Universidad de La Laguna

Escuela de Doctorado y Estudios de Posgrado

Máster Universitario en Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Tropicales.

Evaluación de actividad amebicida de productos marinos

Trabajo final para optar por el grado de Máster.

Emmanuel David Molina Solano

La Laguna, Tenerife. España

Julio, 2020

Abstract

Free-living amoebas (FLA) are protozoans distributed throughout the world in several environments, and they have been isolated from the soil, natural water sources and hot springs. They are able to infect several species of mammals (including humans), the species that affect human being are mainly those that belong to the genus *Acanthamoeba* and the species *Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri and Sappinia pedata/diploidea*.

The main pathologies caused by these genera of amoebas are amoebic keratitis, amoebic meningoencephalitis, and amoebic granulomatous encephalitis. Given these pathologies, it is important to search for timely and safer therapeutic alternatives to treat these infections. Since current treatments are used empirically and present multiple adverse effects that sometimes worsen the patient's condition.

Studies have shown that sesquiterpenes are able to inhibit the growth rate and eliminate different bacteria like *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* . Therefore, Sesquiterpenes emerge as a possible candidates to evaluate as antiamoebic agents.

In this study, the *in vitro* amoebicidal effect of 10 Sesquiterpenes extracted from *Palythoa* aff. *clavata* was evaluated against three different *Acanthamoeba* strains using a colorimetric assay based on the alamarBlue®. Moreover, cytotoxicity studies in murine macrophages were carried out using the same colorimetric test. In order to evaluate the action mode to induce cell death, different apoptosis elucidation kits were used.

Our results showed that the tested sesquiterpenes presented *in vitro* anti-*Acanthamoeba* activity at low doses causing low toxicity to macrophages. Furthermore, guaititol 7 induced chromatin condensation, reduction of the ATP levels, mitochondrial membrane potential disruption and plasmatic membrane increased permeability in *A. castellanii* Neff, which indicate an activation of a programmed cell death pathway. Thus, these molecules could serve as a potential alternative in therapy against *Acanthamoeba* infections.

1. Introducción

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoarios que se encuentran distribuidos por todo el mundo en diversos ambientes, se han logrado aislar del suelo, fuentes de agua fresca y aguas termales. Estos microorganismos presentan dos estados morfológicos y fisiológicos diferenciados que les permiten adaptarse a los entornos en que se desarrollan. Su forma de trofozoíto es su estado metabólicamente activo y les permite reproducirse en un ambiente favorable, y tiene un tamaño entre los 15-60µm aproximadamente. El estadio quístico es considerado una etapa de supervivencia o resistencia, formado por una doble o triple pared gruesa que les permite a las amebas sobrevivir en ambientes más hostiles y de escasos recursos. Se pueden encontrar quistes de tamaños muy variados, que van desde los 10µm a los 35µm. En algunas especies existe un tercer estadio flagelado capaz de transformarse durante la etapa de trofozoíto (1) (2) .

Las AVL son capaces de infectar distintas especies de mamíferos. Algunas de las patologías que causan acaban con la vida del hospedero, lo que a su vez limita la capacidad de diseminarse o trasladarse a otro hospedero. Las especies que afectan al ser humano son principalmente las que pertenecen al género *Acanthamoeba, Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri* y *Sappinia pedata* (1) (3)

1.1. Enfermedades producidas por AVL

Basados en las secuencias de las fracciones 18S de RNA se evidenció que filogenéticamente las especies de *Acanthamoeba* y *Balamuthia* tienen una distancia significativamente distinta con las especies de *Naegleria* y *Sappinia,* esta misma diferencia se puede confirmar con la fisiopatología de los padecimientos que causan. En infecciones al ser humano, las primeras se comportan como patógenos oportunistas infectando a personas inmunocomprometidas. *Acanthamoeba* también es capaz de causar queratitis amebiana (AQ) en pacientes sin ninguna otra patología, pero en inmunocomprometidos desarrollan una encefalitis granulomatosa amebiana (EGA) de lento desarrollo. Por su parte *Naegleria* produce meningoencefalitis amebiana primaria (MAP) de progreso muy rápido que finaliza en la mayoría de los casos con la muerte del infectado (1).

La QA se caracteriza por dolor ocular intenso, constante lagrimeo y fotofobia, con un periodo de incubación de pocos días. Algunos de los factores de riesgo asociados a esta patología son la falta de higiene en la manipulación de las lentes de contacto y utilizarlas en actividades acuáticas o en la ducha. El diagnóstico de esta patología se basa en la presencia de un patrón epitelial

dendrítico que posteriormente se desarrolla un infiltrado estromal en forma de anillo causado por leucocitos polimorfonucleares que migran hacia el área afectada. La tinción de raspados corneales con el colorante fluorescente blanco calcoflúor, se ha utilizado para visualizar las amebas microscópicamente. Otra manera de diagnosticar esta patología es mediante el cultivo en el laboratorio de lentes de contacto y raspados o exudados corneales (1) (2) (4) (5).

La GAE es por lo general la progresión de una infección nasofaríngea causada por amebas del género *Acanthamoeba* o *Balamuthia mandrillaris,* en la cual la ameba destruye el tejido cerebral produciendo lesiones hemorrágicas necrotizantes halladas más comúnmente en el tallo cefálico y el cerebelo. Esta enfermedad cursa por lo general de manera crónica donde sus síntomas más comunes son la fiebre, el dolor de cabeza y hemiparesia. El diagnóstico de esta patología se realiza por estudios radiológicos mediante resonancia magnética o tomografía axial computarizada, para asociar el cuadro clínico es necesario contar con una biopsia de tejido en la se puede evidenciar mediante tinciones de Hematoxilina - Eosina o Inmunofluorescencia Indirecta la presencia del microorganismo (4) (1) (3) (5).

La meningoencefalitis amebiana primaria (MAP) es causada *Naegleria fowleri**,*** y se desarrolla de forma aguda acabando con la vida de la persona infectada en un periodo no mayor a las dos semanas posteriores al primer contacto con el microorganismo. La ameba es capaz de atravesar el epitelio de la mucosa y migrar a través de los nervios olfatorios, cruzando la placa cribiforme hasta el cerebro, en este se genera una destrucción del tejido afectando las meninges, lo que produce un exudado purulento con un alto contenido de trofozoítos de amebas. Los principales síntomas de esta patología son dolor de cabeza intenso, náuseas, vomito, fiebre y comportamiento anormal. El diagnóstico se puede realizar mediante la observación al fresco de una muestra de líquido cefalorraquídeo para observar la motilidad del parásito, otra herramienta para su diagnóstico es el aislamiento en agar no nutritivo inoculado con cultivo de *Escherichia coli* (3).

