# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

# INTERACCIÓN DE *Acanthamoeba* spp. CON CÉLULAS MDCK, LENTES DE CONTACTO Y CÓRNEAS DE HÁMSTER

# T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A :**

**LIZBETH ILIANA SALAZAR VILLATORO**

**DIRECTORA DE TESIS:**
**DRA. MARITZA OMAÑA MOLINA**

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO 2007

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**
**Tesis Digitales**
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# AGRADECIMIENTOS

**A MIS PADRES**…

Gracias por dejar que tomara mis decisiones y dejar que me equivocara, por que con ello comprendí que las cosas no son como siempre pienso. Por apoyarme y estar conmigo cuando los necesito y sobre todo **Gracias por darme la libertad y alas para volar.**

A mi abuelita **ENEDINA** por su apoyo incondicional, gracias abue sin ti no lo hubiera logrado.

A mi hermano **MEMO**, por ayudarme en un principio y hasta hoy, me diste la confianza que necesitaba para lograrlo te debo mucho flaco. Gracias también **ADRIAN** por apoyarme y estar con nosotros, y sobre todo por darme una sobrina tan traviesa **"ANDY".**

**MARITZA** gracias por creer en mí, por impulsarme a superarme cada día, por brindarme los conocimientos necesarios y ante todo gracias por brindarme tú amistad. Eres una gran amiga y una persona súper especial.

A mis grandes amigas **ROSALBA**, **OLIVIA**, **LUCERO**, **JAQUELINE**, **NADIA**, por acompañarme en mis logros y fracasos, celebrar mis alegrías y sobre todo por estar siempre apoyándome.

A mis sinodales **LOLA**, gracias por compartir tus conocimientos, también a **PATY**, **ROSARIO** y **ELI** por sus consejos y esmerada dedicación para que este trabajo quedara lo mejor posible.

Al Químico **LUÍS FERNANDO GONZÁLEZ SÁNCHEZ**, técnico del laboratorio de Microbiología Ambiental perteneciente al proyecto CyMA, por el apoyo brindado con el material de laboratorio, indispensable para que este trabajo se pudiera realizar.

Quiero agradecer de manera muy especial al Doctor **ARTURO GONZÁLEZ ROBLES**, perteneciente al departamento de Patología Experimental del CINVESTAV, por el apoyo técnico brindado y facilitar las imágenes de microscopía de Barrido, usadas en está tesis así mismo a la Doctora **BIBIANA CHÁVEZ MUNGUÍA**, por el apoyo en la realización de este trabajo, gracias a los dos por el apoyo incondicional.

A la Q. B. P. **GUADALUPE CASTAÑÓN GUTIÉRREZ**, auxiliar de Investigación del laboratorio 1, perteneciente al departamento de Patología Experimental del CINVESTAV, por facilitar los cultivos celulares usados en la fase experimental de esta tesis y sobre todo gracias por brindarme tu amistad.

A la bióloga **ANA RUTH CRISTOBAL RAMOS**, auxiliar de Investigación del laboratorio 1, perteneciente al departamento de Patología Experimental del CINVESTAV, por procesar las muestras para Microscopía Electrónica de Barrido.
Así también, quiero agradecer a todas aquellas personas que he conocido y me han brindado su apoyo y amistad, gracias **Sr. Ranferi** por echarme porras.

**No hay nada imposible, porque los sueños de ayer son las esperanzas de hoy y pueden convertirse en realidad mañana.**

**Fíjate cuantas veces te has caído y te has levantado... NO tomes en cuenta TODAS las veces en las que has caído... sino las veces que te has levantado.**

**"Sólo hay un bien: el conocimiento. Sólo hay un mal: la ignorancia".**

**Sócrates**

**INDICE GENERAL**


RESUMEN 1

1. INTRODUCCIÓN 2

2. ANTECEDENTES 3

3. *Acanthamoeba* spp. 6

4. CICLO DE VIDA 6

5. TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Acanthamoeba* 9

6. ECOLOGÍA 11

6.1 Aislamiento de amibas de vida libre en México 12

6.2 Bacterias endosimbiontes de *Acanthamoeba* spp. 13

7. PATOLOGÍAS PRODUCIDAS POR *Acanthamoeba* spp. 13

7.1 ENCEFALITIS AMIBIANA GRANULOMATOSA (EAG 13

7.2 HISTOPATOLOGÍA DE LA EAG 14

8. QUERATITIS AMIBIANA (QA) 14

9. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE *Acanthamoeba* spp. 16

9.1 MECANISMOS INVOLUCRADOS CON LA PATOGENESIS DE *Acanthamoeba* 16

9.2 FACTORES DE RIESGO DE LA QUERATITIS AMIBIANA 17

9.2.1 USO DE LENTES DE CONTACTO 17

9.3 CUADRO CLÍNICO 18

9.4 DIAGNÓSTICO 18

9.4.1 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA QA 18

9.5 TRATAMIENTO 19

9.6 MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE LA QA 19

10. JUSTIFICACIÓN 21

11. OBJETIVOS 22

11.1 OBJETIVO GENERAL 22

11.2 OBJETIVOS PARTICULARES 22

12. MATERIAL Y MÉTODOS 23

12.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS 23

12.2 CULTIVO MONOXÉNICO 23

12.3 AXÉNIZACIÓN DE LAS CEPAS 23

12.4 DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DE LOS ORGANISMOS 24

12.4.1 Identificación Morfológica 24

12.4.2 Morfometría 24

12.5 PRUEBA DE TEMPERATURA 24

12.6 PRUEBA DE PATOGENICIDAD 25
12.7 EVALUACIÓN DE LA ADHERENCIA DE *Acanthamoeba* spp. A DIFERENTES SUPERFICIES 26
12.7.2 Adherencia de *Acanthamoeba* spp. a Lentes de Contacto 26
12.7.1 Adherencia de A*canthamoeba* spp. a células MDCK 26
12.8 INTERACCIÓN *In vitro* DE *Acanthamoeba* spp. CON CÓRNEA DE HÁMSTER (*Mesocricetus auratus*) 27
12.8.1 Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de la interacción de *Acanthamoeba* spp. con Córnea de Hámster (*Mesocricetus auratus*) 28
12.9 PAPEL INHIBITORIO DE LA IgA EN LA ADHERENCIA DE *Acanthamoeba* spp. 29
12.9.1 Obtención de la IgA 29
12.9.2 Determinación de Proteínas por el Método de Microbradford 29
12.9.3 Inhibición de la Adherencia de *Acanthamoeba* spp. a células MDCK en presencia de IgA 29
13. RESULTADOS 30
13.1 AISLAMIENTO DE LAS CEPAS AMIBIANAS 30
13.2 AXENIZACIÓN DE LAS CEPAS 30
13.3 DETERMINACIÓN TAXONÓMICA 30
13.3.1 Identificación Morfológica 30
13.4 TEMPERATURA ÓPTIMA DE CRECIMIENTO Y DETERMINACIÓN DE LA FASE LOGARÍTMICA 33
13.5 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD 33
13.6 EVALUACIÓN DE LA ADHERENCIA DE *Acanthamoeba* spp. A DIFERENTES SUPERFICIES 36
13.6.1 Adherencia a Lentes de Contacto 36
13.6.2 Adherencia a células MDCK 39
13.6.3 Evaluación cualitativa 42
13.7 INTERACCIÓN *In vitro* DE *Acanthamoeba* spp. CON CÓRNEA DE HÁMSTER 46
13.7.1 Análisis por MEB de la Interacción de *Acanthamoeba* spp. Con Córnea de Hámster (*Mesocricetus auratus*) 46
13.8 PAPEL INHIBITORIO DE LA IgA EN LA ADHERENCIA DE *Acanthamoeba* spp. 54
13.8.1 Inhibición de la Adherencia a células MDCK 54

14. DISCUSIÓN 57
15. CONCLUSIONES 62
16. PERSPECTIVAS 63
17. ANEXO 64
18. BIBLIOGRAFIA 71

## INDICE DE TABLAS

**Tabla 1** 5

Comparación clínica y protozoológica de las amibas de vida libre.

**Tabla 2** 10

Clasificación Taxonómica de *Acanthamoeba* spp. dentro del grupo de las Amibas de vida libre de acuerdo a Page, 1988.

**Tabla 3** 31

Determinación morfológica de las fases biológicas de *A. castellanii* y *A. polyphaga*. Se muestran los promedios obtenidos de la medición de 100 trofozoítos y 100 quistes maduros de acuerdo a Pussard y Pons (1977).

**Tabla 4** 35

Pruebas de patogenicidad (Culbertson, 1959).

**Tabla 5** 37

Valores de Adherencia de *A. castellanii* y *A. polyphaga* a lentes de contacto Acuvue; Etafilcon.

**Tabla 6** 38

Valores de Adherencia de *A. castellanii* y *A. polyphaga* a lentes de contacto Bescon; Hefilcon.

**Tabla 7** 40

Valores de adherencia de *A. castellanii* y *A. polyphaga* a células MDCK.

**Tabla 8** 56

Valores de Inhibición de *A. castellanii* y *A. polyphaga* a células MDCK, en presencia de IgA.

## INDICE DE FIGURAS

**Figura 1** 6

Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp. (John, 1993).

**Figura 2** 8

Microscopía de luz de Trofozoíto y quiste de *Acanthamoeba* spp.

**Figura 3** 32

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de *A. castellanii* y *A. polyphaga*

**Figura 4** 34

Curva de Crecimiento de *Acanthamoeba castellanii* en medio Bactocasitona a diferentes temperaturas 30, 35 y 37 ºC.

**Figura 5** 35

Curva de Crecimiento de *Acanthamoeba polyphaga* en medio Chang a diferentes temperaturas 30, 35 y 37 ºC.

**Figura 6** 37

Adherencia de *A. castellanii* y *A. polyphaga* a lentes Acuvue; Etafilcon.

**Figura 7** 38

Adherencia de *A. castellanii* y *A. polyphaga* a lentes de contacto Bescon; Hefilcon.

**Figura 8** 40

Curva de adherencia de *A. castellanii* y *A. polyphaga* a monocapas de células MDCK.

**Figura 9** 41

Microscopía de Luz. Interacción de *A. castellanii* y *A. polyphaga* con células MDCK.

**Figura 10** 43

MEB. Interacción de *A. castellanii* con células MDCK (30 min, 1, 2 y 3 h).

**Figura 11** 45

MEB. Interacción de *A. polyphaga* con células MDCK (30 min y 2 h).

**Figura 12** 48

Córnea control interaccionada por tiempos largos.

**Figura 13** 49

MEB. Interacción de 16 h de *A. castellanii* con córnea de hámster.

**Figura 14** 51

MEB. Interacción de 24 h de *A. castellanii* con córnea de hámster.

**Figura 15** 53

MEB. Interacción de 16 y 24 h de *A. polyphaga* con córnea de hámster.

**Figura 16** 55
Curva de Adherencia e Inhibición de *A. castellanii*.
**Figura 17** 55
Curva de Adherencia e Inhibición de *A. polyphaga*.
**Figura 18** 56
Valores de adherencia de *A. castellanii* y *A. polyphaga*.

**RESUMEN**

Las amibas de vida libre del género *Acanthamoeba* son agentes causales de la queratitis amibiana (QA), una infección corneal de difícil resolución. Se caracteriza por ser una infección multifactorial, que depende del huésped y de las condiciones en que se propicie el contacto con la amiba, así como de su capacidad patógena y virulencia. A nivel mundial la incidencia de la QA por *Acanthamoeba* es relativamente baja sin embargo, en la mayoría de las veces no se considera a esta patología en los diagnósticos iniciales. El presente trabajo se enfocó en la caracterización de dos especies del género *Acanthamoeba* aisladas de lentes de contacto de pacientes del hospital para Evitar la Ceguera en México "Dr. Luis Sánchez Bulnes". Las especies aisladas correspondieron a *A. castellanii* y *A. polyphaga*, que son las especies más frecuentemente reportadas en casos de QA. Para caracterizar las especies en estudio se evaluó su virulencia, es decir la capacidad de las amibas de producir daño. Donde *A. castellanii* fue la especie más virulenta, causando la muerte del 67% de los ratones, invadiendo diferentes órganos, mientras que *A. polyphaga* presentó solo un 20% de virulencia, con una capacidad invasiva baja. Debido a que la adherencia, es considerada como el primer paso en la patogenesis de *Acanthamoeba*, se evaluó la adherencia de las cepas aisladas a lentes de contacto blandos, ya que este tipo de lentes esta mayormente asociado con casos de QA. Los lentes correspondieron a; Acuvue (Etafilcon) y Bescon (Hefilcon), mostrando una adherencia eficiente donde no influyó el contenido de agua y el tipo de polímero de los lentes, por lo que podrían constituir un factor de riesgo para usuarios de estos tipos de lentes. Así mismo se evaluó la adherencia a cultivos celulares, obteniendo un 90% de adherencia de trofozoítos de ambas especies, alcanzando valores máximos a los 180 min. *A. castellanii* fue la especie que presentó mayor adherencia en relación con *A. polyphaga*. Las interacciones se analizaron por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), observando gran número de trofozoítos emitiendo sus acantópodos muy cerca de las uniones celulares, separando y penetrando la monocapa de células. Aunque de manera general no se cuenta con un modelo ideal de QA se ha propuesto al hámster, que de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se consideró adecuado para el estudio de los eventos tempranos de QA. Así también se determinó el papel inhibitorio de la IgA, concluyendo que las especies en estudio tienen la capacidad de evadir la acción de anticuerpos con respecto a otras.

# 1. INTRODUCCIÓN

Las amibas de vida libre son protozoos de importancia clínica debido a las patologías que causan algunos de sus géneros. El carácter anfizoíco de estas amibas les permite vivir exitosamente como organismos de vida libre y como endoparásitos oportunistas. Su amplia distribución cosmopolita, así como su resistencia a condiciones adversas del medio que les rodea, favorece su participación como agentes etiológicos de infecciones en el ser humano, mismas que van de infecciones leves de fácil resolución como una simple diarrea, hasta infecciones graves en el sistema nervioso central, entre las que destacan la meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) y la encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) (Marciano-Cabral, 2003).

Los géneros con mayor importancia clínica dentro del grupo de las amibas de vida libre corresponden a: *Naegleria*, *Balamuthia* y *Acanthamoeba*, donde el primero es el agente causal de la MEAP.

Los géneros *Balamuthia* y *Acanthamoeba* son agentes causales de la EAG, así mismo *Acanthamoeba* es capaz de producir infecciones en diversos órganos como pulmón, riñón y la piel. Sobresaliendo la queratitis amibiana (QA) que es una infección corneal de curso crónico y difícil resolución, que tiene una mayor incidencia en el hombre y se presenta esencialmente en usuarios de lentes de contacto (John, 1993; Marciano-Cabral, 2000).

Recientemente se han reportado amibas del género *Sappinia* como agentes etiológicos de encefalitis amibiana en el hombre e infecciones en vías respiratorias, con consecuencias fatales (Gelman *et al.*, 2001; Schuster y Visvesvara, 2004) (Tabla 1).

El presente trabajo hará énfasis en el estudio de *Acanthamoeba* spp., debido a que este género tiene una mayor incidencia en las infecciones provocadas en el hombre, de manera especial en las infecciones oculares. Las cuales se estiman alrededor de 3000 casos a nivel mundial (Schuster y Visvesvara, 2004). Actualmente se asocia principalmente a usuarios de lentes de contacto, donde los lentes son considerados como vehículo para que las amibas lleguen a la córnea sin embargo, esta infección puede presentarse en individuos sanos que hayan estado expuestos con aguas contaminadas y/o con daño corneal. Es importante mencionar que a esta patología no se le considera en los diagnósticos iniciales, detectándola de manera tardía, cuando la infección esta muy avanzada y el paciente ha sido multitratado.

## 2. ANTECEDENTES

En 1957, Jahnes y Fullmer, refieren a las amibas de vida libre como contaminantes de cultivos de tejido, con lo que comienzan a ser consideradas en el área biomédica. En 1959, Culbertson y colaboradores, descubrieron por primera vez la naturaleza patogénica de las amibas del género *Acanthamoeba*, al llevar a cabo pruebas de seguridad de la vacuna de la polio, observaron un efecto citopático en cultivos de tejido. Inocularon el contenido de dichas cajas en animales de experimentación vía intranasal e intracerebral y en cultivos de tejido, los cuales en pocos días murieron a consecuencia de una meningoencefalitis. Los estudios histopatológicos de los órganos afectados y de las cajas de cultivo revelaron la presencia de organismos ameboideos, que más tarde fueron identificados como amibas del género *Acanthamoeba.* Por lo que sugirió el potencial patógeno de estas amibas de vida libre, refiriendo la capacidad de estos protozoos a invadir la mucosa nasal de organismos sanos, de migrar hacia el cerebro y producir una patología en el sistema nervioso central (SNC) con consecuencias fatales (Rondanelli, 1987).

En 1965, Fowler y Carter reportaron en Australia los cuatro primeros casos de infección amibiana causada por amibas de vida libre en humanos, designada más tarde como meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP), identificando a una amiba del género *Naegleria* como la responsable del daño y no a una del género *Acanthamoeba* como se consideró en un inicio.

Los primeros casos en los cuales claramente se establece como agente causal *Acanthamoeba*, fueron reportados a principios de los setenta. La primera infección humana por *Acanthamoeba* fue descrita por Jager y Stamm (1972). Martínez y colaboradores (1979), designaron como encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), a la infección provocada por amibas del género *Acanthamoeba*; una infección de curso subagudo a crónico que se caracteriza por causar lesiones granulomatosas en el encéfalo (Schuster y Visvesvara, 2004).

En 1973 se reportó en E. U. A. el primer caso de infección en la córnea denominada queratitis amibiana (QA), producida por amibas del género *Acanthamoeba*, el cual correspondió a un paciente masculino de 41 años de edad del sur de Texas, con traumatismo corneal y exposición con agua contaminada en su ojo.

Posteriormente en Gran Bretaña fueron reportados los primeros casos de queratitis por *Acanthamoeba* (Nagington *et al.*, 1975). Las especies encontradas fueron *A. castellanii* y *A. polyphaga*, las cuales se identificaron a través de inmunofluorescencia. Desde 1985 el número de casos de QA se ha incrementado, en gran medida por el uso de lentes de contacto (Kilvington *et al.,* 1990; Schaumberg *et al.*, 1998).

La mayoría de los reportes de casos proceden de países desarrollados, probablemente porque en éstos se toma en consideración a las amibas en los diagnósticos presuntivos, más que por una elevada incidencia que pueda haber en estos países (John, 1993).

| | EAG | QA | MEAP | EA |
|---|---|---|---|---|
| **Agente Etiológico** | **Acanthamoeba* spp.<br>***Balamuthia mandrillaris* | *A. castellanii, A. polyphaga, A. culbertsoni, A. rhysodes, A. hatchetti* | *Naegleria fowleri* | *Sappinia diploidea* |
| **Trofozoíto** | *15-30 µm, acantópodos, desplazamiento ~ 0.3-0.4 µm/s<br>**12-60 µm, polimórfico, desplazamiento ~ 0.25 µm/s | | 15-30 µm , pseudópodos ectoplásmicos, fase flagelada con 2 flagelos, desplazamiento ~ 1 µm/s | 45-85 µm, con una película gruesa, y movimiento tardío |
| **Fase Quística** | *Pared doble con poros, 10-15 µm de diámetro, los quistes se forman en tejido cerebral y tejido corneal<br>**Pared con 3 capas sin poros, 10-30 µm de diámetro, se forman en tejido cerebral | | Pared doble con poros, 7-15 µm de diámetro, los quistes no se forman en tejido cerebral | Pared gruesa, diámetro de 13-37 µm, binucleados |
| **Hábitat** | *Suelo, agua, ambientes domésticos y hospitalarios<br>**Suelo y probablemente agua dulce | | Suelo, aguas termales y ambientes acuáticos contaminados | Suelo, agua dulce, excretas de herbívoros |
| **Factores de Riesgo** | Individuos inmunocomprometidos; SIDA, lesiones en piel, usuarios de lentes de contacto y daño corneal | | Exposición con aguas contaminadas, penetración de agua por vía nasal | ——— |
| **Síntomas y Período de Incubación** | Dolor de cabeza, fiebre, cambios de personalidad. Subaguado-crónico, Fatal | Intenso dolor ocular, lagrimeo, fotofobia. Subaguado-crónico, días | Dolor de cabeza, fiebre, cambios de personalidad. Fatal en días | Dolor de cabeza, fotofobia, vómito, perdida de conciencia |
| **Casos Estimados** | *Acanthamoeba* ~ 200<br>*Balamuthia* ~ 100 | > 3000 | ~ 200 | 1 |

**Tabla 1. Comparación clínica y protozoológica de amibas de vida libre**. De los géneros; **Acanthamoeba,* ***Balamuthia, Naegleria* y *Sappinia*.

**EAG:** encefalitis amibiana granulomatosa, **QA:** queratitis amibiana, **MEAP:** meningoencefalitis amibiana primaria, **EA:** encefalitis amibiana (Marciano-Cabral, 2003; Modificado de Schuster y Visvesvara, 2004).

## 3. *Acanthamoeba* spp.

*Acanthamoeba* es la amiba más común en la naturaleza, su distribución cosmopolita le da una ventaja para vivir en una amplia variedad de hábitats incluyendo agua de piscinas, aguas termales y aguas residuales. Se han aislado de ambientes domésticos y agua mineral embotellada (Rivera *et al.*, 1979, 1981, 1983, 1989; De Jonckheere, 1981). La amplia distribución de *Acanthamoeba* en la naturaleza favorece el contacto directo y frecuente del ser humano con estos protozoos, esto se evidencia por la presencia de anticuerpos contra *Acanthamoeba* tanto en el hombre como en diversos animales (Leher *et al.*, 1998).

## 4. CICLO DE VIDA

Las amibas del género *Acanthamoeba* presentan un ciclo de vida que comprende una fase trófica, en la cual se alimentan activamente y representa la fase reproductiva de este protozoo, y muestran también una fase quística o de resistencia (Pussard y Pons, 1977; Visvesvera, 1991) (Fig. 1).

