



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**DESCRIPCIÓN DE LOS EVENTOS TEMPRANOS DE LA
INVASIÓN DE *Acanthamoeba culbertsoni* EN EL MODELO
MURINO DE ENCEFALITIS AMIBIANA GRANULOMATOSA
(EAG) EN RATONES DIABÉTICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

RAQUEL SÁNCHEZ ROCHA

Los Reyes Iztacala. Edo. de México, 2018



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.

“I’d made it this far
and refused to give
up, because I had
always finished the
race.”

Louis Zamperinni

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a las personas más importantes de mi vida, a mis padres **María del Carmen Rocha Díaz** y **Bernardo Sánchez Contreras**. Por siempre darme el mejor ejemplo, por su amor y apoyo incondicional, por todo su esfuerzo, por enseñarme a luchar por lo que quiero, y porque sin importar nada siempre han estado ahí para mí.

Mamá. Te agradezco por todas tus noches de desvelo, por tu ayuda con las tareas, por siempre preocuparte por mi hermano y por mí, por todo tu apoyo a lo largo de todos estos años, por tu comida tan rica, todos tus consejos, tus regaños, e incluso por todas las diferencias que podemos llegar a tener. Eres sin duda la mejor mamá de todo el mundo. Te amo muchísimo.

Papá. Quiero darte las gracias por todo tu esfuerzo para que mi hermano y yo pudiéramos llegar hasta donde estamos ahora. Porque incluso cuando estabas cansado después de un día de trabajo, siempre estuviste ahí para salir a jugar al parque con nosotros. Porque siempre me has apoyado y dado lo mejor; por todas las pláticas, las risas, las anécdotas chistosas (que espero no se terminen), por esos consejos, regaños y porque, aunque no siempre estamos de acuerdo, no pude haber tenido un mejor papá, que tú. Te amo muchísimo.



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARITZA A. OMAÑA MOLINA

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Estado de
México, 2018.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Antecedentes históricos	3
2.2 Importancia clínica de las amibas de vida libre (AVL).....	4
2.3 <i>Acanthamoeba</i> spp.	5
2.3.1 Ciclo de vida.....	5
2.3.2 Ecología.....	8
2.3.3 Clasificación taxonómica	9
2.4 Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG)	10
2.4.1 Epidemiología.....	11
2.4.2 Cuadro clínico	11
2.4.3 Diagnóstico	12
2.4.4 Tratamiento	13
2.4.5 Factores de riesgo	14
2.4.6 Mecanismos de patogenicidad de <i>Acanthamoeba</i>	14
2.5 Diabetes Mellitus.....	15
2.5.1 Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1).....	15
2.5.2 Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2).....	16
2.5.3 Modelos de diabetes experimental	16
2.5.4 Estreptozotocina	16
3. ANTECEDENTES	18
4. JUSTIFICACIÓN.....	21
5. OBJETIVOS.....	22

5.1	OBJETIVO GENERAL.....	22
5.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
6.1	Determinación de la temperatura óptima de crecimiento	23
6.2	Reactivación de la virulencia de <i>A. culbertsoni</i>	24
6.3	Determinación del efecto citopático de <i>A. culbertsoni</i> en cultivo de células MDCK 25	
6.4	Inducción de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) a ratones BALB/c.....	25
6.5	Determinación de niveles de glucosa en sangre, peso corporal, volumen de orina y consumo de agua y alimento.....	26
6.6	Inducción de la EAG a ratones diabéticos	27
6.7	Grupo control	27
6.8	Obtención de cortes histológicos.....	28
6.9	Obtención de sueros hiperinmunes anti <i>A. culbertsoni</i> en conejo	29
6.10	Western blot	30
6.11	Técnica inmunohistoquímica	32
7.	RESULTADOS	33
6.1	Determinación de la temperatura óptima de crecimiento	33
6.1	Reactivación de la virulencia	33
6.1	Determinación del efecto citopático de <i>A. culbertsoni</i> en cultivo de células MDCK 34	
7.4	Inducción de DM2 a ratones BALB/c	35
7.5	Inducción de la EAG a ratones diabéticos	38
7.6	Western blot	38
7.7	Hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos de la interacción de <i>A. culbertsoni</i> en el meato nasofaríngeo y tejido cerebral de ratones diabéticos.....	39
8.	DISCUSIÓN	44
9.	CONCLUSIONES	50
10.	PERSPECTIVAS.....	50
11.	REFERENCIAS.....	51
12.	ANEXOS	63
a.	MEDIOS DE CULTIVO	63

b.	ESQUEMA CONVENCIONAL DE INMUNIZACIÓN EN CONEJO	64
c.	SOLUCIONES PARA WESTERN BLOT.....	65

1. RESUMEN

La encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) es una infección crónica de difícil resolución, causada por amibas del género *Acanthamoeba*. En la mayoría de los casos afecta a personas inmunosuprimidas o con enfermedades crónicas como la diabetes mellitus (DM).

En el presente trabajo se describen los eventos morfológicos tempranos de la infección inducida por vía intranasal, provocada por *Acanthamoeba culbertsoni* (genotipo T4), en el modelo murino de EAG, en ratones diabéticos, aislada de un caso clínico de queratitis amibiana, en el que se observó invasión extracorneal.

La cepa en estudio creció en condiciones óptimas en medio axénico a 30 °C, alcanzando su fase exponencial a las 96 h. Se evaluó el efecto citopático de trofozoítos de *A. culbertsoni* sobre células Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) relación (1:1) interaccionando en diferentes tiempos (1, 3, 6 y 8 h), observando la adherencia, migración hacia las uniones celulares y penetración de las amibas a la monocapa desde la primera hora de interacción.

Se indujo diabetes melitus tipo 2 (DM2) a un lote de 17 ratones machos BALB/c de 7 semanas de edad, con una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (130mg/kg dosis única), como grupo control 17 ratones sanos de la misma cepa y edad fueron inyectados con un volumen equivalente de buffer de citratos; todos los ratones fueron monitoreados semanalmente y se midieron los niveles de glucosa en sangre, así como el peso corporal.

Seis semanas post-inducción a la diabetes, los ratones se inocularon vía intranasal con 1×10^6 trofozoítos de *A. culbertsoni* en 20 μ l de medio. El grupo control se inoculó con la misma cantidad de medio de cultivo sin amibas. Posteriormente, los animales en estudio se dividieron en dos grupos. El primer grupo (de 5 ratones diabéticos y 5 sanos) se mantuvo en observación durante 21 días, registrando manifestaciones clínicas de la infección por EAG, y mortalidad. Durante este lapso sólo un ratón diabético murió a los 7 días post-inoculación, el resto sobrevivió y se sacrificaron en el tiempo establecido; los órganos (cerebro, pulmón, hígado y riñón), se colocaron en cajas con medio no nutritivo (NNE) enriquecido con *Enterobacter aerogenes* inactivada con calor y las amibas se recuperaron de cerebro y pulmón en todos los ratones.

El segundo grupo (de 12 ratones diabéticos y 12 sanos), se sacrificó y fijó mediante perfusión a las 24, 48, 72 y 96 h post-inoculación (3 ratones por cada tiempo). Se procesó el cerebro y el meato nasofaríngeo para obtener cortes histológicos de 4 μ m de grosor, y mediante técnica inmunohistoquímica, se evidenció la presencia de las amibas en los tejidos. Desde el tiempo

más temprano de interacción (24 h), se inmunolocalizaron trofozoítos en el tejido óseo del epitelio respiratorio, los paquetes del nervio olfatorio, células de Schwann, y la base del epineuro, a las 48 h los trofozoítos invadieron el epitelio respiratorio, la sustancia blanca del cerebro, la corteza central subcortical y tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT). Mientras tanto, a las 72 h trofozoítos y quistes se inmunolocalizaron en la capa granular del cerebelo. En bulbo olfatorio fue posible observar un pequeño infiltrado inflamatorio caracterizado por la presencia de células polimorfonucleares; sin embargo, en ninguno de los casos se pudo observar daño en el tejido. A las 96 h no fue posible encontrar evidencia de amibas en ninguna de las muestras analizadas. En general no se observó reacción inflamatoria periférica, ni infiltrado inflamatorio, en todos los tiempos evaluados. Lo que sugiere que la inmunosupresión característica de la diabetes mellitus, y la incapacidad del sistema inmune a responder adecuadamente ante una infección, podrían contribuir a la rápida diseminación de la misma en el organismo.

La invasión de los trofozoítos en los ratones diabéticos adultos fue significativamente mayor, con respecto a los ratones sanos de la misma cepa y edad, inoculados bajo las mismas condiciones, en todos los tiempos evaluados; lo cual sugiere que los ratones diabéticos son susceptibles ante la EAG. Los datos obtenidos, sugieren que los trofozoítos invaden los tejidos separando las células superficiales, penetrando entre las uniones celulares sin causar efecto citolítico en las células adyacentes, hasta alcanzar el SNC.

2. INTRODUCCIÓN

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoos cosmopolitas, ampliamente distribuidos en la naturaleza, que habitan ambientes como el suelo y el agua, aunque también se pueden encontrar en el aire, el cual es utilizado como medio de dispersión (Schuster, 2002).

La mayoría de las AVL presentan al menos dos estadios de desarrollo: trofozoíto y quiste. El trofozoíto o forma vegetativa, es el estado metabólicamente activo, se alimenta de bacterias y se multiplica por fisión binaria. El quiste es la forma de resistencia. Cuando las condiciones ambientales vuelven a ser favorables las amibas desinquistan (Schuster y Visvesvara, 2004).

Durante la primera mitad del siglo XX se descubrió que algunas amibas del suelo y del agua, que hasta entonces eran consideradas inocuas, protozoos no patógenos, eran capaces de invadir al hombre y a otros animales, causando la muerte o daño cerebral irreversible (Visvesvara *et al.*, 2007).

Algunas AVL son conocidas como microorganismos anfizóicos, debido a que tienen la capacidad de existir en el medio ambiente como organismos de vida libre o como parásitos oportunistas. Ciertas especies del género *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia*, *Hartmanella*; así como las especies *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* y *Sappinia pedata*, antes *S. diploidea*, son capaces de causar diversas patologías en el ser humano, entre las que destacan: la encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP), queratitis amibiana (QA) y lesiones en la piel. (Visvesvara *et al.*, 2007).

Así mismo, hallazgos *in vitro* y en especímenes clínicos, han demostrado que algunas amibas anfizóicas son capaces de actuar como vectores de distintas bacterias, como *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* *Mycobacterium avium* y *Vibrio cholerae*. De esta manera, formas tróficas y quistes funcionan como protección, medio de transporte y dispersión de las bacterias, permitiéndoles colonizar ambientes nuevos (Visvesvara *et al.*, 2007; Willey *et al.*, 2009).

2.1 Antecedentes históricos

En 1903, Schaudin había descrito a *Entamoeba histolytica* como la única amiba patógena para el hombre. Sin embargo, en 1958 durante los ensayos para la vacuna contra la poliomeilitis, Culbertson encontró en cultivos celulares de riñón de mono un patógeno desconocido hasta el momento, capaz de producir un efecto citopático en dichos cultivos, que después de ser aislados, fueron inoculados por vía intranasal e intracerebral en ratones y provocaron su muerte por una meningoencefalitis fatal que se desarrollaba en pocos días

(Culbertson, *et al.*, 1958,1959). Se observó que el daño fue causado por amibas patógenas diferentes a las descritas hasta ese momento, las cuales pertenecían al género *Acanthamoeba*, lo que ayudó a generar la hipótesis de que las AVL de este género podrían ser agentes causales de enfermedades similares en el hombre, éste aislado más tarde se clasificó como *Acanthamoeba culbertsoni*. Sin embargo, los primeros casos en los que *Acanthamoeba* spp. fue establecida claramente como agente causal de enfermedades en humanos fueron reportados a partir de 1970 (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

En 1965, Malcolm Fowler y Rodney F. Carter describieron en Australia cuatro casos de meningitis mortal en humanos, relacionando a una amiba del género *Acanthamoeba* como el agente causal. Sin embargo, un año más tarde, en 1966, Butt aisló y cultivó una amiba a partir de un caso de meningoencefalitis, cuya identificación aportó nuevos elementos, ya que, en este caso, a pesar de que se trataba también de una AVL, era diferente a las anteriormente descritas, ubicándola dentro del género *Naegleria*. Con base a los casos descritos, a la enfermedad se le denominó como meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) (Butt, 1966).

En 1990 *Balamuthia mandrillaris* fue aislada del cerebro de un mandril (*Mandrillus sphinx*) con infección en el sistema nervioso central (SNC) (Visvesvara *et al.*, 1990). Y en 1991 se dio a conocer el primer caso de infección humana por esta especie en un paciente con SIDA (Anzil *et al.*, 1991).

En 2001 se publicó el primer y único caso de encefalitis amibiana causada por *Sappinia pedata*, en un paciente inmunocompetente de 38 años de edad que sobrevivió al ser tratado con varias combinaciones de fármacos (Gelman *et al.*, 2001).

Sólo dos casos de encefalitis atribuidos al género *Vahlkampfia* han sido diagnosticados en base a su apariencia morfológica en los tejidos; y muy pocos casos han sido imputados genuinamente a especies del género *Hartmanella* (Gelman *et al.*, 2001; Gutiérrez, 2000; Martínez y Visvesvara, 1997; Martínez *et al.*, 1997; Mierowitz, 1982).

2.2 Importancia clínica de las amibas de vida libre (AVL)

Como se mencionó anteriormente, las AVL patógenas provocan diversas enfermedades en el ser humano. Estas se pueden presentar de forma subaguda o crónica, pudiendo afectar tanto a pacientes inmunosuprimidos como a individuos completamente sanos, y se asocian con patologías en SNC, piel, o córnea. En pacientes inmunodeprimidos, se han descrito casos en los que provocan infecciones diseminadas (cutáneas y nasofaríngeas) (Murakawa *et al.*, 1995).

El género *Acanthamoeba* y en particular las especies patógenas reportadas hasta el momento: *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. healyi*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes*, *A. hatchetti*; son capaces de

provocar diversas enfermedades relacionadas con la vía de transmisión y, sobre todo, con el estado inmunológico del paciente. (Martínez, 1991; Armstrong, 2000). Si se encuentra invadiendo el SNC, provoca una infección subaguda que causa necrosis y lesiones inflamatorias, llamada EAG, cuya vía de entrada puede ser hematológica o a través de las vías respiratorias, y afecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos (Martínez, 1991). También pueden encontrarse ocasionando ulceraciones en la piel o invadiendo la córnea, provocando QA, una infección dolorosa de difícil resolución, que se presenta por lo general en personas aparentemente sanas (Omaña-Molina *et al.*, 2010).

Naegleria fowleri es el agente causal de la MEAP, una infección del SNC que ocurre de manera más típica en niños, adolescentes y adultos jóvenes aparentemente sanos, con antecedente de natación o juego en fuentes de agua dulce, termales o calentadas de manera artificial (John, 1982; Yoder *et al.*, 2012).

Balamuthia mandrillaris, *Sappinia pedata*, *Vahlkampfia* y *Hartmannella* son también agentes causales de EAG, induciendo lesiones inflamatorias, necrosis y lesiones hemorrágicas (Walochnik *et al.*, 2010).

El presente trabajo se enfocó en el estudio del género *Acanthamoeba*, y en particular en la especie *A. culbertsoni*.

2.3 *Acanthamoeba* spp.

El género *Acanthamoeba* fue descrito por primera vez por Sir Aldo Castellani en 1930, al reportar la presencia de una amiba en un cultivo de *Cryptococcus pararoseus*; posteriormente, M. Douglas la designó como *Hartmannella castellanii* (Douglas, 1930); pero no fue hasta 1931 que Volkonsky crea el género *Acanthamoeba*, quedando finalmente como *Acanthamoeba castellanii* (Volkonsky, 1931).

2.3.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida de las especies de *Acanthamoeba* involucra dos estadios: una forma activa o trofozoíto y una forma latente de resistencia, conocida como quiste.

El trofozoíto se caracteriza por emitir numerosos y finos pseudópodos semejando espinas, conocidos como acantópodos, los cuales son uninucleados, con un nucléolo central prominente. Poseen numerosas vacuolas digestivas, destacando la presencia de una vacuola contráctil muy activa, su tamaño varía entre 25 μm y 40 μm de longitud (**Fig. 1**), se alimenta por fagocitosis de bacterias, algas y levaduras (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

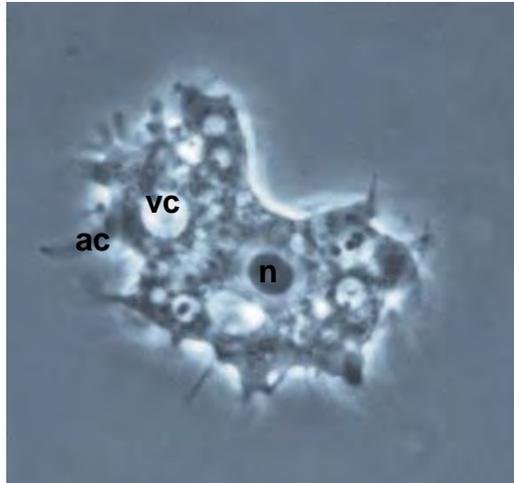


Figura 1. Microscopía de luz, contraste de fases (100 x). Morfología de un trofozoíto de *Acanthamoeba* spp. vacuola contráctil (**vc**), acantópodos (**ac**), núcleo (**n**). Fundación Bioquímica Argentina.

La forma quística consta de una doble pared: una externa, que puede ser ondulada o lisa (exoquiste), y otra interna (endoquiste) (**Fig. 2**). La formación del quiste ocurre bajo condiciones ambientales adversas como la falta de alimento, la desecación y los cambios en la temperatura y pH (Bowers y Korn, 1969; Byers *et al.*, 1980; Chagla y Griffiths, 1974). En general son altamente resistentes a las condiciones adversas, ya que, por ejemplo, los quistes pueden mantenerse viables por más de 24 años a 4 °C, conservando su capacidad invasiva (Mazur *et al.*, 1995). El tamaño puede variar de 13 a 20 μm de acuerdo a la especie, puede tener forma estrellada, poliédrica o esférica. Las paredes se unen en determinadas zonas formando los ostiolos, que representan la vía de salida del trofozoíto, cuando las condiciones medio ambientales y nutricionales aseguran su subsistencia y reproducción (Bowers y Korn, 1968, 1969; Byers, 1979).

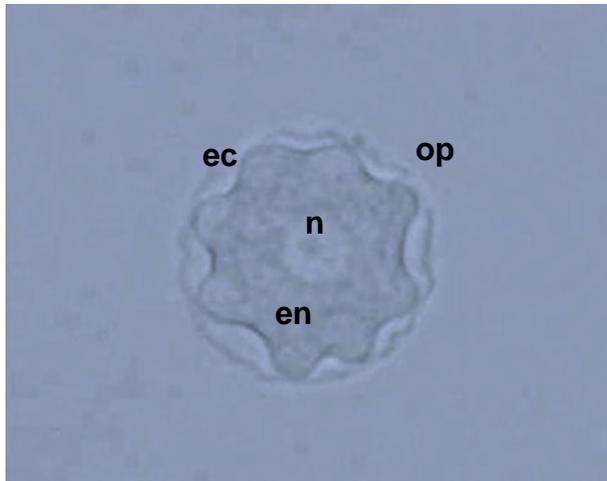


Figura 2. Microscopía de luz, contraste de fases (100 x). Morfología de un quiste de *Acanthamoeba* spp. ectoquiste (**ec**), endoquiste (**en**), núcleo (**n**), opérculo (**op**) (Pérez-Pomata *et al.*, 2005).