1.2. Tratamiento frente a las AVL

El esquema de tratamiento empleado para tratar estas patologías se basa en principios activos sintetizados para tratar patologías de otros microorganismos como, por ejemplo, anfotericina B, miltefosina, azitromicina, fluconazol, 5-flurocitocina, sulfadiazina, itraconazol y fluconazol las cuales son utilizadas en terapias combinadas. En los casos de diagnóstico temprano el tratamiento logra ser efectivo de manera empírica con las secuelas que genere el uso prolongado

de estos fármacos empleados. Los casos que no tienen resolución positiva se deben a que el diagnostico no es realizado a tiempo como el caso de la MAP (4) (5).

La ausencia de principios activos dirigidos específicos contra dianas ubicadas en las distintas especies de amebas según la patología que presente el paciente hace necesaria una investigación orientada a la búsqueda de tratamientos que brinden el esquema terapéutico con la menor cantidad posible de efectos secundarios. La búsqueda de alternativas terapéuticas actualmente se basa en la prueba *in vitro* de compuestos extraídos de distintos organismos como plantas que se conocen por su efecto terapéutico. Las propiedades antiinflamatorias y la inhibición del crecimiento de microorganismos de *Costus speciosus, Inula montana* o *Sonchus palustris* ha quedado demostradas, y se ha podido dilucidar la presencia de compuestos con alto potencial terapéutico como los sesquiterpenos (6) (7) (8).

1.3. Muerte celular programada.

El proceso de apoptosis o muerte celular programada se activa mediante dos vías: la vía extrínseca activada mediante interacción de ligando externos con receptores de membrana que activan una serie de caspasas que desencadenan el proceso y la vía intrínseca o mitocondrial que se activa ante estímulos externos que dañan a la mitocondria y la célula como la hipoxia, radiación y toxinas. Los distintos eventos que se llevan a cabo en la célula durante la apoptosis son la condensación de la cromatina para ambas vías y la perdida de la integridad de la mitocondria para la vía intrínseca (9).

En este estudio se busca evidenciar el efecto de distintos sesquiterpenos extraídos del coral *Palythoa* aff*. clavata*, en cultivos de distintas especies de *Acanthamoeba* y determinar *in vitro* los mecanismos de muerte celular que puedan inducir en estos parásitos, con el fin de minimizar los efectos inflamatorios.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

- En base a lo anteriormente expuesto, en este trabajo se estudiará la capacidad amebicida *in vitro* de distintos sesquiterpenos en diferentes cepas de *Acanthamoeba,* con el fin de evaluar su potencial terapéutico para un futuro desarrollo de fármacos contra las infecciones por este género

2.2. Objetivos específicos

- Evaluación de la actividad in vitro de 9 sesquiterpenos extraídos de corales en cultivos de las tres cepas *Acanthamoeba castellanii* Neff*, Acanthamoeba polyphaga* y *Acanthamoeba griffini*.
- Estudiar la citotoxicidad de los compuestos frente a una línea celular de macrófagos murinos (J774A.1).
- Evaluar la actividad frente a quistes de *A. castellanii* Neff de los compuestos que mostraron mayor eficacia frente a trofozoítos.
- Estudiar los mecanismos de acción de los compuestos con mejor actividad frente a *A. castellanii* Neff.

3. Materiales y métodos

3.1. Equipos y materiales utilizados

Para realizar los ensayos se dispone de equipos necesarios para el trabajo diario y para evaluar los resultados obtenidos, es indispensable contar con otros materiales para llevar cabo todos los ensayos por ellos se debe disponer con los materiales detallados en la tabla 1.

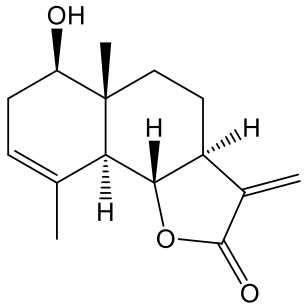
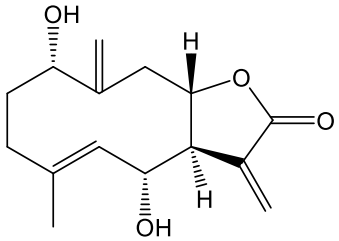
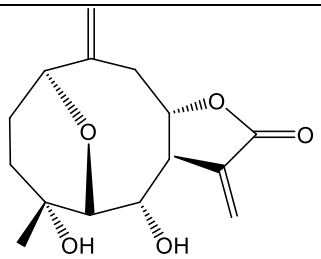
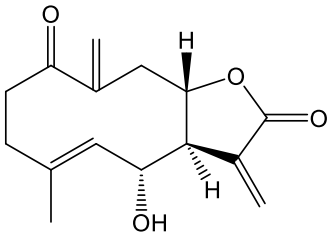
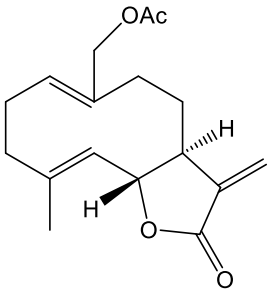
Tabla 1. Reactivos, medios de cultivo y equipo a utilizar.

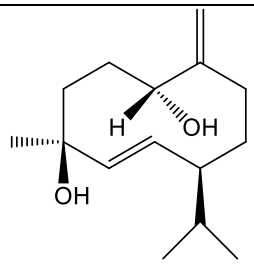
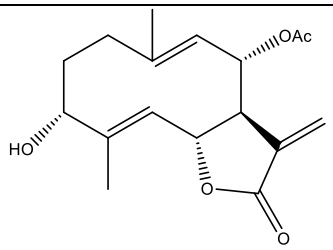
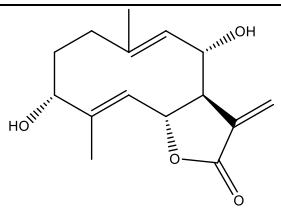
Reactivos	Medios de cultivo	Equipo
AlamarBlue™	Medio PYG (ATCC) con 10 µg/mL de gentamicina.	Estación de trabajo Enspire® para lectura de placas.
Trypan Blue stain 0.4%	Medio de enquistamiento Neff: 0.1 M KCl; 8mM $MgSO_4$ 7 H_2O; 0.4mM $CaCl_2$ 2 H_2O; 1mM $NaHCO_3$; 20mM ammediol, pH 8.8	EVOS ® FL Cell Imaging System AMF4300
Reactivos para determinación de mecanismos de muerte celular: Cell Titer-Glo®, CellROX®, JC-1, Hoechst/PI y SYTOX® Green	Medio DMEM (Gibco®) con 10% suero fetal bovino y 10 µg/mL de gentamicina.	Cámara de flujo laminar Telstar™ AV-100.
	Medio RPMI (Gibco®) con 10 µg/mL de gentamicina.	

3.2. Compuestos evaluados

Los principios activos corresponden a Sesquiterpenos proporcionados por el Instituto Universitario de Bio-Orgánica (IUBO) de la Universidad de La Laguna. Estos fueron extraídos del coral *Palythoa* aff. *clavata* la cual puede ser encontrada en las Islas Canarias y Cabo Verde (10) son etiquetados como Guaititol 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 15 y 16; de los cuales el 5 corresponde a Santamarina, el 6 es Tanachin, el 10 es Cis-*trans*-Custunolido-14-acetato, el 12 es Nephtediol, el 13 es Chihuahuin, el 15 es Tatridin A, el 7, 8 no tienen nombre definido y 16 está en proceso de elucidación, la estructura química de estos se detalla en la tabla 2.

