

## Camperol induce un efecto prooxidante y cambios ultraestructurales como mecanismo amebicida

## Kaempferol induces prooxidant effect and ultrastructural changes as amoebicidal mechanism

Rosa Adriana Jarillo-Luna<sup>1</sup>, Juan Manuel Gutiérrez-Meza<sup>1</sup>, Elizabeth Barbosa-Cabrera<sup>1</sup>, Gabriela Rebeca Luna-Palencia<sup>2</sup>, Martha Cecilia Rosales-Hernández<sup>3</sup>, Mario Nequiz<sup>4</sup>, Judith Pacheco-Yepez<sup>1,\*</sup>

1. Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México. México, 11340.
2. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México. México, 07360.
3. Laboratorio de Biofísica y Biocatálisis, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México. México, 11340
4. Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México. México, 04510.

\***Autor de correspondencia:** Judith Pacheco-Yépez

Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional Plan de San Luis y Salvador Díaz Mirón s/n, Col. Santo Tomas, Ciudad de México. México 11340.

Telefono: 52 55 35183193 e-mail: [jpachecoy@ipn.mx](mailto:jpachecoy@ipn.mx)

DOI <http://dx.doi.org/10.28960/revmeduas.2007-8013.v12.n3.005>

Recibido 09 de mayo 2022, aceptado 16 de junio 2022

### RESUMEN

**Objetivo:** Realizar un análisis comparativo *in vitro* de la actividad anti-amibiana del flavonoide Camperol comparado con la droga de referencia, el Metronidazol y determinar si el mecanismo de daño es oxidativo. **Metodología:** Se aplicaron diferentes concentraciones de Camperol y Metronidazol a trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, analizando mediante microscopía electrónica el daño estructural ocasionado, por métodos colorimétricos el efecto anti-amibiano en y sin condiciones de oxigenación, daño al DNA por método fluorométrico, la citotoxicidad de los fármacos en células HeLa por métodos colorimétrico y la producción de anión superóxido mediante resonancia paramagnética electrónica. **Resultados:** El grado de destrucción amibiana depende del tiempo y concentración del flavonoide. Camperol mostro una actividad anti-amibiana contra *Entamoeba histolytica* similar a la del Metronidazol; indujo cambios ultraestructurales en el citoplasma de los trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, y alteración de la membrana celular, indujo daño al DNA, mostro un efecto prooxidante y mantuvo su actividad anti-amibiana en un medio altamente oxigenado. Finalmente, el Camperol no mostro toxicidad contra células HeLa. **Conclusiones:** Los efectos anti-amibianos se deben a las características prooxidantes del Camperol, efecto que supera los mecanismos anti-oxidantes de la amiba, sugiriendo que *in vivo* sería un mejor amebicida que el Metronidazol.

**Palabras clave:** *Entamoeba histolytica*, Camperol, anti-amibiana prooxidante, cambios ultraestructurales.

### Abstract

**Objective:** Perform a comparative *in vitro* analysis of the anti-amoebic activity of the flavonoid Camperol compared to the reference drug, Metronidazole and determine if the damage mechanism is oxidative. **Methodology:** Different concentrations of Camperol and Metronidazole were applied to *Entamoeba histolytica* trophozoites, analyzing by electron microscopy the structural damage caused, by colorimetric methods the anti-amoebic effect with and without oxygenation conditions, the DNA damage by fluorometric method, the cytotoxicity of Camperol in HeLa cells by colorimetric method and the production of superoxide anion by electron paramagnetic resonance. **Results:** The degree of amoebic destruction depends on the time and concentration of the flavonoid. Camperol showed anti-amoebic activity against *Entamoeba histolytica* similar to Metronidazole; induced ultrastructural changes in the cytoplasm of *Entamoeba histolytica* trophozoites, and alteration of the cell membrane, induced DNA damage, showed a prooxidant effect and maintained its anti-amoebic activity in a highly oxygenated medium. Finally, Camperol did not show toxicity against HeLa cells. **Conclusions:** The anti-amoebic effects are due to the pro-oxidant characteristics of Camperol, an effect that exceeds the anti-oxidant mechanisms of the amoeba, suggesting that *in vivo* it would be a better amebicide than Metronidazole.

