



Actividad antiprotozoaria *in vitro* de alcaloides totales de corteza (CAT) de *Galipea longiflora* Krause Kallunki (evanta) sobre trofozoitos de 2 cepas de *Acanthamoeba*

SALAMANCA CAPUSIRI, EFRAIN¹
FLORES, NINOSKA¹
TICONA HUALLPARA, JUAN CARLOS¹
MORALES JACOB, LORENZO²
CABRERA-SERRA, MARIA GABRIELA²

PIÑERO, JOSE²
UDAETA, ENRIQUE¹
CHUQUI, ROGELIO³
GIMÉNEZ, TURBA ALBERTO¹

Resumen

Galipea longiflora (Evanta), planta empleada por la medicina tradicional amazónica, ha mostrado en estudios previos presentar actividad antiparasitaria sobre *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium*, como también actividad inmunoreguladora. El presente trabajo muestra la actividad antiparasitaria *in vitro* de los alcaloides totales de corteza de evanta frente a trofozoitos de 2 cepas de *Acanthamoeba* como son *Acanthamoeba castellani* Neff y *Acanthamoeba polyfaga* MN7 los que presentan IC₅₀ de $12.01 \pm 0.67 \mu\text{g/mL}$ y $27.34 \pm 2.65 \mu\text{g/mL}$, respectivamente a través del método Fluorométrico Alamar Blue, siendo estos resultados muy interesantes ya que por un lado se encuentran cercanos a los rangos

Abstract

Galipea longiflora (Evanta), plant used in Amazonian traditional medicine, has been shown in previous studies to present antiparasitic activity against *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium*, as well as immune regulatory activity. The present work shows the *in vitro* antiparasitic activity of the total bark alkaloids, extracted from Evanta, against trophozoites of 2 strains of *Acanthamoeba*: *Acanthamoeba castellani* Neff and *Acanthamoeba polyfaga* MN7, both present an IC₅₀ of $12.01 \pm 0.67 \mu\text{g/mL}$ and $27.34 \pm 2.65 \mu\text{g/mL}$, respectively. Using the fluorometric method, with Alamar Blue, and these results very interesting because are near ranges of inhibition showed by chlorhexidine and PHMB, topi-

1 Unidad Parasitología, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.

2 Unidad de Parasitología, Instituto de Enfermedades Tropicales y Salud Pública, Facultad de Farmacia, Universidad de la Laguna. Tenerife-España.

3 Comunidad Santa Rosa de Maravilla (CIPTA)

de inhibición de la clorhexidina y el PHMB, antisépticos tópicos con capacidad antiprotozoaria utilizadas para el tratamiento de queratitis producidas por especies de *Acanthamoeba* y por otro lado muestra IC50 muy próximos a derivados fosfolipídicos como Miltefosina, Octadecil-PC, Elaidil-PC, reportados y ensayados sobre las mismas especies de *Acanthamoebas*. Es así que el presente trabajo se constituye en el primer reporte de esta especie vegetal frente a protozoarios de la familia Amoebida el cual apoya de forma científica el uso tradicional de corteza de evanta como amebicida y muestra así una alternativa muy prometedora frente a patologías producidas por amebas de vida libre.

PALABRAS CLAVE

Acanthamoeba, Evanta, *Galipea longiflora* Alamar Blue, IC50.

cal antiseptics with antiprotozoal activity, used for treatment of keratitis produced by species of *Acanthamoeba*, and because shows IC50 very close to phospholipid derivatives such as Miltefosine, octadecyl-PC, PC-Elaidil, reported and tested on the same of *Acanthamoeba* species. Thus, the present work constitutes the first report of activity against the Amoebidae family by this plant species which scientifically supports the traditional use as Amebicide of Evanta bark constituting a promising alternative against diseases caused by free-living amoebae.

KEY WORDS

Acanthamoeba, Evanta, *Galipea longiflora*, Alamar Blue, IC50.

INTRODUCCIÓN

Se conoce a las amebas, por lo general, como organismos de forma cambiante, dentro de ellas, hay un grupo, el de las amebas de vida libre, que hasta hace unas décadas, no parecía interesar más que a los especialistas más estrictos y en la actualidad, se sabe que algunos de sus representantes, como son las especies de *Acanthamoeba*, afectan al hombre y pueden causarle graves patologías (Ortega, 2002).

