



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**Expresión de citocinas durante la fase  
temprana de infección vía intranasal  
de *Acanthamoeba castellanii* en  
ratones BALB/c diabéticos**

**TESIS**

Que para obtener el título de

**BIÓLOGO**

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

Christopher Alejandro Servin Flores

**DIRECTOR DE TESIS:**

Mtra. Hernández Martínez María Dolores



**Los Reyes Iztacala, Estado de México., 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## Contenido

Listado de abreviaturas:.....	4
Agradecimientos .....	5
Resumen.....	6
1. Introducción.....	8
2. Biología de <i>Acanthamoeba</i> .....	8
2.1 Ciclo de vida .....	8
2.2 Ecología.....	10
2.3 Taxonomía .....	10
3. Importancia médica .....	12
3.1 Encefalitis Amibiana Granulomatosa.....	12
3.1.2 Cuadro clínico .....	12
3.2 Factores de riesgo .....	13
3.3 Diagnóstico .....	13
3.4 Hallazgos histopatológicos.....	14
3.5 Tratamiento.....	14
3.6 Epidemiología.....	14
3.7 Prevención .....	15
3.8 Mecanismos de patogenicidad .....	15
3.9 Respuesta inmune.....	16
4. Diabetes mellitus.....	17
4.1 Concepto.....	17
4.2 Clasificación.....	17
4.3 Fisiopatología .....	18
4.4 Epidemiología.....	18

5. Planteamiento del problema.....	19
6. Objetivo general .....	20
6.1 Objetivos particulares.....	20
7. Materiales y métodos .....	21
7.1 Cultivo amibiano.....	21
7.2 Reactivación de la virulencia.....	21
7.3 Inducción de diabetes en ratones .....	21
7.4 Inducción de EAG en ratones sanos y diabéticos .....	22
7.5 Lavados nasales .....	22
7.6 Determinación de citocinas en lavados nasales y en suero por la técnica de ELISA .....	23
7.7 Análisis histopatológico.....	23
7.8 Inmunohistoquímica .....	23
7.9 Análisis estadístico .....	24
8. Resultados .....	24
8.1 Reactivación de virulencia.....	24
8.2 Inducción de diabetes mellitus en ratones.....	24
8.3 Determinación de citocinas en lavados nasales .....	25
8.4 Determinación de citocinas en suero.....	30
8.5 Hallazgos histopatológicos.....	35
9. Discusión .....	38
10. Conclusiones .....	46
11. Literatura citada .....	47

## Listado de abreviaturas:

EAG	Encefalitis Amibiana Granulomatosa
QA	Queratitis amibiana
IP	Intraperitoneal
STZ	Estreptozotocina
DM	Diabetes Mellitus
$\mu\text{L}$	Microlitros
SS	Sanos Sin infectar
SI	Sanos Infectados
DS	Diabéticos Sin infectar
DI	Diabéticos Infectados
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
IFN- $\gamma$	Interferón $\gamma$
IL-10	Interleucina 10
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
pg	Picogramos
ml	Mililitros

## **Agradecimientos**

Primeramente quiero expresar mi agradecimiento a mi tutora, la Maestra María Dolores Hernández Martínez, por la dedicación, apoyo y tiempo que me ha brindado en este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas. Gracias por la confianza ofrecida desde que llegué al laboratorio.

También, agradezco a la Dra. Maritza Omaña Molina, a la Dra. Alicia Vázquez Mendoza, al Dr. Carlos Sánchez Garibay y a la profesora Miriam Romero Grijalva por hacer correcciones y sugerencias para la realización de mi tesis, así como también me enseñaron muchas cosas de sus respectivas experiencias educativas. Asimismo agradezco al Dr. Citlaltepeltl Salinas Lara, a la Dra. Imelda Juárez Avelar, a la Dra. Yadira Ledesma Soto, a los profesores Patricia Aley Medina y José de Jesús Espinoza Villanueva por el valioso apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto.

Gracias a mis padres y a mi hermana, por su paciencia y su apoyo. De igual forma gracias a mis amigos Issael, Armando, Verónica, Rodrigo, Alejandra y Antonio; que me han brindado su apoyo moral y humor, necesarios en los momentos difíciles en el transcurso de este proyecto.

## Resumen

Las amibas de vida libre del género *Acanthamoeba* son microorganismos ampliamente distribuidos en el medio ambiente que habitan los ecosistemas acuáticos y terrestres y con la capacidad de causar infecciones en humanos, por esta razón se les llama anfizoicas. Se han informado como agentes etiológicos de infecciones en la piel, la córnea y el sistema nervioso central (SNC), donde causan encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), una enfermedad focalizada que se presenta con dolor de cabeza, fiebre, cambios de comportamiento, hemiparesia, letargo, rigidez cuello, afasia, ataxia, vómitos, náuseas, aumento de la presión intracraneal, convulsiones y muerte. EAG se asocia principalmente con personas inmunodeprimidas o con enfermedades crónicas como la diabetes mellitus (DM). Se sabe que la respuesta inmune a la infección por estas amibas puede implicar inmunidad innata y adaptativa. Los estudios *in vitro* han demostrado que estas amibas estimulan la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en leucocitos. Sin embargo, queda mucho por aclarar acerca de los determinantes de susceptibilidad y los mecanismos de patogenicidad que se establecen en la interacción huésped-parásito en la infección por estas amibas y durante las diferentes etapas en el desarrollo de EAG tanto en individuos sanos como en enfermedades crónicas como la DM. Se ha reportado que la DM cursa con una inflamación de bajo grado, así como con un incremento en el riesgo de padecer enfermedades infecciosas. Para contribuir al entendimiento del papel que tiene la respuesta inmune en la resistencia o susceptibilidad a EAG por *Acanthamoeba castellanii* analizamos las citocinas que se estimulan a nivel sistémico y local en ratones sanos y diabéticos ante la infección intranasal por éstas. Se trabajó con una cepa de *A. castellanii* aislada de un caso clínico de QA, con esa misma cepa se obtuvieron anticuerpos monoclonales en conejo usando un esquema convencional de inmunización.

De manera simultánea se indujo diabetes en ratones BALB/C de 7 semanas de edad y 22 gr peso  $\approx$ , se les inyectó 100  $\mu$ l STZ, se hizo un seguimiento durante 7 semanas registrando peso y glucemia.

Se implementó el modelo de EAG, utilizando además del grupo de ratones en los que se indujo diabetes otro grupo de ratones BALB/c con el mismo fondo genético y edad, mismos que se denominaron ratones diabéticos y sanos, la mitad de cada uno de estos grupos (sanos y diabéticos) fueron infectados con *A. castellanii*, y la otra mitad se trabajaron como grupo control (diabéticos sin infectar, y sanos infectados con *A. castellanii*, y sanos sin infectar). Para analizar la producción de citocinas a tiempos tempranos de la invasión vía intranasal se sacrificaron a las 24, 48 y 72 h PI, previo

a lo cual se realizó un sangrado en la vena central de la cola para obtención de suero, para los lavados nasales después del sacrificio los ratones se decapitaron, y a través de la faringe se pasaron 150  $\mu$ l de PBS estéril recuperándose por las narinas, estas muestras fueron preservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso, posteriormente se determinó la concentración de citocinas en las muestras de suero y en los lavados nasales utilizando un kit bioplex para 8 citocinas GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5 y TNF- $\alpha$ , posteriormente se hizo un análisis estadístico ANOVA DE dos factores en el programa minitab 18. De manera simultánea al procesamiento de los ratones para la obtención de suero y lavados nasales, 2 ratones de cada uno de los tratamientos se sacrificaron y sus órganos fueron fijados por perfusión para obtener cortes histológicos del encéfalo, además los cortes se procesaron mediante la tinción de H&E y por Inmunohistoquímica con anticuerpos policlonales anti *A. castellanii* y con Diaminobencidina. La concentración de citocinas en los lavados nasales en general fue muy baja, quizás debido a la dilución al obtener la muestra, sin embargo, las citocinas como GM-CSF, IL-1 $\beta$  e IL-2, con actividad inflamatoria registraron concentraciones en ratones infectados ligeramente superiores a controles, así como IL-10 con actividad reguladora. Las concentraciones séricas de citocinas fueron más altas en ratones infectados con amiba, DI y SI, aunque la diferencia fue significativa solo en GM-CSF ( $F = 3.51$ ,  $\alpha 0.05$ ). TNF- $\alpha$  y GM-CSF, citocinas inflamatorias, alcanzaron las concentraciones séricas más altas, alrededor de 3000 y 300 pg/ml, respectivamente; No obstante, también se estimuló la IL-10, con actividad reguladora. Los ratones con DM inducidos con estreptozotocina no fueron más susceptibles a la invasión por *A. castellanii*.



## **1. Introducción**

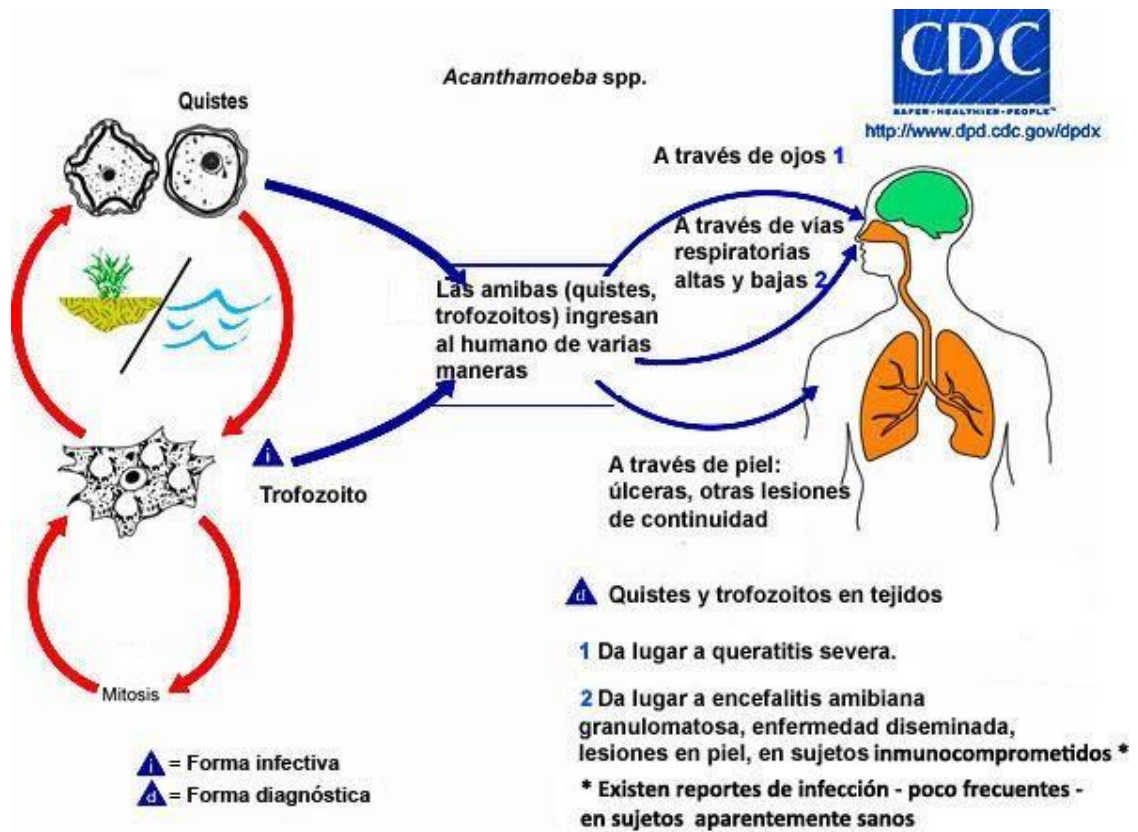
Las amibas de vida libre son un grupo de microorganismos ampliamente distribuidos en el ambiente que habitan una gran variedad de ecosistemas acuáticos y terrestres: dentro de este grupo existen algunas a las que se les denomina 'anfizoicas', es decir que poseen la capacidad de vivir libremente en la naturaleza y que ocasionalmente pueden actuar como parásitos facultativos tanto del hombre como de los animales (Page, 1988; Visvesvara *et al.*, 2007); a este grupo pertenecen: *Naegleria fowleri* agente etiológico de la meningoencefalitis amibiana primaria (Sierra, 2011), *Balamuthia mandrillaris*, *Sapinia pedata* y varias especies del género *Acanthamoeba*, las cuales se han reportado como agentes etiológicos de encefalitis amibiana granulomatosa (EAG).

## **2. Biología de *Acanthamoeba***

### **2.1 Ciclo de vida**

Las amibas del género *Acanthamoeba* a las que haremos referencia en este trabajo presentan 2 estadios dentro de su ciclo de vida, estado trófico y quístico (Figura 1). Los trofozoítos son la fase activa, son pleomórficos, tienen una vacuola contráctil, polaridad antero-posterior, pseudópodos con apariencia de espinas (acantópodos), núcleo con nucléolo grande y central, con un tamaño que oscila entre 15-50  $\mu\text{m}$  de acuerdo a la especie (Martinez y Visvesvara, 1997). Los trofozoítos se alimentan de bacterias, levaduras y algas presentes en el ambiente, a través de fagocitosis donde la digestión tiene lugar dentro de los fagolisosomas (Bowers y Olszewski, 1983; Siddiqui y Khan, 2012; German *et al.*, 2013) y a través de pinocitosis, con absorción de nutrientes en estado líquido. Posee un gran número de mitocondrias, generando la energía necesaria para las actividades metabólicas involucradas en la alimentación, así como el movimiento, la reproducción y otras funciones celulares. La membrana plasmática es inusual por la presencia de un lipofosfoglicano, ausente en células de los mamíferos (Korn *et al.*, 1974), El citoplasma posee un gran número de fibrillas, glucógeno y gotitas de lípidos. La conversión a quiste se caracteriza por la formación de una capa protectora, y se desencadena por privación de alimento o condiciones ambientales adversas tales como temperaturas bajas, altas o variación del pH. El quiste está conformado de dos paredes, la exterior o ectoquiste, constituida de proteínas y polisacáridos, mientras que la pared interna o endoquiste posee celulosa (Tomlinson y Jones, 1962; Neff y Neff, 1969). El tamaño de los quistes varía de 15 a 28  $\mu\text{m}$ . El endoquiste está formado por una capa de

fibrillas compuesta de proteínas insolubles en ácido y celulosa, que confiere resistencia a condiciones de estrés (Cursons *et al.*, 1980; Greub y Raoult, 2004; Trabelsi *et al.*, 2012; Torvinen *et al.*, 2014). Cuando las condiciones ambientales son favorables las amibas exquistan, emergiendo a través de una estructura denominada ostiolo donde el opérculo se ha removido (Chambers y Thompson, 1972).



**Figura 1.** 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, Queratitis amibiana y lesiones en piel), dependiendo de la vía de entrada. (CDC traducido al español).

## **2.2 Ecología**

*Acanthamoeba* es una de las amibas de vida libre más comunes en el ambiente. La resistencia de sus quistes a temperaturas extremas (Kingston, 1969; Biddick *et al.*, 1984), desecación (Kingston y Warhust, 1969) y desinfección (Kilvington, 1990), explica la presencia del microorganismo y su aislamiento de agua dulce, agua de mar, sedimentos oceánicos, congelada, agua de grifo, agua mineral embotellada, agua de sistemas de refrigeración industrial, aires acondicionados, aguas residuales, suelo, composta, piscinas cloradas y medicinales, unidades de tratamiento dental, tubos de lavado gástrico, unidades de diálisis, estuches de lentes de contacto, productos alimenticios, materia fecal, tracto respiratorio y del aire. Entre los organismos vivos, *Acanthamoeba* ha sido aislada de vegetales, hongos, células cultivadas, peces, reptiles, aves y mamíferos. En los seres humanos, especies de *Acanthamoeba* se han aislado de la cavidad nasal, la garganta y del intestino, así como de los tejidos infectados por *Acanthamoeba*, incluidos el tejido cerebral, el tejido pulmonar, de heridas cutáneas y de la córnea (De Jonckheere, 1987; Rivera *et al.*, 1994; Lorenzo *et al.*, 2005; Mahmoudi *et al.*, 2012). Por su depredación natural sobre bacterias, hongos y otros protozoos, esta amiba tiene un efecto significativo sobre los ecosistemas microbianos (Sign y Dutta, 1984). Se ha descrito la depredación de las cianobacterias (algas verdeazules) por *Acanthamoeba*, y se ha sugerido la posible utilización de estas amibas en el control de cianobacterias tóxicas en sitios acuáticos (Dryden y Wright, 1987).

Se han observado aumentos y disminuciones marcadas en la densidad poblacional de especies de *Acanthamoeba* en sedimentos del fondo del lago que parecen no estar relacionados con la temperatura del agua o los conteos bacterianos (O'Dell, 1979). Otros estudios (Kyle y Noblet, 1986; Kyle y Noblet, 1987) han confirmado cambios estacionales en la distribución de amibas en lagos y estanques, aparentemente en respuesta a los cambios químicos estacionales. *Acanthamoeba* prevalece en los sedimentos encontrándose con mayor frecuencia en zonas con partículas. (Kyle y Noblet, 1985).

## **2.3 Taxonomía**

*Acanthamoeba* es un microorganismo que de acuerdo con la clasificación taxonómica clásica pertenecen al Dominio *Eukarya*, al Reino Protista, subreino *Protozoa*, y al grupo *Sarcodina* (Kudo 1969). Dentro de este esquema, las amibas del género *Acanthamoeba*

fueron clasificadas en 3 grupos acorde a las características morfológicas de su quiste (Pussard y Pons, 1977).

Grupo 1: Conformado por cuatro especies, *A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata* y *A. tubiashi*. Estas especies exhiben grandes quistes y trofozoítos (> 18 µm), además de que no se han reportado que sean patógenas.

Grupo 2: Incluye 11 especies con una mayor distribución y las que han sido comúnmente aisladas. Se caracterizan por quistes usualmente con un tamaño < 18 µm donde el ectoquiste es rugoso, mientras que el endoquiste puede ser poligonal, triangular, ovalado o redondeado. Las especies incluidas en este grupo son *A. mauritaniensis*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. divionensis*, *A. triangularis*, *A. lugdunensis*, *A. griffini*, *A. rhyodes*, *A. paradivionensis* y *A. hatchetti*.