En la naturaleza podemos encontrar fácilmente quistes y trofozoítos de *Acanthamoeba*, los cuales son capaces de provocar diversas patologías, dependiendo de la vía de entrada. Por vía hematológica o intranasal, causan EAG, infección que afecta al SNC de pacientes inmunosuprimidos, lesiones en piel, así como QA, que afecta la córnea en pacientes aparentemente sanos (**Fig. 3**).

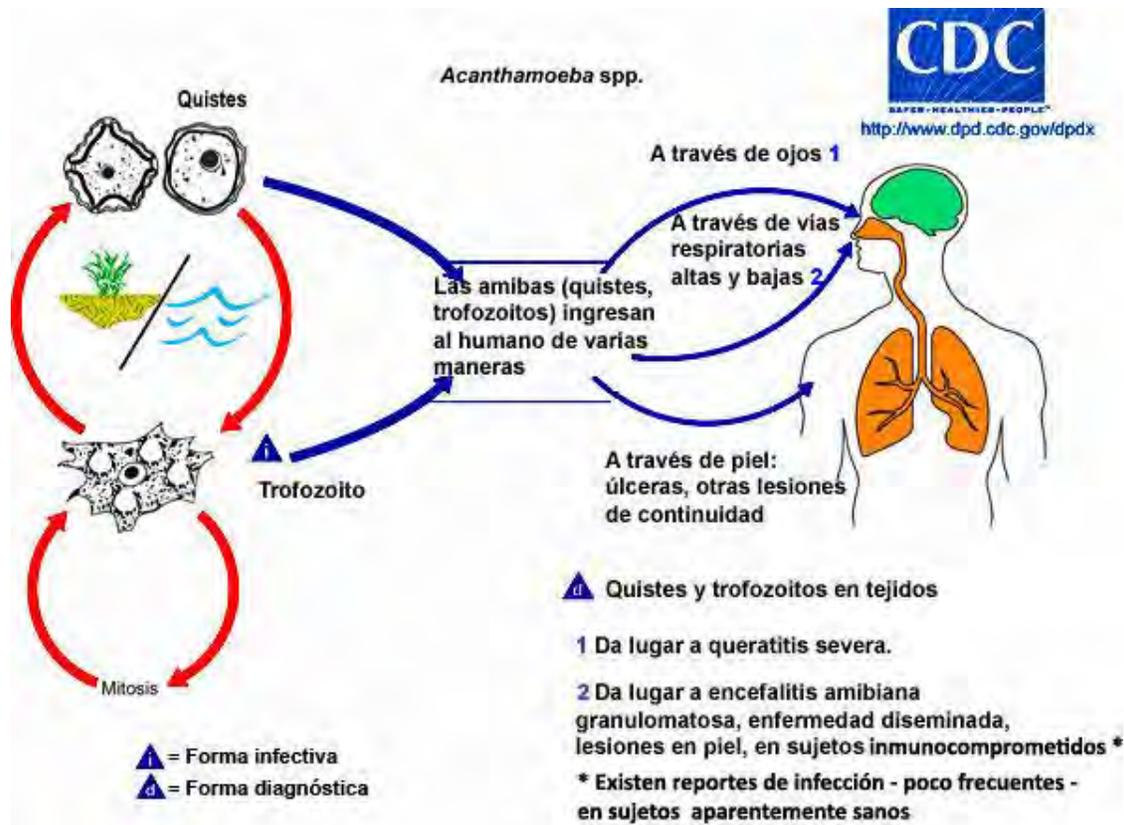


Figura 3. Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp. Los trofozoitos son la forma infecciosa, y son capaces de provocar diferentes patologías en pacientes inmunocomprometidos y sanos (EAG, QA y lesiones en piel), dependiendo de la vía de entrada (CDC traducido al español).

2.3.2 Ecología

Son los protozoos más frecuentemente encontrados en la naturaleza. Han sido aislados de diversos ambientes: tierra, polvo, aire, agua dulce natural y tratada, agua de mar, agua embotellada mineral, agua destilada, piscinas, aguas residuales, sedimentos, aire acondicionado, conductos de ventilación, filtros de calefacción hospitalares, lentes de contacto y cultivos celulares (Barbeau y Buhler, 2001; Casemore, 1977; Castellani, 1930; De Jonckheere, 1991; Jahnes y Fullmer, 1957; Kingston y Warhust, 1969; Mergeryan, 1991; Michel, Müller y Hoffmann, 2001; Paszko-Kolva, *et al.*, 1991; Rivera *et al.*, 1987; Shin y Hadley, 1936; Szénási *et al.*, 1998). También han sido aisladas de animales incluyendo especies de peces, anfibios, reptiles y mamíferos (Chamorro *et al.*, 1988; Dyková *et al.*, 1999; Madrigal Sesma, 1988; Walochnik *et al.*, 1999).

Debido a que su contacto con el hombre es un hecho muy común, se ha observado que, hasta un 50% de la población, posee anticuerpos específicos frente a *Acanthamoeba* (Cursons, 1980; Cerva, 1989), siendo aisladas de la cavidad nasofaríngea de individuos asintomáticos y de personas inmunodeficientes (Rivera *et al.*, 1984).

2.3.3 Clasificación taxonómica

El Comité para la Sistemática y Evolución de la Sociedad de Protozoólogos, en 1980 propuso, la siguiente clasificación (Martínez y Janitschke, 1985):

Subreino: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Sarcodina

Superclase: Rhizopoda

Clase: Lobosea

Subclase: Gymnamoebia

Orden: Amoebida

Suborden: Acanthopodina

Familia: Acanthamoebidae

Género: *Acanthamoeba*

La clasificación taxonómica del género *Acanthamoeba* está en constante revisión.

Las especies que en la actualidad conocemos como integrantes de este género, anteriormente se encontraban incluidas dentro del género *Hartmanella*. Fue a partir de 1967, cuando fueron definitivamente clasificadas como género independiente (Page, 1967).

Pussard y Pons en 1977, propusieron una clasificación basada principalmente en la morfología y medida del quiste en 3 grupos, (Pussard y Pons, 1977).

El grupo I consiste en especies caracterizadas por grandes quistes con endoquistes en forma estrellada y ectoquistes que pueden ser lisos o rugosos de tamaño promedio, mayor a los 18 μ m. El grupo II es el que cuenta con mayor cantidad de especies, debido a que incluye a las amibas con una mayor distribución y las que han sido comúnmente aisladas de casos clínicos. El ectoquiste se caracteriza por ser rugoso, mientras que el endoquiste puede ser poligonal, triangular, ovalado o redondeado y menores a 18 μ m. En el grupo III, el ectoquiste es delgado y ondulado mientras que el endoquiste es generalmente redondeado u oval, con un tamaño promedio de 18 μ m (**Fig. 4**) (Schuster *et al.*, 2004; Visvesvara, 1991).



Figura 4. Clasificación de los quistes de *Acanthamoeba* spp. con base a sus características morfológicas.

La clasificación de *Acanthamoeba* basada en características morfológicas ha resultado poco fiable, esto debido a que la morfología de las especies puede cambiar de acuerdo las condiciones de cultivo en el que se encuentren. Por lo que se han aplicado criterios inmunológicos, bioquímicos y fisiológicos con el fin de identificar las diferentes especies que conforman el género; no obstante, muchas de ellas comparten varias de estas características haciendo estos criterios de clasificación deficientes para su identificación (Johnson *et al.*, 1990). Para evitar estos problemas, se han generado métodos de clasificación molecular, los cuales consisten en esquemas basados en secuencias del ARN ribosomal 18S (Stothard *et al.*, 1998; Gast *et al.*, 1996). Actualmente, la clasificación más reciente de *Acanthamoeba* las agrupa en genotipos de T1 a T20 (Corsaro *et al.*, 2015). Es importante mencionar que la mayoría de los aislados patógenos pertenecen al grupo T4.

2.4 Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG)

Es una infección del SNC que se caracteriza por presentar un curso clínico insidioso y prolongado que abarca de semanas a meses de evolución, inicia posiblemente por vía

hematógena o nasal, a partir de focos primarios localizados en el tracto respiratorio inferior, o de lesiones ulcerosas o nodulares en la piel, siendo ésta la primera puerta de entrada en la mayoría de los casos. Se observan áreas de necrosis hemorrágica en la corteza cerebral, ganglios basales y fosa posterior. Células inflamatorias forman granulomas, a excepción de huéspedes inmunosuprimidos, que no lo forman. Se observa angeítis generalizada y presencia de trofozoítos y quistes en las lesiones (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Gelman *et al.*, 2001). En casos de inmunosupresión puede producirse la diseminación de *Acanthamoeba* spp. a órganos como hígado, riñón, tráquea o glándulas adrenales (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

2.4.1 Epidemiología

El reporte de casos a nivel mundial es relativamente bajo a pesar de la distribución mundial del parásito, ya que se considera imposible evitar su contacto. Desde 1960, cuando se reportó el primer caso, hasta el año 2000, el número de casos reportados de individuos con EAG fue aproximadamente de 200 (Schuster y Visvesvara, 2004). 84 de estos ocurridos en los Estados Unidos y de los cuales, 50 casos fueron registrados en pacientes con SIDA. Al afectar a individuos inmunocomprometidos y con enfermedades crónicas, los casos pueden ocurrir en cualquier época del año, sin un patrón estacional (Visvesvara, 2013). La EAG ha aumentado significativamente en los últimos 10 años en Estados Unidos, por el incremento individuos inmunosuprimidos, sin embargo, los datos epidemiológicos no dejan muy claro si el contagio es debido a contactos ambientales únicamente o existe un componente genético, ya que un porcentaje muy elevado de los pacientes, corresponden a individuos hispanos (Schuster y Visvesvara, 2004). En un periodo de 20 años, en Austria, han diagnosticado 3 casos de EAG, identificando a los genotipos T2, T4 y T5, (Walochnick *et al.*, 2015). En México, se tiene el registro de un caso de EAG por *Acanthamoeba* spp. en el que el paciente sobrevivió (Ortíz *et al.*, 2000); y otro más de una infección cerebral mixta, que involucró a *Acanthamoeba* sp. y *Aspergillus* sp (Bonilla *et al.*, 2001).

Sin embargo, es probable que estas cifras, estén subestimadas, ya que, en muchos países, la realización de necropsias es mínima, o simplemente no se lleva a cabo.

2.4.2 Cuadro clínico

El portal de entrada de la infección no se conoce claramente, ya que llega a ser evidente sólo después de varias semanas o incluso meses (Martínez y Janitschke, 1985), tiempo en el que se afectan los hemisferios cerebrales, siendo las áreas más dañadas el diencefalo, el

tálamo y el bulbo raquídeo, con un deterioro neurológico progresivo, un intenso edema, ablandamiento del tejido, necrosis y abscesos, con presencia de trofozoítos y quistes. En algunos casos, la encefalitis se puede confundir con un tumor cerebral, llegando a ocupar un espacio bien definido. Puede aparecer conjuntamente sinusitis crónica, irritación meníngea, alteraciones del estado mental, cambios en el comportamiento, convulsiones, cefalea, afasia, fiebre, rigidez de cuello, alteración de la visión, anorexia, náuseas y vómitos, ataxia, coma y muerte (Ma *et al.*, 1990; Sangruchi *et al.*, 1994; Murakawa *et al.*, 1995).

Con base en estudios *post mortem* ha sido posible dilucidar la vía de infección, que se cree puede ser a través de lesiones en la piel o por inhalación de amibas través de las fosas nasales y los pulmones (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

2.4.3 Diagnóstico

Generalmente se hace por sospecha, según los antecedentes epidemiológicos, los datos clínicos, y la visualización de los protozoos en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR). Normalmente, el agente es identificado en biopsias cerebrales *post mortem*. Existen signos que sugieren la presencia de *Acanthamoeba*, como son disminución de los niveles de glucosa, aumento del número de células blancas, principalmente linfocitos, así como el aumento de las proteínas presentes en el LCR, (se aconseja que el LCR se centrifugue a baja velocidad (250g) durante 10 minutos para evitar la lisis de los trofozoítos) (Marciano-Cabral *et al.*, 1995).

En condiciones normales el LCR es de color transparente, baña el cerebro y la médula espinal, circula por el espacio subaracnoideo, los ventrículos cerebrales y el canal medular central. Su volumen es de 100 a 150 ml. Sin embargo, puede enturbiarse por la presencia de leucocitos u otras células. Cuando los niveles de proteínas en el LCR aumentan, pueden ser un signo de tumor, sangrado, inflamación de un nervio o lesión. De esta manera, la proteína se puede acumular rápidamente si algo está bloqueando el flujo en el área baja de la columna, donde se realiza la punción lumbar (Rosenberg, 2012).

Los cortes de tejido procedente de biopsia pueden teñirse con H&E, Gram o Giemsa que, aunque no son tinciones específicas, permiten distinguir las amibas de los macrófagos según su morfología (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). Sobre estos mismos cortes pueden realizarse técnicas de inmunohistoquímica o inmunofluorescencia con anticuerpos mono o policlonales.

2.4.4 Tratamiento

Por el momento, no existen tratamientos efectivos. Dentro de los factores que contribuyen a esta pobre respuesta del tratamiento se encuentra el retraso en el diagnóstico, ya que este tipo de infecciones son raras y, en sus inicios, presentan muy pocos síntomas claros que ayuden a su identificación, además del hecho de que el diagnóstico se hace a menudo *post-mortem*. Los fármacos antiparasitarios presentan unos niveles muy bajos de penetración en el LCR, aunado la alta resistencia del quiste (Bottone, 1993; Khunkitti *et al.*, 1998). Y en algunos casos el tratamiento es interrumpido debido a efectos secundarios indeseables de los medicamentos (Seijo *et al.*, 2000; Bloch y Schuster, 2005). La combinación de factores, entre ellos el diagnóstico tardío, la eficacia sub-óptima de la terapia antiparasitaria y problemas inherentes al hospedero (inmunodeficiencias) hacen que la perspectiva de un tratamiento exitoso para la EAG sea pobre (Visvesvara *et al.*, 2007).

Se han descrito resultados esperanzadores frente a este tipo de infecciones, usando compuestos como ketoconazol, fluconazol, itraconazol, pentamidina isetionato, cotrimoxazol, sulfadiazina, y 5-fluorocitosina (flucitosina); en forma individual o combinada, con diferentes grados de buen éxito. Infecciones cutáneas han sido tratadas con aplicaciones tópicas de gluconato de clorhexidina y ketoconazol (Schuster y Visvesvara, 2004).

Algunos regímenes de tratamiento exitosos han incluido cotrimoxazol, rifampicina y ketoconazol en dos pacientes pediátricos con infecciones del SNC (Singhal *et al.*, 2001); sulfadiazina, y fluconazol en un paciente con infección por VIH/SIDA con EAG (Seijo *et al.*, 2000).

Cabello-Vílchez y cols. en 2014 observaron que el voriconazol demostró ser más eficaz contra las cepas de *Acanthamoeba* que la clorhexidina. Asimismo, Webster *et al.* en 2012, informaron de un tratamiento exitoso en un paciente inmunocompetente, utilizando una combinación de voriconazol y miltefosina. Pruebas *in vitro* demostraron que el voriconazol presenta un efecto inhibitorio en contra de *Acanthamoeba* spp. (Schuster *et al.*, 2006).

A pesar de esta cadena de eventos exitosos, la tasa de supervivencia de esta infección es del 2-3% (Kaushal *et al.*, 2008), por lo que la eficacia de un fármaco o combinación de fármacos en detener una infección por *Acanthamoeba* está determinada por numerosos factores que incluyen el estado inmune del hospedero, la progresión de la enfermedad y el momento en que se inicia la intervención del medicamento, la dosis infecciosa de las amibas, el perfil de susceptibilidad al fármaco y la virulencia de la cepa particular que causa la infección.

2.4.5 Factores de riesgo

La EAG generalmente se asocia con individuos debilitados o con algún tipo de inmunosupresión, así como con enfermedades crónicas como la diabetes mellitus (Blanco-Vidal *et al.*, 2013; Bloch y Schuster, 2005; Fung *et al.*, 2008; Harwood *et al.*, 1988; Mayer *et al.*, 2011; McKellar *et al.*, 2006; Petry *et al.*, 2006; Salameh *et al.*, 2015; Satlin *et al.*, 2013); pacientes con VIH/SIDA (Martínez y Visvesvara, 1997), lupus eritematoso (Thamtam *et al.*, 2016), cáncer (Memari *et al.*, 2015), falla renal (Martínez y Visvesvara, 1997), pacientes con terapia inmunosupresora, cirrosis y tuberculosis (Martínez 1991; Martínez y Janitschke, 1985; Martínez y Visvesvara, 1997).

Se ha documentado que los factores que predisponen la incidencia de EAG incluyen el alcoholismo (Martínez y Visvesvara, 1997), el abuso de drogas, el embarazo, el tratamiento con corticoesteroides, la quimioterapia, la radioterapia y el trasplante de órganos (Abd *et al.*, 2009; Doan *et al.*, 2015; Fung *et al.*, 2008; Salameh *et al.*, 2015; Satlin *et al.*, 2013; Young *et al.*, 2010).

Sin embargo, la mayor susceptibilidad a la infección se asocia a condiciones que suprimen o debilitan el sistema inmunológico (Martínez, 1991).

2.4.6 Mecanismos de patogenicidad de *Acanthamoeba*

Los procesos a través de los cuales *Acanthamoeba* provoca daño a su hospedador, inician con la adhesión de los trofozoítos a las superficies epiteliales, la secreción de proteasas, para desorganizar a estos tejidos y, por último, la fagocitosis celular. Se ha observado que la fijación es uno de los pasos cruciales en la patogenicidad de la amiba; las amibas no patógenas presentan unos niveles muy bajos de unión a las células de su hospedador (Khan *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1997). El número de acantópodos que presenta la amiba está muy relacionado con su capacidad de adhesión. Las amibas patógenas presentan más de cien por célula, dificultándose su unión, cuando su número no sobrepasa los veinte (Khan, 2001). La capacidad del parásito para unirse al epitelio celular será, por tanto, un prerrequisito para el establecimiento de la enfermedad y un factor de virulencia que va a determinar la patogenicidad de las diferentes cepas, existiendo diferencias entre las cepas que se aíslan del medio con las que son aisladas de córneas infectadas (Van Klink *et al.*, 1992).

Los trofozoítos de *A. culbertsoni* son capaces de inducir apoptosis en las células microgliales, lo que podría tener importancia para el esclarecimiento de la interacción de *Acanthamoebas* patógenas con células nerviosas, en el desarrollo de la EAG (Shin *et al.*, 2000).

2.5 Diabetes Mellitus

Es un grupo de enfermedades o síndromes metabólicos, donde se altera el metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas. Se caracteriza por la aparición de hiperglucemia crónica, como resultado de un deterioro de la secreción de insulina, de la acción de la insulina o ambas (American Diabetes Association, (ADA) 2015). La hiperglucemia crónica de la diabetes está asociada a complicaciones microvasculares y macrovasculares a largo plazo. Entre las microvasculares destacan la retinopatía, con potencial pérdida de la visión y nefropatía diabética, que puede conducir al daño renal agudo. Las macrovasculares son la cardiopatía isquémica, que puede dañar corazón, reduciendo su capacidad de bombear de forma eficiente; insuficiencia cardíaca, enfermedad cerebrovascular, enfermedad vascular periférica (obstrucción de grandes arterias) y neuropatía diabética, con el riesgo de úlceras en pies y amputaciones (Alpizar, 2001).

