



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

**Efecto de la Taurina sobre los mecanismos de  
patogenicidad de trofozoítos de *Acanthamoeba  
castellanii* en el modelo *ex vivo* de queratitis  
amibiana**

**TESIS**

Que para obtener el título de  
**LICENCIADA EN OPTOMETRÍA**

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

Celia Esther Guevara Estrada

**DIRECTORA DE TESIS**

Dra. Maritza Omaña Molina



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Estado de México, 2020



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.

## Índice

Agradecimientos	4
Dedicatoria	6
1 Introducción	7
2 Antecedentes históricos	7
3 <i>Acanthamoeba</i> spp.	8
3.1 Ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i>	8
3.1.1 Fase trófica	8
3.1.2 Fase quística	9
3.3 Taxonomía y clasificación	11
3.4 Importancia clínica del género <i>Acanthamoeba</i>	11
4. Queratitis amibiana	12
4.1 Epidemiología y factores de riesgo	12
4.2 Cuadro clínico	13
4.3 Diagnóstico	14
4.4 Tratamiento	15
5 Mecanismos de patogenicidad de <i>Acanthamoeba</i>	15
6 Mecanismos de defensa de la superficie ocular	16
7 Lágrima	16
7.1 Componentes de la lágrima	17
7.2 Agentes antimicrobianos de la lágrima	18
8 Aminoácidos en lágrima humana	19
9 Taurina en la superficie ocular	22
10 Inmunidad Ocular ante la infección por <i>Acanthamoeba</i>	22
11 Justificación	23
12 Hipótesis	24
13 Objetivo general	24
13.1 Objetivos específicos	24
14 Metodología	24
14.1 Cultivo Amibiano	24
14.3 Aumento de la virulencia de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	25
14.4 Estrategia experimental	26
14.5 Obtención del tejido corneal	27
14.6 Procesamiento de las muestras	28

14.7 Análisis cuantitativo	28
16 Discusión	39
17 Conclusiones	42
18 Perspectivas	43
19 Bibliografía	44

## Agradecimientos

Dios, tu misericordia y bondad hacia mí son infinitas y me lo demuestras a cada paso que doy. Gracias por no soltarme de tu mano.

Gracias a mis padres por ser mi sostén en todos los sentidos. Son los mejores y no hay manera de que pueda pagar algún día todos los sacrificios que han hecho por mí.

Quiero agradecer a mi querida UNAM, porque en ella he vivido los mejores años de mi vida, me abrió los ojos hacia nuevos horizontes y el orgullo de pertenecer a esta casa de estudios es para siempre. Gracias también a mis profesores y a todas las personas involucradas en mi formación profesional.

Agradezco al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), por todas las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo, en especial al laboratorio de infectómica y patogénesis molecular.

Doctora Maritza, le agradezco infinitamente su amistad, su paciencia, por abrirme las puertas del laboratorio de amibas anfibias, pero sobre todo por haberme permitido aprender a hacer ciencia a su lado a pesar de mi poca formación en el área.

Doctora Bibi, quiero darle las gracias porque aún sin conocerme me dio oportunidad de trabajar en su laboratorio y de aprender cosas que jamás imaginé.

Maestra Dolores, muchas gracias por sus consejos, por sus enseñanzas y por su paciencia. Este trabajo no hubiera sido posible sin su valiosa ayuda.

Agradezco a mis asesoras, maestra Luz Elena y maestra Rosa María por su tiempo y dedicación para la revisión de este trabajo.

Anel, gracias por tu apoyo, amistad y paciencia durante el tiempo que pasamos en experimentación y a todo el equipo de CINVESTAV, gracias por su buena vibra. Son geniales.

Polo, gracias por permanecer a mi lado, por aguantarme y por tu apoyo incondicional en todos los aspectos.

Adriana, nunca olvidaré tus palabras: “Cuando entres a la universidad se te van a abrir los ojos”. Gracias por impulsarme a seguir estudiando y a ser una mejor persona. Sé que nuestra amistad es eterna.

Richard y Nadia, gracias por su invaluable amistad, por estar presentes en las buenas y en las malas. Los quiero mucho.

Pedro gracias por aparecer cuando más te necesitaba, gracias por los consejos.

Erik, gracias por impulsarme a seguir adelante, por no permitir que me quedara en mi zona de confort.

Lic. Yazmín, gracias por su apoyo y amistad. Y a toda mi familia y amigos que si no he mencionado no ha sido por falta de cariño.