**Keywords:** *Entamoeba histolytica*, kaempferol, prooxidant anti-amoebic, ultrastructural changes,

### INTRODUCCIÓN

*Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) es el agente etiológico de la amibiasis, una enfermedad en humanos caracterizada por trastornos como disentería y absceso hepático amibiano<sup>1</sup>. El tratamiento eficaz contra *E. histolytica* es el

Metronidazol. Sin embargo, el tratamiento durante largos periodos es acompañado por efectos indeseables como náusea, vómito y diarrea<sup>1, 2, 3</sup>. Además, se ha mostrado que esta droga presenta actividad mutagénica<sup>4, 5</sup> y efec-

tos cancerígenos en roedores<sup>6</sup>, así como efectos tóxicos cuando es utilizada a dosis elevadas<sup>7, 8</sup>. Estudios in vitro han reportado que algunas cepas de amiba son resistentes a este tratamiento<sup>9, 10</sup>. Debido a ello, existe la necesidad de investigar nuevos tratamientos que sean efectivos en la eliminación de la amiba.

Los flavonoides son un grupo de compuestos que presentan varias propiedades farmacológicas<sup>11</sup>, incluidas actividades antibacterianas, antifúngicas y antivirales<sup>12</sup>. Los flavonoides presentan efectos anti oxidante y anti inflamatorio<sup>11, 13</sup>. Aunque el papel antioxidante de los flavonoides ha sido ampliamente documentado, existen muchos estudios que reportan su actividad prooxidante, la cual parece depender de su concentración y es directamente proporcional al número total de grupos OH en la molécula, especialmente aquellas localizadas en el anillo B<sup>14</sup>.

Por otra parte, se ha reportado que extractos, fracciones y flavonoides purificados de plantas presentan un efecto in vitro contra *E. histolytica*. La actividad anti-amibiana de los flavonoides se ha medido como porcentaje de inhibición de crecimiento utilizando un método de subcultivo<sup>15-22</sup>. Trabajos recientes han demostrado que el Camperol daña a los trofozoítos de *E. histolytica*, afecta principalmente a las proteínas del citoesqueleto lo que ocasiona alteración de los mecanismos de virulencia<sup>23</sup>. No obstante el conocimiento adquirido, sus blancos y mecanis-

mos de acción no son completamente conocidos. El objetivo del presente estudio fue realizar un análisis comparativo de la actividad anti-amibiana del Camperol a diferentes tiempos de interacción, analizar el efecto prooxidante del flavonoide y determinar los cambios ultraestructurales inducidos por el Camperol, comparando estos cambios con el fármaco de referencia, el Metronidazol.

## Material and Métodos

### Cultivo amibiano

Trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM-1: IMSS fueron cultivados axénicamente en medio de cultivo Diamond (TYI-S-33) a 37°C complementado con suero bovino al 20% (GIBCO BRL, USA)<sup>24</sup>. Los trofozoítos fueron colectados a las 48 h.

### Fármacos

Se utilizó el flavonoide Camperol (Sigma Aldrich Chemical Company, St. Louis, Mo. USA) y se diluyo en dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma)/ amortiguador de fosfatos (PBS) para preparar las diferentes soluciones de trabajo (0.7, 1.4 and 2.1 mM). El Metronidazol fue utilizado a las mismas concentraciones (Flagyl, Sanofi-Aventis, México). La concentración final de DMSO en el medio de cultivo nunca supero 0.01% (v/v). Las muestras incubadas con 0.01 (v/v) de DMSO se usaron como control.

### **Efecto anti-amibiano**

Se utilizaron dos métodos para cuantificar la viabilidad amibiana: tinciones con cristal violeta y azul tripano. En ambos métodos,  $1 \times 10^5 / 0.1$  ml de trofozoítos se incubaron independientemente con 0.7, 1.4 y 2.1 mM de cada fármaco durante 2, 3 y 4 h a 37°C. El ensayo de cristal violeta se realizó en placas de 96 pozos (Costar, New York, NY, USA). Luego de la interacción con los fármacos, las placas se lavaron con PBS y las amibas adheridas se fijaron colocado en cada pozo 100  $\mu$ l de metanol al 99% durante 2 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente los trofozoítos se tiñeron con 100  $\mu$ L de solución de cristal violeta al 1% (Difco, Kansas City, KS, USA) por 10 min a TA, se descartó el colorante y se lavó. El colorante unido a las amibas en cada pozo se solubilizó con 100  $\mu$ L de SDS 1% en etanol al 50%. La densidad óptica se determinó a 570/620 nm en lector de microplaca (Bio-Rad, Laboratories, CA, USA) y el porcentaje de trofozoítos viables se calculó por extrapolación a partir de la curva estándar.

Para el ensayo con azul tripano, los trofozoítos se colocaron en microtubos e interaccionaron con cada fármaco a las condiciones antes mencionadas. Luego, se mezclaron 10  $\mu$ l de la suspensión de parásitos con el mismo volumen de azul tripano (0.5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, USA), la mezcla se incubó durante 2 min a TA. Las amibas teñidas (no viables) y no teñidas (viables) se contaron en hemocitómetro obteniendo

los respectivos porcentajes de células. Se examinaron cien trofozoítos en cada momento. Como grupo control se consideró a amibas sin ningún tratamiento.