La DM es una enfermedad crónico degenerativa que compromete el estado inmune de los pacientes, la cual se presenta cuando el páncreas no produce insulina, (hormona responsable de que la glucosa proveniente de los alimentos, sea absorbida por las células y dotar de energía al organismo), o bien, la que se produce no es utilizada de manera eficiente por el organismo. La acción deficiente de la insulina puede deberse a una disminución de su secreción por las células β del páncreas, una reducción en la respuesta de tejidos blanco a la insulina (resistencia a la insulina), o un aumento en las hormonas contra reguladoras que se oponen a los efectos de la insulina (Bensellam *et al.*, 2012). Así mismo, la DM está asociada con un bajo grado de inflamación, así como al incremento en el riesgo de padecer enfermedades infecciosas y sus complicaciones (Shah y Hux, 2003; Hodgson *et al.*, 2015).

Desde el año 2000, la diabetes mellitus en México es la primera causa de muerte entre las mujeres y la segunda entre los hombres. Se clasifica en dos categorías principales: tipo 1, que provoca una absoluta deficiencia en la secreción de insulina; y tipo 2, que es la más común, y la causa es una combinación de resistencia a la acción de la insulina, y una inadecuada respuesta secretora de insulina compensatoria (Rojas *et al.*, 2015).

2.5.1 Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1)

La DM1 se registra en el 90% de los niños con diabetes, y en el 5-10% de los adultos diabéticos; más de 5.3 millones de personas en el mundo padecen DM1, y se estima que alrededor de 218,000 desarrollan la enfermedad cada año; la cual se debe a procesos de autoinmunidad sobre las células β productoras de insulina ubicadas en los islotes pancreáticos.

No está claro que es lo que inicia la cascada que lleva a la autoinmunidad en la diabetes, pero se sabe que se conjuntan factores genéticos y ambientales que contribuyen a la enfermedad (Biros et al., 2005). Dicha enfermedad se caracteriza por: la insulinitis, en la cual, una mezcla de leucocitos invade los islotes de Langerhans, promoviendo la muerte de las células β ; y la diabetes, donde una gran cantidad de células β son destruidas, y el páncreas no puede producir suficiente insulina, para controlar los niveles de glucosa en sangre (Denis *et al.*, 2004).

2.5.2 Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2)

La DM2 es una enfermedad crónico-degenerativa que conlleva complicaciones tanto agudas como crónicas. Se estima que en el año 2010 la prevalencia mundial de la DM2, en el grupo de edad de 20 a 79 años, fue de 6.4% afectando a 285 millones de adultos. Se prevé un incremento del 7.7% en el año 2030, afectando 439 millones de adultos (Shaw *et al.*, 2010). Se presenta más frecuentemente en adultos, normalmente se vincula con aumento de la resistencia a los efectos de la insulina en sus sitios de acción, así como una disminución de la secreción de insulina por el páncreas, no se sabe con certeza si la lesión primaria es la liberación anormal de la insulina de la célula del islote o la resistencia a la insulina.

2.5.3 Modelos de diabetes experimental

Se ha demostrado que la administración de ciertas sustancias químicas en animales de experimentación provoca efectos tóxicos sobre las células β , lo que conlleva a síntomas similares a los de la diabetes. Entre ellos se encuentran el aloxan y la estreptozotocina. En nuestro estudio, la inducción experimental de diabetes a ratones machos de la cepa BALB/c, fue realizada con estreptozotocina.

2.5.4 Estreptozotocina

La estreptozotocina (STZ) es un medicamento comúnmente utilizado en la quimioterapia del cáncer capaz de inducir DM2 en roedores recién nacidos no predispuestos, mediante la destrucción de sus células β .

La STZ es un derivado de la nitrosourea aislado de *Streptomyces achromogenes* con actividad antibiótica y antineoplásica de amplio espectro (Bono, 1976). Se trata de un potente agente alquilante que interfiere con el transporte de glucosa (Wang y Gleichmann, 1998) y la función de

la glucocinasa (Zahner y Malaisse, 1990), e induce múltiples puntos de ruptura en doble hélice del DNA (Bolsan y Bianchi, 2002). La STZ actúa como un caballo de Troya, ya que su molécula consta esencialmente de glucosa ligada a un fragmento reactivo de nitrosourea (**Fig. 5**), y como tal es internalizada a través de los transportadores celulares de glucosa. Una vez dentro, el fragmento de nitrosourea es liberado y ejerce su actividad tóxica. Dado que las células β pancreáticas son más activas que las demás en la captación de glucosa, resultan más sensibles al efecto tóxico de la STZ.

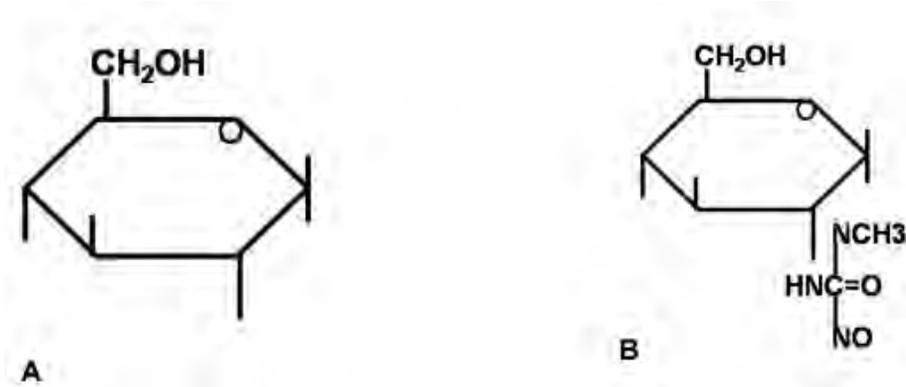


Figura 5. Estructura química de la glucosa (**A**) y la estreptozotocina (**B**). La cadena de nitrosourea le confiere una acción citotóxica que daña a las células β pancreáticas.

La acción de la STZ en las células β es acompañada por alteraciones características en concentraciones de la glucosa e insulina en sangre. Finalmente se desarrolla hiperglucemia permanente, y los niveles de insulina en sangre descienden hasta un 60% (Katsumata et al., 1992; Maisello et al., 1998).

La sensibilidad a la STZ varía según la especie animal, la cepa, el sexo, la edad y el estado nutricional. El modo y ruta de su administración resultan determinantes para su efecto. Una única dosis importante de STZ puede inducir diabetes en roedores, probablemente debido a efecto tóxico directo. De modo alternativo, se puede usar en forma de múltiples dosis pequeñas y en días consecutivos (Yang et al., 2003; Muller et al., 2002).

3. ANTECEDENTES

En 1959, Culbertson y cols., quienes trabajaban con cultivos celulares en pruebas de seguridad de la vacuna contra la poliomielitis, demostraron el potencial patógeno de amibas pertenecientes al género *Acanthamoeba* en animales. Tras observar zonas de lisis en los cultivos y atribuirlos al virus, como parte de la prueba, inocularon a monos y ratones que murieron inesperadamente por una encefalitis. Posteriormente se realizaron estudios histopatológicos, que revelaron que una amiba perteneciente al género *Acanthamoeba* era el agente causal de la muerte en los animales.

Los hallazgos fueron reportados, y posteriormente Culbertson implementó un modelo experimental de infección por amibas de vida libre, el cual se utiliza con la finalidad de evaluar la patogenicidad y virulencia de amibas aisladas de distintas fuentes (Culbertson *et al.*, 1959).

En 1983, Visvesvara y cols., describieron la infección provocada por amibas del género *Acanthamoeba* en ratones, en órganos como cerebro, pulmón e hígado. Aislaron dos cepas provenientes de tejidos humanos, y ambas se interaccionaron con cultivos celulares, a los cuales les provocaron un efecto citopático. Inocularon a 18 ratones de 2 semanas de edad con 1×10^4 amibas cada uno. Luego de 21 días fueron sacrificados y los tejidos (cerebro, pulmón e hígado) fueron fijados en paraformaldehído al 10% y embebidos en parafina. Posteriormente se realizó un examen microscópico que mostró meningoencefalitis en el lóbulo temporal y frontal, así como la pared de los hemisferios cerebrales. Dicho infiltrado meníngeo se caracterizó por la presencia de leucocitos polimorfonucleares y células mononucleares, linfocitos, células plasmáticas e histocitos. Describieron inflamación en el parénquima cerebral, con presencia de quistes y trofozoítos dispersos. Los bulbos olfatorios mostraron necrosis aguda y subaguda con un extenso infiltrado inflamatorio. Se encontraron amibas invadiendo los alveolos de las paredes de los bronquios, así como acumulaciones de células plasmáticas en la zona perivascular y perobronquial (Visvesvara *et al.*, 1983).

En 2004, Rojas-Hernández y cols., describieron mediante técnica inmunohistoquímica las etapas tempranas de la infección intranasal, provocada por *N. fowleri* en modelo murino, a distintos tiempos post-inoculación. Después de 8 h, se observaron trofozoítos en contacto con la capa mucosa del epitelio olfatorio, mientras que otros se situaron sobre el epitelio nasal. Pasadas 24 h, las amibas invadieron el epitelio, sin mostrar evidencia de ruptura de la mucosa nasal. También se encontraron algunos trofozoítos invadiendo el epitelio respiratorio, lo cual sugirió una ruta de invasión adicional. Hasta las 30 h post inoculación, se observó una

respuesta inflamatoria escasa. Mientras que, a las 96 h la respuesta inflamatoria fue severa, en cerebro y bulbo olfatorio (Rojas-Hernández *et al.*, 2004).

En 2005, Górnik y Kuźna-Grygiel trabajaron con 6 cepas patógenas de *Acanthamoeba*, y realizaron estudios histológicos de diferentes órganos de ratones de 2 semanas de edad, previamente infectados intranasalmente, los cuales sacrificados entre 3 y 14 días post-inoculación; los hallazgos histopatológicos, mostraron congestión meníngea en toda la superficie de los hemisferios cerebrales. Mientras que, en los ratones fueron sacrificados entre 7 y 14 días post-inoculación, se encontró un ligero edema y congestión de los lóbulos frontales y los bulbos olfatorios. Una cepa en particular, causó desprendimiento meníngeo en el área de los lóbulos frontales, observando numerosos trofozoítos, neutrófilos, macrófagos, células plasmáticas y células gigantes multinucleadas. Las capas superficiales de la corteza cerebral mostraron necrosis con atrofia del nervio y células de la glía. Finalmente, se asociaron algunas áreas necróticas con infiltrados inflamatorios (Górnik y Kuźna-Grygiel, 2005).

En 2016, Alves y cols., describieron y compararon los hallazgos histopatológicos entre dos distintas rutas de infección experimental, intracraneal (IC) e intraperitoneal (IP) en ratones sanos, con cepas de *Acanthamoeba* del grupo T4 de aislados clínicos y ambientales. En ambas rutas de infección se inocularon 1×10^4 trofozoítos. Los ratones fueron observados durante 21 días y se sacrificaron; se extrajo el cerebro de los ratones infectados vía IC; así como el cerebro, hígado, riñón y pulmón de los ratones inoculados vía IP; y mediante histopatología se evaluaron todos los órganos de interés., No se observaron diferencias significativas entre las dos rutas de infección experimental; sin embargo, la cepa se consideró invasiva ya que fue posible recuperar trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba* en ambas rutas de invasión (Alves *et al.*, 2016).

En 2017, Omaña-Molina y cols. trabajaron con dos cepas de *Acanthamoeba* pertenecientes al grupo T4: *A. castellanii* y *A. culbertsoni*, que fueron aisladas de casos clínicos, e inocularon vía intranasal a dos grupos de ratones de 3 semanas de edad, con 1×10^6 trofozoítos, los cuales fueron sacrificados mediante perfusión a las 24, 48, 72 y 96 h post-inoculación.

Se extrajo el cerebro y la región del meato nasofaríngeo, se realizaron cortes histológicos. Los hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos mostraron la presencia de los trofozoítos invadiendo y penetrando distintos epitelios: olfatorio, respiratorio, el espacio alveolar, así como

el túbulo renal; lo cual asemeja al proceso de invasión de las amibas descrito para el tejido corneal. Los datos sugieren que después de que los trofozoítos invadieron el epitelio nasal, continuaron su invasión levantando y separando la capa más superficial de células, posteriormente migraron y penetraron a través de las uniones celulares, causando un efecto citolítico a las células adyacentes. Confirmando así la idea de los mecanismos dependientes de contacto son de gran importancia en las amibas del género *Acanthamoeba*, sin importar el sitio de la invasión (Omaña-Molina *et al.*, 2017).

4. JUSTIFICACIÓN

El entendimiento de los mecanismos de patogenicidad de las amibas del género *Acanthamoeba* es necesario para conocer los procesos que se llevan a cabo durante la invasión en los diferentes tejidos blanco y en particular los que tienen lugar en el SNC de pacientes con enfermedades crónicas como la diabetes. Hasta el momento se han descrito de manera general los mecanismos de patogenicidad de *Acanthamoeba* spp. en la córnea humana (Omaña-Molina *et al.*, 2010) así como la invasión al SNC y algunos órganos en modelo murino en ratones sanos (Omaña-Molina *et al.*, 2017). Sin embargo, hasta ahora no se han descrito a detalle los eventos morfológicos tempranos de la infección por EAG causada por *Acanthamoeba* spp. en individuos inmunosuprimidos o con enfermedades crónicas como la diabetes.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Describir los eventos tempranos de la invasión de *Acanthamoeba culbertsoni* en el modelo murino de EAG en ratones diabéticos.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Descripción biológica de *A. culbertsoni* aislada de un caso de QA con invasión extracorneal.
- Determinación de la temperatura óptima de crecimiento de *A. culbertsoni*.
- Determinación del efecto citopático de *A. culbertsoni* en cultivo de células Madin-Darby Canine Kidney (MDCK).
- Inducción de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) en ratones BALB/c.
- Inducción de la EAG a ratones diabéticos.
- Obtención de cortes histológicos de cerebro y meato nasofaríngeo de ratones diabéticos.
- Obtención de suero hiperinmune anti *A. culbertsoni* en conejo.
- Descripción los eventos morfológicos tempranos de la invasión de *A. culbertsoni* a través de la técnica inmunohistoquímica.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con una cepa de *A. culbertsoni*, aislada de un caso de QA que involucró la invasión a humor acuoso (**Fig. 6**). La cepa se recibió en un medio monoxénico NNE y se axenizó en medio Bactocasitona (BD, Becton, Dickinson and Company Sparks, USA) al 2%, enriquecido con suero fetal bovino (SFB) al 10%, con antibiótico (200 µg de penicilina/estreptomicina) (**ANEXO 1**).

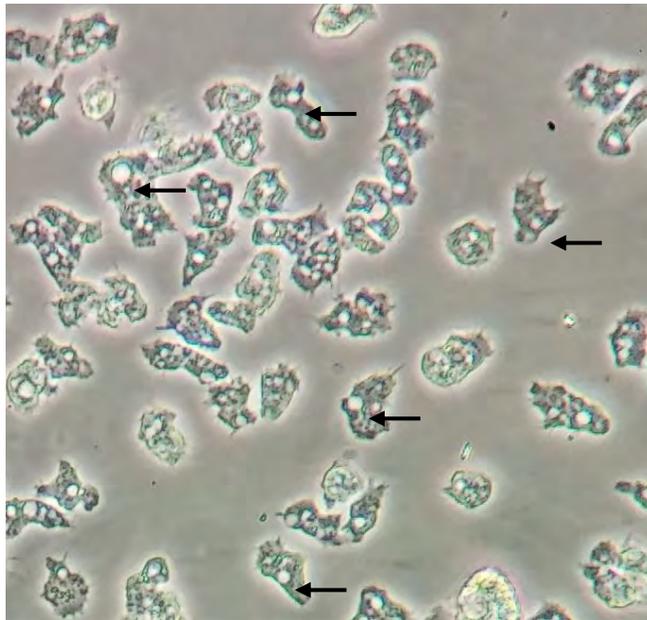


Figura 6. Microscopía de luz, contraste de fases (100x). Trofozoítos de *A. culbertsoni* en donde las vacuolas contráctiles son evidentes (flechas), aislados de un caso de QA, crecidos en medio axénico Bactocasitona al 2%.

6.1 Determinación de la temperatura óptima de crecimiento

Con la finalidad de determinar las condiciones ideales de desarrollo de la cepa en estudio, se evaluaron distintas temperaturas (25, 30, 37 y 42 °C), en ensayos por triplicado. En tubos de ensayo se colocaron 5×10^4 trofozoítos con 2.7 ml de medio Bactocasitona al 2%, enriquecido con (Suero Fetal Bovino) SFB al 10% y 200 µg de penicilina/estreptomicina, para dar un total de 3 ml por cada tubo.

Se llevó un registro del crecimiento diario (durante 4 días), para lo cual, los tubos se colocaron en hielo frappe durante 5 min, lo que permitió despegar la mayor cantidad de amibas adheridas

a las paredes de los tubos y se pusieron en el vórtex durante 10 segundos, evitando la formación de espuma. La viabilidad de los trofozoítos se determinó por medio de la técnica de exclusión con azul tripano (0.4%), de esta manera, los trofozoítos dañados o muertos se tiñeron con el colorante y no fueron tomados en cuenta. Después se realizaron conteos de las amibas en una cámara de Neubauer, para lo cual se tomaron 10 μ l del homogenizado de cada tubo y posteriormente se graficó el número de amibas en relación a las temperaturas y tiempos descritos.

Una vez que se conocieron las características biológicas de las amibas, la cosecha se realizó en la fase exponencial y a la temperatura óptima de crecimiento, lo que garantizó que la cepa se encontraba en condiciones adecuadas para poder utilizarlas en los ensayos posteriores.

6.2 Reactivación de la virulencia de *A. culbertsoni*

La cepa de *A. culbertsoni* utilizada en este trabajo es considerada como patógena, debido a que fue aislada de un caso severo de QA; sin embargo, esta amiba fue mantenida en cultivo axénico durante varios meses. Por lo que fue necesario inocular a ratones con el fin de reactivar su virulencia. Se realizaron tres pasajes seriados, en los que se inocularon intranasalmente grupos de 5 ratones machos BALB/c de 3 semanas de edad. Las amibas fueron cosechadas como se describió previamente. La pastilla se ajustó hasta obtener 1×10^6 trofozoítos en 20 μ l de medio de cultivo fresco (sin SFB ni antibiótico).

Los ratones fueron anestesiados ligeramente e inoculados vía intranasal, acorde a lo establecido por Culbertson et al., (1959). Los ratones fueron alimentados *ad libitum* y monitoreados diariamente, recibiendo cuidados convencionales. Si los ratones no morían después de 21 días, eran sacrificados. El cerebro, hígado, pulmón y riñones fueron colocados en placas de agar con medio no nutritivo NNE enriquecida con *E. aerogenes* inactivada por calor, con el fin de recuperar las amibas. Luego los trofozoítos fueron axenizados en medio Bactocasitona, con la finalidad de inducir EAG en los ensayos posteriores.

Todos los ensayos con animales de experimentación se llevaron a cabo acorde a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio; basada en la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, publicada en el Diario Oficial de la Federación (México) 2001. Los animales de experimentación se mantuvieron dentro del bioterio de la FES Iztacala en un ambiente con temperatura controlada, con ciclos de luz y oscuridad, comida adecuada y suficiente espacio para crecer en óptimas condiciones.