## **Dedicatoria**

A mis padres Gabriel y Trini, ustedes son mi mayor motivación, hoy y siempre.  
Con todo mi amor y admiración.

A mis hermanos María Isabel y Gabriel Arnoldo, no imagino la vida sin ustedes.  
Los amo

“Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida.

Detrás de cada logro, hay otro desafío.

Mientras estés viva, siéntete viva.

Si extrañas lo que hacías, vuelve a hacerlo.

Sigue, aunque todos esperen que abandones.

No dejes que se oxide el hierro que hay en ti”

Madre Teresa de Calcuta

## 1 Introducción

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoos distribuidos ampliamente en la naturaleza. Como organismos de vida libre se encuentran en una amplia variedad de ambientes, incluyendo suelo, aire y agua (Martínez y Visvesvara, 1997; Marciano Cabral y Cabral, 2003). En ambientes acuáticos se han podido aislar de aguas dulces, termales, hipersalinas e incluso en glaciares del antártico (Brown et al., 1982; Park, 2009), así como de sistemas de aire acondicionado, filtros de calefacción, grifos domésticos, albercas, agua embotellada, lentes de contacto y soluciones oftálmicas (Mergeryan, 1991; Visvesvara, 2013). Algunas especies; como *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia pedata* y *Acanthamoeba* spp. son capaces de parasitar al ser humano y algunos animales, es por eso que también se denominan amibas anfitriónicas.

## 2 Antecedentes históricos

Durante la primera mitad del siglo XX, las AVL eran consideradas como microorganismos del suelo y no estaban asociados a enfermedades en seres humanos; sin embargo, en 1958 Culbertson describió el potencial patógeno de *Acanthamoeba* mientras realizaba pruebas de seguridad de la vacuna de la polio, observando efecto citopático en los cultivos, los cuales al ser inoculados vía intranasal, e intracerebral en primates y ratones de experimentación provocaron infección en sistema nervioso central y la muerte (Culbertson, 1958).

En 1965, se reportó el primer caso de meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) en un ser humano, en el que se identificó a *Naegleria fowleri* como el agente causal (Fowler y Carter, 1965).

En 1972 se dio a conocer el primer caso de encefalitis causada por amibas del género *Acanthamoeba* (Jager y Stamm, 1972). Dos años después en Reino Unido, reportaron una infección ocular asociada con estas amibas (Naginton *et al.*, 1974)

En 1990, Visvesvara *et al.*, identificaron por primera vez amibas del género *Balamuthia* como agentes causales de encefalitis amibiana granulomatosa (EAG).

La cual fue aislada del cerebro de un mandril. En 2001, se reportó el único caso conocido hasta el momento de encefalitis amibiana causada por *Sappinia pedata* (Gelman *et al.*, 2001). De los cuatro géneros de amibas anfitriónicas, el género *Acanthamoeba* es el que cuenta con el mayor número de casos clínicos registrados.

### **3 *Acanthamoeba* spp.**

Las amibas del género *Acanthamoeba* fueron observadas por primera vez por Castellani en 1931, como contaminantes de un cultivo de hongos (*Cryptococcus parvovirus*). Esta amiba, fue clasificada inicialmente como *Hartmannella castellanii*. En 1931, Volkonsky separó el género *Hartmannella* en tres grupos: *Hartmannella*, *Glaeseria* y *Acanthamoeba*, sin embargo, fue hasta 1967 que después de estudiar a los géneros *Hartmannella* y *Acanthamoeba*, Page concluyó que estos no tenían nada en común, colocando a *Hartmannella* en la familia *Hartmannellidae*. Posteriormente, Sawyer y Griffin (1975) establecieron la familia *Acanthamoebidae*.

#### **3.1 Ciclo de vida de *Acanthamoeba***

El ciclo de vida de *Acanthamoeba* consta de dos fases: una fase trófica que se alimenta activamente y se reproduce, y una fase quística o de resistencia, donde su metabolismo es reducido, que le ayuda a sobrevivir por periodos prolongados (Pérez-Irízabal, 2005).

