

ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE *Annona muricata* CONTRA *Acanthamoeba castellanii*

Pérez Ramírez Palmira Yanin (1), Flores Villavicencio Lérica Liss (2) Rosiles Ortega Ana Fernanda (2), Sánchez Ramos Sanjuana (1), Castruita Domínguez José Pedro (3), Villagómez Castro Julio César (2)

1 [Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [yanin_pr_07@hotmail.com, sansanchez@itesi.edu.mx]

2 [Departamento de Biología, DCNE, Universidad de Guanajuato] | [castroj2407@hotmail.com]

3 [Departamento de Ecología, CUCBA, Universidad de Guadalajara] | [casdompe@hotmail.com]

Resumen

El género *Acanthamoeba* es un grupo de protozoarios de vida libre, ampliamente distribuidos en la naturaleza. Actualmente existen millones de usuarios de lentes de contacto (LC), los cuales proveen una superficie donde los microorganismos pueden adherirse y causar queratitis. Debido a la resistencia del estadio quístico de *Acanthamoeba*, es difícil su completa eliminación aun utilizando las Soluciones Multipropósito (SMP) elaboradas para desinfectar los LC. En el estudio de la medicina tradicional, la *Annona muricata* contienen metabolitos secundarios con actividad anticancerígena, antiparasitaria e insecticida. En este estudio, se analizó el efecto de extractos de *A. muricata* sobre *A. castellanii*. Los trofozoítos, cultivados a 30 °C en medio Chang conteniendo 10 % de suero fetal de bovino (SFB), fueron tratados con extractos acuosos y etanólicos de *A. muricata* en presencia o ausencia de SMP. Los resultados muestran una disminución de la actividad metabólica amebiana independientemente del extracto de *A. muricata* empleado. La exposición de los trofozoítos a SMP + *A. muricata* ocasionó: la disminución de su actividad metabólica con respecto al tiempo, lisis amebiana y formación de pseudoquistes. Los resultados sugieren que *A. muricata* puede potenciar el efecto de las SMP y reducir el riesgo potencial para los usuarios de LC debida a la resistencia de los trofozoítos y pseudoquistes frente a las SMP.

Abstract

The genus *Acanthamoeba* is a group of free-living protozoa, widely distributed in nature. Currently there are millions of contact lens (LC) users, which provide a surface where microorganisms can adhere and cause keratitis. Due to the resistance of *Acanthamoeba* cystic stage, it's difficult to completely eliminate it, even using the Multipurpose Solutions (SMP) developed to disinfect the LC. In several traditional medicine studies, it has been reported that *Annona muricata* contain secondary metabolites with anticancer, antiparasitic and insecticidal activities. In this study, the effect of extracts of *A. muricata* on *A. castellanii* was analyzed. The trophozoites were cultured in Chang medium with 10% SFB at 30 °C and treated with aqueous and ethanolic extracts of *A. muricata* with and without SMP. The results show a decrease in amebic metabolic activity, independently of the extract of *A. muricata* employed. The exposure of the trophozoites to SMP plus *A. muricata* extract, caused the decrease of their metabolic activity with respect to time, amebic lysis and pseudocyst formation. The results suggest that *A. muricata* may potentiate the effect of SMP and reduce the potential risk for LC users due to the resistance of trophozoites and pseudocysts to SMP.

Palabras Clave

Solución multipropósito, antiparasitario, viabilidad, *A. muricata*, *A. castellanii*

INTRODUCCIÓN

La queratitis amebiana (QA) por *Acanthamoeba*, es una infección de la córnea dolorosa y progresiva que causa ulceraciones en la superficie ocular y puede terminar con la pérdida de la visión del ojo infectado. Los principales factores de riesgo son traumas en la córnea, exposición a aguas contaminadas y principalmente el uso inadecuado de lentes de contacto (LC) como bañarse y/o nadar con ellos, falta de higiene personal, desinfecciones inapropiadas de los LC y la formación de biopelículas en los LC [1].

Acanthamoeba presenta una forma vegetativa metabólicamente activa, el trofozoíto; así como una forma de resistencia, el quiste. El daño corneal es un requisito fundamental para que se produzca la infección por los trofozoítos presentes ya que el estadio de quiste no se adhiere al epitelio corneal y por lo tanto no es infectivo [2].

Sin embargo, debido a la resistencia de los quistes de *A. castellanii*, es difícil su completa eliminación de los LC aun utilizando Soluciones Multipropósito (SMP) las cuales son elaboradas específicamente para desinfectarlos [3].