Las amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* se han aislado en una amplia variedad de hábitat como ser piscinas, conductos de calefacción y de ventilación, suelos, agua mineral embotellada, aire, balnearios, vegetales, sedimentos marinos, lodos procedentes de aguas residuales. Además se han identificado en unidades de diálisis, polvo en suspensión, medios de cultivo de bacterias o células, lentes de contacto donde la mayoría de los casos reportados están asociados a una incorrecta limpieza de las lentes de contacto, empleando soluciones salinas de producción hogareña o el agua de red clorada para el enjuague de las mismas (Morales, 2006; Radford et al., 2002), sus estuches y soluciones para el cuidado de las mismas e, incluso en dispositivos intrauterinos (DIU), haciendo que su contacto con el hombre sea un hecho aparentemente común. Se ha observado que, hasta un 80% de la población, posee anticuerpos específicos frente a *Acanthamoeba*, siendo aisladas de la nariz y garganta de individuos asintomáticos. (Ortega, 2002; Lorenzo-Morales et al., 2005).

Las patologías que provoca *Acanthamoeba* están relacionadas con los tejidos que son capaces de colonizar. Pueden invadir el sistema nervioso central, provocando una meningitis denominada Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA). También pueden encontrarse formando ulceraciones en la piel o invadiendo la córnea, provocando queratitis oculares (Ortega, 2002) que si bien es una patología poco común, en los últimos años ha aumentado su frecuencia asociada, sin duda, al uso de lentes de contacto, especialmente las de tipo blando. (Navarro, 1998). En pacientes inmunodeprimidos, se han descrito casos en los que provocan infecciones diseminadas (Ortega, 2002).

Las actuales medidas terapéuticas para la queratitis producida por *Acanthamoeba* incluyen una combinación de diaminas y biguanidinas dentro de estas últimas las más activas son la clorhexidina presentando un rango de inhibición *in vitro* de 0.49-1.9µg/mL y polihexametilenbiguanidina (PHMB) de 0.49-3.9µg/mL (Elder, 1994), siendo tratamientos de larga duración (Navarro, et al 1998; Elder, et al 1994; Seal, 2003) y en muchos casos poco eficaces contra las etapas enquistadas del protozooario provocando así infecciones residuales incluso luego del tratamiento (Seal, 2003). No se ha establecido ningún tratamiento eficaz contra la EGA (McBride, et al 2007; McBride, et al 2005) por lo que nace la necesidad y la búsqueda de nuevos agentes antiparasitarios como lo muestran los derivados fosfolipídicos (Miltefosina-Hexadecil-PC, Octadecil-PC, Elaidil-PC, Erucyl-PC, Edelfosina, Perifosina, etc) usados originalmente como anticancerígenos y que recientemente resultaron ser muy activos frente a formas parasitarias de *Leishmania*, *Tripanosoma cruzi*, *Entamoeba histolytica* y especies de *Acanthamoeba*. (McBride, et al 2005; Papagiannaros, et al 2005; Cabrera-Serra, 2007).

La especie medicinal *Galipea longiflora* es utilizada por las etnias amazónicas: Tacana, Mosekene, Chimanes como antiparasitario (Bourdy, 1999), estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado esta actividad antiparasitaria frente a diferentes formas y cepas parasitarias de *Leishmania* (*L. donovani*, *L. braziliensis*, *L. chagasi*, *L. amazonensis*) (Fournet et al 1993; Caron et al 1993; Fournet et al 1994-1996) como también se ha demostrado su actividad frente a *Tripanosoma cruzi* (Nakayama, 2001), como su actividad frente a *Plasmodium vinckei* (Gantier, 1996). Mediante estudios en modelo animal se determinó la toxicidad aguda y subcrónica como los parámetros farmacocinéticos para el extracto crudo de esta especie vegetal (Giménez, 2005), y se estableció un sistema de cultivo celular semicontinuo *in vitro* para células de evanta (Paz, 2007). Recientes estudios muestran el efecto del extracto de alcaloides de evanta sobre la producción de TNF y IFN-γ (Calla-Carrasco, 2007). Dada la importancia de esta especie vegetal el I.I.F.B viene desarrollando formulaciones farmacéuticas tópicas (pomada) y sistémicas (jarabe) en base a los alcaloides totales de corteza de evanta para el tratamiento de pacientes con leishmaniasis cutánea. Basados en el conocimiento de la medicina tradicional y al amplio estudio científico en base a esta especie vegetal es que el presente trabajo pretende demostrar de forma científica el uso tradicional de esta especie vegetal como amebicida y así ampliar la actividad antiparasitaria de evanta, demostrando la actividad *in vitro* de CAT frente a 2 cepas de *Acanthamoeba* (castellani – polyfaga), responsables de una serie de patologías en el hombre.

