



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**RETOS EN EL TRATAMIENTO DE LAS
ENFERMEDADES OCASIONADAS POR
AMIBAS DE VIDA LIBRE.**

TESINA

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

**MYRNA GUADALUPE
GRANADOS CHACÓN**

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARCO AURELIO RODRIGUEZ MONROY

LOS REYES, IZTACALA

DICIEMBRE, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

Agradezco a Dios por haberme permitido concluir mis estudios y realizar mi sueño de titularme como Bióloga.

A mis hijas Rebeca y Carla, les agradezco la paciencia que me han tenido, por no haber estado con ellas el tiempo que dedique en la elaboración de esta tesina. Gracias hijas por su amor y comprensión, por sus sonrisas y abrazos, por estar a mi lado siempre y por darme la fortaleza que necesito para salir adelante.

A mi esposo Juan Carlos, le doy gracias por su gran ejemplo, fortaleza, dedicación, apoyo y amor que me dio el tiempo que Dios le permitió estar a mi lado y por el cual ha sido posible la realización de este trabajo, muchas gracias amor.

A mis padres Nicolás y Cristina, quienes han hecho posible el que yo tuviera una carrera y que siempre me han apoyado en todo a lo largo de mi vida, por su cariño y amor; a mi hermana por su apoyo incondicional y quien está conmigo siempre.

Quiero agradecer a mi tía Bombón y a mi tía Socorrito, que además han sido grandes amigas, porque siempre están a mi lado cuando más las necesito y tienen las palabras exactas para alentarme y los mejores deseos.

Con todo mi cariño quiero agradecer el gran apoyo, dedicación y paciencia de mi asesor el Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy y la Dra. Margarita Canales Martínez, y por quienes fue posible la realización de este trabajo y día a día me alentaron a salir adelante.

A mis maestros quienes me formaron académicamente dentro de la FESI, y en especial a la M en C. Edith López Villafranco, M en C. Irma Delfín Alcalá, Biol. Soledad Chino Vargas, M en C. Samuel Meráz Martínez, quienes se convirtieron en grandes amigos y de quienes he recibido un gran apoyo y cariño.

A mis sinodales M en C. Ma. de los Ángeles Sanabria Espinoza, M en C. Ángel Duran Díaz y Biol. Luis Antonio Hernández González, por el tiempo dedicado.

A mi suegra Ma. del Rocío por su apoyo incondicional en todo momento y por la fuerza que me da cuando flaqueo y a agradezco a mi cuñada Marisol Martínez Gaspar por su apoyo y comprensión.

Finalmente agradezco a mis familiares y amigos por el cariño y apoyo que me brindan.

DEDICATORIA

Dedico de todo corazón este trabajo a la memoria de mi esposo JUAN CARLOS MARTÍNEZ GASPAR, quien sigue siendo mi fuerza y apoyo, y estoy segura que desde donde esta, se siente muy orgulloso de lo que he logrado; a mis hijas REBECA JACQUELINE Y CARLA ZYANYA, quienes han sido mi fuerza, energía y gran apoyo, sobre todo en los momentos difíciles que hemos pasado y por quienes continuo en este camino.

*Esta tesina es para ti que ahora continúas en otro camino,
en el cual algún día nos encontraremos para seguir
por siempre, JUNTOS...*

CONTENIDO

Resumen	5
Introducción	7
Capítulo I	9
<i>Acanthamoeba spp.</i>	9
Tratamiento antimicrobiano para infecciones sistémicas por <i>Acanthamoeba</i>	11
Tratamiento antimicrobiano para queratitis por <i>Acanthamoeba</i>	16
<i>Acanthamoeba</i> como portador de bacterias patógenas	22
Capítulo II	24
<i>Naegleria fowleri</i>	24
Terapia antimicrobiana para la MEAP	25
Capítulo III	31
Conclusiones	31
Apéndice	34
Características y mecanismo de acción de los fármacos utilizados	34
Clasificación de los antifúngicos por su estructura	35
Clasificación de los antifúngicos por su sitio de acción en el hongo	35
Referencias	45

RETOS EN EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES OCASIONADAS POR AMIBAS DE VIDA LIBRE.

Resumen

Esta revisión se enfoca en las amibas de vida libre, *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, y *Balamuthia mandrillaris* las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo y agua, además de poder causar infecciones en humanos. Estas enfermedades incluyen la meningoencefalitis amebiana primaria (*N. fowleri*), encefalitis amebiana granulomatosa, infecciones cutáneas y nasofaríngeas (*Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*) y queratitis amebiana (*Acanthamoeba* spp). La terapia antimicrobiana para estas infecciones es generalmente empírica y la recuperación de los pacientes es problemática. *N. fowleri* es altamente sensible a el agente antimicótico anfotericina B, pero el retraso en el diagnóstico y la naturaleza fulminante de la enfermedad, da como resultado pocos sobrevivientes. La encefalitis y otras infecciones causadas por *Acanthamoeba* y *Balamuthia* han sido tratadas, más o menos exitosamente, con combinaciones que incluyen clotrimazol, miconazol, ketoconazol, fluconazol, itraconazol), pentamidina isetionato, 5-fluorocitosina y sulfadiazina. El uso de esta combinación de medicamentos va dirigida a los patrones de resistencia que pudieran existir o desarrollarse durante el tratamiento, asegurando que al menos uno de los medicamentos puede ser efectivo contra de la amiba. Las interacciones favorables de medicamentos (aditivos o sinérgicos) es otro potencial benéfico. En pruebas *in vitro* de medicamentos dirigidos a cepas o especies, muestran diferencias en la sensibilidad, por lo que se concluye que un solo medicamento no puede

asumirse como efectivo contra todas las amibas. Otra complicación es el riesgo de activar quistes latentes que se forman *in situ* en infecciones por *Acanthamoeba* y *Balamuthia*, y los cuales pueden conducir a la recaída del paciente después de un aparente tratamiento efectivo. Esto es particularmente cierto en la queratitis por *Acanthamoeba*, una infección de la córnea, la cual responde bien al tratamiento con gluconato de clorexidina y polihexametileno biguanida, en combinación con isotionato de propamidina (Brolene), hexamidina (Desomodine), o neomicina. *Acanthamoeba* spp. Puede ser portadora también de bacterias endosimbióticas (*Legionella* y *Legionella*-like patógenas) que han sido implicadas en el comienzo de neumonías en huéspedes debilitados. Ya que con otras enfermedades infecciosas, la recuperación no sólo depende de una terapia antimicrobiana, sino también del estado inmune del paciente, de la dosis infectiva y la virulencia de la cepa amebiana, y en qué tan temprano es diagnosticada la enfermedad, así como el inicio de la terapia.

Introducción

Las amibas de vida libre pertenecientes al el género *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Naegleria* son responsables de infecciones en humanos y otros animales. Estos organismos pueden ser aislados del suelo y agua, y están ampliamente distribuidos tanto en ambientes al aire libre como dentro de las casas (macetas, acuarios, grifos y tubos de lavabo, humidificadores ambientales, etc). En el suelo se alimentan de bacterias, excepto por *Balamuthia*, la cual probablemente se alimenta de otra amiba. Los individuos inmunocomprometidos e inmunocompetentes están dentro de las personas que desarrollan infecciones ocasionadas por estas amibas (Janitschke *et al.*, 1996; Jarolim *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 1973).

Acanthamoeba spp., causa encefalitis amebiana granulomatosa, así como infecciones diseminadas tanto cutáneas como nasofaríngeas, principalmente en individuos inmunocomprometidos, también pueden causar queratitis en personas inmunocompetentes. *Balamuthia mandrillaris*, es relativamente cercana a *Acanthamoeba* y causa infecciones similares, principalmente en niños inmunocompetentes. *Naegleria fowleri* es el agente causante de la meningoencefalitis amebiana primaria, una infección diferente, en niños sanos y adultos jóvenes. No hay cura universal para estas infecciones amebianas. Con pocas excepciones, la terapia antimicrobiana es en gran parte empírica, y sin embargo la terapia óptima aún no ha sido determinada. El ratón sirve como un modelo animal útil para el estudio de las encefalitis amebianas: el animal es inoculado intranasalmente o intracranealmente con una suspensión de amibas y la enfermedad murina es paralela a la infección humana (Janitschke *et al.*, 1996; Jarolim *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 1973).

Hay muchas pruebas de medicamentos, sin embargo, la mayoría se han realizado *in vitro*.

Capítulo I

Acanthamoeba spp.

Acanthamoeba spp.

El ciclo de vida de *Acanthamoeba* consiste de una fase trófica y una quística, esta última es más resistente a los antimicrobianos. Aproximadamente 17 especies de *Acanthamoeba* son reconocidas basadas en la morfología y secuencia genómica (Stothard *et al.*, 1998), varias de las cuales causan infecciones oportunistas (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). Muchas de las infecciones han sido en pacientes con órganos trasplantados y VIH/SIDA, o personas en un estado de salud debilitado.

Un amplio espectro de medicamentos han sido usados para tratar infecciones acantamoebianas y algunas han sido reportadas con éxito (Schuster y Visvesvara, 2003). Sin embargo, hay muchos casos, especialmente en huéspedes debilitados por infecciones oportunistas o vueltos vulnerables por medicamentos inmunosupresivos, donde la infección es fatal. Para la encefalitis amebiana, el problema de encontrar una terapia antimicrobiana óptima radica en la dificultad en el diagnóstico de la infección. Sin síntomas patógenos específicos, el reconocimiento de la infección es frecuentemente por autopsia. Aún entonces, la infección puede pasar desapercibida en un análisis histopatológico de rutina debido a la falta de familiaridad con la amiba.

En contraste para las infecciones sistémicas causadas por *Acanthamoeba* las cuales tienen un curso subclínico e insidioso como la queratitis amebiana, causará que el paciente busque ayuda a causa de dolor, desgarramiento, disminución de la visión y ftofobia. El diagnóstico es por raspado de córnea y una tinción para visualizar la amiba; o por cultivo de los raspados para el aislamiento e identificación de la amiba (Schuster, 2002). A diferencia de los protocolos de susceptibilidad bacteriana, no hay referencias de cepas de

Acanthamoeba u otras amibas que puedan ser usadas como patrones para probar la susceptibilidad amebiana. Durante la prueba *in vitro*, también es importante distinguir entre medicamentos amebostáticos y amebicidas. Con los primeros, examinando al microscopio, la amiba parece no estar dividiéndose o muerta, pero se recupera una vez que es transferida a un medio libre de medicamento. Los medicamentos además deben ser quisticidas para prevenir la recurrencia de la infección por la activación de quistes latentes que han sobrevivido al tratamiento antimicrobiano. Debido a las variaciones en la sensibilidad, cada aislado requiere una prueba individual para evaluar su susceptibilidad a las diferentes concentraciones y tipos de medicamentos, lo que conduce a veces a resultados contradictorios entre los laboratorios (Schuster, 2002).

