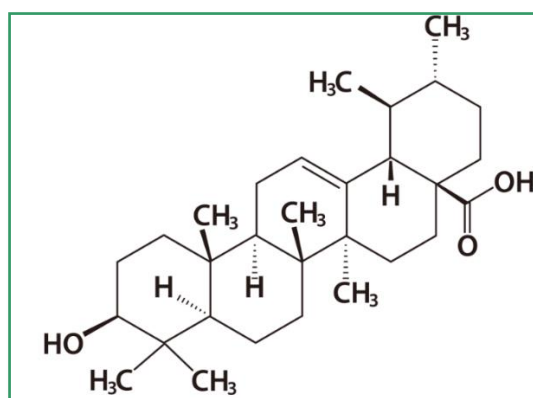


Figura 1. Estructura del ácido ursólico (UA) (Seo *et al.*, 2018)

Interviene en algunos procesos farmacológicos y modula varias vías de señalización para prevenir el desarrollo de enfermedades crónicas (Mancha-Ramirez and Slaga, 2016; Hussain *et al.*, 2017), como antiinflamatorio (Kashyap *et al.*, 2016), antioxidante (Liobikas *et al.*, 2011), anticarcinogénico (Shishodia *et al.*, 2003), frente a la obesidad (Jayaprakasam *et al.*, 2006), prevención de la diabetes (Yu *et al.*, 2015), cardioprotector (Senthil *et al.*, 2007), neuroprotector

(Wang *et al.*, 2016), hepatoprotector (Sundaresan *et al.*, 2014), para combatir la atrofia de la musculatura esquelética (Bakhtiari *et al.*, 2016) y posee efectos termogénicos (Katashima *et al.*, 2017). Sin embargo, el mecanismo bioquímico preciso que conlleva a sus efectos beneficiosos no se conoce completamente.

Todos los estudios sobre el UA muestran que no solo induce varias actividades fisiológicas tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”, sino que también tiene la posibilidad de convertirse en un candidato para desarrollar fármacos antiparasitarios. De esta manera, según Choi y Lee 2018, el UA ha demostrado ser una sustancia eficaz contra *Toxoplasma gondii*, inhibiendo su proliferación en organismos vivos, así como la reciente actividad descubierta frente a las formas de amastigotes y promastigotes de ciertas especies de *Leishmania* spp. (Yamamoto *et al.*, 2015; Jesús *et al.*, 2017). Además, en un estudio anterior (Sifaoui *et al.*, 2017) se ha demostrado que el UA presenta actividad frente a *Acanthamoeba* spp. Por esta razón, este estudio parte de la hipótesis de que el ácido ursólico pueda inhibir o modular la proliferación/crecimiento de *Acanthamoeba* spp. en humanos, y dar un primer paso para determinar su potencial como candidato para el desarrollo de fármacos contra *Acanthamoeba*.

Objetivos

Los objetivos contemplados en este estudio como parte de este Trabajo Fin de Máster (TFM) fueron:

1. Determinar la actividad *in vitro* de los derivados realizados a partir del ácido ursólico frente a trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* (Neff) y una cepa clínica de *A. griffini*.
2. Comprobar la citotoxicidad de los derivados del UA frente a macrófagos murinos (J774A.1).
3. Evaluar la actividad cisticida de aquellos compuestos que demostraron una mejor actividad amebicida y una menor citotoxicidad, frente a quistes de *A. castellanii* y *A. griffini*.

Materiales y Métodos

Componentes Químicos

Se utilizaron un total de trece moléculas para evaluar su actividad *in vitro* frente a *Acanthamoeba castellanii* Neff y *A. griffini*. De las cuales, doce fueron sintetizadas a partir del compuesto original del ácido ursólico (UA) adquirido de Extrasynthese (Cymit química, Barcelona, España). Estas síntesis se realizaron en el Laboratorio de Productos Naturales Bioactivos (QUIMIOPLAN) del Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González (IUBO-AG), por parte del grupo dirigido por la Dra. Isabel López Bazzocchi (Tabla 1). Las soluciones de stock fueron preparadas disolviendo las moléculas en dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Aldrich (Tres Cantos, Madrid, España) y etanol absoluto a una concentración de 5 mg/ml.

Cultivos

La actividad amebicida de los compuestos fue evaluada frente a dos cepas: *Acanthamoeba castellanii* Neff, genotipo T4 (*American Type Culture Collection*, ATCC 30010) y una cepa clínica, *Acanthamoeba griffini*, genotipo T3. Las cepas fueron incubadas axénicamente en el medio de PYG (0.75% (w/v) *Proteose peptone*, 0.75% extracto de levadura (w/v) y 1.5% glucosa (w/v)) suplementado con gentamicina a 40 µg/ml (Biochrom AG, Cultek, Granollers, Barcelona, España). Para los ensayos de citotoxicidad se utilizaron macrófagos murinos J774A.1 (ATCC TIB-67), cultivados en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco Life Technologies) con suplemento del 10% de suero fetal bovino (SBFI), gentamicina a 10 µg/ml y en estufa de CO₂ al 5% y 37°C.

Efecto *in vitro* frente a los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.

La actividad del UA y los derivados de este fue probada *in vitro* frente a trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* Neff y *Acanthamoeba griffini* usando un ensayo colorímetro basado en el reactivo Alamar Blue® (Invitrogen, Life Technologies, Madrid, España), descrito anteriormente por McBride *et al.* 2005 y modificado por Martín- Navarro *et al.* 2008. Las amebas fueron contadas y sembradas por duplicado en placas de 96 pocillos, añadiendo 50 µl a cada pocillo de la solución madre diluida (concentración de 2·10⁴ células/ml). Tras 15 minutos se confirmó la adherencia de las amebas mediante el uso del microscopio invertido Leica DMIL (Leica, Wetzlar, Germany). A continuación, el UA y los derivados fueron diluidos seriadamente

en 150 µl de medio PYG en placas con pocillos de gran volumen (*deepwell*) y se añadieron 50µl a los pocillos de la placa. Por último, se incorporó 10% de Alamar Blue® a los pocillos y se incubó a 27 ° C. Después de 96 horas, las placas fueron analizadas usando EnSpire® Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, Madrid, España), mediante la lectura de la fluorescencia con un pico de 570 nm de excitación y 585 nm de emisión. Luego, la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) fue calculada por análisis de regresión no lineales con un límite de confianza del 95% usando el software estadístico Sigma Plot 12.0 (Systat Software Inc., London, UK).