Un grupo de 5 ratones fue inoculado con medio de cultivo sin amibas, como grupo control. La viabilidad de los trofozoítos fue determinada utilizando azul tripano (0.4%).

6.3 Determinación del efecto citopático de *A. culbertsoni* en cultivo de células MDCK

Las células MDCK se hicieron crecer en botellas de cultivo de 75 cm² (Nunclon Denmark) en medio Dulbecco modificado (D-MEM), enriquecido con suero bovino al 10% (Boehringer, Germany) y una mezcla de kanamicina/penicilina (10,000 µg/ml). Se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ por 48 h. Después, las células se transfirieron en microplacas de cultivo de 96 pozos, en medio D-MEM, hasta alcanzar la confluencia (7.5x10⁴ células aproximadamente).

Las células MDCK se interaccionaron en diferentes tiempos: 1, 3, 6 y 8 h con 7.5x10⁴ trofozoítos en cultivos confluentes (relación 1:1).

Al finalizar cada tiempo, las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M y se observaron a través del microscopio invertido Zeiss Axiovert 25 CA, Alemania y microscopio electrónico de transmisión anexoZeiss Axiophot.

6.4 Inducción de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) a ratones BALB/c

Un lote de 17 ratones (machos) de la cepa BALB/c de 7 semanas de edad fue sometido a un ayuno de 6 h previo a la inducción de DM2, acorde a Sánchez-Zamora *et al.* (2010). Posteriormente a cada ratón se le inyectó una dosis única de 130 mg/kg de STZ (Sigma, St. Louis, MO, USA), diluida en 100 µl de buffer de citratos 0.05M (pH 4.5) vía intraperitoneal. La solución se preparó minutos previos a su utilización (Ito *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 2006).

Como grupo control, 13 ratones de la misma cepa y edad fueron inyectados intraperitonealmente con un volumen equivalente de buffer de citratos.

Considerando que en ratones sanos la concentración de glucosa en sangre es de 80-110 mg/dl (Ito *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 2006), aquellos que alcanzaron niveles >190 mg/dl se consideraron diabéticos.

6.5 Determinación de niveles de glucosa en sangre, peso corporal, volumen de orina y consumo de agua y alimento

Con el fin de corroborar la inducción a la diabetes en los grupos experimentales, se evaluó la presencia de los signos característicos de esta enfermedad, tales como niveles de glucosa en sangre, peso corporal, polifagia, polidipsia y poliuria.

Los niveles de glucosa en sangre, así como el peso corporal de todos los ratones fue determinado a las semanas 0, 1, 2, 4 y 6 post inducción con STZ, con un glucómetro Accu-Check Sensor Comfort, (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) a partir de una gota de sangre obtenida mediante un corte superficial en la cola de cada ratón. El peso corporal se determinó con una balanza electrónica (Ohaus, N.J. USA).

Seis semanas post-inducción a la diabetes, los animales fueron puestos en cajas metabólicas durante 24 h, en donde se les proporcionó agua (100 ml) y alimento (50 g), y posteriormente se cuantificó la ingesta de alimento y agua, así como la producción de orina en un lapso de 24 h (**Fig. 7**).



Figura 7. Caja metabólica en la que se determina ingesta de agua y alimento, así como volumen de orina producida por ratones sanos y diabéticos en un lapso de 24 h.

6.6 Inducción de la EAG a ratones diabéticos

Siete semanas posteriores a la inducción, los ratones que cumplieron con los criterios para considerarlos diabéticos (17) fueron inoculados vía intranasal con 1×10^6 trofozoítos/20 μ l de medio, con el propósito de inducir la infección por EAG (**Fig. 8**). Una vez infectados, se tomaron 5 al azar y se observaron diariamente en el tiempo preestablecido por Culbertson (21 días), registrando sobrevivencia, mortalidad y manifestaciones clínicas de la infección: movimientos, reflejos, respiración, sudoración e ingesta acuosa. Si la muerte de algún ratón ocurría antes del período establecido se extraían cerebro, hígado, pulmón, riñón y se colocaban en cajas con medio NNE y *E. aerogenes* inactivada por calor; y se incubaban a 30 °C, por un periodo de 2-4 días con el fin de recuperar las amibas. Los ratones que sobrevivieron al período establecido, se sacrificaron para extraer los órganos antes mencionados. Una vez recuperada la cepa se procedió nuevamente a la axenización, y se llevaron a cabo los ensayos posteriores. Los 12 ratones diabéticos restantes se dividieron en 4 lotes, fueron sacrificados a las 24, 48, 72 y 96 h post-inoculación y fijados mediante perfusión.

6.7 Grupo control

Se utilizó un lote de 13 ratones sanos de la misma cepa y edad (14 semanas) y se inocularon vía intranasal con 1×10^6 trofozoítos/20 μ l de medio; se tomaron 5 al azar y fueron observados durante 21 días acorde a la técnica descrita previamente. Los ratones restantes fueron sacrificados en los 4 tiempos post-inoculación (2 ratones por cada tiempo) y después fijados por perfusión para obtener los órganos de interés.



Figura 8. Inoculación intranasal a ratones BALB/c de 14 semanas con 1×10^6 trofozoitos de *A. culbertsoni*.

6.8 Obtención de cortes histológicos

Los ratones que fueron sacrificados en los 4 tiempos de interacción propuestos (24, 48, 72 y 96 h), se anestesiaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (200 mg/kg), se colocaron sobre una placa y se sujetaron las extremidades; se les realizó un corte en la piel y se cortaron las costillas en paralelo a los pulmones para exponer el corazón. Se insertó la aguja de la jeringuilla con la solución de lavado (solución salina al 0.9%), en el ventrículo izquierdo, se hizo una incisión en la aurícula derecha para permitir el escape de los líquidos de lavado; se procedió al lavado con solución salina 0.9% durante aproximadamente 5 minutos, y finalmente se perfundió la solución de fijación (paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.2). **(Fig. 9)**. A continuación, se extrajo el cerebro y la región del meato nasofaríngeo, este último fue descalcificado con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 7% durante 7 días, cambiando la solución diariamente y después cortado sagitalmente. Los órganos de interés fueron procesados; se lavaron, deshidrataron, aclararon, infiltraron, incluyeron en parafina y finalmente se realizaron los cortes de 4 μm de grosor en el microtomo, acorde a la técnica histológica convencional.



Figura 9. Perfusión de un ratón macho BALB/c, anestesiado con una dosis letal de pentobarbital sódico 200 mg/kg.

6.9 Obtención de sueros hiperinmunes anti *A. culbertsoni* en conejo

Se trabajó con cultivos amibianos masivos crecidos en botellas de cultivo de 75 cm² con 95% de trofozoítos y 5% de quistes maduros obtenidos en su fase exponencial, cada una con 10 ml de medio Bactocasitona al 2%, enriquecido con SFB al 10% y 200 µg de penicilina/estreptomicina, para dar un total de 11 ml. Las botellas fueron puestas en hielo frappe durante 7 minutos, después se agitaron en el vórtex durante 1 min evitando la formación de espuma; mediante centrifugación se obtuvo un concentrado, el cual fue lisado mediante choques térmicos (5 ciclos), después se hizo una dilución 1:5 del lisado amibiano en PBS, y posteriormente se realizó una cuantificación de proteínas por medio de la técnica de Bradford, obteniéndose 5 µg/ml de proteína. Una vez obtenido el concentrado, se procedió a inmunizar a un conejo New Zealand macho adulto (**Fig. 10**), siguiendo un esquema convencional de inmunización (**ANEXO 2**), al finalizar se realizó un sangrado, mediante un corte en la vena media de la oreja del conejo, con el fin de obtener aproximadamente 30 ml de sangre; se centrifugó a 2500 rpm 10 min, para separar el suero, que se mantuvo en congelación hasta su uso. Finalmente, para poder probar el reconocimiento de los anticuerpos presentes en el suero recién obtenido, se llevó a cabo un Western blot.



Figura 10. Inmunización convencional de conejo New Zealand macho adulto.

6.10 Western blot

Con el propósito de determinar si los anticuerpos presentes en el suero de conejo anti-*A. culbertsoni* mostraban reconocimiento con las proteínas presentes el lisado amibiano, se trabajó con un concentrado de trofozoítos (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína) previamente lisados, acorde a lo descrito en el apartado anterior.

Se prepararon los geles de poliacrilamida, los buffers y el TBS-T (**ANEXO 3**); posteriormente se llevó a ebullición el lisado amibiano durante 5 min. Se colocó en hielo por 3 min y se cargó cada pozo de la cámara por duplicado, en el carril 1 se agregó el marcador de peso molecular (MPM) y se colocaron las muestras en el carril 2, 6 μl del lisado de quistes, y en el carril 3, 6 μl del lisado de trofozoítos, y usando el buffer de corrida se llevó a cabo la electroforesis a 120 V durante 90 min, con el fin de separar las proteínas, de acuerdo a su movilidad electroforética (**Fig. 11**).



Figura 11. Electroforesis con geles de poliacrilamida, para separar las proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética.

Una vez concluida la electroforesis, se separaron los geles; uno de ellos fue puesto en solución desteñidora I durante 5 min, y azul de Coomassie en agitación durante 15 min; mientras que el segundo fue puesto en buffer de transferencia.

Con la finalidad de electrotransferir las proteínas de interés presentes en el gel a una membrana de nitrocelulosa, se colocó el segundo gel junto con la membrana a 120 V durante 60 min y una vez que se cumplió el tiempo el gel se colocó en colorante rojo de Ponceau en agitación durante 15 min; después se cortó la membrana en tiras y se enjuagaron con TBS-T. Para bloquear los sitios de unión inespecíficos remanentes en la membrana, las tiras fueron puestas en la solución bloqueadora 6% (leche descremada (Svelty en polvo), diluida en TBS-T) y se dejaron en agitación durante toda la noche. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario, (a una dilución 1:500 del suero de conejo previamente obtenido, con TBS-T), luego se agregó 1 ml a cada tira y se dejaron en agitación durante 2 h y fueron lavados 5 veces con TBS-T por 5 min. Para la detección del anticuerpo unido, se utilizó proteína A peroxidasa, (dilución 1: 10,000 en TBS-T) y se agregó 1 ml a cada tira, se dejó durante 1 h y nuevamente se hicieron 5 lavados con TBS-T por 5 min cada uno. Para el revelado, se preparó una mezcla de 4-cloro-naftol, metanol, PBS y H₂O₂. Se pasaron las tiras por la solución, después fueron

puestas en agua destilada para hacer más lenta la reacción y para detenerla se dejaron en PBS, hasta que las bandas comenzaron a ser evidentes, y se dejaron secar.

Por último, al segundo gel se le agregó colorante azul de Coomassie en agitación durante 15 min y solución desteñidora II. Y se mantuvo en refrigeración con buffer, para evitar que se seque.

6.11 Técnica inmunohistoquímica

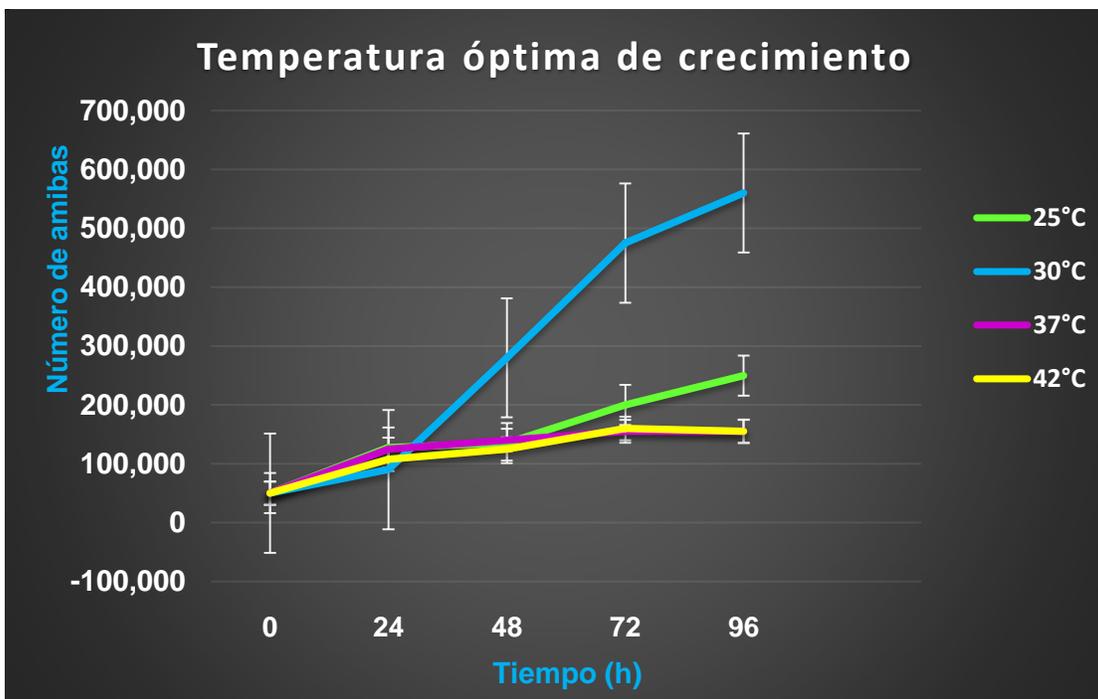
Los cortes histológicos previamente obtenidos fueron desparafinados en la incubadora a 70 °C durante 1 h, se rehidrataron con xilol y series graduales descendentes de etanol (100, 96 y 90%), se lavaron con agua destilada, y con TBS-Tween 20 (0.1%) (TBS-T). La recuperación antigénica se llevó a cabo por digestión enzimática con proteinasa K 0.1 mg/ml en buffer TBS-T con 1% de CaCl₂ durante 15 min. Se hicieron lavados con TBS-T y se bloqueó la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% en agua destilada, la unión inespecífica del anticuerpo fue bloqueada con SFB al 5% en TBS-T durante 2 h, nuevamente se hicieron lavados con TBS-T para después incubar con el suero policlonal de conejo anti- *A. culbertsoni* dilución 1:400 a temperatura ambiente toda la noche en cámara húmeda; se realizaron lavados con TBS-T y se incubó con el segundo anticuerpo, (HRP-Rabbit MACH 2 Polymer Biocare) acoplado a peroxidasa anti-IgG de conejo durante 30 min. Las laminillas se lavaron con TBS-T y se reveló la reacción enzimática con diaminobencidina-H₂O₂ (DAB), después fueron contrateñidas con hematoxilina, y rehidratadas con etanol en series graduales (90, 96 y 100%) y xilol; finalmente para poder preservar los tejidos, se montaron con resina.

7. RESULTADOS

6.1 Determinación de la temperatura óptima de crecimiento

La temperatura óptima de crecimiento de la cepa en estudio fue de 30 °C, como se observa en la **Gráfica 1**, alcanzando su fase exponencial a las 96 h.

En el resto de las temperaturas (25, 37 y 42 °C), las amibas no alcanzaron la fase exponencial de crecimiento, ya que se observaron redondeadas, lo cual indica que las condiciones no eran las adecuadas para su desarrollo.



Gráfica 1. Determinación de la temperatura óptima de crecimiento. Las amibas alcanzaron la fase exponencial a las 96 h, a 30 °C. En el resto de las temperaturas, las amibas se mantuvieron, pero no presentaron las condiciones adecuadas para su desarrollo.

6.1 Reactivación de la virulencia

La virulencia de la cepa en estudio se reactivó a través de tres pases sucesivos en ratones BALB/c. En donde el 60% de éstos fueron infectados con *A. culbertsoni* y murieron en un periodo de 9 días. En todos los ensayos los trofozoítos se recuperaron de cerebro y pulmón.

Los ratones que no murieron fueron sacrificados, y las amibas se recuperaron también de cerebro y pulmón.

6.1 Determinación del efecto citopático de *A. culbertsoni* en cultivo de células MDCK

A través de microscopía óptica pudimos observar que desde la primera hora de interacción los trofozoítos migraron hacia las uniones celulares. La monocapa de células MDCK aún se veía homogénea y confluyente (**Fig. 12**).

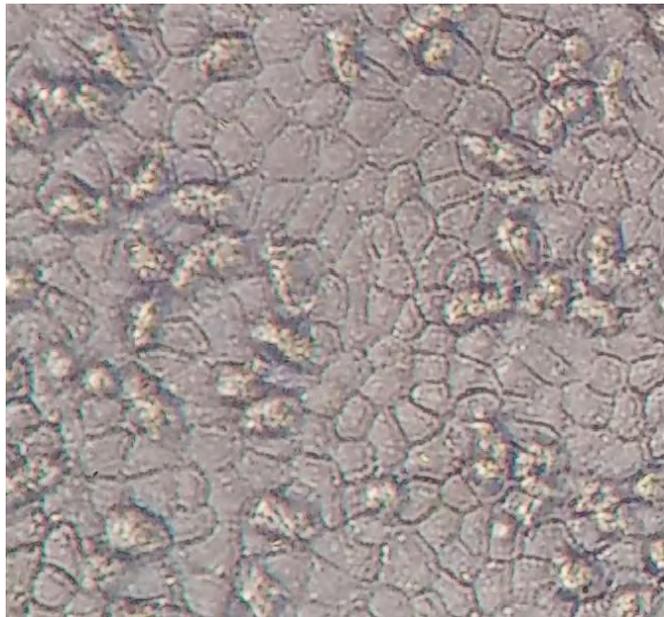


Figura 12. Microscopía de luz, contraste de fases (100x). Interacción de trofozoítos con células MDCK a 1 h. Se observa la migración de trofozoítos a uniones celulares de la monocapa.

Con el propósito de describir con mayor detalle los mecanismos de invasión de la cepa en estudio, las muestras obtenidas en los diferentes tiempos (3, 6 y 8 h) fueron procesadas en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, por el Dr. Arturo González Robles y la Biól. Lizbeth Salazar Villatoro para ser analizadas en el microscopio electrónico de transmisión (JEOL Japan).

Después de 3 h post interacción se observó a los trofozoítos adhiriéndose a la monocapa de células, que aún conservaba su confluencia (**Fig. 13 A**). A las 6 h post interacción la migración de los trofozoítos era clara, se observó el inicio de la penetración a través de las uniones celulares de la monocapa (**Fig. 13 B**). Después de 8 h las amibas fueron capaces de penetrar dentro de la monocapa de células MDCK (**Fig. 13 C, D**).