METODOLOGÍA

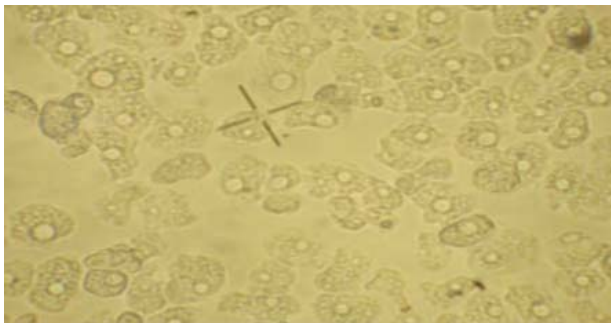
Cultivos de *Acanthamoeba*

Dos cepas fueron utilizadas para este estudio, *Acanthamoeba castellani* Neff (ATCC30010) cepa tipificada por American Type Culture Collection y un aislado clínico (MN-7) que fue identificado previamente como *Acanthamoeba polyphaga*.

Las cepas se mantuvieron en crecimiento en medio PYG (0.75 % peptone proteosa (p/v), 0.75 % extracto de lavadura (p/v)) al cual se añadió 1.5% de glucosa (p/v), con 50µg gentamicina (Roche Diagnostics) previamente descrito por Morales (2006).

Foto 1

Acanthamoeba castellani Neff –Cultivo In vitro Medio PYG



Obtención de alcaloides totales de corteza de *Galipea longiflora* Krause Kallunki (Evanta)

El material vegetal (corteza de evanta) seco finamente molido fue macerado por 3 días en CH_2Cl_2 (10L x 3 veces), en percoladores cónicos de acero inoxidable (diámetro inferior 22cm y diámetro superior 42 x 74cm de alto). El extracto fue filtrado y concentrado a 40°C y secado con una bomba de alto vacío hasta peso constante.

El extracto crudo (50g) fue disuelto en CH_2Cl_2 (100mL) y sometido a lavados sucesivos con HCl 1N (100mL x 3 veces c/u por 30 minutos sobre agitador magnético). Los lavados ácidos fueron controlados con un espectrofotómetro UV, combinados y llevados a precipitación completa con NaOH 2N (150mL). El sólido formado fue extraído con CH_2Cl_2 deshidratado con NaSO_4 , filtrada, evaporada al vacío y secada con una bomba de alto vacío hasta tener un peso constante.

Ensayo de actividad de CAT frente a trofozoitos de 2 cepas de *Acanthamoeba castellani*

Se tomaron alícuotas de las cajas de cultivos madre de ambas cepas de *Acanthamoeba* a quienes se determinó su población mediante un contador automático.