Tabla 2. Compuestos evaluados y estructura química.

Sesquiterpeno	Estructura química
Guaititol 5 (Santamarina)	
Guaititol 6 (Tanachin)	
Guaititol 7	
Guaititol 8 (Tamirin)	
Guaititol 10 (*Cis-trans*-Custunolido-14-acetato)	

Guaititol 12 (Nephtediol)	
Guaititol 13 (Chihuahuin)	
Guaititol 15 (Tatridin A)	
Guaititol 16	En proceso de elucidación.

3.3. Cultivos Celulares

Las líneas celulares utilizadas para el cultivo corresponden trofozoítos de tres distintas especies de *A. castellani* Neff (ATCC® 30010™), *A. griffini* (11) y *A. polyphaga* (ATCC® 30461™). Estas se cultivan en medio PYG (ATCC® 712™) el cual está compuesto por peptona, extracto de levadura y glucosa y suplementado con 10 µg/ml de gentamicina, e incubadas a temperatura ambiente en botellas de cultivo sin filtro (12) (13).

La línea celular utilizada para evaluar la citotoxicidad son macrófagos murinos J774A.1 (ATCC® TIB-67™) incubados en medio DMEM (Gibco®) suplementado con un 10% de suero bovino fetal a 37ºC con una concentración de CO_2 al 5% en botellas con filtro en la tapa que permitan el intercambio gaseoso (13).

3.4. Ensayos de actividad amebicida.

Al realizar estos ensayos se colocan en una placa de 96 pocillos, 10^4 amebas/mL en medio PYG por pocillo donde se colocan diluciones de cada uno de los sesquiterpenos por evaluar iniciando en 50µg/mL hasta 1,56µg/mL y se incuban durante 96 horas a 25ºC. El efecto de los compuestos se evalúa colocando el reactivo de alamarblue™, el cual se basa en el colorante azul resazurina

que se reduce irreversiblemente a resorufina que adquiere un color rosado por la actividad metabólica de las células. La reducción está correlacionada con la respiración de las amebas presentes en el cultivo, este cambio de color puede ser cuantificado mediante la lectura de absorbancia y fluorescencia (12) (14). Nosotros hemos elegido la fluorescencia para relacionar su intensidad con la capacidad metabólica de las células.

Los valores obtenidos de las lecturas se evalúan mediante el software SigmaPlot® donde se grafican los datos y se calcula el valor del 50% de Inhibición o concentración inhibitoria 50 (CI_{50}), el cual indica en el valor de concentración del principio activo que inhibe el 50% del crecimiento del cultivo (12) (14) (15).

3.5. Ensayos de citotoxicidad celular.

La elección de un principio activo para fines terapéuticos no solo se basa en el hecho de su capacidad de afectar al microorganismo en estudio, es importante que el principio activo no tenga una alta actividad citotóxica contra las demás células del organismo. Para ello se realizan ensayos en líneas celulares de macrófagos J774A.1, siguiendo el mismo método del alamarBlue™ y a las mismas concentraciones de cada compuesto. En este caso las placas se incuban durante 24 horas y a 37ºC con 5% de CO_2. Los datos se analizan también de igual manera, pero en este caso el valor que inhibe el 50% del crecimiento del cultivo se denomina Concentración Citotóxica 50 o CC_{50} (12).

3.6. Ensayos de mecanismos de muerte celular

Posterior a los ensayos de actividad amebicida y citotoxicidad celular se deben realizar ensayos que permitan demostrar el mecanismo por el cual mueren las células al entrar en contacto con el principio activo elegido con mejor potencial terapéutico. Para ello se calcula la IC_{90} que corresponde a la concentración del compuesto que inhibe 90% de la población. En este caso, los daños celulares se evalúan en las primeras 24 horas de tratamiento con el principio activo elegido.

3.6.1. Ensayo Cell Titer-Glo®

El ensayo de Cell Titer-Glo® se basa en la mono-oxigenación de la Luciferina en presencia de ATP y luciferasa, lo que genera oxiluciferina que tiene un color verde capaz de ser cuantificado, la concentración de ATP está directamente relacionado con la presencia de oxiluciferina, lo que se traduce en la presencia de células viables (16).

3.6.2. CellROX® Agentes de estrés oxidativo

Los reactivos que componen el ensayo de CellROX® son permeables a la membrana y no fluórese en su estado reducido, uno de los reactivos fluórese color verde en el ADN al estar en presencia de especies reactivas de oxígenos (ROS), los otros reactivos que lo componen son fluorescentes en el citoplasma de color rojo y naranja en el citoplasma en presencia de ROS, estas emisiones pueden ser observadas en microscopia de fluorescencia o cuantificadas por citometría de flujo.

3.6.3. JC-1 Sensor de potencial mitocondrial.

Uno de los indicadores del estado integro de una célula es el potencial de membrana de su mitocondria para ello se utiliza la tinción de JC-1 la cual en presencia de un alto potencial de membrana forma agregados que emiten fluorescencia color rojo y en células que presentan daño en su mitocondria el bajo potencial permite que se formen monómeros que emiten color verde (16).

3.6.4. Hoechst/PI, condensación de cromatina/muerte celular.

La tinción de Hoechst/PI permite determinar si las células en análisis tienen como mecanismo de muerte ceular el proceso de apoptosis, ya que el azul fluorescente del Hoechst se une de manera más fuerte al ADN que tiene la cromatina condesada, evento característico del proceso de muerte celular programada,y por su parte el Ioduro de Propidio es permeable únicamente en células muertas donde se une y produce una coloración rojo intensa (17).

3.6.5. SYTOX® Green, tinción de ácidos nucleicos.

La tinción de ácidos nucleicos SYTOX® Green tiene una alta afinidad para unirse a los ácidos nucleicos, pero solo es capaz de penetrar cuando la membrana citoplasmática está comprometida por el estado de células, generando así una tinción verde en células dañadas (16) (18).

3.7. Ensayo de actividad quisticida.

Al finalizar los ensayos de actividad amebicida y citotoxicidad celular se calcula la IC_{90} del compuesto que cumpla con los requisitos de alta actividad amebicida y baja toxicidad y se procede con la evaluación quisticida.

Se realizan diluciones 10^4 de quistes de *A. castellanii* Neff en medio PYG, se coloca el Guaititol elegido en la IC_{90} donde se incuba durante 96 horas, para posteriormente eliminar el medio con

el compuesto y cambiarlo por medio PYG que estimule el desenquistamiento de los quistes sobrevivientes, la viabilidad de estos se realizará mediante el ensayo de alamarBlue™ (16).