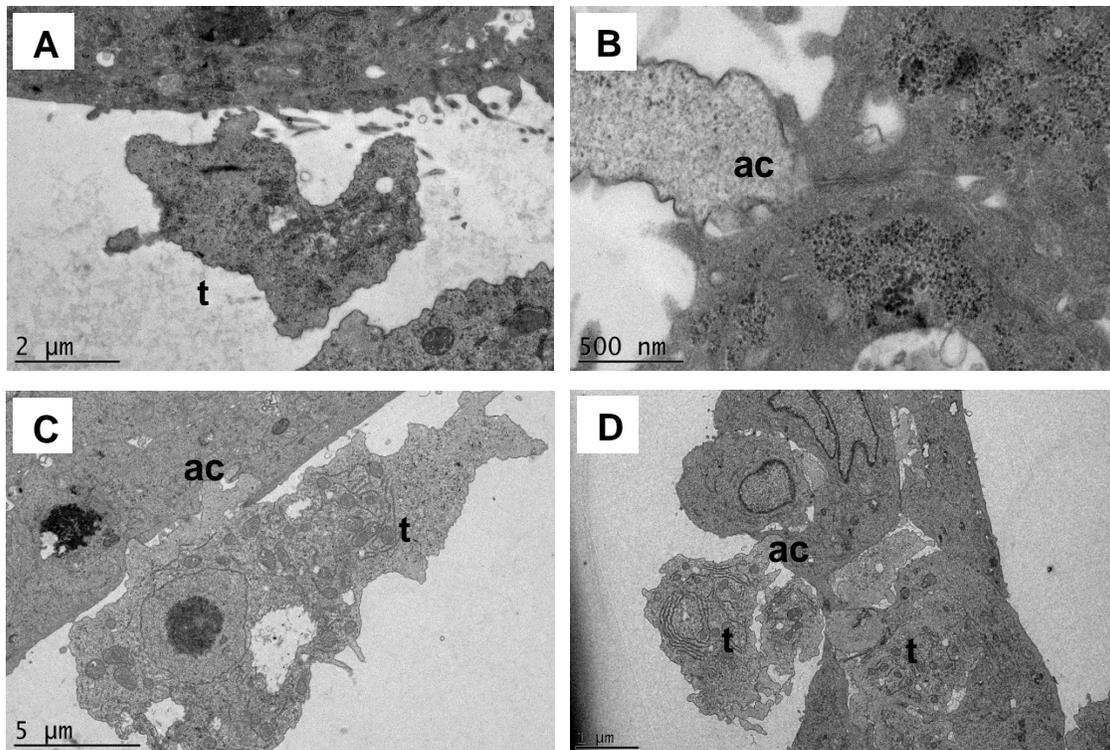
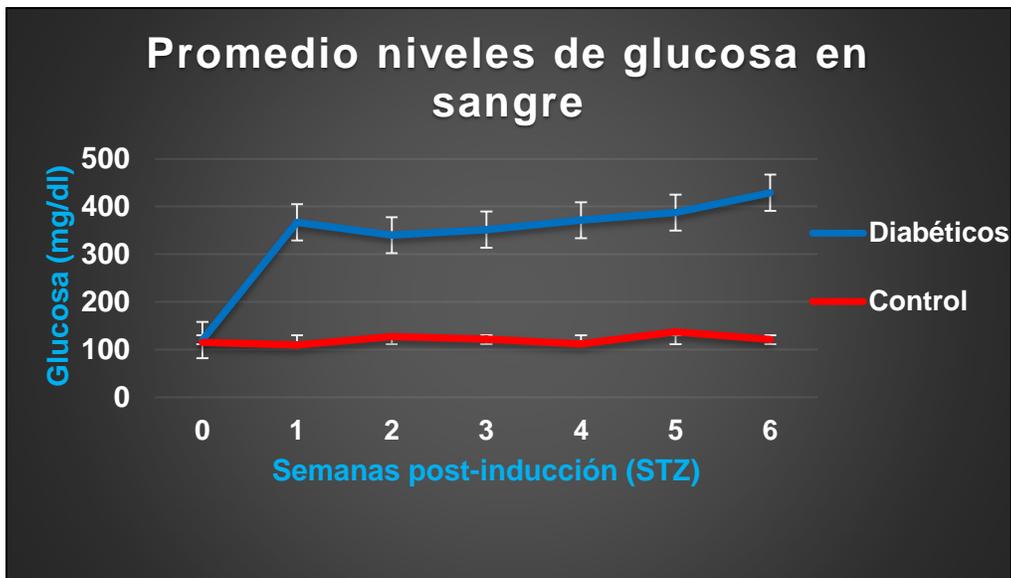


Figura 13 A, B, C y D). Interacción de trofozoítos de *A. culbertsoni* con monocapa de células MDCK (3, 6 y 8 h) con microscopía electrónica de transmisión. **A)** Después de 3 h post interacción se observaron trofozoítos (**t**) adhiriéndose a la monocapa de células. **B)** Después de 6 h la migración es clara, se observa el inicio de la penetración a través de las uniones celulares. **C)** A las 8 h las amibas continúan penetrando, y con ayuda de sus acantópodos (**ac**) irrumpen la monocapa celular. **D)** Se observa que numerosos trofozoítos han penetrado la monocapa.

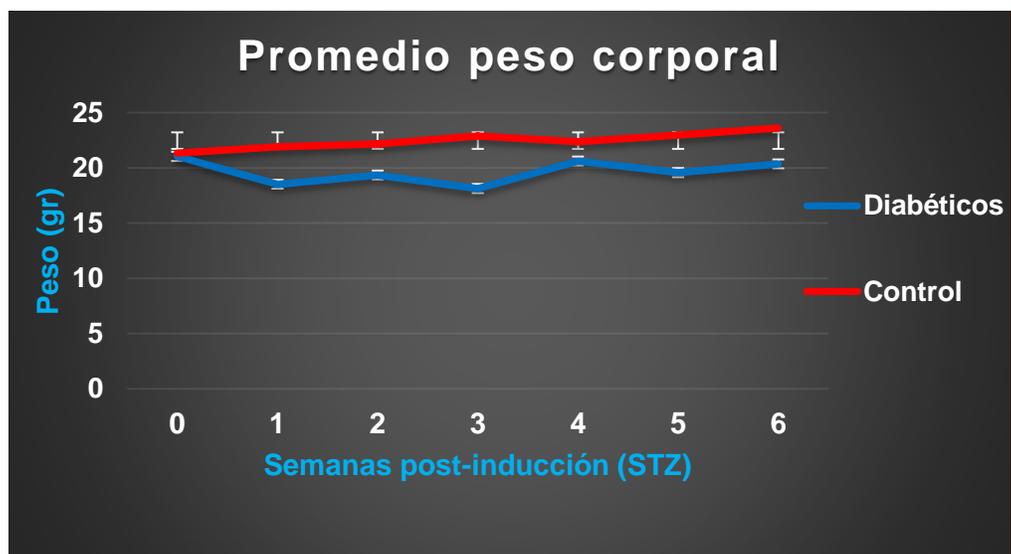
7.4 Inducción de DM2 a ratones BALB/c

Se indujo DM2 exitosamente. El desarrollo de la diabetes fue monitoreado y se compararon los niveles de glucosa en sangre, peso corporal, volumen de orina, e ingesta de alimento y agua, entre el grupo experimental, y el grupo control (**Tabla 1**). En los ratones experimentales, se registró un incremento significativo en los niveles de glucosa en sangre, una semana post-inducción con STZ, alcanzando en promedio los 350 mg/dl, los cuales continuaron aumentando durante las siguientes 6 semanas, alcanzando 429 mg/dl (**Gráfica 2**), la hiperglicemia fue acompañada por una pérdida de peso promedio de 2 g, lo cual corresponde aproximadamente al 11% del peso corporal inicial. Por el contrario, el grupo control no excedió los niveles normales de glucosa en sangre; además se registró una ganancia de peso corporal

promedio de 1 g (aproximadamente 3% del peso corporal inicial) durante el período de tiempo evaluado (**Gráfica 3**).



Gráfica 2. Promedio semanal de niveles de glucosa en sangre (mg/dl) de ratones BALB/c control y diabéticos.



Gráfica 3. Promedio semanal de peso corporal (gr) de ratones BALB/c sanos y diabéticos.

Se evidenciaron las diferencias físicas de peso y talla entre los ratones control y diabéticos (**Fig. 14**). Ambos ratones eran machos pertenecientes a la cepa BALB/c y de 14 semanas de edad

aproximadamente; sin embargo, el ratón diabético (izquierda) presentó una talla y peso menor en comparación con el ratón control (derecha).



Figura 14. Comparación en talla de ratones de 14 semanas de edad, a la 6° semana post inducción con STZ. Diabético (izquierda), Control (derecha).

Seis semanas post-inducción, se determinó la presencia de poliuria, polifagia y polidipsia en el grupo de ratones experimentales, los cuales presentaron un incremento del volumen urinario, así como la ingesta de alimento y agua, en relación con el grupo control (**Tabla 1**).

Ratones machos BALB/c de 14 semanas	Volumen de orina (ml/24 h)	Consumo de alimento (g/24 h)	Consumo de agua (ml/24 h)
DM2	1.13	7.64	9
Control	0.4	5.3	5.5

Tabla 1. Promedio volumen de orina, consumo de alimento y agua en un lapso de 24 h de ratones sanos y diabéticos de 14 semanas de edad, 5 semanas post inducción con STZ.

7.5 Inducción de la EAG a ratones diabéticos

En la **Tabla 2** se detallan las observaciones diarias (durante 21 días) del comportamiento, signos de infección y mortalidad de los grupos de ratones diabéticos y control de 14 semanas, previamente inoculados vía intranasal para inducir la EAG:

Semanas post-inoculación	Ratones diabéticos (5)	Ratones control (5)
1	Muerte de un ratón al día 7 post-inoculación. El resto no presenta signos de infección, ni cambios en el comportamiento.	Sin presencia de signos de infección, ni cambios en el comportamiento.
2	Pelo erizado en todos los ratones y respiración más rápida de lo normal en dos de ellos.	Pelo ligeramente erizado, pero sin cambios en el comportamiento.
3 (Sacrificio al día 21)	Pelo erizado en los cuatro ratones restantes, pero sin cambios en comportamiento.	Pelo erizado, y más activos en comparación con el grupo diabético.

Tabla 2. Seguimiento semanal de ratones diabéticos y control, después de la inducción de EAG a través de inoculación intranasal con 1×10^6 trofozoítos de *A. culbertsoni*.

Sólo un ratón diabético murió a los 7 días post-inoculación, se continuó con la observación de los ratones restantes de ambos grupos, pero no hubo evidencia de infección en el SNC, así que fueron sacrificados a los 21 días recuperándose la amiba de cerebro y pulmón en todos los ratones diabéticos evaluados, mientras que, en los ratones sanos, no hubo recuperación de amibas.

7.6 Western blot

Las proteínas presentes en el lisado amibiano, se separaron por peso molecular por medio de electroforesis en un gel de poliacrilamida, las cuales, posteriormente se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Y finalmente estas fueron inmunodetectadas por los anticuerpos presentes en el suero de conejo anti-*A. culbertsoni*. Es posible apreciar la inmunodetección en las bandas de marcaje (**Fig. 15**). Lo que nos aseguraba que hubo un reconocimiento de los anticuerpos en el suero de conejo.

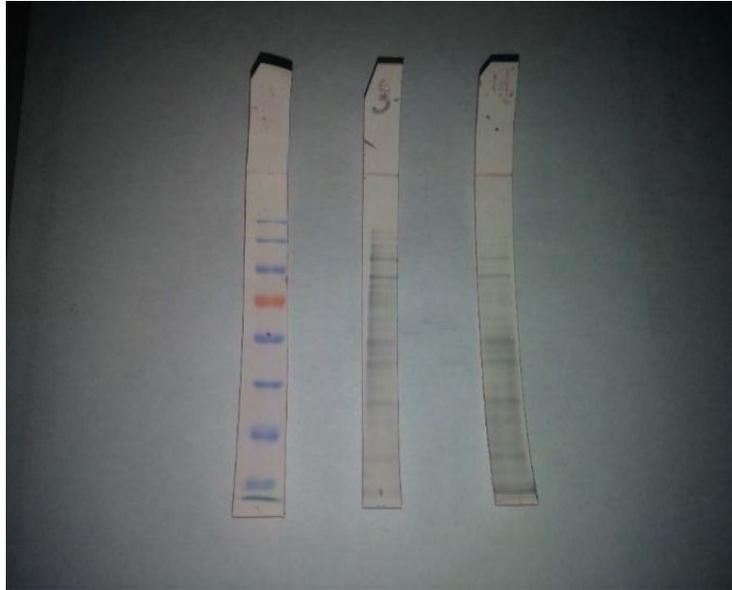


Figura 15. Tiras de nitrocelulosa sometidas a la técnica de Western blot, que muestran inmunodetección de las proteínas presentes en el lisado amibiano (Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 lisado de quistes y carril 3 lisado de trofozoítos). Proteínas amibianas reconocidas por los anticuerpos policlonales.

7.7 Hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos de la interacción de *A. culbertsoni* en el meato nasofaríngeo y tejido cerebral de ratones diabéticos

Los resultados del análisis histopatológico e inmunohistoquímico de la infección por EAG causada por *A. culbertsoni* en ratones diabéticos, fue consistente en todas las muestras evaluadas. Durante el análisis macroscópico de los órganos en estudio, no se observaron cambios patológicos evidentes, tales como edema, necrosis o zonas hemorrágicas. La secuencia de los eventos inmunohistoquímicos observados durante la invasión de las amibas, se describe a continuación:

24 h

Desde las 24 h post-inoculación, se inmunolocalizaron trofozoítos y escasos quistes en el epitelio respiratorio, adyacente al hueso (**Fig. 16 A, B**), paquetes del nervio olfatorio y células de Schwann, en el bulbo olfatorio, y la base del epineuro, sin causar daño en el tejido (**Fig. 16 C, D**). Es importante enfatizar la ausencia de infiltrado inflamatorio en todas las muestras.

48 h

48 h post-inoculación se observaron numerosos trofozoítos en el epitelio respiratorio y el tejido linfóide asociado a nasofaringe (NALT) sin daño en el tejido, infiltrado inflamatorio o presencia de folículos linfoides (**Fig. 17 A, B**). Al mismo tiempo, se observó un quiste en la sustancia blanca del cerebro en la región central subcortical (**Fig. 17 C, D**), lo cual sugiere la dispersión vía hematogena de la amiba en estudio hacia el SNC.

72 h

Luego de 72 h post-inoculación, se inmunolocalizaron trofozoítos en el bulbo olfatorio (**Fig. 18 A**) con la presencia de un ligero infiltrado inflamatorio, caracterizado por la presencia de células polimorfonucleares (**Fig. 18 B**). Es importante enfatizar que, a este tiempo de interacción, los trofozoítos invadieron la base del encéfalo sin evidencias de inflamación o daño en el tejido (**Fig. 18 C, D**), y algunos trofozoítos alcanzaron la capa granular del cerebelo (**Fig. 18 E**).

No se encontraron trofozoítos de *A. culbertsoni*, ni daño aparente en las muestras de meato nasofaríngeo y tejido cerebral de los ratones diabéticos que interacturaron con los trofozoítos durante 96 h post-inoculación; ya sea por medio de la técnica inmunohistoquímica o en las muestras teñidas con H&E.

Es muy importante mencionar que todas las muestras evaluadas de cerebro y meato nasofaríngeo de los ratones sanos BALB/c (grupo control), inoculados con *A. culbertsoni* resultaron negativas a la presencia de trofozoítos o quistes (**Figs. 16 F, 17 F y 18 F**). Además, las muestras teñidas con H&E no mostraron ningún daño o alteración en su histología (**Figs. 16 E, 17 E**).

24 h

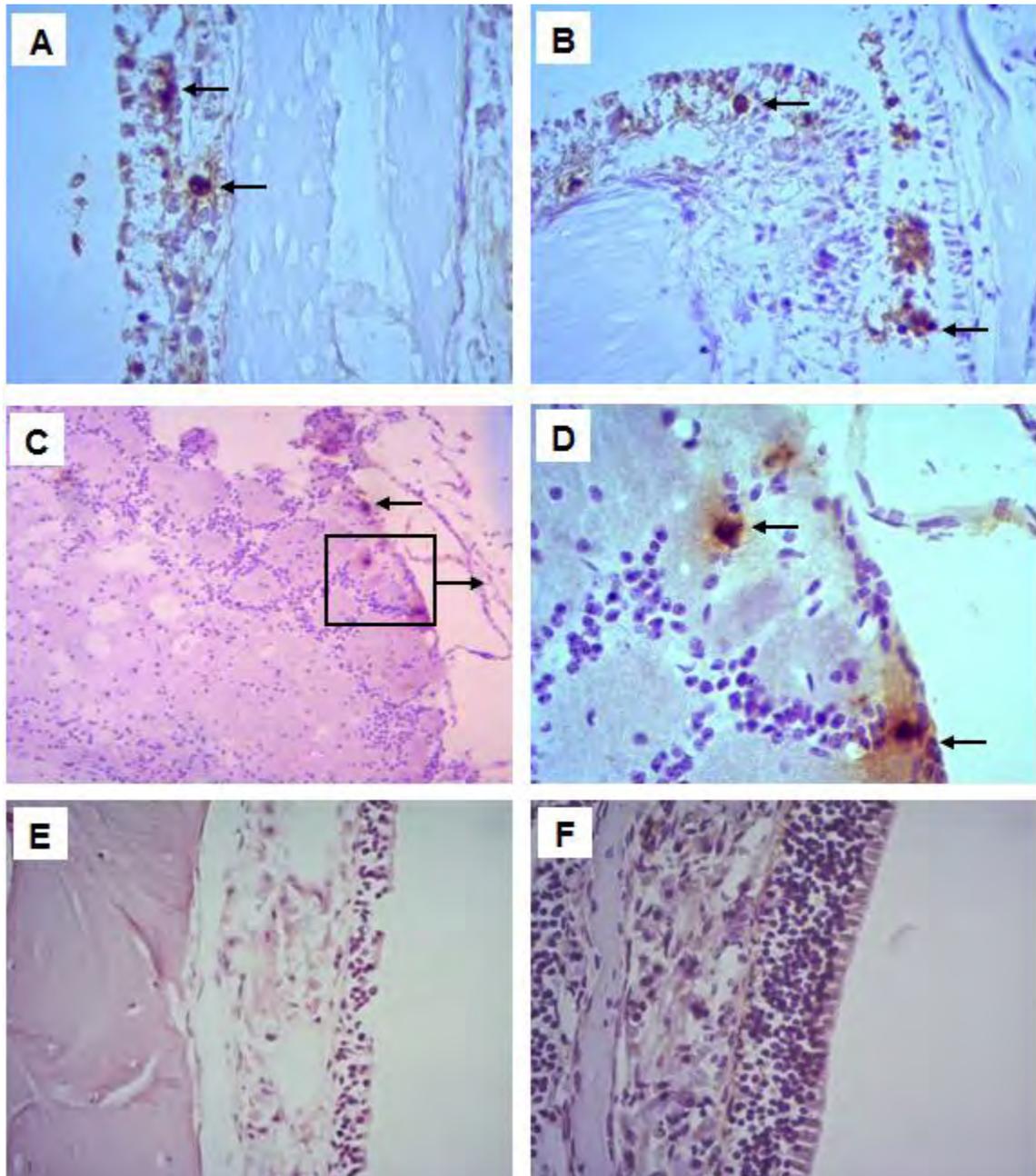


Figura 16. A-D). Microfotografía que muestra por inmunolocalización trofozoítos de *Acanthamoeba culbertsoni* en ratones diabéticos 24 h post-inoculación. **A, B)** Trofozoíto (flechas) y escasos quistes en el hueso del epitelio respiratorio (x100). **C, D)** Trofozoíto en paquetes del nervio olfatorio y células de Schwann (x400), en la región del nervio olfatorio y la base del epineuro (x100 y x400 respectivamente). Nótese la ausencia de reacción inflamatoria periférica. **(A, B, C, D)** IHQ DAB. **E, F)** Mucosa nasofaríngea

con epitelio respiratorio, estroma y hueso de ratones control 24 h post-inoculación sin daño en el tejido (x400 Tinción H&E e IHQ DAB respectivamente).