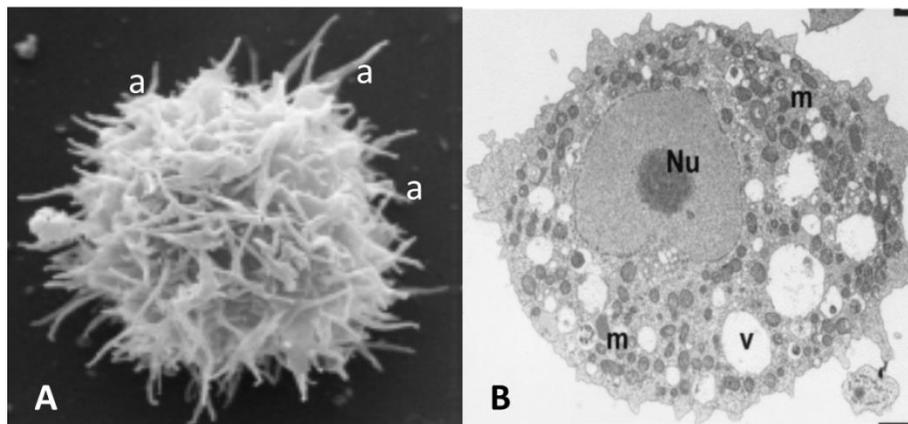
##### **3.1.1 Fase trófica**

El trofozoíto tiene un tamaño variable que oscila entre los 25 y los 40  $\mu\text{m}$ . Emiten finas y pequeñas proyecciones a lo largo del cuerpo ameboideo que semejan espinas (acanthos) y son éstas las que le dan el nombre al género (Fig. 1A). Como organismo de vida libre se alimenta de bacterias, algas y levaduras en el medio ambiente por medio de fagocitosis. En el laboratorio, cuando se cultivan en condiciones axénicas adquieren los nutrientes a través de pinocitosis. Los trofozoítos se desplazan a 0.8  $\mu\text{m}$  por segundo, involucrando un pseudópodo

hialino (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Preston *et al.*, 2001). Se reproducen asexualmente por fisión binaria dando lugar a dos células hijas (Pérez-Irízabal, 2006).

*Acanthamoeba* puede permanecer en fase trófica mientras que las condiciones de pH, temperatura, osmolaridad y suministro de alimento sean óptimas (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

A través del microscopio electrónico de transmisión se han observado diversas estructuras en el trofozoíto: aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso y rugoso, ribosomas libres, mitocondrias y microtúbulos (Bowers y Korn, 1969), una vacuola contráctil prominente en el citoplasma que controla el contenido hídrico de la célula (posiblemente también excreta desechos) y la regulación osmótica, y un núcleo con un nucléolo central prominente (Fig.1B) (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).



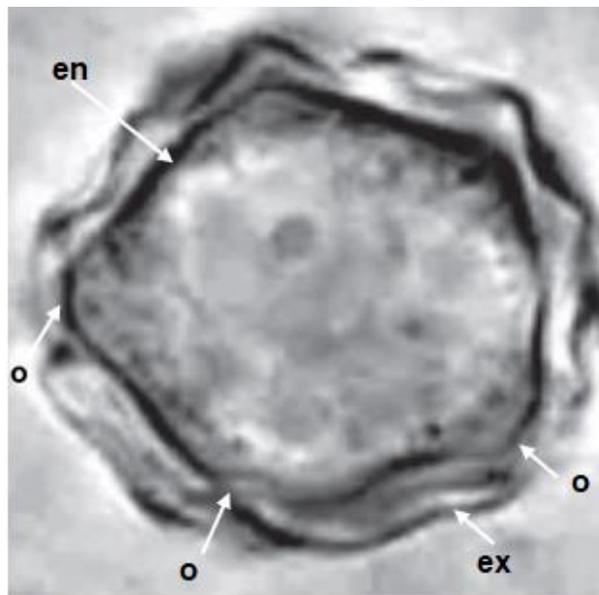
**Fig. 1.** Fase trófica de *Acanthamoeba*. A) Microscopía electrónica de barrido, trofozoíto de *Acanthamoeba*, se observan acantópodos característicos del género (a) B) Microscopía electrónica de transmisión, trofozoíto en el cual se observan núcleo (Nu), vacuola digestiva (v) y mitocondrias (m).

### 3.1.2 Fase quística

Cuando las condiciones ambientales y nutricionales son adversas o por el uso de medicamentos para el tratamiento de la infección amibiana, se induce la transformación de los trofozoítos de *Acanthamoeba* en quistes, a este proceso se

le conoce como enquistamiento, el cual es acompañado por una serie de cambios morfofisiológicos, dando como resultado la disminución de la actividad metabólica (Bowers y Korn, 1969).