Tratamiento antimicrobiano para infecciones sistémicas por *Acanthamoeba*

Los medicamentos que han sido utilizados en el tratamiento de infecciones diseminadas tanto en nasofaringe como en el sistema nervioso central, incluyen ketoconazol, fluconazol, itraconazol, isetionato de pentamidina, trimetropina-sulfametazol (cotrimoxazol), sulfadiazinae y 5-fluorocitosina (flucitosina). Las infecciones cutáneas han sido tratadas con aplicaciones tópicas de gluconato de clorhexidina y ketoconazol en crema. Infecciones localizadas (ej., lesiones cutáneas) pueden desarrollarse en infecciones diseminadas a través de la propagación hematógena. A pesar de varias recuperaciones después de un tratamiento farmacológico, el panorama para muchos de los pacientes sigue siendo sombrío, especialmente aquellos debilitados por múltiples infecciones oportunistas. Algunos regímenes de tratamiento con éxito han incluido isetionato de pentamidina, flucitosina,

itraconazol, clorhexidina tópica y ketoconazol crema (para lesiones en la piel) en un paciente con trasplante de pulmón con acantamibiasis diseminada sin complicación en el sistema nervioso central (SNC) (Oliva et al., 1999); trimetropina-sulfametazol, rifampina, y ketoconazol en dos pacientes pediátricos con infecciones en SNC (Singhal *et al.*, 2001); cotrimoxazol, flucitosina, sulfadiazina en un paciente pediátrico con infección en SNC (Karande *et al.*, 1991) pentamidina intravenosa, clorhexidina tópica y ketoconazol crema en un paciente con trasplante renal con infección diseminada (Slater *et al.*, 1994); sulfadiazina y fluconazol en un paciente con VIH/SIDA con encefalitis granulomatosa (Martínez *et al.*, 2000); flucitosina después de un tratamiento inefectivo con ketoconazol en un paciente con VIH/SIDA con infección cutánea (Helton *et al.*, 1993); la terapia de multimedicamentos para el tratamiento de rinosinusitis amebiana en un paciente con VIH/SIDA (Rivera y Padhya, 2002). Una combinación de penicilina y cloranfenicol fue aparentemente exitosa en el tratamiento de un paciente con meningitis en la cual *Acanthamoeba culbertsoni* fue recuperada del líquido cefalorraquídeo (Lalitha *et al.*, 1985). Una infección crónica en el SNC con *Hartmannella (Acanthamoeba) rhysodes* mejoró pero no fue curada con el tratamiento con sulfametazina (Cleland *et al.*, 1982). *Acanthamoeba castellanii*, aislada de nódulos de piel de una infección cutánea fatal en un paciente con VIH/SIDA, fue resistente *in vitro* a metronidazol, anfotericina B, rifampina, pentamidina, 5-fluorocitosina, e itraconazol (Hunt *et al.*, 1995). La Anfotericina B fue inefectiva en el tratamiento de un caso fatal de acantoamibiasis diseminada (Gullet *et al.*, 1979). La reaparición de enfermedades en casos que fueron exitosamente tratados con antimicrobianos no han sido reportados, pero existe la posibilidad de que quistes en el cerebro y otros tejidos puedan reactivarse para dar salida a la amiba trófica o trofozoica. En el cuadro 1, se

muestra un resumen de terapias exitosas que han sido utilizadas en infecciones sistémicas por *Acanthamoeba*.

Cuadro 1. Ejemplos de tratamientos antimicrobiales exitosos para infecciones por *Acanthamoeba*.

Antimicrobiales	Dosis	Referencia
Encefalitis amebiana		
Sulfametazina	1qid	Cleland et al. (1982)
Cotrimoxazol	75mg/kg q12h IV	Karande et al. (1991)
5-fluorocitosina	150mg/kg q6h	
Sulfadiazina	150mg/kg q6h	
Penicilina G	2 x 10 ⁶ U q3h IV	Lalitha et al. (1985)
Cloranfenicol	500mg q6h po	
Sulfadiazina	500mg qid	Martínez et al. (2000) ^a
Pyrimethamine	50mg qd	
Fluconazol	200mg bid	
Ketoconazol	5mg/kg qd	Singhal et al. (2001)
Rifampina	10mg/kg qd	
TMP-SMX	20mg/kg qd	
Infección cutánea		
Ketoconazol	200mg q8h IV	Helton et al. 81993) ^a
5-fluorocitocina	40mg/kg q8h	
Pentamidina	4mg/kg q24h IV	Slater et al. (1994)
Clorhexidina tópica	Cleansing bid	
Ketoconazol crema	2% following cleansing	
Infección nasofaríngea		
Pentamidina	4mg/kg qd IV	Rivera y Padhya (2000) ^a
Levofloxacin	500mg qd IV	
Anfotericina B	550mg qd IV	
5-fluorocitosina	2mg q6h	
Rifampina	600mg bid po	
Itraconazol	200mg bid po	
Infección diseminada		
Pentamidina	Dosis no dadas	Oliva et al. (1999)
5-fluorocitocina		
Itraconazol		
Clorhexidina tópica		
Ketoconazol crema		

Abreviaturas: qxh, cada x horas; qd, cada día; bid, dos veces al día; qid, cuatro veces cada día; po, administración oral; IV, administración intravenosa.

^a pacientes con VIH/SIDA

Un número considerable de otros antimicrobianos han sido probados *in vitro* para evaluar su actividad contra aislados o muestras de *Acanthamoeba*, pero aún no han sido probados en la clínica. La azitromicina fue inhibitoria por

arriba del 98% en cerebro, piel y aislados de córnea, mientras que macrólidos relacionados como la claritromicina y eritromicina fueron inefectivas (Schuster y Visvesvara, 1998). Varias fenotiazinas (ej. Clorpromazina, trifluoperazina) mostraron actividad contra muestras o aislados clínicos de *Acanthamoeba* (Schuster y Visvesvara, 1998). Miltefosina (hexadecilfosfocolina), un medicamento anti cancerígeno utilizado para el tratamiento de leishmaniasis visceral (Sundar *et al.*, 2002) también tiene actividad contra muestras de *Entamoeba histolytica* (Seifert *et al.*, 2001) y aislados de *Acanthamoeba* (Walochnik *et al.*, 2002).

Aunque no se probó clínicamente contra *Acanthamoeba*, la miltefosina puede tener potencial para el tratamiento de infecciones sistémicas así como queratitis amebiana. La habilidad de antimicrobianos para entrar en el cerebro y líquido cefalorraquídeo se consideran también importantes. La miltefosina y fenotiazinas penetran al cerebro como la azitromicina, aunque la acumulación de éste último en el fluido cerebroespinal ha sido reportada baja (0.015µg/ml) (Jaruratanasirikul *et al.*, 1996).

Con respecto al aprovechamiento de un tratamiento de multimedicamentos, hay poca o ninguna evidencia de resistencia clínica para cualquiera de los medicamentos usados en el tratamiento de infecciones por *Acanthamoeba*. La combinación de medicamentos puede originar efectos sinérgicos o aditivos que no fueron aparentes en pruebas *in vitro* de medicamentos individuales. La evaluación de un medicamento en un modelo de ratón, simulando una situación clínica es una actividad poco frecuente en los diversos laboratorios. El valor de un medicamento o combinación de medicamentos en una infección, es determinada por un número de factores, incluyendo el estado inmune del huésped, la progresión de la enfermedad, y el tiempo en el cual la intervención del medicamento es iniciada, la dosis

infectiva de la amiba, la virulencia y el perfil de sensibilidad del medicamento de la cepa en particular causando la infección.

Se han encontrado variaciones tanto en virulencia como en la sensibilidad al antibiótico entre muestras clínicas de *Acanthamoeba*, incluso entre cepas de una misma especie. En cuanto a diferencias en la virulencia, algunas especies y/o cepas producen una mortalidad alta en modelos de ratón o causan un efecto citopático más pronunciado en cultivos de tejidos (De Jonckheere, 1980). En un aislado de cerebro (*A. healyi*) fue más virulenta que aislados crecidos en cultivos de tejido (*A. culbertsoni*) o del medio ambiente cuando se probaron en un modelo de ratón inmunodeficiente (Kong *et al.*, 1998). Asimismo, aislados de cerebro de ratón y queratitis fueron más citopatogénicos en cultivos de tejido que muestras de agua del grifo o casos con lentes de contacto (Walochnik *et al.*, 2000). En cuanto a diferencias en la susceptibilidad antimicrobiana, un estudio comparativo de cuatro especies de *Acanthamoeba*, encontró variaciones en sensibilidad al clotrimazol, *Acanthamoeba polyphaga* es más resistente y *A. rhysodes* es más sensible al medicamento (Stevens y Willaert, 1980). En un estudio comparativo de azoles, clotrimazol mostró la mejor inhibición contra una cepa diferente de *A. polyphaga*: clotrimazol (inhibición arriba del 99%) y menor que bifonazol, ketoconazol e itraconazol; mientras que el fluconazol (no inhibió) (Schuster, 1993). En cuanto a las concentraciones probadas, los azoles fueron amebostáticos pero no amebicidas.

La membrana celular de la amiba es un blanco para los componentes de azoles y la anfotericina B (AMB). Los azoles intervienen con la síntesis de esteroides que son incorporados dentro de la membrana, originando una arquitectura defectuosa de la membrana, incrementando la permeabilidad, y la fuga de iones de la célula (Sande y Mandell, 1985). Ergosterol y 7-dehyrostigmasterol son los principales componentes de los esteroides en la

membrana de *A. castellanii* no patógena (Smith y Korn, 1968) y la cepa patógena *A. culbertsoni* A-1 (Medí *et al.*, 1988). Cicloartenol es el ergosterol precursor para *A. polyphaga* cuya conversión es presumiblemente bloqueada por la actividad de los azoles (Raederstorff y Rohmer, 1985). Los imidazoles (clotrimazol, bifonazol, ketoconazol) son más efectivos contra *Acanthamoeba* que los triazoles (itraconazol, fluconazol) (Schuster, 1993). El polieno AMB actúa preferencialmente uniendo a los ergosteroles y produciendo poros en la membrana celular (Sande y Mandell, 1985). Este no es un medicamento elegido para infecciones acantemoebicas, en muchos aislados tampoco son inhibidos o matados por éste (Duma y Finley, 1976). Sin embargo el patógeno *N. fowleri*, es altamente sensible a AMB.

Tratamiento antimicrobiano para queratitis por *Acanthamoeba*

La queratitis amebiana puede resultar de un trauma córneoal, la transferencia de *Acanthamoeba* spp., en su estado vegetativo o como quiste latente, es a través del uso inapropiado o mal mantenimiento de los lentes de contacto. El recipiente para guardar los lentes de contacto puede causar la enfermedad por falta de limpieza adecuada, crecimiento de biopelículas bacterianas, las cuales pueden convertir el recipiente en un lugar apropiado para que la bacteria prolifere y sirva de alimento a la amiba. Las amibas son transmitidas al ojo cuando los lentes de contacto son colocados en la superficie córneoal. Una vez establecidas, penetran el estroma, del cual es muy difícil de erradicar. Debido a que hay una mayor posibilidad para el diagnóstico de la queratitis amebiana que con las infecciones sistémicas; el tratamiento antimicrobiano puede ser iniciado tempranamente en el curso de la infección y compatible con el uso intensivo del medicamento (aplicaciones

frecuentemente cada hora), los pronósticos para la recuperación son excelentes. Sin embargo, el uso del medicamento puede inducir enquistamiento (Kilvington *et al.*, 1990) y una vez que los niveles de medicamento han bajado, puede conducir al desenquistamiento y el establecimiento de la infección. Con el propósito de impedir la reaparición, se ha propuesto que el tratamiento debería ser continuado por 3-4 meses (Kosrirukvongs *et al.*, 1999; Ficker *et al.*, 1990). Algunos de los medicamentos usados inicialmente en el tratamiento de estas infecciones fueron marginalmente amebicidas o quisticidas y permitieron la recuperación eventual de la inhibición. Es más probable que el quiste sobreviva al tratamiento debido a su gruesa pared e impermeabilidad. (Aksozek *et al.*, 2002). Distintivamente se requieren mayores concentraciones de medicamento para destruir el quiste que las que son necesarias para destruir el trofozoito (Kilvington *et al.*, 1990; Turner *et al.*, 2000) y el proceso de enquistamiento es acompañado por el desarrollo de resistencia al medicamento (Lloyd *et al.*, 2001; Parking *et al.*, 1992; Lim *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 1985). La recurrencia de la infección por activación de los quistes puede conducir a la repetición de trasplantes de córnea (queratoplastia) en intentos para eliminar o reducir el número de amibas y restaurar la visión. En muchas situaciones crónicas o donde se ha encontrado una resistencia obstinada al medicamento, la enucleación (procedimiento quirúrgico de la cuenca del ojo) es el último recurso para la infección (Lloyd *et al.*, 2001; Parking *et al.*, 1992; Lim *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 1985).