### **Ensayo de citotoxicidad *in vivo***

Se sembraron células HeLa at  $1 \times 10^3 / 0.1$  ml en medio Dulbecco modificado (DMEM) (Gibco) suplementado con suero fetal bovino descomplementado en placas de cultivo 96 pozos en una atmósfera humificada de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, durante 24 h. Las células se interaccionaron durante 2, 3 y 4 h con Camperol o Metronidazol en las concentraciones mencionadas previamente. Posteriormente, se agregó solución de azul tripano al 0.4% (Sigma) 1:1 (v/v) y se determinó el porcentaje de viabilidad utilizando el contador de células automatizado TC10 (Bio-Rad), mediante la siguiente formula: % células viables = (célula viva/células totales) x 100.

### **Cambios ultraestructurales**

Para determinar los cambios ultraestructurales inducidos por los fármacos, se incubaron  $1 \times 10^6$  amibas en presencia de Camperol y Metronidazol a las concentraciones antes mencionadas durante 2, 3 y 4 h a 37°C. Las amibas se fijaron con glutaraldehído al 2% (Electron Microscopy Sciences (EMS), Hatfield, PA, USA) diluido en solución de cacodilato sodio 100 mM (EMS) durante 60 min, posteriormente se fijaron con tetróxido de osmio al 2% (EMS) en el mismo amortiguador durante 60 min. Se eliminó

el tetróxido de osmio y las muestras se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol antes de tratarlas con óxido de propileno (EMS). Los parásitos se incluyeron en resina epoxi (EMS) y se polimerizaron a 60°C por 24 h. Cortes ultrafinos fueron teñidos con acetato de uranilo (EMS) seguido de citrato de plomo (EMS)<sup>25</sup>. Las muestras se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Philips EM 208 S (Royal Philips Electronics, Amsterdam, Netherlands).

### Cuantificación del daño al DNA

El porcentaje de daño al DNA se determinó con una versión modificada de un método previamente reportado<sup>26</sup>. Brevemente, se sembraron  $2 \times 10^5$  trofozoítos en placas de cultivo de 96 pozos e incubaron en presencia de cada fármaco a las concentraciones mencionadas durante 2, 3 y 4 h at 37°C. Al cabo del tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo de los pozos y las placas se congelaron a -80°C y se descongelaron a 37°C. El reactivo SYBR Green I (Sigma) se diluyó 1:5000 en amortiguador de lisis (0.08%(v/v) con Triton X-100 (Sigma), 200 mM TRIS (Sigma), 5 mM EDTA (Sigma), pH 8.0 y 100 µl de esta solución se agregó a cada pozo. Las placas se incubaron en la oscuridad durante 30 min a TA con agitación suave constante. La fluorescencia se midió en un espectrofotómetro de microplacas Eon (Winooski, United State) a una longitud de ondas de excitación

de 485 y de emisión 535 nm. El porcentaje medio de daño al DNA de los trofozoítos se calculó como  $[1 - (\text{fluorescencia media de los pozos con trofozoítos y fármaco} / \text{fluorescencia media de pozos con trofozoítos y sin fármaco})] \times 100$  y se graficó en función del tiempo de incubación.

### Cuantificación de anión superóxido

Para explorar si el Camperol presentaba un efecto prooxidante sobre *E. histolytica*, se cuantifico la producción anión superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) mediante resonancia paramagnética electrónica (EPR). Se colocaron  $2.5 \times 10^5$  amibas en 0.5 ml de medio TYI-S-33 en microtubos de 1ml y se interaccionaron con las concentraciones mencionadas de cada fármaco durante 2, 3 y 4 h a 37°C. Al final del tiempo de interacción, las amibas se trataron con el recolector de radicales CM-H (1 hidroxil-3-metoxicarbonil-2,2, 5,5-tetrametilpirrolidina), amortiguador Krebs (99 mM NaCl, 4.69 mM KCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2 \times 2(\text{H}_2\text{O})$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 2.5 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1.03 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , D Glucosa 5.6 mM, Na-HEPES 20mM), trihidrato de dietilditiocarbamato de sodio (DETEC; 5µM, Sigma) y sal de metasulfonato de deferoxamina (DF 25µM, Sigma) se disolvió en la mezcla de reacción que contenía CMH (10 mM), 89:3:8 % v/v de amortiguador Krebs :DETEC:DF. Después, a cada muestra se le añadió el CM-H para llegar a una concentración 0.5 mM. El CM-H y las muestras fueron procesadas dentro una cámara sellada con atmosfera de nitrógeno. Las muestras con CM-H