Los quistes suelen tener una forma redondeada o poligonal y están conformados de dos capas: una capa externa o exoquiste y una capa interna o endoquiste, formadas principalmente por fibrillas de celulosa (Schuster y Visvesvara, 2004; Chávez-Munguía, 2005; Garajová et al., 2019). El exo y endoquiste están separados entre sí por un espacio y solo se unen en los pequeños poros, llamados ostiolos (3) en la superficie de la pared del quiste. Cada ostiolo está cerrado por un opérculo (Fig. 2) (Bowers y Korn, 1969).



**Fig. 2.** Microscopía de luz. Quiste de *Acanthamoeba* se observan: endoquiste (en), exoquiste (ex) y tres ostiolos con sus opérculos (o).

### **3.2 Importancia ecológica del género *Acanthamoeba***

En su fase de vida libre, los trofozoítos se alimentan principalmente de algas, hongos y bacterias, consumiendo aproximadamente el 50% de biomasa bacteriana, regulando de esta manera dicha población en la biósfera (Siddiqui y Khan, 2012). Algunas bacterias son capaces de resistir la digestión de las amibas, y pueden sobrevivir en su interior protegiéndose así de la acción de los antibióticos y la cloración (Barker y Brown, 1994).

### **3.3 Taxonomía y clasificación**

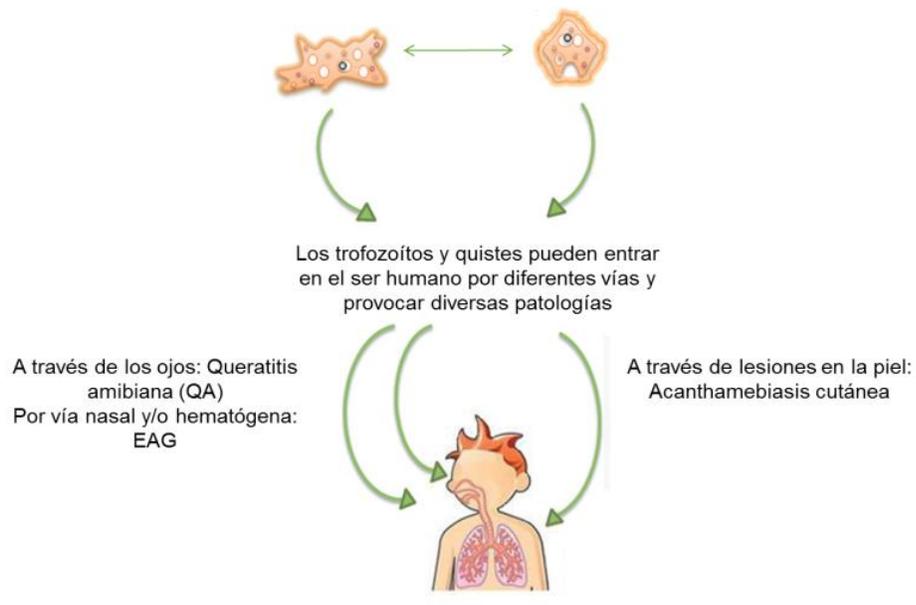
Las características morfológicas del quiste fueron durante mucho tiempo la base para la clasificación de *Acanthamoeba*, identificando de esta manera tres grupos principales: el grupo I se caracteriza por tener quistes de aproximadamente 18  $\mu\text{m}$ , con endoquistes de forma estrellada y lisos, o exoquistes rugosos. Los quistes del grupo II son de tamaño menor a 18  $\mu\text{m}$  con endoquistes de forma estrellado, ovoide o poliédrico y con exoquiste ondulado. Este grupo es el más abundante en la naturaleza y con más especies patógenas, entre las que destacan *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga*. El grupo III se caracteriza por tener grandes quistes, con un tamaño menor a 19  $\mu\text{m}$ , con endoquiste globular u ovoide y exoquiste con pared ondulada (Pussard y Pons, 1977).

Actualmente, la biología molecular juega un papel muy importante en la clasificación de estos protozoos, debido a que la morfología de los trofozoitos y quistes se puede ver afectada por las condiciones y medio de cultivo lo que ha llevado a identificaciones erróneas. Hasta el momento con base en la secuencia del gen que codifica la subunidad 18S del RNA ribosomal se han identificado 20 genotipos (T1-T20) (Corsaro *et al.*, 2015), siendo las amibas del grupo T4 las más abundantes y de mayor importancia clínica.