Substancialmente existe mucha literatura sobre la sensibilidad a los medicamentos de cepas de *Acanthamoeba* y especies involucradas en la queratitis amebiana, que de infecciones sistémicas. Algunos de los tratamientos farmacológicos empleados en fases tempranas fueron

neomicina-polimixina B-bacitracina tópica (Neosporin) con o sin miconazol o ketoconazol (Sharma *et al.*, 1990); itraconazol oral y miconazol tópico (Ishibashi *et al.*, 1990); ketoconazol sistémico y miconazol tópico (Hirst *et al.*, 1984); clotrimazol tópico más otro antimicrobiano (Driebe *et al.*, 1988). Brolene en gotas para ojos (la mayoría de los fármacos contienen isetionato de propamidina y dibromo propamidina) y ungüento disponible en el Reino Unido, han sido utilizados exitosamente en el tratamiento de casos de queratitis (Yeoh *et al.*, 1987), pero no es bien tolerado en los ojos cuando es usado por períodos prolongados de tiempo (Murdoch *et al.*, 1998; Wright *et al.*, Yeoh *et al.*, 1987). Se encontró resistencia a la propamidina fuera de 6 a 8 aislados clínicos de *Acanthamoeba* (concentración mínima de inhibición 500µg/ml) (Pérez-Santoja *et al.*, 2003). La neomicina fue efectiva contra la amiba trófica *in vitro*, pero menos contra el quiste (Hay *et al.*, 1994; Varga *et al.*, 1993). Sin embargo, su uso, es desalentador a causa de la resistencia del quiste, y su posible neurotoxicidad (Murdoch *et al.*, 1998; Seal, 2003). En el cuadro 2 se presentan ejemplos exitosos del régimen antimicrobiano para el tratamiento de la queratitis amebiana.

Agentes anti-inflamatorios (esteroides tópicos) son generalmente añadidos al régimen del tratamiento anti-amibiano (Larkin *et al.*, 1992; Perez-Santoja *et al.*, 2003), pero se sugiere precaución en su uso a causa de la supresión de la actividad macrófaga (Berger *et al.*, 1990; Seal, 2003).

Mejores resultados en el tratamiento de la queratitis amebiana, se obtuvieron con el uso de dos antisépticos catiónicos, gluconato de clorhexidina y biguanida polyhexametileno (PHMB; Bacquacil) (Elder y Dart; 1995).

Estos medicamentos han llegado a ser los fármacos de elección para el tratamiento de la queratitis. La clorhexidina puede tener una ventaja sobre el PHMB (Seal *et al.*, 1995; Elder y Dart, 1995). Usados a una concentración de

0.02% o más baja, estos medicamentos han mostrado ser clínicamente efectivos contra las fases de trofozoito y quiste de las amibas además de ser bien tolerados en los ojos (Kosrirukvongs *et al.*, 1999).

El PHMB es un agente quisticida más potente que la propamidina (Parking *et al.*, 1992; Varga *et al.*, 1993). Además, fue utilizado con y sin otros antimicrobianos (clorhexidina, brolene, y hexamidina, diamidina un componente marcado en Francia como Désomedin) (Perez-Santoja *et al.*, 2003). La clorhexidina y el PHMB han sido utilizados solos, o en combinación con isetionato de propamidina y/o neomicina (Hay *et al.*, 1994; Lindquist, 1998) o con 0.1% hexamidina también estos fueron usados en combinación (Murdoch *et al.*, 1998), aunque los dos juntos podrían resultar tóxicos (Seal, 2003).

Cuadro 2. Regímenes de tratamientos exitosos antimicrobiales por *Acanthamoeba* keratitis, listado cronológicamente.

Antimicrobiales	Dosis	Referencia
Ketoconazol Miconazol gotas Gentamicina gotas	200mg bid po 10mg/ml qh qid	Hirst et al. (1984)
Isetinato de propamidina Dipropamidina ungüento Neomicina	0.1% qh 0.15% q4h q4h	Wright et al. (1985)
Brolene ^a gotas para ojos Brolene ungüento	qds qds	Yeoh et al. (1987)
Clotrimazol gotas Propamidina Ketoconazol N-PB-Gb tópico	1% qh qh 200mg bid po qh	Driebe et al. (1988)
Itraconazol Miconazol tópico	50mg qd po	Ishibashi et al. (1990)
Neosporin ^c gotas Miconazol gotas	qid 10mg/ml qh	Sharma et al. (1990)
PHMB ^d	0.02%qh to q3h	Larkin et al. (1992)
Clorhexidina Propamidina	0.02% in saline qh 0.1% qh	Seal et al. (1995)
PHMB Propamidina Clorhexidina Désomedine ^e	0.02% qh to qid 0.1% qh 0.1% qid	Murdoch et al. (1998)
Clorhexidina	0.006% qh	Kosrirkvongs et al. (1999)
PHMB Clorhexidina Brolene Désomedine	0.02% qh 0.02% qh 0.1% qh 0.1% qh	Pérez-Santonja et al. (2003)

El listado de dosis indicados en la tabla son generalmente para iniciar el tratamiento, y la aplicación de medicamentos fuera de tiempo y con mejora. En algunas de las referencias, son presentados varios casos de historias con menores diferencias en tratamientos.

Abreviaturas: q.xh, cada x horas; qd, cada día; bid, dos veces al día; qid, cuatro veces cada día; po, administración oral; IT, administración intratecal; IV, administración intravenosa.

^a Brolene: isetinato de propamidina y dipropamidina

^b N-PB-G: neomicina-polymyxin B-gramicidin.

^c Neosporin: neomicina-polymyxin B-bacitracin.

^d PHMB: biguanida polyhexametileno.

^e Désomodine (Desmodine): hexamidina

El desarrollo de resistencia al medicamento durante tratamientos prolongados en infecciones es hasta cierto punto comprensible. Diferente a

la situación por infecciones sistémicas donde la dificultad de evaluar la resistencia al medicamento, es aparentemente más fácil en queratitis cuando el tratamiento alivia poco a poco los síntomas. Repetidos aislamientos de amibas de un caso de queratitis persistente demostró resistencia al desarrollarse en Brolene (propamidina) y a un componente de arsénico experimental (R6-56) en el curso de la infección (Ficker *et al.*, 1990). Dos casos de queratitis fueron reportados como refractarios a PHMB, aún cuando la amiba aislada fue sensible a el componente *in vitro* (Murdoch *et al.*, 1998). La razón para usar la combinación de medicamentos en la terapia es para minimizar el riesgo de selección a la resistencia durante el tratamiento de una infección.

Otros medicamentos para el uso en la queratitis amebiana han sido probados *in vitro*. Las magaininas, un grupo de péptidos de membranas activas naturales y sintéticos, han sido probados favorablemente cuando se combinan con nitrato de plata (Shuster y Jacob, 1992). La povidona yodada (Betadine) fue reportada como el mejor agente amebicida que la clorhexidina cuando se probó *in vitro* contra aislados corneales de *Acanthamoeba* (Gatti *et al.*, 1998). La actividad de siete compuestos diferentes de diamidina, incluyendo propamidina y hexamidina, contra *Acanthamoeba* fue proporcional a la longitud de la cadena alquil de la molécula diamidina, relacionando su lipofilia y su habilidad para penetrar la membrana celular de la amiba (Perrine *et al.*, 1995). La hexamidina resultó ser más efectiva que la propamidina, sin embargo esto ha sido recientemente discutido (Seal, 2003). La miristamidopropil dimetilamina, (MAPD) se ha encontrado que es efectiva *in vitro* contra los estadios trofozoico y quístico de *Acanthamoeba* (Kilving *et al.*, 2002), y no favorece la resistencia en poblaciones amebianas que sobrevivieron después de ser expuestas a bajas concentraciones de MAPD (Shuster *et al.*, 2003). Pero para muchos

medicamentos la actividad probada contra aislados de amibas, *in vitro* no garantiza la eficacia *in vivo* en la queratitis amebiana (Elder *et al.*, 1994; Ficker *et al.*, 1990; Lim *et al.*, 2000; Pérez-Santoja *et al.*, 2003; Seal, 2003).

Se han desarrollado modelos animales para estudiar la queratitis amebiana, pero no se han utilizado para evaluar la eficacia antimicrobiana (Badenoch *et al.*, 1990; He *et al.*, 1992; Van Klink *et al.*, 1993). Un modelo *in vivo* hasta el momento ha sido difícil de establecer. Aislados amibianos de córneas que producen citopatogenicidad en cultivos de tejido, pueden ser utilizados como un índice de cepas virulentas (Badenoch *et al.*, 1995; Niszl *et al.*, 1998). La habilidad de los antimicrobianos para bloquear la destrucción citopática de cultivos tisulares, han sido usadas como una técnica para evaluar medicamentos (Schuster y Visvesvara, 1998).

***Acanthamoeba* como portador de bacterias patógenas**

En muestras aisladas de *Acanthamoeba* de suelo y agua (Newsome *et al.*, 1998) así como muestras clínicas (Fritsche *et al.*, 1993; Rowbotham, 1983) se han encontrado bacterias endosimbióticas. La más destacada de estas es *Legionella* spp., o la bacteria *Legionella*-like, la cual ha tenido un rol importante en neumonías nosocomiales. Amibas encontradas en el grifo del agua, ventilación y sistemas de enfriamiento así como humidificadores son lisadas por esta bacteria y la bacteria es subsecuentemente liberada en aerosoles. Se ha reportado la existencia de legionelosis en hospitales y edificios de oficina. Neumonías atípicas han sido asociadas con *Acanthamoeba* spp., y son un problema de afección particular para los pacientes más viejos o inmunocomprometidos. La endosimbiosis también puede influir el resultado de los casos de queratitis amebiana (Murdoch *et*

al., 1998). Además de la bacteria *Legionella* spp., se encontró a las bacterias *Parachlamydia acanthamoeba* (Maurin *et al.*, 2002), *Neochlamydia hartmannellae* (Horn *et al.*, 2000), y organismos *Rickettsia*-like (Fritsche *et al.*, 1999), como agentes potenciales de enfermedad natural en *Acanthamoeba* y otras amibas. Además *Acanthamoeba* puede ser fácilmente infectada *in vitro* con bacterias como *Afipia felis*, *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium boris*, *Simkania negevensis* y *Vibrio cholerae*.