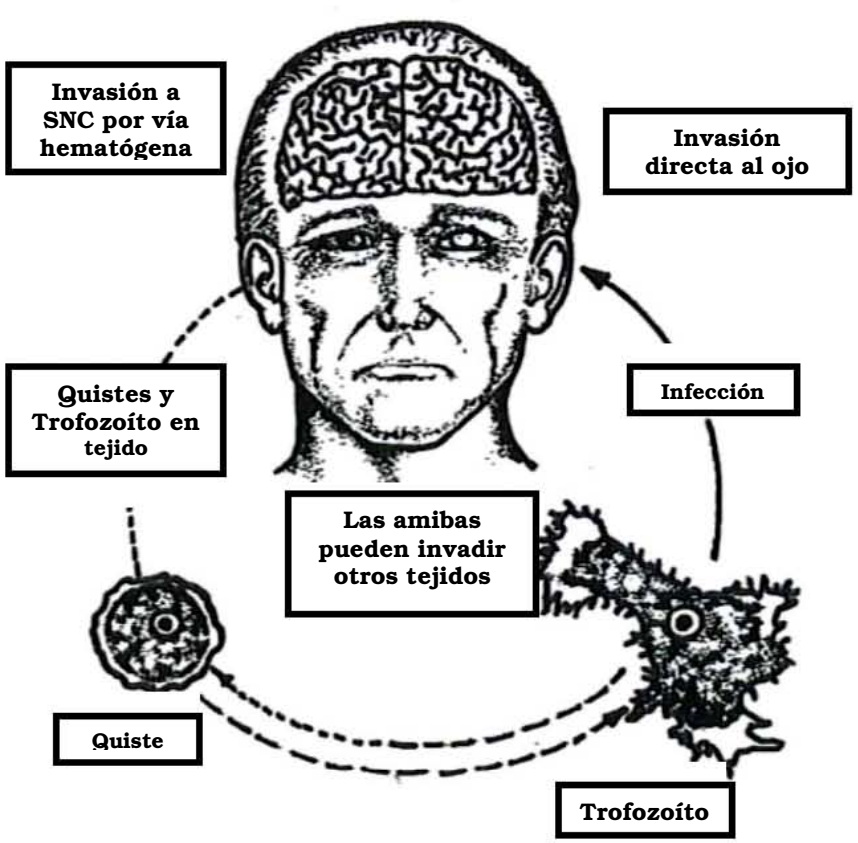


**Figura 1. Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp.** (John, 1993).

**Fase trófica:** Los trofozoítos presentan una longitud promedio de 15-30 µm (Schuster y Visvesvara, 2004). Se caracterizan por presentar un endo y ectoplasma hialino, este último libre de organélos y con gránulos de glucógeno y microvesículas (Rondanelli, 1987). De esta película flexible se pueden emitir dos tipos de pseudópodos; uno hialino y de gran amplitud llamado lobópodo y otro caracterizado por la emisión de finas proyecciones a lo largo de todo el cuerpo ameboideo, denominados acantópodos (Acantos= espinas) de los cuales deriva el nombre del género (Bowers y Korn, 1968; Visvesvera, 1991). La función de estos pseudópodos es la locomoción con movimientos unidireccionales. Necesitan de un sustrato al cual adherirse para desplazarse con movimientos lentos, con una velocidad de desplazamiento de 0.3-0.4 µm/s donde interviene la actina, y dos tipos de miosina I y II (Page, 1988; Shuster y Visvesvara, 2004). En su fase de vida libre se alimentan principalmente de bacterias y levaduras (Weekers *et al.*, 1993). Su organización celular consta de un núcleo vesicular con un gran nucléolo central, mitocondrias elongadas, un complejo de Golgi, retículo endoplásmico liso y rugoso, libre de ribosomas; lisosomas, microtubulos, así como vacuolas digestivas y contráctiles. Estas últimas cumplen la función de sistema excretorio para mantener el equilibrio hídrico de la célula, son de mayor tamaño que las vacuolas digestivas debido a la unión de otras más pequeñas, que se dilatan lentamente (diástole) y se colapsan súbitamente (sístole) expulsando al medio ambiente el líquido que contienen (Bowers y Korn, 1968).
Los trofozoítos presentan un metabolismo aerobio y crecen de forma óptima entre 25-37 ºC y en algunas cepas del género el crecimiento se ve inhibido a temperaturas que van de 35–39 ºC, generalmente la amiba es uninucleada, aunque células multinucleadas son comunes cuando *Acanthamoeba* es mantenida en cultivos líquidos (Page, 1988; Visvesvera, 1991; Omaña, 1997).

**Reproducción:** Se lleva a cabo por fisión binaria simple, donde la división nuclear es metamitótica, una forma relativamente típica de mitosis caracterizada por la formación de una esfera bipolar y la desaparición del nucleolo y la envoltura nuclear durante la cariocinesis (Pussard, 1973).

**Fase quística:** Confiere resistencia a condiciones ambientales adversas como la falta de alimento, desecación y a una gran variedad de agentes químicos y físicos (Aksokek *et al.*, 2002). El quiste mide en promedio 13–20 µm de diámetro, esta formado por una doble pared, el endoquiste y ectoquiste constituidos principalmente por celulosa (Bowers y Korn, 1968; Weisman, 1976; Pussard y Pons, 1977). El ectoquiste es de apariencia rugosa, y el endoquiste presenta un número de brazos variable dependiendo de la especie. Se encuentran poros (opérculos) en la pared que unen al endoquiste con el ectoquiste, a través de los cuales emerge el trofozoíto (Weisman, 1976; John, 1993). Ver Figura 2.

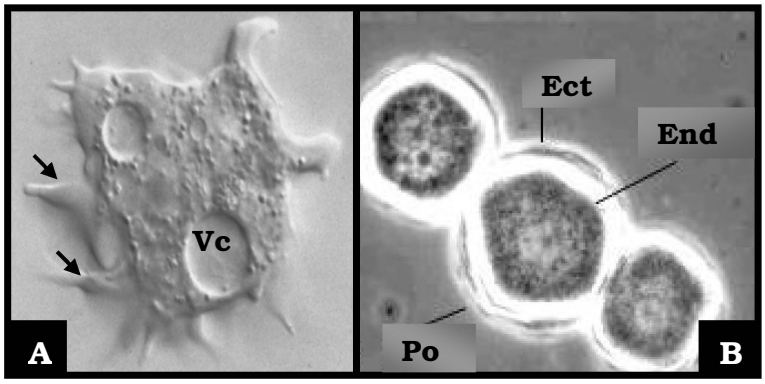


**Figura 2. A).** Microscopía de luz (Nomarsky, 40x). Trofozoíto de *Acanthamoeba* spp. se observan los acantópodos característicos del género distribuidos a lo largo del cuerpo amibiano (flechas), vacuolas digestivas y una vacuola contráctil prominente (**Vc**). **B).** Contraste de fases (40x). Quiste maduro de *Acanthamoeba* spp. con endoquiste semicircular. Se observa el ectoquiste (**Ect**), endoquiste (**End**), y el poro (**Po**).

## 5. TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Acanthamoeba*

De acuerdo a Pussard y Pons (1977), las diferencias morfológicas de los quistes permiten organizarlos en 3 grupos.

**Grupo I**

Integrado por cepas de *Acanthamoeba* con quistes de mayor tamaño con respecto a otros grupos. Presentan un diámetro mayor a 18 µm, el endoquiste contiene brazos con apariencia estrellada rodeado por un ectoquiste liso o rugoso. Tanto la pared interna como externa están separadas y solamente se unen por la extensión de los brazos que forman los opérculos cuyo número será igual al número de brazos.

Se considera al grupo como poco relevante, ya que carece de especies patógenas. Dentro de las cuales están: *A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata*.

**Grupo II**

El quiste mide 18 µm en promedio, el endoquiste puede tener apariencia estrellada o poligonal, siendo el ectoquiste ondulado o liso. Ambas capas se juntan en las zonas angulares del endoquiste.

A este grupo pertenecen las amibas más abundantes en la naturaleza, incluyendo las especies altamente patógenas para el hombre; *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. rhysodes A. griffini*, *A. mauritaniensis, A. lugdunensis*, *A. quina*, *A. divionensis, A. hatchetti, A. paradivionensis, A. triangularis, A. griffini, A. tublashi*.

**Grupo III**

El quiste mide menos de 19 µm, con un endoquiste globular u ovoide, no presenta brazos y el ectoquiste es muy delgado y rugoso. Dentro de este grupo esta *A. palestinensis, A. culbertsoni*, *A. lenticulata, A. royreba, A. pustulata*.

La morfología de los quistes ha sido la base fundamental para la identificación de las especies de *Acanthamoeba* que constituyen el género de acuerdo a Page (1988), ver Tabla 2.

| | |
|---|---|
| **Reino** | Protista (Haeckel, 1866) |
| **Subreino** | Protozoa (Golfuss, 1818; von Siebold, 1846) |
| **Phylum** | Rhizopoda (von Siebold, 1845) (Protistas heterótrofos con lobópodos, filópodos o reticulopodios) |
| **Clase** | Lobosea (Carpenter, 1861) |
| **Subclase** | Gymnamoebia (Haeckel, 1862) |
| **Orden** | Schizopyrenida (Singh, 1952) |
| **Familia** | Vahlkampfiidae (Jollos, 1917; Zulueta, 1917) |
| **Orden** | Acanthopodina (Page, 1976) |
| **Familia** | Acanthamoebidae (Sawyer y Griffin, 1975) |
| **Género** | *Acanthamoeba* (Volkonsky, 1931; Page, 1967) |
| **Especies** | *A. astronyxis*<br>*A. castellanii* (Douglas, 1930)<br>*A. comandoni*<br>*A. culbertsoni*<br>*A. divionensis*<br>*A. echinulata*<br>*A. griffini*<br>*A. hatchetti*<br>*A. lenticulata*<br>*A. lugdunensis*<br>*A. mauritaniensis*<br>*A. palestinensis*<br>*A. polyphaga* (Puschkarew, 1913)<br>*A. quina*<br>*A. rhysodes*<br>*A. royreba*<br>*A. tubiashi*<br>*A. triangularis*<br>*A. gigantea* |

**Tabla 2.** Clasificación Taxonómica de *Acanthamoeba* spp. dentro del grupo de las Amibas de vida libre de acuerdo a Page (1988).

La clasificación taxonómica que dividía a los protozoos en 4 grupos; Sarcodina (amoeba), Mastigophora (flagellates), Sporozoa (protozoos parásitos) e Infusoria (ciliados). Ha sido totalmente abandonada por la sociedad internacional de protozoología, por una basada en herramientas modernas como la bioquímica y la filogenia molecular. El antiguo sistema que consistía en reino, phylum, clase, subclase, superorden, orden ha sido reemplazado por un nuevo vocabulario. De acuerdo al nuevo esquema los eucariontes han sido clasificados dentro de 6 grupos o supergrupos denominados; Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata y Excavata. *Acanthamoeba* esta clasificada dentro del supergrupo; Amoebozoa (Luhe, 1913; Cavalier-Smith, 1998), caracterizado por una locomoción ameboide, con morfología variable, pseudópos eruptivos (lobópodos); usualmente uninucleados, con presencia de fase quística, morfológicamente variable y estado flagelar presente. Primer rango; Acanthamoebidae (Sawyer and Griffin, 1975), glicocalix extremadamente delgado; prominentes pseudópodos, flexibles y finas proyecciones denominadas acantópodos, uninucleados, el quiste de la mayoría de las especies con doble pared y con opérculo con poros; locomoción basada en un citoesqueleto de actina-miosina. Segundo rango; *Acanthamoeba* sp. (Adl *et al.*, 2005).

## 6. ECOLOGÍA

*Acanthamoeba* es un género ampliamente distribuido en la biosfera, son las amibas de vida libre aisladas con mayor frecuencia, por lo que son considerados los protozoos más comunes en la naturaleza tanto en medio acuático como terrestre. En la naturaleza se pueden encontrar en hábitats, tales como; lagos y aguas termales (Rivera, *et al.*, 1989; John, 1993).

La importancia de estás amibas en su fase de vida libre radica en el papel ecológico que desempeñan en el control de poblaciones bacterianas (Rodríguez-Zaragoza, 1994). Constituyen del 50% al 90% de los protozoos heterótrofos en suelo y son considerados como los depredadores más importantes de bacterias en la biosfera. Siendo las enterobacterias no pigmentadas como *E. coli* K-12 y *Klebsiella aerogenes* los mejores recursos alimenticios de *Acanthamoeba* (Weekers *et al.*, 1993).

En el laboratorio, las bacterias que más se utilizan para el crecimiento de estas amibas son *Enterobacter aerogenes* y *E. coli*, ya que son las de mayor consumo en la naturaleza, aunque también existen bacterias que pueden inhibir el crecimiento amibiano, tal es el caso de *Pseudomonas*, *Bacillu*s y *Staphylococcus*, que impiden la adherencia de las amibas. Se desconoce si la bacteria produce exotoxinas o el crecimiento bacteriano induce cambios en el pH contribuyendo a la muerte de la amiba.

La sobrevivencia y crecimiento de *Acanthamoeba* en presencia de bacterias gram-negativas soportan su crecimiento, sin embargo altas densidades de bacterias lo inhiben (Wang *et al.*, 1997).

### 6.1 Aislamiento de *Acanthamoeba* spp. en México.

En nuestro país, se han aislado diferentes especies del género *Acanthamoeba* de diversos ambientes; *A. astronyxis* y *A. castellanii* han sido aisladas de agua de la llave y de tinacos de la ciudad de México (Rivera *et al.*, 1979; Ramírez *et al.*, 1998), de albercas de la ciudad de México y del estado de Morelos, confirmando la presencia constante de amibas de vida libre, donde la forma de quiste les proporciona la habilidad de sobrevivir y resistir los procesos de limpieza en las albercas (Rivera *et al.*, 1983), *A. astronyxis* también ha sido aislada de agua mineral embotellada junto con *A. castellanii* y *A. culbertsoni* (Rivera *et al.*, 1981).

Así mismo se ha aislado a *A. castellanii*, *A. lugdunensis* y *Acanthamoeba* sp. de manantiales de agua termal (Rivera *et al.*, 1989), y de la atmósfera de la ciudad de México, donde permanecen viables, adheridas a partículas de polvo, y se dispersan a través del aire y/o la lluvia (Rivera *et al.*, 1987), lo que les permite estar en continuo contacto con los seres humanos, quedando de manifiesto su presencia en pacientes con quemaduras y rinitis, donde se han aislando a *A. palestinensis*, *A. polyphaga*, *A. lugdunensis*, *A. divionensis*, *A. mauritaniensis* y *A. rhysodes*.

Dentro de las especies del género *Acanthamoeba* aisladas del medio ambiente, se encuentran especies patógenas capaces de producir enfermedades en el hombre (Rivera *et al.*, 1989).

### 6.2 Bacterias Endosimbiontes de *Acanthamoeba* spp.

Recientemente se han reportado bacterias endosimbiontes en diversas especies de *Acanthamoeba* (Marciano-Cabral *et al.*, 2003). Las amibas del género *Acanthamoeba* tienen la capacidad de internalizar diferentes especies bacterianas. Las cuales utilizan a *Acanthamoeba* como hospedero natural, dentro de la cual se multiplican y son liberadas en vesículas al ambiente produciendo la lisis de la amiba (Preston y King, 1984). Dentro de las especies bacterianas reportadas como endosimbiontes están; *Shigella enterica, Yersinia enterocolitica, Pseudomonas aeruginosa, E. coli* O157, *Mycobacterium avium, M. leprae, Helicobacter pylori* y *Vibrio cholerae* (Michel *et al.*, 1995; Barker *et al.*, 1999; Krishna *et al.*, 1978; Winiecka-Krusnell *et al.*, 2002; Thom *et al.*, 1992). También se ha reportado a *Legionella pneumophila*, patógeno intracelular de macrófagos alveolares, como endosimbionte de *Acanthamoeba*, lo que indica su posible papel como reservorio natural de *Legionella* (Rowbotham, 1980). Estudios recientes muestran que la interacción bacteria-amiba induce cambios en las bacterias simbiontes a nivel morfológico, fisiológico, así como en su virulencia y resistencia a biocidas (Cirillo *et al.*, 1994). Se ha sugerido también que *Chlamydia*, exacerba el efecto citopático que produce *Acanthamoeba*, ya que después de su interacción aumenta la liberación de enzimas proteolíticas (Fritshe *et al.*, 1998).

## 7. PATOLOGÍAS PRODUCIDAS POR *Acanthamoeba* spp.

Las especies patógenas de *Acanthamoeba* son capaces de producir diversas infecciones en el hombre a nivel de Sistema nervioso central, riñón, pulmón, piel y ojos (Marciano-Cabral *et al.*, 2003).

### 7.1 ENCEFALITIS AMIBIANA GRANULOMATOSA (EAG)

Por lo general los pacientes que padecen las infecciones que provocan las amibas del género *Acanthamoeba* son personas que cursan enfermedades crónicas (diabetes, alcoholismo, lupus eritematoso), con deficiencias inmunitarias (enfermos de VIH), por lo que se considera que las amibas son organismos oportunistas (Martínez, 1981; Martínez y Visvesvara, 1997). Si bien, las infecciones causadas por amibas del género *Acanthamoeba* no son un problema de salud pública, si son de importancia clínica por las patologías que ocasionan,

entre las que destaca la EAG, que se caracteriza por presentar lesiones granulomatosas en el cerebro. Se considera que la puerta de entrada es a través del neuroepitelio respiratorio, úlceras en la piel o a través de las mucosas. La invasión es por vía hematógena, donde las amibas migran de los tejidos hacia la superficie del cerebro. El período de incubación varía de semanas a meses, con un diagnóstico fatal en la mayoría de los casos. Hasta el momento se han detectado alrededor de 200 casos de EAG a nivel mundial, ocasionados por *Acanthamoeba* (Schuster y Visvesvara, 2004).

## 7.2 HISTOPATOLOGÍA DE LA EAG

Se caracteriza por presentar lesiones necrotizantes y pequeños abscesos en el cerebro, mesencéfalo y tronco encefálico. Los hemisferios cerebrales muestran edema y ablandamiento, se presentan lesiones granulomatosas con presencia de células gigantes, además de un exudado purulento que cubre la materia gris compuesto por leucocitos y monocitos. El fluido cerebroespinal contiene un rango de 30-2960 leucocitos-$mm^2$, del cual los linfocitos comprenden del 6-8% de las células. A través de estudios *post-mortem*, se han visto trofozoítos y quistes en cortes de cerebro, método por el cual se ha diagnosticado la EAG por *Acanthamoeba* (Martínez, 1981).

## 8. QUERATITIS AMIBIANA (QA)

Se define a la QA como una infección corneal de curso crónico de difícil resolución, caracterizada por una necrosis progresiva del epitelio corneal y destrucción de la lamela estromal. La infección ocurre en dos fases, la primera de estas se restringe al epitelio corneal con un mejor pronóstico. En la segunda fase, los parásitos invaden el estroma, en el cual se produce un extenso daño a la matriz de colágena y una inflamación intensa (Garner, 1993). Se cree que la infección se inicia cuando los trofozoítos se adhieren al epitelio corneal, por medio de proteínas de unión a manosa (Panjwani *et al.*, 1997; Hurt *et al.*, 2003; Imbert-Bouyer *et al.*, 2004; Alizadeh *et al.*, 2005). La primera descripción de queratitis por *Acanthamoeba* fue reportada por Nagington y colaboradores (1974), refiriendo que esta infección era poco frecuente. En 1984 sólo se habían registrado 11 casos; donde la mayoría de ellos se consideraron relacionados con traumatismo

oculares menores. A partir del segundo lustro de los ochenta, se comenzaron a registrar cientos de casos de queratitis por *Acanthamoeba,* de los cuales el 85% aproximadamente, se presentaron en usuarios de lentes de contacto (Schaumberg *et al.*, 1998). En nuestro país en 1997 se reportaron los primeros casos de Queratitis por *Acanthamoeba*, relacionados con usuarios de lentes de contacto (Omaña, 1997).

Actualmente se considera a los lentes de contacto vectores de trofozoítos y quistes amibianos. Otro factor de riesgo asociado a la queratitis por *Acanthamoeba* es la producción de lágrimas con baja actividad microbiana y la contaminación bacteriana (Alizadeh *et al.*, 2001). La severidad de la QA en los pacientes, no es homogénea ya que se han reportado variaciones inter-especificas dentro del género, donde *A. castellanii* y *A. polyphaga* muestran diferencias en la adherencia a diversos sustratos con respecto a otras especies lo que explicaría en parte, la mayor incidencia de casos de QA reportados con esas dos especies (Morton *et al.*, 1991; Omaña, 1997). Se ha determinado que *A. castellanii* presenta proteínas de unión a manosa (receptores a manosa) en la superficie de su membrana lo que le facilita la adherencia a la superficie del epitelio corneal (Yang *et al.*, 1997; Hurt *et al.*, 2003; Alizadeh *et al.*, 2005).

Garner (1993), después del análisis de 30 especimenes anatomopatológicos obtenidos de pacientes con queratitis por *Acanthamoeba*, propuso la secuencia del desarrollo de la queratitis:

* Invasión parasitaria del estroma anterior por rompimiento de la superficie del epitelio corneal.
* Fagocitosis de queratocitos, que se inicia en la parte anterior y se propaga gradualmente hasta afectar toda la córnea.
* Infiltración secundaria de células inflamatorias en el estroma desvitalizado, constituida por neutrófilos polimorfonucleares y algunos macrófagos.
* Necrosis del estroma, atribuible a la colagenólisis leucocitaria y parasitaria.

Las especies del género *Acanthamoeba* con mayor incidencia reportados en casos de queratitis amibiana son: *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. rhysodes, A. griffini*, *A. hatchetti, A. lugdunensis, A. quina* y *A. culbertsoni* (Marciano-Cabral, 2003).

## 9. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE *Acanthamoeba* spp.

Los mecanismos precisos asociados con la patogenicidad de *Acanthamoeba* no se han comprendido del todo, ya que la patogenicidad es un proceso complejo que involucra múltiples factores del parásito y del hospedero, que pueden directa o indirectamente contribuir a la infección (Khan, 2003).

### 9.1 MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA PATOGENESIS DE *Acanthamoeba*

**Adherencia.** La adherencia juega un papel importante para que la infección se inicie. Las amibas se adhieren a distintos medios como las superficies inertes de los lentes de contacto y diversos tejidos, ésta se ve favorecida por la temperatura y el tiempo de permanencia en dichas superficies (Willcox *et al.*, 2001, Cancrini *et al.*, 1998; Sehgal *et al.*, 2002). Se ha reportado la existencia de proteínas de unión a manosa, que le permite la adherencia a células huésped (Yang *et al.*, 1997; Alizadeh et *al.*, 2005). Una vez adheridas las amibas desencadenan señales intracelulares que estimulan procesos secundarios como la fagocitosis (Khan, 2001), secreción de proteasas determinantes para causar daño celular (Cao *et al.*, 1998), y apoptosis celular (Alizadeh *et al.*, 1994).

**Fagocitosis.** Es un proceso posterior a la adherencia, mediante la cual *Acanthamoeba* engulle células y partículas de comida (Allen y Dawidowiez, 1990). Es mediada por amebostomas, que se presentan en la superficie del trofozoíto, lo que sugiere que la fagocitosis juega un papel relevante en la patogenesis (Khan, 2001).

**Proteólisis.** Se ha reportado que las proteasas juegan un papel importante en la patogenesis de *Acanthamoeba*, ya que están involucradas en la invasión, migración y daño a tejidos y células (Khan, 2000; Mitro *et al.*, 1994). Se ha determinado que las serin-proteasas producidas por *Acanthamoeba*, provocan la citólisis de la córnea (Leher *et al.*, 1998), actualmente se sabe que están involucradas en la estimulación de la apoptosis celular (Alizadeh *et al.*, 1994).