se incubaron a 37 °C durante 30 min en agitación constante. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se colocó en capilares de 50 µL (Corning) dentro de la cámara nitrógeno y cada uno de los capilares fue sellado por ambos lados para posteriormente obtener las mediciones por EPR. El control positivo fue trofozoítos incubados con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 1 mM. Las mediciones de la producción de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> se realizaron en un espectrómetro Bruker e-scan con los siguientes parámetros registrados: campo magnético 3490 G, ventana: 60 G, amplitud: 1.5 G, ganancia: 56.4, poder: 0.0155mW; frecuencia: 9.743 GHz y se utilizó el software adquisición WinEPR.

### **Actividad anti-amibiana bajo condiciones oxigenadas**

Para explorar si el efecto anti-amibiano del Camperol se conservaba en condiciones de oxigenación, se empleó un método previamente reportado<sup>27</sup>. Brevemente, 1.0 x 10<sup>6</sup> trofozoítos fueron sembrados en placas de 96 pozos (Corning) y se incubaron con cada uno de los fármacos a las concentraciones previamente mencionadas durante 2, 3 y 4 h a 37°C en una incubadora modular (Billups-Rothenberg, CA, USA) purgada con 100% O<sub>2</sub> durante 10 min. Después del tiempo de interacción, se determinó la viabilidad de los parásitos por refringencia positiva en presencia de azul tripano. Las amibas sin fármaco se consideraron como control.

### **Análisis estadístico**

Los datos se expresan como la media ± SD de 3 ensayos independientes. La comparación entre 2 grupos fue analizada usando la prueba t de Student para datos no pareados. Para comparación entre más de dos grupos, se empleó ANOVA una vía. Si se identificaba un efecto principal o una asociación significativa ( $P \leq 0.05$ ), las medias de los grupos se compararon mediante la prueba de Bonferroni. Todos los análisis fueron realizados con Graph Pad Prism software (versión 6).

### **Resultados**

#### **El efecto anti-amibiano del Camperol es comparable con diferentes métodos experimentales**

El Camperol mostro la máxima actividad anti-amibiana a la concentración 2.1 mM y 4 h de incubación. Como se muestra en el Cuadro 1, Camperol y Metronidazol mostraron actividad anti-amibiana similar sin diferencias significativas entre ellos tanto por el método de azul tripano (60.0 ± 4.08; 56.0 ± 4.09) como de cristal violeta (19.67 ± 2.49; 20.33 ± 3.68).

#### **Camperol no es tóxico para las células HeLa**

La toxicidad del fármaco fue evaluada en células HeLa interaccionadas con Camperol y cuantificadas mediante el método de azul tripano. Como se muestra en el Cuadro 2, la viabilidad

de las células HeLa no se modificó en comparación con los controles ( $P \geq 0.05$ ). Estos datos mostraron que el Camperol no es tóxico para la línea celular HeLa.

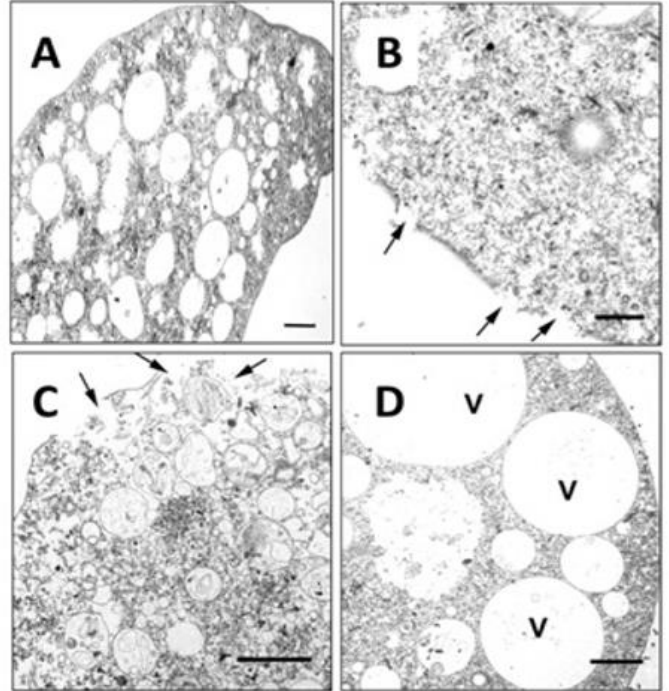
### Camperol induce cambios ultraestructurales en *E. histolytica*

Los trofozoítos sin tratamiento mostraron una morfología y distribución de vacuolas normales, así como integridad en su membrana (Figura 1 fotografía A). Camperol a 1.4 mM y 4 h de interacción indujo pérdida de continuidad en algunas áreas de la membrana citoplasmática de la ameba (Figura. 1 fotografía B). El Camperol a 2.1 mM y 4 h de interacción indujo la presencia de vacuolas en el citoplasma y la ruptura completa de la membrana así como salida del contenido citoplasmático (Figura. 1 fotografía C). El Metronidazol provocó incremento en el tamaño de las estructuras vesiculares y grandes espacios vacíos en el citoplasma (Figura. 1 fotografía D) seguido de lisis celular.