Poco se ha hecho para determinar la sensibilidad antimicrobiana a una endosimbiosis natural, a pesar de su potencial como agente etiológico de neumonía. Esto es debido en parte a la dificultad de cultivar algunas de las bacterias endosimbióticas. En una inspección de pacientes con neumonía, fueron detectados anticuerpos para *Legionella*-like y cepas de *Parachlamydia* asociadas con *Acanthamoeba*. La eritromicina más un segundo antimicrobiano (cefuroxime o ceftazidime) fueron efectivas en pacientes con tratamiento (Marrie *et al.*, 2001). En un estudio *in vitro* de la susceptibilidad antimicrobiana de dos cepas de *P. acanthamoeba* derivada de una amiba comparada con amibas aisladas con *Chlamydia* spp. Los aislados acantamebianos fueron resistentes a los antibióticos β -lactama y fluoroquinolona, pero fueron sensibles a aminoglucósidos y clotrimazol (Maurin *et al.*, 2002).

Capítulo II

Naegleria fowleri

Naegleria fowleri.

Más de 30 especies de *Naegleria* han sido identificadas con base a su secuencia de datos (De Jonckheere, 2002). Sólo una especie *N. fowleri*, ha sido aislada de infecciones en humanos, aunque hay otras especies que son patógenos en modelos de ratón. La amiba tiene un ciclo de vida que incluye estados de amiba y quiste, y la mayoría de las especies presentan un estado transitorio flagelar que se desarrolla en la amiba vegetativa. El organismo es el principal agente causal de la meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP), en adultos jóvenes y niños inmunocompetentes. La infección es adquirida por nadar o bañarse en aguas termales, así como lagos, estanques, aguas termales y ríos termales contaminados o arroyos. Las amibas tróficas o trofozoicas en el agua entran dentro de los pasajes nasales, penetra el epitelio nasal y migran a lo largo de los nervios olfatorios al cerebro. La MEAP es una enfermedad fulminante, casi invariablemente fatal en cuestión de días. Debido a que la enfermedad tiene un período de incubación corto, y un curso clínico entre 7 ~ 10 días, la diagnosis y la iniciación temprana de la terapia antimicrobiana son críticas para la sobrevivencia del paciente. La diagnóstico de la MEAP es por microscopio y/o cultivo de la amiba a partir de muestras de líquido cefalorraquídeo (Schuster, 2002).

Terapia antimicrobiana para la MEAP

El medicamento elegido en el tratamiento de MEAP es el polieno antifúngica anfotericina B (AMB). La amiba *Naegleria* es altamente sensible al medicamento, con una mínima concentración amebicida de

0.026-0.078µg/ml (Duma *et al.*, 1971). Pero el tratamiento con el medicamento debe ser iniciado en las etapas tempranas de la enfermedad para que sea efectivo y solo hay un puñado de recuperaciones publicadas en la literatura fuera de un estimado de 200 casos (Anderson y Jamieson, 1972; Aplkey *et al.*, 1970; Brown, 1991; Jain *et al.*, 2002; Seidel *et al.*, 1982; Wang *et al.*, 1993) En una recuperación bien documentada, le fue dado al paciente AMB intravenosa (iv) e intratecal (it), miconazol iv e it, y rifampina oral (Seidel *et al.*, 1982). Pruebas *in vitro* de aislados amebianos obtenidas de un paciente indicaron un efecto sinérgico o aditivo de AMB y miconazol, pero no se encontró eficacia con rifampina (Seidel *et al.*, 1982). Anfotericina B, rifampina, y ornidazol fueron usados exitosamente para tratar un supuesto caso de MEAP (Jain *et al.*, 2002). Diferente a *Acanthamoeba* (y *Balamuthia*), la cual se enquistas en tejidos, *Naegleria* permanece en su forma trófica en el tejido cerebral, y una vez destruida la amiba por un tratamiento efectivo antimicrobiano, la infección no volverá. Los regímenes antimicrobianos para varios casos de tratamientos con éxito para MEAP son resumidos en el cuadro 3.

Cuadro 3. Terapia exitosa en el tratamiento de la meningoencefalitis amebiana primaria causada por *Naegleria fowleri*

Antimicrobiales	Dosis	Referencia
Anfotericina B	0.75mg/kg qd IV	Apley et al. (1970)
Anfotericina B Rifampina	0.1mg 5 veces por día IT 600mg q12h	Brown (1991)
Anfotericina B Rifampina Ornidazol	1mg/kg qd 450mg qd po 500mg q8h	Jain et al. (2002)
Anfotericina B Miconazol Rifampina Sulfisoxazol	1.5mg/kg q12h IV 1.5mg por día IT 350mg/m ² q8h IV 10mg por día IT 10mg/kg q8h po 1g q6h IV	Seidel et al. (1982)
Anfotericina B Rifampina Cloranfenicol	60mg qd 450mg qd 1g qid	Wang et al. (1993)

Las dosis anotadas en la tabla son los niveles iniciales usados en el tratamiento y fueron reducidos con el tiempo.

Abreviaturas: qxh, cada x horas; qd, cada día; bid, dos veces al día; qid, cuatro veces cada día; po, administración oral; IT, administración intratecal; IV, administración intravenosa.

En casos donde la terapia intensiva con AMB fue empleada, la muerte del paciente es asumida debido a la patofisiología de la enfermedad o al retraso en el inicio de la terapia, y no a la resistencia AMB. En aislados de *Naegleria* provenientes de pacientes fallecidos por MEAP, todos demostraron sensibilidad a la anfotericina B cuando se probó *in vitro* (Duma y Finley, 1976; Tiewcharoen *et al.*, 2002). Sin embargo, existen algunos ejemplos sin éxito en el uso de AMB. En un caso raro de MEAP en un paciente inmunocomprometido con lupus eritromatoso sistémico, altas concentraciones de AMB via iv e it se administraron en el hospital el día 9 (iv de 0.5, e it de 1.0mg/kg), se pudo eliminar la amiba del LCR, pero el paciente murió en el hospital el día 40 con amibas presentes en el LCR (Shrestha *et al.*, 2003). Eliminaciones similares de amibas en el LCR de un

adulto masculino después de la administración de AMB por vía it e iv en el día 3, el paciente expiró el día 9 con numerosas amibas teniendo reaparición en el CFS (Lawande *et al.*, 1980). AMB intravenosa (0.6 mg/kg de peso corporal) y ceftriaxona (100mg/kg) fueron usados sin éxito para tratar un caso pediátrico de MEAP (Shenoy *et al.*, 2002). En ninguno de estos tres casos se tuvo el seguimiento de la amiba *in vitro*.

Además de la AMB, y otros medicamentos antifungicidas se han estado probando contra aislados de *Naegleria in vitro* y en ratones infectados con la amiba. Miconazol y ketoconazol mostraron *in vitro* ser efectivos contra *N. fowleri*, pero no en un modelo de ratón (Elmsly *et al.*, 1980). Como se mencionó anteriormente, el miconazol, el cual no está disponible en Estados Unidos, fue usado en conjunto con AMB en un tratamiento exitoso para MEAP (Seidel *et al.*, 1982) pero no está claro si fue la combinación de los dos medicamentos o sólo fue el efecto de la AMB. La AMB, clotrimazol, y miconazol fueron efectivos *in vitro* contra *N.fowleri* (Duma y Finley, 1976). En una comparación de AMB con ketoconazol, fluconazol e itraconazol *in vitro*, en muestras clínicas aisladas, se encontró que *N. fowleri* es más sensible a ketoconazol y AMB, pero son menos sensibles a los triazoles itraconazol y fluconazol (Tiewcharoen *et al.*, 2002). Una desventaja en el uso de AMB es el riesgo de dañar la función del riñón después del uso del medicamento. Comparando la AMB con AMB liposomal, una forma menos tóxica de el medicamento, la concentración mínima inhibitoria (MIC) para AMB fue 0.1µg/ml (Goswick y Brenener, 2003b). Sin embargo AMB liposomal fue menos efectiva *in vitro* y en el modelo de ratón que la forma más tóxica de AMB. AMB metil-éster, otro derivado de la AMB menos tóxico que el componente de origen, también fue menos efectivo en el modelo de ratón (Ferrante, 1982).

La membrana plasmática es el blanco de la AMB. El medicamento actúa por unión del ergosterol en la membrana, produciendo poros y causando la pérdida de pequeñas moléculas (Sande y Mandell, 1985). Se han hecho pocos estudios en los componentes esteroides de la membrana de *Naegleria* y ninguno en la membrana de *N. fowleri*. El Cicloartenol es el precursor del ergosterol en *N. lovaniensis*, mientras que en *N. gruberi* los precursores son cicloartenol, lanoesterol y parkeol (Raederstorff y Rohmer, 1987). En un estudio ultraestructural para el efecto de AMB en *N. fowleri* y *N. gruberi*, el medicamento produjo distorsiones en la forma nuclear, incremento en la membrana citoplasmática (con variaciones ásperas y lisas), anomalías mitocondriales, aparece la autofagia de vacuolas y embebimiento de la membrana plasmática (Schuster y Rechthand, 1975). Estos cambios en la célula llegaron a ser más pronunciados con una duración en la exposición y la concentración incrementada de AMB.

El macrólido azitromicina tiene eficacia contra *Naegleria* (Goswick y Brenner, 2003a; Schuster *et al.*, 2001) tanto estudios *in vitro* como *in vivo*. La claritromicina fue menos efectiva que la azitromicina *in vitro*, y la eritromicina fue mínimamente efectiva (Schuster *et al.*, 2001). Como se mencionó anteriormente, los niveles de azitromicina en el fluido cerebroespinal, se han reportado en niveles muy bajos (Jaruratanasirikul *et al.*, 1996).

Como los aislados clínicos de *Acanthamoeba*, existen variaciones en virulencia entre aislados de *N. fowleri*. La citopatogenicidad de células en cultivos de tejido, son frecuentemente considerados como un indicador de virulencia (John y John, 1989, 1994). Las diferencias en virulencia también son reflejadas en la mortalidad de los modelos de ratón (Wong *et al.*, 1977). La amiba aislada del caso de MEAP tratado exitosamente mencionado arriba (Seidel *et al.*, 1982) fue reportada como una de las menos citopáticas, para

cultivos celulares de riñón de mono de entre varios aislados de *N. fowleri*, se requirieron de 7 días para la destrucción de monocapas del tejido comparado los 2 a 6 días por otras cepas (John y John, 1989). Además también fue la más sensible a componentes de fenotiazina con respecto a varias cepas probadas *in vitro* (Schuster y Mandel, 1984). Una posible conclusión es que una combinación de baja virulencia y una gran sensibilidad de las muestras aisladas fueron factores en la supervivencia de los pacientes en este caso en particular.