## 9.2 FACTORES DE RIESGO DE LA QUERATITIS AMIBIANA

Se considera que el 85% de los casos de QA corresponde a usuarios de lentes de contacto de uso prolongado (Kilvington *et al.,* 1990), un 30% de éstos corresponde a pacientes con algún traumatismo corneal con introducción de cuerpo extraño y en el 2% no hay razón aparente de presencia (Visvesvara, 1991). La incidencia de QA en usuarios de lentes de contacto es en gran medida causada por la mala desinfección de los lentes, así como el uso de soluciones salinas caseras que favorecen el desarrollo de las amibas en los lentes (Seal *et al.*, 1994). Sin embargo, esta infección puede presentarse en individuos sanos que hayan estado expuestos con aguas contaminadas y/o con daño corneal.

### 9.2.1 USO DE LENTES DE CONTACTO

Los cambios morfológicos que se llevan a cabo en la córnea de usuarios de lentes de contacto, lo hacen más vulnerable a la QA por *Acanthamoeba* (Niederkorn *et al.*, 1992). La adherencia de las amibas a los lentes depende del contenido hídrico, ionicidad y la composición de los polímeros utilizados en su manufactura. Las amibas se adhieren a los lentes de contacto y se transfieren a la córnea principalmente a zonas del epitelio corneal que presenten daño, penetrando hacia las capas más profundas de la córnea. La repuesta del hospedero puede exacerbar el daño, provocando lesiones permanentes en la visión del individuo (Jonh, 1993; Willcox *et al.*, 2001).

Se ha determinado que la adherencia de trofozoítos y quistes a los lentes de contacto, se incrementa en función del tiempo de interacción, ya que son suficientes 10 segundos de contacto, para que las amibas se adhieran (Kelly *et al.*, 1995). Por esto el lavado mecánico y físico de los lentes, disminuye la oportunidad de las amibas a colonizarlos, ya que remueve un gran número de trofozoítos (Cancrini *et al.*, 1998; Sehgal *et al.*, 2002). Ciertas soluciones limpiadoras como el peróxido de hidrógeno y la clorhexidina, no afectan la viabilidad de trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba* después de 17 h (Cancrini *et al.*, 1998). Los lentes de contacto estimulan la expresión de glicoproteínas en el epitelio corneal, exacerbando el proceso de infección, promoviendo la unión a receptores de manosa presentes en la membrana de la célula amibiana (Yang *et al.*, 1997; Alizadeh *et al.*, 2005).

## 9.3 CUADRO CLÍNICO

La infección se presenta en individuos saludables con pequeños traumas en los ojos, exposición con aguas contaminadas y en la mayoría de los casos en usuarios de lentes de contacto principalmente de tipo blando, la infección da inicio a través del contacto directo de la amiba con la córnea, donde la amiba es capaz de penetrar el epitelio intacto de córneas humanas (Niederkorn *et al.*, 1992). De manera general los principales signos y síntomas de los pacientes son; Infección de difícil resolución que no se resuelve con tratamientos terapéuticos convencionales (antibacterianos y virales), lagrimeo constante así como un severo dolor ocular en desproporción con respecto a la lesión corneal que se observa, y fotofobia. Una vez iniciada la infección, *Acanthamoeba* provoca ulceraciones corneales y en etapas posteriores invade el estroma corneal, desencadenando la respuesta inmune del huésped. La respuesta exacerbada del huésped produce opacidad corneal que impide la visión, llegando a provocar ceguera, haciendo necesaria la remoción quirúrgica de la córnea y en casos más graves la remoción del ojo mismo (John, 1993).

## 9.4 DIAGNÓSTICO

A la QA difícilmente se considera en los diagnósticos iniciales, en la mayoría de los casos la infección se diagnostica después de varias semanas o meses de evolución (Ledee *et al.*, 1995). El médico debe tomar en cuenta a la queratitis provocada por *Acanthamoeba* en pacientes de alto riesgo, es decir usuarios de lentes de contacto. En México no se cuenta con el material y equipo necesario para el diagnóstico.

### 9.4.1 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA QA

El diagnóstico de la QA no es fácil de llevar a cabo, este puede ser confirmado cuando se hace un raspado de la córnea con un hisopo, espátula o bisturí. El material obtenido se puede teñir con la técnica de Giemsa o Naranja de acridina (Hahn *et al.*, 1998). Se recomienda el uso del Calcofluor blanco. En la mayoría de los casos no es posible observar amibas cuando el epitelio corneal está intacto, por esta razón, cuando se sospecha que la infección, es de origen amibiano se recomienda hacer una biopsia corneal (Wilhelmus, 1986).

Los raspados corneales deben colocarse en placas de agar no nutritivo (NNE) enriquecido con *E. aerogenes* inactivado por calor. Las placas de agar se deben incubar a 30–35 °C por 24-48 h, si las amibas están presentes en el tejido, migran hacia el agar y se pueden observar bajo el microscopio (Schaumber *et al.*, 1998). Si el paciente es usuario de lentes de contacto, tanto los lentes como las soluciones preservadoras se siembran en el medio para su búsqueda (Mathers *et al.*, 1987). No debe descartarse una infección mixta asociada con otros microorganismos y de manera especial con bacterias y hongos (Schaumberg *et al.*, 1998; Bonilla *et al.*, 2001). El uso del microscopio confocal ha sido de gran utilidad para el diagnóstico, ya que ha podido detectar casos que de otra forma podrían haber pasado inadvertidos (Mathers *et al.*, 1987). Recientemente la técnica de PCR se ha utilizado para el diagnóstico de la QA. Es una prueba muy sensible y precisa, que se puede emplear en muestras corneales y lágrimas de pacientes (Bacon *et al.*, 1993; Khan *et al.*, 2002).

## 9.5 TRATAMIENTO

En general se usan tratamientos combinados, donde las biguanidas como la polihexametilbiguanida 0.02%, clorohexidina 0.02% y las diamidinas son los antiamibianos más eficaces (Larkin *et al.*, 1992). Sin embargo estos fármacos no están disponibles en el mercado farmacéutico de América, solamente en el europeo, lo que limita su uso. El tratamiento inicial debe ser intensivo ya que los microorganismos son más sensibles antes de enquistar y a su vez son más sensibles los quistes inmaduros que aquellos que ya hayan madurado (Larkin *et al.*, 1992; Elder *et al.*, 1994; Seal *et al.*, 1996). El tratamiento frente a organismos enquistados es limitado, se emplea principalmente imidazoles, miconazol 1% y clotrimazol al 1% por vía tópica (Turner *et al.*, 2000).

## 9.6 MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE LA QA

El establecimiento de un modelo experimental de QA es indispensable para conocer los mecanismos de patogenicidad que inducen las amibas en la córnea humana. Un modelo experimental de QA debe semejar la patología, así como cumplir los postulados de Koch, que establece que las enfermedades deben ser producidas por organismos vivos, los parásitos viables deben aislarse de los

tejidos afectados y crecer en medios puros, aunado a esto el modelo experimental debe evidenciar características clínicas similares al humano (He *et al.*, 1992).

Se han tratado de implementar modelos en los que se puedan seguir y explicar los mecanismos de daño de los trofozoítos y quistes en la QA. Las investigaciones más sobresalientes en la búsqueda de dicho modelo animal se detallan a continuación: Font y colaboradores (1990) experimentaron con conejos pre-tratados con esteroides (vía conjuntival por 4 días), a los que inyectaron vía intraestromal trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba polyphaga*. Los conejos mostraron una queratitis estromal y ulceraciones corneales sin embargo, hoy día se sabe que la infección en humano no se asocia con inmunosupresión como es el caso de la infección en el sistema nervioso central (EAG). He y colaboradores (1992), demostraron por medio de estudios *In vitro* que *Acanthamoeba*, no se adhiere eficientemente a la superficie corneal de diferentes mamíferos y solamente se adhiere eficientemente a córneas humanas, de hámster chino y de cerdo. Propone al cerdo como modelo experimental para reproducir la QA, ya que el daño que se presenta es muy similar al del humano, llegando a presentar un infiltrado en forma de anillo en la córnea. Así mismo reportan, que la adherencia a una superficie previamente dañada es un factor que predispone la infección. Sin embargo, Panjwani *et al.*, (1997), demostraron que *A. polyphaga* como *A. culbertsoni*, pueden adherirse al epitelio corneal de conejo sugiriendo a este animal como un modelo útil para investigaciones sobre los mecanismos moleculares que median la adherencia al epitelio corneal. Experimentalmente se ha demostrado que la co-infección de córnea de rata con *Corynebacterium* y *Acanthamoeba*, induce una queratitis supurativa, sugiriendo que la presencia de la bacteria juega un papel importante en la infección corneal (Winiecka-Krusnell y Linder, 2001). Omaña-Molina *et al.*, (2004) evaluaron cambios morfológicos y electrofisiológicos que ocurren durante la interacción *in vitro* de *A. castellanii* y *A. polyphaga* con córneas de hámster intactas y dañadas. Después de una 1 h los trofozoítos formaron grupos y migraron a las uniones celulares provocando separación celular, después de 2 y 4 h las células epiteliales estaban desprendidas y los trofozoítos habían penetrado hacia capas más profundas. La resistencia transepitelial del tejido corneal dañado descendió de manera proporcional al tiempo de interacción con las amibas.

## 10. JUSTIFICACIÓN

Los estudios biológicos que se han llevado a cabo con amibas del género *Acanthamoeba*, se han hecho con diferentes especies, considerando que los resultados pueden extrapolarse a todo el género sin embargo, hasta el momento se desconoce si existen o no diferencias inter-especificas que hagan evidente mecanismos de patogenicidad atribuibles a la especie o al género mismo, por lo que el conocimiento y descripción biológica de estas amibas es importante para tratar de explicar posibles diferencias entre las especies que conforman el género y en particular aquellas que son capaces de producir queratitis amibiana en el hombre. Actualmente, aún existe desconocimiento del potencial patógeno de las amibas del género *Acanthamoeba* para el hombre, lo que hace no incluirlas en los diagnósticos diferenciales iniciales. De ahí la importancia de considerar a esta infección en dichos diagnósticos y sobre todo caracterizar las cepas relacionadas con casos de QA, evaluando su potencial patógeno.

Por lo anterior, el presente trabajo pretende caracterizar dos cepas aisladas de pacientes usuarios de lentes de contacto uno de ellos diagnosticado con queratitis amibiana. Por medio de la determinación de diferencias en los mecanismos de patógenicidad, a través de la evaluación *In vitro* de las interacciones con células MDCK y córneas de hámster, comparación del patrón de adherencia a diferentes sustratos y la capacidad de evadir la acción de anticuerpos del tipo IgA. Así mismo, evaluar el potencial patógeno de cada especie y conocer la relación de su virulencia y capacidad de adherencia con el grado de severidad de la queratitis que pueden llegar a producir en el hombre.

Por lo anterior en el presente estudio se plantean los siguientes objetivos de trabajo.

# 11. OBJETIVOS

## 11.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar las posibles semejanzas o diferencias en la adherencia, patogenicidad y evasión de la respuesta inmune mucosal, entre *A. castellanii* y *A. polyphaga*, aisladas de lentes de contacto.

## 11.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Aislamiento e identificación de amibas de vida libre de lentes de contacto.

Axenización de las cepas aisladas.

Identificación morfológica de los aislados hasta el nivel de especie de acuerdo a Page (1988).

Determinación de la temperatura óptima de crecimiento y fase exponencial de desarrollo de las amibas en estudio.

Evaluación de la patogenicidad de las cepas en estudio, por medio del modelo experimental de EAG en ratón propuesto por Culbertson (1959).

Determinación y comparación de la adherencia de las amibas a diferentes superficies: lentes de contacto y cultivos celulares.

Implementación de un modelo experimental *In vitro* en córnea de hámster, para evaluar los posibles mecanismos de daño de *Acanthamoeba* spp. en la QA.

Evaluación cualitativa del efecto citopático de *Acanthamoeba* spp. en cultivos celulares y córneas de hámster, por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Acción de la IgA en la adherencia de *Acanthamoeba* spp. a células Madin Derby Cell Kidney (MDCK).

# 12. MATERIAL Y MÉTODOS

## 12.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

La obtención de las amibas se hizo a través de evaluaciones de raspados corneales y de lentes de contacto de pacientes con diagnóstico presuntivo de QA detectados en el Hospital Asociación para evitar la ceguera en México "Dr. Luis Sánchez Bulnes". Las muestras se estudiaron en el laboratorio de Microbiología Ambiental, del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente, de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Se tomaron en cuenta los siguientes signos y síntomas de los pacientes para la recolección de las muestras:

* Infección de difícil resolución que no se resuelve con tratamientos terapéuticos convencionales (antibacterianos y virales).
* Severo dolor ocular.
* Lagrimeo constante.
* fotofobia.
* Presencia de anillo corneal (hipopión).

## 12.2 CULTIVO MONOXÉNICO

Las muestras de raspados corneales y los lentes de contacto, fueron colocados en cajas Petri con medio no nutritivo (NNE), enriquecido con *Enterobacter aerogenes* inactivada con calor a 65 °C. Se incubaron a 30 °C, colocando las cajas de forma invertida (Anexo 1). Después de 24 h se observaron al microscopio invertido (Nikon TMS, Japón). En los casos de crecimiento amibiano positivo se cortaron cuadros de agar de aproximadamente 1 $cm^2$ (Page, 1988) y se resembraron en cajas de agar.

## 12.3 AXENIZACIÓN DE LAS CEPAS

La axenización fue un proceso indispensable para contar con cultivos de amibas libres de bacterias y llevar a cabo los estudios biológicos propuestos. Se partió de un crecimiento amibiano positivo en el medio NNE, evaluando el desarrollo amibiano en dos medios axénicos; medio Bactocasitona y medio Chang Modificado, enriquecidos con suero de ternera al 10%, con antibiótico (200 mgc de Kanamicina/penicilina) y se incubaron inicialmente a 30 °C (Anexo 1).

## 12.4 DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DE LOS ORGANISMOS

### 12.4.1 Identificación Morfológica

Para ubicar taxonómicamente a nivel de especie las cepas aisladas, se tomaron en cuenta sus características morfológicas (trofozoíto y quiste) de acuerdo a las claves de Page (1988). Se observaron preparaciones *In vivo* de trofozoítos y quistes de cultivo axénico, en el microscopio de contraste de fases a 40x (Zeiss).

### 12.4.2 Morfometría

Se hicieron mediciones de 100 trofozoítos y 100 quistes de preparaciones en fresco a través del microscopio de contraste de fases (Zeiss, Alemania). Con ayuda de una reglilla micrométrica se midió el diámetro de los núcleos, largo y ancho de los trofozoítos (Page, 1988). A quistes maduros se les registro su diámetro y el número de brazos que presentaban para determinar la morfología quística y ubicarlos dentro de los grupos propuestos por Pussard y Pons, (1977).

## 12.5 PRUEBA DE TEMPERATURA

Se determinó la temperatura óptima de crecimiento amibiano. Las temperaturas evaluadas fueron; 30 °C, 35 °C y 37 °C, que corresponden a las más comúnmente reportadas (Visvesvara, 1991; Omaña, 1997). Se hicieron curvas de crecimiento por triplicado, iniciando con un inoculó de 50 000 trofozoítos crecidos en los medios axénicos; Bactocasitona y Chang en tubos con 3 ml de medio enriquecidos con suero de ternera al 10% y 200 mcg. de Kanamicina/penicilina (Anexo 1).

Se llevó un registro del crecimiento diario de las amibas por 8 días. Para el conteo se utilizó un hematocitómetro en el que se colocaron 10 µl del homogenizado de cada tubo, el cual se lograba colocando los tubos de cultivo en hielo frape por 5 min para despegar la mayor cantidad de células adheridas en las paredes del tubo. La viabilidad celular se determinó por medio de la técnica de exclusión con azul tripano al 0.4%.

Con los datos de los conteos diarios se obtuvieron los promedios, a partir de los cuales se hicieron curvas de crecimiento para cada temperatura y cepa.

## 12.6 PRUEBA DE PATOGENICIDAD

Esta prueba se llevo a cabo de acuerdo a la metodología propuesta por Culbertson (1959), para evaluar la capacidad amibiana de producir infección en el sistema nervioso central de los animales.

Se utilizaron lotes de 5 ratones machos de la cepa CD-1, de aproximadamente 3 semanas de edad, a los que se les inoculó vía intranasal $2x10^5$ trofozoítos/20 µl de medio limpio. Se usaron cultivos axénicos en fase exponencial de crecimiento, obtenidos de cajas de cultivo de 25 $cm^2$ las cuales se colocaron sobre una capa de hielo, las amibas posteriormente se concentraron por centrifugación a 2 500 r. p. m. durante 10 min. Los ratones se anestesiaron ligeramente en una cámara con éter dietílico y se les inoculó la suspensión amibiana, introduciendo una punta de micropipeta en las narinas y por instilación se inoculó la suspensión amibiana. Los animales inoculados se observaron diariamente por un período de 21 días, registrando manifestaciones clínicas de la infección como; sobrevivencia, mortalidad, movimientos, reflejos, respiración, sudoración e ingesta acuosa. Si la muerte ocurría antes del período establecido se extraían órganos como; cerebro, hígado, pulmón y riñón, para verificar la diseminación hematógena. Los órganos recién extraídos se colocaban en cajas con medio NNE y *E. aerogenes* (Anexo 1) y se incubaron a 30 °C, por un período de 2-4 días con el fin de recuperar las amibas. Cuando los ratones sobrevivieron al período establecido, se sacrificaron para extraer los órganos. Una vez recuperadas las cepas se procedió nuevamente a la axenización, y se llevaron a cabo los ensayos biológicos.

Previó a los ensayos de adherencia e inhibición, se reactivo la virulencia amibiana a través de 3 pases sucesivos en ratón, de acuerdo a la metodología descrita previamente.

## 12.7 EVALUACIÓN DE LA ADHERENCIA DE *Acanthamoeba* spp. A DIFERENTES SUPERFICIES

### 12.7.1 Adherencia de *Acanthamoeba* spp. a Lentes de Contacto

Para determinar si la adherencia de *Acanthamoeba* spp. se ve influenciada por el tipo de material, se evaluaron lentes de contacto de diferente contenido hídrico, que correspondieron a las marcas; Acuvue (58% de agua y 42% polímero etafilcon A) y Bescon (45% de agua y 55% de hefilcon) (Reichter, Buffalo N. Y.). Se cortaron segmentos de lentes de aproximadamente 25 $mm^2$, con ayuda de un bisturí y una hoja milimétrica, cada segmento se colocó en placas de 8 pozos y se interaccionó con $7.5x10^4$ trofozoítos en 100 µl de medio limpio a 30 °C, las amibas se obtuvieron a partir de cultivos en fase exponencial de crecimiento de cajas de cultivo de 25 $cm^2$, y se procesaron bajo las condiciones antes ya descritas. Se consideraron 3 tiempos de interacción 3, 6 y 12 h, manejando como control positivo pozos con $7.5x10^4$ trofozoítos en 100 µl de medio limpio.

Una vez transcurrido cada tiempo de interacción, los lentes se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M durante 1 h (Anexo 3). Una vez fijadas las células se llevó a cabo el conteo de trofozoítos adheridos, colocando cada segmento en un hematocitómetro, y se observaron al invertoscopio (Nikon TMS, Japón). Los ensayos se realizaron por triplicado, y bajo condiciones de esterilidad.

### 12.7.2 Adherencia de *Acanthamoeba* spp. a células MDCK

Se realizaron ensayos para determinar la adherencia de las amibas en estudio a diferentes superficies. Se evaluó la adherencia a cultivos celulares MDCK (Madin Derby Cell Kidney). Se utilizaron monocapas confluentes de células MDCK crecidas en medio D-MEM (Microlab, México), sobre placas de 96 pozos (Anexo 1).

Se realizó una curva patrón de adherencia para determinar de manera cuantitativa el número de trofozoítos adheridos a la monocapa, para ello se usaron números crecientes de amibas; 5 000, 10 000, 15 000, 30 000, 50 000 y 75, 000 trofozoítos, con el objetivo de abarcar limites de adherencia evaluados con anterioridad. Los trofozoítos fueron obtenidos de cultivos en fase exponencial. Con base en la curva ya mencionada, se determinó el número de células

adheridas en cada tiempo de interacción. Los ensayos de adherencia se realizaron igualmente sobre monocapas de células MDCK en placas de 96 pozos, adicionando 100 µl de medio limpio que contenían $75x10^4$ trofozoítos, obtenidos de cultivos en fase exponencial, que se obtuvieron de cajas de cultivos de 75 $cm^2$, las cuales se colocaron sobre una capa de hielo, las amibas posteriormente se concentraron por centrifugación a 2 500 r. p. m. durante 10 min. En todos los ensayos realizados, la obtención de los trofozoítos en cultivo se realizó de la forma antes descrita. Se evaluaron diferentes tiempos de interacción 5, 10, 15, 30, 60, 120 y 180 min, incubando a 30 °C. Al término de cada tiempo, las muestras se fijaron con 75 µl de glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M durante 1 h. Las placas se lavaron con PBS-Tween 0.05%, y se procesaron conforme a la técnica de ELISA modificada (Campos-Rodríguez *et al.*, 2004). Se cuantificó la absorbancia en un lector de microplacas de Elisa (Bio-rad, modelo 550), con un filtro de 490 nm de longitud de onda (Anexo 2). Los ensayos se hicieron por cuadriplicado y bajo condiciones de esterilidad.

Los datos de adherencia de *Acanthamoeba* spp. a células MDCK y a lentes de contacto, fueron transformados a logaritmo natural, ya que de acuerdo a la prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov), los datos no fueron normales. Con los datos transformados se aplicó un análisis de varianza de dos factores (cepa-tiempo), así mismo una prueba de t de student, para muestras pareadas mediante la cual se compararon las cepas en los diferentes tiempos.

## 12.8 INTERACCIÓN *In vitro* DE *Acanthamoeba* spp. CON CÓRNEA DE HÁMSTER (*Mesocricetus auratus*)

Se realizó la interacción *In vitro* de trofozoítos de *A. castellanii* y *A. polyphaga* con córneas de hámster dorado de Siria (*Mesocricetus auratus*). Las córneas fueron obtenidas de un lote de 4 hámsteres machos, adultos jóvenes con un peso aproximado de 120-130 g, proporcionados por el departamento de patología Experimental del CINVESTAV, unidad Zacatenco. Se utilizaron animales libres de infecciones y sin daño corneal.

Los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo a los procedimientos para el manejo de animales de experimentación estipulados en la reglamentación de la Asociación para la investigación en Visión y Oftalmología (ARVO). Los animales se

anestesiaron con pentobarbital sódico (anestesal) 1:10 en solución salina isotónica estéril, a una concentración para eutanasia, una vez anestesiados se les práctico punción cardiaca, para evitar el sangrado al remover el tejido corneal. Posteriormente se realizó la extracción quirúrgica de los ojos por medio de la enucleación, para garantizar el mínimo daño a las córneas, se dejó un fragmento de esclera y cristalino facilitando así su manipulación y manteniendo de esta manera la curvatura normal de la córnea (Omaña-Molina *et al.*, 2004). Los ojos recién extraídos se lavaron en solución salina y se colocaron en placas de 96 pozos. Para la interacción se usaron $2.5x10^4$ trofozoítos de *A. castellanii* y *A. polyphaga* en 200 µl de medio limpio, obtenidos de cultivos en fase exponencial. Los tiempos de interacción correspondieron a 16 y 24 h, y se incubaron a 30 °C.
Las córneas controles se interaccionaron con medio limpio. Todo el procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones de esterilidad. Las muestras se procesaron para ser observadas al microscopio electrónico de Barrido (Philips, XL 30 ESEM).
Con anterioridad Omaña y colaboradores (2004), realizaron interacciones tempranas con el mismo modelo animal sin embargo, en este trabajo se implemento para tiempos más largos.