Por otra parte, los estudios de la medicina tradicional han promovido el descubrimiento de nuevos agentes antiparasitarios, entre ellos la *Annona muricata*, la cual contienen diversos metabolitos secundarios, tales como las acetogeninas (ACG) que presentan funciones como anticancerígenos, insecticidas y antiparasitarios [4]. En este sentido, se ha descrito que las ACG tienen actividad antiparasitaria *in vitro* contra *Leishmania donovani*, *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* y larvas de *Molineria dessatae*; parásitos de importancia en el área de la salud [4].

Actualmente existen millones de usuarios de LC en el mundo. Los LC proveen una superficie en donde los microorganismos, pueden adherirse y posteriormente extenderse hacia un epitelio previamente dañado causando diversos tipos de queratitis, entre ellas la queratitis amebiana y debido a que las SMP no son 100% efectivas en la desinfección de LC, dan lugar a infecciones por *A. castellanii* [1]. Por lo anterior, en este estudio se analizó el efecto sobre *A. castellanii* de los extractos de *A. muricata* solos o en combinación con SMP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de A. castellanii

Los trofozoítos de *A. castellanii* fueron cultivados en medio Chang suplementado con 10% SFB a 30°C.

SMP para lentes de contacto

Se utilizaron dos diferentes SMP elegidas con base en su formulación con agentes antimicrobianos. Solución SIMPLUS conteniendo gluconato de clorhexidina (0.003%) y clorhidrato de poliaminopropil biguanida (0.0005%) producido por Bausch & Lomb; y solución Opti-Free Replenish con agente POLYQUAD (policuaternio-1) 0.001% y ALCON ALDOX (miristamidopropil dimetilamina) 0.0005% de Alcon Laboratories. Además, se utilizó una solución no comercial de peróxido de hidrógeno (H₂O₂, 3%), la cual ha sido reportada como eficiente amebicida.

Extractos de A. muricata

Se recolectaron hojas de *A. muricata* del estado de Nayarit, se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente en un horno a 45°C. Las hojas secas fueron molidas y tamizadas. Se usaron 2 tipos de extractos: 1) acuoso extraído por el método de infusión y 2) etanólico obtenido por el método de extracción.

Ensayo de la actividad metabólica en trofozoítos expuestos a las SMP y A. muricata

Se inocularon trofozoítos (1x10⁵/mL) en placas de cultivo de 24 pozos durante 24h para permitir su adherencia. Posteriormente se lavaron con NaCl 0.9% y se adicionaron los extractos de *A. muricata* en dilución seriada: 6.25 – 100% (v/v). Después de 24h de incubación, se analizó la actividad metabólica mitocondrial por medio del ensayo de XTT, el cual se basa en la reducción de la sal de tretazolio (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida) a cristales de formazan solubles en agua, proceso bioquímico realizado por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables. La solución de XTT (Sigma) se añadió a las muestras y se incubó por 90 min a 30°C en oscuridad. Se recuperó el sobrenadante y se midió la absorbencia en un espectrofotómetro (Epoch Biotek) a 490 nm.

Por otra parte, se expusieron los trofozoítos (1x10⁵/mL) en placas de cultivo de 24 pozos

durante 4 y 6 h en presencia o ausencia de SMP y H₂O₂ 3%. Posteriormente, se determinó la actividad metabólica por el ensayo de XTT y se analizó la morfología (Primo Vert Carl Zeiss acoplado con una cámara AxioCam ERc5s).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Morfología de los trofozoítos de *A. castellanii*

Los trofozoítos tienen una morfología amorfa con acantopodios y una gran cantidad de vacuolas (Fig. 1), mantienen un constante movimiento y su reproducción es por fisión binaria.

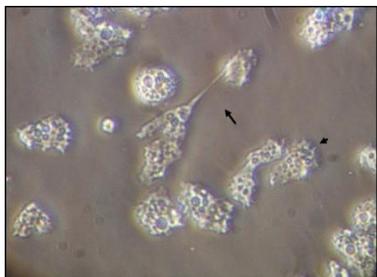


Figura 1. Morfología de los trofozoítos de *A. castellanii*. Se observan trofozoítos reproduciéndose por fisión binaria (flecha) y los característicos acantopodios (cabeza de flecha)

Determinación de la actividad metabólica mitocondrial de *A. castellanii* expuesta a *A. muricata*

La actividad metabólica de los trofozoítos de *A. castellanii* fue disminuida independientemente del tipo de extracto de *A. muricata* y su concentración (Fig. 2).