Ensayo de citotoxicidad

Los compuestos fueron sometidos a un ensayo de citotoxicidad *in vitro* en macrófagos murinos (J774A.1) utilizando el medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco Life Technologies) con L-glutamina, suplementado al 10% (v/v) con suero bovino fetal inactivado (SBFI) y suplementado con gentamicina, 10 µg/ml.

Estos ensayos se realizaron de forma similar al descrito en el apartado anterior para evaluar la actividad sobre los trofozoítos de *Acanthamoeba*. Se determinaron los porcentajes de inhibición por duplicado, se calcularon los valores medios y las desviaciones, y se compararon con los controles negativos.

Actividad quística

Los quistes de *A. castellanii* Neff y *A. griffini* fueron preparados según Martín- Navarro *et al.*, 2013. Los trofozoítos de las dos cepas fueron transferidos del medio de cultivo con PYG (medio de trofozoítos) al medio de enquistamiento para *A. castellanii* Neff (NEM) y *A. griffini* (GEM) (0.1 M KCl, 8 mM MgSO₄ · 7 H₂O, 0.4 mM CaCl₂·2 H₂O, 1 mM NaHCO₃, 20 mM ammediol [2-amino-2-methyl-1,3-propanediol; Sigma Aldrich Chemistry Ltd., Madrid, Spain], pH 8.8, a 25° C) y fueron cultivados en estos medios con un agitado automático durante una semana para obtener quistes maduros. A continuación, los quistes maduros fueron cultivados y lavados usando el medio PYG. El efecto de las moléculas activas frente a los quistes fue evaluado mediante el cálculo de la CI₅₀ con la lectura de las placas a las 168 horas (7 días) de incubación por el mismo método descrito con el ensayo en trofozoítos.

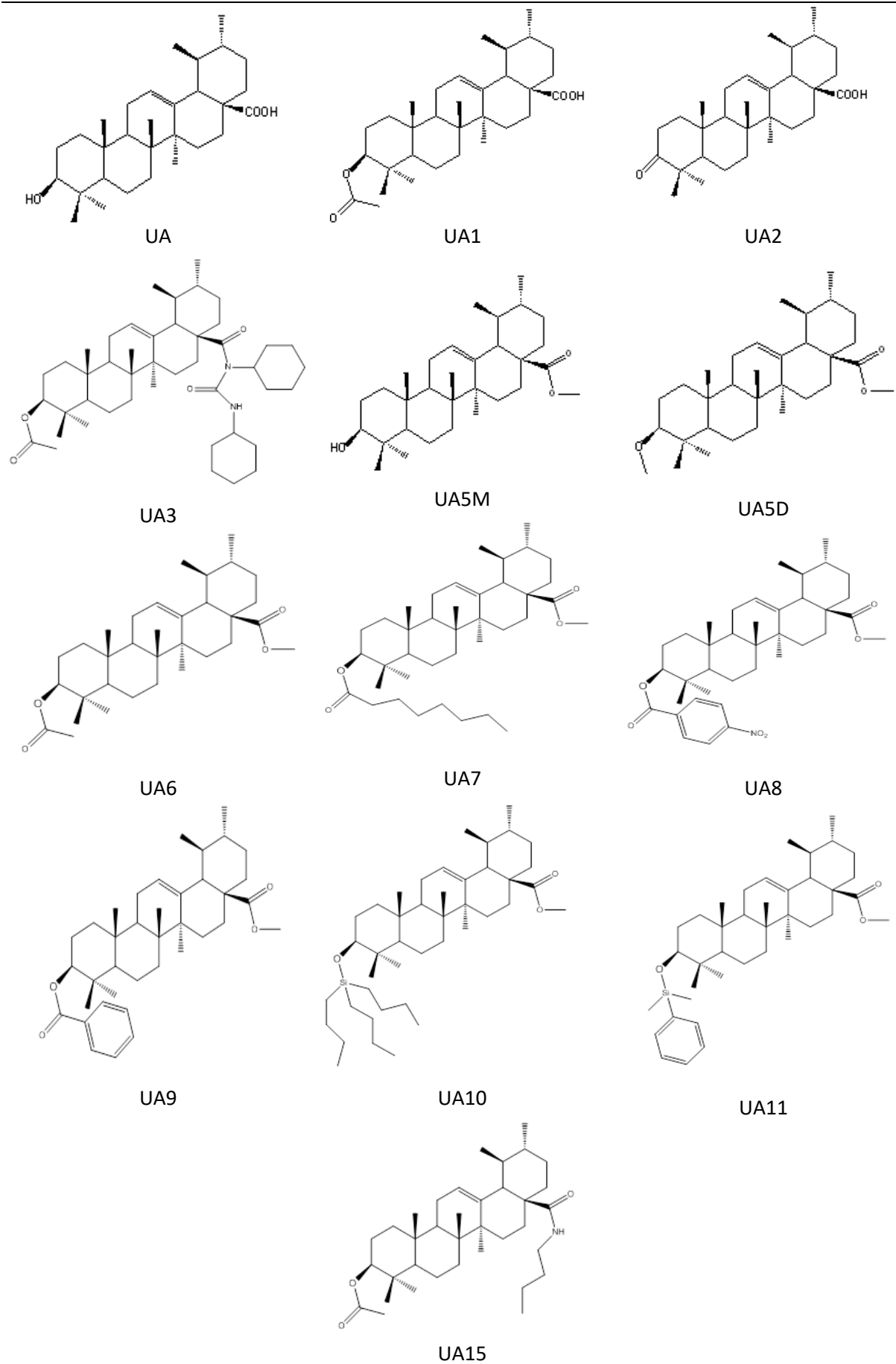


Tabla 1. Estructura química de los derivados de ácido ursólico (UA) utilizados en los ensayos para la actividad amebicida. Peso Molecular: UA = 456,38 g/mol, UA1 = 498,37 g/mol, UA2 = 454,34 g/mol, UA3 = 705,55 g/mol, UA5M = 470,38 g/mol, UA5D = 484,39 g/mol, UA6 = 512,39 g/mol, UA7 = 596,48 g/mol, UA8 = 619,39 g/mol, UA9 = 574,4 g/mol, UA10 = 668,56 g/mol, UA11 = 604,43 g/mol, UA15 = 553,45 g/mol.