### 12.8.1 Análisis por Microscopía electrónica de Barrido (MEB) de la Interacción de *Acanthamoeba* spp. con Córnea de Hámster (*Mesocricetus auratus*)

Pasado cada tiempo de interacción, los ojos se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M durante 1 h, y se lavaron tres veces con buffer de fosfatos (PBS). Se procesaron de acuerdo a la técnica convencional de MEB. Para ello se deshidrataron con diferentes grados de etanol (70, 90 y 100%), y se secaron a punto crítico con $CO_2$ líquido en un aparato Samdri-780 (Tousimis, Rockville Maryland, USA), y se montaron en porta muestras. Se cubrieron con una capa de oro (Fine coat Ion sputter JEOL JFC-1100).
Las muestras se observaron al microscopio de barrido modelo XL 30 ESEM (FEI Company, Eindhoven, The Netherlands) (Anexo 4).

## 12.9 PAPEL INHIBITORIO DE LA IgA EN LA ADHERENCIA DE *Acanthamoeba* spp.

### 12.9.1 Obtención de IgA

Los anticuerpos IgA fueron purificados de calostro humano tal como lo describe Kondoh (1987), para lo cual el calostro fue desgrasado por centrifugación a 12000 r. p. m. por 15 min a 4 °C en dos ocasiones. El sobrenadante fue pasado a través de una columna de jacalina-agarosa, para obtener un eluído de IgA (Anexo 5).

### 12.9.2 Determinación de Proteínas por el Método de Microbradford (IgA)

Por el método de microbradford (Bradford, 1976), se determinó la concentración de proteína presente en el eluído de PBS-anticuerpo (IgA), obtenido de la purificación de calostro humano, las lecturas se hicieron en un lector de ELISA (Bio-rad, modelo 550) (Anexo 5).

### 12.9.3 Inhibición de la Adherencia de *Acanthamoeba* spp. a células MDCK en presencia de IgA

Para evaluar el papel de la IgA en la inhibición de la adherencia de *A. castellanii* y *A. polyphaga* a células MDCK, se interaccionaron 25 µl de IgA a una concentración de 300 µg/ml y $7.5x10^4$ trofozoítos en fase exponencial, en monocapas confluentes de células MDCK crecidas en medio D-MEM (Microlab, México) sobre placas de 96 pozos (Anexo 1). Los tiempos de interacción fueron los mismos que en los ensayos de adherencia, y se incubaron a la temperatura óptima de las amibas. Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2.5% durante 1 h, y se procesaron conforme a la técnica de ELISA modificada (Campos-Rodríguez *et al.*, 2004) (Anexo 2).

Los datos de adherencia de *Acanthamoeba* spp. a células MDCK, en presencia de IgA, fueron transformados a logaritmo natural, ya que de acuerdo a la prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov), los datos no fueron normales.

Con los datos transformados se aplicó un análisis de varianza de dos factores (cepa-tiempo) y una prueba de t de student, para muestras pareadas mediante la cual se compararon las dos cepas en los diferentes tiempos.

# 13. RESULTADOS

## 13.1 AISLAMIENTO DE LAS CEPAS AMIBIANAS

Se trabajo con dos cepas de *Acanthamoeba*; *A. castellanii* y *A. polyphaga*. Las cepas en estudio fueron aisladas directamente de lentes de contacto, de un grupo de usuarios de lentes de contacto que acudieron al hospital para evitar la ceguera en México "Luis Sánchez Bulnes", a los que se les pidió tanto los lentes como los estuches para evaluar la presencia de amibas del género *Acanthamoeba*. De las especies en estudio *A. polyphaga* fue aislada de los lentes de contacto de un paciente que presentaba QA, mientras que *A. castellanii* fue aislada de los lentes de contacto, de un usuario que no presentaba sintomatología aparente.

## 13.2 AXENIZACIÓN DE LAS CEPAS

Ya que las cepas en estudio fueron aisladas de casos clínicos de usuarios de lentes de contacto, fue necesario evaluar el medio idóneo de crecimiento. *Acanthamoeba castellanii* presentó un mejor crecimiento en medio Bactocasitona y *A. polyphaga* en el medio Chang, ambos enriquecidos con suero de ternera al 10% (Microlab, México) con antibiótico (200 mcg de Kanamicina/penicilina) (Anexo 1).

## 13.3 DETERMINACIÓN TAXONÓMICA

### 13.3.1 Identificación Morfológica

En preparaciones de trofozoítos se observaron prolongaciones citoplasmáticas como lobópodos y acantópodos, núcleo, nucleolo y un gran número de vacuolas contráctiles y digestivas. En las formas quísticas se observó la doble pared característica del género *Acanthamoeba* así como un endoquiste estrellado.

Las cepas aisladas de casos clínicos de usuarios de lentes de contacto, se determinaron hasta nivel de especie de acuerdo al criterio de Page, (1988).

Estas especies se ubicaron dentro del segundo grupo al cual pertenecen las especies patógenas involucradas en infecciones humanas de acuerdo a Pussard y Pons (1977) (Tabla 3). Mediante Microscopía electrónica de barrido fue posible tener imágenes de las especies en estudio (Fig. 3).

| ESPECIE | TROFOZOÍTO | | | QUISTE | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Largo | Ancho | Diámetro del núcleo | Diámetro | No de brazos del quiste |
| *A. castellanii* | 29 µm | 27 µm | 5 µm | 17 µm | 4-5 brazos |
| *A. polyphaga* | 21 µm | 25 µm | 4 µm | 15 µm | 3-4 brazos |

**Tabla 3. Determinación morfológica de las fases biológicas de *Acanthamoeba* spp.** Se muestran los promedios obtenidos de la medición de 100 trofozoítos y 100 quistes maduros, correspondiendo a *A. castellanii* y *A. polyphaga* de acuerdo a Page (1988).

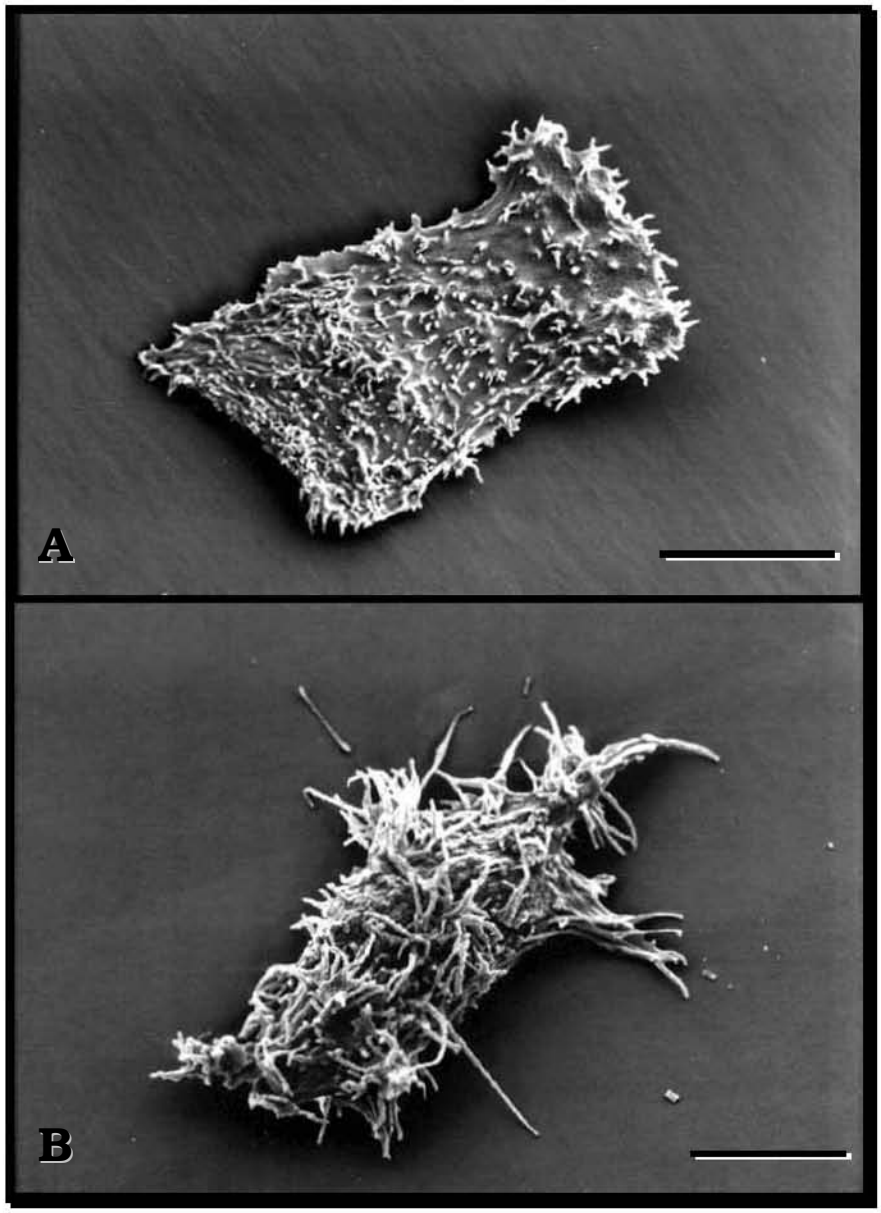


**Figura 3. Trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.** Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). **A).-** Trofozoítos de *A. castellanii*, presenta un cuerpo amibiano aplanado con acantópodos cortos a lo largo del cuerpo amibiano. Tamaño de la barra= 10 µm. **B).-** Trofozoíto de *A. polyphaga*, con acantópodos de mayor longitud y con un cuerpo amibiano voluminoso. Tamaño de la barra= 5 µm.

## 13.4 TEMPERATURA ÓPTIMA DE CRECIMIENTO Y DETERMINACIÓN DE LA FASE LOGARÍTMICA

Se determinó la temperatura óptima de crecimiento de *A. castellanii* y *A. polyphaga* la cual correspondió a 30 °C para ambas especies. Cabe mencionar que aunque *A. castellanii* presentó mayor crecimiento a 37 °C, las células estaban redondeadas y en mal estado en pocos días por lo cual se eligió la de 30 °C. La determinación de la temperatura se realizó por triplicado con una viabilidad mayor al 98% en ambas especies. La fase logarítmica de crecimiento de *A. castellanii* esta entre 72–96 h (Fig. 4) y para *A. polyphaga* entre 24-48 h (Fig. 5).
Donde *A. polyphaga* crece en menor tiempo y es capaz de soportar tiempos largos en cultivo en forma trófica, formando quistes maduros después de varias semanas con respecto a *A. castellanii* que necesita de mayor tiempo para alcanzar su máximo de crecimiento y es sensible a condiciones adversas en cultivo ya que en 2 semanas logra formar quistes maduros.

## 13.5 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

En los ensayos de patogenicidad en ratón; *A. castellanii* y *A. polyphaga* fueron capaces de producir EAG. *A. castellanii* mostró una virulencia del 67%, ya que fue capaz de provocar la muerte en 10 ratones, alrededor de 5 a 9 días post-inoculación, además de presentar una mayor diseminación amibiana, con aislamientos positivos en cerebro, hígado, riñón y pulmón, con respecto a *A. polyphaga* que mostró una virulencia del 20%, que produjo la muerte de 3 ratones; entre los 7 y 20 días post-inoculación, con una menor diseminación amibiana aislándose solo de cerebro y riñón. Las cepas aisladas se reinocularon tres veces, los resultados fueron semejantes en los ensayos realizados (Tabla 4). Los ensayos biológicos planteados se llevaron a cabo con estas amibas.

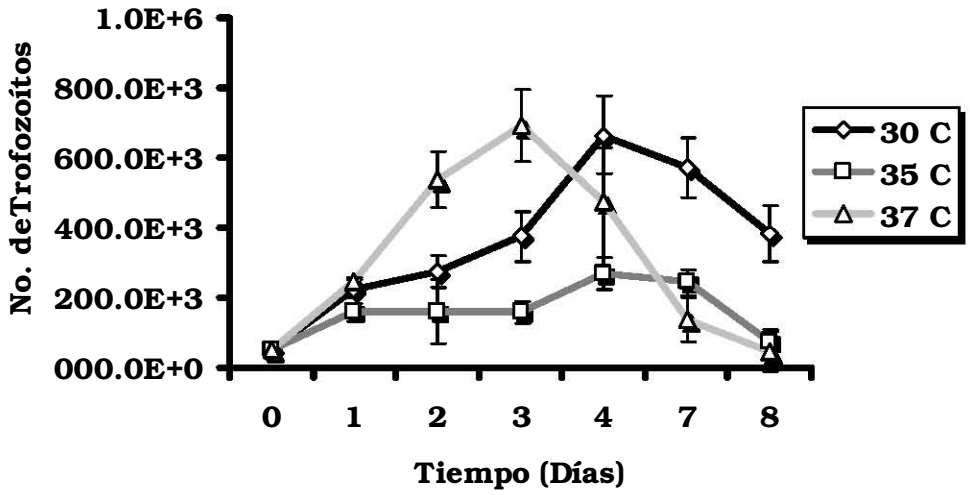


**Figura 4. Curva de Crecimiento de *Acanthamoeba castellanii*.** Promedios de conteos diarios (por triplicado), de trofozoítos de *A. castellanii* crecidos en medio Bactocasitona a diferentes temperaturas 30, 35 y 37 °C.

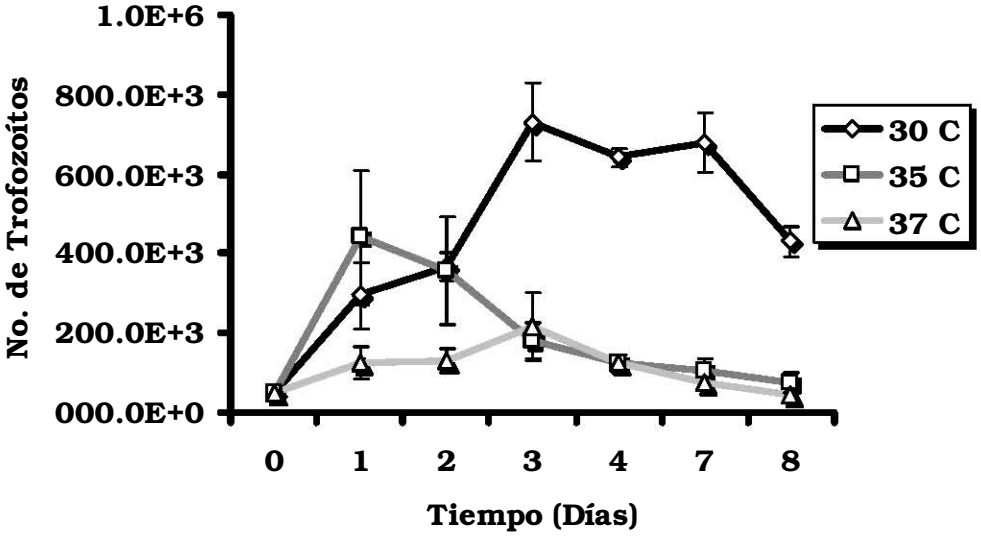


**Figura 5. Curva de Crecimiento de *Acanthamoeba polyphaga*.** Promedios de conteos diarios (por triplicado,) de trofozoítos de *A. polyphaga* crecidos en medio Chang a diferentes temperaturas 30, 35 y 37 °C.

| ESPECIE | PORCENTAJE DE VIRULENCIA | AISLAMIENTO AMIBIANO DE ÓRGANOS | | MUERTE POST-INOCULACIÓN |
|---|---|---|---|---|
| ***A. castellanii*** | 67% | C | **+** | 5-9 días |
| | | H | **+** | |
| | | P | **+** | |
| | | R | **+** | |
| ***A. polyphaga*** | 20% | C | **+** | 7-20 días |
| | | H | **-** | |
| | | P | **-** | |
| | | R | **+** | |

**Tabla 4. Pruebas de patogenicidad (Culbertson, 1959).** Porcentajes de virulencia obtenidos de 3 ensayos realizados con lotes de 5 ratones machos de la cepa CD-1, a los que se les inoculó vía intranasal $2x10^5$ trofozoítos de *A. castellanii* y *A. polyphaga*.

**+** Aislamiento positivo de amibas en órganos de ratones que murieron a causa de la infección en SNC.

**-** Aislamiento negativo de amibas en órganos de ratones que fueron sacrificados 21 días post-inoculación.

**C=**cerebro, **H=**hígado, **P=**pulmón, **R=**riñón.

## 13.6 EVALUACIÓN DE LA ADHERENCIA DE *Acanthamoeba* spp. A DIFERENTES SUPERFICIES

### 13.6.1 Adherencia a Lentes de Contacto

Debido a que los lentes de contacto son considerados como vectores de trofozoítos y quistes amibianos, este factor incrementa la incidencia de QA en usuarios de lentes de contacto, por lo cual se evaluó la adherencia a dos tipos de lentes de contacto blandos; Acuvue= Etafilcon A y Bescon= Hefilcon, por diferentes tiempos de interacción.

De acuerdo al análisis estadístico ANOVA las especies en estudio no mostraron diferencias de adherencia a los dos tipos de lentes; para Acuvue ($F= 1.99$, $p= 0.1830$), así como en los distintos tiempos de interacción ($F= 21.91$, $p= 0.1902$) y para Bescon ($F= 0.5635$, $p= 0.4673$), así como en los distintos tiempos de interacción ($F= 2.7247$, $p= 0.1057$).

Ver Tabla 5 y Figura 6 para lentes Acuvue (Etafilcon) y Tabla 6 y Figura 7 para lentes Bescon (Hefilcon).

En observaciones al microscopio de luz (40x), amabas especies en estudio mostraron una adherencia eficiente a ambos lados de las lentes (parte cóncava y convexa), fue posible ver un gran número de trofozoítos adheridos emitiendo sus acantópodos y en mayor proporción en los márgenes, debido a la curvatura de los segmentos.

| Tiempo (h) | Especie | Promedio de Trofozoítos Adheridos |
|---|---|---|
| 3 | AP | 51 |
| | AC | 958 |
| 6 | AP | 246 |
| | AC | 353 |
| 12 | AP | 109 |
| | AC | 52 |

**Tabla 5. Valores de Adherencia de *A. castellanii* y *A. polyphaga* a lentes de Contacto.** Se muestra los promedios obtenidos del número de trofozoítos adheridos a lentes de Acuvue (etafilcon), a través de los diferentes tiempos de interacción, los datos se obtuvieron por anti-logaritmo.
**AP:** *A. polyphaga*; **AC:** *A. castellanii*.

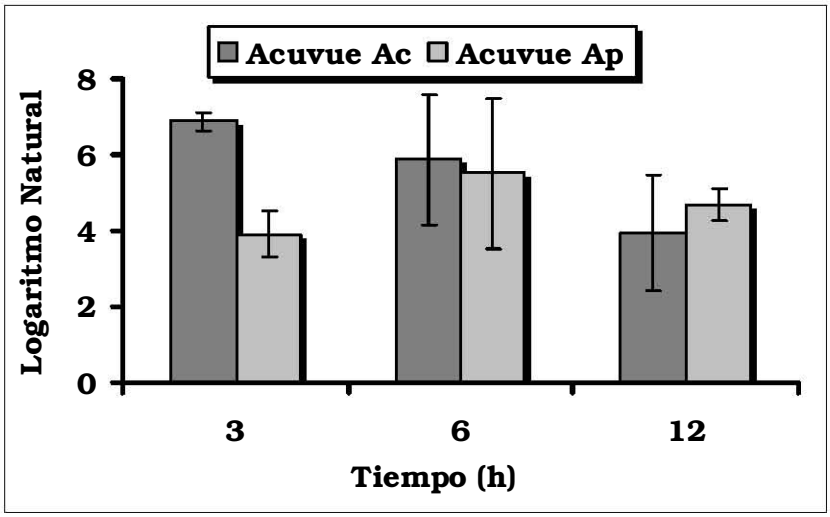


**Figura 6. Adherencia de *A. castellanii* y *A. polyphaga* a lentes Acuvue.** Se muestran los valores de adherencia obtenidos de las dos especies en estudio, a diferentes tiempos de interacción con segmentos de 25 $mm^2$ de lentes de contacto Acuvue (etafilcon). Los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos se muestran transformados a logaritmo natural. No hay diferencia significativa en la adherencia a los dos tipos de lentes ($F= 1.99$, $p= 0.1830$), así como en los distintos tiempos de interacción ($F= 21.91$, $p= 0.1902$).

| Tiempo (h) | Especie | Promedio de Trofozoítos Adheridos |
|---|---|---|
| 3 | AP | 399 |
| | AC | 531 |
| 6 | AP | 161 |
| | AC | 24 |
| 12 | AP | 236 |
| | AC | 236 |

**Tabla 6. Valores de Adherencia de *A. castellanii* y *A. polyphaga* a lentes de Contacto.** Se muestra los promedios obtenidos del número de trofozoítos adheridos a lentes de Bescon (hefilcon), a través de los diferentes tiempos de interacción (datos obtenidos por anti-logaritmo).
**AP:** *A. polyphaga*; **AC:** *A. castellanii*.

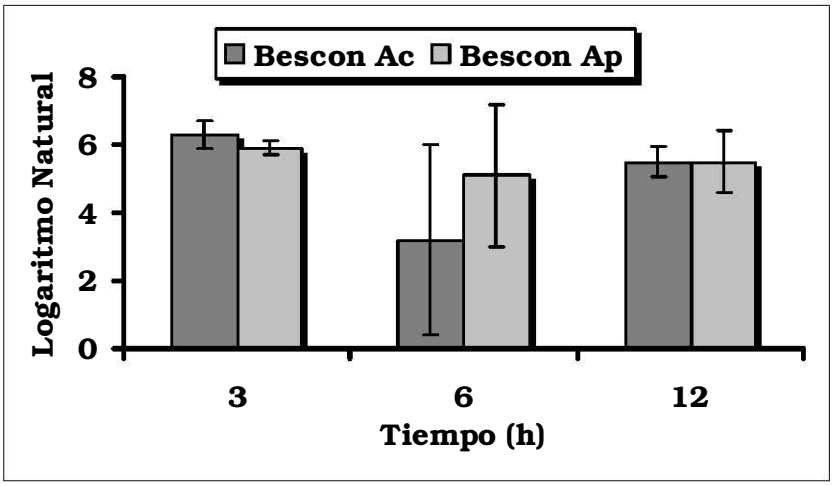


**Figura 7. Adherencia de *A. castellanii* y *A. polyphaga* a lentes de contacto Bescon.** Se muestran los valores de adherencia obtenidos de las dos especies en estudio, a diferentes tiempos de interacción con segmentos de 25 $mm^2$ de lentes de contacto Bescon (hefilcon). Los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos se muestran transformados a logaritmo natural. No hay diferencias significativas en la adherencia a los dos tipos de lentes (F= 0.5635, p= 0.467), y en los distintos tiempos de interacción (F= 2.724, p= 0.105).