### Camperol indujo daño en el DNA similar al del Metronidazol

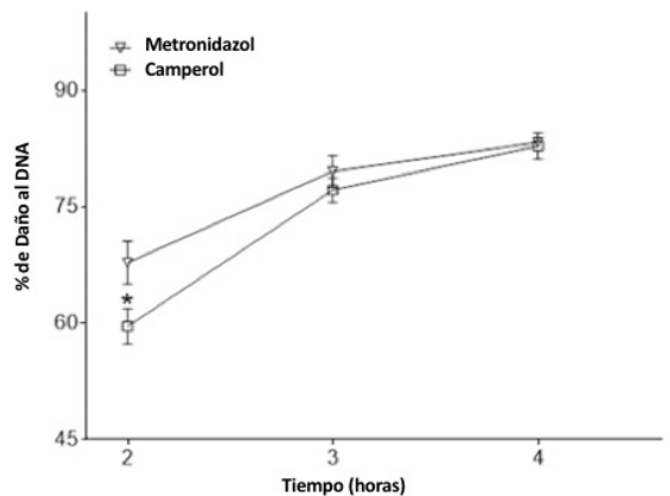
En comparación con el Metronidazol, el Camperol indujo un porcentaje de daño al DNA similar al ocasionado por el Metronidazol (82.8 %) ( $P \geq 0.05$ ) (Figura 2).

**Figura 1. Cambios ultraestructurales en *E. histolytica* causados por Camperol**



**Cambios ultraestructurales causados por Camperol.** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de trofozoítos *E. histolytica*. (A) Trofozoítos sin tratamiento. (B) Trofozoítos tratados con 1.4 mM of Camperol provocaron una falta de continuidad en la membrana del parásito (flechas). (C) Trofozoítos tratados con 2.1 mM de Camperol muestran discontinuidad de su membrana citoplásmica (flechas). (D) El Metronidazol a 1.4 mM ocasiono grandes vacuolas (V) y espacios vacíos en el citoplasma de la ameba.

**Figura 2. Porcentaje de daño al DNA**

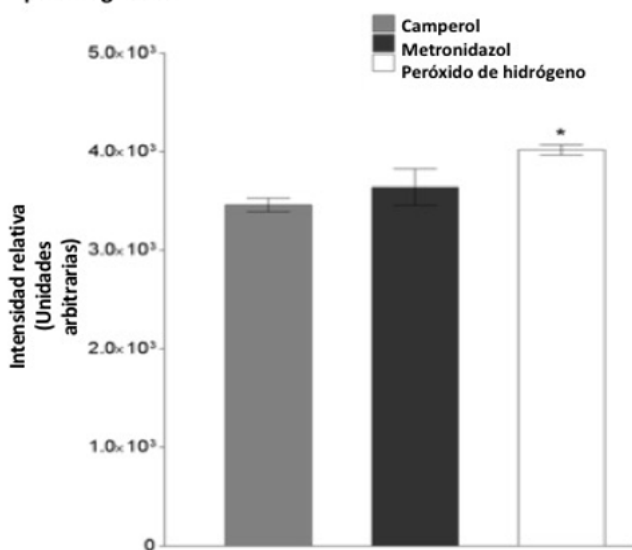


**Porcentaje de daño al DNA.** El máximo daño al DNA inducido por Camperol a 3 h (77.14%) y 4 h (84.82) de incubación indujo un porcentaje de daño similar en el DNA causado por el Metronidazol (79.54%; 83.3%) ( $*p < 0.05$ ). Eje Y % de Daño al DNA. Eje X Tiempo (horas).

### Camperol indujo una producción de $\bullet\text{O}_2^-$ similar al Metronidazol

No se observaron diferencias significativas entre los trofozoítos tratados con Camperol o Metronidazol, estos fármacos mostraron una elevada concentración de  $\bullet\text{O}_2^-$  ( $3459.9 \pm 69.1$  and  $3699.0 \pm 183.6$  respectivamente) ( $P \geq 0.05$ ). Como se muestra en la Figura 3, el control positivo (tratado con  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) mostró la más alta concentración de  $\bullet\text{O}_2^-$  ( $4015.52.4 \pm 52.4$ ) ( $P \leq 0.05$ ).