Ambas cepas de *Acanthamoeba* fueron sembradas por duplicado en placas de 96 pozos, sembrando 50 μ L de una solución de 8×10^3 células/mL, por lo que se tuvo 400 amebas en cada pozo. Se dejó aproximadamente 15 minutos en reposo la placa para que las amebas puedan adherirse al posillo, esto fue comprobado bajo la observación en un microscopio invertido. (Axiovert 25- Zeiss)

Luego se añadió 50 μ L de diferentes concentraciones CAT (100 μ g/mL, 50 μ g/mL, 25 μ g/mL, 12,5 μ g/mL, 6,25 μ g/mL) disueltas en medio PYG obtenidas a partir de una solución madre (2mg de CAT/200 μ L de DMSO), donde la concentración final de DMSO fue $\leq$ al 1%. Finalmente se añadió el reactivo de ensayo Fluorométrico Alamar Blue (Biosource, Europe, Nivelles, Belgium) a cada uno de los pozos de placa en una cantidad igual al 10% del volumen final, la placa fue incubada por 120 horas a 28°C con agitación leve. Se realizó la lectura de las placas en un lector de microplacas modelo 680 (Biorad, Hercules, CA) usando un filtro de excitación de 570nm y un filtro de emisión de 630nm.

El porcentaje de inhibición y el 50% de la concentración inhibitoria (IC50) fue calculado por análisis de regresión lineal usando el programa informático sigma Plot 0.9. (Statist Software Inc).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

La queratitis producida por especies de *Acanthamoeba* es una afección poco frecuente pero potencialmente grave, las actuales medidas terapéuticas para la queratitis consiste el uso tópico de un conjunto de antimicrobianos, sin embargo muchas veces estos tratamientos no son eficaces contra etapas enquistadas del protozooario y peor aun no existe un tratamiento eficaz frente a la EGA, ante la necesidad de nuevos agentes antiparasitarios en los últimos años se viene realizando estudios de actividad antiparasitaria de derivados fosfolipídicos (Miltefosina-Hexadecil-PC, Octadecil-PC, Elaidil-PC, Erucyl-PC, Edelfosina etc) que fueron inicialmente diseñados como anticancerígenos que a su vez mostraron una excelente actividad antiparasitaria frente a formas parasitarias de *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, *Entamoeba histolytica* y especies de *Acanthamoeba*. Es así que los resultados mostrados por CAT son relevantemente buenos en relación a los rangos de inhibición de la polihexametilenbiguanida-PHMB (0.49-3.9 μ g/mL) y la clorhexidina (0.49-1.9 μ g/mL) antisépticos tópicos más eficaces utilizados en queratitis por *Acanthamoeba* reportados por Elder et.al. (1994), mostrando también una estrecha relación a los IC50 de Miltefosina reportados en estudios previos por McBride et.al. (2007-2005) como el más prometedor derivado fosfolipídico para el tratamiento de *Acanthamoebiasis* ensayado sobre las mismas especies de *Acanthamoebas*, mostrando IC50 de 2.38 y 9.52 μ g/mL frente a *A.Castellani* y *A polyfaga* respectivamente, coincidiendo estos resultados a la sensibilidad que presenta *A castellani* a CAT en relación a *A.polyfaga*.

Figura 1

Actividad antiparasitaria in vitro de CAT frente a trofozoitos de 2 cepas de *Acanthamoeba* (Neff-MN7)
Método colorimétrico Alamar Blue

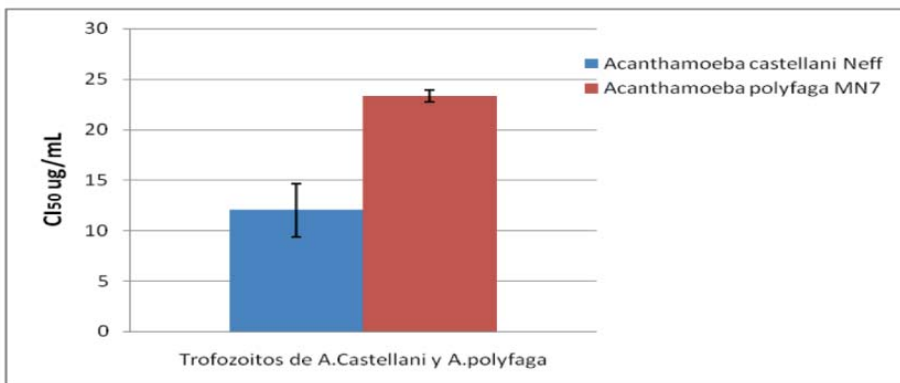


Tabla 1

IC50 de CAT in vitro sobre trofozoitos de 2 cepas de *Acanthamoeba*
Método colorimétrico Alamar Blue incubados a 28°C por 120 horas