### 13.6.2 Adherencia a Células MDCK

La adherencia constituye un paso crucial en los mecanismos de patogenicidad de las amibas y se relaciona con la capacidad de producir daño en la córnea, por lo que se consideró necesario realizar estos ensayos. Debido a que los datos no fueron normales estos fueron transformados a logaritmo natural (Kolmogorov-Smirnov).

Con los datos transformados se aplicó un análisis estadístico ANOVA de dos factores a partir del cual se determinó, que existen diferencias significativas en la adherencia de las dos especies en estudio ($F= 28.5$, $p= 0.000003$), así mismo hay diferencias a lo largo de los tiempos de interacción ($F= 5.6$, $p= 0.000094$). En la tabla 7 se muestran los datos en promedio de trofozoítos de *A. castellanii* y *A. polyphaga*, adheridos a monocapas de células MDCK en diferente tiempos de interacción.

La adherencia de *A. castellanii* fue proporcional al tiempo de interacción. Por su parte *A. polyphaga* presentó una adherencia significativamente menor, desde tiempos tempranos de interacción la cual se incrementa en relación al tiempo de interacción, ver curva de Adherencia (Fig. 8).

Las interacciones de *Acanthamoeba* spp. con células MDCK, se analizaron por microscopía de luz, donde fue posible observar la distribución de los trofozoítos a lo largo de las uniones celulares de las células MDCK, después de 2 h de interacción, ambas especies mostraron un modo similar de acción sobre la monocapa, aunque no es posible apreciar zonas con daño por medio de la Microscopía de Luz (contraste de fases 40x) (Fig. 9).

| Tiempo (min) | Especie | Promedio de Trofozoítos |
|---|---|---|
| 5 | AP | 71955 |
| | AC | 88870 |
| 10 | AP | 56848 |
| | AC | 64828 |
| 15 | AP | 51206 |
| | AC | 67920 |
| 30 | AP | 37809 |
| | AC | 65881 |
| 45 | AP | 43406 |
| | AC | 68326 |
| 60 | AP | 55274 |
| | AC | 72230 |
| 120 | AP | 54790 |
| | AC | 71818 |
| 180 | AP | 79597 |
| | AC | 91317 |

**Tabla 7. Valores de adherencia a células MDCK.** Promedios de adherencia de *A. castellanii* y *A. polyphaga* a MDCK por diferentes tiempos. Datos obtenidos por anti-logaritmo. **AP:** *A. polyphaga*; **AC:** *A. castellanii*.

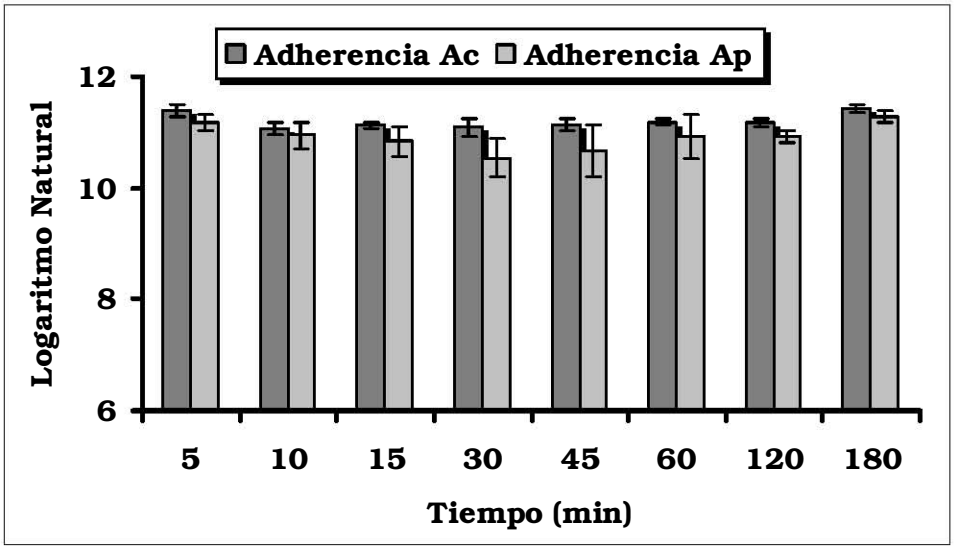


**Figura 8. Adherencia de *A. castellanii* y *A. polyphaga* a células MDCK.** Valores de adherencia obtenidos de ensayos por cuadriplicado a diferentes tiempos (F= 5.6, p= 0.000094). Datos transformados a logaritmo natural.

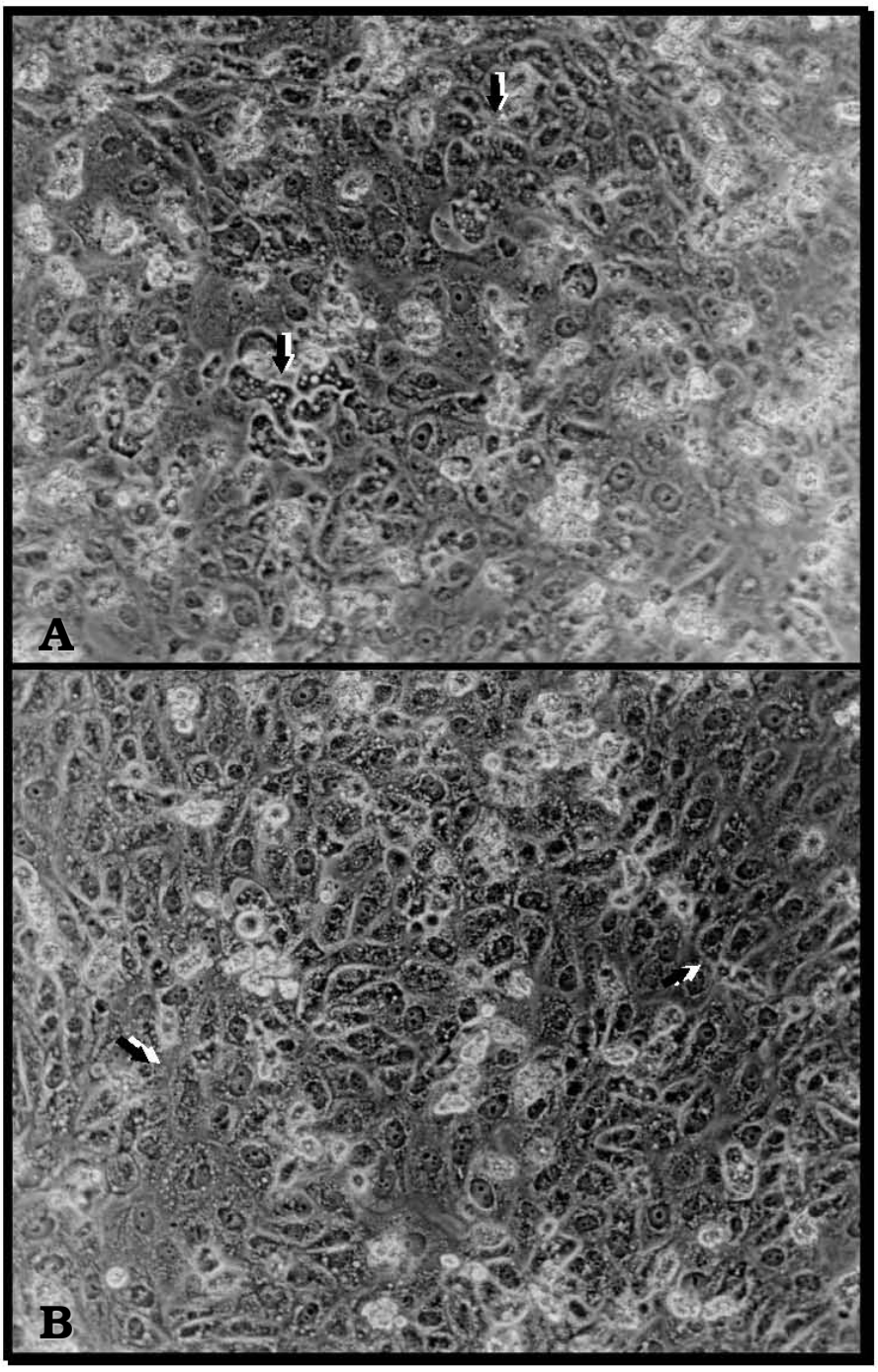


**Figura 9. Interacción de *Acanthamoeba* spp. con células MDCK.** Microscopía de Luz (contraste de fases 40x). **A).** y **B).** Interacción de 2 h *A. castellanii* y *A. polyphaga* respectivamente, se observan trofozoítos adheridos a la monocapa de células MDCK, distribuidos principalmente en las uniones intercelulares de las células MDCK (flechas), no se observan zonas con daño.

### 13.6.3 Evaluación cualitativa

Para tener un mayor detalle de los eventos que suceden durante la interacción de *Acanthamoeba* spp. con células MDCK, se recurrió a la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), para evaluar de manera cualitativa el daño producido por las amibas a la monocapa de células MDCK. A través de la MEB fue posible seguir la secuencia de la interacción, donde se determinó como primer paso la adherencia de las amibas a la monocapa, posteriormente la migración de los trofozoítos a las uniones intercelulares de las células MDCK y a continuación la separación celular y daño citopático así como áreas líticas desprovistas de células MDCK. En la interacción con *A. castellanii* desde tiempos tempranos (30 min) se observan trofozoítos emitiendo sus acantópodos, en grupos distribuidos en la monocapa (Fig. 10A). Después de 1 h de interacción, los trofozoítos migraron preferentemente hacia las uniones celulares, se aprecia un daño leve sobre la monocapa (Fig. 10B). A 1 h con 30 min se observó una pequeña zona con daño citopático (Fig. 10C). A mayor detalle se observa la interacción en el mismo tiempo, donde se aprecia un trofozoíto teniendo contacto con una zona de la monocapa con daño a través de la cual emite un pseudópodo (Fig. 10D). Después de 2 h el efecto citopático es mayor, hay diversas zonas líticas, es evidente el inicio de la separación celular de la monocapa de MDCK (10E). A 3h de interacción es posible ver áreas líticas desprovistas de células MDCK (10F). Con respecto a *Acanthamoeba polyphaga* después de interacción de 1 h, se observaron trofozoítos adheridos a las uniones intercelulares de la monocapa (Fig. 11A). Después de 1 h con 30 min son evidentes grupos de trofozoítos adheridos a las uniones celulares, así como el contacto de dos trofozoíto (Fig. 11B), así mismo se aprecian zonas con daño generalizado, debido al contacto de los trofozoítos con la monocapa (Fig. 11C). A 2 h es evidente un trofozoíto penetrando la monocapa de células MDCK, se aprecia la elevación de una célula MDCK, lo cual podría ser el inicio de la separación celular (Fig. 11D).

**Figura 10. Interacción de *A. castellanii* con células MDCK**. MEB **A).** Tiempo temprano de interacción (30 min.) se observa gran número de trofozoítos emitiendo sus acantópodos adheridos a la monocapa de células, distribuidos en las uniones intercelulares (flechas). **B).** 1h grupos de trofozoítos distribuidos en las uniones intercelulares, se aprecia un daño leve sobre la monocapa (flechas). **C).** 1 h con 30 min se observa una pequeña zona con efecto citopático (flecha). **D).** A mayor detalle se observa la interacción de 1 h con 30 min, donde se aprecia un trofozoíto teniendo contacto con una zona de la monocapa con daño a través de la cual emite un pseudópodo (Flecha). **E).** 2 h el efecto citopático es mayor, hay diversas zonas líticas, es evidente el inicio de la separación celular de la monocapa de MDCK (Flecha). **F).** A 3h se observan áreas líticas desprovistas de células MDCK (Cabeza de flecha). Tamaño de la barra= 10 μm.

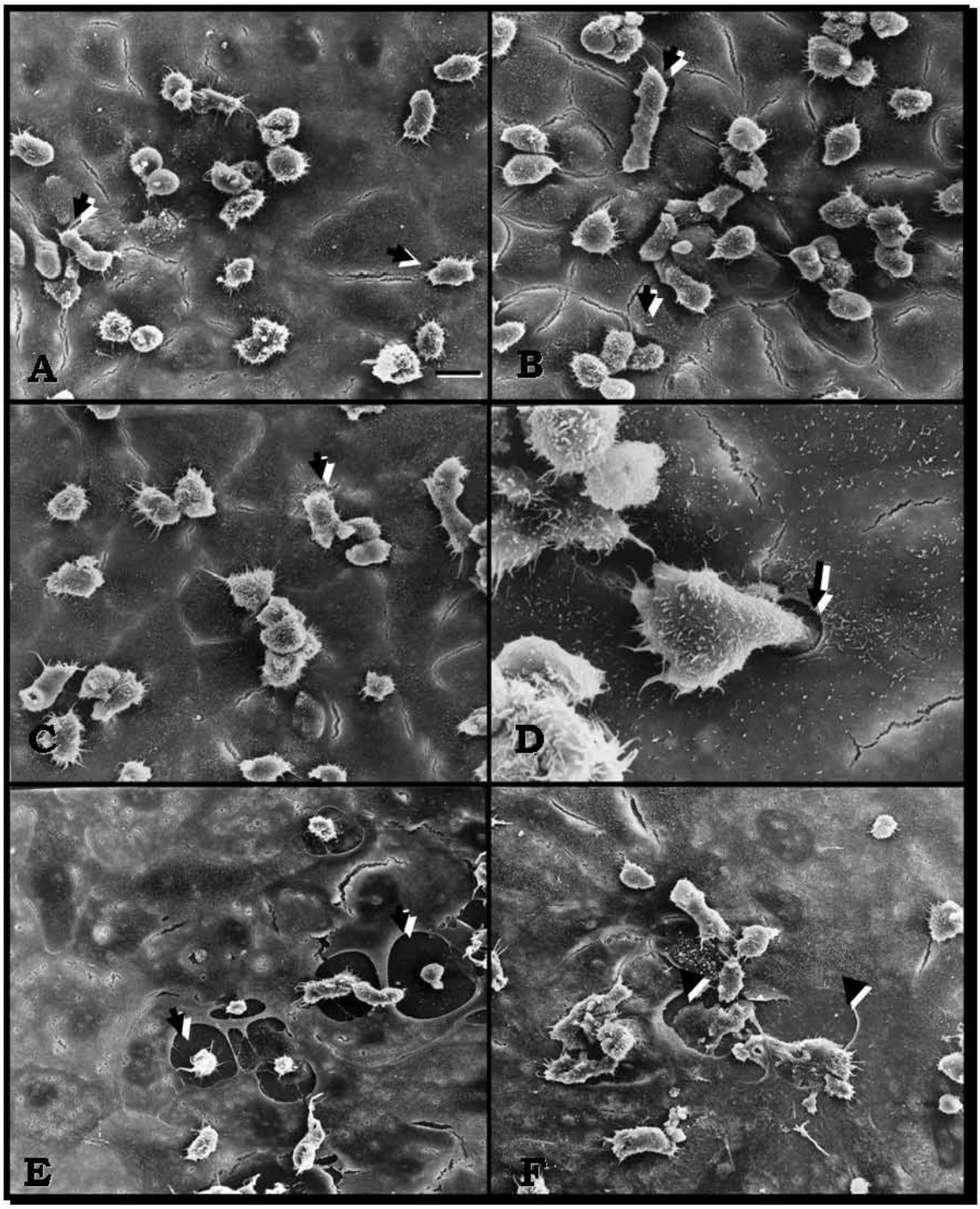


**Figura 10.**

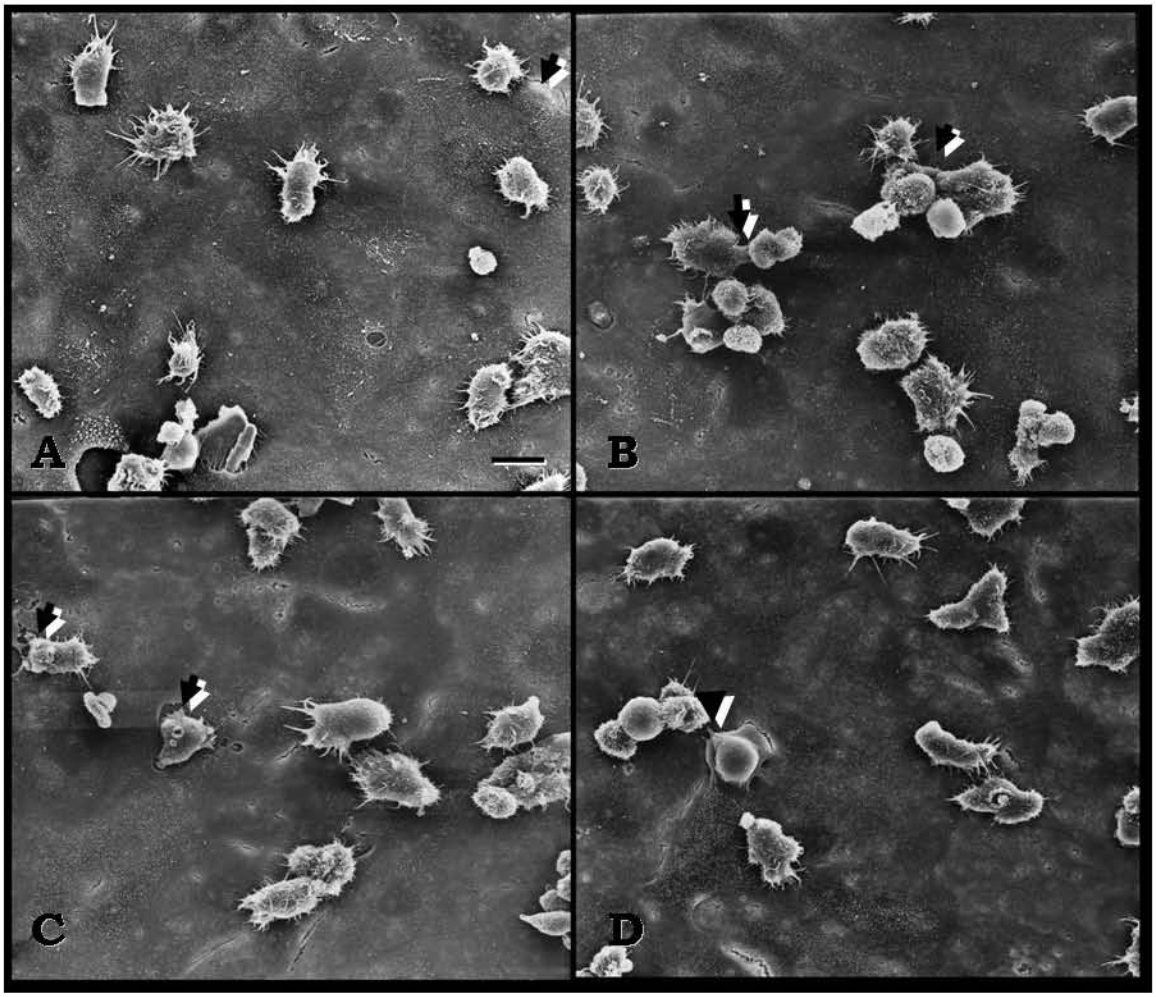


**Figura 11. Interacción de *A. polyphaga* con células MDCK.** MEB **A).** Interacción de 1 h, se observan trofozoítos adheridos a las uniones intercelulares de la monocapa (flecha). **B).** 1 h con 30 min. son evidentes grupos de trofozoítos adheridos a las uniones celulares, así como el contacto de dos trofozoíto (flechas). **C).** 1 h con 30 min hay zonas con daño generalizado, debido al contacto de los trofozoítos con la monocapa (flechas). **D).** 2 h es evidente un trofozoíto penetrando la monocapa de células MDCK, se aprecia la elevación de una célula MDCK, lo cual podría ser el inicio de la separación celular (cabeza de flecha).
Tamaño de la barra= 10 μm.

## 13.7 INTERACCIÓN *In vitro* DE *Acathamoeba* spp. CON CÓRNEA DE HÁMSTER

### 13.7.1 Análisis por MEB de la Interacción de *Acanthamoeba* spp. con Córnea de Hámster (*Mesocricetus auratus*)

Actualmente diversas investigaciones se inclinan por el uso de córneas de cerdo y hámster chino como modelos experimentales *In vitro* de QA (Niederkorn *et al.*, 1992; Omaña-Molina *et al.*, 2004), en los cuales se han obtenido buenos resultados, en este trabajo se decidió usar córneas de hámster (*Mesocricetus auratus*), mediante las cuales fue posible evaluar de manera cualitativa los posibles mecanismos de daño que son capaces de producir las amibas en la córnea del modelo animal. Ya que las especies de *Acanthamoeba* spp. mostraron gran eficiencia para adherirse y en algunos casos producir daño citopático en células MDCK, se consideró necesario evaluar el daño potencial en tejido corneal eligiendo para ello córneas de hámster. Para esto se evaluaron diferentes tiempos de interacción para determinar en que tiempo era más evidente el proceso invasivo que llevan a cabo las amibas en el epitelio corneal. Se consideraron tiempos de 30 min, 1, 2, 8, 12, 16, 20 y 24 h, siendo entre las 16 y 24 h los más óptimos de acuerdo a los objetivos de este trabajo. En las interacciones ambas especies provocaron una secuencia de eventos muy similares a los descritos con las células MDCK, aunque *A. castellanii* produce áreas de lisis más grandes lo que se traduce en un efecto citopático mayor en menor tiempo.

Por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), se evaluó de manera cualitativa el daño citopático producido por las especies en estudio, para ello se utilizaron córneas de hámster intactas las interacciones se llevaron a cabo a 16 y 24 h. Como controles se usaron córneas intactas interaccionadas solo con medio de cultivo, especifico para cada especie. En la figura 12 se muestra un corte de una córnea control, interaccionada por tiempos largos de interacción, la cual preserva en buen estado así como su organización celular, indicando que el medio como tal no es capaz de producir daño a la córnea.