Grupo 3: Cinco especies fueron incluidas en éste grupo: *A. palestinensis*, *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *A. lenticulata* y *A. pustulosa*. En estas especies el diámetro promedio del quiste generalmente es < 19 µm, con un ectoquiste delgado y un endoquiste que puede tener entre 3 y 5 ángulos suaves.

Sin embargo, la morfología del quiste puede variar incluso dentro de las poblaciones clonales debido a las condiciones del cultivo (Kilvington *et al.*, 1991). Actualmente existe un nuevo esquema de clasificación basado en las relaciones filogenéticas en el cual los eucariotas se han ubicado en seis grupos o “super grupos”: *Amoebozoa*, *Opisthokonta*, *Rhizaria*, *Archaeplastida*, *Chromalveolata* y *Excavata*. En particular las amibas del género *Acanthamoeba* están situadas dentro del grupo *Amoebozoa* (Adl *et al.*, 2005). Sin embargo, considerando que ubicar a estas amibas hasta el nivel de especie a través de sus características morfológicas y bioquímicas en ocasiones es complicado y poco preciso; en los últimos años la clasificación dentro del género *Acanthamoeba* hace referencia a una nueva nomenclatura, fundamentada en su filogenia molecular a partir de las secuencias del ARNr de la subunidad 18S, a partir de las cuales hasta el momento se han determinado 20 genotipos para este género (Corsaro *et al.*, 2015; Fuerst *et al.*, 2015; Cabello, 2015; Corsaro *et al.*, 2017).

### **3. Importancia médica**

Se ha demostrado que algunas especies del género *Acanthamoeba* pueden causar desde ulceraciones cutáneas hasta graves enfermedades como queratitis amibiana (QA), una infección corneal de difícil resolución asociada principalmente a usuarios de lentes de contacto que puede resultar en la pérdida de la visión si no se diagnostica y trata a tiempo, y encefalitis granulomatosa fatal (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Shuster y Visvesvara, 2004a; Clarke y Niederkorn, 2006; Khan, 2006).

Las infecciones en piel por *Acanthamoeba* se caracterizan por la presencia de nódulos y ulceraciones cutáneas en los que se encuentran quistes y trofozoítos. En individuos sanos, estas infecciones son muy raras y son autolimitantes, pero en pacientes inmunocomprometidos, esto proporciona una vía de entrada al torrente sanguíneo, seguida por la diseminación hematológica a diferentes tejidos, lo que puede llevar a consecuencias fatales. La infección en SNC conduce a la muerte dentro de unas pocas semanas (Torno *et al.*, 2000).

Por otro lado, la QA, aunque puede ocurrir en personas que no utilizan lentes de contacto, está asociada principalmente con el uso de estos (Seal, 2003). En general se trata de un proceso multifactorial que involucra (i) el desgaste de los lentes por falta de reemplazo adecuado (ii) la falta de higiene personal, (iii) la limpieza inadecuada de los mismos, (iv) la formación de biopelículas en las lentes y (v) la exposición con agua contaminada (Khan, 2006). La secuencia de eventos en la QA implica destrucción de la barrera epitelial, invasión estromal por amibas, agotamiento de queratocitos, inducción de una respuesta inflamatoria intensa, fotofobia y si el diagnóstico no es realizado a tiempo o si este es inadecuado puede tener como consecuencia necrosis estromal con ceguera o pérdida del órgano (Niederkorn *et al.*, 1999; Panjwani, 2010).

#### **3.1 Encefalitis Amibiana Granulomatosa**

##### **3.1.2 Cuadro clínico**

La Encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) es una enfermedad focalizada provocada por estos parásitos. Los síntomas clínicos pueden parecerse a la meningitis viral o tuberculosa, dependiendo del área de lesión en el cerebro: e incluyen dolor de cabeza, fiebre, cambios de comportamiento, hemiparesia, letargia, rigidez del cuello, afasia, ataxia, vómito, náuseas, parálisis de los nervios craneales (3ero y 6to), aumento de la presión intracraneal, convulsiones y muerte. Estos se deben a lesiones necrotizantes

hemorrágicas con severa irritación meníngea (Martínez, 1991; Martínez y Visvesvara, 1997).

### **3.2 Factores de riesgo**

Aunque se han descrito casos de EAG sin ninguna predisposición (Martínez, 1997), se sabe que ésta afecta principalmente a personas con trastornos linfoproliferativos o hematológicos, neumonitis, insuficiencia renal, cirrosis hepática u otras enfermedades hepáticas, gammaglobulinemia, pacientes sometidos a trasplante de órganos o tejidos con terapia inmunosupresora, esteroides, uso excesivo de antibióticos, personas inmunocomprometidas o inmunosuprimidas, alcohólicos crónicos, mujeres en gestación, VIH positivos, enfermos con SIDA, con lupus eritematoso sistémico, cáncer y diabetes (Borochovitz *et al.*, 1979; Slater *et al.*, 1994; Bloch y Schuster, 2005; Tsutsumi *et al.*, 2002; Petry *et al.*, 2006; McKellar *et al.*, 2006; Tilak *et al.*, 2008; Kaul *et al.*, 2008; Mayer *et al.*, 2011; Satlin *et al.*, 2013; Khanna *et al.*, 2014; Salameh *et al.*, 2015; Morrisson *et al.*, 2016).

### **3.3 Diagnóstico**

Para el diagnóstico de la EAG por *Acanthamoeba* el método de cultivo *in vitro* es todavía usado y en algunos casos el único disponible. Muestras de líquido cefalorraquídeo y tejido cerebral pueden ser inoculadas en el medio de crecimiento para amibas, denominado No nutritivo enriquecido con *Enterobacter aerogenes* o *Escherichia coli* (NNE), vivas o muertas (Schuster, 2002; Marciano-Cabral y Cabral, 2003). Los hallazgos en líquido cefalorraquídeo muestran pleocitosis con predominio linfocítico y presencia de leucocitos polimorfonucleares, aumento de las concentraciones de proteínas, disminución de las concentraciones de glucosa y mínima turbidez (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). Es posible también realizar un diagnóstico histológico a partir de biopsias de piel o cerebro, utilizando diferentes métodos de tinción (Martínez y Visvesvara, 1997) como Giemsa-Wright y Tricrómica modificada (Ma *et al.*, 1990). Análisis de imágenes cerebrales mediante tomografía computarizada (TC) o de resonancia magnética (MRI) pueden mostrar áreas multifocales de lesiones, lo que indica un absceso cerebral o tumores. Los hallazgos, aunque no son confirmatorios de EAG, son de valor en el diagnóstico de esta infección en SNC.

### **3.4 Hallazgos histopatológicos**

La patogénesis de la EAG por *Acanthamoeba* está íntimamente relacionada con el estado inmunológico del paciente; en individuos inmunocompetentes se pueden observar granulomas alrededor de las amibas mientras que en las personas inmunocomprometidas estos granulomas son escasos o inexistentes (Martínez, 1982). La causa de la aparición de zonas necróticas no está bien definida, aunque puede deberse a la acción directa de los trofozoítos sobre el tejido o a la inducción de citocinas pro-inflamatorias como la interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) o la interacción de ambas (Marciano-Cabral *et al.*, 2000).

El examen *post mortem* a menudo muestra edema grave y necrosis hemorrágica. Las lesiones por EAG son más numerosas en los ganglios basales, mesencéfalo, tronco encefálico y hemiparesia cerebral, con lesiones características en el parénquima del SNC resultando en encefalitis granulomatosa crónica. Una respuesta granulomatosa ausente o mínima en pacientes con un sistema inmunológico severamente alterado, que se interpreta como un deterioro de la respuesta inmune celular (Martínez *et al.*, 2000). En casos de inmunosupresión puede producirse la diseminación de *Acanthamoeba* a órganos como hígado, riñón, tráquea o glándulas adrenales (Marciano-Cabral y Cabral, 2003), piel, pulmones, páncreas, próstata, ganglios linfáticos y médula ósea (Khan, 2006).

### **3.5 Tratamiento**

La EAG es una infección con una mortalidad mayor al 90 % y aunque no existe un tratamiento de elección se han reportado pacientes exitosamente tratados con sulfadiazina y fluconazol (Seijo *et al.*, 2000), Ketoconazol, isetionato de pentamidina, anfotericina B, azitromicina, itraconazol o rifampicina (Lalitha *et al.*, 1985; Ofori *et al.*, 1986; Visvesvara *et al.*, 2007).

### **3.6 Epidemiología**

El número de infecciones causadas por *Acanthamoeba* es relativamente pequeño a pesar de la amplia distribución mundial del parásito, ya que es casi imposible evitar su contacto. Solo en algunos casos de EAG ha sido posible aislar estas amibas (Martínez, 1980; Martínez, 1983). Desde 1960, cuando se reportó el primer caso hasta 1990, 56 casos de EAG se habían descrito en todo el mundo; 30 en los Estados Unidos. Solo 3 de esos pacientes reportados sobrevivieron a esta enfermedad, uno de Nigeria (Cleland *et al.*, 1982), uno de Barbados (Ofori *et al.*, 1986) y el tercero de la India (Lalitha *et al.*, 1985).

Hasta el año 2000, el número de casos reportados de individuos con EAG era de aproximadamente 200 (Schuster y Visvesvara, 2004).

Aproximadamente 17 especies de *Acanthamoeba* han sido descritas y 13 han sido asociadas a infecciones sistémicas en el hombre: *A. castellanii* (T4), *A. polyphaga* (T4), *A. culbertsoni* (T10), *A. palestinensis* (T2), *A. astronyxis* (T7), *A. hatchetti* (T11), *A. rhyodes* (T4), *A. byersi* (T18), *A. divionensis* (T4), *A. healyi* (T12), *A. lenticulata* (T5), *A. triangularis*, (T4) y *A. griffini* (T3) (Corsaro *et al.*, 2015). Además de casos en humanos, las infecciones sistémicas por *Acanthamoeba* han sido reportadas en ovejas, perros, monos y caballos (Kadlek, 1978).

### **3.7 Prevención**

Evitar el contacto con este microorganismo es imposible debido a su ubicuidad; sin embargo, es posible tener algunas precauciones sencillas para minimizar el contacto con este parásito. En primer lugar, los individuos inmunodeficientes deben evitar la exposición al polvo y a partículas del suelo que pueden llevar quistes al sistema respiratorio, evitar piscinas o aguas termales que no estén tratadas correctamente y la exposición de heridas abiertas al ambiente (Castrillón y Orozco, 2013).

### **3.8 Mecanismos de patogenicidad**

Hasta la fecha se han realizado varios estudios para determinar los mecanismos de patogenicidad de estas amibas, reportándose que llevan a cabo tanto mecanismos dependientes como independientes de contacto (Omaña-Molina *et al.*, 2010). El primer paso es su adhesión a la superficie de los tejidos (Panjwani *et al.*, 1997) a través de la expresión de una proteína transmembranal de aproximadamente 133 kDa conocida como proteína de unión a manosa (mannose-binding protein-MBP), expresada en la superficie de los trofozoítos (Alsam *et al.*, 2005), la cual se une a glicoproteínas que contienen manosa en las células blanco (Garate *et al.*, 2004 y Garate *et al.*, 2006). Además de esta adhesina, otra podría estar participando en la patogénesis de *Acanthamoeba*: la proteína de unión a laminina, uno de los principales constituyentes de la matriz extracelular (Siddiqui y Khan, 2012). Posterior a la adhesión, se propuso que estas amibas secretan enzimas que favorecen su invasión hacia capas más profundas del tejido; Alsam y colaboradores (2005) reportaron que *Acanthamoeba* secreta proteasas extracelulares que median la separación de las células de las monocapas de endotelio micro vascular de cerebro humano, indicando que subsecuente a la adhesión, la amiba produce diferentes



enzimas hidrolíticas como proteasas y fosfolipasas que degradan colágeno tipo I, III y IV, así como fibronectina, componentes principales de la matriz extracelular (Kong *et al.*, 2002). No obstante, este planteamiento, Omaña-Molina y colaboradores (2013; 2016; 2017) han mostrado que a tiempos tempranos de la infección *Acanthamoeba* spp. se adhieren, migran hacia las uniones celulares, penetran a capas más profundas del tejido a través de un proceso mecánico y/o enzimático, sin causar un efecto citolítico. Se conoce también que este microorganismo expresa ecto-ATPasas en su membrana que hidrolizan el ATP en ADP, el cual puede unirse a receptores celulares causando un incremento en la concentración de Ca<sup>++</sup>, lo que activa diferentes cascadas de señalización que llevan a la muerte de la célula por apoptosis (Khan, 2006). Otro aspecto importante en la virulencia de *Acanthamoeba* parece ser la capacidad de fagocitar la célula blanco; un proceso que requiere la inducción de rearrreglos en el citoesqueleto y la formación de amebostomas en la superficie celular (Omaña-Molina *et al.*, 2004). Esto ha sido reportado en cultivos de células epiteliales de córnea en interacción con *Acanthamoeba*, donde se observa la formación de los amebostomas, así como a través de la inhibición de la actividad fagocítica; utilizando citocalasina D (inhibidor de la polimerización de actina) (Khan, 2001). *Acanthamoeba* puede inducir la liberación de citocinas que conduce a una respuesta inflamatoria (Mattana *et al.*, 2002), detención del ciclo celular (arresto) del hospedero (Sissons *et al.*, 2004) o inducción de la apoptosis, evitando así la regeneración del tejido.

### **3.9 Respuesta inmune**

La respuesta inmune frente a la infección por estas amibas puede involucrar tanto la inmunidad innata como la adaptativa. Ferrante y Rowan-Kelly reportaron en 1983 que una de las razones por las que estas amibas no infectan individuos saludables es por su capacidad de activar la vía alterna del complemento, ya que se ha reportado que la membrana plasmática de *Acanthamoeba* carece de ácido siálico (Korn y Olivecrona, 1971) o cualquier capa protectora o cápsula (Bowers y Korn, 1968).

A través de ensayos *in vitro* se ha demostrado que estas amibas estimulan la producción de citocinas proinflamatorias (Marciano-Cabral y Toney, 1998; Mattana *et al.*, 2015); y activan a las células natural killer (NK) (Kim *et al.*, 1990), neutrófilos (Stewart *et al.*, 1994; Toney y Marciano-Cabral, 1998) y macrófagos (Van Klink *et al.*, 1997), lo que sugiere que en individuos inmunocompetentes la inmunidad innata juega un papel importante en la resistencia a la infección por estas amibas. También se han detectado anticuerpos anti-

*Acanthamoeba* tanto en personas sanas como en pacientes con EAG (Martínez, 1993); sin embargo, el mecanismo de respuesta más importante en estos pacientes es la inmunidad mediada por células T (Cursons *et al.*, 1980; Kim *et al.*, 1993) que determina la formación de granulomas. Como es de esperarse, en personas con Síndrome de inmunodeficiencia adquirida y con EAG, no desarrollan una lesión granulomatosa completa (Hawley *et al.*, 1997).

A pesar de estos avances aún falta mucho por esclarecer en torno a los determinantes de susceptibilidad y a los mecanismos de patogenicidad que se establecen en la interacción hospedero-parásito en la infección por estas amibas y durante las diferentes etapas en el desarrollo de la EAG tanto en individuos sanos como con enfermedades crónicas como la diabetes.

#### **4. Diabetes mellitus**

##### **4.1 Concepto**

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades caracterizadas principalmente por hiperglucemia crónica debido a la falta de acción de la insulina. Existen múltiples procesos fisiopatogénicos involucrados en su aparición que varían desde la destrucción autoinmunitaria de las células  $\beta$  del páncreas hasta alteraciones que conducen a la resistencia a la acción de la insulina (Sone, 2018).

##### **4.2 Clasificación**

La diabetes se divide generalmente en 2 tipos en función de su etiología. La diabetes tipo 1, que anteriormente se denominaba diabetes juvenil o dependiente de la insulina, representa menos del 5% -10% (dependiendo de las zonas del mundo) de la diabetes.

La diabetes tipo 2 (DM2), que solía conocerse como diabetes no insulino dependiente o diabetes asociada a la adultez (pero actualmente también es común entre los niños con sobrepeso), es responsable de la gran mayoría de casos de esta enfermedad. Sin embargo, se han descrito otros casos de diabetes asociados a enfermedades del páncreas, genéticas o por exposición a fármacos y Diabetes Mellitus gestacional (Baynest, 2015; Sone, 2018).

### **4.3 Fisiopatología**

La diabetes tipo 1, ocurre debido a una destrucción aguda de las células  $\beta$  productoras de insulina en el páncreas a través de trastornos autoinmunes que conducen a una deficiencia repentina y total de insulina, la única hormona que puede reducir los niveles de glucosa en plasma.

En la diabetes tipo 2, la secreción de insulina permanece, pero no en cantidades suficientes para mantener el nivel de glucemia en un rango normal, con frecuencia debido no solo a niveles disminuidos de secreción de insulina sino también a una demanda inapropiadamente mayor de insulina debido a la respuesta de las células del cuerpo a la disminución de la insulina. Esta respuesta reducida a la insulina se denomina 'resistencia' y ocurre en diversas situaciones, típicamente en la obesidad. En pacientes con diabetes tipo 2, la resistencia a la insulina y su deficiencia contribuyen a elevar los niveles de glucosa en plasma, pero en diferentes proporciones, variando de paciente a paciente (Sone, 2018). Además, se ha reportado que la DM2 cursa con inflamación de bajo grado (Bensellam *et al.*, 2012).