Resultados y Discusión

Los resultados de estos experimentos se muestran a continuación (Tabla 2).

MOLÉCULA	CI ₅₀ <i>A. castellanii</i> Neff (μM)	CI ₅₀ <i>A. griffini</i> (μM)	CL ₅₀ Macrófagos (μM)	% de Inhibición Macrófagos (100 μg/mL)
UA	16,17 ± 2,70	14,07 ± 0,31	18,97 ± 3,96	-
UA1	8,62 ± 0,30	9,36 ± 0,81	93,24 ± 7,20	-
UA2	11,54 ± 1,47	10,26 ± 0,56	-	30,33 ± 1,98
UA3	6,74 ± 0,03	6,43 ± 0,23	-	19,68 ± 3,82
UA5M	9,72 ± 0,92	7,88 ± 0,41	25,71 ± 1,58	-
UA5D	9,67 ± 1,46	8,90 ± 1,55	-	48,73 ± 2,51
UA6	14,61 ± 1,26	9,07 ± 1,06	-	37,71 ± 2,42
UA7	13,05 ± 0,38	8,54 ± 1,97	-	16,89 ± 1,62
UA8	10,41 ± 1,36	8,59 ± 1,76	-	34,47 ± 2,04
UA9	9,35 ± 2,12	9,08 ± 0,81	-	32,84 ± 1,46
UA10	8,65 ± 0,49	7,38 ± 0,87	69,37 ± 3,44	-
UA11	9,08 ± 1,26	10,31 ± 0,81	32,36 ± 3,44	-
UA15	13,97 ± 1,58	9,16 ± 0,65	-	18,05 ± 0,79

Tabla 2. Resultados de los ensayos de actividad (CI₅₀) de los diferentes derivados del ácido ursólico (UA) utilizados frente a los trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* Neff y *A. griffini*, y los ensayos de citotoxicidad (CL₅₀ y % de Inhibición) frente a macrófagos murinos (J774A.1).

En primer lugar, como podemos observar en los resultados obtenidos, todos los derivados del UA presentan actividad frente a los trofozoítos, confirmando lo visto en el estudio anterior (Sifaoui *et al.*, 2017), y además muestran una actividad más alta. La molécula que presentó una mayor actividad frente a las cepas evaluadas fue el UA3, con CI₅₀ 6,74 ± 0,03 y 6,43 ± 0,23 μM respectivamente. Asimismo, el UA5M, UA5D y UA10 también mostraron unas CI₅₀ bastante bajas.

Las imágenes obtenidas con el microscopio (Figura 2) para el ensayo de actividad de los trofozoítos de *A. castellanii* Neff muestran como, a concentraciones de 12,5 y 25 μg/ml para UA5D y UA8 respectivamente, inhiben la proliferación, hay gran cantidad de trofozoítos muertos y otros pierden la morfología celular característica. Mientras que, por ejemplo; para UA a una

concentración de 12,5 $\mu\text{g/ml}$, equivalente a la de UA5D, los trofozoítos se observan de forma similar a la del control. Es así, que a concentraciones bajas se observa como las dos moléculas, UA5D y UA8, tienen una buena actividad amebicida.