Capítulo III

Conclusiones

Conclusiones

Se han hecho progresos en el tratamiento de encefalitis e infecciones relacionadas, causadas por la amiba de vida libre *Acanthamoeba*. Mientras nuevos medicamentos y nuevas combinaciones han sido probados en situaciones clínicas, estas enfermedades amebianas continúan teniendo una alta mortalidad. En parte esto se debe a la dificultad en diagnosticar las enfermedades dando como resultado el retraso de la iniciación de la terapia efectiva. Por otra parte, es muy frecuente que el diagnóstico se realice en la autopsia. También es muy posible que las encefalitis amebianas no sean reportadas debido a la ausencia de conocimiento o familiaridad de los médicos y patólogos con las enfermedades que causan estos organismos.

Se han realizado un gran número de combinaciones de medicamentos en tratamientos, y mientras la mortalidad permanece alta, los éxitos en el tratamiento logrados han sido publicados en la literatura. Ninguna indicación que sugiera resistencia al fármaco se ha mantenido oculta para poder lograr un mayor aprovechamiento del uso de multimedicamentos en el tratamiento de infecciones. *Naegleria fowleri*, el agente causante de meningoencefalitis, es sensible a anfotericina B y otros componentes antifúngicos, pero la naturaleza fulminante de la enfermedad, asociada con el diagnóstico retardado, son frecuentemente un factor crítico en la determinación de los resultados. La queratitis por *Acanthamoeba* es una infección discreta que es más sensible al tratamiento antimicrobiano que las infecciones sistémicas. Las cuales son más fácilmente reconocidas a causa de este efecto inmediato en el alivio y bienestar de los pacientes, la infección responde favorablemente al tratamiento con desinfectantes catiónicos (clorhexidina, polihexametileno biguanida) los cuales han llegado a ser los

medicamentos frecuentemente más usados en el tratamiento. Sin embargo, nuevos componentes con actividad amebicida y quisticida son necesarios para usarse en aquellas situaciones donde se encuentra cierta resistencia al medicamento. Se ha demostrado que la miristamidopropil dimetilamina y la miltefosina son dos componentes que pueden ser una alternativa prometedora para combatir queratitis infecciosas recalcitrantes, sin embargo aún faltan más estudios en el ámbito clínico.

Es importante hacer mención que se necesitan estudios más profundos de estas amibas y de las patologías que producen, así como ampliar el conocimiento sobre otras especies que son más raras o que producen de manera menos frecuente enfermedades, como sería el caso de las amibas del género *Balamuthia* y *Sappinia diploidea*, que también pueden ser causantes de lesiones cerebrales.

Apéndice
***Características y mecanismo de acción
de los fármacos utilizados***

CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIFÚNGICOS POR SU ESTRUCTURA (Tomado del libro de Goodman & Gilman)

Polienos	Nistatina, natamicina, amfotericina B
Azoles	Imidazol: miconazol, clotrimazol
	Triazoles: fluconazol, itraconazol, ketoconazol
	Triazoles de segunda generación: voriconazol, ravuconazol, posaconazol
Alilaminas	Terbinafina, naftifina
Lipopéptidos	Papulacandinas
	Triterpenos glicosilados
	Equinocandinas: caspofungina, anidulofungina, micafungina
Pirimidinas fluoradas	Flucitosina
Otros	Yoduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato, griseofulvin

CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIFÚNGICOS POR SU SITIO DE ACCIÓN EN EL HONGO

Antifúngicos interactuando en pared celular	Lipopéptidos
Antifúngicos interactuando en membrana celular	Polienos, azoles, alilaminas
Antifúngicos interactuando en núcleo	Pirimidinas fluoradas

Acción del antifúngico sobre la membrana celular del hongo

La membrana celular de la célula humana así como la de los hongos, desempeña una importante función en la división celular y en el metabolismo. Las complejas partículas lipídicas llamadas esterolatos, son

aproximadamente el 25 % de la membrana celular. Sin embargo, el contenido de esterol de la célula fúngica y mamífera es diferente. En las células de los mamíferos el colesterol es el esterol que predomina y en las células fúngicas el primario es el ergosterol. La diferencia del contenido de esteroides ha sido explotada como blanco de acción en los medicamentos antifúngicos. Dentro de ellos se tiene a los polienos, azoles y alilaminas.

Polieno. Los medicamentos que se encuentran en este grupo, se unen al ergosterol presente en la membrana celular fúngica, donde se forman poros que alteran la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causas de la muerte celular .

Azoles. Estos inhiben a la citocromo P-450-3-A de la célula fúngica, a través de la inactivación de la enzima C-14- α -dimetilasa, con lo cual se interrumpe la síntesis del ergosterol en la membrana celular. Debido a la falta de ergosterol se comienzan a acumular esteroides tóxicos intermedios, aumenta la permeabilidad de la membrana y se interrumpe el crecimiento del hongo.

Alilaminas. Trabajan de forma similar a los azoles, conceptualmente ellas inhiben la síntesis del ergosterol. Sin embargo, este grupo actúa en un paso temprano de la síntesis del ergosterol.

Las alilaminas inhiben a la enzima escualeno epoxidasa, de esta forma disminuye la concentración de ergosterol, aumentan los niveles de escualeno, aumenta la permeabilidad de la membrana celular, se interrumpe la organización celular y disminuye el crecimiento del hongo.

Antifúngicos que actúan sobre la pared celular del hongo

Lipopéptidos. La pared celular del hongo es fundamental en su viabilidad y patogenicidad. Esta sirve como cubierta protectora, le provee morfología celular, facilita intercambio de iones, la filtración de proteínas y participa en metabolismo y catabolismo de nutrientes complejos. La ausencia de pared celular es otro de los blancos de acción en la terapia antifúngica.

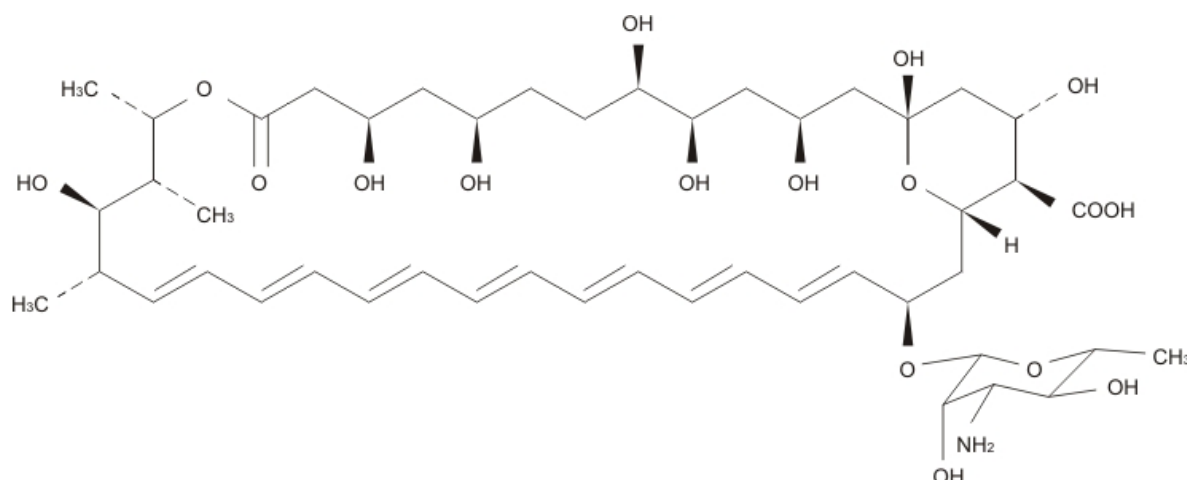
Desde el punto de vista estructural, la pared celular de los hongos está compuesta de un complejo protéico y polisacarídico cuya composición varía en dependencia de la especie de hongo. La distribución de estas proteínas y carbohidratos en la matriz está en relación con la función de la pared celular y los procesos de osmosis y lisis. Los antifúngicos que actúan sobre ella lo hacen inhibiendo la síntesis de los glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3-beta-glucano sintetasa. La falta de glucanos en la pared celular la vuelve débil e incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que muere.

Antifúngicos que actúan sobre el núcleo de la célula fúngica

Antimetabolitos. Un clásico antimetabolito es la fluocitosina o 5-fluorocitosina. Este fármaco es transportado por la citosina permeasa en el citoplasma de la célula fúngica, donde se convierte en 5-fluorouracil (5-FU) por la citosina diaminasa. El 5-FU es fosforilado e incorporado dentro del RNA convirtiéndose en el dexosinucleotido, el cual inhibe a la timidilato sintetasa y de esta forma impide la síntesis de proteínas de la célula. También inhibe la síntesis de la proteína fúngica, reemplazando el uracil con 5-FU en el ARN fúngico.

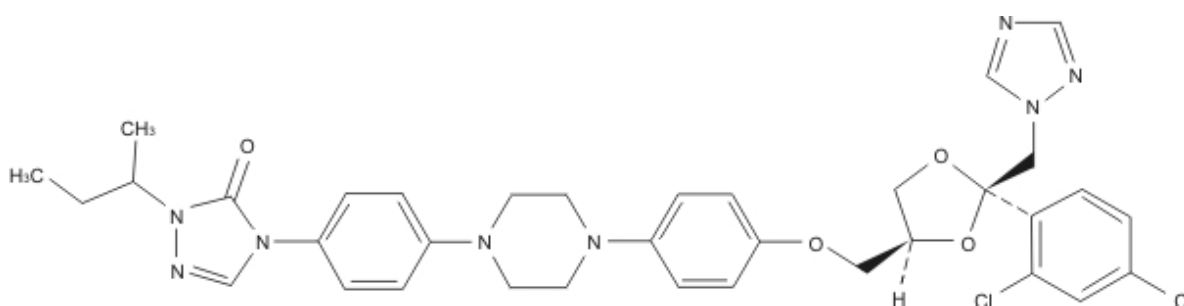
Agentes misceláneos. En esta clase se encuentra el griseofulvin, el cual inhibe la mitosis, al destruir el huso mitótico, necesario para efectuar la división celular.

Anfotericina B: Este es el más antiguo de los agentes antimicóticos de uso sistémico. Es producida naturalmente por el hongo *Streptomyces nodosus* y como la nistatina, este poliene interfiere con el mecanismo de producción de los esteroides y obligando a la formación de grandes poros sobre la membrana lipídica llevando así a la extravasación de potasio y electrolitos y ruptura de la membrana a través de otros mecanismos antioxidantes. Las ventajas de administrar la anfotericina con un vehículo liposomal como el ambisome, son las de poder administrar las mismas dosis o dosis mayores ofreciendo menos nefrotoxicidad ante las células humanas. Otra forma de administración es por vía intratecal cuando hay infección meníngea con coccidioides, el cual cursa con alta mortalidad.



Estructura de la anfotericina B

Ketoconazol: Se administra vía oral, absorbiéndose mejor en medio ácido. Se distribuye bien, salvo en SNC y se elimina por vía hepática con una vida media de 8 horas. A dosis elevada pueden inhibir la síntesis de testosterona y esteroides corticales por lo que a veces produce ginecomastia en varones. El efecto adverso más grave es la aparición de hepatotoxicidad que puede ser fatal. Interacciona con un gran número de fármacos que utilizan el sistema del citocromo P450 para su metabolismo (ciclosporina, antidiabéticos orales, etc).