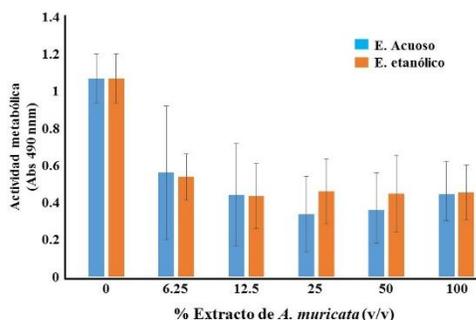


Figura 2. Actividad metabólica mitocondrial de *A. castellanii* expuesta a los extractos de *A. muricata*. n=7, *p<0.05

Al exponer los trofozoítos de *A. castellanii* a los extractos de *A. muricata* se observaron cambios en la morfología y adhesión amebiana (Fig. 3). Entre ellos se pueden mencionar la pérdida de la monocapa de trofozoítos, los cuales parecen haberse diferenciado en pseudoquistes con forma redondeada, conservando su adhesión al sustrato. Otro efecto observado fue la disminución en la movilidad celular y la reproducción amebiana (fisión binaria).

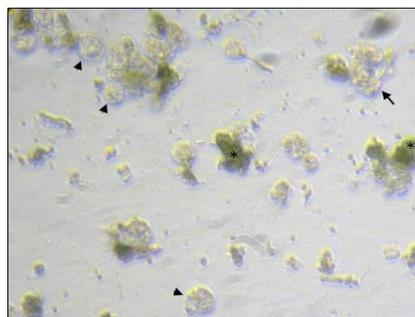


Figura 3. Morfología de *A. castellanii* expuesta a extracto acuoso de *A. muricata*. Se observan pocos trofozoítos (flecha), mientras que la mayoría son pseudoquistes (cabeza de flecha), fragmentos de hojas de *A. muricata* (*).

Los efectos antiparasitarios de las plantas del género *Annona* y de las acetogeninas encontradas en especies de este género han sido reportadas previamente. En ensayos *in vitro*, el extracto acuoso de *Annona squamosa* L. causa la inhibición de la eclosión de huevos (80.6%) de nematodos gastrointestinales de bovinos, mientras que en ensayos *in vivo* con ovejas infectadas se observó una reducción del 40% de los conteos de huevos de *Haemonchus contortus*. Similarmente, con extractos acuosos de *A. muricata*, se ha observado 84,91% y 89,08% respectivamente en su eficacia en la prueba de eclosión de huevos y motilidad larval para éste nematodo [5]. El mecanismo de acción de los componentes del extracto es aún desconocido, sin embargo, se ha sugerido sea por medio de la inhibición de la división celular.

Exposición de *A. castellanii* a las SMP

Se analizó la actividad metabólica mitocondrial de los trofozoítos expuestos por 6 h a las SMP, el tiempo fue tomado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La solución no oftálmica de peróxido de hidrógeno al 3%, la cual ha sido reportada

anteriormente como eficiente amebicida [6], fue utilizada como control positivo.

Los resultados mostraron (Fig. 4), que el peróxido de hidrógeno al 3% presenta la mayor actividad amebicida, seguido por las soluciones SIMPLUS (SP) y Opti-Free Replenish (OFR).

Los agentes desinfectantes que pertenecen a la familia de las biguanidas de la solución SP, han mostrado actividad contra *A. castellanii* de forma independiente, causando daño celular a nivel de la membrana plasmática. Bajas concentraciones de estos compuestos tienen efectos mínimos y se ha sugerido que el daño ocasionado puede ser reversible, sin embargo, los mejores efectos se han obtenido con concentraciones altas, las cuales no son utilizadas en las SMP [7]. A pesar de que la solución SP es un amebicida eficiente, su uso está limitado a lentes de contacto rígidos y gas permeable. En contraste, la solución OFR es utilizada para lentes de contacto suaves (hidrofilicos) y de hidrogel de silicona, los cuales son utilizados por la mayoría de usuarios de LC. La actividad amebicida de la solución OFR es debida a los agentes desinfectantes como el policuaternario (PQ-1), bactericida y el miristamidopropil dimetilamina (MAPD), desinfectante de amplio espectro con actividad antifúngica y antiamebiana [8].

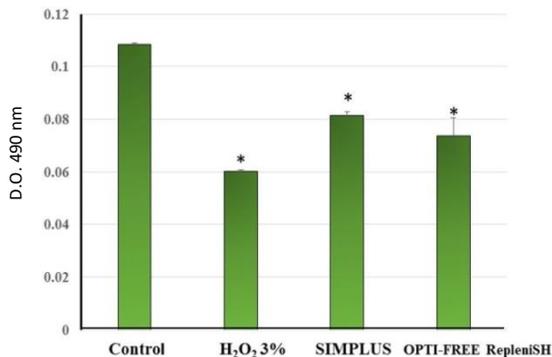


Figura 4. Exposición de trofozoitos de *A. castellanii* a las soluciones multipropósito. ANOVA n=3, *p≤0.05

En el análisis morfológico (Fig. 5), se observaron cambios en los trofozoitos comparados con el control (Fig. 5A); la solución SP induce una forma redondeada, reducción de tamaño, acortamiento de los acantopodios, nulas reproducción y movimiento (Fig. 5C). La solución Opti-Free Replenish (OFR), provocó la lisis amebiana y en el residuo celular se formaron agregados de pseudoquistes, algunos

aun adheridos a la superficie, además de nula reproducción y movimiento (Fig. 5D). Algunas alteraciones fueron similares a las observadas en control positivo, amebas expuestas a peróxido de hidrógeno al 3% (Fig. 5B).