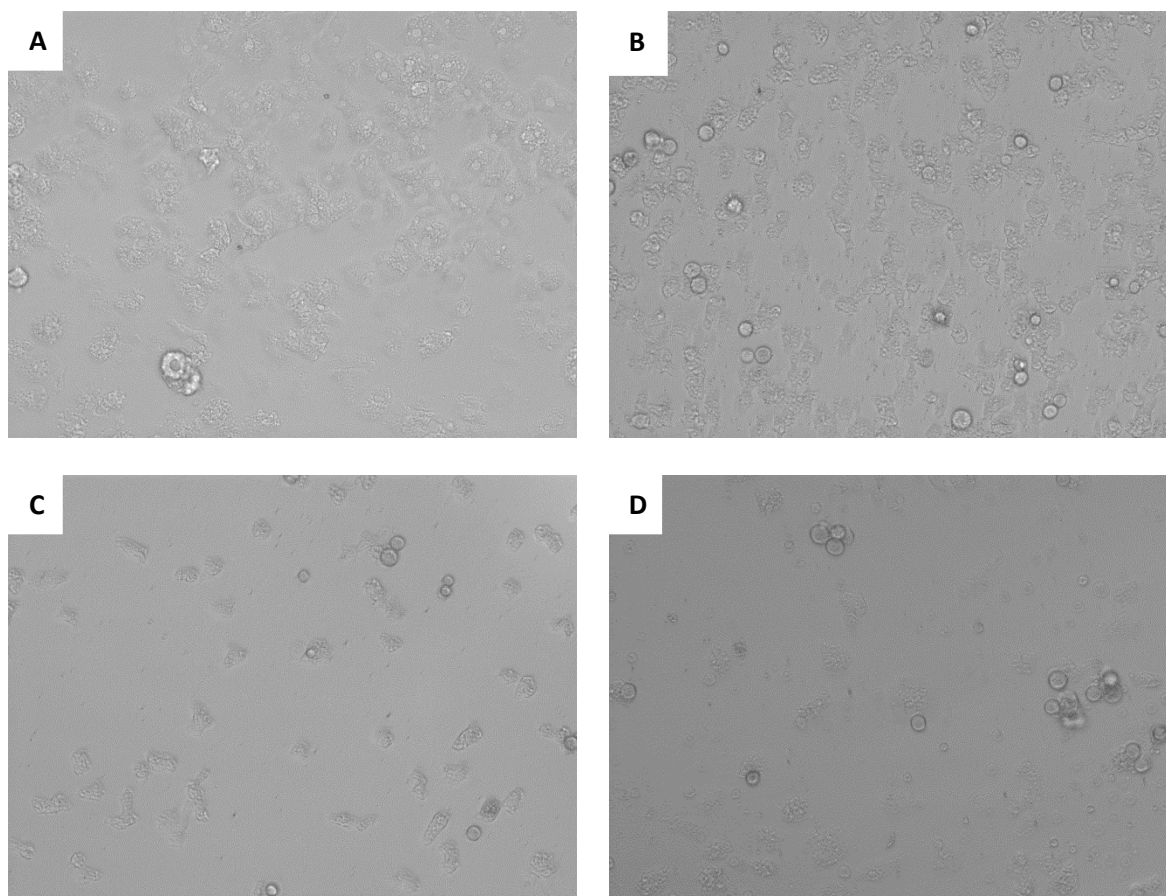


Figura 2. Imágenes de los ensayos de actividad de los derivados del ácido ursólico (UA) utilizados frente a *Acanthamoeba castellanii* Neff (20x). Control negativo (A), UA concentración 12,5 $\mu\text{g/ml}$ (B), UA5D concentración 12,5 $\mu\text{g/ml}$ (C) y UA8 concentración 25 $\mu\text{g/ml}$ (D).

Los ensayos de citotoxicidad en macrófagos muestran que todas las moléculas poseen una citotoxicidad menor a la del UA. Los compuestos UA1, UA5M, UA10 y UA11 presentan una citotoxicidad más elevada cuando son incubados en una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, por lo que estas moléculas quedaron descartadas para la continuación del estudio.

En las imágenes de los ensayos de citotoxicidad con macrófagos murinos (Figura 3), se observa, a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ de UA, la mayoría de las células muertas, mientras que a la misma concentración para UA5D se aprecian macrófagos vivos y que aún conservan su morfología celular similar a la del control. De esta manera, el UA5D confirma su moderada citotoxicidad.

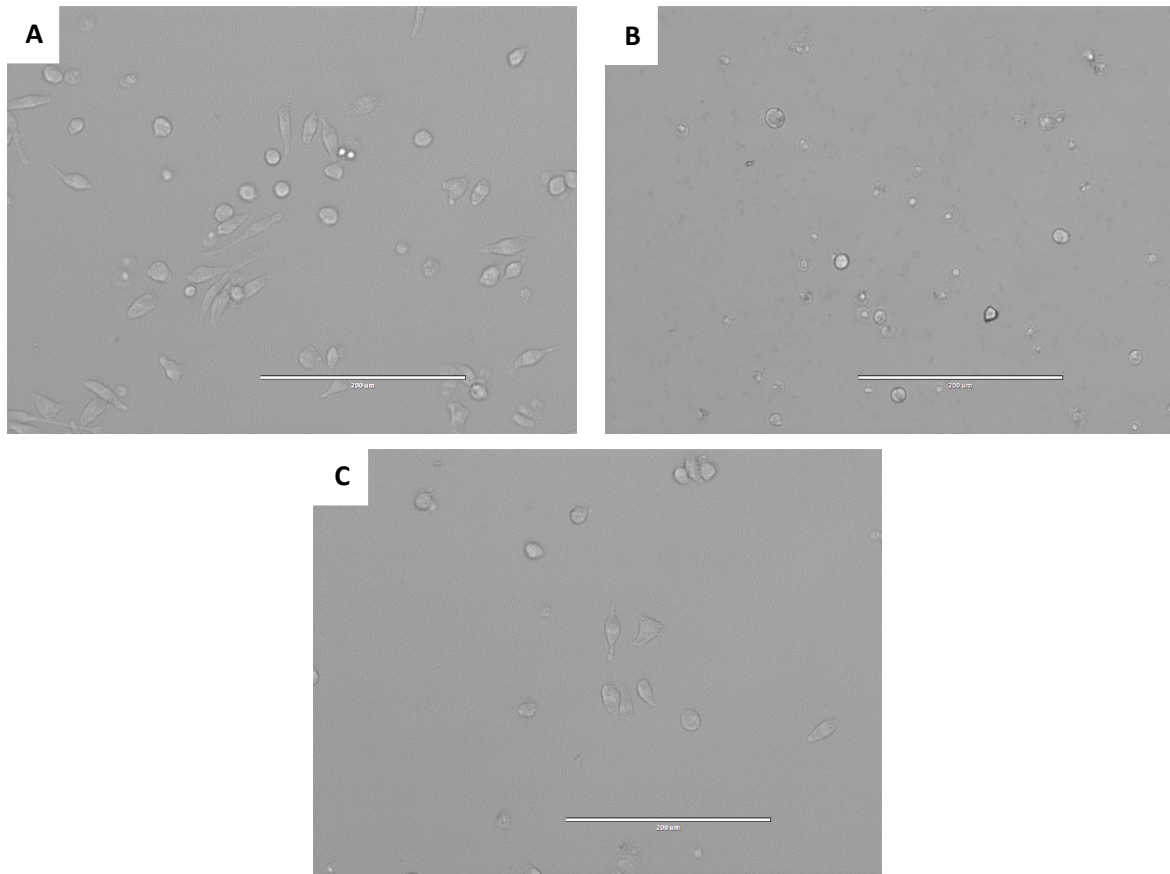


Figura 3. Imágenes de los ensayos de citotoxicidad de los derivados del ácido ursólico (UA) utilizados frente a macrófagos murinos (J774A.1) (20x). Control negativo (A), UA concentración 25 µg/ml (B), UA5D concentración 25 µg/ml (C).

Por otro lado, mientras que las moléculas UA3, UA5D, UA8 y UA9, que presentaban buenos datos de actividad frente a las amebas, mostraron porcentajes de inhibición de macrófagos moderadamente altos, siendo considerados los compuestos candidatos para continuar los estudios.

No obstante, la molécula UA3 fue descartada debido a que durante su purificación el compuesto no pudo ser elucidado correctamente.

Las moléculas UA8 y UA9, aunque mostraron resultados similares, la observación al microscopio de los trofozoítos expuestos a UA8 revelaron una mejor inhibición.

Por todo ello, los compuestos utilizados para estudios de actividad quística fueron el UA5D y el UA8.