### **3.4 Importancia clínica del género *Acanthamoeba***

De las especies de *Acanthamoeba* identificadas como causantes de patologías en el ser humano, destacan *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. lugdunensis*, *A. hatchetti*, *A. griffini* y *A. royreba*.

Según la vía de entrada al organismo pueden causar diferentes enfermedades; por vía nasal y/o hematogena causan encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), aunque es poco frecuente, se han registrado casos de acanthamebiasis cutánea principalmente en individuos inmunocomprometidos asociándose a lesiones en la piel (Król-Turmińska y Olender, 2017). Por vía ocular causan una infección clínicamente importante llamada queratitis amibiana (QA), la cual, por lo general se presenta en personas sanas usuarias de lentes de contacto (Siddiqui y Khan, 2012) (Fig. 3).



**Fig. 3.** Vías de entrada de *Acanthamoeba spp.* y patologías que causa en el ser humano.

#### 4. Queratitis amibiana

La QA es una infección corneal que produce inflamación, pérdida de la transparencia o incluso perforación, lo que conlleva en muchas ocasiones a la pérdida de la visión.

Los primeros casos de QA fueron descritos en Londres (Naginton *et al.*, 1974) y Estados Unidos (Jones *et al.*, 1974). A partir de entonces, se han reportado diversos casos alrededor del mundo asociados principalmente al uso prolongado de lentes de contacto blandos, higiene deficiente de los mismos, o ineficacia de soluciones de limpieza (Siddiqui y Khan, 2012). Se han diagnosticado casos en individuos sanos, usuarios y no usuarios de lentes de contacto (Lorenzo Morales *et al.*, 2015).

##### 4.1 Epidemiología y factores de riesgo

El uso de lentes de contacto está asociado a la QA en el 80% de los casos reportados en países desarrollados, siendo el uso inadecuado de soluciones de limpieza y la higiene deficiente de los mismos, factores importantes para adquirir la infección. En países como la India, Bangladesh o Nepal la infección se ha

asociado a traumas oculares o actividades agrícolas o al aire libre (Gopinathan *et al.*, 2009). El contacto con agua o suelo contaminado, así como procedimientos quirúrgicos como queratoplastia penetrante o queratotomía radial también se consideran factores de riesgo para adquirir la infección (Dart *et al.*, 2009).

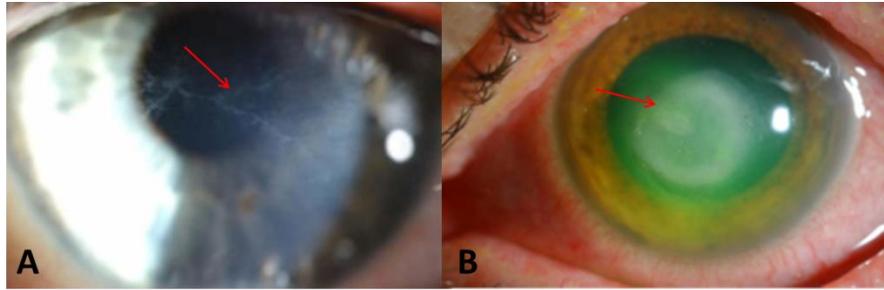
La incidencia de la QA a nivel mundial se ha incrementado en los últimos años, debido principalmente al uso de lentes de contacto, a pesar de ello, en Mexico y el resto del mundo, no se cuenta con datos certeros del número de casos de QA. En 2015 se reportaron dos casos en usuarios de lente de contacto blando, asociados a los genotipos T3 y T4 (Omaña-Molina *et al.*, 2016), y en 2018 se dieron a conocer cinco casos más, tratados con éxito por Vanzzini-Zago, et al., (2018) siendo éstos los únicos casos reportados hasta el momento.

#### **4.2 Cuadro clínico**

La QA generalmente es una infección unilateral. Se describe como una infección cuya progresión va del epitelio al estroma. Los primeros síntomas reportados son: dolor intenso, fotofobia y baja de agudeza visual. A la exploración clínica durante la etapa temprana se observa epitelopatía punteada, pseudodendritas epiteliales o subepiteliales e infiltrados perineurales (Fig. 4A), estas características hacen que sea confundida con una infección por herpes simple, mientras que en etapas avanzadas los infiltrados estromales en forma de anillo sugieren una infección por hongos (Fig. 4B) (Maycock *et al.*, 2016).