48 h

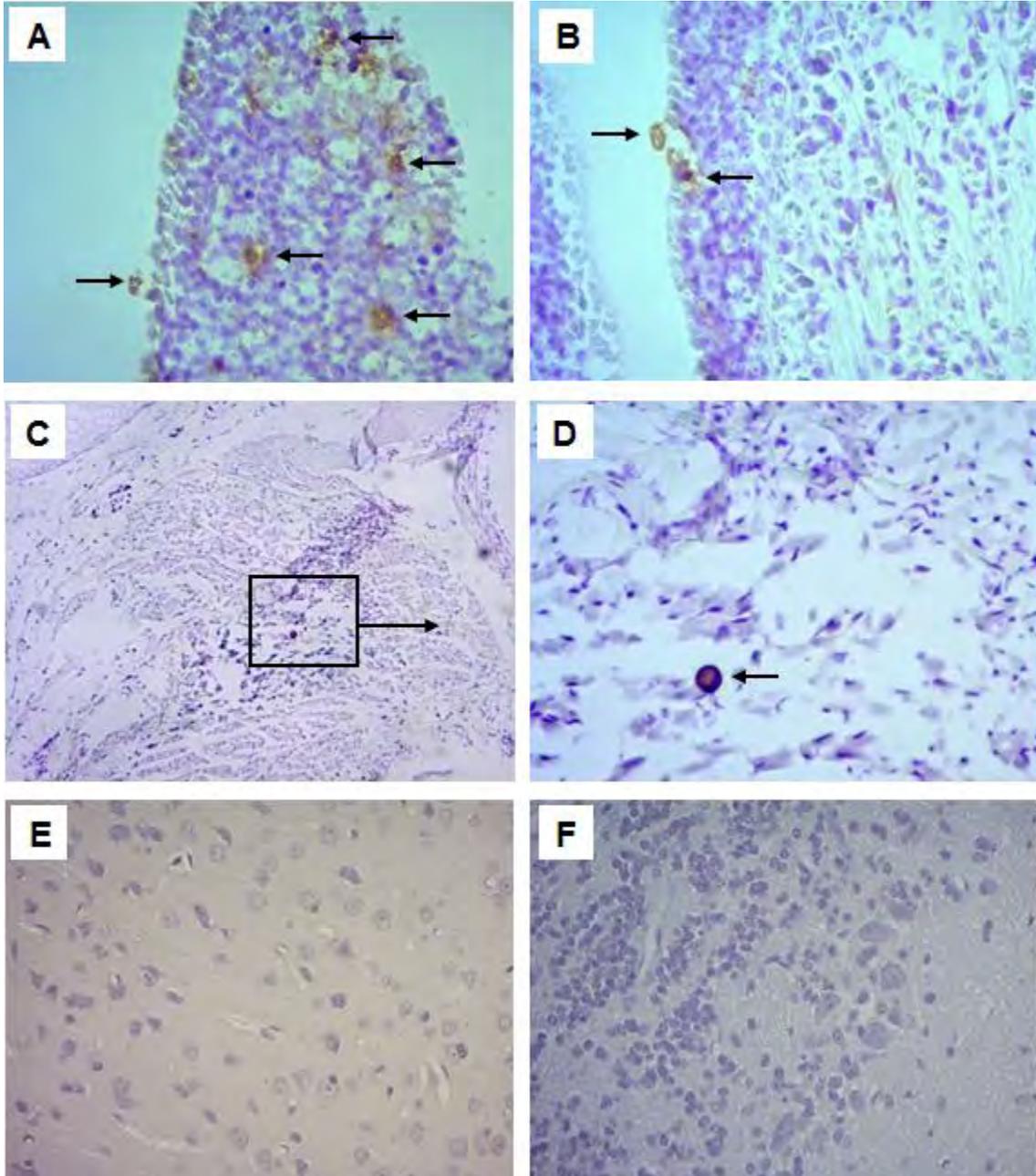


Figura 17. A-D) Microfotografía que muestra inmunolocalización de trofozoítos de *Acanthamoeba culbertsoni* (flechas) en el epitelio respiratorio de ratones diabéticos, 48 h post-inoculación. **A, B)** Numerosos trofozoítos (flechas) se observaron en el epitelio respiratorio y tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT) sin presencia de folículos linfoides, hiperplasia linfoide, inflamación, ni destrucción en el tejido (x100 IHQ DAB). **C, D)** Un quiste (flecha) inmunolocalizado en la sustancia blanca del cerebro,

corteza central subcortical (x100 y x400 respectivamente IHQ DAB). **E, F**) Microfotografía de corteza cerebral de ratones control 48 h post-inoculación (x400 Tinción H&E e IHQ DAB respectivamente).

72 h

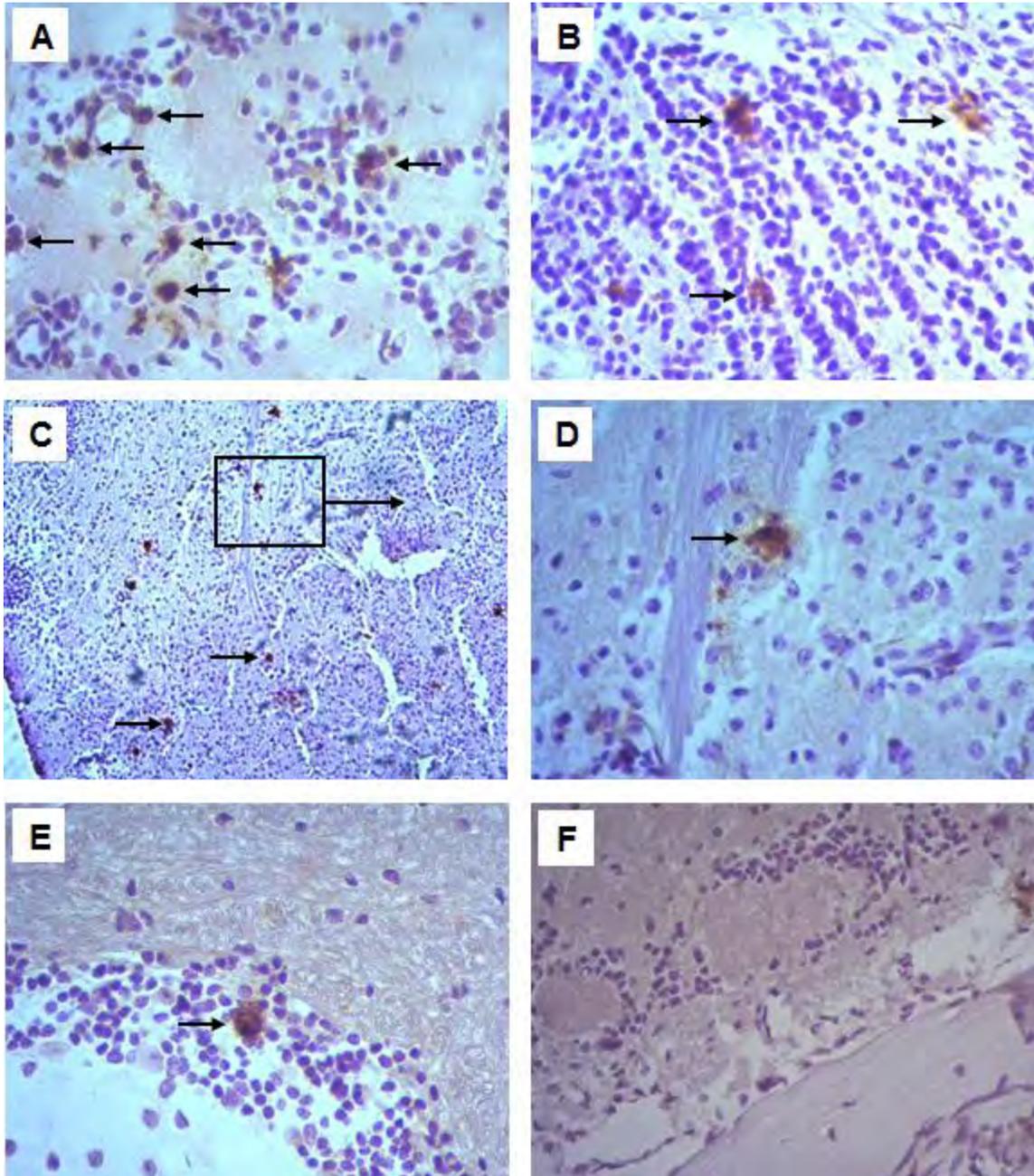


Figura 18. Microfotografía que muestra la presencia de trofozoítos de *A. culbertsoni* en tejido nervioso de ratones diabéticos 72 h post-inoculación. **A, B**) Trofozoítos (flechas) y quistes en bulbo olfatorio con presencia de un ligero infiltrado inflamatorio, caracterizado por células polimorfonucleares (x400 IHQ DAB). **C, D**) Escasas amibas en la base del encéfalo, sin evidencia de inflamación o daño en el tejido

(x100 y x400 respectivamente IHQ DAB). **E**) Trofozoíto (flecha) en la capa granular del cerebelo. **F**) Bulbo olfatorio de ratones control 72 h post-inoculación sin mostrar daño en su histología (x400) IHQ DAB.

8. DISCUSIÓN

Es ampliamente aceptado que la EAG causada por amibas del género *Acanthamoeba*, ocurre principalmente en personas con un sistema inmune debilitado, inmunosuprimido (Martínez y Visvesvara et al., 1997) con enfermedades crónicas, tales como lupus eritematoso (Koide et al., 1998; Thamtam et al., 2016), VIH/SIDA (Martínez y Visvesvara, 1997), cáncer (Memari et al., 2015), falla renal (Martínez y Visvesvara, 1997), pacientes con terapia inmunosupresora, cirrosis, tuberculosis (Martínez 1991; Martínez y Janitschke, 1985; Martínez y Visvesvara, 1997), diabetes mellitus (Harwood et al., 1988; Bloch and Schuster, 2005; McKellar et al., 2006; Petry et al., 2006; Fung et al., 2008; Mayer et al., 2011; Blanco-Vidal et al., 2013; Satlin et al., 2013; Salameh et al., 2015).

Desde que se demostró el potencial patógeno de las amibas del género *Acanthamoeba*, se han realizado trabajos en modelos animales, con la intención de describir los hallazgos histopatológicos de infecciones experimentales causadas por estas amibas. (Culbertson et al., 1966; Martínez, 1991; Górnik y Kuźna-Grygiel, 2005); sin embargo, estos hallazgos se han reportado en organismos sanos, y en periodos de tiempo que van de 3 a 14 días, e incluso hasta 7 meses post-inoculación. Hasta el momento, se ha aceptado que la vía de entrada de estas amibas hacia el cerebro puede ocurrir por vía hematológica, o a través del neuroepitelio olfatorio (Martínez et al., 1975); sin embargo, no se han realizado estudios experimentales que ayuden a determinar si el establecimiento de DM en un individuo es un factor de riesgo para la invasión de estas amibas a nivel del SNC.

En el presente trabajo se describen y comparan los hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos de la invasión temprana de trofozoítos de *Acanthamoeba culbertsoni* en ratones diabéticos y sanos de la cepa BALB/c inoculados intranasalmente.

Para la realización de este trabajo fue necesario conocer biológicamente a la amiba en estudio, para que, de esta manera, todos los ensayos fueran llevados a cabo en las condiciones que permitieran el desarrollo óptimo de las amibas, que fueron cosechadas en su fase exponencial durante la realización de todos los ensayos.

Se trabajó con una cepa virulenta de *A. culbertsoni*, aislada de un caso clínico de QA, que involucró invasión a humor acuoso (Arnalich-Montiel *et al.*, 2012); que además, es la especie más frecuentemente reportada en casos de infección al SNC, y que mostró tener neurotropismo e invasividad hacia el meato nasofaríngeo y el tejido cerebral (Omaña-Molina *et al.*, 2017).

La temperatura óptima de crecimiento para los cultivos de *A. culbertsoni* fue 30 °C, alcanzando su fase exponencial a las 72 h, sin embargo, las amibas mostraron un pobre crecimiento a los 25, 37 y 42 °C, coincidiendo con el trabajo de Qvarnstrom *et al.*, (2013) quienes evaluaron la temperatura de crecimiento (30, 37 y 42°C) de una cepa de *Acanthamoeba* aislada de un caso de EAG, y observaron patrones de crecimiento óptimo (30°C) similares al de nuestra cepa en estudio; así mismo a los 37 y 42°C hubo un crecimiento limitado.

La amiba de este trabajo demostró ser termotolerante, lo que le confirió la capacidad de desarrollarse y crecer a diferentes temperaturas; por ejemplo, en la córnea humana (de donde originalmente fue aislada) y en donde estuvo en contacto con la película lagrimal, y se expuso a una alta osmolaridad, alteraciones en el pH y distintas temperaturas (la temperatura aproximada del ojo es de 34°C), así como en el SNC de los animales de experimentación (36.5°C aproximadamente), e incluso podría sobrevivir ante condiciones de fiebre alta (42°C), que pudieran ocurrir en pacientes con EAG. Lorenzo-Morales *et al.*, 2013, enfatiza que altas temperaturas, así como la alta osmolaridad están relacionados con la patogenicidad, lo que podría considerarse como un buen indicador del potencial patógeno de nuestra cepa.

Después de los ensayos de temperatura, las amibas se mantuvieron en cultivo axénico durante varios meses, por lo que, fue necesario reactivar la virulencia de la cepa por medio de 3 inoculaciones seriadas en ratones machos BALB/c sanos de 3 semanas de edad; una vez recuperadas, se continuó con los ensayos posteriores.

A pesar de que la amiba en estudio tenía potencial patógeno, dado que fue aislada de un caso clínico de QA, era necesario demostrar el efecto citopático, así como los mecanismos de invasión dependientes de contacto que presentan al invadir, ya que fue lo observado tanto en el modelo de córnea (Omaña-Molina *et al.*, 2013), así como el modelo de ratones sanos (Omaña-Molina *et al.*, 2017).

La interacción con células MDCK, nos permitió corroborar los mecanismos dependientes de contacto, tales como la adherencia, migración hacia las uniones celulares y penetración de las

amibas desde la primera hora de interacción; transcurridas las 8 h se observó la pérdida de la confluencia de la monocapa celular, mediante la emisión de acantópodos de los trofozoítos y la formación de amebostoma para fagocitar las células, sugiriendo que la acción de las proteasas promueven la separación celular, sin causar destrucción; esto concuerda con ensayos previos realizados por Omaña-Molina *et al.*, (2013), quienes realizaron pruebas en cultivos celulares MDCK con trofozoítos de *A. castellanii* y *A. polyphaga*, y mediante microscopía de luz pudieron observar el efecto citopático de estas amibas en la monocapa de células.

Por otro lado, la invasión de las amibas hacia los órganos evaluados fue consistente con los ensayos para la reactivación de la virulencia en las pruebas de patogenicidad. *A. culbertsoni* causó la muerte en el 60% de los ratones, recuperándose únicamente de cerebro y pulmón. Los que concuerda con estudios previos realizados por Kasprzak *et al.*, (1974), quienes reportaron que, a pesar de varios pases en ratones, los trofozoítos de *Acanthamoeba* mantienen su tropismo hacia los mismos órganos (cerebro y pulmón). Hay que enfatizar que no todos los ratones murieron. Sin embargo, a los 9 días post-inoculación, se registraron las muertes, similar al tiempo en que *Naegleria fowleri*, considerada como una especie virulenta, provoca la muerte en animales experimentales (Marciano-Cabral y Cabral, 2007).

Se indujo DM2 en el 100% de los ratones machos BALB/c, acorde a Sánchez-Zamora *et al.* (2010). Confirmando la presencia de hiperglicemia, pérdida de peso, poliuria, polidipsia y polifagia. Asegurando así tener ratones diabéticos, previo a la inoculación con las amibas en estudio. Es muy importante señalar que, en ese momento, los ratones diabéticos y sanos tenían 14 semanas de edad, y los ratones sanos fueron resistentes ante la infección por EAG.

Los hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos del presente trabajo confirmaron que *A. culbertsoni* es capaz de invadir el SNC después de haber sido inoculada intranasalmente; 24 h post-inoculación, las amibas se adhirieron al epitelio respiratorio y olfatorio, cerca de los cornetes nasales, penetrando el tejido entre las uniones celulares, hasta invadir los paquetes del nervio olfatorio, las células de Schwann y la base del epineuro, con ausencia de infiltrado inflamatorio y sin causar daño en los tejidos. A las 48 h post-inoculación, los trofozoítos invadieron (probablemente por vía hematogena), la sustancia blanca del cerebro de la región central subcortical. Las amibas continuaron su invasión hacia el bulbo olfatorio 72 h post-inoculación, en donde sólo se observó un ligero infiltrado inflamatorio. Algunos trofozoítos

migraron a través de la base del cerebro, invadiendo la capa granular del cerebelo, sin mostrar inflamación, ni daño en el tejido.

La ruta de invasión de la amiba en estudio es similar a lo descrito previamente para esta misma cepa, inoculada en ratones machos BALB/c sanos de 3 semanas de edad (Omaña-Molina *et al.*, 2017), así como para otras amibas anfitriónicas de especies como *N. fowleri* (Rojas-Hernández *et al.*, 2004) y *B. mandrillaris* (Kiderlen y Laube, 2004).

Aunque el curso de invasión es análogo, *N. fowleri* es capaz de causar una inflamación severa, en contraste con *A. culbertsoni*, ya que, durante el análisis histopatológico no hubo evidencia de necrosis, hemorragia o inflamación, a excepción del bulbo olfatorio, en donde a las 72 h post-inoculación se observó un ligero infiltrado inflamatorio. Górnik y Kuźna-Grygiel (2005) sugirieron que la ausencia de una reacción inflamatoria en áreas adyacentes a un solo trofozoíto o quiste, probablemente se deba a la ausencia de una alta concentración de antígeno, necesario para activar el sistema inmune. En este estudio, a pesar de que la ruta de invasión de estas especies anfitriónicas es similar, el proceso llevado a cabo por *A. culbertsoni* es más lento y se lleva a cabo principalmente a través de mecanismos dependientes de contacto, lo cual podría explicar el curso crónico de la infección por EAG tanto en humanos, como en animales de experimentación.

Aunque la ruta de invasión de los trofozoítos de *A. culbertsoni* en ratones diabéticos adultos (14 semanas de edad) y ratones sanos (3 semanas de edad), referido por Omaña-Molina *et al.*, (2017), es similar; *A. culbertsoni* penetró áreas más profundas de tejido en los ratones diabéticos, en un periodo de tiempo menor (**Fig. 19**); desde las 24 h post-inoculación, los trofozoítos migraron al hueso del epitelio respiratorio, los paquetes del nervio olfatorio, células de Schwann y la base del epineuro, a las 48 h, migraron a la materia blanca del cerebro, así como la región central subcortical, y después de 72 h, las amibas invadieron la base del cerebro y la capa granular del cerebelo (**Fig. 19 A**). Mientras que, en los ratones no diabéticos de 3 semanas, entre las 24 -72 h post-inoculación, las amibas se adhirieron y penetraron a través del epitelio olfatorio y respiratorio en la cavidad nasal; llegando al bulbo olfatorio, la corteza cerebral y la capa granular del giro dentado del hipocampo, hasta las 96 h (**Fig. 19 B**).

Cabe destacar que los ratones adultos BALB/c de 14 semanas (grupo control) fueron considerados resistentes a la invasión por estas amibas, debido a que no se inmunolocalizaron

trofozoítos o quistes, ni tampoco se observó daño en ninguno de los tejidos evaluados (cerebro y meato nasofaríngeo).