Figura 3. Cuantificación de anión superóxido por resonancia paramagnética



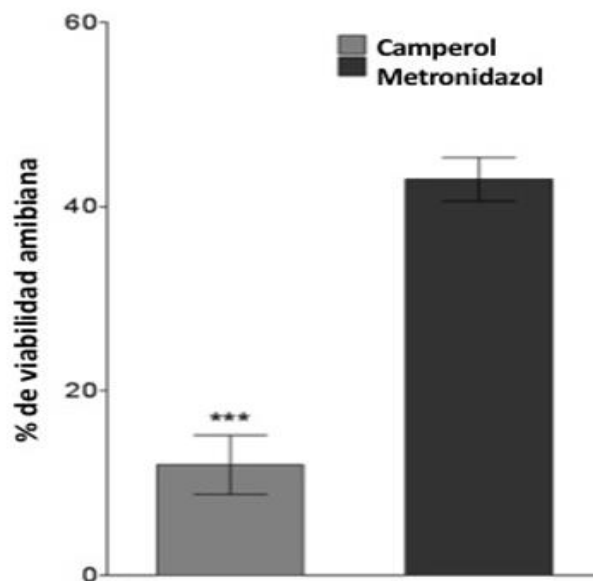
Cuantificación de anión superóxido por resonancia paramagnética electrónica. Cantidades similares de ión superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) se indujeron por Camperol y Metronidazol sin diferencias significativas entre los dos tratamientos ( $3459.9$  vs  $3699.1$ ) ( $* p \leq 0.05$ ). Eje Y Cantidad de anión superóxido (unidades arbitrarias). Eje X Camperol, Metronidazol y  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### Camperol mantiene su actividad anti-amibiana en condiciones oxigenadas

En condiciones oxigenadas, el efecto anti-amibiano del Metronidazol no mostró diferencias significativas entre los grupos ( $43.3\% \pm 6.1$ ) ( $P \geq 0.5$ ). Sin embargo, la actividad anti-amibiana

del Camperol se incrementó significativamente en presencia de oxígeno ( $12.0\% \pm 2.4$ ) ( $P \leq 0.5$ ) (Figura 4).

Figura 4. Actividad anti-amibiana del Camperol y Metronidazol en condiciones de hiperoxigenación



Actividad anti-amibiana de Camperol y Metronidazol en condiciones de hiperoxigenación. El Camperol indujo actividad anti-amibiana en condiciones de hiperoxigenación con 12% de células viables y el Metronidazol mostró menor actividad anti-amibiana con 43% de viabilidad. ( $* p \leq 0.05$ ). Eje Y % de viabilidad amibiana. Eje X Camperol y Metronidazol.

### Discusión

Nuestros resultados muestran que el Camperol, presenta una actividad anti-amibiana a concentración de 2.1 mM, y este efecto fue similar al observado para Metronidazol. Nuestros resultados difieren de reportes previos donde se menciona que el Camperol purificado de plantas fue menos activo que el Metronidazol<sup>16</sup>.

El efecto anti-amibiano del Camperol fue evaluado mediante diferentes ensayos de viabilidad celular y mostro el mismo efecto citotóxico. Para

excluir que la concentración de Camperol y Metronidazol utilizada pudiera dañar a células humanas se probaron las mismas concentraciones en células HeLa, y no se observó daño.

El análisis ultraestructural mostro cambios en *E. histolytica* después de 4 h de incubación con el flavonoide, hubo daño en la membrana citoplasmática, núcleo y DNA. El Camperol indujo ruptura de la membrana plasmática y finalmente lisis de la amiba, hasta donde sabemos, no existen reportes previos que muestren daño a la membrana citoplasmática y lisis inducida por el Camperol.

Basados en reportes previos de inhibición de la síntesis y degradación de DNA inducida por Metronidazol<sup>28,29</sup>, nosotros determinamos si este efecto es producido por el flavonoide probado. Camperol indujo daño al DNA similar al ocasionado por Metronidazol. Estudios han reportado que el Camperol induce desestabilización del DNA al inhibir la unión de las topoisomerasas<sup>30</sup>. Además de los efectos antioxidantes de los flavonoides, muchos estudios han reportado su actividad pro-oxidante. Los flavonoides con un anillo fenol como el Camperol (3, 4',5, 7-tetrahidroxiflavona) son más prooxidantes que aquellos que presentan un anillo catecol tipo –epicatequina<sup>31</sup>. Se analizó el efecto prooxidante como un mecanismo de daño celular, para lo cual la producción de radicales  $\bullet\text{O}_2^-$  se determinó por EPR en *E. histolytica* después de 4 h de incubación con Camperol. La concentración

de  $\bullet\text{O}_2^-$  en muestras de amibas incubadas con Camperol fue similar a la producida por el Metronidazol, esto probablemente se debe a la presencia del grupo fenol en el Camperol<sup>31</sup>. Nuestros resultados difieren de los reportados por Velázquez-Domínguez y cols, quienes encontraron que el Camperol induce una baja producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Sin embargo, consideramos que el Camperol presenta un efecto prooxidante que puede dañar a la amiba<sup>32</sup>.