### **4.4 Epidemiología**

Aunque recientemente se ha informado sobre la estabilización en el aumento de la diabetes mellitus en algunos países desarrollados, como en los Estados Unidos (Gregg *et al.*, 2014), la prevalencia mundial y la incidencia de diabetes mellitus (DM) siguen aumentando. Un análisis de los datos combinados de estudios poblacionales de 146 países reveló que la prevalencia mundial de diabetes estandarizada por edad se estimó que aumentó del 4.3% (95% CI 2.4-7.0) en 1980 a 9.0% (7.2-11.1) en 2014 en hombres y de 5.0% (2.9-7.9) a 7.9% (6.4-9.7) en mujeres. La población adulta mundial con diabetes aumentó cuatro veces, de 108 millones a 422 millones durante este período. (KCD Risk Factor Collaboration, 2016). Además de la diabetes, hay 318 millones de adultos considerados prediabéticos en todo el mundo, que tienen un mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 en el futuro, así como enfermedades cardiovasculares. Debido a su naturaleza asintomática, es muy difícil de encontrar la intolerancia a la glucosa y la diabetes temprana, excepto por un chequeo de salud o detección. Como consecuencia, casi la mitad de la población mundial de diabéticos no ha sido diagnosticada, lo que permite continuamente la progresión silenciosa de complicaciones (Sone, 2018).

La DM se ha asociado con un incremento en la tasa de infección (Pozzilli y Leslie 1994; Calvet, 2001; Shan y Hux, 2003), lo que puede explicarse parcialmente por una disminución de la respuesta inmune mediada por células T (Pozzilli y Leslie 1994; Calvet y Yoshikawa, 2001). También se ha documentado la alteración de la función de los neutrófilos asociada a la diabetes (Delamaire *et al.*, 1997). Algunos estudios han demostrado que la DM aumenta la susceptibilidad a las infecciones respiratorias, gastrointestinales y hepáticas, vías urinarias, piel, tejidos suaves, cabeza y cuello (Casqueiro *et al.*, 2012), tanto infecciones comunes como las que se presentan principalmente en personas con DM. No obstante, en otros estudios no han observado tal asociación (Pozzilli y Leslie, 1994; Calvet y Yoshikawa, 2001; Hu y Boyko, 2004; Peleg *et al.*, 2007). Tales infecciones, además pueden desencadenar complicaciones como la hipoglucemia y la cetoacidosis. (Casqueiro *et al.*, 2012).

## **5. Planteamiento del problema**

Se sabe que la DM2 cursa con inflamación de bajo grado, asociada con la resistencia a la insulina y el deterioro de las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos (Bensellam *et al.*, 2012). Además, diversos estudios han demostrado que esta enfermedad se relaciona con un incremento en el riesgo de padecer enfermedades infecciosas y sus complicaciones (Shah y Hux, 2003). Si bien existen pocos reportes de EAG asociados a DM (Duma *et al.*, 1978; Borochovit *et al.*, 1979; Tsutsumi *et al.*, 2002; Bloch y Schuster, 2005; Petry *et al.*, 2006; McKellar *et al.*, 2006; Tilak *et al.*, 2008; Kaul *et al.*, 2008; Mayer *et al.*, 2011; Satlin *et al.*, 2013; Khanna *et al.*, 2014; Salameh *et al.*, 2015; Morrisson *et al.*, 2016), no existen publicaciones sobre el posible mecanismo de patogenicidad de *Acanthamoeba* en EAG asociada a DM2. Se sabe en general que los mecanismos dependientes de contacto y las proteasas pudiesen tener un papel patogénico, pero también se involucra a la respuesta inmune innata y adaptativa como posibles participantes en el daño en SNC (Baig, 2015; Mattana *et al.*, 2016).

Considerando los antecedentes antes expuestos y a fin de contribuir al entendimiento del papel que tiene la respuesta inmunitaria en la resistencia o susceptibilidad a EAG por *A. castellanii* proponemos analizar las citocinas que se estimulan a nivel sistémico y local en ratones sanos y diabéticos ante la infección intranasal por estas amibas.

## **6. Objetivo general**

Determinar la expresión de citocinas durante la fase temprana de infección vía intranasal de *A. castellanii* en ratones BALB/c diabéticos.

### **6.1 Objetivos particulares**

Reactivar la virulencia de la cepa de *A. castellanii* mediante su inoculación vía intranasal en ratones BALB/c.

Inducir diabetes en ratones BALB/c mediante una dosis única de estreptozotocina.

Implementar el modelo de EAG en ratones sanos y diabéticos en tiempos tempranos de interacción.

Cuantificar citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias presentes en lavados nasales y en suero de ratones BALB/c diabéticos infectados con *A. castellanii*.

Detectar la presencia e invasión de *A. castellanii* en cortes histológicos del meato nasofaríngeo y del tejido cerebral de ratones BALB/c diabéticos infectados con *Acanthamoeba castellanii*.

## **7. Materiales y métodos**

### **7.1 Cultivo amibiano**

Se trabajó con una cepa de *A. castellanii*, aislada de un caso clínico de queratitis, la cual se mantuvo axénicamente en medio PYG (peptona proteosa [0.75%], extracto de levadura [0.75%], y glucosa [1.5%]), a 30 °C. Para la reactivación de la virulencia y la inducción de EAG los trofozoítos se cosecharon en la fase exponencial de crecimiento después de desprenderlos de la pared de los frascos de cultivo por enfriamiento en agua-hielo durante 10 minutos, se lavaron dos veces con PBS; posteriormente se contaron utilizando la cámara de Neubauer, ajustando a  $1 \times 10^6$  trofozoítos en 20  $\mu$ l de PBS 1X.

### **7.2 Reactivación de la virulencia**

Es ampliamente aceptado que el mantenimiento de microorganismos patógenos en cultivos axénicos disminuye su virulencia, por lo tanto, antes de montar el modelo de EAG en animales se realizaron 2 pases seriados de la cepa amibiana para reactivar la virulencia, para lo cual se inoculó intranasalmente (IN) un lote de 3 ratones machos de la cepa BALB/c recién destetados con  $1 \times 10^6$  trofozoítos en 20  $\mu$ l de medio de cultivo. Los ratones se mantuvieron 21 días en el bioterio de la FES-Iztacala, donde fueron monitoreados diariamente en busca de signos de la enfermedad. Pasados los 21 días se sacrificaron con pentobarbital y se realizó la disección del cerebro, pulmón, hígado y riñón; para ser depositados en cajas con agar no nutritivo enriquecido con *Enterobacter aerogenes* (NNE) y se incubaron a 30 °C con el propósito de recuperar las amibas de estos órganos. Recuperadas las amibas se crecieron nuevamente en el medio axénico PYG para su uso en los ensayos posteriores.

### **7.3 Inducción de diabetes en ratones**

Se indujo diabetes a un grupo de 45 ratones machos con fondo genético BALB/c de 7 semanas de edad con un peso promedio de 22 gr, a los cuales se les inyectó intraperitonealmente 130 mg/kg de estreptozotocina (STZ) en 100  $\mu$ l de buffer de citratos pH 4.5, con ayuno previo de 6 h y registro de glucosa en sangre. Consecutivamente, para confirmar la inducción de diabetes se hicieron registros semanales del peso y niveles de glucosa en sangre previo ayuno de 6 h, durante 7 semanas post inducción, a través de lo cual se confirmó el establecimiento de la diabetes en los ratones (Sánchez-Zamora *et al.*,

2010). Todos los animales fueron tratados de acuerdo con los cuidados contemplados en la norma mexicana NOM-062-ZOO-1999, 2001.

#### **7.4 Inducción de EAG en ratones sanos y diabéticos**

La inducción de EAG se trabajó en ratones sanos y en los que se indujo previamente diabetes acorde al siguiente esquema:

##### **Grupos de estudio:**

SI: Ratones sanos infectados con *Acanthamoeba castellanii*

SS: Ratones sanos sin Infectar

DI: Ratones diabéticos infectados con *Acanthamoeba castellanii*

DS: Ratones diabéticos sin infectar

21 ratones sanos (SI) y 21 ratones diabéticos (DI) con el mismo fondo genético y de la misma edad, se inocularon vía IN con  $1 \times 10^6$  trofozoítos/ 20  $\mu$ L de medio limpio. Posteriormente en lotes de 7 ratones se sacrificaron con una inyección intraperitoneal con pentobarbital a diferentes tiempos: 24, 48 y 72 h post-inoculación. Previo al sacrificio se tomó una muestra de sangre de cada ratón a través de un corte de la vena lateral de la cola para determinar la concentración de las diferentes citocinas a nivel sistémico. Cinco de los ratones de cada tratamiento se sacrificaron y se realizaron lavados nasales con PBS estéril para determinar la presencia de citocinas en la mucosa nasal. De manera simultánea se trabajó con un grupo control de ratones sanos sin infectar (SS) y un grupo de diabéticos sin infectar (DS) que fueron inoculados solamente con 20  $\mu$ L del medio de cultivo. De cada lote de ratones, 2 fueron procesados mediante la técnica histológica convencional.

#### **7.5 Lavados nasales**

La toma de muestra para la detección de citocinas presentes en la cavidad nasal se realizó a partir de lavados nasales acorde a lo propuesto por Moreno y colaboradores en 2013. Para lo cual se sacrificó a los ratones mediante sobredosis de anestesia con pentobarbital sódico, se decapitó al ratón con ayuda de unas tijeras, después se localizó la faringe que es la parte superior de la tráquea y que se comunica directamente con las fosas nasales, se introdujo una cánula, se lavó con 150  $\mu$ L de PBS estéril, posteriormente

se colectó el lavado en tubos eppendorff mantenidos en hielo y se centrifugó cada una a 10,000 r.p.m. por 10 minutos, finalmente el sobrenadante se guardó a -70°C hasta su uso.

### **7.6 Determinación de citocinas en lavados nasales y en suero por la técnica de ELISA**

Las muestras obtenidas de los lavados nasales y de suero fueron utilizadas para evaluar las concentraciones de citocinas mediante la técnica de ELISA-sandwich. Se determinó la concentración de Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 10 (IL-10), Interleucina 2 (IL-2), Interleucina-5 (IL-5) y Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) de los diferentes grupos experimentales y en los tiempos establecidos. Se utilizó el kit Bio-PlexPro marca Biorad acorde al protocolo del proveedor. La absorbancia se determinó con el equipo (Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex Reader) a la longitud de onda determinada.

### **7.7 Análisis histopatológico**

Los 2 ratones de cada tratamiento que se utilizaron para el análisis histopatológico se procesaron de la siguiente manera: para su sacrificio fueron inyectados con una sobredosis de pentobarbital y los órganos fueron fijados por perfusión con una solución de paraformaldehído al 4 % en PBS pH 7.2, el meato nasofaríngeo fue descalcificado durante un mes con EDTA para después incluirse en parafina. Se hicieron cortes seriales de 3  $\mu$ m de espesor en micrótopo, unos se tiñeron con hematoxilina y eosina; otros se procesaron por inmunohistoquímica para localizar las amibas en el tejido (detalles de la técnica en el párrafo siguiente). Este análisis permitió describir la presencia de amibas, quistes, así como infiltrado inflamatorio (Guarner *et al.*, 2007).

### **7.8 Inmunohistoquímica**

De los cortes histológicos seriados unos se procesaron por inmunohistoquímica para detectar la presencia de amibas y/o quistes en los tejidos. Para realizar la recuperación antigénica los cortes fueron colocados en vasos coplin para teñir llenos con buffer de citratos pH 6 y se mantuvieron dentro de una autoclave a 120 °C y 15 lb/in<sup>2</sup> de presión durante 10 min y se permeabilizaron con detergente Tween 10x. La peroxidasa endógena fue bloqueada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en agua. Como anticuerpos primarios se utilizaron los policlonales anti-*Acanthamoeba castellanii* de conejo de acuerdo a la dilución



estandarizada. Posteriormente se utilizó el Mach2 Rabbit HRP Polymer (Biocare). El revelado se hizo con Diaminobenzidina y la contratinción con hematoxilina de Harris.

### **7.9 Análisis estadístico**

La comparación entre las concentraciones de citocinas en los lavados nasales y en el suero de los ratones de los diferentes tratamientos se llevó a cabo mediante un análisis de varianza factorial (ANOVA de dos factores), y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. Los análisis fueron procesados en el paquete de cómputo Minitab versión 18, con un coeficiente de confiabilidad del 95%.

## **8. Resultados**

### **8.1 Reactivación de virulencia**

Con el propósito de reactivar la virulencia de la cepa de *A. castellanii* utilizada se realizaron dos pases seriados en ratones BALB/c. Del total de ratones inoculados solamente el 20 % murió días posteriores a la inoculación, el resto fueron sacrificados y los órganos de todos los ratones fueron extirpados en busca de amibas. *A. castellanii* fue recuperada de cerebro, pulmón, hígado y riñón al día siguiente de extirpar los órganos, con lo que se confirmó la capacidad invasiva de esta cepa.

### **8.2 Inducción de diabetes mellitus en ratones**

De los 25 ratones en los que se administró estreptozotocina, solamente en el 92 % de estos se indujo diabetes, confirmándose ésta por un aumento significativo en la concentración de glucosa en sangre a partir de 7 días después del tratamiento; tiempo en el que se registró una mortalidad del 4 % de los animales. Los animales se consideraron diabéticos debido a que los niveles de glucosa en sangre se mantuvieron por arriba de 150 mg/dl (Furman, 2015) después de permanecer en ayuno durante 6 horas. Transcurridas 6 semanas la concentración media de glucosa en los ratones en ayuno en los que se indujo diabetes fue de 182.93 mg/dl (Figura 2) mientras que la media del grupo de ratones sanos (control) fue 114.31 mg/dl.

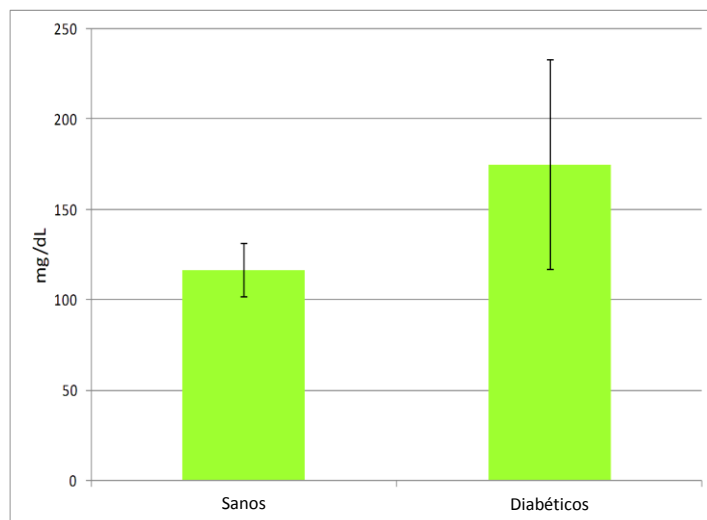


Figura 2. Promedio de la concentración de glucosa en sangre en ratones BALB/c sanos y en los que se indujo diabetes de los diferentes grupos de estudio.

### **8.3 Determinación de citocinas en lavados nasales**

Con el propósito de evaluar la expresión de citocinas en tiempos tempranos posteriores a la infección vía intranasal por *A. castellanii* en ratones diabéticos, se determinaron los niveles de éstas en suero y en lavados nasales. Los resultados de la concentración de citocinas en los lavados nasales, en los diferentes grupos se describen a continuación, es importante mencionar que las concentraciones de algunas de las citocinas fueron menores a la sensibilidad de detección del kit utilizado.

Del total de citocinas analizadas, en los ratones del grupo SI hubo solo un ligero aumento de la concentración de IL-1 $\beta$  y de IL-10 24h PI y del GM-CSF después de 48 h; las concentraciones del resto de las citocinas fueron semejantes a las del grupo SS, en el que consideramos presentaron las concentraciones basales de cada una de las citocinas.

En el grupo de ratones diabéticos que fueron inoculados con amibas, DI, las concentraciones de las citocinas en los lavados nasales tampoco se incrementaron de forma significativa a través de los 3 tiempos evaluados, solamente aumentaron un poco más en algunos de los tiempos el GM-CSF e IL-5. En relación con el grupo de ratones DS la concentración de citocinas en los lavados nasales fue semejante o ligeramente mayor a los SS.

**GM-CSF:** En la comparación de los niveles de GM-CSF se observó una mayor concentración de ésta en los grupos de ratones DI, DS con respecto al grupo de ratones

SS (Figura 3a), registrándose en ambos grupos de ratones diabéticos una concentración de 7.663 pg/ml y 4.673 pg/ml respectivamente; concentración ligeramente mayor que 2.562 pg/ml de los ratones SS. A través del tiempo en los grupos de DI y SI se presentó un ligero incremento de esta citocina 48 hrs post inoculación (Figura 4a). Sin embargo, en el análisis de varianza no se encontraron diferencias significativas entre grupos ( $F=1.83$ ,  $P=0.205$ ) ni entre tiempos ( $F=2.02$ ,  $P=0.183$ ).

**IFN- $\gamma$ :** Con respecto a esta citocina (Figura 3b) no se observaron variaciones importantes en su concentración en los diferentes grupos, en los ratones infectados; las concentraciones oscilaron entre 1 pg/ml.

Sin embargo, al analizar la cuantificación de esta citocina a través del tiempo se observa que en los grupos de animales infectados con las amibas se presentó una ligera tendencia a disminuir los niveles de ésta (Figura 4b).

En el análisis de varianza realizado no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $F=0.5$ ,  $P=0.679$ ), ni entre tiempos ( $F=0.02$ ,  $P=0.981$ ).

**IL-10:** En relación con los niveles de IL-10 se presentaron también concentraciones bajas y con un patrón semejante al del IFN- $\gamma$ , con valores similares en los diferentes grupos (Figura 3c). Asimismo, en los grupos de ratones infectados se presentó primero a las 24 h PI un ligero aumento en su concentración, seguido de una ligera disminución a través de los tiempos evaluados (Figura 4c), pero estadísticamente no hubo diferencias significativas (entre grupos:  $F=1.44$ ,  $P=0.278$ ; y entre tiempos:  $F=0.30$ ,  $P=0.747$ ).

**IL-1 $\beta$ :** En la comparación de los niveles de IL-1 $\beta$  en los diferentes grupos, se observa que solamente en los ratones SI se presentó un incremento de esta citocina con un valor de 12.35 pg/ml, considerablemente superior a las concentraciones registradas para los otros 3 grupos restantes (Figura 3d). Aunque, al analizar la expresión de esta citocina en los 3 tiempos evaluados (Figura 4d) observamos que el incremento solamente se presentó 24 h post infección, un tanto similar a lo registrado en los DI.