4. Resultados y discusión.

4.1. Ensayos de actividad amebicida, quisticida y citotoxicidad celular.

Al evaluar la actividad amebicida de los sesquiterpenos se obtiene que con *Acanthamoeba castellanii* Neff se obtienen IC_{50} desde los 9.56µg/mL hasta los 26.43µg/mL para los nueve principios activos evaluados. Para el caso de *Acanthamoeba polyphaga* y *Acanthamoeba griffini* se evaluaron únicamente ocho principios activos, ya que estos corresponden a compuestos sintetizados y el volumen de recuperación es variable por lo que no se contaba con un volumen suficiente para su evaluación. Para estos ocho compuestos se obtuvieron valores de 8.58µg/mL hasta 20.37µg/mL y de 6.47µg/mL hasta 13.96µg/mL respectivamente. Los mismos sesquiterpenos fueron evaluados en una línea celular de macrófagos murinos obteniendo resultados desde 5.62µg/mL hasta mayor a 50µg/mL como se observa en la tabla 3, en esta misma tabla se indican valores de referencia de clorhexidina y Anfotericina B.

Tabla 3. Valores obtenidos de IC50 y CC50 en líneas celulares de Acanthamoeba castellani Neff (trofozoítos y quistes)*, Acanthamoeba polyphaga, Acanthamoeba griffini y macrófagos murinos.*

Línea celular	Valor	**Guaititol**									**Anfotericina B (µg/mL)**	**Clorhexidina (µg/mL)**
		5 (µg/mL)	**6 (µg/mL)**	**7 (µg/mL)**	**8 (µg/mL)**	**10 (µg/mL)**	**12 (µg/mL)**	**13 (µg/mL)**	**15 (µg/mL)**	**16 (µg/mL)**		
***A. castellani* Neff (trofozoítos)**	IC_{50}	26,43 ± 0,75	13,36 ± 1,04	10,34 ± 1,53	10,16 ± 1,59	12,49 ± 1,78	9,83 ± 1,67	11,36 ± 1,40	9,56 ± 1,85	14,21 ± 1,68	39.65 ± 0.56 (13)	5.23 ± 0.55 (13)
A. polyphaga	IC_{50}	20,37 ± 0,11	16,18 ± 1,66	15,46 ± 1,37	14,32 ± 0,16	12,94 ± 2,40	8,58 ± 1,34	12,08 ± 1,74	10,71 ± 0,45	-*	-	-
A. griffini	IC_{50}	9,74 ± 0,20	11,67 ± 0,12	13,18 ± 2,44	13,96 ± 0,24	9,48 ± 0,41	6,47 ± 0,31	11,86 ± 0,62	8,60 ± 0,46	-*	-	-
Macrófagos J744A.1	CC_{50}	19,14 ± 3,47	26,23 ± 1,17	25,14 ± 1,10	8,45 ± 0,46	14,82 ± 2,19	5,62 ± 0,05	5,91 ± 0,28	8,56 ± 1,72	≥50	-	-
***A. castellani* Neff (quistes)**	IC_{50}			16.73 ± 2.84							-	-

* No se realizaron análisis en *A. polyphaga y A. griffini* por baja cantidad de producto disponible.

El primer paso para considerar que un nuevo compuesto tenga potencial terapéutico en ensayos *in vitro* es elegir la que presente valores bajos de IC_{50} y valores altos de CC_{50}. Es decir, valores bajos de IC_{50} significan que se necesita una concentración baja del principio activo para afectar al 50% de las células presentes lo que implica no someter al individuo a altas concentraciones de un agente externo que le pueda causar algún efecto secundario. Por su parte, valores altos de CC_{50} indican que se necesita una dosis alta para causar daño al 50% de las demás células del individuo.

Ante estas afirmaciones es necesario evaluar los resultados de la tabla 3, donde observamos que los sesquiterpenos nombrados como guaititol 5, 8,10,12, 13,15 presentan valores muy bajos de CC_{50} lo que los clasifica con una toxicidad importante que los descarta con potencial terapéutico incluso en algunos de estos se alcanza más fácilmente el CC_{50} antes que IC_{50} lo que en definitiva los descarta como posible compuesto a elegir. Los productos señalados como guaititol 6, 7 y 16 en términos de CC_{50} presenta valores prometedores. El 16 se descarta debido a que no se tiene producto disponible lo que imposibilita evaluaciones posteriores. La diferencia obtenida de CC_{50} entre el 6 y 7 es nula debido a la desviación estándar que presentan ambos productos por lo que se elige el guaititol 7 al tener valores menores de IC_{50} lo que implica que se necesita menor concentración de principio activo para alcanzar a tener un efecto amebicida en el 50% de los microorganismos presentes.

Los ensayos de actividad quisticida confirman el potencial terapéutico que observado en las líneas celulares de amebas en su estadio de trofozoíto y los macrófagos murinos ya que la IC_{50} observada indica que no se necesita una dosis alta del compuesto para que tenga efecto sobre el estadio de quiste que le provee resistencia al microorganismo.

4.2. Ensayos de mecanismos de muerte celular

Al realizar el ensayo de Celltiter-Glo® para determinación de ATP se obtiene que, el control de *Acanthamoeba castellani* Neff que no se ha sometido a ninguno tipo de tratamiento se considera 100% de luminiscencia porcentual. La misma línea celular tratada con el compuesto 7 presenta una disminución del 83% de luminiscencia con respecto al control como se observa en la figura 1. Los valores obtenidos en este ensayo se evaluaron mediante el análisis de varianza de un factor presentando una diferencia estadísticamente significativa. Lo cual indica una disminución de la cantidad de células viables metabólicamente activas capaces de producir ATP.

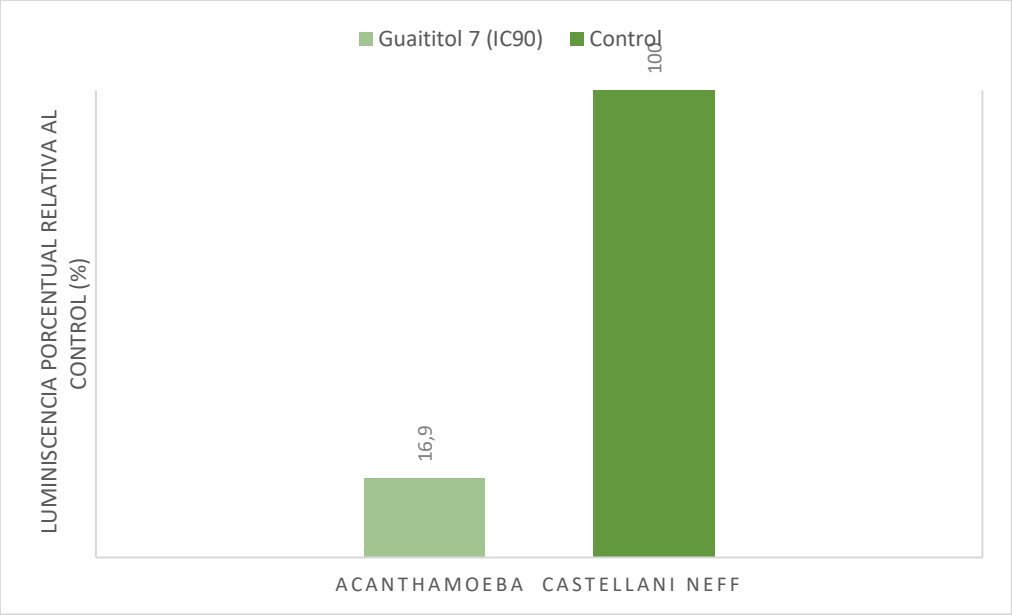


Figura 1. Porcentaje de luminiscencia relativo al control obtenidos al evaluar la exposición de A. castellani contra el Guaititol 7.