La secuencia de los eventos en la QA inicia por la destrucción de la barrera epitelial, posteriormente la invasión estromal por amibas, depleción de queratocitos y la inducción de una respuesta inflamatoria intensa, lo que produce la fotofobia (Siddiqui y Khan, 2012). Cuando el infiltrado estromal aumenta puede conducir a una uveítis anterior estéril con hipopión, escleritis, glaucoma, formación de abscesos y perforación corneal (Maycock *et al.*, 2016).

La diseminación intraocular de *Acanthamoeba* no es común. Existen casos documentados de corioretinitis (Moshari A. *et al.*, 2001) y endoftalmitis (Davis M.J. *et al.*, 2010) secundarios a la infección corneal por *Acanthamoeba*, en ambos casos se realizó queratoplastia penetrante como tratamiento ante la inminente perforación corneal y culminaron en evisceración.



**Fig.4.** A) Signos clínicos de QA en etapas tempranas, se observan epiteliopatía y pseudodendritas (flecha). B) características clínicas de QA en etapas avanzadas, se observa infiltrado en forma de anillo (flecha) (Maycock y Jayaswal, 2016).

### 4.3 Diagnóstico

La QA presenta cierta similitud con las infecciones causadas por herpes simple, o incluso infecciones por hongos, lo que complica su detección temprana y tratamiento oportuno. En ocasiones, no obstante que el diagnóstico sea oportuno, en algunos casos las amibas son resistentes a la terapéutica con antibióticos (Siddiqui y Khan, 2012; Maycock *et al.*, 2016).

El raspado corneal ha sido el método más utilizado para la identificación de quistes o trofozoítos de *Acanthamoeba* sobre la superficie ocular. Generalmente se cultiva sobre agar no nutritivo enriquecido con *Escherichia coli*. Las muestras obtenidas se incuban a una temperatura de entre 28 y 35 °C y se observan diariamente por un periodo de 7-10 días.

La biopsia corneal es otro método utilizado en etapas avanzadas de la infección (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es un método eficaz para la detección de *Acanthamoeba*, ya que se puede detectar la presencia de ADN amibiano en una muestra de tejido infectado, lo cual hace posible realizar un diagnóstico preciso e iniciar un tratamiento (Schroeder *et al.*, 2001). Actualmente se utiliza también la microscopía confocal como método no invasivo para el diagnóstico temprano y seguimiento de la QA, sin embargo, se considera importante conocer la morfología de las amibas para su identificación adecuada y no confundirlas con otras poblaciones celulares (Füst *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019).

#### **4.4 Tratamiento**

Cuando *Acanthamoeba* se encuentra en su forma trófica es sensible a diversos fármacos, sin embargo, en su forma quística presenta mayor resistencia. (Maycock *et al.*, 2016).

Se han reportado tratamientos exitosos con Isetionato de propamidina, polihexametilen-biguanida (PHMB), gluconato de clorhexidina, clotrimazol, ketoconazol, miconazol, itraconazol, gluconato de clorhexidina, entre otros (Visvesvara y Schuster, 2008). Tzu-Yu *et al.*, 2017 reportaron la eficacia de la clorhexidina tópica en combinación con voriconazol en el tratamiento de la QA, logrando la recuperación de la visión a 20/20 en un mes de tratamiento y en 2019, Hernández-Martínez *et. al.*, realizaron ensayos *in vitro* con cepas de *Acanthamoeba* pertenecientes al grupo T4 y tres diferentes fármacos: clorhexidina, voriconazol e itraconazol, demostrando que *A. castellanii* es altamente sensible al voriconazol.

Se ha comprobado que el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) como diclofenaco sódico o paracetamol, impiden el enquistamiento de *Acanthamoeba castellanii*, lo que sugiere un tratamiento útil en combinación con otros fármacos, ya que por sí solos, los AINES no actúan sobre la viabilidad de *Acanthamoeba* (Siddiqui, *et. al.*, 2016).