MOLÉCULA	CI ₅₀ Quistes <i>A. castellanii</i> Neff (μM)	CI ₅₀ Quistes <i>A. griffini</i> (μM)
UA5D	19,23 ± 2,84	13,66 ± 1,50
UA8	18,13 ± 1,60	16,80 ± 0,65

Tabla 3. Resultados de los ensayos de actividad (CI₅₀) de los derivados del ácido ursólico (UA) seleccionados frente a los quistes de *Acanthamoeba castellanii* Neff y *A. griffini*.

Por último, se realizó el ensayo de actividad en quistes de *A. castellanii* Neff y *A. griffini* con las moléculas seleccionadas UA5D y UA8 (Tabla 3). Se obtuvieron valores de actividad ligeramente bajos, 19,23 y 13,66 μM para UA5D y para UA8 18,13 y 16,80 μM en *A. castellanii* Neff y *A. griffini* respectivamente. Entonces, de forma general se observa como estas dos moléculas tienen buenas propiedades amebicidas a bajas concentraciones siendo óptimas para continuar su estudio para comprender su mecanismo de acción, es por ello por lo que el ácido ursólico constituye un buen candidato para ser un antiparasitario y, al igual que se ha comprobado en estudios anteriores, incluso en otras especies parasitarias. En los cuales se demostró en animales tratados con UA, por un lado, un efecto terapéutico para la leishmaniosis cutánea producida por *Leishmania amazonensis* (Yamamoto *et al.*, 2015), además de ser un tratamiento efectivo para la leishmaniosis visceral en animales infectados con *L. infantum* (Jesús *et al.*, 2017) y ,por otro lado, en otro estudio se empleó para tratar la toxoplasmosis causada por *Toxoplasma gondii* mostrando como resultado la inhibición del crecimiento y de la proliferación del parásito en las células hospedadoras (Choi y Lee 2018).

Conclusiones

1. Todas las moléculas evaluadas, derivadas del ácido ursólico, presentan una mayor actividad frente *A. castellanii* Neff y *A. griffini* que la mostrada por el compuesto de origen (UA0).
2. Los derivados de ácido ursólico presentan una menor citotoxicidad en macrófagos murinos (J774A.1) en comparación con la del UA0.
3. Las moléculas UA5D y UA8, por todos los datos de actividad amebicida y citotoxicidad que presentan, son buenas candidatas para el desarrollo de alternativas a los compuestos amebicidas utilizados en la actualidad.

Referencias

- Aksozek A., McClellan K., Howard K., Niederkorn J.Y., Alizadeh H. (2002). Resistance of *Acanthamoebacastellanii* cysts to physical, chemical and radiological conditions. *Journal of Parasitology* 88:621-623.
- Alkharashi M., Lindsley K., Law HA., Sikder S. (2015). Medical interventions for *Acanthamoeba* keratitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2, CD010792.
- Astorga B., Lorenzo-Morales J., Martín-Navarro C.M., Alarcón V., Moreno J., González A.C., Navarrete E., Piñero J.E., Valladares B. (2011). *Acanthamoeba* Belonging to T3, T4, and T11: Genotypes Isolated from Air Conditioning Units in Santiago, Chile. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 58, 542–544. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2011.00584.
- Bakhtiari N, Hosseinkhani S, Soleimani M, Hemmati R, Noori-Zadeh A, Javan M, Tashakor A. (2016). Short-term ursolic acid promotes skeletal muscle rejuvenation through enhancing of SIRT1 expression and satellite cells proliferation. *Biomed Pharmacother.* 2016;78:185-196.
- Baltaza, W., Padzik, M., P. Szaflik, J., Dybicz, M., Hendiger, E. and Chomicz, L. (2017). Amoebicidal or amoebostatic influence of disinfectants used in health facilities and laboratories on corneal strains of *Acanthamoeba*. *Annals of Parasitology*, 63(3), pp.167–172.
- Booton, G.C., Kelly, D.J., Chu, Y.W., Seal, D.V., Houang, E., Lam, D.S., Byers, T.J., Fuerst, P.A., (2002). 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1621e1625.
- Chan L. L., Mak J. W., Low Y. T., Koh T. T., Ithoi I., Mohamed S.M. (2011). Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. *Acta tropica*, 117, 23–30. DOI: 10.1016/j.actatropica.2010.09.004.
- Choi, W. and Lee, I. (2018). Evaluation of Anti-Toxoplasma gondii Effect of Ursolic Acid as a Novel Toxoplasmosis Inhibitor. *Pharmaceuticals*, 11(2), p.43.
- Chomicz L., Conn D.B., Padzik M., Szaflik J.P., Walochnik J., Zawadzki P.J., Pawłowski W., Dybicz M. (2015). Emerging threats for human health in Poland: pathogenic isolates from drug resistant *Acanthamoeba* keratitis monitored in terms of their *in vitro* dynamics and temperature adaptability. *BioMed Research International*: 231285
- Corsaro, D., Venditti, D., (2010). Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitol. Res.* 107, 233e238.
- Croft KD, Yamashita Y, O'Donoghue H, Shirasaya D, Ward NC, Ashida H. (2017). Screening plant derived dietary phenolic compounds for bioactivity related to cardiovascular disease. *Fitoterapia*. 2017. doi:10.1016/j.fitote.2017.12.002.
- de Freitas Junior LM, de Almeida EB Jr. (2017) Medicinal plants for the treatment of obesity: ethnopharmacological approach and chemical and biological studies. *Am J Transl Res.* 2017;9:2050-2064
- Derda M., Hadaś E. (2014). The use of phytotherapy in diseases caused by parasitic protozoa. *Acta Parasitologica* 60 1–8. DOI: 10.1515/ap-2015-0001
- Diarra M, El Ouahabi H, Bouxid H, Boujraf S, Khabbal Y, Ajdi F. (2016). Medicinal plants in type 2 diabetes: therapeutic and economical aspects. *Int J Prev Med.* 2016;7:56.