En la evaluación mediante el ensayo de CellROX® como se observa en la figura 2 se obtuvo diferencia entre las imágenes del control negativo y las amebas en evaluación con el sesquiterpeno, lo que puede indicar que la producción de especies reactivas de oxígeno en la acción de este sesquiterpeno es significativa.

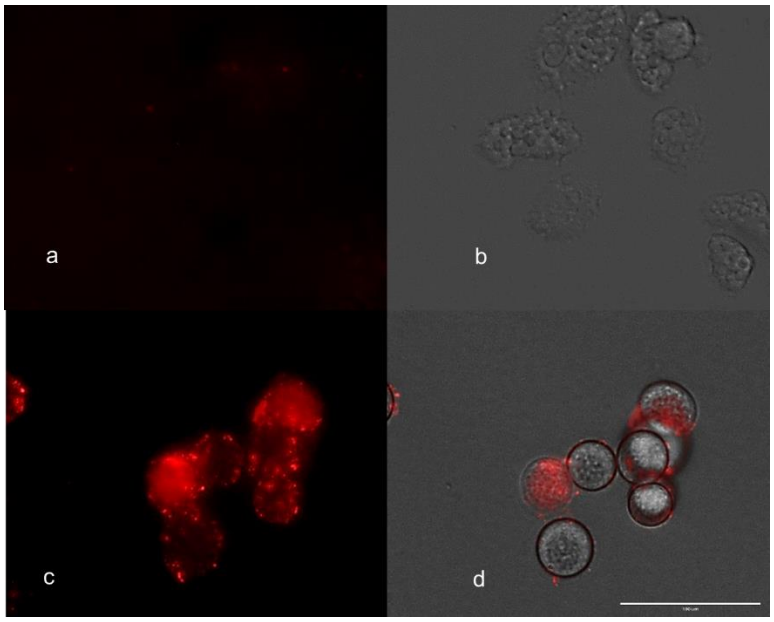


Figura 2. Determinación de especies reactivas de oxígeno. a) Amebas sin tratamiento, fluorescencia 40x. b) Amebas sin tratamiento, luz visible 40X. c) Amebas con tratamiento, fluorescencia 40x. d) Amebas con tratamiento, luz visible 40X.

Los resultados obtenidos mediante la tinción de JC-1 revelan que el principio activo causa daño en la célula que afecta el potencial de membrana de la mitocondria ya que se obtienen valores altos de coloración roja en el control negativo y coloración verde en las células sometidas al tratamiento (ver figura 3 y 4).

Esto indica que el sesquiterpeno evaluado genera muerte en las amebas mediante mecanismo de apoptosis activado por la vía intrínseca, esto porque como se evidencia en el ensayo de JC-1 existe una pérdida del potencial de membrana de la mitocondria lo cual es característico al generarse los poros en la membrana de la mitocondria en los primeros pasos de la activación de la apoptosis. Otra de las evidencias de la afectación a la mitocondria es la disminución en la producción de ATP demostrado en el ensayo de cuantificación de este metabolito, ya que la mitocondria es el principal productor de energía de las células (19).

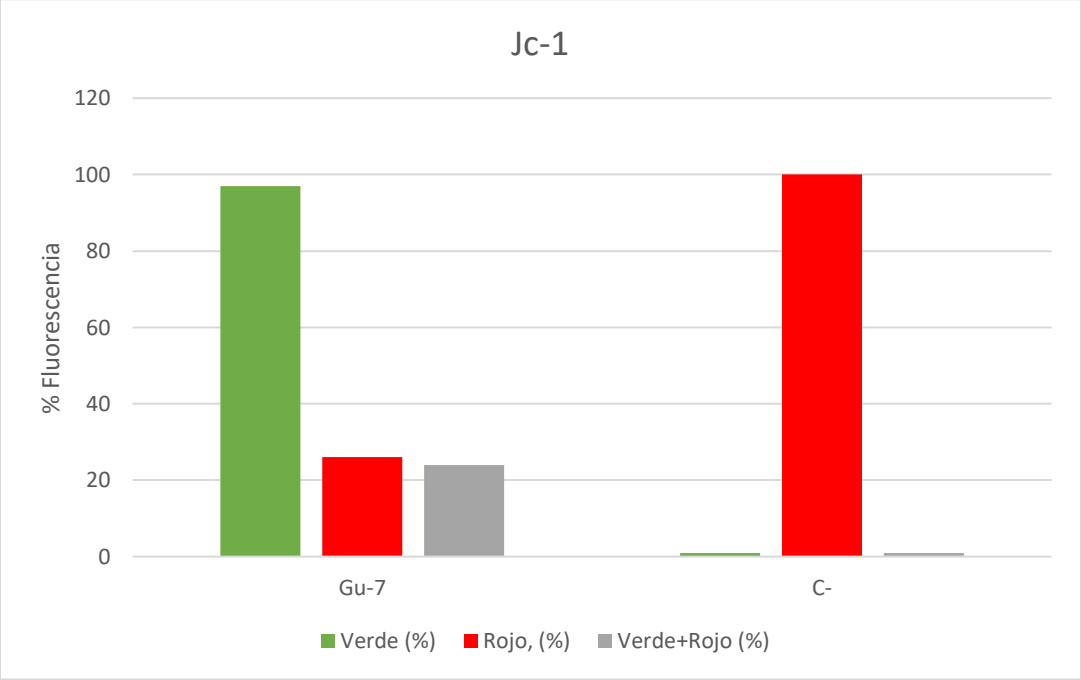


Figura 3.Porcentaje de amebas con la coloración verde, roja o verde + roja, al aplicarle el tratamiento y la tinción de JC-1.