El análisis de varianza realizado no mostró diferencias significativas entre grupos ( $F=0.57$ ,  $P=0.649$ ), ni entre tiempos ( $F=1.08$ ,  $P=0.375$ ).

**IL-2:** Con relación a los niveles de IL-2 la mayor concentración se registró en los ratones DI (1.113 pg/ml), a pesar de ello, la mediana de la concentración fue semejante en todos

los grupos, y osciló entre 0.546 y 0.808 (Figura 3e). De igual manera no se observaron diferencias significativas en la concentración de esta citocina a través del tiempo (Figura 4e). Los valores del ANOVA fueron de  $F=0.40$  y  $P=0.756$  entre grupos; y de  $F=0.01$  y  $P=0.993$  entre tiempos.

**IL-4:** Con respecto a los niveles de IL-4 en los lavados nasales (Figura 4f) se observa un patrón semejante al de la IL-2 con la mayor concentración en el grupo de ratones DI (2.268 pg/ml) 72 h PI y valores menores y semejantes en los otros grupos, y no se encontraron diferencias significativas ( $F=0.46$ ,  $P=0.711$ ).

A través del tiempo, la expresión de esta citocina mostró pequeñas variaciones estadísticamente no significativas ( $F=0.25$ ,  $P=0.784$ ).

**IL-5:** Respecto a IL-5, en la mayoría de las muestras de los lavados nasales la concentración estuvo por debajo de la sensibilidad de lectura del aparato, solamente en el grupo DI se registró una concentración de 17.43 pg/ml. De igual manera, las concentraciones de esta citocina se mantuvieron bajas en los 3 tiempos determinados, semejante a los animales del grupo SS en el que todas las muestras estuvieron debajo de la sensibilidad del lector (Figura 4g).

Los resultados del análisis de varianza realizado no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $F=0.40$ ,  $P=0.699$ ), ni entre tiempos ( $F=0.51$ ,  $P=0.645$ ).

**TNF- $\alpha$ :** Se detectó una mayor concentración de TNF- $\alpha$  en los ratones DI con un valor máximo de 29.79 pg/ml. Con respecto al grupo SI, el valor máximo fue 16.76 pg/ml (Figura 3h). En relación a la concentración de esta citocina a través del tiempo, de manera general, se mostraron pequeñas variaciones en los grupos, que no fueron estadísticamente significativas ( $F=0.11$ ,  $P=0.901$ ). El análisis de varianza tampoco mostró diferencias significativas entre grupos ( $F=1.15$ ,  $P=0.375$ ).

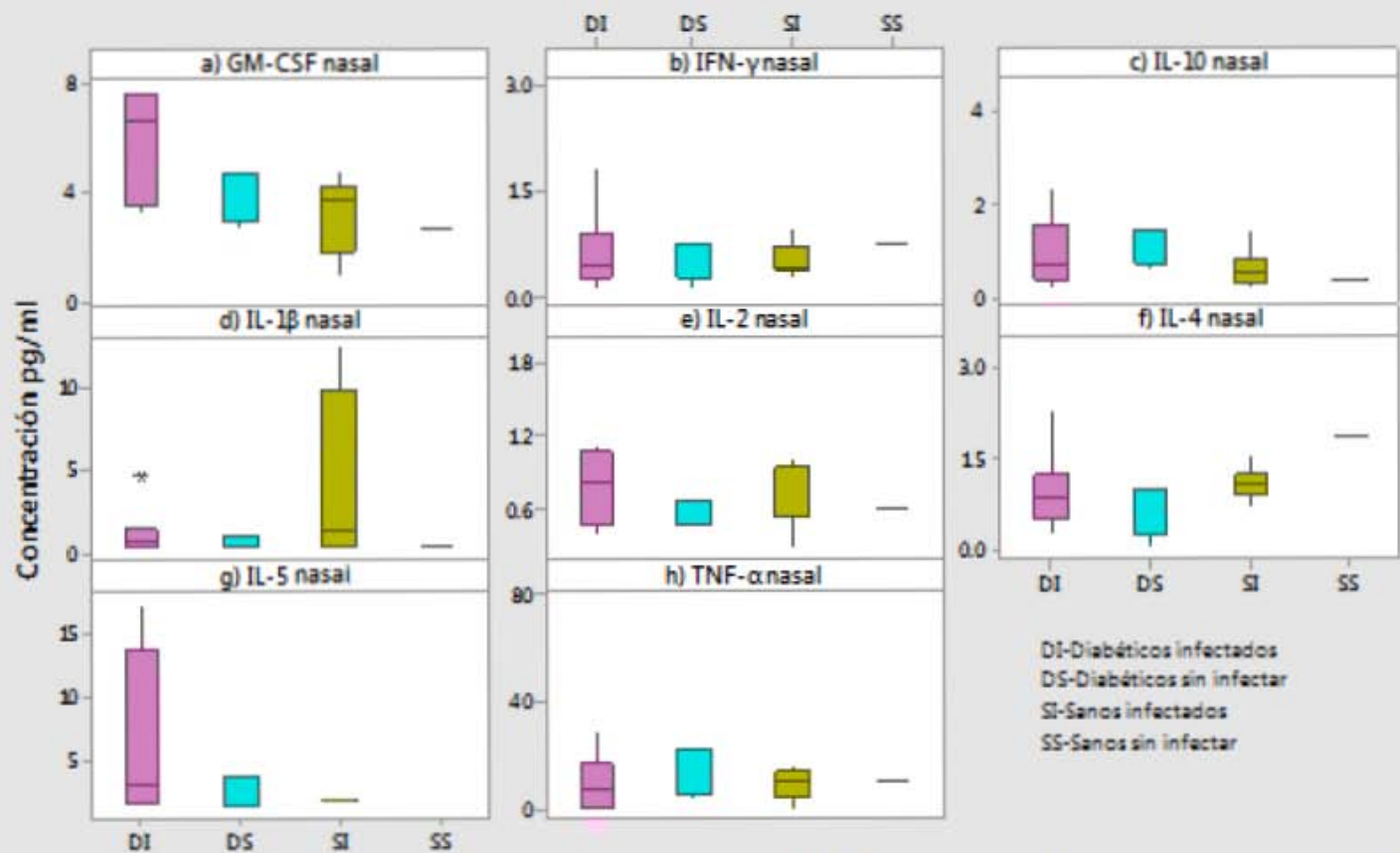
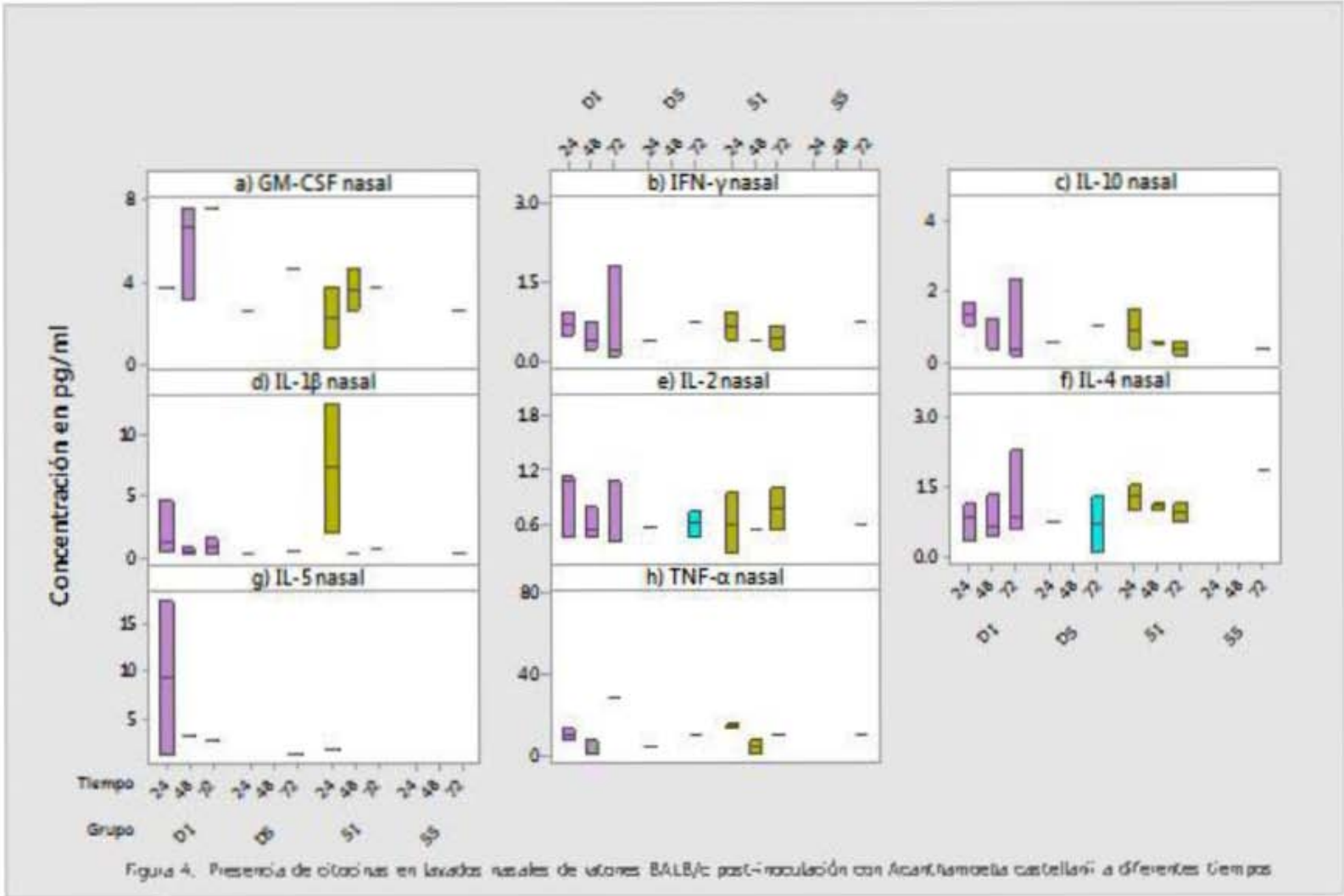


Figura 3. Presencia de citocinas en lavados nasales de ratones BALB/C post-inoculación con *Acanthamoeba castellanii*.



#### **8.4 Determinación de citocinas en suero**

Los resultados de las concentraciones de las citocinas en suero, en los diferentes grupos se describen a continuación:

En los ratones del grupo SI se presentó en general, un incremento de la concentración de todas las citocinas evaluadas 24h PI, seguido de un descenso 48h PI, mismas que a las 72h tuvieron nuevamente un ligero incremento en su concentración. En las muestras del grupo SS las concentraciones de las citocinas fueron de las más bajas que se registraron.

En relación con los grupos de ratones DS, se observa que en general, tienen una mayor concentración de las diferentes citocinas con respecto al grupo de ratones SS, lo que nos muestra una concentración basal inicial superior a la de los ratones no diabéticos.

En los ratones DI la concentración de las diferentes citocinas muestran variaciones entre ellas, y en los diferentes tiempos después de ser inoculados con las amibas; así para GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-4 y TNF- $\alpha$ , la mayor concentración se presentó a las 72h PI, mientras que para IL-5 e IL-2 a este tiempo PI se registró la menor concentración.

**GM-CSF:** En los grupos de ratones DI, SI y DS se registró una mayor concentración de GM-CSF con respecto al grupo de ratones SS (Figura 5a), determinándose en los grupos de ratones infectados las concentraciones más altas de esta citocina, 339.6 y 252.3 pg/ml, respectivamente; comparados con los SS, que tuvieron una concentración de 101.2 pg/mL. Se observó también que en los ratones DS se encontraron concentraciones elevadas para esta citocina (241.3 pg/ml). No obstante, a través del tiempo (Figura 6a) en este grupo la mediana de la concentración de esta citocina se mantuvo elevada, mientras que en los grupos de animales infectados con las amibas se presentó una leve tendencia a disminuir sus niveles.

El análisis de varianza realizado mostró diferencias significativas entre grupos ( $F=3.51$ ,  $P=0.038$ ), mientras que entre tiempos no hubo diferencias significativas ( $F=2.42$ ,  $P=0.119$ ).

**IFN- $\gamma$ :** Al comparar los niveles de IFN- $\gamma$  en los diferentes grupos se observó una mayor concentración de ésta en los ratones DI y SI con respecto al grupo de ratones SS (Figura 5b), determinándose en los infectados las concentraciones más altas, 181.5 y 157.6

pg/ml, respectivamente; mientras que en los ratones SS el valor máximo fue 45.40 pg/ml. En relación a la concentración de esta citocina a través del tiempo se observa que en los grupos de animales infectados con las amibas también se presentó una sutil tendencia a disminuir los niveles de ésta (Figura 6b).

El análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre grupos ( $F=2.11$ ,  $P=0.137$ ), y entre tiempos ( $F=1.18$ ,  $P=0.183$ ).

**IL-10:** Con respecto a los niveles de IL-10, se encontró una mayor concentración de esta citocina en los ratones DI y SI registrándose 196.5 y 144.6 pg/ml, respectivamente; valores considerablemente mayores que 49.20 pg/ml detectados en los ratones SS (Figura 5c). Respecto a la concentración de esta citocina a través del tiempo se observó que solamente el grupo de SI la mediana de la concentración de IL-10 tuvo un incremento importante 24 h PI (Figura 6c), concentración que descendió de manera sustancial 48 h después de la inoculación con estas amibas. El análisis de varianza utilizado no mostró diferencias significativas entre grupos ( $F=1.72$ ,  $P=0.200$ ), ni entre tiempos ( $F=0.92$ ,  $P=0.418$ ).

**IL-1 $\beta$**  La concentración de esta citocina fue ligeramente mayor en los grupos de ratones en lo que se indujo la diabetes (DI y DS) con respecto al grupo de ratones SS, registrándose en el grupo DI 78.36 pg/ml, mayor que 22.36 pg/ml registrados en los ratones SS (Figura 5d). Sin embargo, la mediana de la concentración de IL 1 $\beta$  no mostró diferencias importantes tras la inoculación de los animales de estos grupos (DI versus DS y SI versus SS). A través del tiempo (Figura 6d) en el grupo DI la concentración de esta citocina se mantuvo elevada durante los 3 tiempos evaluados, no así en los ratones SI en lo que se mostró un pico 24 hrs PI, con un marcado descenso en los 2 tiempos posteriores

A través del análisis de varianza realizado no se encontraron diferencias significativas entre grupos ( $F=1.62$ ,  $P=0.221$ ), ni entre tiempos ( $F=0.45$ ,  $P=0.648$ ).

**IL-2:** Respecto a los niveles de IL-2 en los diferentes grupos, se observó un incremento mayor en la concentración de ésta en los ratones SI comparado con el grupo de ratones SS, registrándose en los grupos de SI una concentración de 46.44 pg/ml, respectivamente; mientras que los ratones SS alcanzaron apenas 17.12 pg/ml (Figura 5e). Con relación a la expresión de esta citocina a través del tiempo (Figura 6e) se observó



que la concentración se mantuvo semejante en los ratones diabéticos (DI y DS), no así en el grupo SI en los que 24 h después del reto con amibas se dio un incremento importante, después un descenso hasta los niveles basales a las 48 h con un ligero incremento en las siguientes horas.

El análisis de varianza utilizado no mostró diferencias significativas entre grupos ( $F=3$ ,  $P=0.060$ ), ni entre tiempos ( $F=2.85$ ,  $0.086$ ).

**IL-4:** La comparación de los niveles de IL-4 en los diferentes grupos, permitió observar una mayor concentración de ésta en los ratones DI, SI y DS con respecto al grupo de SS, encontrando que los ratones infectados tuvieron las concentraciones más altas de esta citocina 129.52 y 94 pg/ml, respectivamente (Figura 5f); mayor que 35.16 pg/ml registrados en los ratones SS. La concentración de esta citocina a través del tiempo (Figura 6f) se mantuvo sin cambios significativos, solamente en el grupo DI se presentó un aumento en su concentración en los valores máximos detectados, no así en la mediana del grupo.

En el análisis de varianza realizado no se encontraron diferencias con significancia estadística entre los grupos ( $F=2.86$ ,  $P=0.068$ ), ni entre tiempos ( $F=1.33$ ,  $0.291$ ).

**IL-5:** Con relación a los niveles de IL-5, se observó la misma tendencia que para las otras citocinas, una mayor concentración en los ratones DI, SI y DS con valores máximos de 354.7 y 216.2 pg/ml, para los dos primeros grupos, considerablemente mayor que 69.9 pg/ml de los ratones SS (Figura 5g). Con respecto a la concentración de IL-5 a través del tiempo (Figura 6g) se encontró que disminuyó un poco en los grupos de ratones infectados con amibas, no así en los ratones diabéticos no infectados (DS), en los que la concentración se mantuvo semejante.

Los resultados del análisis de varianza no mostraron diferencias significativas entre grupos ( $F=1.53$ ,  $P=0.242$ ), ni entre tiempos ( $F=2.05$ ,  $0.160$ ).

**TNF- $\alpha$ :** El TNF- $\alpha$ , fue la citocina en la que se registraron las mayores concentraciones en el estudio, con valores medios entre 912 pg/ml en los ratones SS y 2173 pg/ml en los diabéticos infectados (DI); y con valores máximos que alcanzaron 6533 y 3585 pg/ml en los ratones DI y SI (Figura 5h), respectivamente. Finalmente, con respecto a la expresión de las citocinas evaluadas en suero, observamos que la mediana de los niveles de TNF- $\alpha$

fue semejante en los tres tiempos evaluados (Figura 6h), sin embargo, en algunos ratones diabéticos que fueron infectados si se exacerbó la respuesta 48 y 72 h después de la inoculación con *A. castellanii*. No obstante, el análisis de varianza realizado no mostró diferencias significativas entre grupos ( $F=1.68$ ,  $P=0.209$ ), ni entre tiempos ( $F=0.61$ ,  $p=0.555$ ).