- Di Cave D., D'Alfonso R., Comlavi K.A.D., D'Orazi C., Monno R., Berrilli F. (2014). Genotypic heterogeneity based on 18S-rRNA gene sequences among *Acanthamoeba* isolates from clinical samples in Italy. *Experimental parasitology*, 145, 46–49. DOI: 10.1016/j.exppara.2014.05.009.
- Dudley R, Alsam S, Khan NA. (2007). Cellulose biosynthesis pathway is a potential target in the improved treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:133–140.
- Feher J., Kovacs I., Pacella E., Keresz S., Spagnardi N., et al. (2009). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) attenuated capsaicin-induced neurotrophic keratouveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50, 5173-5180.
- Gast, R.J., (2001). Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dotblot and the discovery of a new ribotype. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48, 609e615.
- Geisen S, Fiore-Donno AM, Walochnik J, Bonkowski M. (2014). *Acanthamoeba* Everywhere: High Diversity of *Acanthamoeba* in Soils, *Parasitol Res* (Springer) 113:3151-3158, DOI 10.1007/s00436-014-3976-8.
- Gooi, P., Lee-Wing, M. & Brownstein, S. (2008). *Acanthamoeba* keratitis – persistent organism without inflammation after 1 year of topical chlorhexidine. *Cornea* 27, 246–248.
- Hadaś, E., Derda, M. and Cholewiński, M. (2017). Evaluation of the effectiveness of tea tree oil in treatment of *Acanthamoeba* infection. *Parasitology Research*, 116(3), pp.997-1001.
- Hay, J., Kirkness, C. M. & Seal, D. V. (1994). Drug-resistance and *Acanthamoeba* keratitis – the quest for alternative antiprotozoal chemotherapy. *Eye* 8, 555–563.
- Hewett, M.K., Robinson, B.S., Monis, P.T., Saint, C.P., (2003). Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi sawyer*, nerad and Visvesvara, 1992 (lobosea: Acanthamoebidae). *Acta Protozool.* 42, 325e329.
- Horn, M., Fritsche, T.R., Gautom, R.K., Schleifer, K., Wagner, M., (1999). Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* sp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environ. Microbiol.* 1, 357e367.
- Huang S.W., Hsu B.M. (2010). Isolation and identification of *Acanthamoeba* from Taiwan spring recreation areas using culture enrichment combined with PCR. *Acta tropica*, 115, 282–287. DOI: 10.1016/j.actatropica.2010.04.012
- Hussain H, Green IR, Ali I, Khan IA, Ali Z, Al-Sadi AM, Ahmed I. (2017). Ursolic acid derivatives for pharmaceutical use: a patent review (2012-2016). *Expert Opin Ther Pat.* 2017;27:1061-1072.
- Ithoi I, Ahmad AF, Nissapatorn V, Lau YL, Mahmud R, Mak JW. (2011). Detection of *Naegleria* Species in Environmental Samples from Peninsular Malaysia. *Plos One* 6 (9): e24327.
- Jäger S, Trojan H, Kopp T, Laszczyk MN, Scheffler A.(2009). Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules.* 2009;14:2016-2031.
- Jayaprakasam B, Olson LK, Schutzki RE, Tai MH, Nair MG. (2006). Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian cherry (*Cornus mas*). *J Agric Food Chem.* 2006;54:243-248.
- Jesus, J., Fragoso, T., Yamamoto, E., Laurenti, M., Silva, M., Ferreira, A., Lago, J., Santos-Gomes, G. and Passero, L. (2017). Corrigendum to “Therapeutic effect of ursolic acid in experimental visceral leishmaniasis” [Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 7 (2017) 1–11]. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 7(2), p.250.

- Jiang T, Wang XQ, Ding C, Du XL. (2017). Genistein attenuates isoflurane-induced neurotoxicity and improves impaired spatial learning and memory by regulating cAMP/CREB and BDNF-TrkB-PI3K/Akt signaling. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2017;21:579-589.
- Johnston SP, Sriram R, Qvarnstrom Y, Roy S, Verani J, Yoder J, et al. (2009). Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection in multiple contact lens solutions. *J Clin Microbiol.* 47(7):2040–5.
- Katashima CK, Silva VR, Gomes TL, Pichard C, Pimentel GD. (2017). Ursolic acid and mechanisms of actions on adipose and muscle tissue: a systematic review. *Obes Rev.* 2017;18:700-711.
- Kashyap D, Sharma A, Tuli HS, Punia S, Sharma AK. (2016). Ursolic acid and oleanolic acid: pentacyclic terpenoids with promising anti-inflammatory activities. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2016;10:21-33.
- Khan, N.A., (2006). *Acanthamoeba* biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 564e595.
- Khan NA. (2015). *Acanthamoeba*, Biology and Pathogenesis. *Second Edition Caister Academic Press*, Norfolk, UK.
- Kopańska K., Najda A., Żebrowska J., Chomicz L., Piekarczyk J., Myjak P., Bretner M. (2004). Synthesis and activity of 1H-benzimidazole and 1H-benzotriazole derivatives as inhibitors of *Acanthamoeba castellanii*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 12: 2617-2624.
- Kuk S., Yazar S., Dogan S., Çetinkaya Ü., Şakalar Ç. (2013). Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated from Kayseri well water. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 43, 12–17. DOI: 10.3906/sag-1205-26
- Lasjerdi Z., Niyati M., Haghighi A., Shahabi S., Biderouni F.T., Taghipour N., et al. (2011). Potentially pathogenic free-living amoebae isolated from hospital wards with immunodeficient patients in Tehran, Iran. *Parasitology research*, 109, 575–580. DOI: 10.1007/s00436-011-2288-5
- Leake I. (2013). Liver: plant sterols have a role in liver injury associated with parenteral nutrition. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10:693
- Lemgruber L, Lupetti P, De Souza W, Vommaro RC, da Rocha-Azevedo B. (2010). The fine structure of the *Acanthamoeba polyphaga* cyst wall. *FEMS Microbiology Lett* 305:170–176.
- Lim, N., Goh, D. & Bunce, C. (2008). Comparison of polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine as monotherapy agents in the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol* 145, 130–135.
- Liobikas J, Majiene D, Trumbeckaite S, Kursvietiene L, Masteikova R, Kopustinskiene DM, Savickas A, Bernatoniene J. (2011). Uncoupling and antioxidant effects of ursolic acid in isolated rat heart mitochondria. *J Nat Prod.* 2011;74:1640-1644.
- Lloyd D., Turner N.A., Khunkitti W., Hann A.C., Furr J.R., Russell A.D. (2001). Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: development of biocide resistance. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48: 11-16. doi:10.1111/j.1550-7408.2001.tb00410.x
- López-Arencibia, A., Reyes-Batlle, M., Freijo, M., McNaughton-Smith, G., Martín-Rodríguez, P., Fernández-Pérez, L., Sifaoui, I., Wagner, C., García-Méndez, A., Liendo, A., Bethencourt-Estrella, C., Abad-Grillo, T., Piñero, J. and Lorenzo-Morales, J. (2017). In vitro activity of 1 H -phenalen-1-one derivatives against *Acanthamoeba castellanii* Neff and their mechanisms of cell death. *Experimental Parasitology*, 183, pp.218-223.
- Lorenzo-Morales J, Ortiga-Rivas A, Martinez E, Foronda P, Valladares B. (2005). Isolation and Identification of Pathogenesis *Acanthamoeba* Strains in Tenerife, Canary Island, Spain from Water Source. *Parasitol Res.* 95:273- 277.