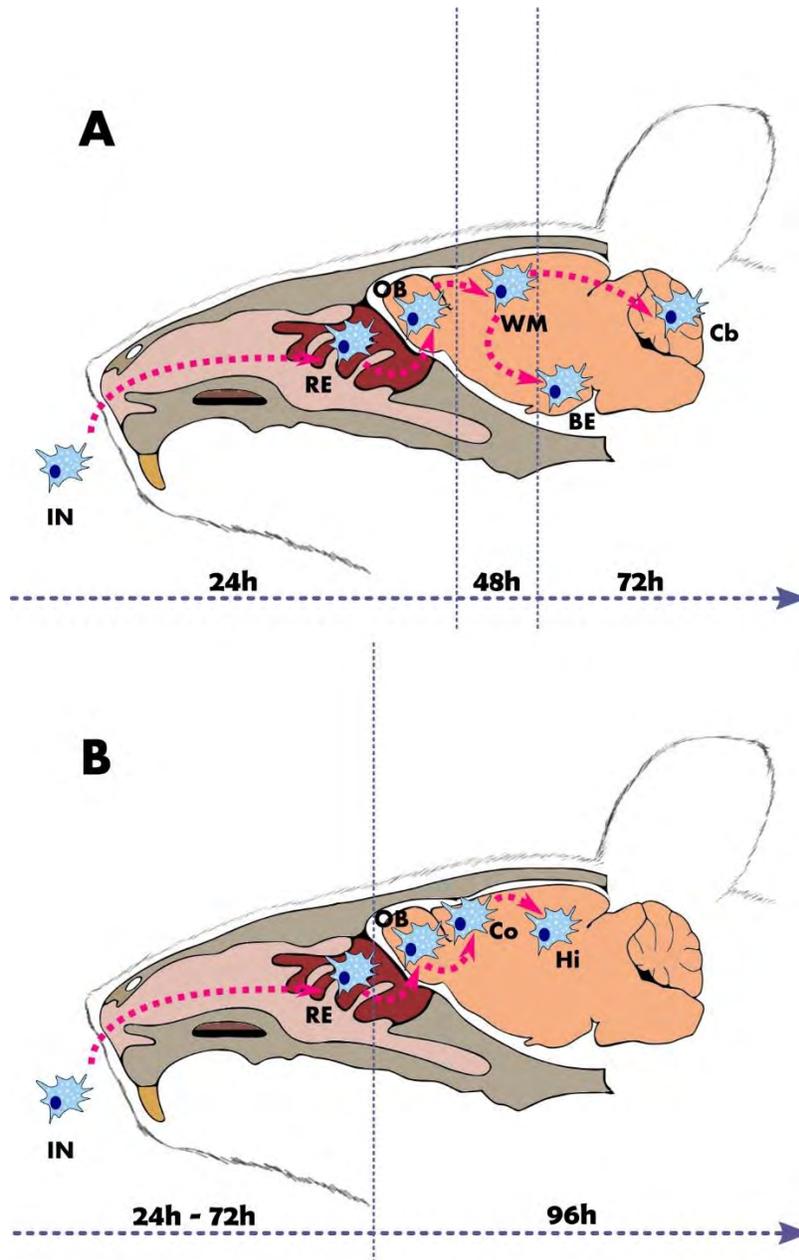


Figura 19 A, B). Ruta de invasión de trofozoítos de *A. culbertsoni* en ratones diabéticos machos BALB/c de 14 semanas de edad (**A**), y ratones sanos machos BALB/c de 3 semanas de edad (**B**). **A**) 24 h post-inoculación (**IN**), los trofozoítos llegaron al hueso del epitelio respiratorio (**RE**), paquetes del nervio olfatorio, células de Schwann y la base del epineuro en el bulbo olfatorio (**OB**). Después de 48 h post-inoculación, las amibas invadieron la sustancia blanca del cerebro, en la región central subcortical (**WM**). 72 h post inoculación, las amibas invadieron la base del encéfalo (**BE**), y la capa granular del cerebelo (**Cb**). **B**) Desde las 24 y hasta las 72 h post-inoculación, las amibas se observaron adhiriéndose y

penetrando a través del epitelio respiratorio y olfatorio. 96 h post-inoculación, los trofozoítos llegaron al bulbo olfatorio **(OB)**, la corteza cerebral **(Co)** y la capa granular del giro dentado del hipocampo **(H)**. El análisis de resultados sugiere que los ratones diabéticos son más susceptibles a la EAG que los ratones sanos de la misma cepa y edad inoculados intranasalmente bajo las mismas condiciones. Así mismo, concuerdan con reportes clínicos que aseguran que pacientes con DM son más susceptibles a enfermedades infecciosas y sus complicaciones, comparados con individuos no diabéticos (Baiju *et al.*, 2003; Shah y Hux, 2003) ya que, esta enfermedad predispone a los pacientes a comorbilidades y afecta el pronóstico de infecciones como la bacteriemia y la neumonía neumocócica (Joshi *et al.*, 1999).

Es probable que el modelo DM2 (enfermedad crónica) utilizado en este trabajo, afectara la inmunidad de los ratones inducidos, debido a que no se observó infiltrado inflamatorio ni granulomas. Marciano-Cabral *et al.*, (2000) argumentan que, en individuos inmunocomprometidos, puede estar ausente la formación de granulomas rodeando las amibas, lo cual podría contribuir a la diseminación de los trofozoítos en el organismo.

Es bien sabido que la diabetes tiene un importante componente inflamatorio, además, se ha encontrado que existe una correlación entre un pobre control glicémico y los niveles de citocinas inflamatorias tales como proteína C reactiva, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), Interleucina-6 (IL-6) y 1β (IL- 1β) en el torrente sanguíneo circulante (Calle y Fernández, 2012). La hiperglucemia aumenta la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, en consecuencia, la diabetes es responsable de la respuesta inflamatoria sistémica, pero también incrementa la susceptibilidad de que las citocinas inflamatorias entren al SNC (Starr *et al.*, 2003; Hawkins *et al.*, 2007), lo cual, podría facilitar que las amibas atravesaran la barrera hematoencefálica.

9. CONCLUSIONES

La invasión de trofozoítos de *A. culbertsoni* en ratones diabéticos es significativamente mayor con respecto a los ratones sanos de la misma cepa y edad inoculados bajo las mismas condiciones; lo cual sugiere que los ratones diabéticos son más susceptibles ante la infección por EAG.

Los resultados obtenidos sugieren que los trofozoítos invadieron los tejidos separando las células superficiales, penetrando a través de las uniones celulares sin causar efecto citolítico en las células adyacentes hasta alcanzar el SNC.

La presencia de un mayor número de trofozoítos en comparación con los quistes, en los tejidos evaluados, sugiere que las amibas encontraron las condiciones óptimas de desarrollo dentro del organismo de los ratones diabéticos infectados.

La DM incrementa la susceptibilidad a la infección por amibas, lo que podría favorecer al desarrollo de la EAG.

10. PERSPECTIVAS

Se sugiere la realización de más estudios que permitan describir la invasión de estas amibas en tiempos más largos, con el fin de determinar las moléculas involucradas durante la invasión o la resistencia de estos protozoos, para poder tener un mejor entendimiento de los mecanismos de defensa, así como los mecanismos de patogenicidad de estas amibas anfitriónicas.

11. REFERENCIAS

- Abd H, Saeed A, Jalal S, Bekassy AN, Sandström G, (2009). Ante mortem diagnosis of amoebic encephalitis in a haematopoietic stem cell transplanted patient. *Scand J Infect Dis.* 41(8): 619-622.
- Alpizar M, (2001). Guía para el manejo integral del paciente diabético., México DF., Manual Moderno. Pp 1-165.
- Alves DS, Moraes AS, Alves LM, Gurgel-Gonçalves R, Lino Junior RS, Cuba-Cuba CA, Vinaud MC (2016) Experimental infection of T4 *Acanthamoeba* genotype determines the pathogenic potential. *Parasitol Res* 115(9):3435-3440.
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care.* (2015). 30(27): 42-47.
- Anzil AP, Rao C, Wrzolek MA, Visvesvara GS, Sher JH, Kozlowski PB, (1991). Amebic meningoencephalitis in a patient with AIDS caused by a newly recognized opportunistic pathogen. Leptomyxid Ameba. *Arch Pathol Lab Med.* 115: 21-25.
- Armstrong M, (2000). The pathogenesis of human *Acanthamoeba* infection. *Infect. Dis. Rev.* 2: 65-73.
- Arnalich-Montiel F, Martín-Navarro CM, Alió JL, López-Vélez R, Martínez-Carretero E, Valladares B, Piñero JE, Lorenzo-Morales J, (2012). Successful monitoring and treatment of intraocular dissemination of *Acanthamoeba*. *Arch.Ophthalmol.* 130, 1474-1475.
- Baiju R, Shah MD, Janet E, Hux MD, (2003). Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. *Diab. Care.* 26(2): 510-513.
- Barbeau J, Buhler T, (2001). Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Res Microbiol.*152(8):753-760.
- Bensellam M, Laybutt DR, Jonas JC, (2012). The molecular mechanisms of pancreatic β -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol. Cell. Endocrinol.* 364, 1-27.
- Blanco-Vidal MJ, Catalán-Uribarrena G, López JI, Del Águila C, Magnet A, Pomposo-Gaztelu I, Montejo M, (2013). Hemiparesia izquierda en un paciente diabético: encefalitis granulomatosa crónica por *Acanthamoeba*. *Rev Neurol.* 56:187-188.
- Blake OA, Bennink MR, Jackson JC, (2006). Ackee (*Blighia sapida*) hypoglycin A toxicity: dose response assessment in laboratory rats. *Food Chem Toxicol.*, 44(2):207-213.

- Bloch K, Schuster F, (2005). Inability to make a premortem diagnosis of *Acanthamoeba* species infection in a patient with fatal granulomatous amebic encephalitis. *J Clin Microbiol.* 43(6): 3003-3006.
- Bonilla P, Esparza A, Hernández D, Rojas S, Rodríguez M, Ramírez E, Campos R, Jarillo A, Alvarez L, García P, González F, Felix S, García Y, (2001). Mixed brain infection by *Acanthamoeba* and *Aspergillus* sp. case report. En: Xth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae. John Libbey Eurotext, París, Francia. Pp. 19-25.
- Bono VH, Jr (1976). Review of mechanism of action studies of the nitrosoureas. *Cancer Treat Rep.* 60 (6): 699-702.
- Bolzan AD, Bianchi MS, (2002). Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res.* 512 (2-3): 121-34.
- Bottone EJ, (1993). Free-living amebas of the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria*: an overview and basic microbiologic correlates. *Mt. Sinai. J. Med.* 60: 260-270. Review.
- Bowers B, Korn E, (1968). The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. I. The trophozoite. *J Cell Biol* 39:95-111.
- Bowers B, Korn E, (1969). The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. *J Cell Biol* 41:786-805.
- Butt L, (1966). Primary amoebic meningoencephalitis. *New Eng. J. Med.* 274: 1473-1476.
- Byers TJ, (1979). Growth, reproduction, and differentiation in *Acanthamoeba*. *Int Rev Cytol* 61:283-338.
- Byers TJ, Akins RA, Maynard BJ, Lefken RA, Martin SM, (1980). Rapid growth of *Acanthamoeba* in defined media; induction of encystment by glucose-acetate starvation. *J Protozool.* 27(2):216-219.
- Cabello-Vílchez AM, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Reyes-Batlle M, Sifaoui I, Valladares B, Piñero JE, Lorenzo-Morales J (2014) Voriconazole as a first line treatment against potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains from Peru. *Parasitol Res.* 113(2): 755-759.
- Casemore DP, (1977). Free-living amoebae in home dialysis unit. *Lancet.* 2(8047):1078.
- Castellani A, (1930). An amoeba found in cultures of a yeast: Preliminary note. *J Trop Med Hyg.* 33: 160.

- Castrillón J, Orozco L, (2013). *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- Cerva L, (1989). *Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri*. Occurrence of antibodies in man. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol Immunol.* 33: 99-103.
- Chagla AH, Griffiths AJ. (1974). Growth and encystation of *Acanthamoeba castellanii*. *J Gen Microbiol.* 85(1):139-45.
- Chamorro L, Madrigal Sesma MJ, Zapatero Ramos LM, (1989). The pathogenicity of free-living amoebae isolated from the intestinal tract of reptiles. *Exp Parasitol.* 65(1):154-155.
- Corsaro D, Walochnik J, Köhler M, Rott MB, (2015). *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitol Res.*114(7): 2481-90.
- Culbertson CG, Smith JW, Minner JR, (1958). *Acanthamoeba*: observations on animal pathogenicity. *Science.* 27;127(3313): 1506.
- Culbertson CG, Smith JW, Cohen HK, Minner JR, (1959). Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am J Pathol.* 35(1):185-97.
- Culbertson CG, Ensminger PW, Overton WM, (1966). *Hartmannella (Acanthamoeba)*. Experimental chronic, granulomatous brain infections produced by new isolates of low virulence. *Am J Clin Pathol.* 46(3):305-14.
- Curson R, Brown T, Keys E, Moriarty K, Till D, (1980). Immunity to pathogenic free-living amoeba: role of humoral antibody. *Infect. Immun.* 29: 401-407.
- De Jonckheere J, (1991). Ecology of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis;* 13 (5): 385-387.
- Denis MC, Mahmood U, Benoist C, Mathis D, Weissleder R, (2004). Imaging inflammation of the pancreatic islets in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101 (34): 12634-12639.
- Doan N, Rozansky G, Nguyen HS, Gelsomino M, Shabani S, Mueller W, Johnson V, (2015). Granulomatous amebic encephalitis following hematopoietic stem cell transplantation. *Surg Neurol Int.* 6: S459-462.
- Douglas M, (1930). Notes on the classification of the amoeba found by Castellani on culture of yeast-like fungus. *J Trop Med Hyg.* 33: 258-259.
- Dyková I, Lom J, Schroeder-Diedrich JM, Booton GC, Byers TJ, (1999). *Acanthamoeba* strains isolated from organs of freshwater fishes. *J Parasitol.* 85(6):1106-1013.

- Fung KT, Dhillon AP, McLaughlin JE, Lucas SB, Davidson B, Rolles K, Patch D, Burroughs AK (2008) Cure of *Acanthamoeba* cerebral abscess in a liver transplant patient. *Liver Transpl.* 14(3): 308-312.
- Gast RJ, Ledee DR, Fuerst PA, Byers TJ, (1996). Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *J Eukaryot Microbiol.* 43: 498-504.
- Gelman BB, Rauf SJ, Nader R, Popov V, Borkowski J, Chaljub G, Nauta HW, Visvesvara GS, (2001). Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *J Am Med Assoc.* 16; 285:2450-2451.
- Górnik K y Kuźna-Grygiel W, (2005). Histological studies of selected organs of mice experimentally infected with *Acanthamoeba* spp. *Folia Morphol (Warsz).* 64(3):161-167.
- Gutiérrez Y, (2000). Free-Living Amebae. En: Y. Gutiérrez (Ed). Diagnostic Pathology of Parasitic Infections with Clinical Correlations. Ed. Oxford University Press. New York. p 114-42.
- Harwood CR, Rich GE, McAleer R, Cherian G, (1988). Isolation of *Acanthamoeba* from a cerebral abscess. *Med. J. Aust.* 148, 47-49.
- Hawkins BT, Lundeen TF, Norwood KM, Brooks HL, Egleton RD, (2007). Increased blood-brain barrier permeability and altered tight junctions in experimental diabetes in the rat: contribution of hyperglycaemia and matrix metalloproteinases. *Diabetologia.* 50, 202–211.
- Hayashi K, Kojima R, Ito M, (2006). Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 29(6): 1110-1119.
- Hodgson K, Morris J, Bridson T, Govan B, Rush C, Ketheesan N, (2015). Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections. *Immunology.* 44, 171-185
- Ito M, Kondo Y, Nakatani A, Naruse A, (1999). New model of progressive non-insulin-dependent diabetes mellitus in mice induced by streptozotocin. *Biol. Pharm. Bull.* 22(9): 988-989.
- Jahnes WG, Fullmer HM, (1957). Free living amoebae as contaminants in monkey kidney tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med.* 96(2): 484-488.
- John D, (1982). Primary Amebic Meningoencephalitis and the Biology of *Naegleria Fowleri*. *Ann Rev Microbiol.* 36:101-23.

- Johnson AM, Fielke R, Christy P E, Robinson B, Baverstock PR, (1990). Small subunit ribosomal RNA evolution in the genus *Acanthamoeba*. *J Gen Microbiol*. 136:1689-1698.
- Joshi N, Caputo GM, Weitekamp MR, Karchmer AW, (1999). Infections in patients with diabetes mellitus. *N.Engl. J. Med*. 341, 1906–1912.
- Kasprzak W, Mazur T, Rucka A, (1974). Studies on some pathogenic strains of free-living amoebae isolated from lakes in Poland. *Ann Soc Belg Med Trop* 54(4–5):351–357.
- Katsumata K, Katsumata K Jr, Katsumata Y, (1992) Protective effect of diltiazem hydrochloride on the occurrence of alloxan- or streptozotocin-induced diabetes in rats. *Horm Metab Res*. 24(11):508-10.
- Kaushal V, Chhina DK, Kumar R, Pannu HS, Dhooria HP, Chhina RS (2008) *Acanthamoeba* encephalitis. *J Med Microbiol*. 26:182-184.
- Khan NA, (2001). Pathogenicity, morphology and differentiation of *Acanthamoeba*. *Current Microbiology*. 43:391-395.
- Khan NA, (2006). *Acanthamoeba*: Biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev*. 30:564-595.
- Khan NA, Greenman J, Topping KP, Hough VC, Temple GS, Paget TA, (2000) Isolation of *Acanthamoeba*-specific antibodies from a bacteriophage display library. *J Clin Microbiol* 38(6):2374-2377.
- Khunkitti W, Lloyd D, Furr JR, Russell AD, (1998). *Acanthamoeba castellanii*: growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. *J Infect*. 36(1):43-48.
- Kiderlen AF, Laube U, (2004). *Balamuthia mandrillaris*, an opportunistic agent of granulomatous amebic encephalitis, infects the brain via the olfactory nerve pathway. *Parasitol Res*. 94(1):49-52.
- Kingston D, Warhurst DC, (1969). Isolation of amoebae from the air. *J Med Microbiol*. 2(1):27-36.
- Koide J, Okusawa E, Ito T, Mori S, Takeuchi T, Itoyama S, Abe T, (1998). Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a patient with systemic lupus erythematosus. *Clin. Rheumatol*. 17, 329-332.
- Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, Piñero JE, Valladares B, (2013). *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? *Trends Parasitol*. 29(4):181-7. doi: 10.1016/j.pt.2013.01.006.
- Ma P, Visvesvara GS, Martínez AJ, Theodore FH, Daggett PM, Sawyer TK, (1990). *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections. *Rev Infect Dis*. 12(3):490-513.