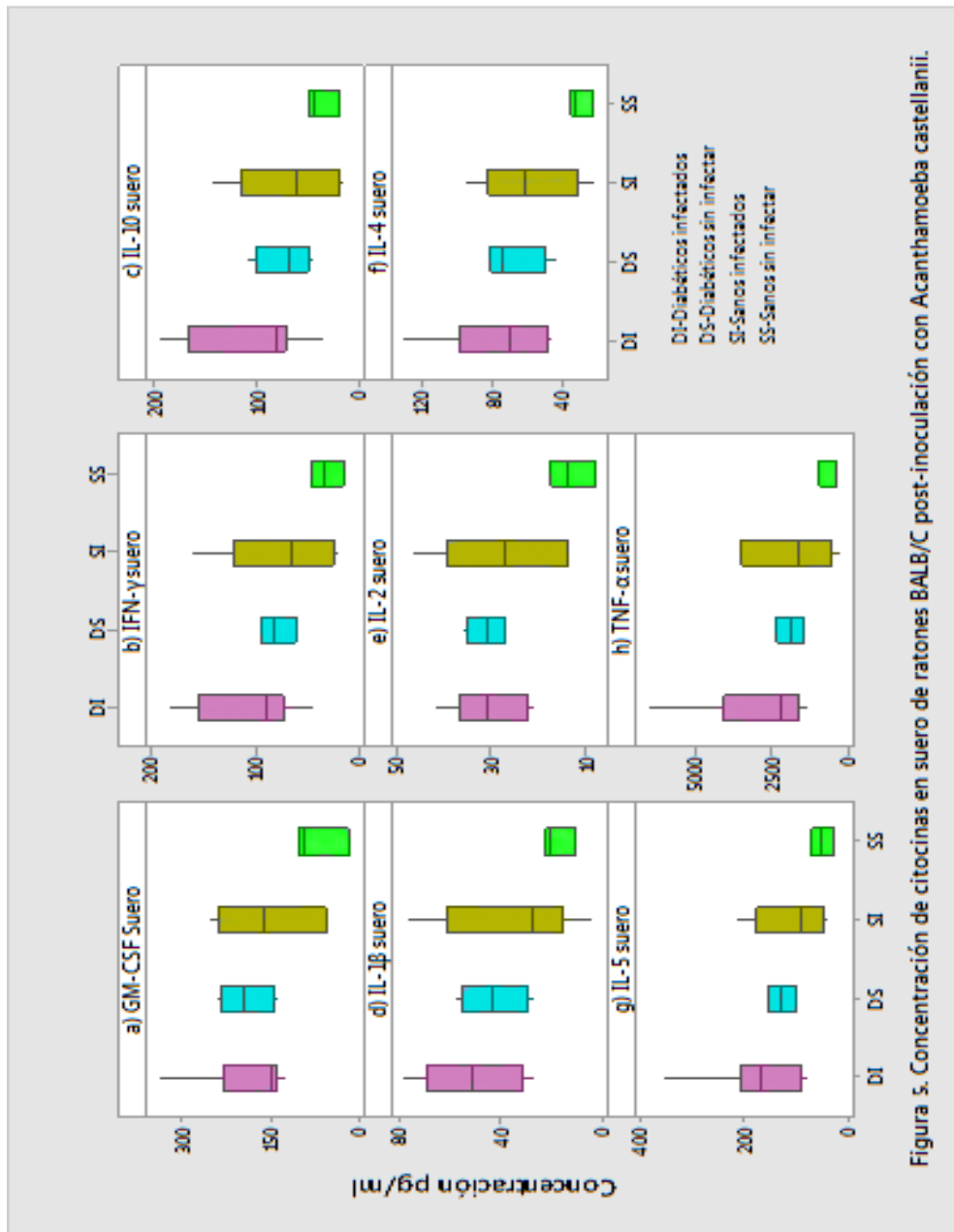


Figura 5. Concentración de citocinas en suero de ratones BALB/C post-inoculación con *Acanthamoeba castellanii*.

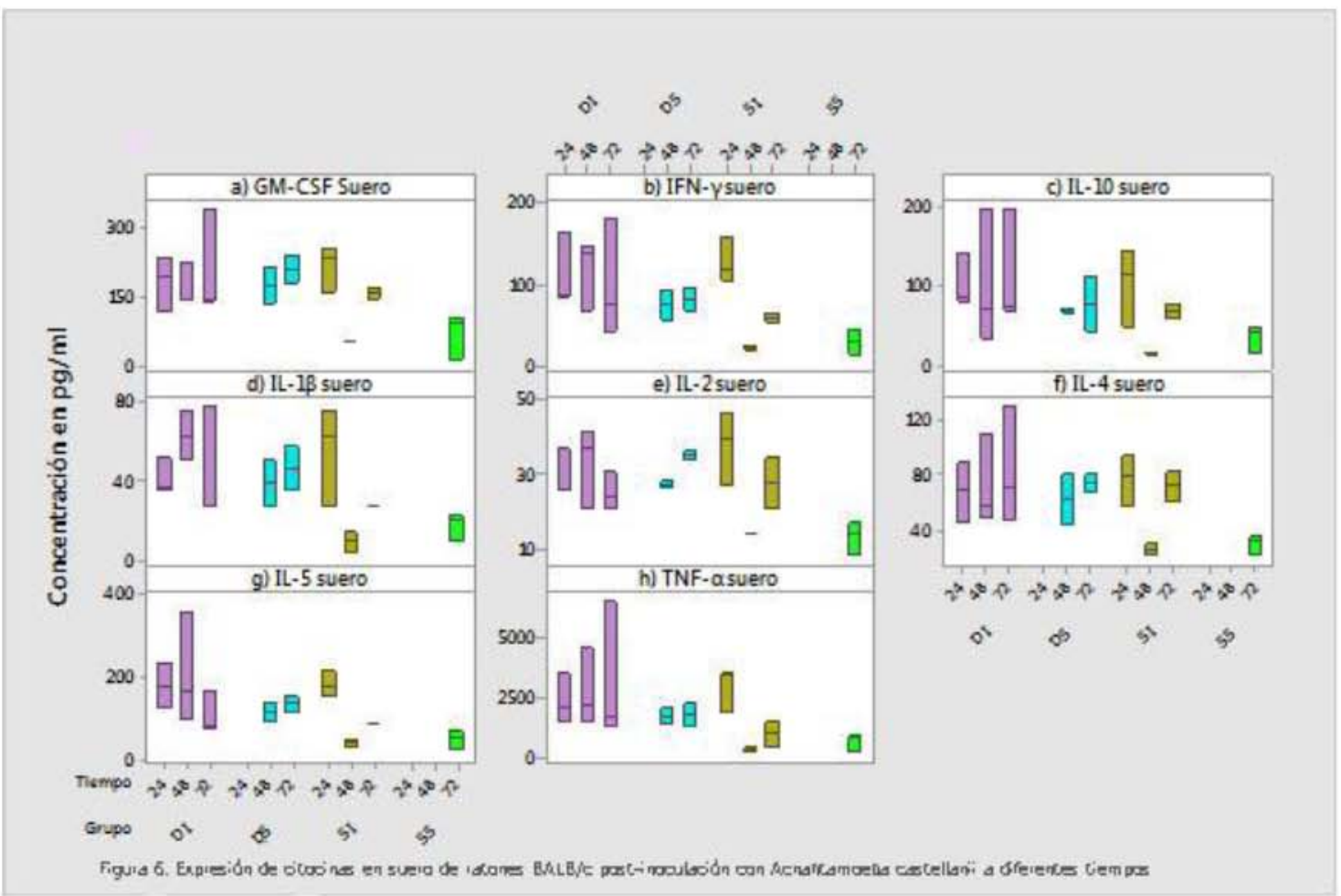


Figura 6. Expresión de citocinas en suero de ratones BALB/c post-inoculación con *Acanthamoeba castellanii* a diferentes tiempos

### **8.5 Hallazgos histopatológicos**

Los resultados del análisis histopatológico de la invasión de *A. castellanii* inoculada vía intranasal en ratones diabéticos y sanos se presenta a continuación: En el grupo de ratones DI el tejido presentó a las 24 h PI fibras axonales abiertas, así como presencia de macrófagos; a las 48 h PI se encontró apertura del neuropilo en bulbo olfatorio continua al parénquima cerebral, así como cambios en espacio de Virchow Robin y a las 72 h PI inflamación de la mucosa a expensas de polimorfonucleares (Figura 7A). Sin embargo, solo se inmunolocalizaron trofozoítos en la lengua después de 48h de la inoculación y sin presencia de inflamación en esta zona (Figuras 7D y 7E). Es importante mencionar que en los ratones DS también se observaron cambios histopatológicos como infiltrado inflamatorio perivascular, hipertrofia y vacuolización en la región cortical de plexos coroides, ligero edema y apertura discreta del neuropilo (Figuras 7B y 7C).

En los tejidos del grupo de ratones SI se encontraron los siguientes cambios microscópicos: 24 h PI se detectó pérdida de neuropilo y edema generalizado en bulbo olfatorio (Figura 8A), 48 h PI se encontró una ligera apertura del neuropilo generalizada en tejido encefálico (Figura 8B), y después de 72 h de la inoculación, una apertura del neuropilo en bulbo olfatorio (Figura 8C), además se inmunolocalizaron trofozoítos a las 24 h PI en espículas óseas del macizo facial y estroma de los cornetes con un infiltrado inflamatorio (Figura 8D); 72 h PI continúan trofozoítos en el estroma de la mucosa de los cornetes (Figura 8E), y en bulbo olfatorio a nivel de la lámina cribosa del etmoides y en los fascículos nerviosos, con un mínimo infiltrado inflamatorio adyacente periférico al parásito (Figura 8F).

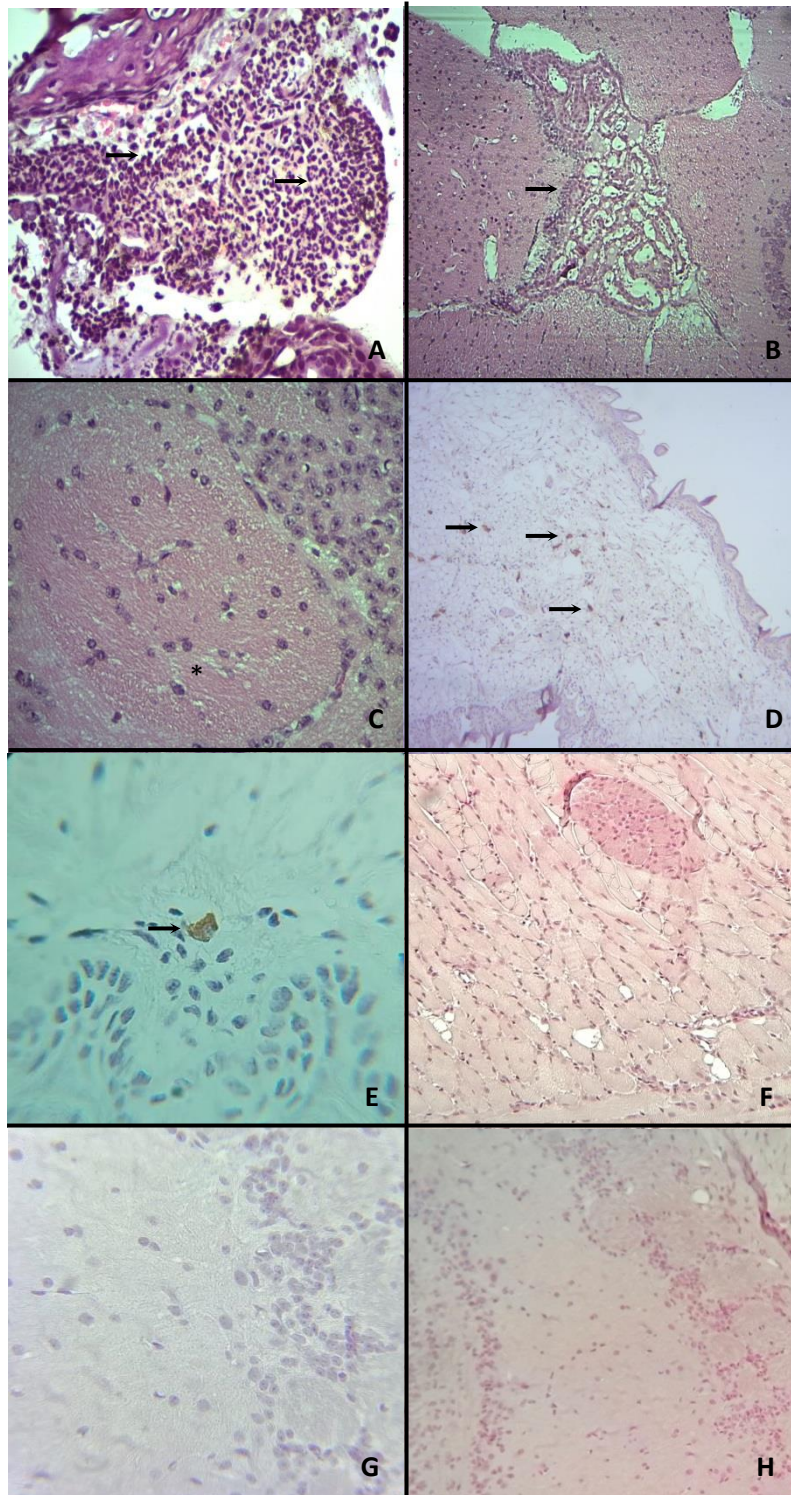


Figura 7. Hallazgos histopatológicos de ratones diabéticos. A) DI 72 h PI inflamación de la mucosa a expensas de polimorfonucleares (Flechas) 40x HyE. B,C) Ratones DS: infiltrado inflamatorio perivascular, hipertrofia y vacuolización en la región cortical de plexos coroides (Flechas), ligero edema y apertura discreta del neuropilo (\*) HyE. D) DI48h PI Trofozoitos en la lengua sin presencia de inflamación en esta zona (Flechas) 10x IHQ. E) Trofozoitos en la lengua sin presencia de inflamación 40x IHQ. F). Control HyE lengua de ratón SS 40x, G) Control ratón SS Immunohistoquímica bulbo olfatorio 40x. H) Control ratón SS bulbo olfatorio HyE 10x.



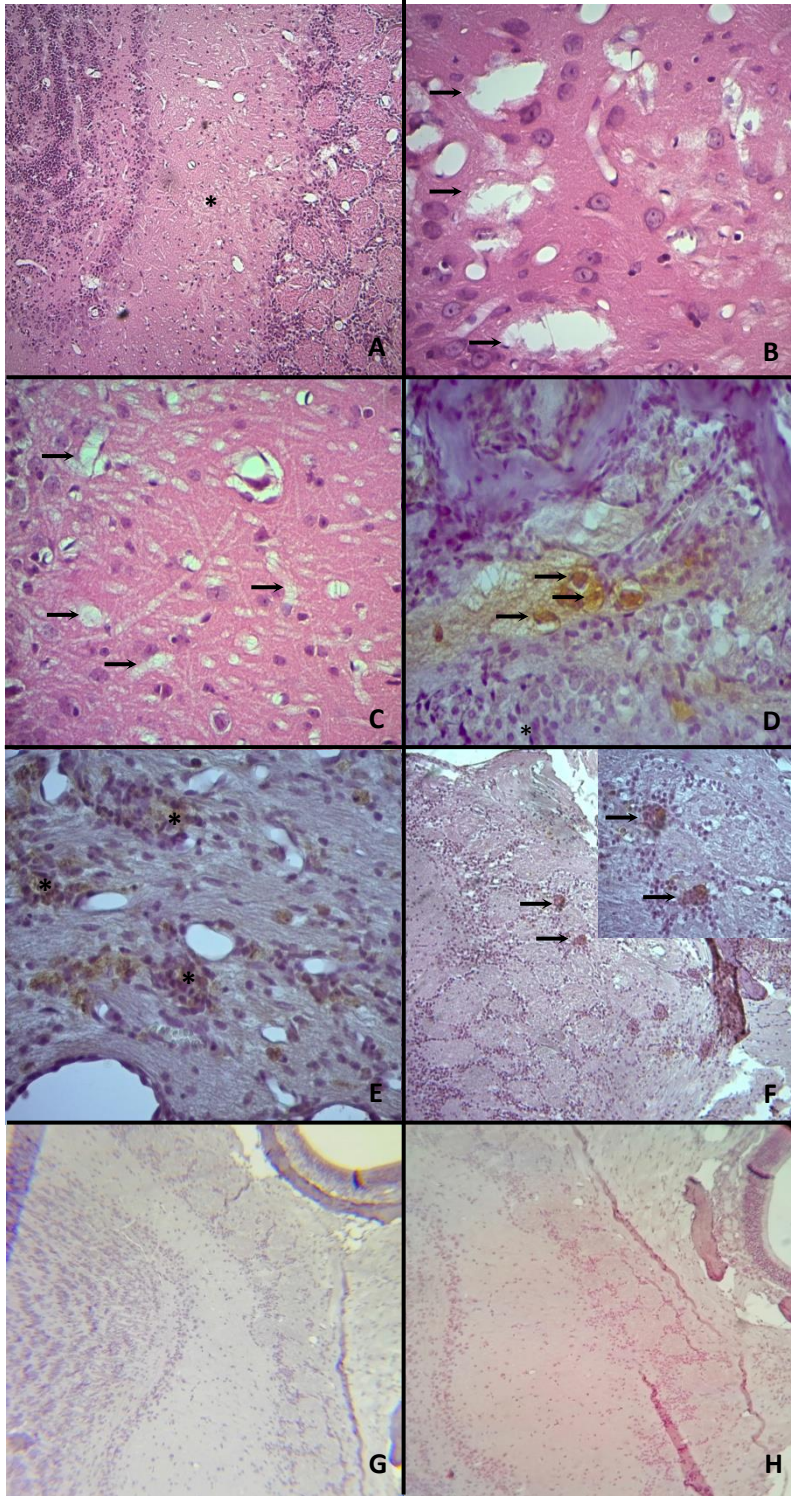


Figura 8. Hallazgos histopatológicos de ratones sanos infectados. A) S124h PI Pérdida de neuropilo y edema generalizado en bulbo olfatorio (\*) 10x HyE, B) S148h PI Ligera apertura del neuropilo generalizada en tejido encefálico (Flechas) 40x HyE, C) S172h PI Apertura del neuropilo en bulbo olfatorio (Flechas) 40x HyE, D) S124 h PI Trofozoítos en espículas óseas del macizo facial y estroma de los cornetes (Flechas) con un infiltrado inflamatorio crónico (\*) 40x IHQ, E) S172 h PI Trofozoítos en estroma de la mucosa de los cornetes (\*) 40X IHQ, F) S172h PI Trofozoítos en bulbo olfatorio a nivel de la lámina cribosa del etmoides y en los fascículos nerviosos, con un mínimo infiltrado inflamatorio adyacente periférico al parásito (Flechas) 10x IHQ, G) Control SS Inmunohistoquímica bulbo olfatorio, H) Control SS HyE bulbo olfatorio.