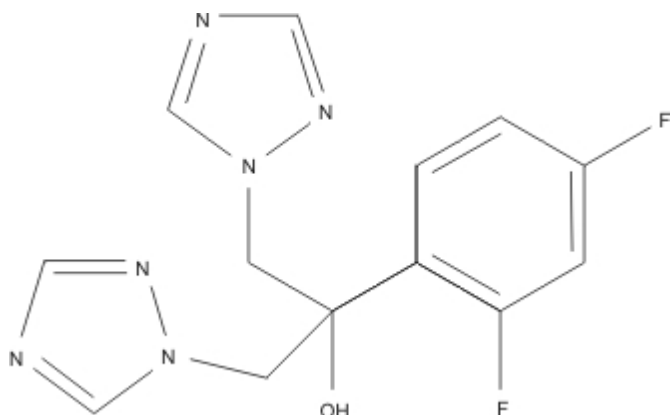
Estructura del ketoconazol

Fluconazol. Agente antifúngico ampliamente usado. Como otros triazoles, tiene 2 anillos que contienen 3 átomos de nitrógeno. El anillo bencénico presenta 2 flúor. Su peso molecular es relativamente bajo, 306,3 Da. Es una molécula polar y simétrica lo que favorece su hidrosolubilidad. Su aspecto es de polvo blanco y cristalino, es una base extraordinariamente débil (pKa 3,7) y no ionizable a pH fisiológico.

Su buena solubilidad en agua le hace apto para administración endovenosa, penetrando muy bien en fluidos corporales.

Interacción con el sitio activo. Este fármaco pudiera asociarse con sitios activos de la enzima a través de puente de hidrógeno entre el grupo C=O de

la enzima y el grupo OH del fármaco, interacción que tiene una fuerza de unas 5 kcal/mol.

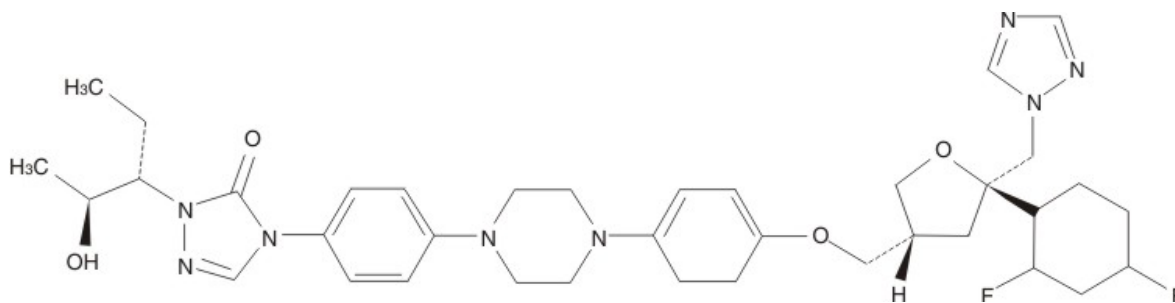


Estructura del fluconazol

Itraconazol. El itraconazol es un compuesto lipofílico que se distribuye en tejido grasos y su penetración en fluidos acuosos es limitada.

Interacción con el sitio activo: este fármaco pudiera asociarse con sitios activos de la enzima a través de asociaciones Van der Waals CH_3 del fármaco y CH_3 de la enzima.

Itraconazol se usa en el tratamiento de infecciones debido a la mayoría de las levaduras. Sus ventajas con respecto al fluconazol recaen en su actividad contra la mayoría de los *Aspergillus* y un subconjunto de *Candida*.



Estructura del itraconazol

Clotrimazol:

Mecanismo de acción: Acción fungistática, altera la permeabilidad de la membrana fúngica al inhibir la síntesis del ergosterol.

Indicaciones terapéuticas: Micosis superficiales de piel, micosis interdigitales, cutáneas y de pliegues cutáneos, paroniquia en onicomycosis. Sicosis de la barba y otomicosis. Vulvitis y balanitis candidiásica.

Cotrimoxazol es una combinación de trimetoprima y de sulfametoxazol, una sulfonamida. Elimina las bacterias que provocan infecciones, incluyendo las infecciones que afectan las vías urinarias, los pulmones (neumonía), oídos e intestinos. También se usa para tratar la diarrea del viajero. Los antibióticos no tienen ningún efecto sobre los resfríos, la gripe u otras infecciones virales.

Sulfonamidas Las sulfonamidas fueron las primeras drogas eficaces empleadas para el tratamiento sistémico de infecciones bacterianas en el ser humano. Les caracteriza compartir una estructura química similar al ácido para-amino-benzoico (PABA). El compuesto base de las sulfonamidas es la sulfanilamida, cuya estructura es similar al PABA, factor requerido por las bacterias para la síntesis del ácido fólico. Importa el grupo amino libre en posición 4 pues se relaciona con su actividad. Las sustituciones a nivel del radical sulfonilo modifican las características farmacocinéticas, pero no la actividad antibacteriana. Las sustituciones en el grupo amino en posición 4 dan compuestos de menor absorción intestinal.

Mecanismo de acción: Las sulfonamidas son análogos estructurales y antagonistas del PABA (ácido para amino benzoico) e impiden la utilización de este compuesto para la síntesis de ácido fólico. Este a su vez actúa en la síntesis de timina y purina. Esta acción se ejerce compitiendo por la acción

de una enzima bacteriana responsable de la incorporación de PABA al ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico. Las células de los mamíferos requieren ácido fólico preformado ya que no pueden sintetizarlo y por lo tanto no son atacadas. El efecto sinérgico de las sulfonamidas asociadas a trimetoprim se debe a la inhibición secuencial de esta vía metabólica.

Polimixina B

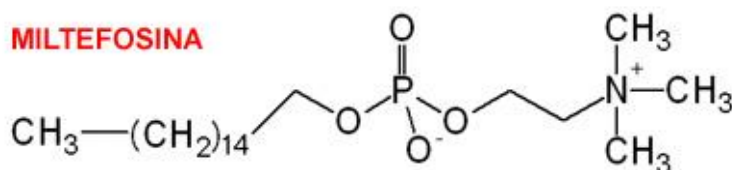
Los agentes activos en la membrana celular bacteriana son las polimixinas (polimixina B y colistín). Estas drogas son péptidos catiónicos con actividad de tipo detergente que disrumen la porción fosfolipídica de la membrana de las bacterias Gram negativas.

Interfiriendo con la síntesis de proteínas, a diversos niveles del organoide encargado de su elaboración, el ribosoma, actúa un cúmulo de agentes, a saber: Aminoglucósidos y aminociclitoles, tetraciclinas, cloranfenicol y sucedáneos, lincosamidas y macrólidos. Dada la complejidad de este proceso, hay diversos blancos que son impactados por los diferentes agentes antiinfecciosos. Los aminoglucósidos y aminociclitoles actúan a nivel de la porción 30 S del ribosoma, induciendo errores en la lectura de la información aportada por el ARN mensajero. De esta manera, la proteína que se sintetice contendrá errores y no será útil. También son capaces de inducir alteraciones de las membranas.

Miltefosina es un fosfolípido sintético activo tópicamente y por vía oral, químicamente similar a los fosfolípidos naturales. Este fármaco tiene propiedades antineoplásicas, inmunomoduladoras, antivirales y antiprotozoarias. La miltefosina es particularmente interesante en el tratamiento de la leishmaniasis visceral en la que ocasiona hasta el 98% de

curaciones. Tópicamente, se utiliza en el tratamiento de los linfomas cutáneos en los que se ha observado un 71% de respuestas y en el tratamiento del cáncer cutáneo de mama. En este tipo de cáncer, la miltefosina por vía oral no es activa.

Mecanismo de acción: se desconoce el mecanismo de acción de este fármaco. *In vitro*, a concentraciones muy bajas, la miltefosina es sinérgica con el factor estimulante de colonias, las interleukinas 2 y 3 y otros factores de crecimiento, aumentando el crecimiento de las células progenitoras de las células T. La acción antitumoral se cree que es debida a un efecto inhibidor sobre las enzimas implicadas en la síntesis y en la transcripción de los fosfolípidos de la membrana. La inhibición resultante de la proteína C kinasa impide la diferenciación celular.



Cloranfenicol

Mecanismo de acción:

Antibiótico bacteriostático de amplio espectro, actúa inhibiendo la síntesis proteica bacteriana.

Rifampina

Antibiótico bactericida semisintético de amplio espectro. Inhibe la síntesis del RNA bacteriano al unirse fuertemente a la subunidad beta de la RNA polimerasa dependiente del DNA; evita así la unión de la enzima al DNA y

bloquea la iniciación de la transcripción del RNA. Se absorbe en el tracto gastrointestinal, y se difunde bien en la mayoría de los líquidos y tejidos corporales incluyendo el LCR, donde las concentraciones aumentan si las meninges están inflamadas. Atraviesa la placenta. Al ser liposoluble puede llegar a las bacterias y micobacterias sensibles, tanto intracelulares como extracelulares. Su unión a las proteínas es elevada; se metaboliza en el hígado, donde es rápidamente desacetilada a metabolitos activos. La hidrólisis da lugar a la formación de 3-formilrifamicina inactiva en la orina. Se excreta en las heces, orina y en la leche materna. No se acumula en pacientes con disfunción renal.

Gentamicina: Pertenece al grupo de los aminoglucósidos. Estos son transportados en forma activa a través de la pared bacteriana, se unen irreversiblemente a una o más proteínas receptoras específicas de la subunidad 30 S de los ribosomas bacterianos e interfieren con el complejo de iniciación entre el RNA mensajero y la subunidad 30 S. El RNA puede leerse en forma errónea, lo que da lugar a la síntesis de proteínas no funcionales, los polirribosomas se separan y no son capaces de sintetizar proteínas. Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas. La gentamicina se absorbe totalmente después de su administración por vía intramuscular, en cambio, por vía oral su absorción es escasa. Por vía local tópica se pueden absorber cantidades significativas en la superficie corporal. Se distribuye principalmente en el líquido extracelular con acumulación en las células de la corteza renal. Atraviesa la placenta. Las concentraciones en orina son altas, pueden superar los 100 µg/ml. No se metaboliza.

Referencias.

- Aksozek, A., McClellan, K., Howard, K., Niederkorn, J. Y., Alizadeh, H., 2002. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical and radiological conditions, J. Parasitol 88:621-623.
- Anderson, K., Jamieson, A., 1972. Primary amoebic meningoencephalitis. Lancet 1902-903.
- Apley, J., Clarke, S.K.R., Roome, A. P. C.H., Sandry, S. A., Saygi, G., Silk, B., Warhust, D. C., 1970. Primary amoebic meningoencephalitis in Britain, Br. Med. J. 1: 596-599.
- Badenoch, P. R., Adams, M., Coster, D. J., 1995. Corneal virulence, cytopathic effect on human keratocytes and genetic characterization of *Acanthamoeba*. Int. J Parasitol. 25: 229-239
- Badenoch, P.R., Johnson, A. M., Christy, P. E., Coster, D. J., 1990. Pathogenicity of *Acanthamoeba* and a corynebacterium in the rat cornea. Arch. Ophthalmol. 108:107-112.
- Bakardjiev, A., Azimi, P. H., Ashouri, N., Ascher, D. P., Janner, D., Schuster, F. L., Visvesvara, G. S., Glaser, C., 2003. Amebic encephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris*: report of four cases. Pediatr. Infect. Dis. 22: 447-452.
- Berger, S. T., Mondino, B. J., Hofr, R. H., Donzis, P.B., Holland, G.N., Farley, M.K., Levenson, J.E., 1990. Successful medical management of *Acanthamoeba* keratitis. Am. J. Ophthalmol. 110: 395-403.
- Booton, G.C., Carmichael, J.R., Visvesvara, G.S., Byers, T.J., Fuerst, P.A. 2003. Genotyping of *Ballamuthia mandrillaris* based on nuclear 18S and mitochondrial 16S rRNA genes. Am. J. Trop. Med. Hyg. 68: 65-69.
- Bray, P.G., Barrett, M.P., Ward, S.A., de Kooning, H.P., 2003. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. Trends parasitol. 19: 232-239.
- Brown, R.L., 1991. Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis. Arch. Intern. Med. 151: 1201-1202.
- Cleland, P.G., Lawande, R.V., Onyemelukwe, G., Whittle, H.C., 1982. Chronic amebic meningoencephalitis. Arch. Neurol. 39: 56-57.