Uno de los mecanismos propuestos para este efecto prooxidante, es que los compuestos de polifenoles y sus complejos  $\text{Fe}^{2+}$  reaccionan con el  $\bullet\text{O}_2^-$  para formar  $\text{H}_2\text{O}_2$  y un radical semi-quinona, lo que resulta en un comportamiento similar al de la superóxido dismutasa (SOD). La reactividad similar a la SOD, cataliza la dismutación de dos aniones  $\bullet\text{O}_2^-$  a pH fisiológico en  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{O}^2$ . Dado que estas reacciones forman  $\text{H}_2\text{O}_2$ , los compuestos polifenólicos pueden contribuir al estrés celular oxidativo<sup>33</sup>.

Además, se sabe que el oxígeno es tóxico para *E. histolytica* debido a su transformación en ROS, que interactúan con todas las biomoléculas presentes en la célula siendo altamente dañino para el parásito.

Debido a que la incubación de los trofozoítos con Camperol genera  $\bullet\text{O}_2^-$ , suponemos que a pesar de los mecanismos de defensa amibianos contra la oxidación, la actividad prooxidante de



los flavonoides superó estas defensas y provocó un gran daño al parásito. Esto fue más evidente cuando las amibas fueron incubadas con los flavonoides en un ambiente aeróbico, condiciones en las que el Camperol mostro un mayor efecto amebicida que el Metronidazol, sugiriendo que el Camperol puede tener una gran actividad amebicida en tejidos oxigenados.

### Conclusiones

Los resultados muestran que los cambios ultraestructurales inducidos por Camperol incluyen cambios en el citoplasma, en el núcleo y alteración en la membrana citoplásmica de *E. histolytica*. Además, el Camperol provocó un daño al DNA similar al inducido por Metronidazol. Proponemos que estos efectos se deben a las características prooxidantes del Camperol, un efecto que supera los mecanismos anti-oxidantes de la amiba. Siendo la actividad anti-amibiana del Camperol mayor en condiciones de hiperoxigenación, sugiriendo que in vivo sería un mejor amebicida que el Metronidazol, dado que este fármaco disminuye su actividad en estas condiciones.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen a los Drs. Alfonso Olivos-García† y Rafael Campos Rodríguez† por sus invaluable comentarios. El trabajo fue apoyado por SIP-IPN 20131262, 20221473.

### Referencias

1. Haque R, Faruque AS, Hahn P, Lysterly DM, Petri WA. Entamoeba histolytica and entamoeba dispar infection in children in bangladesh. J Infect Dis 1997;175(3):734-736
2. Petri WA. Therapy of intestinal protozoa. Trends Parasitol. 2003;19(11):523-526.
3. Stanley SL. Amoebiasis. Lancet 2003;361(9362):1025-1034.
4. Cortinas de Nava C, Espinosa J, Garcia L, Zapata AM, Martinez E. Mutagenicity of antiamebic and anthelmintic drugs in the salmonella typhimurium microsomal test system. Mutat Res 1983; 117(1-2):79-91.
5. Legator MS, Connor TH, Stoeckel M. Detection of mutagenic activity of Metronidazol and niridazole in body fluids of humans and mice. Science 1975;188(4193):1118-1119.
6. Shubik P. Current status of chemical carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 1972; 69(4):1052-1055.
7. Espinosa-Aguirre JJ, Aroumir C, Meza MT, Cienfuegos E, Cortinas de Nava C. Genotoxicity of amebicide and anthelmintic drugs in escherichia coli pol a+/pol a. Mutat Res 1987;188(2):111-120.
8. Roe FJ. Toxicologic evaluation of Metronidazol with particular reference to carcinogenic, mutagenic, and teratogenic potential. Surgery 1983;93(1 Pt 2):158-164.
9. Orozco E, Lopez C, Gomez C, Perez DG, Marchat L, Banuelos C et. al. Multidrug re-