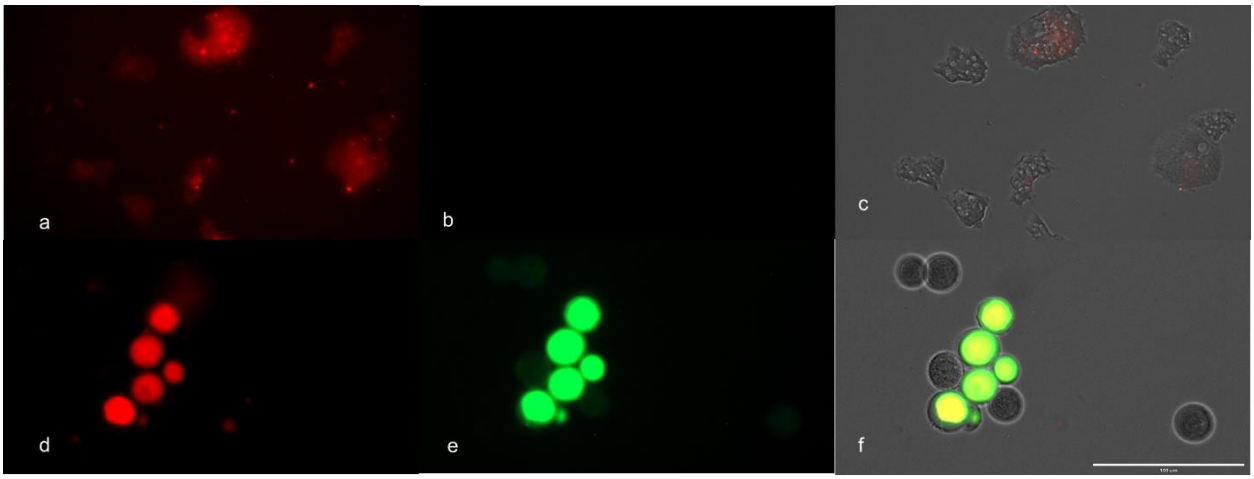


Figura 4. Determinación de potencial de membrana mitocondrial. a) Amebas sin tratamiento, fluorescencia 40x. b) Amebas sin tratamiento, fluorescencia 40X. c) Amebas sin tratamiento, superposición con luz visible, 40x. d) Amebas con tratamiento, fluorescencia 40x. b) Amebas con tratamiento, fluorescencia 40X. c) Amebas con tratamiento, superposición con luz visible, 40x

La tinción de Hoechst y Ioduro de Propidio evidencia que existe un alto porcentaje de fluorescencia color azul con respecto al control lo que significa que la mayor parte de las células en estudio presentan condensación de la cromatina como parte de su mecanismo de muerte celular, el color rojo es indicativo de las células que se encuentran muertas y las que presentan color azul y rojo son por un proceso de apoptosis tardía (ver figuras 5 y 6).

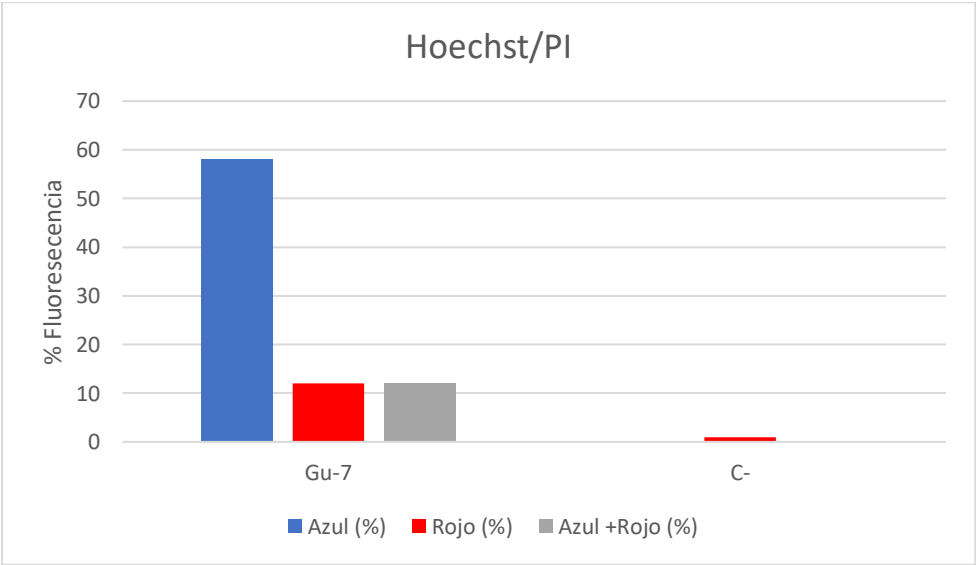


Figura 5. Porcentaje de amebas con la coloración azul, roja o azul + roja, al aplicarle el tratamiento y la tinción de Hoechst/PI.

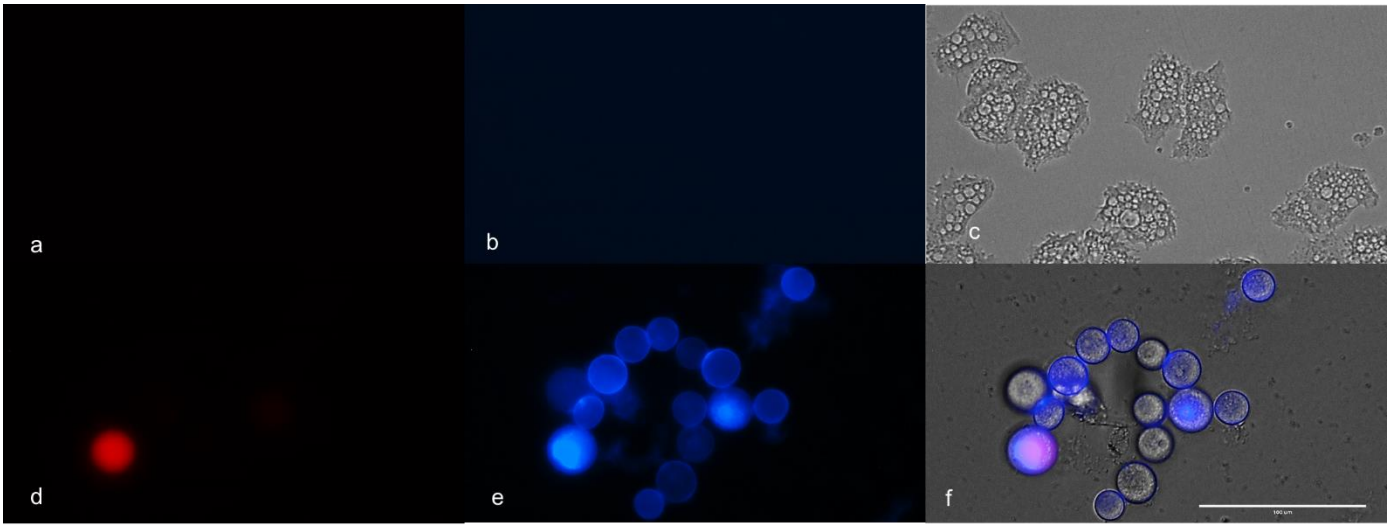


Figura 6. Determinación de condensación de cromatina y viabilidad celular. a) Amebas sin tratamiento, fluorescencia 40x. b) Amebas sin tratamiento, fluorescencia 40X. c) Amebas sin tratamiento, superposición con luz visible, 40x. d) Amebas con tratamiento, fluorescencia 40x. b) Amebas con tratamiento, fluorescencia 40X. c) Amebas con tratamiento, superposición con luz visible, 40x