Cepa	<i>Acanthamoeba</i> <i>castellani</i> Neff	<i>Acanthamoeba</i> <i>polyfaga</i> MN7
IC50 µg/mL	12.01±2,6	27.34±0,6

Es conocido el uso tradicional de esta especie vegetal por las etnias Tacanas, Mosetenes y Chimanes de Bolivia, quienes recomiendan usar pedazos de corteza molida de evanta sancochada en tres litro de agua en casos de diarrea con sangre (Bourdy et al 1999), es así y debido a que *Acanthamoeba* pertenece al mismo orden Amoebeida en el cual se encuentra *Entamoeba histolytica* que es la responsable de una serie de diarreas en nuestro país (Mollinedo, 2006), que el presente trabajo muestra de una forma científica la validación del uso tradicional de esta planta (*Evanta*) como amebicida.

CONCLUSIONES

El presente trabajo muestra de una forma científica el uso tradicional de corteza de evanta como amebicida debido a los resultados de IC50 encontrados de CAT frente a trofozoitos de 2 cepas de *Acanthamoeba* como son *Acanthamoeba castellani* Neff y *Acanthamoeba polyfaga* MN7 los que presentan IC50 de 12.01±0,67µg/mL y 27.34±2,65µg/mL, respectivamente mediante el método colorimétrico Alamar Blue, resultados realmente muy interesantes en relación con los rangos de inhibición de los antisépticos tópicos utilizados en queratitis por *Acanthamoeba*.

Si bien es cierto que los derivados fosfolipídicos responden muy bien frente a protozoarios de la familia tripanosomatidae, edelfosina no presenta actividad frente a *Acanthamoeba* lo que pudiera indicar que *Acanthamoeba*

sería susceptible a un rango más limitado de derivados fosfolipídicos, es así que CAT puede llegar a resultar una alternativa prometedora frente a patologías producidas por amebas de vida libre, sin embargo un estudio más detallado quizá por separado de los alcaloides de evanta frente a las diferentes formas del parásito (trofozoitos- quistes) creemos que es importante.

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto UMSA-IDH-2012 “Desparasitación de niños en escuelas rurales II”. A la agencia AECl, por los proyectos PCI con la Universidad de La Laguna, al IRD Francia por beca de Maestría (SCE), a la Fundación AvH/Stiftung y la OEA, por la donación de equipos. Al CIPTA y la comunidad de Santa Rosa de Maravilla, por la colecta de la especie medicinal.