- sistance in the protozoan parasite entamoeba histolytica. *Parasitol Int* 2002;51(4):353-359.
10. Samarawickrema NA, Brown DM, Upcroft JA, Thammapalerd N, Upcroft P. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:Ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of Metronidazol resistance in entamoeba histolytica. *J Antimicrob Chemother* 1999;40(6):833-840.
11. Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Bioch Pharm.* 1983;32(7):1141-1148.
12. Martinez-Florez S, Gonzalez-Gallego J, Cu-lebras JM, Tunon MJ. Flavonoids: Properties and anti-oxidizing action. *Nutr Hosp* 2002;17(6):271-278
13. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods enzymol* 1990;186:343-355.
14. Perron NR, Garcia CR, Pinzon JR, Chaur MN, Brumaghim JL. Antioxidant and prooxidant effects of polyphenol compounds on copper-mediated DNA damage. *J Inorg Biochem* 2011;105(5):745-753
15. Alanis AD, Calzada F, Cedillo-Rivera R, Meckes M. Antiprotozoal activity of the constituents of rubus coriifolius. *Phytother Res* 2003;17(6):681-682.
16. Calzada F, Alanis AD. Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of helianthemum glomeratum. *Phytother Res* 2007; 21(1):78-80.
17. Calzada F, Barbosa E, Cedillo-Rivera R. Antiamoebic activity of benzyl glucosinolate from lepidium virginicum. *Phytother Res* 2003a;17(6):618-619.
18. Calzada F, Cervantes-Martinez JA, Yopez-Mulia L. In vitro antiprotozoal activity from the roots of geranium mexicanum and its constituents on entamoeba histolytica and giardia lamblia. *J Ethnopharmacol* 2005; 98(1-2):191-193.
19. Calzada F, Meckes M, Cedillo-Rivera R. Antiamoebic and anti giardial activity of plant flavonoids. *Planta Med* 1999;65(1):78-80.
20. Calzada F, Velazquez C, Cedillo-Rivera R, Esquivel B. Antiprotozoal activity of the constituents of teloxys graveolens. *Phytother Res* 2003b; 17(7):731-732.
21. Calzada F, Yopez-Mulia L, Aguilar A. In vitro susceptibility of entamoeba histolytica and giardia lamblia to plants used in mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *J Ethnopharmacol* 2006; 108(3):367-370.
22. Calzada F, Yopez-Mulia L, Tapia-Contreras A, Bautista E, Maldonado E, Ortega A. Evaluation of the antiprotozoal activity of neoclerodane type diterpenes from salvia polys-tachya against entamoeba histolytica and giardia lamblia. *Phytother Res* 2010;24(5):662-665.
23. Bolanos V, Diaz-Martinez A, Soto J, Marchat LA, Sanchez-Monroy V, Ramirez-Moreno E. Kaempferol inhibits entamoeba histolytica growth by altering cytoskeletal functions. *Mol Biochem Parasitol* 2015;204(1):16-25.

24. Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978;72(4):431-432.
25. Pacheco-Yepez J, Rivera-Aguilar V, Barbosa-Cabrera E, Rojas Hernandez S, Jarillo-Luna RA, Campos-Rodriguez R. Myeloperoxidase binds to and kills *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Parasite Immunol* 2011;33(5):255-264.
26. Downey AS, Graczyk TK, Sullivan DJ. In vitro activity of pyrvinium pamoate against *Entamoeba histolytica* and *Giardia intestinalis* using radiolabelled thymidine incorporation and an SYBR Green I-based fluorescence assay. *J Antimicrob Chemother* 2009;64(4):751-754.
27. Espey MG. Role of oxygen gradients in shaping redox relationships between the human intestine and its microbiota. *Free Radic Biol Med* 2013; 55:130-140.
28. Edwards DI. The action of Metronidazole on DNA. *J Antimicrob Chemother* 1977;3(1):43-48.
29. Plant CW, Edwards DI. Effect of tinidazole, Metronidazole and nitrofurazone on nucleic acid synthesis in *Clostridium bifermentans*. *J Antimicrob Chemother* 1976;2(2):203-209.
30. Boege F, Straub T, Kehr A, Boesenberg C, Christiansen K, Andersen A et al. Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I. *J Biol Chem* 1996;271(4):2262-2270.
31. Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 2002;177(1):91-104.
32. Velazquez-Dominguez JA, Hernandez-Ramirez VI, Calzada F, Varela-Rodriguez L, Pichardo-Hernandez DL, Bautista E, et al. Lignarolactone and kaempferol disrupt the actin cytoskeleton in *Entamoeba histolytica*: Inhibition of amoebic liver abscess development. *J Nat Prod* 2020; 24; 83(12):3671-3680.
33. Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys* 2009;53(2):75-100.