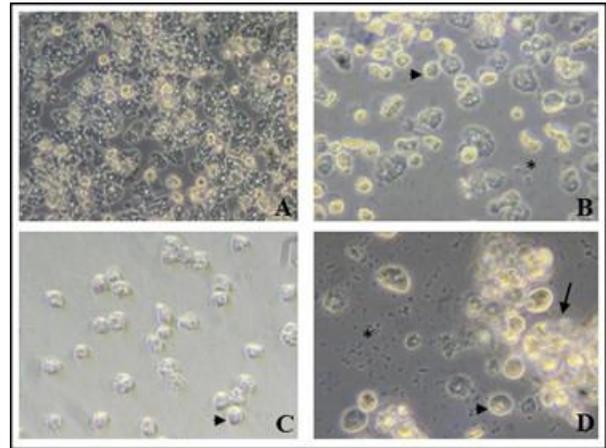


Figura 5. Morfología de los trofozoitos de *A. castellanii* expuestos a las Soluciones Multipropósito. A). Control, B) H₂O₂ 3%, C). SIMPLUS, D). Opti-Free RepleniSH. En las muestras, se observan pseudoquistes (cabeza de flecha), residuos celulares (asterisco) y agregados de pseudoquistes (flecha).

Exposición de *A. castellanii* a las SMP + *A. muricata*

La actividad metabólica de *A. castellanii* expuesta 6h a las SMP adicionado del extracto acuoso de *A. muricata*, no disminuyó significativamente con respecto a las amebas tratadas solo con las SMP (Tabla 1). Sin embargo, a las 24 h de exposición existió una disminución significativa de la actividad metabólica.

	Actividad metabólica (%)				
		6h		24h	
		<i>A. muricata</i>		<i>A. muricata</i>	
Chang +10%SFB	100	87.6	100	63.0	
H ₂ O ₂ 3%	55.6	55.8	20.0	30.23	
SIMPLUS	75.0	64.0	40.72	31.41	
OPTI-FREE RepleniSH	68.0	71.9	61.45	38.58	

Tabla 1. Efecto de la combinación de SMP + *A. muricata* sobre los trofozoitos de *A. castellanii*. El extracto acuoso (100%) de *A. muricata* fue utilizado en dilución 1:1 (v/v)

CONCLUSIONES

La resistencia de los trofozoítos y pseudoquistes a las SMP indican un riesgo potencial para los usuarios de LC, los datos sugieren que *A. muricata* puede ayudar a incrementar la actividad de las SMP contra los parásitos.

REFERENCIAS

- [1] Khan, N.A. (2006). Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev*, 30(4), 564-595.
- [2] Dudley, R., Matin, A., Alsam, S., Sissons, J., Mahsood, A.H. & Khan, N.A. (2005). Acanthamoeba isolates belonging to T1, T2, T3, T4 but not T7 encyst in response to increased osmolarity and cyst do not bind to human corneal epithelial cells. *Acta Trop.*, 95(2), 100-108.
- [3] Szczotka-Flynn, L., Ahearn, D.G., Barr, J., Benjamin, W.J., Kiang, T., Nichols, J.J. et al. (2013). History, evolution, and evolving standards of contact lens care. *Contact Lens & Anterior Eye*, 36(S1), S4-S8.
- [4] Zorofchian, M. S., Fadaeinasab, M. & Abdul, K. H. (2015). *Annona muricata* (Annonaceae): A review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15625-15658
- [5] Ferreira L.E., Castro P.M.N. & Belebóni R.O. (2013) *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. *Experimental Parasitology*, 134 (3), 327–332
- [6] Kolar, S.S.N., Manarang, J.C. & Bergmanson, J.P.G. (2015). Contact lens care solution killing efficacy against *Acanthamoeba castellanii* by *in vitro* testing and live-imaging. *Contact Lens & Anterior Eye*, 38(6), 442-450
- [7] Khunkitti, W., Hann, A.C. & Russell, A.D. (1998). Biguanide-induced changes in *Acanthamoeba castellanii*: an electron microscopic study. *Journal of Applied Microbiology*, 84(1), 53-62
- [8] Codling, C.E., Maillard, J.Y. & Russell, A.D. (2003). Aspects of the antimicrobial mechanisms of action of a polyquaternium and an amidamine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(5), 1153-1158