REFERENCIAS

- Bourdy, G., Giménez, A., Quenevo, C. (1999). “Tacana: Ecuánasha aquí, ecuanasha id’rene cuana, me schanapaque” (Tacana: Conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas). UMSA: IIFB-IIQ-IBBA; FONAMA-EIA; IRD. Plural. La Paz, Bolivia, 411-416.
- Cabrera-Serra, G., Lorenzo-Morales, J., Romero, M., Valladares, B., Piñero, J. (2007). *In vitro* activity of perifosine: A novel alkylphospholipid against the promastigotes stage of Leishmania species. *Parasitol Res*, 100, 1155-1157.
- Caron, S., Desfossés, S., Dionea, R., Théberge, N., Burnell, R. (1993). Synthesis of some minor quinoline alkaloids found in *Galipea longiflora*. *Journal of Natural Products*, 56, 138-139.
- Calla-Carrasco, J., Troye-Blomberg, M., Fernandez, C. (2007) Extracto de alcaloides de *Galipea longiflora* (Evanta) afecta la proliferación celular y la producción de citoquinas pro-inflamatorias: Factor de necrosis tumoral e interferon- γ *in vitro*. *Revista-Biofarbo*, 14, 57-66.
- Elder, J., Kilvington, S., Dart, G. A. (1994) Clinicopathological study of *in vitro* sensitivity testing and Acanthamoeba keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35, 1059-1064.
- Fournet, A., Hocquemiller, R., Roblot, F., Cavé, A., Richomme, P., Bruneton, J. (1993) Les chimanines, nouvelles quinolines substituees en 2, isolees de une plante Bolivienne antiparasitaire: *Galipea longiflora*. *Journal of Natural Products*, 56, 1547-1552.
- Fournet, A., Barrios, A., Muñoz, V., Hocquemiller, R., Cavé, A., Bruneton, J. (1993). 2-Substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37, 859-863.
- Fournet, A., Gantier, J.C., Gautheret, A., Leysalles, L., Munos, H., Mayrargue, J. (1994). The activity of 2-substituted quinoline alkaloids in Balb/c mice infected with Leishmania donovani. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 33, 537-544.
- Fournet, A., Ferreira, E., Rojas, A., Torres, S., Fuentes, S., Nakayama, H., Schinini, A., Hocquemiller, R. (1996). In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania amazonensis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 2447-2451.
- Fournet, A., Barrios, A., Muñoz, V., Hocquemiller, R., Roblot, F., Cavé, A., Richomme, P. (1994). Antiprotozoal activity of quinoline alkaloids isolated from *Galipea longiflora*, a Bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. *Phytotherapy Research*, 8, 174-178.
- Gantier, J., Fournet, A., Muñoz, M., Hocquemiller, R. (2006). The effect of some 2-substituted quinolines isolated from *Galipea longiflora* on Plasmodium vinckei petteri infected mice. *Planta médica*, 62, 285-286.
- Giménez, A., Avila, J., Ruiz, G., Paz, M., Udaeta, E., Ticona, J., Salamanca E. (2005). Estudios químicos, biológicos y farmacológicos de *Galipea longiflora*, Krause. *Revista Boliviana de Química*, 22, 94-107.
- Lorenzo-Morales, J., Monteverde-Miranda, C., Jiménez, C., Tejedor, M., Valladares, B., Ortega-Rivas, A. (2005). Evaluation of Acanthamoeba Isolates from Environmental Sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Ann Agric Environ Med*, 12, 233-236.
- McBride, J., Mullen, A., Carter, Ch., Roberts, W. (2007). Differential cytotoxicity of pathogenic Acanthamoeba species and mammalian cells. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 521-525.
- McBride, J., Ingram, P., Henriquez, F., Roberts, W. (2005). Development of colorimetric microtiter plate assay for assessment of antimicrobials against Acanthamoeba. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2), 629-634.

- Mollinedo, S., Prieto, C. (2006). El entero-parasitismo en Bolivia (1975-2004). Ministerio de Salud y Deportes de Bolivia, 29-34.
- Morales, J. (2006). Estudios Epidemiológicos y Moleculares del Género Acanthamoeba en Regiones Tropicales y Subtropicales, Tesis Doctoral, Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, España. 19-20.
- Nakayama, H., Ferreira, M., Rojas de Arias, A., Bilbao, S., Schinini, Alicia., Fournet, A. (2001). Experimental Treatment of chronic *Tripanosoma cruzi* infection in mice with 2-N-Propylquinoline. *Phytotherapy Research*, 15, 630-632.
- Navarro, J., Zarco, D., Lorduy, L., Alemán, R. (1998) Queratitis por Acanthamoeba: A propósito de un caso bilateral. *Farm Hosp*, 22 (5), 253-255.
- Ortega, A. (2002). Aplicación de la técnica de Rapd para la caracterización de especies de género Acanthamoeba, Tesis Doctoral Universidad de la Laguna, España. 1-6.
- Papagiannaros, A., Bories, C., Demetzos, C., Loiseau, P. (2005) Antileishmanial and Trypanocidal activities of new miltefosine liposomal formulations. *Biomedicine y Pharmacotherapy*, 59, 545-550.
- Paz, M., Vázquez, F., Chuqui, R., Paredes, C., Sauvain, M., Gimenez, A. (2007) Establecimientos de cultivos *in vitro* de *Gali-pea longiflora* una Rutacea de la Amazonia Boliviana. *Acta Farm. Bonaerense*, 26, 15-19.
- Radford, C., Minassian, D., Dart, J. (2002) Acanthamoeba keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. *Br J Ophthalmol*, 86, 536-542.
- Seal, V. (2003) Acanthamoeba keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye*, 17, 893-905.