- Deetz, T.R., Sawyer, T.H., Billman, G., Schuster, F.L., Visvesvara, G.S. 2003. Successful treatment of *Balamuthia* amoebic encephalitis. Presentation of 2 cases. Clin. Infect. Dis. 37: 1304-1312.
- De Jonckheere, J., 1980. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. Appl. Environ. Microbiol. 39: 681-685.
- De Jonckheere, J.F. 2002. A century of research on the amoeboliagellate genus *Naegleria*. Acta Protozoologica 41: 309-342.
- Del Palacio, A., et. al. 2002. Tratamiento actual de la dermatofitosis. Revista Iberoam. Micol. 19: 68-71.
- Donnelly, H., Bernard, E.M., Rothkotter, H., Gold, J.W.M., Amstrong, D. 1988. Distribution of pentamidine in patients with AIDS. J. Infect. Dis. 157: 985-989.
- Driebe, Jr., W.T., Stern, G.A., Epstein, R.J., Visvesvara G.S., Adi, M., Komadina, T., 1988. *Acanthamoeba* keratitis. Potential role for topical clotrimazole in combination chemotherapy. Arch. Ophthalmol. 106: 1196-1201.
- Duma, R.J., Finley, R., 1976. In vitro susceptibility of pathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* species to a variety of therapeutic agents. Antimicrob. Agents Chemother. 10: 370-376.
- Duma, R.J., Rosenblum, W.L., McGhee, R.F., Jones, M.M., Nelson, E.C. 1971. Primary amoebic encephalitis caused by *Naegleria*. Two new cases, response to amphotericin B, and a review. Ann. Int. Med. 74: 923-931.
- Ebadi, M. 1996. Pharmacology. Third edition. Ed. Mosby
- Elder, M.J., Dart, J.K.G., 1995. Chemotherapy for *Acanthamoeba* keratitis. Lancet 345: 791-792.
- Elder, M.J., Kilvington, S., Dart, J.K.G. 1994. A clinicopathologic study of in vitro sensitivity testing and *Acanthamoeba* keratitis. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 35: 1059-1064.
- Elmsly, C.J., Donald, J.J., Brown, T.J., Keys, E.A. 1980. Chemotherapy of primary amoebic meningo-encephalitis (PAM). II. Miconazole and R41, 400 (ketoconazole), N.Z.J. Med. Lab. Technol. 34: 37-43.

- Ferrante, A., 1982. Comparative sensitivity of *Naegleria fowleri* to amphotericin B and amphotericin B methyl ester. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 76: 476-478.
- Ficker, L., Seal, D., Warhurst, D., Wright, P., 1990. *Acanthamoeba* keratitis-resistance to medical therapy. Eye 4: 835-838.
- Fritsche, T.R., Gautam, R.K., Seyedirashri, S., Bergeron, D.L., Lindquist, T.D. 1993. Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. Isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. J. Clin. Microbiol. 31: 1122-1126.
- Fritsche, T.R., Horn, M., Seyedirashti, S., Gautam, R.K., Schleifer, K.H., Wagner, M., 1999. In situ detection of novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. Phylogenetically related to members of the Order *Rickettsiales*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 206-212.
- Galarza, M., Cuccia, V., Sosa, F.P., Monges, J.A. 2002. Pediatric granulomatous cerebral amebiasis: a delayed diagnosis. Pediatric. Neurol. 26: 153-156.
- Gatti, S., Cevini, C., Bruno, A., Penso, G., Rama, P., Scaglia, M. 1998. In vitro effectiveness of povidone-iodine on *Acanthamoeba* isolates from human cornea. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2232-2234.
- Gelman, B.B., Popov, V., Chaljub, G., Narder, R., Rauf, S.J., Nauta, H.W., Visvesvara, G.S. 2003. Neuropathological and ultrastructural features of amebic encephalitis caused by *Sappinia diploidea*. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 62:990-998.
- Goswick, S.M., Brenner, G.M. 2003a. activities of azithromycin and amphotericin B against *Naegleria fowleri* in vitro and in a mouse model of primary amebic meningoencephalitis. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 524-528.
- Goswick, S.M., Brenner, G.M. 2003b. Activities of therapeutic agents against *Naegleria fowleri* in vitro and in a mouse model of primary amebic meningoencephalitis. J. Parasitol. 89: 837-842.
- Gullet, J., Mills, J., Hadley, k., Podemski, B., Pitts, L., Gelber, R. 1979. Disseminated granulomatous *Acanthamoeba* infection presenting as an unusual skin lesion. Am. J. Med. 67: 891-896.
- Hardman J.G., Limbird L.E., Molinoff P.B., Ruddon R.W., Goodman A.G. 1996. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapeutica. 9^{na} ed. Mc Graw-Hill Interamericana. Vol 2.

- Hay, J., Kirkness, C.M., Seal, D.V., Wright, P. 1994. Drug resistance and *Acanthamoeba* keratitis: the quest for alternative antiprotozoal chemotherapy. *Eye* 8: 555-563.
- He, Y.G., McCulley, J.P., Alizadeh, H., Pidherney, M., Mellon, J., Ubelaker, J.E., Stewart, G.L., Silvany, R.E., Niederkorn, J.Y. 1992. A pig model of *Acanthamoeba* keratitis: transmission via contaminated contact lenses. *Invest. Ophthalmol.* 33: 126-133.
- Helton, J., Loveless, M., White, Jr., C.R. 1993. Cutaneous *Acanthamoeba* infection associated with leukocytoclastic vasculitis in an AIDS patient. *Am. J. Dermatopathol.* 15: 146-149.
- Hirst, L.W., Green, W.R., Merz, W., Kaufmann, C., Visvesvara, G.S., Jensen, A., Howard, M. 1984. Management of *Acanthamoeba* keratitis a case report and review of the literature. *Ophthalmology* 1: 1105-1111.
- Horn, M., Wagner, M., Müller, K.D., Schmid, E.N., Fritsche, T.R., Schleifer, K.H., Michel, R. 2000. *Neochlamydia hartmannellae* gen. nov., sp. nov. (Parachlamydiaceae), an endoparasite of the amoeba *Hartmannella vermiformis*. *Microbiology* 146: 1231-1239.
- Hunt, S.J., Reed, S., Mathews, W.C., Torian, B. 1995. Cutaneous *Acanthamoeba* infection in the acquired immunodeficiency syndrome: response to multidrug therapy. *Cutis* 56: 285-287.
- Ishibashi, Y., Matsumoto, Y., Kabata, T., Watanabe, R., Hommura, S., Yasuraoka, K., Ishii, K. 1990. Oral itraconazole, and topical miconazole, with debridement for *Acanthamoeba* keratitis. *Am. J. Ophthalmol.* 109: 121-126.
- Jain, R., Prabhakar, S., Modi, M., Bhatia, R., Sehgal, R. 2002. *Naegleria* meningoencephalitis: a rare survival. *Neurol. India* 50: 470-472.
- Janitschke, K., Martínez, A.J., Visvesvara, G.S., Schuster, F. 1996. Animal model *Balamuthia mandrillaris* CNS infection: contrast and comparison in immunodeficient and immunocompetent mice: a murine model of "granulomatous" amebic encephalitis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55: 815-821.
- Jarolim, K.L., McCosh, J.K., Howard, M.J., John, D.T. 2000. A light microscopy study of the migration of *Naegleria fowleri* from the nasal submucosa to the central nervous system during the early stage of amebic meningoencephalitis in mice. *J. Parasitol.* 86: 50-55.

- Jaruratanasirikul, S., Hortiwakul, R., Tantisarasart, T., Phuenpathom, N., Tussanasunthornwong, S. 1996. Distribution of azitromycin into brain tissue, cerebrospinal fluid, and aqueous humor of the eye. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 825-826.
- John, D.T., John, R.A. 1989. Cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* in mammalian cell cultures. *Parasitol. Res.* 76: 20-25.
- John, D.T., John, R.A. 1994. Enhancement of virulence of *Naegleria fowleri* by growth in Vero-cell cultures. *J. Parasitol.* 80: 149-151.
- Karande, S.C., Lahiri, K.R., Sheth, S.S., Nadkarni, U.S., Jain, M.K., Shah, M.D. 1991. *Acanthamoeba* meningoencephalitis complicating pyogenic meningitis. *Indian Pediatric.* 28: 794-797.
- Kilvington, S., Hughes, R., Byas, J., Dart, J. 2002. Activities of therapeutic agents and myristamidopropyl dimethylamine against *Acanthamoeba* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 2007-2009.
- Kilvington, S., Larkin, .F.P., White, D.G., Beeching, J.R.1990. Laboratory investigation of *Acanthamoeba* keratitis. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2722-2725.
- Kong, H.H., Yee, S.T., Chung, D.I. 1998. Comparison of virulence by *Acanthamoeba* strains in a murine model of acquired immunodeficiency syndrome. *Korean J. Parasitol.* 36: 23-31 (in Korean with English abstract).
- Kosrirukvongs, P., Wanachiwanawin, D., Visvesvara, G.S.1999. Treatment of *Acanthamoeba* keratitis with chlorhexidine. *Ophthalmology* 106: 798-802.
- Lalitha, M.K., Anadi, V., Srivastava, A., Thomas, K., Cherian, A.M., Candi, S.M. 1985. Isolation of *Acanthamoeba culbertsoni* from a patient with meningitis. *J. Clin. Microbiol.* 21: 666-667.
- Larkin, D.F.P., Kilvington, S., Dart, J.K.G., 1992. Treatment of *Acanthamoeba* keratitis with polyhexamethylene biguanide. *Ophthalmology* 99: 185-191.
- Lawande, R.V., Macfarlane, J.T., Weir, W.R.C., Awunor-Renner, C. 1980. A case of primary amebic meningoencephalitis in a Nigerian farmer. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 21-25.
- Lim, L., Coster, D.J., Badenoch, P.R. 2000. Antimicrobial susceptibility of 19 Australian corneal isolates of *Acanthamoeba*. *Ophthalmology* 28: 119-124.