## 9. Discusión

Las amibas del género *Acanthamoeba* son microorganismos anfizoicos de distribución mundial, por lo que son considerados cosmopolitas, así que las posibilidades de infectarse con estas amibas podrían ser altas, sin embargo, el número de casos reportados por *Acanthamoeba* es relativamente bajo. Se sabe que las infecciones en sistema nervioso central provocadas por estas amibas están asociadas principalmente a pacientes con una deficiencia inmunológica, inmunosuprimidos o con enfermedades crónicas como la diabetes.

La diabetes mellitus, es una enfermedad crónica asociada con un incremento en el riesgo de padecer enfermedades infecciosas y sus complicaciones (Shah y Hux, 2003), como la EAG (Duma *et al.*, 1978; Borochoviz *et al.*, 1979; Tsutsumi *et al.*, 2002; Bloch y Schuster, 2005; Petry *et al.*, 2006; McKellar *et al.*, 2006; Tilak *et al.*, 2008; Kaul *et al.*, 2008; Mayer *et al.*, 2011; Satlin *et al.*, 2013; Khanna *et al.*, 2014; Salameh *et al.*, 2015; Morrisson *et al.*, 2016). Hasta el momento se sabe poco de los mecanismos que determinan la susceptibilidad o la resistencia a la infección por estas amibas, tanto en personas sanas como en los grupos de riesgo.

En este trabajo se utilizó una cepa de *A. castellanii* aislada de un caso clínico de QA mantenida en cultivo axénico, y aunque previo a esta investigación se han realizado pases en ratón para reactivar su virulencia, el mantenimiento en medio axénico lleva a la pérdida de la expresión de factores de virulencia y favorece su enquistamiento (Koehsler *et al.*, 2009). Por tanto al inicio del trabajo experimental se realizaron 2 pases seriados por ratón para reactivar su virulencia y comprobar su capacidad de establecer infecciones sistémicas después de ser inoculada vía intranasal, comprobándose que esta cepa es capaz de inducir infecciones sistémicas, diseminándose en varios órganos; aún sin causar la muerte de los animales después del período de 21 días para el que está establecida la prueba. Similarmente con estudios previos de 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). Además se sabe que *Acanthamoeba* puede ingresar al SNC migrando a través del neuroepitelio olfatorio y/o vía hematogena (Martínez, 1991; Omaña *et al.*, 2016).

Hasta el momento, se han realizado algunos trabajos para conocer los mecanismos que determinan la susceptibilidad o resistencia a la invasión durante las infecciones

provocadas por amibas del género *Acanthamoeba*. Se sabe que mientras las amibas expresan mecanismos de patogenicidad dependientes e independientes de contacto (Omaña-Molina *et al.*, 2010), el hospedero es protegido ante la infección por estas amibas, inicialmente por los mecanismos de la inmunidad innata, como el complemento y las células fagocíticas, principalmente los neutrófilos y los macrófagos, los cuales son capaces de eliminarlas (Hurt *et al.*, 2001); así como por elementos de la inmunidad adquirida como anticuerpos. También se ha reportado la expresión de TNF- $\alpha$  durante la interacción *in vitro* de *Acanthamoeba* y células de la microglía, de monocitos y macrófagos de sangre periférica de humanos, respectivamente (Shin *et al.*, 2001; Mattana *et al.*, 2016), así como de IL-6, IL-12, IL-8 y de IL-10 (Mattana *et al.*, 2016), mostrando que la producción de quimiocinas y citocinas proinflamatorias por monocitos y macrófagos pueden desempeñar un papel en el desarrollo de la respuesta inflamatoria durante las infecciones por *Acanthamoeba*.

En este trabajo se evaluó la expresión de citocinas en la fase temprana de invasión de *A. castellanii* en la mucosa nasal y a nivel sistémico en el modelo murino de EAG en individuos sanos y con una enfermedad crónica como la diabetes. Desde el tiempo más corto evaluado (24 h) se detectó la expresión de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias: GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5 y TNF- $\alpha$ , principalmente a nivel sistémico.

A nivel local, en los sitios donde las amibas entran en contacto con los tejidos del hospedero se inicia la respuesta inmune estimulando los mecanismos de control innatos, las concentraciones de estas citocinas en las muestras de lavados nasales que se determinaron fueron en general muy bajas, incluso en aproximadamente un 30 % de las muestras que se evaluaron el resultado obtenido se indicó por debajo del valor mínimo de sensibilidad del kit utilizado. Sin embargo, y aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, se observaron ligeros incrementos en las concentraciones de algunas citocinas en los grupos de animales que fueron infectados con amibas, por ejemplo, GM-CSF, IL-1 $\beta$  e IL-5 con actividad proinflamatorias e IL-10 con actividad reguladora.

En las muestras de lavado nasal se observó un incremento en la concentración del GM-CSF a través del tiempo en los grupos DI y SI, siendo en los DI en los que se presentaron los niveles más altos con respecto al control (SS). Esta citocina estimula el desarrollo y la



maduración de las células mieloides (Hamilton y Anderson, 2004); y su señalización puede conducir a la producción de mediadores inflamatorios a nivel de mucosas (McDermott *et al.*, 2014). La inflamación de la mucosa, especialmente durante las infecciones bacterianas agudas, implica la activación de numerosas vías de inmunidad innata como la activación de macrófagos que pueden proteger al hospedero de patógenos respiratorios, además de que aumenta la supervivencia de neutrófilos, monocitos/macrófagos, y la producción de quimiocinas y mediadores proinflamatorios en estas células, lo que da como resultado la expresión de citocinas inflamatorias, que incluyen TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\gamma$ , así como factores quimiotácticos de leucocitos (Fournier y Parkos, 2012; Brazil *et al.*, 2013; Szabady y McCormick, 2013). Con respecto a IL-1 $\beta$  esta citocina también aumentó 24 h PI en los ratones de los grupos infectados, misma que disminuyó en tiempos posteriores hasta una concentración semejante al grupo SS, comportamiento que concuerda con la estimulación de IL-10 a través de los tiempos evaluados. IL-1 $\beta$  es una potente citocina proinflamatoria producida y secretada por varios tipos celulares, aunque la mayoría de los estudios se han centrado en su producción dentro de las células del sistema inmune innato, como los monocitos y macrófagos (López-Castejón y Brough, 2011). Su papel es muy importante en la respuesta inmune del hospedero a las infecciones (Dinarello, 1996), ejerciendo su acción protectora contra las infecciones al activar varias respuestas como: el reclutamiento rápido de neutrófilos a sitios inflamatorios, la activación de las moléculas de adhesión endotelial, la inducción de citocinas y quimiocinas y de la respuesta febril (Sahoo, *et al.*, 2011). Se ha reportado como protector en varios modelos de infección bacteriana, viral y micótica (Sahoo *et al.*, 2011), pero también se ha confirmado que tiene un alto potencial para causar daño a los tejidos del huésped por lo que, varios mecanismos están dedicados a controlar su actividad: intracelularmente, limitando cuidadosamente su transcripción y procesamiento por el inflamasoma, y extracelularmente por inhibición de la señalización del receptor (Schultz *et al.*, 2003).

Con respecto a IL-10, considerada como un factor inhibidor de síntesis de citocinas (Murphy y Weaver, 2016), se puede observar que en los grupos DI y SI a las 24h PI sus niveles son ligeramente elevados con respecto al grupo SS, y citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-4 tuvieron concentraciones semejantes al grupo SS o por debajo de este. Mattana y colaboradores (2016) reportaron la estimulación de IL-10 *in vitro* tras la interacción de macrófagos de sangre periférica con trofozoítos de *Acanthamoeba* y sugiere que la

producción de esta citocina puede desempeñar un papel en el desarrollo de la respuesta inflamatoria durante las infecciones por *Acanthamoeba*.

No obstante, se requiere de más estudios para determinar con mayor precisión que citocinas se expresan a nivel de la mucosa y de los tejidos de la cavidad nasal durante la invasión de amibas del género *Acanthamoeba* inoculadas vía intranasal, debido a que la concentración de éstas en las muestras obtenidas a partir de lavados de la cavidad nasal en este trabajo están diluidas.

A nivel sistémico, como se mencionó previamente, se detectó una tendencia de incremento de la concentración de las diferentes citocinas evaluadas tras la inoculación con amibas, principalmente en el grupo de ratones SI desde el primer tiempo evaluado (24 h), sin observarse diferencia estadísticamente significativa. Es importante mencionar que también algunos de los ratones del grupo DI mostraron un incremento significativo en los niveles de citocinas post infección. Sin embargo, en este grupo se presentó una mayor variabilidad en la respuesta individual, lo cual podría estar relacionado con los niveles de glucosa que presentaban individualmente estos ratones.

Interesantemente, en el grupo de ratones diabéticos que no fueron infectados (DS) las concentraciones en general de las citocinas evaluadas, también fueron superiores a las de los ratones sanos sin infectar (SS), y en algunos casos semejantes a los grupos de ratones infectados, lo que puede deberse al estado proinflamatorio basal reportado en los individuos diabéticos y que podría asociarse a una mayor susceptibilidad a las infecciones (Shah y Hux, 2003), como la EAG (Duma *et al.*, 1978; Borochovizt *et al.*, 1979; Tsutsumi *et al.*, 2002; Bloch y Schuster, 2005; Petry *et al.*, 2006; McKellar *et al.*, 2006; Tilak *et al.*, 2008; Kaul *et al.*, 2008; Mayer *et al.*, 2011; Satlin *et al.*, 2013; Khanna *et al.*, 2014; Salameh *et al.*, 2015; Morrisson *et al.*, 2016). Se sabe que el estado hiperglucémico es proinflamatorio (Nishikawa *et al.* 2000; Nedrebo *et al.* 2004), las citocinas y las quimiocinas secretadas por el tejido adiposo son la fuente más grande de factores que conducen a la inflamación sistémica (Chen, 2006); así como la acumulación de células inmunitarias innatas activadas en los tejidos metabólicos, que promueven la resistencia sistémica a la insulina y el daño de las células  $\beta$  (Pozzilli y Guglielmi, 2009; Wilkin, 2009), lo que afecta la concentración de glucosa y de las diferentes citocinas según la variabilidad en la respuesta inmune del hospedero .

La única citocina en la que las diferencias en la concentración fueron significativas fue el GM-CSF. Su concentración se incrementó principalmente en los ratones SI 24 h PI, y la concentración mayor se presentó en DI 72 h PI. Este factor de crecimiento hematopoyético es capaz de estimular la supervivencia, proliferación, diferenciación y función *in vitro* de células mieloides y sus precursores (Wen-Chao *et al.*, 2014), y como se mencionó previamente ejerce un papel proinflamatorio importante.

El IFN- $\gamma$  es una citocina proinflamatoria secretada principalmente por las células T, natural killer (NK) y neutrófilos. En nuestro estudio aumentó su concentración en los grupos de ratones infectados principalmente 24h PI, observándose el mayor incremento en los SI. Esta citocina desempeña el papel de inductor en la respuesta inmunitaria adaptativas contra las infecciones por protozoos (Machado *et al.*, 2004), además tiene una amplia gama de efectos inmunomoduladores tanto en la inmunidad innata como en la adquirida. Se ha demostrado que IFN- $\gamma$  regula la sobreexpresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) I y II y activa macrófagos (Farrar y Schreiber, 1993). Asimismo, desempeña un papel fundamental en la resistencia del hospedero a la infección *por Leishmania*. Contrariamente, IL-4 regula la producción de ROS y controla la respuesta antipatogénica mediada por el hospedero (Muller *et al.*, 2001). Recientemente Moraes *et al.* (2015) evaluaron el efecto de esta citocina sobre monocitos de sangre humana en interacción con *Entamoeba histolytica* y reportaron que el IFN- $\gamma$  aumentó la actividad amebicida y la apoptosis.

Con respecto a IL-1 $\beta$  se observa que su concentración en suero del grupo SI aumentó también 24 h PI, misma que disminuye en el tiempo posterior a la concentración basal. Esta citocina, como se mencionó previamente tiene una actividad proinflamatoria importante, produciendo fiebre y activando macrófagos y células T (Murphy y Weaver, 2016).

La IL-5 fue una de las citocinas con mayor aumento en su concentración en ambos grupos de ratones infectados (SI y DI) encontrándose detrás del TNF- $\alpha$  y el GM-CSF, esta citocina es una glicoproteína homodimérica interdigitante producida por células hematopoyéticas como células T, mastocitos y eosinófilos (Busse *et al.*, 2013), y por las células linfoides innatas 2 (ILC2) (Murphy y Weaver, 2016). ILC2 son linfocitos que carecen de receptores de reconocimiento de antígenos y se activan en respuesta a citocinas y a través de receptores de patrones moleculares asociados a microorganismos

(MAMP). Las ILC se localizan preferentemente en las mucosas, y participan en la respuesta inmune contra infecciones y en enfermedades inflamatorias crónicas. Las ILC-2 expresan GATA3, producen IL-4, IL-5, IL-13 y anfirregulina y protegen contra infecciones parasitarias activando una respuesta análoga a la estimulada por los linfocitos T cooperadores (Th2); además, las ILC-2 también presentan péptidos a través del MHC-II a los linfocitos T y favorecen su diferenciación a linfocitos Th2, los cuales participan en la respuesta antiparasitaria (Furusawa *et al.*, 2013; Maizels y Withers, 2014). Sabin *et al.* desde 1996 demostraron que IL-5, juega un papel importante en la inmunidad a nivel de mucosa, ya que esta induce una respuesta Th2 a través de los eosinófilos que liberan IL-4 tempranamente durante la infección por *Schistosoma mansoni*. En particular, se ha demostrado que la IL-5 actúa en “sinergia” con IL-2 e IL-4 para inducir la producción de anticuerpos por las células B (Griffin *et al.*, 1994). También se ha documentado que en el modelo murino de infección con *Toxoplasma gondii*, las ILC participan en la eliminación del parásito a través de la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Klose *et al.*, 2014).

TNF- $\alpha$  es la citocina que aumentó más su concentración sérica después de la infección de los ratones con *A. castellanii*, manteniéndose elevada en algunos individuos del grupo DI y reduciendo su concentración en los SI a través del tiempo. Este factor es un componente clave de la respuesta inflamatoria que conduce al daño tisular (Ehlers *et al.*, 2001; Olsen y Estein, 2004); se ha reportado que los niveles elevados de TNF- $\alpha$  están relacionados con una inflamación excesiva con necrosis y caquexia (Bekker *et al.*, 2000; Ehlers *et al.*, 2001), además de promover la inmunopatología al interferir con los procesos de muerte celular y la inducción de un medio hiperinflamatorio (Solovic *et al.*, 2010). TNF- $\alpha$  desempeña múltiples actividades biológicas, tanto en la inflamación como en la regulación de la respuesta inmune, (Jaattela, 1991) innata y en la adaptativa, la proliferación celular y los procesos apoptóticos (Solovic *et al.*, 2010) y coordina la respuesta inflamatoria a través de la inducción de otras citocinas (IL-1 e IL-6), al igual que el reclutamiento de células inmunitarias e inflamatorias a través de la inducción de quimiocinas y suprarregulación de moléculas de adhesión (Nova *et al.*, 2012). TNF- $\alpha$  es producido por diferentes tipos celulares, como macrófagos, neutrófilos, monocitos, células T, células de músculo liso, adipocitos y fibroblastos (Olsen y Stein, 2004; Nova *et al.*, 2012). La disminución de esta citocina 48 PI en los SI podría obedecer a una regulación antagónica de las ILC2 que estimulan una respuesta tipo Th2 o bien por la presencia de IL-10. Mattana *et al.* (2016) reportaron la estimulación de IL-10 *in vitro* en macrófagos

humanos de sangre periférica sugiriendo que puede ser estimulada por *Acanthamoeba* para regular el estado inflamatorio y por tanto favorecer su invasión a los tejidos.

La IL-2 (factor de crecimiento de células T) es una citocina en la que su producción en mamíferos está estrictamente regulada y restringida a células T CD4<sup>+</sup>; aunque también se ha reportado que es secretada por células TCD8<sup>+</sup>, NK, NKT, células dendríticas y mastocitos; sin embargo, en niveles considerablemente más bajos (Feau *et al.*, 2011; Granucci *et al.*, 2001). En la activación inmune del receptor de células T (TCR) por antígenos presentados a través de las células presentadoras de antígeno y las señales coestimuladoras, las células T empiezan a secretar una gran cantidad de esta citocina (Arenas-Ramírez *et al.*, 2015; Mitra y Leonard, 2018). La expresión de esta citocina en nuestro trabajo, de la misma manera que IL-4, se dio principalmente en el grupo de ratones SI 24 h PI. IL-2 tiene una gran variedad de acciones incluida la capacidad de estimular la actividad citolítica de las células NK y células T, aumentar la producción de inmunoglobulinas por las células B activadas, mantener la proliferación homeostática de las células T reguladoras (Treg), induce las ILC y la diferenciación de células T efectoras (Wang y Secombes, 2013; Arenas-Ramírez *et al.*, 2015). En la diferenciación de células Th, IL-2 modula la expresión de receptores para otras citocinas y factores de transcripción, promoviendo o inhibiendo cascadas de citocinas que se correlacionan con el desarrollo de las células Th (Liao, Lin y Leonard, 2011). Por lo tanto, IL-2 promueve la diferenciación de células T vírgenes en células Th1 y Th2 mientras inhibe el desarrollo de Th17 (Liao, Lin y Leonard, 2013; Wang y Secombes, 2013). La interleucina-4 (IL-4) es una glicoproteína compleja producida principalmente por mastocitos, células T activadas y ILC2, eosinófilos y neutrófilos. IL-4 actúa sobre los linfocitos B, monocitos, células dendríticas y fibroblastos (Chomarat y Banchereau, 1997).