Los resultados de la tinción de SYTOX® Green presentan una diferencia de 80% de las amebas tratadas con el Guaititol 7 con respecto al control, lo que evidencia que en su mayoría las células tienen un grado de permeabilidad significativo en la membrana que permite la entrada del reactivo y la unión a material genético (ver figuras 7y 8). Aún así, como se aprecia en las figuras, se mantiene la integridad celular, no favoreciendo procesos inflamatorios derivados de la liberación del contenido intracelular. La apoptosis es el proceso en donde se degradan todas sus estructuras de manera controlada, lo que genera permeabilidad en la membrana lo cual se confirma en el ensayo de SYTOX® Green que demuestra en un alto porcentaje que el colorante fue capaz de atravesar la membrana citoplasmática para unirse a los ácidos nucleicos (20) (9).

En la búsqueda de un candidato terapéutico es muy importante que, además de que sea efectivo contra el microorganismo que deseamos eliminar y que no cause daño a otros células, que la forma en que provoque la muerte sea de la forma más controlada posible. Un proceso de muerte por necrosis donde se da la ruptura de la membrana de forma abrupta, libera citoquinas proinflamatorias generando la activación de una cascada inflamatoria y por consiguiente daño tisular (9).

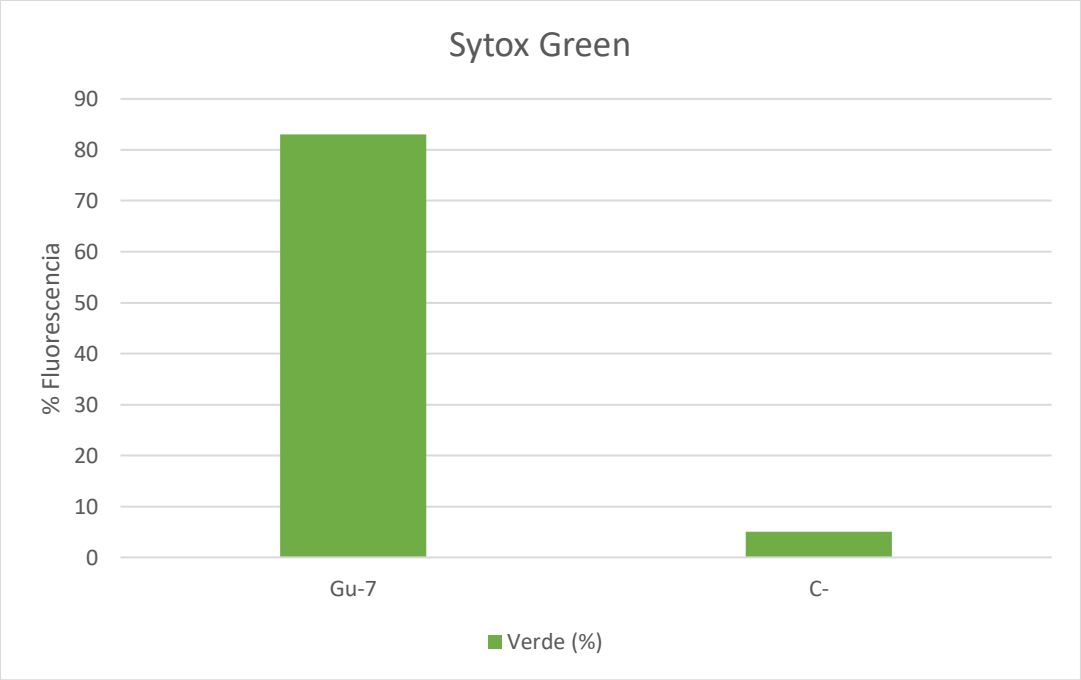


Figura 7. Porcentaje de amebas con la coloración verde, al aplicarle el tratamiento y la tinción de SYTOX® Green.

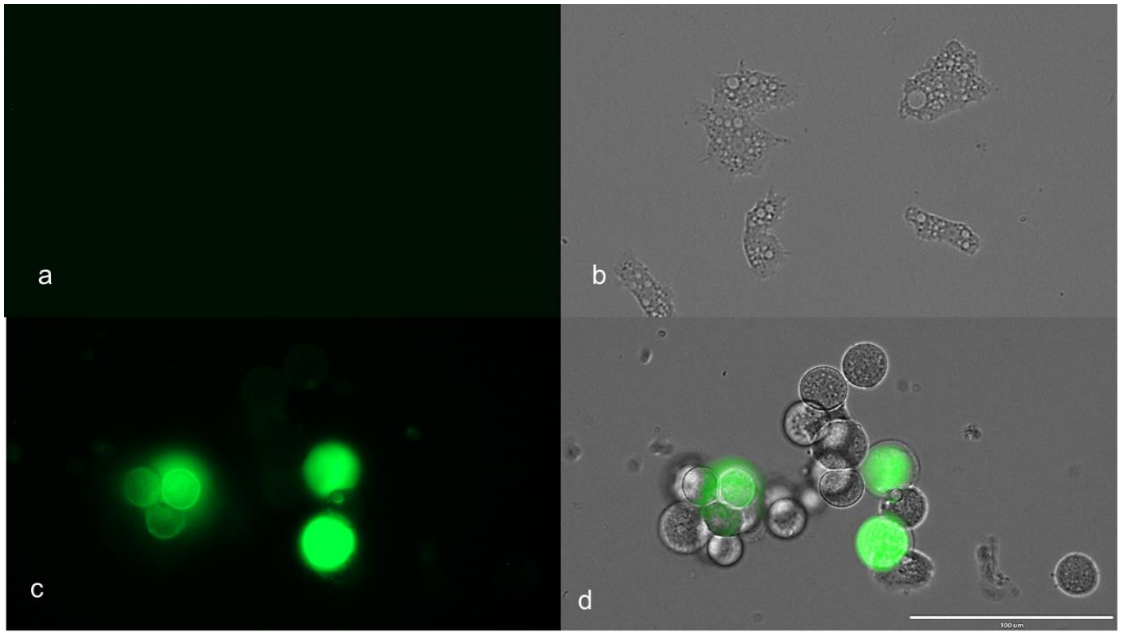


Figura 8. Determinación de viabilidad celular. a) Amebas sin tratamiento, fluorescencia 40x. b) Amebas sin tratamiento superposición con luz visible, 40x. c) Amebas con tratamiento, fluorescencia 40x. d) Amebas con tratamiento superposición con luz visible, 40x.

Por esta razón es que es necesario que el daño que cause el producto en análisis genere el que la ameba entre un mecanismo de muerte celular programada de manera que se logre eliminar el microorganismo de forma controlada, este proceso de muerte celular programada es llamado

apoptosis. La apoptosis se refiere a un proceso celular mediado por una serie de proteínas llamadas caspasas que desencadenan eventos que generan fragmentación de ADN y destrucción de proteínas nucleares (9).