- Lindquist, T.D. 1998. Treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Córnea* 17: 11-16.
- Lloyd, D., Turner, N.A., Khunkitti, W., Hann, A.C., Rurr, J.R., Russell, A.D., 2001. Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: development of biocide resistance. *J. Euk. Microbiol.* 48: 11-16.
- Marciano-Cabral, F., Cabral, G. 2003. *Acanthamoeba* spp. As agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 273-307.
- Marrie, T.J., Raoult, D., La Scola, B., Birtles, R.J., de Carolas, E. 2001. *Legionella*-like and other amoebal pathogens as agents of community-acquired pneumonia. *Emerg. Inf. Dis.* 7: 1026-1029.
- Martínez, A.J., Duma, R.J., Nelson, E.C., Moretta, F.L. 1973. Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. Penetration of the olfactory mucosal epithelium by *Naegleria* and pathological changes produced: a light and electron microscope study. *Lab. Invest.* 29: 121-133.
- Martínez, A.J., Visvesvara, G.S. 1997. Free-living amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.* 7: 583-598.
- Martínez, M.S., Gonzalez-Mediero, G., Santiago, P., Rodríguez De Lope, A., Diz, J., Conde, C., Visvesvara, G.S. 2000. Granulomatous amebic encephalitis in a patient with AIDS: isolation of *Acanthamoeba* sp. Group II from brain tissue and successful treatment with sulfadiazine and fluconazole. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3892-3895.
- Maurin, M., Bryskier, A., Raoult, D. 2002. Antibiotic susceptibilities of *Parachlamydia acanthamoeba* in amoebae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3065-3067.
- Mehdi, H., Garg, H.S., Garg, N.K., Bhakuni, D.S. 1988. Sterols of *Acanthamoeba culbertsoni* strain A-1. *Steroids* 51: 551-558.
- Murdoch, D., Gray, T.B., Cursons, R., Parr, D. 1998. *Acanthamoeba* keratitis in New Zealand, including two cases with in vivo resistance to polyhexamethylene biguanide. *Aust. N. Z. Ophthalmol. J.* 26: 231-236.
- Newsome, A.L., Scott, T.M., Benson, R.F., Fields, B.S., 1998. Isolation of an amoeba naturally harbouring a distinctive *Legionella* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1688-1693.
- Niszl, I.A., Veale, R.B., Markus, M.B. 1998. Cytopathogenicity of clinical and environmental *Acanthamoeba* isolates for two mammalian cell lines. *J. Parasitol.* 84: 961-967.

- Oliva, S., Jantz, M., Tiernan, R., Cook, D.L., Judson, M.A. 1999. Successful treatment of widely disseminated acanthamoebiasis. *Southern Med. J.* 92: 55-57.
- Pérez-Santoja, J.J, Kilvington, S., Hughes, R., Tufail, A., Matheson, M., Dart, J.K. 2003. Persistently culture positive *Acanthamoeba* keratitis: in vivo resistance and in vitro sensitivity. *Ophthalmology* 110: 1593-1600.
- Ferrine, D., Chenu, J.P., Georges, P., Lancelot, J.C., Saturnino, C., Robba, M. 1995. Amoebicidal efficiencies of various diamidines against two strains of *Acanthamoeba polyphaga*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 339-342.
- Raederstorff, D., Rohmer, M. 1985. Sterol biosynthesis de novo via cycloartenol by the soil amoeba *Acanthamoeba polyphaga*. *Biochem. J.* 231: 609-615.
- Raederstorff, D., Rohmer, M., 1987. Sterol biosynthesis via cycloartenol and other biochemical features related to photosynthetic phyla in the amoebae *Naegleria lovaniensis* and *Naegleria gruberi*. *Eur. J. Biochem.* 164: 427-434.
- Rivera, M.A., Padhya, T.A. 2002. *Acanthamoeba*: a rare primary cause of rhinosinusitis. *Laryngoscope* 112: 1201-1203.
- Rowbotham, T.J. 1983. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *J. Clin. Pathol.* 36: 978-986.
- Sande, M.A., Mandell, G.L. 1985. Antimicrobial agents: antifungal and antiviral agents. In: Gilman, A.G., Goodman, L.S., Rall, T.W., Murad, F., (Eds.), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, seventh ed. Macmillan Publishing Co., New York, pp. 1219-1239.
- Schuster, F.L. 1993. Comparative effects of selected azole compounds on trophic and stages of *Acanthamoeba polyphaga*. *J. Euk. Microbiol.* 40: 563-569.
- Schuster, F.L. 2002. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 342-354.
- Schuster, F.L., Buck, S., Rosenthal, R.A., Schlech, B.A. 2003. Efficacy of myristamidopropyl dimethylamine (Aldox®) against corneal isolates of *Acanthamoeba* spp. *J. Euk. Microbiol.* 50 (Supplement), 520-521.
- Schuster, F.L., Dunnebacke, T.H., Visvesvara, G.S. 2001. Activity of selected antimicrobials against clinical isolates of pathogenic free-living amebas. In: Billot-Bonef, S., Cabanes, P.A., Marciano-Cabral, F., Pernin, P., Pringuez, E.

(Eds.), Proceedings of IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae, John Libbey Eurotext, Paris, France, pp. 45-48.

-Schuster, F.L., Glaser, C., Gilliam, S., Visvesvara, G.S. 2001. Survey of sera from encephalitis patients for *Balamuthia mandrillaris* antibody. J. Euk. Microbiol. 48 (Suppl.), 10S-11S.

-Schuster, F.L., Jacob, L.S. 1992. Effects of magainins on amoeba and cyst stages of *Acanthamoeba polyphaga*. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 1263-1271.

-Schuster, F.L., Mandel, N. 1984. Phenothiazine compounds inhibit in vitro growth of pathogenic free-living amoebae. Antimicrob. Agents Chemother. 25: 109-112.

-Schuster, F.L., Rechthand, E. 1975. In vitro effects of amphotericin B on growth and ultrastructure of the amoeboflagellates *Naegleria gruberi* and *Naegleria fowleri*. Antimicrob. Agents Chemother. 8: 591-605.

-Schuster, F.L., Visvesvara, G.S. 1998. Efficacy of novel antimicrobials against clinical isolates of opportunistic amoebas. J. Euk. Microbiol. 45: 612-618.

-Schuster, F.L., Visvesvara, G.S. 2003. Amebic encephalitis and amebic keratitis caused by pathogenic and opportunistic free-living amoebas. Curr. Treatment Options Infect. Dis. 5: 273-282.

-Seal, D.V. 2003. *Acanthamoeba* keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. Eye 17: 893-905.

-Seal, D.V., Hay, J., Kirkness, C.M. 1995. Chlorhexidine or polyhexamethylene biguanide for *Acanthamoeba* keratitis. Lancet 345: 136.

-Seidel, J.S., Harmatz, P., Visvesvara, G.S., Cohen, A., Edwards, J., Turner, J. 1982. Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis. N. Engl. J. Med. 306: 346-348.

-Seifert, K., Duchêne, M., Wernsdorfer, W.H., Kollaritsch, H., Scheiner, O., Wiedermann, G., Hottkowitz, T., Eibl, H. 2001. Effects of miltefosine and other alkylphosphocholines on human intestinal parasite *Entamoeba histolytica*. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 1505-1510.

-Sharma, S., Srinivasan, M., George, C. 1990. *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers. Arch. Ophthalmol. 108: 676-678.

- Shenoy, S., Wilson, G., Prashanth, H.V., Vidyalakshmi, K., Dhanashree.B., Bharath, R. 2002. Primary meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: first reported case from Mangalore, South India. J. Clin. Microbiol. 40: 309-310.
- Shrestha, N.K., Khanal, B., Sharma, S.K., Dhakal, S.S., Kanungo, R. 2003. Primary amoebic meningoencephalitis in a patient with systemic lupus erythematosus. Scand J. Infect. Dis. 35: 514-516.
- Singh, B.N., Das, S.R. 1972. Intra-nasal infection of mice with flagellate stage of *Naegleria aerobia* and its bearing on the epidemiology of human meningo-encephalitis. Curr. Sci. 41: 625-628.
- Singhal, T., Bajpai, A., Kalra, V., Kabra, S.K., Samantaray, J., Satpathy, G., Gupta, A.K., 2001. Successful treatment of *Acanthamoeba* meningitis with combination oral antimicrobials. Pediatr. Infect. Dis. J. 20: 623-627.
- Slater, C.A., Sickel, J.Z., Visvesvara, G.S., Pabico, R.C., Gaspari, A.A. 1994. Brief report: successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* infection in an immunocompromised patient. N. Eng. J. Med. 331: 85-87.
- Smith, F.R., Korn, E.D., 1968. 7-Dehyrostigmasterol and ergosterol: the major sterols of an amoeba. J. Lipid Res. 9: 405-408.
- Stevens, A.R., Willaert, E. 1980. Drug sensitivity and resistance of four *Acanthamoeba* species. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 74: 806-808.
- Stothard, D.R., Schroeder-Diedrich, J.M., Awwad, M.H., Gast, R.J., Ledee, D.R., Rodriguez-Zaragoza, S., Dean, C.L., Fuerst, P.A., Byers, T.J. 1998. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. J. Euk. Microbiol. 45: 45-54.
- Sundar, S., Jha, T.K., Thakur, C.P., Engel, J., Sindermann, H., Fischer, C., Junge, K., Bryceson, A., Berman, J. 2002. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. N. Eng. J. Med. 347: 1739-1746.
- Tiewcharoen, S., Junnu, V., Chinabut, P. 2002. In vitro effect of antifungal drugs on pathogenic *Naegleria* spp. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 33: 38-41.
- Turner, N.A., Russell, A.D., Furr, J.R., Lloyd, D. 2000. Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. J. Antimicrob. Chemother. 46: 27-34.
- Van Klink, F., Alizadeh, H., He, Y., Mellon, J.A., Silvany, R.E., McCulley, J.P., Niederkorn, J.Y. 1993. The role of contact lenses, trauma, and Langerhans

cells in a Chinese hamster model of *Acanthamoeba* keratitis. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 344: 1937-1944.

-Varga, J.H., Wolf, T.C., Jensen, H.G., Parmley, V.C., Rowsey, J.J. 1993. Combined treatment of *Acanthamoeba* keratitis with propamidine, neomycin, and polyhexamethylene biguanide. Am. J. Ophthalmol. 115: 466-470.

-Visvesvara, G.S., Schuster, F.L., Martínez, A.J. 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N.G., Sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. J. Euk. Microbiol. 40: 504-514.

-Walochnik, J., Obwaller, A., Aspöck, H. 2000. Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4408-4413.

-Walochnik, J., Duchene, M., Seifert, K., Obwaller, A., Hottkowitz, T., Wiedermann, G., Eibl, H., Aspöck, H. 2002. Cytotoxic activities of alkylphosphocholines against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 695-701.

-Wang, A., Kay, R., Poon, W.S., Ng, H.K. 1993. Successful treatment of amoebic meningoencephalitis in a Chinese living in Hong Kong. Clin. Neurol. Neurosurg. 95: 249-252.

-Wong, M.M., Karr, Jr., S.L., Chow, C.K. 1977. Changes in the virulence of *Naegleria fowleri* maintained in vitro. J. Parasitol. 63: 872-878.

-Wright, P., Warhurst, D., Jones, B.R. 1985. *Acanthamoeba* keratitis successfully treated medically. Br. J. Ophthalmol. 69: 778-782.

-Yeoh, R., Warhurst, D.C., Falcon, M.G. 1987. *Acanthamoeba* keratitis Br. J. Ophthalmol. 71: 500-503.