- Madrigal Sesma MJ, (1988). Isolation of free-living amoebae, potentially pathogenic for humans, from 3 species of saurians from the western Canary Islands. *Rev Sanid Hig Publica*. 62(1-4):1405-1409.
- Mandell L, (1990). Infections in the compromised host. *J Int Med Res*. 18(3):177-190.
- Marciano-Cabral F, Petri Jr WA. Free-living amoebae. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (1995). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th Edition, New York: Churchill Livingstone, 2122 p.
- Marciano-Cabral F, Puffenbarger R, Cabral GA, (2000). The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. *J Eukaryot Microbiol*. 47(1):29-36.
- Marciano-Cabral F, Cabral GA, (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev*. 16(2):273-307.
- Martínez AJ, (1991). Infection of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis*. 13 (Suppl 5): S399-S402.
- Martínez AJ, Markowitz SM, Duma JR, (1975). Experimental pneumonitis and encephalitis caused by *Acanthamoeba* in mice: pathogenesis and ultrastructural features. *J Infect Dis*. 131:692-699.
- Martínez AJ, Janitschke K (1985) *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism: a review. *Infection*. 13(6):251-256.
- Martínez AJ, Visvesvara GS, (1997). Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol*. 7(1):583-598.
- Martínez JM, Visvesvara GS, Chandler FW, (1997). Free-Living Amebic Infections. En DH Connors, FW Chandler, DA Schwartz, HJ Manz, EE Lack (Eds). *Pathology of infectious Diseases*, Vol II. Ed. Appleton & Lange. Stamford, Connecticut. p 1163-76.
- Masiello P, Broca C, Gross R, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, Novelli M, Ribes G, (1998). Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*. 47(2):224-9.
- Mazur T, Hadas E, Iwanicka I, (1995). The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop Med Parasitol* 46:106-108.
- McKellar MS, Mehta LR, Greenlee JE, Hale DC, Booton GC, Kelly DJ, Fuerst PA, Sriram R, Visvesvara GS, (2006). Fatal granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis mimicking a stroke, diagnosed by correlation of results of sequential magnetic resonance imaging, biopsy, in vitro culture, immunofluorescence analysis, and molecular analysis. *J. Clin. Microbiol*. 44, 4265-4269.

- Memari F, Niyati M, Haghghi A, Seyyed Tabaei SJ, Lasjerdi Z (2015). Occurrence of pathogenic *Acanthamoeba* genotypes in nasal swabs of cancer patients in Iran. *Parasitol Res.* 114(5):197-212.
- Mergeryan H, (1991). The prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment. *Rev Infect Dis. Suppl 5*: S390-391.
- Mierowitz RL, (1982). Granulomatous Amebic Encephalitis and Disseminated Acanthamebiasis. En Mierowitz RL. (Ed). *The Pathology of Opportunistic Infections*. New York. Raven Press. pp 235-42.
- Michel R, Müller KD, Hoffmann R, (2001). Enlarged Chlamydia-like organisms as spontaneous infection of *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitol Res.* 87(3): 248-251. Muller A, Schott-Ohly P, Dohle C, Gleichmann H, (2002). Differential regulation of Th1-type and Th2-type cytokine profiles in pancreatic islets of C57BL/6 and BALB/c mice by multiple low doses of streptozotocin. *Immunobiology.* 205(1): 35-50.
- Murakawa GJ, McCalmont T, Altman J, Telang GH, Hoffman MD, Kantor GR, Berger TG, (1995). Disseminate acanthamebiasis in patients with AIDS. A report of five cases and a review of the literature. *Arch-Dermatol.* 131(11):1291-1296.
- Omaña-Molina 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-Molina M, González-Robles A, Salazar-Villatoro LI, Cristóbal-Ramos AR, González-Lázaro M, Salinas-Moreno E, Méndez-Cruz R, Sánchez-Cornejo M, De la Torre-González E, Martínez-Palomo A, (2010). *Acanthamoeba castellanii*: Morphological analysis of the interaction with human cornea. *Exp Parasitol.* 126:73-78.
- Omaña-Molina M, González-Robles A, Salazar-Villatoro LI, Lorenzo-Morales J, Cristóbal-Ramos AR, Hernández-Ramírez VI, Talamás-Rohana P, Méndez Cruz AR, Martínez-Palomo A. (2013). Reevaluating the role of *Acanthamoeba* proteases in tissue invasion: Observation of cytopathogenic mechanisms on MDCK cell monolayers and hamster corneal cells. *Biomed Res Int.* DOI: 10.1155/2013/461329
- Omaña-Molina M, Vanzzini-Zago V, Hernández-Martínez D, González-Robles A, Salazar-Villatoro LI, Ramírez-Flores E, Oregon-Miranda E, Lorenzo-Morales J, Martínez-Palomo A, (2015). *Acanthamoeba* genotypes T3 and T4 as causative agents of amoebic keratitis in Mexico. *Parasitol Res.* 115(2):873-878.
- Omaña-Molina M, Hernández-Martínez D, **Sánchez-Rocha R**, Cárdenas-Lemus U, Salinas-Lara C, Méndez-Cruz AR, Colín-Barenque L, Aley-Medina P, Espinosa-

- Villanueva J, Moreno-Fierros L, Lorenzo-Morales J, (2017). *In vivo* CNS infection model of *Acanthamoeba* genotype T4: the early stages of infection lack presence of host inflammatory response and are a slow and contact dependent process. *Parasitol Res.* 116(2): 725-733. DOI: 10.1007/s00436-016-5338-1.
- Ortíz, HA, Vázquez T, Morales QD, Llamosas GB, Flores RJ, Valencia RS, (2000). Encefalitis por amibas de vida libre del género *Acanthamoeba* spp. *Acta Pediátrica de México* 21(3): 61-66.
 - Page FC, (1967) Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *J. Protozool.* 14: 709-724.
 - Page F, (1988). A new key to freshwater and soil Gimnamoebidae with instructions for culture collection of Algae and Protozoa. England. 122pp.
 - Paszko-Kolva C, Yamamoto H, Shahamat M, Sawyer TK, Morris G, Colwell RR, (1991). Isolation of amoebae and *Pseudomonas* and *Legionella* spp. from eyewash stations. *Appl Environ Microbiol.* 57(1):163-167.
 - Rivera F., Medina F., Ramírez P., Alcocer J., Vilaclara G., Robles E., (1984). Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients. *Environ. Res.* 33: 428-440.
 - Petry F, Torzewski M, Bohl J, Wilhelm-Schwenkmezger T, Scheid P, Walochnik J, Zöller L, Bhakdi S, Lackner KJ, (2006). Early diagnosis of *Acanthamoeba* infection during routine cytological examination of cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 44(5): 1903-1904.
 - Pussard M, Pons R, (1977). Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica.* 13:557-598.
 - Qvarnstrom Y, Nerad TA, Visvesvara GS, (2013). Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. *J Eukaryot Microbiol.* 60(6):626-33. doi: 10.1111/jeu.12069.
 - Rivera F, Roy-Ocotla G, Rosas I, Ramírez E, Bonilla P, Lares F, (1987). Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *Environ Res.* 42(1):149-154.
 - Rojas-Hernández S, Jarillo-Luna A, Rodríguez-Monroy M, Moreno-Fierros L, Campos-Rodríguez R, (2004). Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice. *Parasitol Res.*94(1):31-36.
 - Rojas MR, *et al*, “Epidemiología de la diabetes mellitus en México”, en Aguilar SC *et al*, Acciones para enfrentar a la diabetes. Documento de postura. Academia Nacional de Medicina de México, México, 2015.

- Rosenberg GA, (2012). Brain edema and disorders of cerebrospinal fluid circulation. In: Daroff RB, Fenichel GM, Jankovic J, Mazziotta JC, eds. *Bradley's Neurology in Clinical Practice*. 6th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; chap 59.
- Sadaka H, Emam E, (2001). Is the intestinal tract a portal of entry for *Acanthamoeba* infection? *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 31: 781-790.
- Salameh A, Bello N, Becker J, Zangeneh T, (2015). Fatal granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a patient with kidney transplant: a case report. *Open Forum Infect Dis.* 10:2(3).
- Sánchez-Zamora Y, Terrazas LI, Vilches-Flores A, Leal E, Juárez I, Whitacre C, Kithcart A, Pruitt J, Sielecki T, Satoskar AR, Rodríguez-Sosa M, (2010). Macrophage migration inhibitory factor is a therapeutic target in treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FASEB J.* 24(7): 2583-2590.
- Sangruchi T, Martínez AJ, Visvesvara GS, (1994) Spontaneous granulomatous amoebic encephalitis: report of four cases from Thailand. *Southeast. Asian. J. Trop. Med. Public Health.* 25: 309-313.
- Satlin MJ, Graham JK, Visvesvara GS, Mena H, Marks KM, Saal SD, Soave R, (2013). Fulminant and fatal encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a kidney transplant recipient: case report and literature review. *Transpl Infect Dis.* 15:619-626.
- Schuster FL, (2002). Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. *Clin Microbiol. Rev.* 15(3): 342-354.
- Schuster FL, Visvesvara GS, (2004). Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Vet Parasitol;* 126:91-120.
- Schuster FL, Visvesvara GS, (2004). Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resist Updat,* 7: 41-51.
- Schuster FL, Glaser C., Honarmand S., Maguirre JH., Visvesvara GS., (2004) *Balamuthia* Amoebic Encephalitis risk, Hispanic Americans. *Emerging Infectious Diseases.* 10(8):1510-1512.
- Schuster FL, Guglielmo BJ, Visvesvara GS, (2006). In-Vitro activity of miltefosine and voriconazole on clinical isolates of free-living amebas: *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba* spp., and *Naegleria fowleri*. *J Eukaryot Microbiol.* 53(2): 121-126.
- Shah BR, Hux JE, (2003). Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. *Diabetes Care.* 26(2): 510-513.

- Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ, (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*. 87:4-14.
- Shin LE, Hadley PB, (1936). Note on the spontaneous contamination of a bacterial culture by an organism resembling *Hartmannella castellanii*. *J Infect Dis*. 58, 23–27.
- Seijo M., González G., Santiago P., Rodríguez A., Diz J., Conde C., (2000). Granulomatous amebic encephalitis in a patient with AIDS: isolation of *Acanthamoeba* spp. Group II from brain tissue and successful treatment with sulfadiazine and fluconazole. *J Clin Microbiol*; 38: 3892-3895.
- Shah BR, Hux JE, (2003). Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. *Diabetes Care*. 26(2): 510-513. Shin H, Cho M, Kim H, Lee M, Park S, Sohn S, Im K, (2000). Apoptosis of primary-culture rat microglial cells induced by pathogenic *Acanthamoeba* spp. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 7: 510-514.
- Siddiqui R, Khan NA, (2012) Review Biology and Pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors*. 5:6.
- Singhal T, Bajpai A, Kalra V, Kabra SK, Samantaray JC, Satpathy G, Gupta AK, (2001). Successful treatment of *Acanthamoeba* meningitis with combination oral antimicrobials. *Pediatr Infect Dis J* 20(6): 623-7.
- Starr JM, Wardlaw J, Ferguson K, MacLulich A, Deary IJ, Marshall I, (2003). Increased blood-brain barrier permeability in type II diabetes demonstrated by gadolinium magnetic resonance imaging. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 74, 70-76.
- Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodríguez-Zaragoza S, et al. (1998). The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbiol*. 45: 45-54.
- Szénási Z, Endo T, Yagita K, Nagy E, (1998). Isolation, identification and increasing importance of 'free-living' amoebae causing human disease. *J Med Microbiol*. 47(1):5-16.
- Thamtam VK, Uppin MS, Pyal A, Kaul S, Rani JY, Sundaram C, (2016). Fatal granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a newly diagnosed patient with systemic lupus erythematosus. *Neurol India*. 64:101-104.
- Uribarren T, (2010). *Naegleria, Acanthamoeba, Balamuthia*. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, México.
- Van Klink F, Alizadeh H, Stewart G, Pidherney M, Silvany R, He Y, McCulley J, Niederkorn J, (1992). Characterization and pathogenic potential of a soil isolate and an

- ocular isolate of *Acanthamoeba castellanii* in relation to *Acanthamoeba* keratitis. *Curr. Eye. Res.* 11: 1207-1220.
- Visvesvara GS, Mirra SS, Brandt FH, Moss DM, Mathews HM, Martinez AJ (1983). Isolation of two strains of *Acanthamoeba castellanii* from human tissue and their pathogenicity and isoenzyme profiles. *J Clin Microbiol.* 18(6):1405-1412.
 - Visvesvara GS, (1991) Classification of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis* 1991; 5: S369-372.
 - Visvesvara GS, (2013) Infections with free-living amoebae. *Hand Clin Neurol.* 114:153-168.
 - Visvesvara GS, Martínez AJ, Schuster FL, Leitch G, Wallace SV, Sawyer TK, Anderson M, (1990) *Leptomyxid* amoeba, new agent of amoebic meningoencephalitis in human and animals. *J Clin Microbiol.* 28: 2740-2756.
 - Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL, (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 50: 1-26.
 - Volkonsky M, (1931). *Hartmannella castellanii* Douglas, et classification des hartmannelles. *Arch Zool Exp Gen* 72:317-339.
 - Walochnik J, Hassl A, Simon K, Benyr G, Aspöck H, (1999). Isolation and identification by partial sequencing of the 18S ribosomal gene of free-living amoebae from necrotic tissue of *Basilliscus plumifrons* (Sauria: Iguanidae). *Parasitol Res.* 85(7): 601-603.
 - Walochnik J, Wylezich C, Michel R., (2010). The genus *Sappinia*: History, phylogeny and medical relevance. *Exp Parasitol.* 126(1):4-13.
 - Walochnik J, Scheikl U, Haller-Schober EM, (2015). Twenty years of *Acanthamoeba* diagnostics in Austria. *J Eukaryot Microbiol.* 62: 3-11.
 - Wang Z, Gleichmann H, (1998). GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes.* 47 (1): 50-56.
 - Webster D, Umar I, Kolyvas G, Bilbao J, Guiot MC, Duplisea K, Qvarnstrom Y, Visvesvara GS, (2012). Case report: treatment of granulomatous amoebic encephalitis with voriconazole and miltefosine in an immunocompetent soldier. *Am J Trop Med Hyg.* 87(4): 715–718.
 - Willey J, Sherwood L, Woolverton C, (2009). *Virus de Eucariotas y otros agentes infecciosos acelulares*. En: Microbiología de Prescott, Harley y Klein. 7ª ed. Madrid: Editorial Mc Graw Hill Interamericana de España; p. 466. Yang Z, Cao Z, Panjwani N,

- (1997). Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis: Carbohydrate-mediated host-parasite interactions. *Infection and immunity*. 65: 439-445.
- Yang Z, Chen M, Fialkow LB, Ellett JD, Wu R, Nadler JL, (2003). The novel anti-inflammatory compound, lisofylline, prevents diabetes in multiple low-dose streptozotocin-treated mice. *Pancreas*; 26 (4): e99-104.
 - Yoder JS, Straif-Bourgeois S, Roy SL, Moore TA, Visvesvara GS, Ratard RC, Hill VR, Beach MJ, (2012). Primary amebic meningo-encephalitis deaths associated with sinus irrigation using contaminated tap water. *Clin Infect Dis*. 55(9): e79-e85.
 - Young AL, LeBoeuf NR, Tsiouris SJ, Husain S, Grossman ME, (2010). Fatal disseminated *Acanthamoeba* infection in a liver transplant recipient immunocompromised by combination therapies for graft-versus-host disease. *Transpl Infect Dis*. 12: 529–537.
 - Zahner D, Malaisse WJ, (1990). Kinetic behaviour of liver glucokinase in diabetes. I. Alteration in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes Res*. 14 (3): 101-108.

12. ANEXOS

ANEXO 1

a. MEDIOS DE CULTIVO

Medio Monoxénico

No nutritivo con *Enterobacter aerogenes* (NNE)

Agua destilada	1000 ml
NaCl	0.120 gr
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.004 gr
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.004 gr
Na ₂ HPO ₄	0.142 gr
KH ₂ PO ₄	0.136 gr
Bactoagar	15.0 gr

Se mezclan las sales y el agar, se agrega el agua destilada y se pone a hervir durante aproximadamente 1 minuto. Se esteriliza a 121 °C durante 20 minutos, y sin dejar enfriar por completo se vacía en cajas Petri estériles. Una vez que el agar solidifique, se agregan 0.8 ml de un concentrado de *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor, la cual se distribuye de manera homogénea por toda la superficie con una varilla de vidrio, con el fin de obtener una monocapa de bacterias. Se dejan reposar durante aproximadamente 1 hora, y se mantienen en refrigeración, hasta su uso.

Medio Axénico

Medio Bactocasitona 2%

Agua destilada	1000 ml
Bactocasitona	20 gr

Se mezcla la Bactocasitona con el agua destilada, se vierten 2.7 ml del medio en tubos con tapón de rosca, y se esterilizan a 121 °C durante 15 minutos. Una vez frío el medio, se añaden 0.3 ml de SFB, con antibiótico (200 µg de Kanamicina/penicilina).

ANEXO 2

b. ESQUEMA CONVENCIONAL DE INMUNIZACIÓN EN CONEJO

Dosis (2 mg)	Día	Vía	Adyuvante de Freud
1°	0	SC	ACF
2°	14	SC	AIF
3°	28	IM	SF
4°	35	IM	SF
Sangrado	40		

SC-subcutánea, **IM**-intramuscular, **ACF**-adyuvante completo de Freud, **AIF**-adyuvante incompleto de Freud, **SF**-suero fisiológico.

ANEXO 3

c. SOLUCIONES PARA WESTERN BLOT

Geles de poliacrilamida

Gel separador 10% (10 ml)

Poliacrilamida	3.33 ml
Amortiguador Tris-Base pH 8.8	2.5 ml
SDS 20%	50 μ l
Agua bidestilada	4 ml
* Temed	6.5 μ l
* APS 10% (Persulfato de amonio)	100 μ l

En el agua destilada se mezclan todos los reactivos.

* Ayudan a gelificar en minutos y siempre se agregan al final, poco antes de vaciar en las placas.

Por último, se agrega una capa de alcohol isopropílico para eliminar las burbujas.

Se deja reposar por 15 minutos.

Gel concentrador (5 ml)

Poliacrilamida	0.67 ml
Amortiguador Tris-Base pH 8.8	1.25 ml
SDS 20%	25 μ l
Agua bidestilada	3 ml
* Temed	5 μ l
* APS	80 μ l

En el agua destilada se mezclan todos los reactivos.

* Ayudan a gelificar en minutos y siempre se agregan al final, poco antes de vaciar en las placas.

Con la ayuda de papel filtro, se quita el exceso de alcohol isopropílico previamente usado, se agrega el gel recién preparado sobre el gel separador hasta el borde y finalmente se ponen los peines.

Buffer de transferencia (1 L)

Tris- Base	3.025 gr
Glicina	14.4 gr
Agua bidestilada	500 ml
Metanol	200 ml

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente. Almacenar a 4 °C.

Buffer de electroforesis 1 x (1 L)

Tris-Base 0.025M pH 8.3	3.025 gr
Glicina 0.192 M	14.4 gr
SDS 0.1%	1 gr

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente. Almacenar a 4 °C.

TBS Tween pH 7.5 (1 L)

Tris-HCl 50 mM	6.05 gr
NaCl 150 mM	8.76 gr
Tween 20 0.05%	500 µl

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente. Se agregan escamas de sosa hasta subir el pH a 7.5. Almacenar a 4 °C.

Solución bloqueadora (11 ml)

Leche descremada en polvo Svelty	0.66 gr
TBS Tween pH 7.5	11ml

Disolver y aforar a la cantidad correspondiente.

Solución Desteñidora I (1 L)

Metanol	400 ml
Ácido acético	70 ml

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución Desteñidora II (1 L)

Metanol	50 ml
Ácido acético	70 ml

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente. Almacenar a temperatura ambiente