Finalmente, respecto a IL-10 su concentración también se incrementó tras la inoculación con amibas en los grupos DI y SI, manteniéndose la concentración elevada en algunos individuos del grupo DI hasta las 72 h, no así en los SI donde se presentó una clara disminución de su concentración en los tiempos posteriores. Esta citocina es producida por distintos tipos de leucocitos y células no hematopoyéticas (Shouval *et al.*, 2014), en la que su mecanismo de inducción varía ampliamente dependiendo de la naturaleza del estímulo (Zhang *et al.*, 2009; Cherie y Oldstone, 2012), su secreción se desencadena muy pronto después de la participación de los receptores de reconocimiento de patógenos

(PRR) por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o patrones moleculares asociados a daños (DAMPs) (Zhang *et al.*, 2009; Peñaloza *et al.*, 2015); esta citocina es una molécula inmunorreguladora clave durante la infección con virus, bacterias, hongos, helmintos y protozoos, que bloquea la proliferación de linfocitos estimulados por Th1 y detiene la producción de citocinas proinflamatorias que son responsables de gran parte de la inmunopatología asociada con infecciones (Gazzinelli *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 2006).

Con respecto al análisis histopatológico de la invasión amibiana en concomitancia con diabetes encontramos, contrario a lo esperado, mayor inflamación e invasión en los ratones SI que en los DI; contradictorio a lo reportado por Omaña y colaboradores (2017) y Hassanain y colaboradores (2014), donde encontraron que individuos diabéticos, o con hiperglucemia fueron más susceptibles a la infección con *A. culbertsoni* y *Toxoplasma gondii*, respectivamente.

Aunque se inmunolocalizaron trofozoítos en el tejido de los ratones SI hasta las 72 h PI, se evidencia un proceso inmunológico competente ya que se observa la presencia de infiltrado inflamatorio e incluso macrófagos rodeando al parásito. Como se ha reportado los macrófagos son capaces de matar a *Acanthamoeba* (Hurt *et al.*, 2001), pero también se ha demostrado que persisten en el sitio de la infección (Larkin y Easty, 1991; Knickelbein *et al.*, 2013) y, por lo tanto, no solo pueden participar en el inicio y mantenimiento de una respuesta inmune efectiva, sino que pueden tener un papel en la reparación del tejido (Mosser y Edwards, 2008). Además, con respecto a la infección por *A. castellanii* en ambos grupo (DI y SI) encontramos en los ratones SI que las amibas alcanzaron el bulbo olfatorio después de 72 h PI, además de encontrarse en el epitelio respiratorio de la cavidad nasal e invadir el macizo facial; mientras que en los DI las amibas solamente fueron inmunolocalizadas en el músculo de la lengua, Omaña y colaboradores (2017) reportaron que en ratones diabéticos, *A. culbertsoni* alcanzó el bulbo olfatorio, el córtex central subcortical, la base del encéfalo y la capa granular del cerebelo 72 h PI. Este aumento en la susceptibilidad podría estar asociada a un mayor deterioro en el organismo de los ratones relacionada a niveles de glucemia más altos reportados por Omaña-Molina que los reportados en nuestro estudio; y estos niveles de glucosa podrían asociarse también a mayor daño previo en el tejido.

Nuestros resultados sugieren que la invasión vía IN de *A. castellanii* en ratones sanos y diabéticos estimula localmente una respuesta inflamatoria en la que se estimulan los

neutrófilos, células NK e ILC2 y la producción principalmente de citocinas como el GM-CSF, IL-1 $\beta$ , además de IL-5 con actividad proinflamatoria, e IL10, reguladora. Vía sistémica las células presentadoras de antígenos llegan a los ganglios linfáticos cercanos donde inician una respuesta inmune antagonica en la que se estimulan la producción, tanto de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ , antiinflamatorias como IL-5, IL-4 e IL-2 e incluso IL-10 con actividad reguladora, desde las 24 h PI, las cuales disminuyen su concentración en los siguientes tiempos evaluados. La aparente modulación de la respuesta inmune, quizá por la participación de *A. castellanii*, podría favorecer la infección por estas amibas a SNC a través de su invasión sin la presencia de un proceso inflamatorio importante, reportado previamente en este modelo animal.

## 10. Conclusiones

La infección intranasal de *A. castellanii* en ratones BALB/c sanos y diabéticos incrementó los niveles séricos de las citocinas proinflamatorias GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 y TNF- $\alpha$ , antiinflamatorias IL-5 e IL-4 y con actividad reguladora IL-10.

La concentración de las citocinas determinadas en las muestras de lavados nasales fueron muy bajas, registrándose solamente ligeros incrementos del GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-5 e IL-10 en los grupos de animales que fueron infectados con amibas.

Los hallazgos histopatológicos mostraron una mayor invasión de *A. castellanii* en los ratones SI observándose las amibas en el epitelio respiratorio, el macizo facial y en bulbo olfatorio.

En los ratones diabéticos infectados *A. castellanii* fue inmunolocalizada solamente en el músculo de la lengua.

Los ratones con DM inducidos con Estreptozotocina no fueron más susceptibles a la invasión por *A. castellanii*.

La estimulación de citocinas proinflamatorias, antiinflamatorias y reguladoras determinadas durante la fase temprana de infección de *A. castellanii* pueden estar correlacionadas y favorecer la invasión de estas amibas hasta el SNC.

## 11. Literatura citada

- Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, Mccourt RM, Mendoza L, Moestrup Ø, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF. 2005. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5): 399-451.
- Ahearn DG., Simmons RB, Ward MA, Stulting RD. 2012. Potential resistant morphotypes of *Acanthamoeba castellanii* expressed in multipurpose contact lens disinfection systems. *Eye and Contact Lens*, 38 (6):400-405.
- Alsam S, Sissons J, Jayasekera S. & Khan NA. 2005. Extracellular proteases of *Acanthamoeba castellanii* (encephalitis isolate belonging to T1 genotype) contribute to increased permeability in an in vitro model of the human blood-brain barrier. *J Infect*; 51(2):150-6.
- Alizadeh H, Neelam S, Niederkorn JY. 2007. Role of activated macrophages in *Acanthamoeba* keratitis. *J Parasitol*;93(5):1114-20.
- Arenas-Ramirez N, Woytschak J, Boyman O. 2015. Interleukin-2: biology, design and application. *Trends Immunol*; 36:763–77.
- Baynest HW. 2015. Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes & Metabolism*; 06 (05): 1-9.
- Bensellam M, Duvillié B, Rybachuk G, Laybutt DR, Magnan C, Guiot Y, Pouysségur J, Jonas JC. 2012. Glucose-induced O<sub>2</sub> consumption activates hypoxia inducible factors 1 and 2 in rat insulin-secreting pancreatic beta-cells. *PLoS One*; 7(1): 1-15 .
- Bekker LG, Moreira AL, Bergtold A, Freeman S, Ryffel B, Kaplan G. 2000. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. *Infect Immun*; 68(12):6954-61
- Biddick CJ, Rogern LH and Brown TJ. 1984. Viability of pathogenic and non-pathogenic free-living amoebae in long-term storage at a range of temperatures. *Appl Environ Microbiol*; 48(4):859-860.



- Bloch KC, Schuster FL. 2005. Inability to make a premortem diagnosis of *Acanthamoeba* species infection in a patient with fatal granulomatous amebic encephalitis. *J. Clin. Microbiol.* 43:3003-3006.
- Brazil JC, Louis NA, Parkos CA. 2013. The role of polymorphonuclear leukocyte trafficking in the perpetuation of inflammation during inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*; 19:1556-6.
- Borochoviz D, Martinez AJ, Patterson GT. 1981. Osteomyelitis of a bone graft of the mandible with *Acanthamoeba castellanii* infection. *Human Pathology*; 12(6), 573-576.
- Bowers B y Korn ED, 1968. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. I. The trophozoite. *J Cell Biol*; 39(1):95–111.
- Bowers B, Olszewski TE. 1983. *Acanthamoeba* discriminates internally between digestible and indigestible particles. *The Journal of Cell Biology*; 97(2), 317-322.
- Cabello-Vílchez AM. 2015. *Acanthamoeba* spp. Un agente oportunista en infecciones humanas. *Revista de Invest. Universidad Norbert Wiener*, (4) 22.
- Calvet HM, Yoshikawa TT. 2001. Infections in diabetes, *Infect Dis Clin North Am*; 15(2):407-21.
- Castrillón JC, Orozco LP. 2013. *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. *Revista chilena de infectología* ;30(2):147-55.
- Chambers J, Thompson J. 1972. A scanning electron microscopic study of the excystment process of *Acanthamoeba castellanii*. *Experimental Cell Research*, 73(2), 415-421.
- Chen H. 2006. Cellular inflammatory responses: novel insights for obesity and insulin resistance. *Pharmacol. Res*; 53: 469–477.
- Chomarat P, Banchereau J. 1997. An update on interleukin-4 and its receptor. *Eur. Cytokine Netw*; 8: 333-344
- Clarke DW, Niederkorn JY. 2006. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends Parasitol*; 22: 175–180.
- Cleland PG, Lawande RV, Onyamelukwe G, Whittle HG. 1982. Chronic amebic meningoencephalitis. *Arch. Neurol*; 39:56-57.
- Corsaro D, Walochnik J, Köhsler 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*; 114:2481–2490

- Corsaro D, Köhler M, Montalbano Di Filippo M, Venditti D, Monno R, Di Cave D, Berrilli F, Walochnik J. 2017. Update on *Acanthamoeba jacobsi* genotype T15, including full-length 18S rDNA molecular phylogeny. *Parasitol Res*; 116:1273–1284
- Cursons RT, Brown TJ, Keys EA, Moriarty KM and Till D, 1980. Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody. *Infect. Immun*; 29(2):401-407.
- Dart J, Saw V, Kilvington S. 2009. *Acanthamoeba* Keratitis: Diagnosis and Treatment Update. *Am J Ophthalmol* ; 148 (4): 487-99.
- De Jonckheere JF. 1987. Epidemiology. In: Rondanelli EG, ed. *Amphizoic amoebae. Human pathology*. Padua, Italy: Piccin Nuova Libreria: 127-47.
- Delamaire M, Maugeudre D, Moreno M, Le Goff M-C, Allannic H, Genetet B. 1997. Impaired leucocyte functions in diabetic patients, *Diabet Med*; 14 (1):29-34.
- Dinarello CA. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*; 87(6):2095-147.
- Duma, R. J., Helwig, W. B., & Martínez, A. J. (1978). Meningoencephalitis and Brain Abscess Due to a Free-Living Amoeba. *Annals of Internal Medicine*; 88(4), 468-473.
- Dryden RC, Wright SJL. 1987. Predation of cyanobacteria by protozoa. *Can J Microbiol*; 33:471-482.
- Ehlers S, Benini J, Held HD, Roeck C, Alber G, Uhlig S. 2001. Alphabeta T cell receptor-positive cells and interferon-gamma, but not inducible nitric oxide synthase, are critical for granuloma necrosis in a mouse model of mycobacteria-induced pulmonary immunopathology. *S J Exp Med*; 194(12):1847-59.
- Ehrchen JM, Roebrock K, Foell D, Nippe N, von Stebut E, Weiss JM, Münck NA, Viemann D, Varga G, Müller-Tidow C, Schubert HJ, Roth J, Sunderkötter C. 2010. Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis. *PLoS Pathog*; 29; 6(4):E1000871 1-16.
- Farrar MA, Schreiber RD. 1993. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol*; 11:571–611.

- Feau S, Arens R, Togher S, Schoenberger SP. 2011. Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8 (+) memory T cells. *Nat Immunol*; 2:908–13.
- Ferrante A, Rowan-Kelly B. 1983. Activation of the alternative pathway of complement by *Acanthamoeba culbertsoni*. *Clin Exp Immunol*; 54(2): 477-485.
- Fournier BM, Parkos CA. 2012. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol* ; 5:354-66.
- Fuerst PA, Booton GC, Crary M. 2015. Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. *J Eukaryot Microbiol*; 62:69–84
- Furman BL. 2015. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr. Protoc. Pharmacol*; 70:5.47.1-5.47.20
- Furusawa J, Moro K, Motomura Y, Okamoto K, Zhu J, Takayanagi H, Kubo M, Koyasu S. 2013. Critical role of p38 and GATA3 in natural helper cell function. *J Immunol*; 191(4):1818-1826.
- Garate M, Marchant J, Cubillos I, Cao Z, Khan N A, Panjwani N. 2006. In vitro pathogenicity of *Acanthamoeba* is associated with the expression of the mannose-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 47: 1056-62.
- Garate M, Cao Z, Bateman E, Panjwani N. 2004. Cloning and characterization of a novel mannose-binding protein of *Acanthamoeba*. *J Biol Chem*; 279: 29849-56.
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Scharon-Kersten T, Cheever A, Kuhn R, Muller W, Trinchieri G, Sher A. 1996. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . *J. Immunol*; 157: 798-805.
- Gerrard TL, Dyer DR y Mostowski HS. 1990. IL-4 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor selectively increase HLA-DR and HLA-DP antigens but not HLA-DQ antigens on human monocytes. *J Immunol*; 144 (12): 4670-4674.
- German N, Doyscher D, Rensing C. 2013. Bacterial killing in macrophages and amoeba: do they all use a brass dagger? *Future Microbiol*; 8(10):1257-64.
- Górnik K, Kuźna-Grygiel W. 2005. Histological studies of selected organs of mice experimentally infected with *Acanthamoeba* spp., *Folia Morphol*; 64 (3):161-167.

- Granucci F, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, Virzi E, Rescigno M, Moro G, Ricciardi-Castagnoli P. 2001. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol*; 2:882–8.
- Granucci F, Feau S, Angeli V, Trottein F y Ricciardi-Castagnoli P. 2003. Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming. *J Immunol*; 170: 5075-5081.
- Greub G, Raoult D. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev*; 17(2): 413-33.
- Hamilton JA, y Anderson GP. 2004. GM-CSF biology. *Growth Factors* 22,225–231
- Hawley HB, Czachor JS, Malhotra V, Funkhouser JW, and Visvesvara GS. 1997. *Acanthamoeba* encephalitis in patients with AIDS. *AIDS Reader*; 7:134-137.
- Hu KK, Boyko EJ, Scholes D, Normand E, Chen CL, Grafton J, Fihn SD. 2004. Risk factors for urinary tract infections in postmenopausal women, *Arch Intern Med*; 164(9):989-93.
- Hurt M, Apte S, Leher H, Howard K, Niederkorn J, Alizadeh H. 2001. Exacerbation of *Acanthamoeba* keratitis in animals treated with anti-macrophage inflammatory protein 2 or antineutrophil antibodies. *Infect Immun*, 69:2988–2995.
- International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas (7ed)*. 2015. (descargado de <http://www.diabetesatlas.org/>)
- Iovieno A, Ledee D, Miller D, Alfonso E. 2010. Detection of Bacterial Endosymbionts in Clinical *Acanthamoeba* Isolates. *Ophthalmology*; 117(3): 445–52.
- Jaattela M. 1991. Biology of disease: biologic activities and mechanisms of action of tumor necrosis factor- $\alpha$ /cachectin. *Lab. Invest*;64: 724-42.
- Kadlec V. 1978. The occurrence of amphizoic amebae in domestic animals. *J. Protozool.* 25, 235–237.
- 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
- Kaul D, Lowe L, Visvesvara G, Farmen S, Khaled Y, Yanik G. 2008. *Acanthamoeba* infection in a patient with chronic graft-versus-host disease occurring during treatment with voriconazole. *Transplant Infectious Disease*; 10(6): 437-441.