- Lorenzo-Morales J, Kliescikova J, Martínez-Carretero E, De Pablos LM, Profotova B, Nohynkova E, Osuna A, Valladares B. (2008). Glycogen phosphorylase in *Acanthamoeba* spp.: determining the role of the enzyme during the encystment process using RNA interference. *Eukaryot Cell* 7:509–517.
- Lorenzo-Morales J, Martin-Navarro CM, Lopez-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, Pinero JE, Valladares B. (2013). *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? *Trends Parasitol.*;29(4):181–7.
- Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. (2015). An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite.*;22:10.
- Maghsoud AH, Sissons J, Rezaian M, Nolder D, Warhurst D, Khan NA. (2005). *Acanthamoeba* Genotype T4 from the UK and Iran and Isolation of the T2 Genotype from Clinical Isolates. *J. Med Microbiol* 54 (Pt 8):755-759.
- Magnet, A., Henriques-Gil, N., Galvan-Diaz, A.L., Izquierdo, F., Fenoy, S., Del Aguila, C., (2014). Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitol. Res.* 113, 2845e2850.
- Magnet, A., Gomes, T., Pardinas, C., Garcia de Blas, N., Sadaba, C., Carrillo, E., Izquierdo, F., del Castillo, J., Hurtado, C., del Aguila, C. and Fenoy, S. (2018). Can artificial tears prevent *Acanthamoeba* keratitis? An in vitro approach. *Parasites & Vectors*, 11(1).
- Mahmoudi MR, Rahmati B, Seyedpour SH, Karanis P. (2015). Occurrence and Molecular Characterization of Free-Living Amoeba Species (*Acanthamoeba*, *Hartmannella*, and *Saccamoeba limax*) in Various Surface Water Resources of Iran. *Parasitol. Res.* 114(12):4669-4674.
- Mancha-Ramirez AM, Slaga TJ. (2016). Ursolic acid and chronic disease: an overview of UA's effects on prevention and treatment of obesity and cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2016;928:75-96.
- Marciano-Cabral F, Puffenbarger R, Cabral GA. (2000). The Increasing Importance of *Acanthamoeba* Infections. *J. Eukaryot Microbiol* 47(1):29-36.
- Marciano-Cabral F. (2009). Free-living amoebae as agents of human infection. *J Infect Dis.* 199, 1104-1106.
- Martin-Navarro, C.M., Lorenzo-Morales, J., Cabrera-Serra, M.G., Rancel, F., CoronadoAlvarez, N.M., Pinero, J.E., Valladares, B., (2008). The potential pathogenicity of chlorhexidine-sensitive *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens cases from asymptomatic individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. *J. Med. Microbiol.* 57, 1399e1404.
- Martinez A.J., Visvesvara G.S. (1997). Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathology* 7: 583-598.
- McBride, J., Ingram, P.R., Henriquez, F.L., Roberts, C.W., (2005). Development of colorimetric microtiter plate assay for assessment of antimicrobials against *Acanthamoeba*. *J. Clin Microbiol* 43, 629e634.
- Niyayati M., Dodangeh S., Lorenzo-Morales J. (2016). A review of the current research trends in the application of medicinal plants as a source for novel therapeutic agents against *Acanthamoeba* infections. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* 15, 893–900
- Nuprasert, W., Putaporntip, C., Pariyakanok, L., Jongwutiwes, S., (2010). Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4636e4640.