#### **5 Mecanismos de patogenicidad de *Acanthamoeba***

La patogénesis de *Acanthamoeba* se ha estudiado mediante ensayos realizados *in vitro* sobre córneas de hámster, líneas de células MDCK (González-Robles *et al.*, 2006) y córnea humana (Omaña Molina *et. al.*, 2010), los eventos tempranos de la invasión se describen a continuación:

Inicialmente, los trofozoítos se adhieren a la superficie del tejido blanco, posteriormente migran hacia las uniones celulares donde, por efecto mecánico y/o enzimático, penetran e invaden espacios intercelulares, formando eventualmente protuberancias y destrucción del tejido corneal en capas más profundas del epitelio (Omaña Molina *et. al.*, 2004). Se ha demostrado que *Acanthamoeba* secreta diversas proteasas que facilitan la invasión del tejido, como serina

proteasas, cisteína proteasa, elastasa y una enzima colagenolítica (Niederkon *et al.*, 1999). Durante este proceso, las amibas fagocitan el tejido corneal y lo utilizan como fuente de alimento, desarrollando bocas fagocíticas o amebostomas (Omaña Molina *et al.*, 2004).

## **6 Mecanismos de defensa de la superficie ocular**

La protección ocular externa representa un sistema multicapa diseñado para defender de agentes extraños la integridad del ojo, empezando por los párpados y pestañas que mediante el parpadeo impiden la colonización de agentes microbianos que pueden alojarse sobre la superficie, minimizando también el daño causado por trauma. En esta primera capa también se incluyen los lípidos de la película lagrimal, secretados por las glándulas de Meibomio, la cual evita la evaporación de la lágrima (Sack *et al.*, 2001).

La segunda barrera está representada por la capa acuosa y mucínica de la película lagrimal. La capa acuosa tiene una acción de barrido, limpieza y bombeo que protege la mucosa. La capa mucínica está compuesta por proteínas de alto peso molecular, las cuales son secretadas por las células caliciformes. Hay evidencia de que la IgAs y la lisozima se acumulan en esta capa, creando así un reservorio de agentes antimicrobianos (Sack *et al.*, 2001).

La última barrera está representada por las uniones celulares del epitelio corneal, las cuales se encuentran estrechamente unidas (Sack, 2001).

## **7 Lágrima**

Además de ser una barrera de la superficie ocular, la lágrima forma una capa lisa y transparente que permite la refracción de la luz, provee de humectación y sirve de suministro de oxígeno a la córnea (Torras, 2006). Las glándulas lagrimales producen la lágrima por secreción basal o refleja. La secreción refleja se produce en la glándula lagrimal principal como respuesta a cuerpos extraños, agentes tóxicos o a reacciones emocionales. La lagrima basal se produce continuamente por las glándulas accesorias, actúa como lubricante y se distribuye con el parpadeo sobre la superficie ocular formando tres capas (mucínica, acuosa y lipídica) (Hernández-Galilea E y Juan-Marcos, 2013), aunque algunos autores

aseguran que está compuesta por una bicapa, donde la primera es un gel hidratado de proteínas y mucinas y la segunda es una capa de lípidos (Chen Hai-Bo, 1997).

### 7.1 Componentes de la lágrima

La lágrima está constituida por diversos componentes, de los cuales el 98.2% es agua, el resto (1.8%) se conforma de electrolitos, enzimas entre las que destaca la lisozima, hidratos de carbono, proteínas, aminoácidos, entre otros (Cuadro 1).

<b>Lágrimas</b>	
<b>Propiedades físicas</b>	
pH	7.4 (7.2-7.7)
Presión osmótica	305 mOsm/kg Equiv NaCl 0.95%
Índice de refracción	1.357
Volumen	0.50-0.67 g/ 16 hrs (vigilia)
<b>Propiedades químicas</b>	
1. Composición general de la lágrima	
Agua	98.2 g/100 ml
Sólidos	1.8 g/100 ml
Cenizas	1.05 /100 ml
2. Electrolitos	
Calcio	120-170 mmol/L
Potasio	26-42 mmol/L
Sodio	0.3-2.0 mmol/L
Magnesio	0.5-1.1 mmol/L
Cloruro	120-135 mmol/L
Bicarbonato	26 mmol/L
3. Antiproteinasas	
$\alpha_1$ -antitripsina ( $\alpha_1$ -at)	0.1-3.0 mg%
$\alpha_1$ -antiquimotripsina	1.4 mg%
Inhibidor de inter- $\alpha$ - tripsina	0.5 mg%
$\alpha_2$ - macroglobulina	3-6 mg%
4. Sustancias nitrogenadas	
Proteínas totales	0.668-0.800 g/100mL