- Khan N A. Pathogenicity, morphology, and differentiation of *Acanthamoeba*. *Curr Microbiol* 2001; 43(6): 391-5.
- Khan NA. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev*; 30: 564-95.
- Khanna V, Shastri BA, Anusha G, Mukhopadhyay C, Khanna R. 2014. *Acanthamoeba* meningoencephalitis in immunocompetent: A case report and review of literature. *Trop Parasitol*; 4(2):115-118.
- Kilvington S. 1969. Moist-heat disinfection of pathogenic *Acanthamoeba* cyst. *Lett Appl Microbiol*; 9:187-189.
- Kilvington S. 1990. Activity of water biocide chemicals and contact lens disinfectants on pathogenic free-living amoebae. *Int Biodeterioration*; 26:127-128.
- Kilvington S, Beeching JR, White DG. 1991. Differentiation of *Acanthamoeba* strains from infected corneas and the environment using restriction endonuclease digestion of whole cell DNA. *J. Clin. Microbiol.* 29, 310-314.
- Kingston D, Warhust DC. 1969. Isolation of amoebae from the air. *J Med Microbiol*; 2(1):27-36.
- Kim KH, Shin CO, Im K. 1993. Natural killer cell activity in mice infected with free-living amoeba with reference to their pathogenicity. *Kor. J. Parasitol.*, 31(3):239-248.
- Klose CSN, Flach M, Möhle L, Rogell L, Hoyler T, Ebert K, Fabiunke C, Pfeifer D, Sexl V, Fonseca-Pereira D, Domingues RG, Veiga-Fernandes H, Arnold SJ, Busslinger M, Dunay IR, Tanriver Y, Diefenbach A. 2014. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell.* ;157(2):340-356.
- Knickelbein JE, Kovarik J, Dhaliwal DK, Chu CT. 2013. *Acanthamoeba* keratitis: a clinicopathologic case report and review of the literature. *Hum Pathol* 44:918–922.
- Koehsler M, Leitsch D, Duchêne M, Nagl M, Walochnik J. 2009. *Acanthamoeba castellanii*: growth on human cell layers reactivates attenuated properties after prolonged axenic culture. *FEMS Microbiol Lett* 299:121–127.
- Kong H, Shin J, Yu H, Kim J, Hahn T, Hahn Y, Chung D. 2002. Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and 18S Small-Subunit Ribosomal DNA PCR-RFLP Analyses of *Acanthamoeba* Isolated from Contact

- Lens Storage Cases of Residents in Southwestern Korea. *Journal of Clinical Microbiology*; 40(4), 1199-1206.
- Korn ED, Olivecrona T. 1971. Composition of amoeba plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 45(1):90–97.
  - Korn ED, Dearborn DG, Wright PL. 1974. Lipophosphoglycan of the plasma membrane of *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem*; 249:3335–3341.
  - Kudo RR. 1969. *Protozoologia*. Continental, Mexico; 905 pp.
  - Kyle DE, Noblet GP. 1985. Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes. *J Protozool* ;32:99-105
  - Kyle DE, Noblet GP. 1986. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. I. Willard's Pond. *J Protozool*; 33:422.
  - Kyle DE, Noblet GP. 1987. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. II. Lake Issaqueena. *J Protozool* ;34:10-5
  - Lalitha MK, Anandi V, Srivastava A, Thomas K, Cherian AM, Chandi SM. 1985. Isolation of *Acanthamoeba culbertsoni* from a patient with meningitis. *J Clin Microbiol*;21:666–7.
  - Larkin DFP, Easty DL. 1991. Experimental *Acanthamoeba* keratitis. II. Immunohistochemical evaluation. *Br J Ophthalmol* 75:421–424.
  - Liao W, Lin JX, Leonard WJ. 2011. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol*; 23:598–604.
  - Liao W, Lin JX, Leonard WJ. 2013. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*; 38:13–25.
  - Lopez-Castejon G. y Brough D. 2011. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine & growth factor reviews*, 22(4), 189–195.
  - Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Foronda P, Martinez E, Valladares B. 2005. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitology Research*, 95(4), 273-277.
  - Ma P, Visvesvara GS, Martinez AJ, Theodore FH, Daggett P, Sawyer TK. 1990. *Naegleria* and *Acanthamoeba* Infections: Review. *Clinical Infectious Diseases*, 12(3), 490-513.
  - Machado PRL, Araújo MIAS, Carvalho L y Carvalho EM. 2004. Immune response mechanisms to infections. *Anais Brasileiros de Dermatologia*; 79(6): 647-662

- Mahmoudi M, Taghipour N, Eftekhari M, Haghighi A, Karanis P. 2012. Isolation of *Acanthamoeba* species in surface waters of Gilan province-north of Iran. *Parasitol Res*; 110(4):473-7.
- Maizels RM, Withers DR. 2014. MHC-II: a mutual support system for ILCs and T cells. *Immunity*;41(2):174-176.
- Malek TR. 2008. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol*; 26: 453-479.
- Marciano-Cabral F, Cabral G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev*; 16(1): 273-307.
- Marciano-Cabral F, Toney DM. 1998. The interaction of *Acanthamoeba* spp. with activated macrophages and with macrophage cell lines. *J Eukaryot Microbiol*; 45(4):452-8.
- Marciano-Cabral F, Puffenbarger R, Cabral GA. 2000. "The increasing importance of *Acanthamoeba* infections". *J Eukaryot Microbiol* 47(1); 29-36,
- Martinez AJ. 1980) "Primary amebic meningoencephalitis". *Neurosurgery*; 6(5), 613-614.
- Martinez AJ. 1982. "Acanthamoebiasis and immunosuppression. Case report". *J Neuropathol Exp Neurol*; 41(5), 548-557.
- Martinez AJ. 1985. *Free-Living Amebas: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology and Treatment of Disease*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Martinez AJ. 1991. Infections of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis* 13: S399–S402.
- Martinez AJ. 1993. Free-living amebas: infection of the central nervous system. *Mount Sinai J Med*; 60: 271-278.
- Martínez AJ, Visvesvara G. 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amoebas, *Brain Pathol*; 7(1): 583-598.
- Martinez MS, Gonzalez-Mediero G, Santiago P, Rodriguez de Lope A, Diz J, Conde C, Visvesvara GS. 2000. Granulomatous amebic encephalitis in a patient with AIDS: isolation of *Acanthamoeba* sp. Group II from brain tissue and successful treatment with sulfadiazine and fluconazole. *J Clin Microbiol* 38: 3892–3895.
- Mattana A, Sanna M, Cano A, Delogu G, Erre G, Roberts CW, Henriquez FL, Fiori PL, Cappuccinelli P. 2016. *Acanthamoeba castellanii* Genotype T4 Stimulates the Production of Interleukin-10 as Well as Proinflammatory Cytokines in THP-1 Cells,

Human Peripheral Blood Mononuclear Cells, and Human Monocyte-Derived Macrophages. *Infect Immun*;84 (10):2953-62.

- Mayer PL, Larkin JA, Hennessy JM. 2011. Amebic encephalitis. *Surg Neurol Int*; 2:50.
- Mc Kellar 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. *Journal of Clinical Microbiology*; 44(11): 4295-4269.
- Mitra S, Leonard WJ. 2018. Biology of IL-2 and its therapeutic modulation: mechanisms and strategies. *J Leukoc Biol*; 103(4):643–55.
- Moraes LC, França EL, Pessoa RS, Fagundes DL, Hernandez MG, Ribeiro VP, Gomes MA, Honorio-França AC. 2015. The effect of IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  in the functional activity of mononuclear cells in the presence of *Entamoeba histolytica*. *Parasit Vectors*; 8:413.
- Morrison AO, Morris R, Shannon A, Lauer SR, Guarner J, Kraft CS. 2016. Disseminated *Acanthamoeba* Infection presenting with cutaneous lesions in an Immunocompromised patient, *Am J Clin Pathol*; 145(2):266-270.
- Mosser DM, Edwards JP. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958–969.
- Müller K, van Zandbergen G, Hansen B, Laufs H, Jahnke N, Solbach W, Laskay T. 2001. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Medical microbiology and immunology*;190:73-6
- Murphy K., Weaver C. 2016. *Immunobiology*. 9<sup>a</sup> ed. Garland Science. Nueva York, Estados Unidos.
- Naguib G, Al-Mashat H, Desta T, Graves DT. 2004. Diabetes Prolongs the Inflammatory Response to a Bacterial Stimulus Through Cytokine Dysregulation. *Journal of Investigative Dermatology*; 123(1): 87-92.
- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). 2016. Worldwide trends in diabetes since 1980: A pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet* 10027: 1513-1530.



- Nedrebo T, Karlsen TV, Salvesen GS, Reed RK. 2004. A novel function of insulin in rat dermis. *J Physiol*; 559(Pt 2):583–591.
- Neff RJ, Neff RH. 1969. The biochemistry of amoebic encystment. In *Dormancy and Survival, Symposia of the Society for Experimental Biology*, Cambridge University Press, pp. 5 1-81.
- Ng CT, Oldstone MB. 2012. Infected CD8alpha- dendritic cells are the predominant source of IL-10 during establishment of persistent viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 14116–14121
- Nguyen KT, Seth AK, Hong SJ, Geringer MR, Xie P, Leung KP, Mustoe TA, Galiano RD. 2013. Deficient cytokine expression and neutrophil oxidative burst contribute to impaired cutaneous wound healing in diabetic, biofilm-containing chronic wounds. *Wound Repair Regen*;21(6):833–41.
- Niederkorn JY, Alizadeh H, Leher H, McCulley JP. 1999. The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Microb Infect*;1 (6):437–443
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*;404:787–790.
- Nova-Cavalcanti YV, Accioly-Brelaz MC, Lemoine-Neves JKA, Ferraz JC y Alves-Pereira VR. 2012. “Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the Development of Pulmonary Tuberculosis,” *Pulmonary Medicine, Pulm Med*;2012: 745-483.
- O'Dell W. 1979. Isolation, enumeration and identification of amoebae from a Nebraska lake. *J Protozool*; 26:265-9.
- Ofori-Kwakye SK, Sidebottom DG, Herbert J, Fischer EG, Visvesvara GS. 1986. Granulomatous brain tumor caused by *Acanthamoeba*. *J Neurosurg*; 64(3):505–9.
- Oliphant CJ, Barlow JL, McKenzie AN. 2011. Insights into the initiation of type 2 immune responses. *Immunology*; 134: 378–385.
- Olsen NJ, Stein CM. 2004. New drugs for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*; 350:2167-79.
- Omaña-Molina M, González-Robles A, Salazar-Villatoro LI, Lorenzo-Morales J, Cristóbal-Ramos AR, Hernández-Ramírez VI, Talamás-Rohana P, Mendez-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 Research International*; (2013), 1-13.

- Omaña-Molina, M, Hernandez-Martinez D, Sanchez-Rocha R, Cardenas-Lemus U, Salinas-Lara C, Méndez-Cruz A, Colin L, Aley-Medina P, Espinosa-Villanueva J, Moreno-Fierros L, Lorenzo-Morales J. 2016. 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.
- Omaña-Molina M, Sanchez-Rocha R, Hernandez-Martinez D, Romero Grijalva M, Salinas-Lara C, Rodriguez-Sosa M, Juarez-Avelar I, Salazar-Villatoro L, Gonzalez-Robles A, Mendez-Cruz AR, Aley-Medina P, Espinosa-Villanueva J, Castelan-Ramirez I, Lorenzo-Morales J. 2017. Type 2 diabetes mellitus BALB/c mice are more susceptible to granulomatous amoebic encephalitis: Immunohistochemical study. *Exp Parasitol*; 183:150-159.
- Page FC. 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae*. Freshwater Biological Association, Ambleside, UK. 122p.
- Panjwani N. 2010. Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Ocul Surf*;8(2):70–79.
- Peleg AY, Weerathna T, McCarthy JS, Davis TM. 2007. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev*; 23(1):3-13.
- Peñaloza HF, Nieto PA, Munoz-Durango N, Salazar-Echegarai FJ, Torres J, Parga MJ, Alvarez-Lobos M, Riedel CA, Kalergis AM, Bueno SM. 2015. Interleukin-10 plays a key role in the modulation of neutrophils recruitment and lung inflammation during infection by *Streptococcus pneumoniae*, *Immunology*; 146 (1): 100–112.
- Petry F, Torzewski M, Bohl J, Wilhelm-Schwenkmezger T, Scheid P, Walochnik J, Michel R, Zoller L, Werhanhn KJ, Bhakdi S, Lackner KJ. 2006. Early Diagnosis of *Acanthamoeba* Infection during Routine Cytological Examination of Cerebrospinal Fluid. *Journal of Clinical Microbiology*; 44(5), 1903-1904.
- Pozzilli P, Leslie RDG. 1994. Infections and diabetes: mechanisms and prospects for prevention, *Diabet Med*; 11 (10): 935-41.
- Pozzilli P, Guglielmi C. 2009. Double diabetes: a mixture of type 1 and type 2 diabetes in youth. *Endocr Dev* ;14:151-66.

- Pussard M, Pons R. 1977. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida) *Protistologica*; 13:557–598.
- Ren M, Gao L, Wu X. 2010. TLR4: The receptor bridging *Acanthamoeba* challenge and intracellular inflammatory responses in human corneal cell lines. *Immunology and Cell Biology*, 88(5), 529-536.
- Rivera F, Bonilla P, Ramírez E, Calderón A, Gallegos E, Rodríguez S, Ortiz R, Hernández D, Rivera V. 1994. “Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in Mexico city and its suburbs”. *Water, Air and Soil Poll*; 74: 65-87.
- Ruiz-Sánchez BP, Cruz-Zárata D, Estrada-García I, Wong-Baeza I. Las células linfoides innatas y su papel en la regulación de la respuesta inmune. *Rev Alerg Mex*. 2017;64 (3):347-363.
- Sabin EA, Kopf MA, Pearce EJ. 1996. *Schistosoma mansoni* egg-induced early IL-4 production is dependent upon IL-5 and eosinophils. *J. Exp. Med*; 184:1871–1878.
- 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 Infectious Diseases*; 2(3), 1-4.
- Satlin M, Graham J, Visvesvara G, Mena H, Marks K, Saal S, Soave R. 2013. Fulminant and fatal encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a kidney transplant recipient: Case report and literature review. *Transplant Infectious Disease*; 15(6), 619-626.
- Sahoo M, Ceballos-Olvera I, del Barrio L, y Re F. 2011. Role of the inflammasome, IL-1 $\beta$ , and IL-18 in bacterial infections. *TheScientificWorldJournal*, 11, 2037–2050
- Seal DV. 2003. *Acanthamoeba* keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye*; 17:893–905.
- Seijo Martínez M, González-Mediero G, Santiago P, Rodríguez De Lope A, Diz J, Conde C, Visvesvara GS. 2000. Granulomatous amebic encephalitis in a patient with AIDS: isolation of *Acanthamoeba* sp. Group II from brain tissue and successful treatment with sulfadiazine and fluconazole. *J Clin Microbiol*; 38(10): 3892-5.
- Schultz MJ, Knapp S, Florquin S, Pater J, Takeda K, Akira S, Van der Poll T. 2003. Interleukin-18 impairs the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*; 71(4):1630-4.

- Schuster FL. 2002. Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), 342-354.
- Schuster FL, Visvesvara GS .2004a. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 34: 1001–1027.
- Shah BR, Hux JE, 2003. Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. *Diabetes Care*. 26(2): 510-3.
- Shin HJ, Cho MS, Jung SY, Kim HI, Park S, Seo JH, Yoo JC, Im KI. 2001. Cytopathic changes in rat microglial cells induced by pathogenic *Acanthamoeba culbertsoni*: morphology and cytokine release. *Clin Diagn Lab Immunol*;8(4):837-40.
- Shouval DS, Ouahed J, Biswas A, Goettel JA, Horwitz BH, Klein C, Muise AM, Snapper SB. 2014. Interleukin 10 receptor signaling: master regulator of intestinal mucosal homeostasis in mice and humans, *Adv Immunol*;122:177-210
- Siddiqui R, Khan NA. 2012. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors*;5: 6
- Siddiqui R, Aqeel Y, Khan NA. 2013. Killing the dead: chemotherapeutic strategies against free-living cyst-forming protists (*Acanthamoeba* sp. and *Balamuthia mandrillaris*). *J Eukaryot Microbiol*; 60(3):291-7.
- Sierra-Calzado L. 2011. Demostración del ameboflagelado *Naegleria fowleri* como agente etiológico de meningoencefalitis amébrica primaria en Santiago de Cuba. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*; 30(3): 418-431.
- Sign BN, Dutta GDP. 1984. Small free-living aerobic amoebae: soil as suitable habitat, isolation, culture, classification, pathogenicity, epidemiology and chemotherapy. *Indian J Parasitol*; 8:1-23.
- Solovic I., Sester M, Gomez-Reino JJ, Rieder HL, Ehlers S, Milburn HJ, Kampmann B, Hellmich B, Groves R, Schreiber S, Wallis RS, Sotgiu G, Schölvinck EH, Goletti D, Zellweger JP, Diel R, Carmona L, Bartalesi F, Ravn P, Bossink A, Duarte R, Erkens E, Clark J, Migliori GB, Lange C. 2010. The risk of tuberculosis related to tumour necrosis factor antagonist therapies: a TBNET consensus statement. *European Respiratory Journal*; 36 (5): 1185-1206.
- Sone H. 2018. "Diabetes Mellitus." *Encyclopedia of Cardiovascular Research and Medicine*;1(2):9–15.

- Stewart GL, Shupe KK, Kim I, Silvano RE, Alizadeh H, McCulley JP, Niederkorn JY. 1994. Antibody-dependent neutrophil-mediated killing of *Acanthamoeba castellanii*. *Int J Parasitol*; 24(5):739-742.
- Szabady RL, McCormick BA. 2013. Control of neutrophil inflammation at mucosal surfaces by secreted epithelial products. *Front Immunol*; 4:220 1-6
- Tilak R, Singh RG, Wani IA, Parekh A, Prakash J, Usha. 2008. An unusual case of *Acanthamoeba* peritonitis in a malnourished patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) .*J Infect Developing Countries* 2008; 2(2):146-148.
- Tomlinson G&, Jones EA. 1962. Isolation of cellulose from the cyst wall of a soil amoeba. *Biochimica et biophysica acta* 63, 194-200.
- Toney DM, Marciano-Cabral F. 1998. Resistance of *Acanthamoeba* species to complement lysis. *J Parasitol*; 84(2):338-344.
- Torno MS, Jr., Babapour R, Gurevitch A, Witt MD. 2000. Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. *Journal of the American Academy of Dermatology*; 42, 351–354.
- Trabelsi H, Dedana F, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, Makni F, Ayadi A .2012. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathol Biol (Paris)*; 60(6):399-405.
- Tsutsumi Y, Tachibana H, Azuma S, Ariwa R. 2002. Acanthamebic Meningoencephalitis Associated with Alcoholic Liver Cirrhosis. *Pathology Case Reviews*, 7(6), 273-277.
- Van Klink F, Taylor WM, Alizadeh H, Jager MJ, Van Rooijen N, Niederkorn JY. 1996. The role of macrophages in *Acanthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 37(7):1271-1281.
- 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):1–26.
- Wang T, Secombes CJ. 2013. The cytokine networks of adaptive immunity in fish. *Fish Shellfish Immunol*; 35:1703–18.
- Wen-Chao W, Hong-Wei S, Hai-Tian C, Jing L, Xing-Juan Y, Chong W, Zilian W, Limin Zheng. 2014. Circulating hematopoietic stem and progenitor cells are myeloid-biased in cancer patients, *Proc Natl Acad Sci U S A*; 111 (11): 4221-422.

- Wilkin TJ. 2009. The accelerator hypothesis: a review of the evidence for insulin resistance as the basis for type I as well as type II diabetes. *Int J Obes (Lond)*; 33:716-26.
- Wilson EH, Wille-Reece U, Dzierszinski F, Hunter CA. 2005. A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis. *J Neuroimmunol*; 165: 63-74
- Zelante T, Fric J, Wong AY, y Ricciardi-Castagnoli P. 2012. Interleukin-2 production by dendritic cells and its immuno-regulatory functions. *Front Immunol*; 3: 161 1-5
- Zhang X, Majlessi L, Deriaud E, Leclerc C, Lo-Man R. 2009. Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils, *Immunity*; 31 (5): 761–771.