En la Figura 13 se muestra la interacción de 16 h de *A. castellanii* con córnea de hámster, donde es posible ver que la córnea interaccionada mantiene su curvatura normal sin daño mecánico durante su procesamiento (Fig. 13A), así

también se aprecia una extensa zona con daño (Fig. 13B). Se observaron numerosos trofozoítos adheridos a toda la superficie corneal distribuidos específicamente en las uniones celulares de las células (Fig. 13C y 13D). Fue posible observar a un trofozoíto en el proceso de fagocitosis de una célula epitelial, donde se aprecia con claridad una estructura semejante a una boca fagocítica (Fig. 13E), lo que indica una posible fagocitosis, así mismo se vio un trofozoíto emitiendo sus acantópodos para hacer contacto con una célula epitelial (Fig. 13F), de manera general los trofozoítos se caracterizaron por la presencia de acantópodos. A 24 h la córnea mantiene la curvatura normal y presenta un daño evidente (Fig. 14A) y las amibas se ubican en capas profundas de la córnea (Fig. 14B). A mayor detalle se observan trofozoítos con una gran cantidad de acantópodos, en capas más profundas de la córnea y por ende la falta de una capa celular, dado que los trofozoítos se observan a un nivel más profundo, así también hay presencia de zonas desprovistas de células en la córnea (Fig. 14C y 14D). Durante la interacción fue posible observar en las amibas la presencia de estructuras semejantes a bocas fagocíticas, posiblemente para llevar a cabo la fagocitosis (Fig. 14E). Por otra parte también se observaron trofozoítos con el cuerpo amibiano alargado y emitiendo sus acantópodos, para tener contacto con dos células corneales a la vez (Fig. 14F). En la interacción de *A. polyphaga* con córnea de hámster por 16 h, se observa la desorganización de las células epiteliales, y no es posible diferenciar las células amibianas de las células epiteliales de la córnea. Mientras que a 24 h es posible observar la curvatura normal de la córnea (Fig. 15A), a mayor detalle se aprecia una desorganización de las células epiteliales así como trofozoítos de *A. polyphaga* rodeándolas con sus característicos acantópodos alrededor del cuerpo amibiano, sugiriendo una fagocitosis celular (Fig. 15B). En la figura 15C se observó con gran detalle a un trofozoíto abarcando una pequeña porción de una célula de la córnea, emitiendo acantópodos para rodearla. Así también se vio a un trofozoíto con el cuerpo amibiano algo alargado, emitiendo sus acantópodos, para tener contacto con dos células MDCK a la vez (Fig. 15D). Los resultados obtenidos con córneas de hámster, indican un modo similar de acción de las dos especies en estudio, aunque con diferencias notables en el grado del efecto citopático, ya que *A. castellanii* fue capaz de producir más daño en menor tiempo de interacción.

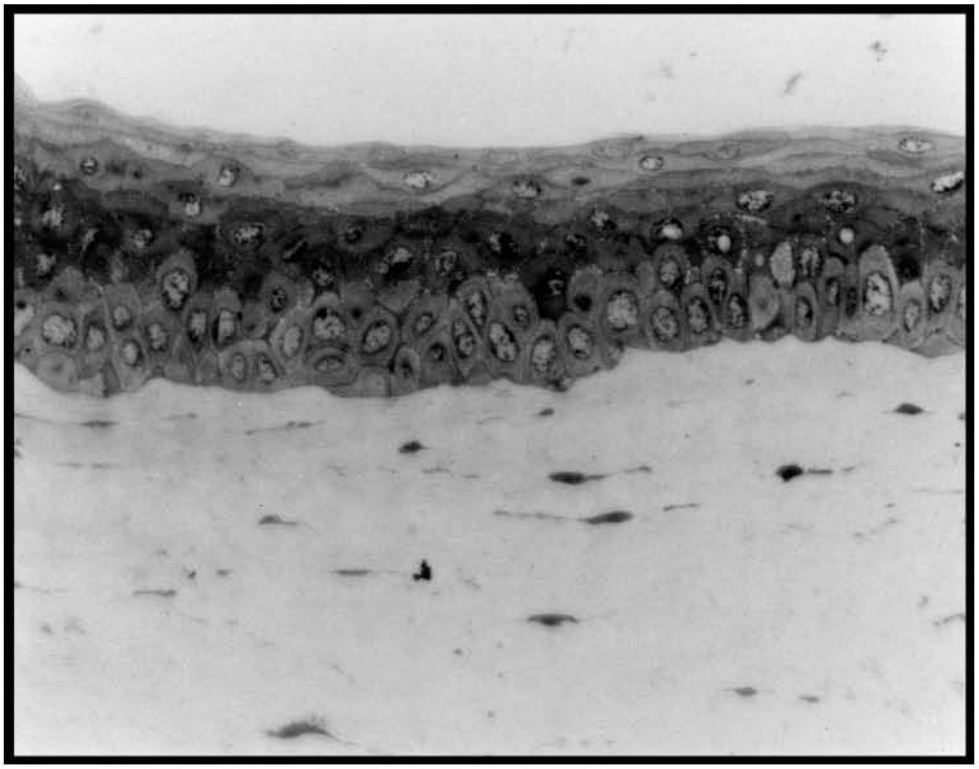

**Figura 12. Córnea Control interaccionada por tiempos largos.** Microscopía de luz (40x). Corte transversal de córnea de hámster, interaccionada con medio de cultivo por 24 h, se observa el buen estado del tejido así como la organización sin daño aparente, se aprecia la primera capa constituida por células epiteliales, seguida por células aladas y célula basales.

**Figura 13. MEB. Interacción de 16 h de *A. castellanii* con córnea de hámster. A).** De manera general se observa la córnea sin daño mecánico. Tamaño de la barra= 1 mm. **B)** Se aprecia una córnea con daño aparente en toda su superficie. Tamaño de la barra= 200 µm. **C)** y **D)** Se observa un gran número de trofozoítos adheridos a células epiteliales, distribuidas principalmente en las uniones celulares (flechas). **E)** Se observa el proceso de fagocitosis de una célula epitelial, así como la emisión de acantópodos y una boca fagocítica (flecha). Tamaño de la barra= 20 µm. **F)** Trofozoíto emitiendo acantópodos para hacer contacto con células epiteliales justo en la unión intercelular (flecha). Tamaño de la barra= 10 µm.

**T:** Trofozoíto, **Ce:** Célula epitelial.

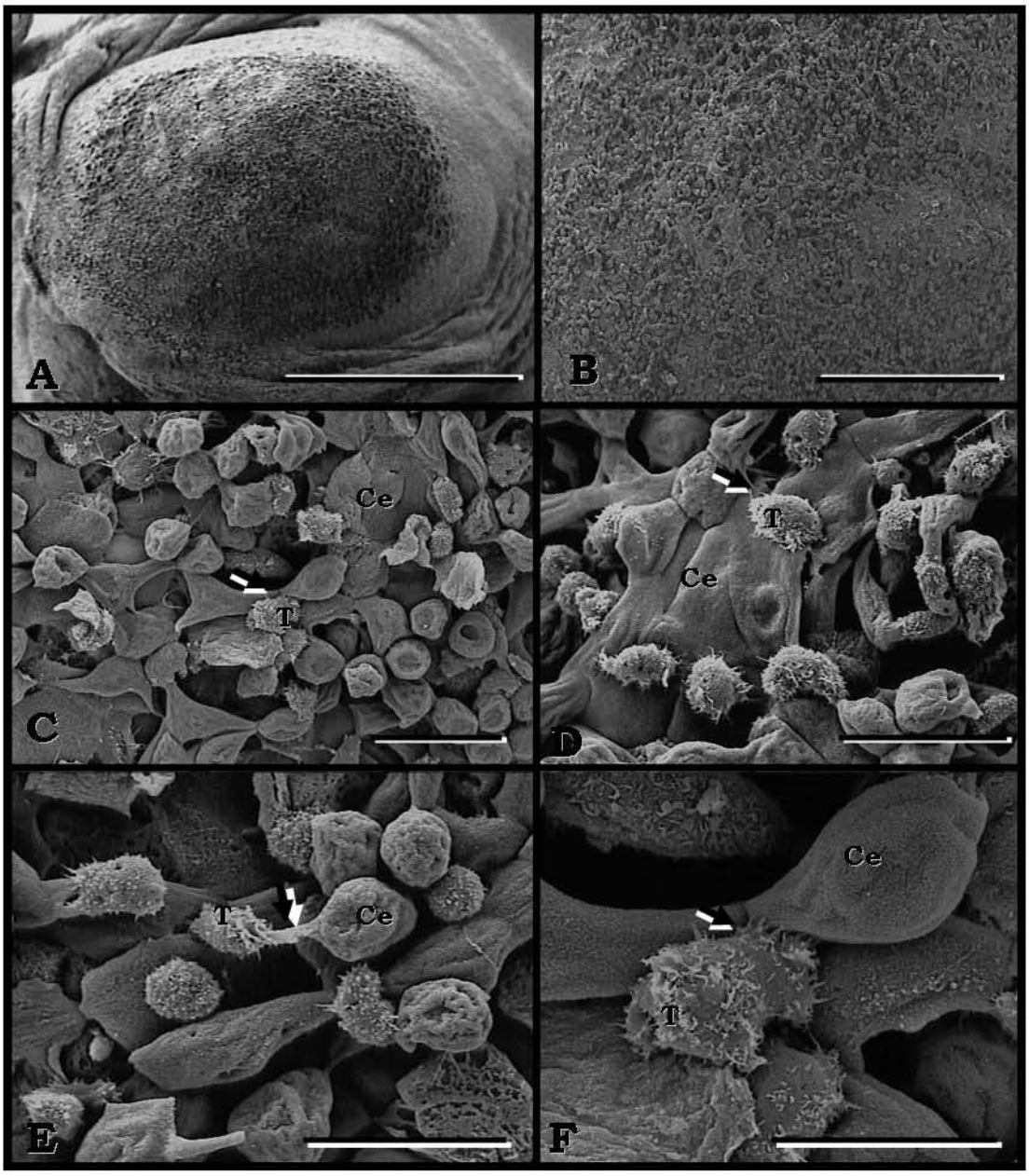


**Figura 13.**

**Figura 14. MEB. Interacción de 24 h de *A. castellanii* con córnea de hámster. A).** Córnea con curvatura normal, sin daño mecánico. Tamaño de la barra= 1 mm. **B).** Son evidentes diversas zonas con protuberancias con daño. Tamaño de la barra= 200 µm. **C)** y **D)** Se observan trofozoítos emitiendo sus acantópodos, se aprecian zonas desprovistas de células y amibas en capas más profundas (flechas). Tamaño de la barra= 20 µm. **E).** Es posible observar una amiba con una estructura semejante a una boca fagocíticas (flecha) **F).** Así también hay trofozoítos alargados emitiendo sus acantópodos, para tener contacto con dos células epiteliales a la vez (flecha). Tamaño de la barra= 20 µm.
**T:** Trofozoíto, **Ce:** Célula epitelial.

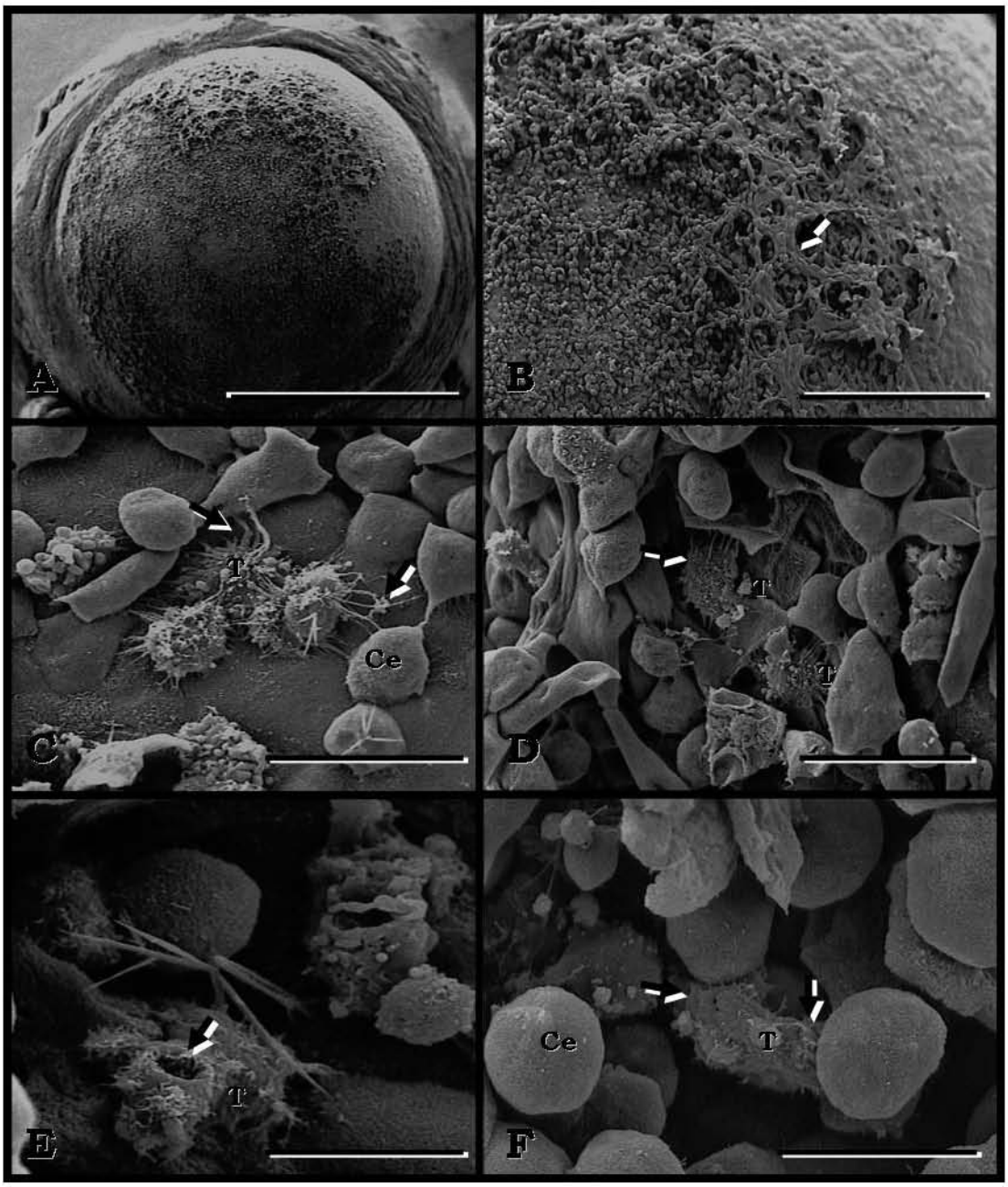


**Figura 14.**

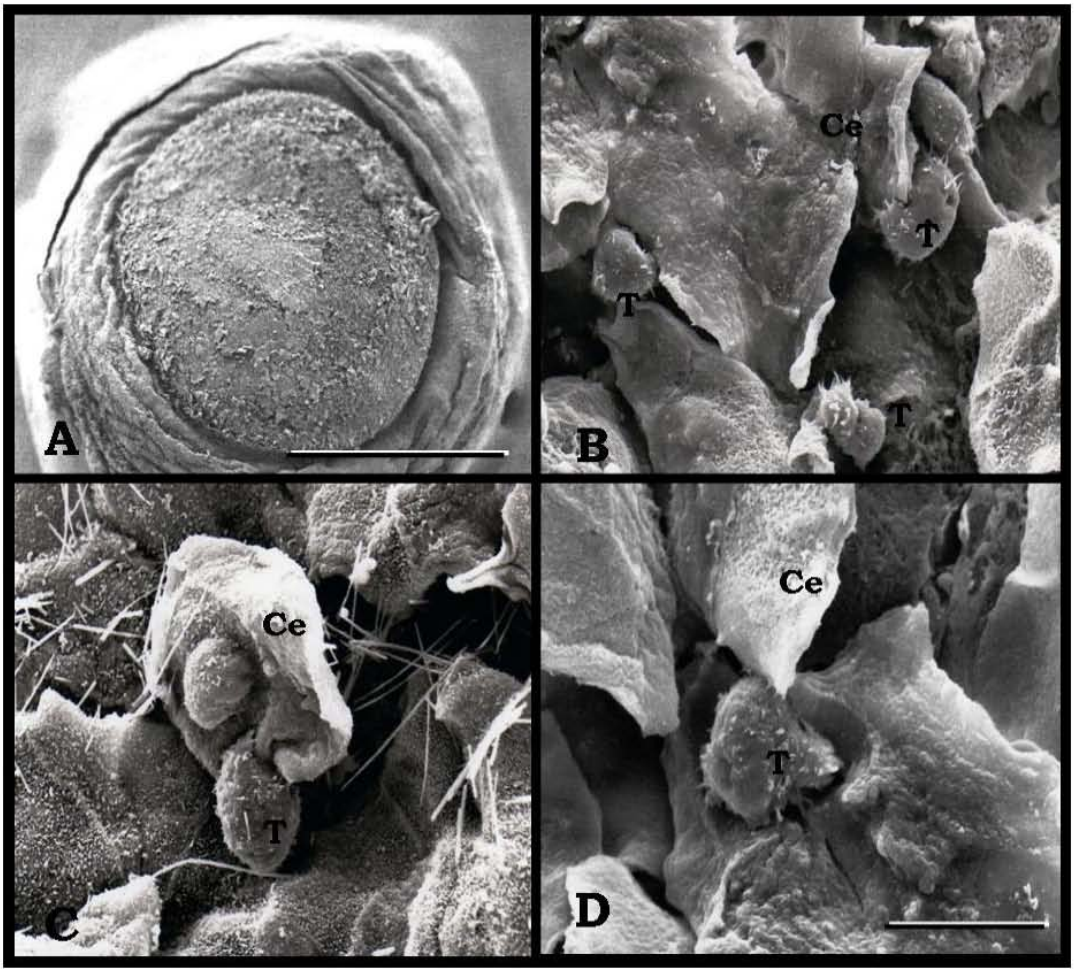


**Figura 15. MEB. Interacción de *A. polyphaga* con córnea de hámster. A).** Interacción de 24 h, se observa una córnea con la curvatura normal. Tamaño de la barra= 1 mm. **B).** a mayor detalle se aprecia una desorganización de las células epiteliales. Así mismo se observan trofozoítos de *A. polyphaga* rodeando a las células de la córnea con sus característicos acantópodos alrededor del cuerpo amibiano, sugiriendo una fagocitosis celular. **C).** trofozoíto abarcando una pequeña porción de una célula de la córnea, emitiendo acantópodos para rodearla zonas, para llevar a cabo la fagocitosis. **D).** Amiba algo alargada emitiendo sus acantópodos para tener contacto con dos células epiteliales.
Tamaño de la barra= 200 µm. **T:** Trofozoíto, **Ce:** Célula epitelial.

## 13.8 PAPEL INHIBITORIO DE LA IgA EN LA ADHERENCIA DE *Acanthamoeba* spp.

### 13.8.1 Inhibición de la Adherencia a Células MDCK

Se evaluó el papel inhibitorio de anticuerpos tipo IgA, sobre la adherencia de *A. castellanii* y *A. polyphaga* a monocapas de células MDCK por diferentes tiempos. De acuerdo al análisis estadístico, las especies en estudio presentaron diferencias significativas a través de los tiempos de interacción ($F= 2.24$, $p= 0.047$), y por ende la adherencia resultó significativamente diferente entre las dos especies, donde la adherencia de *A. castellanii* no se vio afectada en presencia de la IgA, en la figura 16 se muestra la comparación de los valores de adherencia en condiciones normales y en presencia de IgA, donde es posible apreciar que no existen diferencias significativas en la adherencia a lo largo de los diferentes tiempos de interacción. Sin embargo, la adherencia de *A. polyphaga* resultó significativamente inhibida en los diferentes tiempos, más visiblemente a los 45, 60, 120 y 180 min de interacción ($F= 14.27$, $p= 0.000438$) (Fig. 17). En la tabla 8 y figura 18 se comparan los valores de adherencia de las dos especies en estudio en presencia de IgA, donde se ve claramente que *A. polyphaga* fue la especies más susceptible a la presencia de la IgA con respecto a *A. castellanii*.

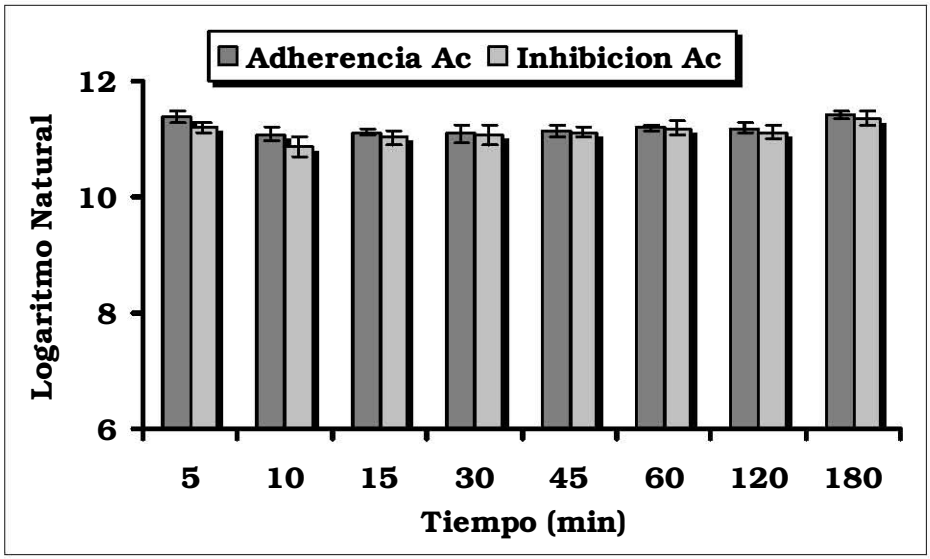


**Figura 16. Curva de Adherencia e Inhibición de *A. castellanii*.** Comparación de la adherencia de *A. polyphaga* a monocapas de células MDCK en condiciones normales y en presencia de IgA [300 µg/ml]. Ensayos por cuadriplicado. Los datos se muestran transformados a logaritmo natural.

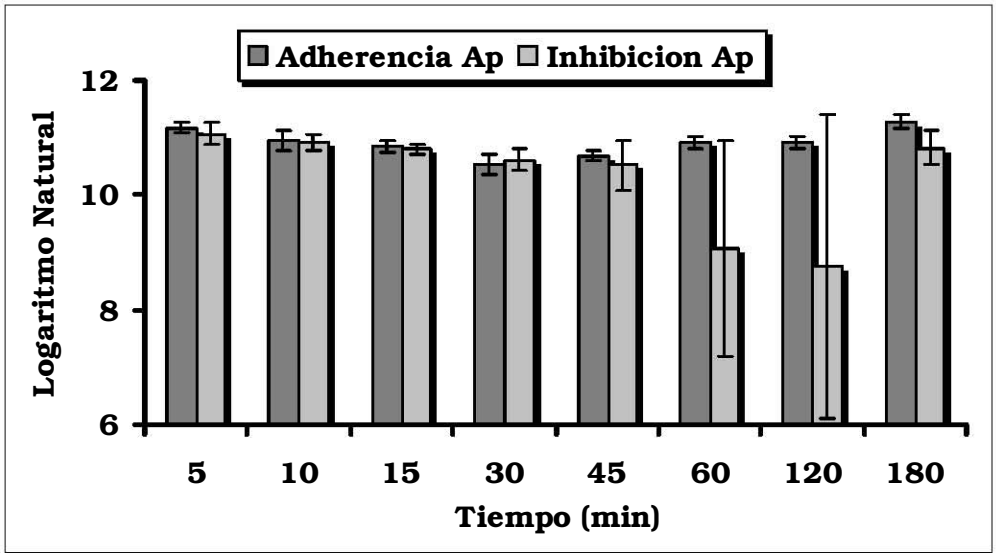


**Figura 17. Curva de Adherencia e Inhibición de *A. polyphaga*.** Comparación de la adherencia de *A. polyphaga* a monocapas de células MDCK en condiciones normales y en presencia de IgA [300 µg/ml]. Ensayos por cuadriplicado. Los datos se muestran transformados a logaritmo natural.

| Tiempo (min) | Especie | Promedio de Trofozoítos |
|---|---|---|
| 5 | AP | 64223 |
| | AC | 73095 |
| 10 | AP | 55225 |
| | AC | 52481 |
| 15 | AP | 49587 |
| | AC | 61281 |
| 30 | AP | 40905 |
| | AC | 64345 |
| 45 | AP | 37375 |
| | AC | 67148 |
| 60 | AP | 8701 |
| | AC | 71488 |
| 120 | AP | 6366 |
| | AC | 67285 |
| 180 | AP | 50267 |
| | AC | 85021 |

**Tabla 8. Valores de Adherencia de *Acanthamoeba* spp. a células MDCK.** Ensayo de inhibición de la adherencia (300 µg/ml de IgA), datos obtenidos por anti-logaritmo. **AP:** *A. polyphaga*; **AC:** *A. castellanii*.