- Padzik M., Chomicz L., Szaflik J. P., Chrusikowska A., Perkowski K., Szaflik J. (2014). In vitro effects of selected contact lens care solutions on *Acanthamoeba castellanii* strains in Poland. *Experimental Parasitology* 145 (Suppl.): 98-101.
- Page MA, Mathers WD. (2013). *Acanthamoeba* keratitis: a 12-year experience covering a wide spectrum of presentations, diagnoses, and outcomes. *J Ophthalmol.*;2013:670242.
- Paling Sepling, Ni'matuzahroh, Winarni Dwi, Khaleyla Firaz, Wahyuni Ratna (2016). Adaptasi Morfologi *Acanthamoeba* Sp.S-11 Terhadap Variasi Konsentrasi *Peptone-Yeast Extract-Glucose* (PYG) dan Variasi Waktu Inkubasi. Semnas Biodiversitas IV Universitas Airlangga Surabaya.
- Paling, S., Wahyuni, R., Dea, N., Winarni, D., M.Kis, I., Astari, L., Adriaty, D., Agusni, I. and Izumi, S. (2018). *ACANTHAMOEBA SP.S-11 PHAGOCYTOTIC ACTIVITY ON MYCOBACTERIUM LEPRAE IN DIFFERENT NUTRIENT CONDITIONS. African Journal of Infectious Diseases, 12(1S), pp.44-48.*
- Panjwani N. (2010). Pathogenesis Of *Acanthamoeba* keratitis. *Ocul Surf.*; 8(2):70–9.
- Qvarnstrom, Y., Nerad, T.A., Visvesvara, G.S., (2013). Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 60, 626e633.
- Risler A., Coupat-Goutaland B., Pélandakis M. (2013). Genotyping and phylogenetic analysis of *Acanthamoeba* isolates associated with keratitis. *Parasitology Research* 112: 3807-3816.
- Sawyer TK. (1989). Free-Living Pathogenic and Nonpathogenic Amoebae in Maryland Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1074-1077.
- Schuster FL, Visvesvara GS. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 34:1001–1027.
- Sehrawat A, Roy R, Pore SK, Hahm ER, Samanta SK, Singh KB, Kim SH, Singh K, Singh SV (2017). Mitochondrial dysfunction in cancer chemoprevention by phytochemicals from dietary and medicinal plants. *Semin Cancer Biol.* 2017;47:147-153.
- Seo, D., Lee, S., Heo, J., No, M., Rhee, B., Ko, K., Kwak, H. and Han, J. (2018). Ursolic acid in health and disease. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology, 22(3), p.235.*
- Senthil S, Chandramohan G, Pugalendi KV. (2007). Isomers (oleanolic and ursolic acids) differ in their protective effect against isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. *Int J Cardiol.* 2007;119:131-133.
- Shishodia S, Majumdar S, Banerjee S, Aggarwal BB. (2003). Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of I kappa B alpha kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. *Cancer Res.* 2003;63:4375-4383.
- Shoff, M. E., Rogerson, A. & Kessler, K. (2008). Prevalence of *Acanthamoeba* and other naked amoebae in South Florida domestic water. *J Water Health* 6, 99–104.
- Siddiqui, R. and Khan, N. (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors, 5(1), p.6.*
- Siddiqui R, Khan NA. (2012). War of the Microbial Worlds: Who is the Beneficiary in *Acanthamoeba* Bacterial interactions? *Exp. Parasitol.* 130: 311-313
- Sifaoui I., López-Arencibia A., Ticona J.C., Martín-Navarro C.M., Reyes-Batlle M., Mejri M. *et al.* (2014). Bioassay guided isolation and identification of anti-*Acanthamoeba* compounds from Tunisian olive leaf extracts. *Experimental Parasitology* 145, S111–S114. DOI: 10.1016/j.exppara.2014.02.018

- Sifaoui, I., López-Arencibia, A., Martín-Navarro, C., Reyes-Batlle, M., Wagner, C., Chiboub, O., Mejri, M., Valladares, B., Abderrabba, M., Piñero, J. and Lorenzo-Morales, J. (2017). Programmed cell death in *Acanthamoeba castellanii* Neff induced by several molecules present in olive leaf extracts. *PLOS ONE*, 12(8), p.e0183795.
- Stothard, D.R., Hay, J., Schroeder-Diedrich, J.M., Seal, D.V., Byers, T.J., (1999). Fluorescent oligonucleotide probes for clinical and environmental detection of *Acanthamoeba* and the T4 18S rRNA gene sequence type. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2687e2693.
- Sundaresan A, Radhiga T, Pugalendi KV. (2014). Effect of ursolic acid and Rosiglitazone combination on hepatic lipid accumulation in high fat diet-fed C57BL/6J mice. *Eur J Pharmacol.* 2014;741:297-303.
- Tanveer T, Hameed A, Muazzam AG, Jung SY, Gul A, Matin A. (2013). Isolation and Molecular Characterization of Potentially Pathogenic *Acanthamoeba* Genotypes from Diverse Water Resources Including Household Drinking Water from Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Parasitol. Res.* 112: 2925-2932
- Thammaratana T, Laummaunwai P, Boonmars T. (2016). Isolation and Identification of *Acanthamoeba* Species from Natural Water Sources in the Northeastern Part of Thailand. *Parasitol. Res.* 115: 1705-1709.
- Tice AK, Shadwick LL, Fiore-Donno AM, Geisen S, Kang S, Schuler GA, Spiegel FW, Wilkinson KA, Bonkowski M, Dumack K, Lahr DJ, Voelcker E, Clauß S, Zhang J, Brown MW (2016). Expansion of the molecular and morphological diversity of *Acanthamoebidae* (*Centramoebida*, *Amoebozoa*) and identification of a novel life cycle type within the group. *Biology Direct* 11(1):69.
- Trabelsi H, Dendana F, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, Makni F, Ayadi A. (2012). Pathogenic Free-Living Amoeba: Epidemiology and Clinical Review. *Pathol Biol* 60: 399-405. DOI: 10.1016/j.patbio.2012.03.002.
- Tsvetkova N, Schild M, Panaiotov S, Kurdova-Mintcheva R, Gottstein B, Walochnik J, Aspo H, Siles M, Muller LN. (2004). The Identification of Free-Living Environmental Isolates of Amoebae from Bulgaria. *Parasitol. Res.* 92: 4-5-413.
- Turner N.A., Russell A.D., Furr J.R., Lloyd D. (2000). Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46: 27-34.
- Yamamoto, E., Campos, B., Jesus, J., Laurenti, M., Ribeiro, S., Kallás, E., Rafael-Fernandes, M., Santos-Gomes, G., Silva, M., Sessa, D., Lago, J., Levy, D. and Passero, L. (2015). The Effect of Ursolic Acid on *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Is Related to Programed Cell Death and Presents Therapeutic Potential in Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *PLOS ONE*, 10(12), p.e0144946.
- Yu SG, Zhang CJ, Xu XE, Sun JH, Zhang L, Yu PF. (2015). Ursolic acid derivative ameliorates streptozotocin-induced diabestic bone deleterious effects in mice. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8:3681-3690.
- Walochnik J., Obwaller A., Aspöck H. (2000). Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4408- 4413.
- Wang Y, He Z, Deng S. (2016). Ursolic acid reduces the metalloprotease/anti-metalloprotease imbalance in cerebral ischemia and reperfusion injury. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:1663-1674.
- Wink MA, Caumo K, Rott MB. (2011). Prevalence of *Acanthamoeba* from Tap Water in Rio Grande do Sul, Brazil. *Curr Microbiol* 63:464-469. DOI: 10.1007/s00284-011-0003-5.
- Woźniak Ł, Skąpska S, Marszałek K. (2015) Ursolic acid—a pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological activities. *Molecules.* 2015;20:20614-20641.