Existen dos mecanismos mediante el cual se desencadena el proceso apoptótico, la vía intrínseca en la cual el principal protagonista es la mitocondria que al entrar la célula en daño comienza a sufrir cambios morfológicos y fisiológicos activando caspasas que llevan a la degradación de la cromatina y el citoesqueleto de manera controlada, esta vía es estimulada por factores externos como hipoxia, radiación o calor. La vía extrínseca genera de igual forma fragmentación de ADN y perdida de integridad de la membrana, la diferencia entre las dos vías radica en la forma en que se comienzan a desarrollar los eventos apoptóticos, ya que en la vía extrínseca se generan a partir de la activación de receptores de membrana activados por ligandos externos (20).

Por lo tanto, ante estas evidencias podemos decir que el Guaititol 7 tiene potencial terapéutico ya que los ensayos realizados demuestran que es capaz de generar la muerte del microorganismo en ambos estadíos de manera controlada a baja concentración. Es importante señalar la necesidad de realizar más ensayos que permitan caracterizar de forma más detallada la forma en que activa el mecanismo de muerte celular de manera que se pueda optimizar este proceso para generar una muerte celular programada más controlada.

5. Conclusiones y recomendaciones

Se determino que los sesquiterpenos naturales evaluados presentan actividad frente a *Acanthamoeba.*

Se determinó que la citotoxicidad de los sesquiterpenos evaluados es variable, caracterizando como menos citotóxicos al Guaititol 7 y Guaititol 16 como los que tienen valores más altos.

Se estableció que el guaititol 7 es un candidato como tratamiento contra especies de Acanthamoeba en su estadio de trofozoíto y quiste ya que es capaz de activar la muerte celular programada del microorganismo.

Se evidenció que el Guaititol 7 tiene actividad quisticida en contra de los quistes de *Acanthamoeba.*

Como recomendación es de gran importancia saber que estos estudios son la base de estudios más complejos y funcionan como los primeros pasos en la selección de nuevo tratamiento, existe la posibilidad que una molécula con buenos resultados *in vitro* no genere resultados satisfactorios en modelos *in vivo* en los cuales existen diversos factores que podrían afectar el contacto del principio activo con la ameba o la diana terapéutica.

Bibliografía

1. *Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals.* **Schuster, Frederick and Visvesvara, Govinda.** 2004, International Journal for Parasitology, Vol. 34, pp. 1001-1027.

2. *Acanthamoeba keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide?* **Lorenzo-Morales, Jacob, et al.** 4, 2013, Trends in Parasitology, Vol. 29.

3. *Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas.* **Schuster, Frederick.** 3, 2002, Clinical Microbiology Reviews, Vol. 15, pp. 342-354.

4. *Acanthamoeba spp. as Agents of Disease in Humans.* **Marciano-Cabral, Francine and Cabral, Guy.** 2, 2003, Clinical Microbiology Reviews, Vol. 16, pp. 273-307.

5. *Biology and pathogenesis of Acanthamoeba.* **Siddiqui, Ruqaiyyah and Ahmed-Khan, Naveed.** 6, 2012, Parasites & Vectors, Vol. 5.

6. *Anti-inflammatorysesquiterpenesfrom Costus speciosus rhizomes.* **Al-Attas, Ahmed, et al.** 2015, Journal ofEthnopharmacology, Vol. 176, pp. 365-374.

7. *New sesquiterpene acid and inositol derivatives from Inula montana L.* **Garayev, Elnur, et al.** 2017, Fitoterapia, Vol. 120, pp. 79-84.

8. *Sesquiterpene Lactones from Anthemis melanolepis and Their Antibacterial and Cytotoxic Activities. Prediction of Their Pharmacokinetic Profile.* **Saroglou, Vasiliki, et al.** 2010, Journal of Natural Products, Vol. 73, pp. 242-246.

9. *Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy.* **Arcy, Mark.** 2019, Cell Biology International, Vol. 43, pp. 582-592.

10. *Diversity of zoantharian species and their symbionts from the Macaronesian and Cape Verde ecoregions demonstrates their widespread distribution in the Atlantic Ocean.* **Lopez, Cataixa, et al.** 2019, Vol. 38, pp. 269-283.

11. *Morphological Features and In Vitro Cytopathic Effect of Acanthamoeba griffini Trophozoites Isolated from a Clinical Case.* **González-Robles, Arturo, et al.** Journal of Parasitology Research, Vol. 2014.

12. *PrestoBlue and AlamarBlue are equally useful as agents to determine the viability of Acanthamoeba trophozoites.* **Martin-Navarro, Carmen, et al.** 2014, Experimental Parasitology, Vol. 145, pp. S69-S72.

13. *Amoebicidal Activity of Caffeine and Maslinic Acid by the Induction of Programmed Cell Death in Acanthamoeba.* **Martin-Navarro, Carmen, et al.** 2017, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 61.

14. *Acanthamoeba castellanii Neff: In vitro activity against the trophozoite stage of a natural sesquiterpene and a synthetic cobalt(II)–lapachol complex.* **Martin-Navarro, Carmen, et al.** 2010, Experimental Parasitology, Vol. 126, pp. 106-108.

15. *The potential pathogenicity of chlorhexidine-sensitive Acanthamoeba strains isolated from contact lens cases from asymptomatic individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain.* **Martin-Navarro, Carmen, et al.** 2008, Journal of Medical Microbiology, pp. 1399-1404.

16. *Programmed cell death in Acanthamoeba castellanii Neff induced by several molecules present in olive leaf extracts.* **Sifaoui, Ines, et al.** 8, 2017, PLoS ONE, Vol. 12.

17. **Kabakov, Alexander and Gabai, Vladimir.** Cell Death and Survival Assays. [book auth.] Stuart Calderwood and Thomas Prince. *Chaperones: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* 2018, Vol. 1709.

18. **Li-Ying Chan, Leo, McCulley, Kelsey and Kessel, Sarah.** Assessment of Cell Viability with Single-, Dual-, and Multi-Staining Methods Using Image Cytometry. [book auth.] Daniel Gilbert and Oliver Fiedrich. *Cell Viability Assays: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* 2017, Vol. 1601.

19. *The Role of Mitochondria in Apoptosis.* **Wang, Chunxin and Youle, Richard.** 2009, Annual Review of Genetics, Vol. 43, pp. 95-118.

20. *Amphotericin B induces apoptosis-like programmed cell death in Naegleria fowleri and Naegleria gruberi.* **Cárdenas-Zuñiga, Roberto, et al.** 2017, Microbiology, Vol. 163, pp. 940-949.

21. *Statins and Voriconazole Induce Programmed Cell Death in Acanthamoeba castellanii.* **Martin-Navarro, Carmen, et al.** 5, 2015, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 59, pp. 2817-2824.