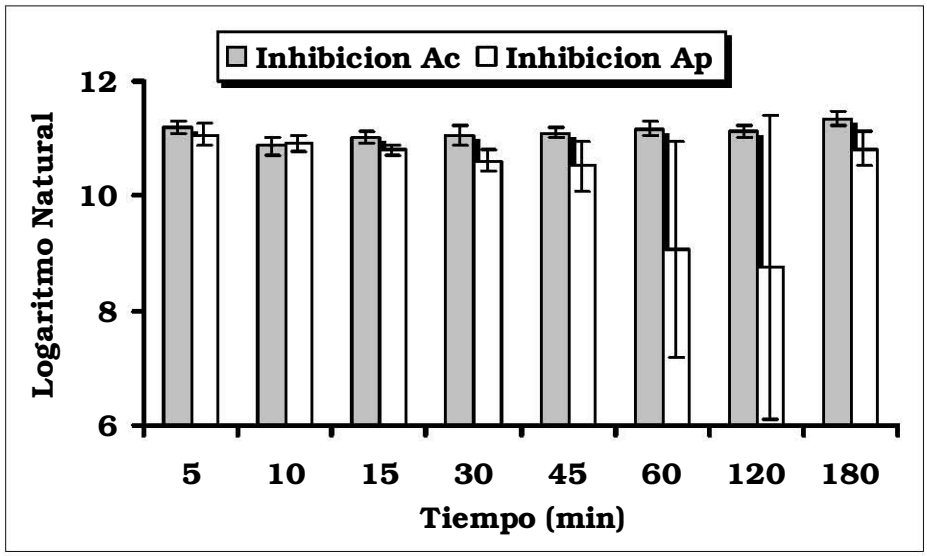


**Figura 18. Valores de adherencia de *A. castellanii* y *A. polyphaga*.** Ensayo de inhibición de la adherencia. Datos transformados a logaritmo natural. Las especies en estudio presentan diferencias significativas en la adherencia.
(F= 14.27, p= 0.000438), en los tiempos de interacción (F= 2.24, p= 0.047).

## 14.- DISCUSIÓN

La queratitis amibiana es una infección multifactorial, que depende del huésped y de las condiciones en que se propicie el contacto con la amiba, de acuerdo a los estudios biológicos que se han llevado a cabo en las diferentes especies del género *Acanthamoeba*, la capacidad de las amibas para producir queratitis depende directamente de la capacidad patógena y la virulencia que presenten (Khan, 2003). En este estudio se caracterizó a *A. castellanii* y *A. polyphaga*, que corresponden a las especies de mayor incidencia en casos reportados de QA. Debido a que presentan mayor adherencia a diversos sustratos, con respecto a otras especies, lo que explicaría en parte su mayor incidencia (Nagington *et al.*, 1974; Morton *et al.*, 1991).

Para caracterizar las especies en estudio inicialmente se evaluó la virulencia de las cepas, es decir la capacidad de las amibas de producir daño, esta prueba nos permitió hacer inferencias sobre el posible daño que son capaces de producir en el ser humano. Los resultados encontrados indican que *A. castellanii* fue la especie con mayor virulencia al causar la muerte de los animales así como una mayor capacidad invasiva, migrando e invadiendo diferentes órganos, con lo que podemos inferir que esta especie es potencialmente patógena para el hombre, aunque haya sido aislada de lentes de contacto de un individuo que no presentaba QA, lo que pudo deberse a diversos factores, tal como el tiempo de haberse establecido en los lentes, el uso y el estado inmunológico de la persona, lo que influyó para que no se hubiera manifestado una queratitis. En comparación *A. polyphaga*, presentó un bajo porcentaje de virulencia, ocasionando la muerte a un número reducido de animales e invadiendo pocos órganos sin embargo, esta especie fue aislada de lentes de contacto de un paciente, que presentaba queratitis amibiana con lo que podemos deducir que esta especie es igualmente patógena para el hombre.

Schaumberg y colaboradores (1998), reportan a *A. castellanii* y *A. polyphaga* como las especies patógenas más frecuentemente reportadas en casos de QA, relacionados con usuarios de lentes de contacto en el 85% de los casos. Por lo cual los lentes de contacto son considerados como vectores de trofozoítos y quistes amibianos, donde la adherencia de las amibas va a depender del contenido hídrico, ionicidad y de la composición de los polímeros utilizados en su

manufactura (Gorlin *et al.*, 1996). Partiendo de esto y considerando el origen de las especies en estudio se evaluó su adherencia a dos tipos de lentes de contacto; Acuvue (Etafilcon) y Bescon (Hefilcon), determinando que ambas especies se adhieren eficientemente a la superficie de los lentes aunque, sin diferencias significativas entre las cepas y el tipo de lente, observando gran cantidad de trofozoítos adheridos en la periferia de los dos tipos lentes. Lo que indica que en este caso, el contenido de agua como el tipo de polímero de los lentes no influyo en el incremento de la adherencia de las amibas, como lo reporto Gorlin *et al*, (1998). Partiendo de esto, podemos inferir que *A. castellanii* y *A. polyphaga* tienen la capacidad de adherirse eficientemente a lentes de contacto y llegar a la córnea en la cual podrían establecerse. Constituyendo un factor de riesgo para producir queratitis en usuarios de estos tipos de lentes de contacto (Ledee *et al.*, 1995; Morton *et al.*, 1991).

Por lo cual la adherencia es considerada como uno de los procesos de mayor importancia en la patogenesis de *Acanthamoeba*, se considera como el primer paso de las amibas para llegar a las células blanco y se relaciona con el efecto citopático que son capaces de producir (Panjwani et al., 1997; Yang *et al.*, 1997; Khan, 2003; Omaña *et al.*, 2006; González-Robles *et al.*, 2006). Cursons y Brown (1978), han sugerido que la mejor manera de evaluar si una cepa es patógena o no, es a través de la determinación del efecto citopático sobre células en cultivo, por lo que se ha convertido en el método alternativo para determinar la patogenicidad de cepas amibianas aisladas de casos clínicos y del ambiente. Lo cual fue confirmado al observar la adherencia de trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. a monocapas de células MDCK, donde aproximadamente el 90% de los trofozoítos de ambas especies estaban adheridos desde los tiempos tempranos, alcanzando valores máximos de adherencia después de 180 min de interacción. Siendo *A. castellanii* la especie que mayor adherencia presentó desde tiempos tempranos en relación a *A. polyphaga*. De manera general se observaron gran número de trofozoítos emitiendo sus acantópodos muy cerca de las uniones celulares, donde probablemente por efecto mecánico producen la separación celular y por ende penetran la monocapa, lo cual fue posible ver en las interacciones analizadas por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Indicando una gran eficiencia de ambas especies para adherirse a células en cultivo con respecto a superficies inertes como los lentes de contacto.

A diferencia de la mayoría de los trabajos en los que se evalúa el efecto citopático de las diversas especies del género *Acanthamoeba*, se ha encontrado que es necesario que transcurran varios días para observar un daño franco hacia numerosos tipos celulares (Halenda *et al.*, 1998). En nuestro estudio, las amibas mostraron un efecto citopático, desde las primeras horas de interacción lo que sugiere una virulencia mayor a la reportada en otras especies del género.

Actualmente se continua en la búsqueda de un modelo animal experimental ideal de queratitis amibiana, que semeje la condición humana para poder conocer los posibles mecanismos involucrados en la patogenicidad de *Acanthamoeba* spp. en la córnea, para ello se han utilizado diferentes animales de experimentación como diversas especies de ratón, rata, conejo, hámster chino y cerdo (Larking y Easty, 1990; Font *et al.*, 1990; Panjwani *et al.*, 1997; He *et al.*, 1992). Aunque los resultados no han sido concluyentes, se ha propuesto al hámster chino y al cerdo como animales de experimentación para el estudio de la queratitis amibiana (He *et al.*, 1992). De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo consideramos que el modelo experimental *in vitro* que constituye el hámster (*Mesocricetus auratus*), es adecuado para el estudio de los eventos tempranos de la queratitis amibiana concordando con lo reportado por Omaña-Molina y colaboradores, (2004). Mediante MEB, fue posible analizar las interacciones, en las cuales *A. castellanii* fue la especie que presentó mayor adherencia y daño citopático al epitelio corneal, observando gran cantidad de trofozoítos adheridos en toda la córnea, y un daño franco a la organización celular así como estructuras semejantes a amebostomas que indican un inicio de fagocitosis celular de acuerdo a lo reportado por Omaña *et al.*, (2004). Concordando con lo observado en células MDCK donde produjo un daño citopático considerable a la monocapa de células MDCK, desde tiempos tempranos. En base a la información determinada por medio del modelo animal y la interacción con células MDCK podemos inferir que esta especie es altamente patógena para el hombre, ya que cuenta con mecanismos específicos que le permiten ocasionar daño tanto a cultivos celulares como a la córnea, correspondiendo a su mayor eficiencia para adherirse como lo mencionan González-Robles *et al.*, (2006) y Omaña-Molina y

colaboradores, (2006). Los resultados obtenidos en la córnea de hámster indican que el proceso de invasión comienza con la adherencia de los parásitos solos o en grupos a las células del epitelio corneal, haciendo contacto mediante los acantópodos, para después adherirse completamente, y migrar a las uniones celulares separándolas y comenzando a penetrar y destruir capas más profundas de la córnea, la cual se lleva a cabo en un período de tiempo corto. Aunque solo *A. castellanii* presentó esta secuencia, en *A. polyphaga* se observó un número reducido de trofozoítos adheridos rodeando a células del epitelio corneal, indicando una posible fagocitosis. De manera general esta especie no fue capaz de producir un daño franco a la córnea, lo que discrepa con el daño moderado producido en la monocapa de células MDCK, lo que indica que no basta evaluar el daño citopático sobre cultivos celulares como lo reporta Cursons y Brown (1978) sino también evaluar la adherencia y daño a córneas de modelos animales. Por lo que nosotros planteamos el uso de córneas de hámster como modelo animal, para evaluar de manera más precisa la patogenicidad de una cepa. Constituyendo una herramienta útil, a partir de la cual se puede extrapolar a lo que ocurre en la córnea humana.

Aunque las especies en estudio mostraron diferencias morfológicas como el tamaño y el número de acantópodos, diferencias en los requerimientos nutricionales, en el tiempo para alcanzar su fase logarítmica de crecimiento, esto no parece ser determinante en el proceso de invasión, ya que los trofozoítos de ambas especies se comportaron de una manera muy semejante entre sí, llevando a cabo la misma secuencia de eventos tanto en la córnea del hámster, como en las células MDCK, lo que sugiere que los mecanismos de daño siguen un patrón muy semejante en los diferente sustratos analizados.

No obstante que la QA es particularmente una infección prevaleciente en usuarios de lentes de contacto también se presenta en personas sanas. Sin embargo, en la mayoría de las personas, existen mecanismos inmunológicos que les permiten prevenir el desarrollo de la queratitis ya que la exposición a *Acanthamoeba* spp. no necesariamente resulta en QA. Estudios recientes en animales indican que la presencia de anticuerpos IgA, en secreciones de la mucosa tienen un papel importante para que no se de la infección amibiana, ya que bloquean la adherencia de trofozoítos al epitelio corneal (Leher *et al.*, 1998).

En humanos se han detectado anticuerpos específicos contra *A. polyphaga* en suero, saliva y calostro, que tienen la capacidad de inhibir la adherencia de la amiba a lentes de contacto y a células MDCK, sugiriendo que los anticuerpos IgA en lágrima pueden participar en la resistencia a la invasión amibiana (Campos-Rodríguez *et al.*, 2004). Por ello se decidió evaluar la capacidad de la IgA purificada de calostro humano, para inhibir la adherencia de las especies en estudio. Mediante análisis cuantitativo se determinó que *A. castellanii* no se ve inhibida significativamente en presencia de la IgA, lo que sugiere que la concentración usada no fue la óptima o que esta especie muy probablemente cuenta con mecanismos eficientes que le permiten evadir la acción de anticuerpos, lo que le facilitaría de manera natural la entrada al huésped. En contraste la adherencia de *A. polyphaga* se vio inhibida significativamente desde tiempos tempranos mostrando una leve recuperación, estos resultados concuerdan con los encontrados por Campos-Rodríguez *et al.*, (2004), los cuales reportan que la adherencia de *A. polyphaga* se ve inhibida en presencia de IgA a una concentración de 200 µg/ml mientras que en este trabajo se uso una concentración mayor lo que indica que la concentración usada inhibe la adherencia sin embargo, no podemos afirmar con certeza que sea capaz de inhibir la adherencia por un tiempo largo.

## 15. CONCLUSIONES

A través de la implementación del modelo animal con córnea de hámster, fue posible demostrar que, los trofozoítos de *A. castellanii* y *A. polyphaga* que son las especies más frecuentemente aisladas de casos de QA en el humano, son capaces de invadir y provocar daño al epitelio corneal intacto sin necesidad de inducir abrasión corneal previa a su interacción. Además se puede afirmar que el daño observado es producido por los trofozoítos y sus productos. Ya que las especies aisladas fueron capaces de provocar un efecto citopático en cultivo de tejidos, así como de invadir diferentes órganos cuando fueron inoculados por vía intranasal en animales de experimentación.

Los trofozoítos de ambas especies en estudio se comportaron de una manera muy semejante entre sí y llevan a cabo la misma secuencia de eventos tanto en córnea del hámster, como con células MDCK, lo que sugiere que los mecanismos de daño de las amibas siguen un patrón muy semejante en los diferentes sustratos biológicos utilizados. Además el daño y la desorganización celular producido fue dependiente del tiempo de interacción. La sucesión de eventos consistió en: adherencia, migración preferentemente hacia las uniones celulares, penetración y destrucción celular, la cual se lleva a cabo en un periodo de tiempo corto.

Sin embargo, ambas especies también mostraron diferencias significativas en la inhibición de la adherencia en presencia de IgA, lo que nos permite considerar la capacidad de *A. castellanii*, para evadir la acción de los anticuerpos.

Con todo esto se puede concluir que los cultivos celulares y córnea de hámster como modelo *In vitro* de QA permiten caracterizar de manera cuantitativa y cualitativa los eventos que acontecen en las diferentes etapas de la infección, abriendo la posibilidad de extrapolar a lo que ocurre en la córnea humana durante la infección.

Constituyendo el hámster un modelo ideal para estudios tempranos de interacción huésped parásito, por lo que proponemos la utilización de esta especie para otros estudios relacionados con esta patología, especialmente con aquellos relacionados con la patogenesis de la infección. Las principales ventajas son su fácil manipulación de los animales y poseer un prominente cristalino el cual facilita su manipulación, así mismo sostiene y mantiene la curvatura del tejido corneal mientras la interacción se lleva a cabo.

**Directora de Tesis:**

**Dra. Maritza Omaña Molina**

**Asesoras:**

**Dra. Patricia Bonilla Lemus**

**M. en C. Elizabeth Ramírez Flores**

**Dra. Ma. Del Rosario Sánchez Rodríguez**

**M. en C. Ma. Dolores Hernández Martínez**

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología Ambiental, perteneciente al proyecto de conservación y mejoramiento del ambiente (CyMA). Durante la realización de este trabajo se contó con la beca del proyecto DGAPA-PAPIIT-IN-219406, UNAM.

## 16. PERSPECTIVAS

El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar y evaluar posibles diferencias inter-especificas de dos especies de *Acanthamoeba* aisladas de lentes de contacto, sin embargo, aun quedan estudios por realizar para tratar de explicar por completo los mecanismos de patogenicidad de *Acanthamoeba*, entre estos están:

- Determinar el papel que juegan las proteasas amibianas, en la diferencia del efecto citopático que es capaz de producir *A. castellanii* con respecto a *A. polyphaga* y con ello explicar las diferencias inter-especificas que presentan.

- Determinar la concentración óptima de IgA para inhibir eficazmente la adherencia de *Acanthamoeb*a spp. y establecer si la amiba cuenta con mecanismos específicos para evadir la acción de los anticuerpos.

- Evaluar la adherencia de *Acanthamoeba* spp. a diferentes tipos de lentes, determinar si el tipo de lente influye en el incremento de la adherencia así como también evaluar el papel inhibitorio de la IgA en la adherencia de *Acanthamoeba* spp. a lentes de contacto.

# 17. A N E X O S

## ANEXO 1

## MEDIOS DE CULTIVO

Medios sólidos y líquidos utilizados para mantener las cepas amibianas en el laboratorio.

### 1.1 Agar no nutritivo (NNE) con *Enterobacter aerogenes*

| | |
|---|---|
| NaCl | 120 mg |
| $MgSO_4$ $7H_2O$ | 4 mg |
| $CaCl_2$ $2H_2O$ | 4 mg |
| $Na_2HPO_4$ | 142 mg |
| $KH_2PO_4$ | 136 mg |
| Bactoagar | 15 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Se mezclan las sales y el agar, se agrega el agua y se pone a hervir durante 1 min. Se esteriliza a 15 lb de presión durante 15 min. Se pone 20 ml de agar NNE en cajas petri de vidrio de 100 x 15 mm.

Al medio solidificado se le agrega 0.5 ml de un concentrado bacteriano de *Enterobater aerogenes* disuelto en agua destilada y se extiende en toda la caja para que quede una película de bacteria. Se dejan solidificar a temperatura ambiente, las cajas ya preparadas se guardan en bolsas de plástico a 4 °C. Antes de usarse deben estar a temperatura ambiente.

La muestra a sembrar puede ser: raspado o biopsia de córnea, lentes de contacto, y soluciones de limpieza. Para ello resuspender en solución de Page y centrifugar a 1000 r. p. m. durante 10 min. Sembrar de 2 a 3 gotas del sedimento en el centro de la placa, marcando externamente la zona e incubando a 37 °C de forma invertida en bolsas de plástico para mantener la humedad (Page, 1988).

### 1.2 Bactocasitona al 2%

| | |
|---|---|
| Bactocasitona Difco | 2 g |
| Agua destilada | 100 ml |

Se disuelve la Bactocasitona en agua destilada. Se coloca 2.7 ml en tubos con tapón de rosca de 16x128 mm, y se esterilizan a 15 lb de presión a 121 °C, durante 15 min. Se agrega 1 ml de la mezcla de antibiótico (kanamicina/penicilina) por cada 100 ml de suero descomplementado, para obtener una concentración de 200 mcg de cada antibiótico en 3 ml de medio. Antes de utilizar los tubos de cultivo se adiciona 0.3 ml de suero de ternera.

### 1.3 Medio Chang Modificado

| | |
|---|---|
| Peptona Biotriptasa | 16.6 g |
| Dextrosa | 2.7g |
| $Na_2HPO_4$ | 1.5 g |
| $KH_2PO_4$ | 0.9 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Se mezclan los componentes diluyéndolos lentamente en agua destilada. Se coloca 2.7 ml en tubos con tapón de rosca de 16x128 mm, y se esterilizan. Antes de utilizar los tubos también se adiciona 0.3 ml de suero de ternera quedando al 10% y 1 ml de antibiótico y se guardan a 4 °C.

### 1.4 Medio Dulbeco D-MEM de Gibbco

Al medio MEM, se le adiciona 3.7 g de Bicarbonato de sodio, se ajusta el pH a 7.2 y se esteriliza por filtración. Se complementa con suero fetal bovino al 10%, antibiótico (Penicilina-Estreptomicina al 1%) e insulina al 1%. Las células se mantienen en cultivo en un medio de $CO_2$ al 5.0 %, a 37 °C. Cuando la monocapa de células MDCK este formada, se lava 2 veces con PBS estériles incuba a 37 °C durante 20 min, se retira el PBS y se adiciona 1 ml de tripsina-verseno al 0.5% y se incuba a 37 °C durante 10 min. Se golpea ligeramente la caja para favorecer su desprendimiento y se toma un inoculó y se pasa a una caja con medio nuevo.

## ANEXO 2

## DETERMINACIÓN DE LA ADHERENCIA DE TROFOZOÍTOS DE *Acanthamoeba* spp. A CÉLULAS MDCK

Se usan placas de cultivo de 96 pozos con células MDCK confluentes (Mayde Derby cell Kidney).

Se inicia a partir de cultivos amibianos en fase exponencial de crecimiento, se colocan 75000 trofozoítos en 100 µl de medio limpio en placas de 96 pozos con monocapas de células MDCK y se interacciona por diferentes tiempos: 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 y 180 min a la temperatura óptima de la cepa. Pasado cada tiempo de interacción se fija con 75 µl de glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilato al 0.1 M.

Una vez llevada a cabo las diferentes interacciones, se lava la placa 6 veces con PBS-Tween al 0.05%.

Se bloquea la placa con 200 µl de caseína al 1%, toda la noche a 4 °C o bien 3 h a temperatura ambiente.

Se lava la placa 5 veces con PBS-Tween al 0.05% y se añade 100 µl de IgG anti-*Acanthamoeba* (1:8000 para *A. castellanii* y 1:4000 para *A. polyphaga*), se incuba por 2 h a 37 °C o bien toda la noche.

Posteriormente se lava la placa 5 veces con PBS-Tween 0.05%. Y se adicionan 100 µl de la disolución 1: 50 000 del conjugado anti-IgG de conejo y se incuba 1 h a 37 °C.

La placa se lava 5 veces con PBS-Tween al 0.05%.

Agregar 100 µl de solución reveladora, se deja 10 min y sin tirar, se detiene la reacción con 50 µl de $H_2SO_4$ al 2.5 M.

Se hacen las lecturas en un lector de Microplacas de ELISA (Bio-rad, modelo 550) con filtro a una longitud de onda de 490 nm (Campos-Rodríguez *et al.*, 2004).

## ANEXO 3

### 3.1 Solución PBS (Buffer de fosfato) 1X

| | |
|---|---|
| NaCl | 8.0 g |
| KCl | 0.2 g |
| $Na_2HPO_4$ | 1.15 g |
| $KH_2PO_4$ | 0.2 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Disolver los componentes lentamente en agua destilada y ajustar el pH a 7-7.2.

### 3.2 Solución Reveladora

A).-Ácido cítrico 0.1 M (19.2 g para 1000 ml de agua destilada).

B).-Fosfato dibásico de Sodio 0.2 M (28.4 g para 1000 ml de agua destilada).

Antes de emplearse se mezclan:

Solución A 24.3 ml

Solución B 25.7 ml

Agua destilada 50 ml

Total 100 ml

Se mide el pH y se ajusta a 5.0

Al momento de usarse se agrega:

40 mg de Ortofenilendiamina para 100ml

40 µl de Peroxido de hidrógeno al 30% para 100ml.

### 3.3 Glutaraldehído al 2.5% en Amortiguador de Cacodilato de Sodio 0.1 M

### *Amortiguador de Cacodilato de Sodio 0.2 M

Este reactivo debe prepararse en campana de extracción, pesar 17.12 g de Cacodilato de Sodio ($Na\ (CH_3)_2\ AsO_2$). Disolver en 100 ml de agua destilada, ajustar pH a 7.2; aforar a 400 ml, etiquetar y guardar a 4 °C. Se utilizan 95 ml de Cacodilato de Sodio 0.2 M a los cuales se le adiciona 95 ml de agua destilada para tener una solución 0.1 M, y disolver poco a poco los 2 ml de la ampolleta de glutaraldehído al 75%. Etiquetar y guardar la solución a 4 °C.

## ANEXO 4

## TÉCNICA CONVENCIONAL PARA MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2.5% durante 1 h, a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de fijación, las muestras se lavaron con amortiguador de Cacodilato de Sodio 0.1M a pH 7.2 por 5 min para quitar el exceso de fijador.

Posteriormente deshidratar con diferentes grados de etanol (70%-90%) durante 10 min en cada uno de estos, finalmente se deshidrata la muestra en etanol al 100%, dos veces por 10 min.

Posteriormente se secaron a punto crítico con $CO_2$ en un aparato Samdri-780 (Tousimis, Rockville Maryland, USA). Posteriormente las muestras se montaron en porta muestras con plata coloidal. Se cubrieron con una capa de oro (Fine coat Ion sputter, JEOL JFC-1100).

Posteriormente se observaron al microscopio Electrónico de barrido, modelo XL30 ESEM (Fei Company, Eindhoven, The Netherlands).

## ANEXO 5

## PURIFICACIÓN DE IgA (PROTÓCOLO PIERCE)

Columna de jacalina (20 ml) preservada en azida de sodio al 0.02%.

Equilibrar la columna adicionando al menos 5 volúmenes de la columna con buffer de unión.

Adicionar el calostro desgrasado a volúmenes iguales con buffer de unión, centrifugar si es necesario y adicionar el sobrenadante a la columna. Lavar la columna con un volumen 8 veces (40 ml) el de esta, adicionando buffer de unión o hasta que el buffer recuperado alcance la absorbancia 0.0. Leer el efluente a 280 nm. Eluír la $IgA_1$ unida usando alícuotas de 2 ml del buffer de elusión hasta alcanzar la absorbancia basal. Se colecta el eluído en alícuotas y se mantiene en hielo frape.

Se monitorea la absorbancia a 280 hasta determinar la absorbancia basal.

Intercambiar el buffer de unión de la muestra seleccionada, dializando para remover la melibiosa o galactosa (Dializar con PBS de unión durante 24 h a 4 °C).

PBS de unión (pH 7.4): 0.1 M $Na_2HPO_4$, NaCl 150 mM.

PBS de elusión 0.1 M α-galactosa en PBS de unión.

### 4.1 Determinación de proteínas (IgA) purificada de calostro humano en placa de ELISA por el método de Microbradford

Utilizar albúmina sérica bovina y el eluído de PBS-anticuerpo (IgA). Colocar 0, 1-7 µl de albúmina por triplicado, y 2-6 µl de IgA por triplicado, adicionar 40 µl de reactivo de Bradford 5X, y llevar las muestras a 160 µl con PBS 1X. Preparar blancos (160 µl de PBS 1X+40 µl de reactivo de Bradford 5X). Las lecturas se hicieron en un lector de ELISA (Bio-rad, modelo 550) con filtro de 590 nm.

### Reactivo de Bradford

Pesar 100 mg de coomasie azul brillante G-250, disolver en 50 ml de etanol al 95% y 100 ml de ácido fosfórico, aforar a 200 ml con agua desionizada. Estable a 4 °C por 6 meses.

## 18. BIBLIOGRAFIA


Aksokek, A., McClelian, K., Howard, K., Niederkorn, J. Y. and Alizadeth, H. 2002. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical and radiological conditions. *J. Parasitol.* 88 (3): 621-623.

Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W., Taylor, M. F. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52 (5): 399-451.

Alizadeh, H., Pidherney, M. S., McCulley, J. P. and Niederkorn, J. Y. 1994. Apoptosis as a mechanism of cytolysis of tumor cells by a pathogenic free living amoeba. *Infect. Immun.* 62 (4): 1298-1303.

Alizadeh, H. P., Apte, S. B., El-Agha, M. S. H., Li, L. M., Hurt, M. B., Howard, K. M., Cavanagh, H. D., McCulley, J. P., Niederkorn, J. Y. 2001. Tear IgA and Serum IgG Antibodies Against *Acanthamoeba* in Patients with *Acanthamoeba* Keratitis. *Cornea.* 20 (6): 622-627.

Alizadeh, H., Neelam, S., Hurt, M. and Niederkorn, J. Y. 2005. Role of contact lens wear, bacterial flora, and mannose induced pathogenic protease in the pathogenesis of amoebic keratitis. *Infect. Immun.* 73 (2): 1061-1068.

Allen, P. G. and Dawidowiez, E. A. 1990. Phagocytosis in *Acanthamoeba* I. A mannose receptor is responsible for binding and phagocytosis of yeast. *J. Cell. Physol.* 145 (3): 508-513.

Bacon, A. S., Dart, J. K., Ficker, L. A., Mathison, M. M. and Wright, P. 1993. *Acanthamoeba* keratitis: the value of early diagnosis. *Ophthalmol.* 100 (8): 1238-1243.

Barker, J., Humphrey, T. J. and Brown, M. W. 1999. Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS. Microbiol. Lett.* 173: 291-295.

Bowers, B., and Korn, E. D. 1968. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* I. The trophozoite. *J. Cell Biol.* 39 (1): 95–111.

Bonilla, P., Esparza, A., Hernández, D., Rojas, S., Rodríguez, M. A. 2001. Mixed brain infection by *Acanthamoeba* sp. and *Aspergilus* sp.: case report. In: IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings. Billot-Bonef, S., Cabanes, P. A., Marciano-Cabral, F., Pernin, P., Pringuez, E. Jonh Libbey. Paris. 19-25.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities of protein, utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 7 (72): 248-254.

Campos-Rodríguez, R., Oliver-Aguillón, G., Vega-Pérez, L. M., Jarillo-Luna, A., Hernández-Martínez, D., Rojas-Hernández, S., Rodríguez-Monroy, M. A., Rivera-Aguilar, V. and González-Robles, A. 2004. Human secretory IgA inhibits adherente of *Acanthamoeba polyphaga* to epithelial cell and contact lenses. *Can. J. Microbiol.* 50 (9): 711-718.

Cancrini G., Iori, A. and Mancino, R. 1998. *Acanthamoeba* adherence to contact lenses, removal by rinsing procedures, and survival to some ophthalmic products. *Parassitol.* 40 (3): 275-278.

Cao, Z., Jefferson, D. M. and Panjwani, N. 1998. Role of carbohydrate mediated adherence in cytophathogenic mechanisms of *Acanthamoeba*. *J. Biol. Chem.* 273 (25): 15838-15845.

Cirillo, J. D., Falkow, S. and Tompkins, L. S. 1994. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect. Immun.* 62 (8): 3254-3261.

Cursons, R. T. and Brown, T. J., 1978. Use of cells cultured as an indicator of pathogenicity of free-living amoebae. *J. Clin. Pathol.* 31: 681-685.

Culbertson, C. G., Smith, J. W., Cohen, H. K. and Minner, J. R. 1959. Experimental infection of mice and monkey by *Acanthamoeba*. *Am. J. Pathol.* 35 (1): 185-197.

De Jonckheere, J. F. 1981. Pathogenic and Nonpathogenic *Acanthamoeba* spp. In Thermally Polluted Discharges and Surface waters. *J. Protozool.* 28 (1): 56-59.

Elder M. J., Kilvington, S. and Dart, J. K. G. 1994. A clinicopathologic study of in vitro sensitivy testing and *Acanthamoeba* keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35 (3): 1059-1064.

Font, R., Tapert, M. J., Robinson, N. M., Osato, M. S. and Jones, D. B. 1990. An animal model of *Acanthamoeba* keratitis. *Invest. Ophthamol. Vis. Sci.* 35 (4): 8.

Fowler, M. and Carter, R. F. 1965. Acute Pyogenic Meningitis probably due to *Acanthamoeba* spp.: A preliminary report. *Brit. Med. J.* 2 (5464): 740-742.

Fritsche, T. R., Sobek, D. and Gautom, R. K. 1998. Enhancement of *in vitro* cytopathogenicity by *Acanthamoeba* spp. following acquisition of bacterial endosymbionts. *FEMS. Microbiol. Lett.* 166 (2): 231-236.

Garner, A. 1993. Pathogenesis of acanthamoebic Keratitis hypothesis based on histological analysis of 30 cases. *British. J. Ophthalmol.* 77 (6): 366-370.

Gelman, B. B., Rauf, S. J., Nader, R., Popov, V., Borkowsk, J., Chaljub, G., Nauta, H. W. and Visvesvara, G. S. 2001. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *JAMA*. 285 (19): 2450-2451.

González-Robles, A., Castañon, G., Cristóbal-Ramos, A. R., Lázaro-Haller, A., Omaña-Molina, M., Bonilla, P. and Martínez-Palomo, A. 2006. *Acanthamoeba castellanii*: Structural basis of the cythopathic mechanisms. *Exp. Parasitol.* 114 (3): 133-40.

Gorlin, A., Wilson, L. and Aheam, D. 1996. Effect of adhered bacteria on the binding of *Acanthamoeba* to hydrogel lenses. *Arch. Ophthalmol.* 114 (5): 575-582.

Hahn, T., O´Brien, T. P., Sah, W. and Kim, J. 1998. Acridine orange staining for rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *J. Ophthalmol.* 42 (2): 108-114.

Halenda, R. M., Grevan, V. L., Hook, R. R. and Riley, L. K. 1998. An immortalized hamster corneal epithelial cell line for studies of the pathogenesis of Acanthamoeba keratitis. *Curr Eye Res.* 17 (3): 225-30.

He, Y. G., McCulley, J. P., Alizadeh, H., Pidherney, M., Mellon, J., Ubelaker, J. E., Strewart, G. L., Silvany, E. and Niederkorn, J. Y. 1992. A Pig Model of *Acanthamoeba* keratitis: Transmission via contaminated contact lenses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33 (1): 126-133.

Hurt, M., Neelam, S., Niederkorn, J. and Alizadeh, H. 2003. Pathogenic *Acanthamoeba* spp. Secrete a Mannose-Induced Cytolytic Protein That Correlates with the Ability To Cause Disease. *Infect. Immun.* 71 (11): 6243-6255.

Imbert-Bouyer, S. A., Imbert, C., Daniault G. and Rodier, M. H. 2004. A mannose binding protein is involved in the adherence of *Acanthamoeba* species to inert surfaces. *FEMS. Microbiol. Lett.* 238 (1): 207-211.

Jager, B. V. and Stamm W. P. 1972. Brain abscesses caused by free-liing amoeba `robably of the genus Hartmannella in a patient with Hodgkin´s disease. *Lancet.* 2 (7791): 1343-1345.

Jahnes, W. G. and Fullmer, H. M. 1957. Free living amoebae as contaminants in monkey tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 96 (2): 484-488.

John, D. T. 1993. Opportunistically Pathogenic Free-living Amoebae, In: Kreier, J. P., Baker J. R. (eds). Parasitic. Protozoa. California: Academic Press. 2 (3): 143-246.

Kelly, L. D., Long, D. and Mitra, D. 1995. Quantitative comparison of *Acanthamoeba castellanii* adherence to rigid versus soft contact lenses. *CLAO.* 21 (2): 111-113.

Kilvington, S., Larkin, D. F., White, D. C. and Beeching J. R. 1990. Laboratory investigations of *Acanthamoeba* Keratitis. *J. Clin. Microbiol.* 28 (12): 2722-2725.

Khan, N. A., Janell, E. L., Panjwanii, N., Cao, Z. and Paget, A. 2000. Proteases as markers for differentation of pathogenesis and nonpathogenesis species of *Acanthamoeba*. *J. Clin. Microbiol.* 38 (8): 2858-2861.

Khan, N. A. 2001. Pathogenicity, morphology and differentiation of *Acanthamoeba*. *Curr. Microbiol.* 43 (6): 391-395.

Khan, N. A. 2003. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microb. Pathog.* 34 (6): 277-285.

Kondoh, H., Kabayashi, K. and Hagiwara K. 1987. A simple procedure for the isolation of human secretory IgA of IgA1 and IgA2 subclass by a jackfruit lectin, jacalin, affinity chromatography. *Mol. Immunol.* 24 (11): 1219-122.

Krishna Prasad, B. N. and Gupta, S. K. 1978. Preliminary report on the engulfment and retention of *Mycobacteria* by trophozoites of exenically grown *Acanthamoeba castellanii* Douglas, 1930. *Curr. Sci.* 47: 245-247.

Larking, D. F., Kilvington, S. and Dart, J. K. G. 1992. Treatment of *Acanthamoeba* keratitis with polyhexamethylene biguanide. *Ophthalmol.* 99 (2): 185-191.

Ledee, D. R., Byer, T. J., Kirknees, C. M. and Seal, D. V. 1995. *Acanthamoeba griffini* confirmed from corneal infection, contac lens storage case and home water supply using srDNA analysis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36 (4): 327.

Leher, H., Alizadeh, H., Taylor W. M., Shea A. S., Van Klink F., Jager M. J. and Niederkorn, J. Y. 1998. Role of mucosa IgA in the resistance to *Acanthamoeba* keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39: 2666-2673.

Leher, H., Silvany, R., Alizadeh, H., Houang, J. and Niederkorn, J. Y. 1998. Mannose induces the release of cytopathic factors from *Acanthamoeba castellanii*. *Infect. Immun.* 66 (1): 5-10.

Marciano-Cabral, F., R., Puffenbarger, R. and Cabral, G. A. 2000. The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. *J. Eukaryot. microbiol.* 47(1): 29-36.

Marciano-Cabral, F. and Cabral, G. A. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16 (2): 273–307.

Martínez, A. J. 1981. Is *Acanthamoeba* Encephalitis and Opportunistic Infection? J. *Neurology*. 30 (6): 567-574.

Martínez, J. A. and Visvesvara, G. 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain. Pathol.* 7 (1): 583-598.

Mathers, W., Stevens G. Jr., Rodriguez, M., Chan, C. C., Gold, J., Visvesvara, G. S., Lemp, M. A. and Zimmerman, L. E. 1987. Immunopathology and electron microscopy of Acanthamoeba keratitis. *Am. J. Ophthalmol.* 103 (5): 626-635.

Michel, R., Burghardt, H. and Bergmann, H. 1995. *Acanthamoeba*, naturally intracellulary infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contamined drinking water system in a hospital. *Zentbl. Hyg. Umweltmed.* 196: 532-544.

Mitro, K., Bhagavathiammai, A., Zhou, O., Bobbett, G., McKerrow, J., Chokshi, R., Chokshi, B. and James, E. 1994. Partial characterization of the proteolytic secretions of *Acanthamoeba polyphaga*. *Exp. Pathol.* 78 (4): 377-385.

Morton, L. D., McLaughlin, G. L. and Whiteley, H. E. 1991. Adherence characteristics of three strains of *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis.* 13 (Suppl 15): S424.

Nagington, J., Watson, P. G., Playfair, T. J. McGill, J., Jones, B. R. and Steel, A. D. 1974. Amoebic infec of the eye. *Lancet*. 1537-1540.

Nagington, J. 1975. Isolation of amoebae from eye infections in England. *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.* 95 (2): 207-209.

Niederkorn, J., Ubelaker, J. E., McCulley, J. P., Stewart, G. L., Meyer, D. R., Mellon, J. A., Silvany, R. E., He, Y., Pidherney, M., Martin, J. H. and Alizadeh, H. 1992. Susceptibility of corneas from various animal species to *in vitro* binding and invasion by *Acanthamoeba castellanii*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33 (1): 104-112.

Omaña, M. M. 1997. Estudio comparativo de 3 cepas del género *Acanthamoeba* responsables de los primeros casos detectados de Queratitis amibiana en México. Tesis de Maestría en Ciencias. UNAM-FES Cuautitlán, México. 166pp.

Omaña, M. M., Navarro-García, F., González-Robles, A., Serrano-Luna, J. J., Campos Rodríguez, R., Martínez-Palomo, A., Tsutsumi V. and Shibayama, M. 2004. Induction of Morphological and Electrophysiological changes in Hamster, Córnea after in vitro interaction with trophozoítes of *Acanthamoeba* spp. *Infect and Immun.* 72 (6): 1-7.

Omaña, M. M., Hernández, D., González-Robles, A., Salazar-Villatoro, L., Castañón, G., Campos-Rodríguez, R. and Bonilla P. 2006. Relationship Between adhesion and Cytopathic Effect of four Strains of *Acanthamoeba* spp. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53 (S1): s18-s19.

Page, F. C. 1988. A new key to freshwater and soil Gimnamoebidae with instructions for culture collection of Algae and Protozoa. England. 122pp.

Panjwani, N., Zhoo, L., Baum, J., Hazlett, L. D. and Yong, Z. 1997. *Acanthamoeba* bind to rabbit corneal epithelium in vitro. *Invest. Ophthalmol. vis. Sci.* 38 (9): 1858-1864.

Pussard, M. 1973. Modalites de la division nuclearie et taxonomie chez les amibes (amoebae protozoo). Revision des notions de promitose, metamitose e metamitosis. *Protistol.* 9: 163-173.

Pussard, M. and Pons, R. 1977. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistol.* 13: 557-610.

Preston, T. M. and King, C. A. 1984. Amoeboid locomotion of *Acanthamoeba castellanii* with special reference to cell-substratum interactions. *J. Gen. Microbiol.* 130 (9): 2317-2323.

Ramírez-Flores, E., Omaña-Molina, M., Marcial-Chalico, P., Velázquez-Espino, M., Bonilla Lemus, P., Méndez de la Rosa, R. M. 1998. Estudio Epidemiológico de aguas intradomiciliarias como fuente de contaminación de amebas de vida libre. In: Cuadernos de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud, la educación y el Ambiente. Vol. 1. Compiladores Mancilla Díaz J. M. y Vilaclara G. FES-Iztacala. México. Pag. 118-126.

Rivera, F., Ortega, A., López-Ochoterena, E. and Paz, M. E. 1979. A quantitative morphological and ecological study of protozoa pollution tap water in Mexico City. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 98 (3): 465-469.

Rivera, F., Galvan, M., Robles, E., Leal, P., Gonzalez, L. and Lacy, A. M. 1981. Bottled mineral waters polluted by protozoa in Mexico. *J. Protozool.* 28 (1): 54-56.

Rivera, F., Ramírez, P., Vilaclara, G., Robles, G. and Medina, F. 1983. A survey of pathogenic and free-living amoebae inhabiting swimming pool water in México. *Environ. Res.* 32 (1): 205-211.

Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, L., Ramírez, E., Bonilla, P. and Lares, F. 1987. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *Environ. Res.* 42 (1): 149-154.

Rivera, F., Lares, F., Gallegos, E., Ramírez, G., Bonilla, P., Calderón, A., Martínez, J. J., Rodríguez, S. and Alcocer, J. 1989. Pathogenic amoebae in natural thermal water of three resorts of Hidalgo, México. *Environ. Res.* 50 (2): 289-295.

Rodríguez-Zaragoza, S. 1994. Ecology of free-living amoebas. *Crit. Rev. Microbiol.* 20 (3): 225-241.

Rondanelli, E. G. 1987. Infection diseases. J. Amphizoic amoebae human pathology. Ed. Piccin Nuova libraria. Padua Italy. 279pp.

Rowbotham, T. J. 1980. Preliminary report on the patogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater ans soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* 33 (12): 1179-1183.

Seal, D. V., and Hay, J. 1994. Acanthamoeba keratitis. *Br. Med. J.* 309: 1019.

Seal, D., Hay, J., Kirkness, C., Morrell, A., Booth, A., Tullo, A., Ridgway, A., Armstrong, M. 1996. Successful medical therapy of Acanthamoeba keratitis with topical chlorhexidine and propamidine. *Eye.* 10 (pt. 4): 413-421.

Sehgal, R., Saini, J., Singh, K. D. and Batí, H. S. 2002. *Acanthamoeba* adherence to soft contact lens and human corneal stroma. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 45 (1): 63-67.

Schaumberg, D. A., Snow, K. K. and Dana, M. R. 1998. The epidemic of *Acanthamoeba* Keratitis Where do we stand?. *Cornea.* 17 (1):3-10.

Schuster, F. L. and Visvesvara, G. S. 2004. Free-living amoebae as Opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int. J. Parasitol.* 34 (9): 1001-1027.

Thom, S., Warhurst, D. and Drasar, B. S. 1992. Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. *J. Med. Microbiol.* 36 (5): 303-306.

Turner, N. A., Harris, J., Russell, A. D. and Lloyd, D. 2000. Microbial differentiation and changes in susceptibility to antimicrobial agents. *J. Appl. Microbiol.* 89 (5): 751-759.

Visvesvera, G. S. 1991. Classification of *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis.* 13: S369–372.

Wang, X. and Ahearn, D. G. 1997. Effect of bacteria on survival and growth of *Acanthamoeba castellanii*. *Curr. Microbiol.* 34 (4): 212-215.

Weekers, P. H. H., Bodelier, P. L. E., Wijen, J. P. H. and Volgels, G. O. 1993. Effects of grazing by the Free-living Amoeba. *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga* and *Hartmanella vermiformis* on various bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (7): 2317-2319.

Weisman, R. A. 1976. Differentiation in *Acanthamoeba castellanii*. San Antonio Texas, U. S. A. *Ann. Rev. Microbiol.* 30:189-219.

Wilhelmus, K. R. 1986. Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using calcofluor white. *Arch. Ophthalmol.* 104 (9): 1309-1311.

Willcox, M. D. and Holden, B. A. 2001. Contact lens related corneal infections. *Biosci Rep.* 21 (4): 445-461.

Winiecka-Krusnell, J. and Linder, E. 2001. Bacterial infections of free-living amoebae. *Res. Microbiol.* 152 (7): 613-619.

Winiecka-Krusnell, J., Wreiber, K., Von Euler, A., Engstrand, L. and Linder, E. 2002. Free living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. *Scand. J. Infect. Dis.* 34 (4): 253-256.

Yang, Z., Cao, Z. and Panjwani, N. 1997. Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis carbohydrate mediated host-parasite interactions. *Infect and immun.* 65 (2): 439-445.