Albúmina	0.392 g/100mL
Globulinas	0.2758 g/100mL
Amoniaco	0.005 g/100 mL
Ácido úrico	0.04 mg/100 mL
Urea	
Nitrógeno total	158 mg/100 mL
Nitrógeno no proteico	51 mg/100 mL
5. Hidratos de carbono	
Glucosa	2.5 (0-5.0) mg/100mL
6. Esteroles	
Colesterol y ésteres de colesterol	8-32 g/100mL
7. Varios	
Ácido cítrico	0.6 mg/100 mL
Ácido ascórbico	0.14 mg/100 mL
Lisozima	1-2 mg/mL
Aminoácidos	7.58 mg/100 mL
Ácido láctico	1-5 mmol/L
Prostaglandinas	75 pg PF/mL 300 pg PF/mL
Catecolamina	0.5-1.5 µg/mL
Complemento	Dilución 1:4 (Prueba hemolítica)

**Cuadro 1.** Componentes de la lágrima humana. Tomado del libro Ojo seco y otros trastornos de la superficie ocular (Garg *et al.*, 2008).

## 7.2 Agentes antimicrobianos de la lágrima

Se ha comprobado que algunos de los componentes de la lágrima poseen propiedades que impiden que diversos patógenos invadan la superficie ocular; lisozima, lactoferrina, lipocalina, inmunoglobulina A secretora (IgA), complemento, entre otros.

### Lisozima

Actúa sobre bacterias Gram positivas y su contenido en lágrima es 120 veces mayor que en suero y saliva (Fleming, 1922; Hankiewicz y Swierczek, 1974).

### Lactoferrina

Una cationes divalentes, incluido el hierro, privando a las bacterias de este nutriente, evitando también la generación de especies reactivas de oxígeno (Flanagan y Willcox, 2009).

### **Lipocalina lacrimal**

Constituye el 25% de la proteína en lágrimas reflejas, y se une a sideróforos interfiriendo con la capacidad de los patógenos para capturar hierro. (Redl, 2000)

### **Inmunoglobulina A secretora (sIgA)**

Es el principal anticuerpo de la película lagrimal, producido por las células plasmáticas (linfocitos B) de la glándula lagrimal principal y tejido linfoide conjuntival, liberándose de las células acinares con un componente secretor que la protege de enzimas proteolíticas, tanto del hospedero como del patógeno. Neutraliza patógenos para prevenir su unión al hospedero (Knop y Knop, 2005). Actúa como quimiotáctico para neutrófilos, y se ha comprobado que evita la unión de *Acanthamoeba polyphaga* a las células del epitelio corneal (Campos-Rodríguez *et al.*, 2004).

### **Complemento**

La vía del complemento no está activa en lagrimeo reflejo, ya que la lisozima y lactoferrina inhiben la ruta, es por esto que se activa a través de la vía alternativa (hidrólisis espontánea de C3). El complemento genera fragmentos implicados en respuestas inflamatorias agudas que facilitan el reconocimiento de los neutrófilos y dan como resultado la formación de complejos de ataque a la membrana que pueden lisar a los patógenos (Willcox *et al.*, 1997).

### **Enzima secretora fosfolipasa A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>)**

Constituye la principal proteína lagrimal activa contra bacterias Gram positivas. Tiene actividad enzimática lipolítica, actuando en membranas celulares bacterianas (Qu y Lehrer, 1998; McDermott, 2013).

## **8 Aminoácidos en lágrima humana**

En 2011 Nakatsukasa *et al.*, reportaron 23 aminoácidos presentes en lágrima humana (Cuadro 2), asociando la disminución de estos con enfermedades de la superficie ocular.

Tanto en lagrimeo basal como en lagrimeo reflejo, el aminoácido libre más

abundante es la taurina (Zhuo *et al.*, 2000), a través de estudios con modelos murinos, se ha comprobado que este aminoácido se encuentra en todos los tejidos oculares incluyendo córnea, cuerpo ciliar, cristalino y mayormente en retina, así como en la mayoría de los tejidos del cuerpo humano (Ripps y Shen, 2012).

Concentración de cada aminoácido (media/ $\mu$ M) en lagrimeo basal y reflejo de individuos sanos.		
	<b>Lágrima basal (n=31)</b>	<b>Lágrima reflejo (n=16)</b>
<b>Glicina</b>	10.7 $\pm$ 2.8	14.4 $\pm$ 7.1
<b>Alanina</b>	23.8 $\pm$ 4.8	19.5 $\pm$ 8.5
<b>Valina</b>	3.5 $\pm$ 0.9	3.8 $\pm$ 1.4
<b>Leucina</b>	10.1 $\pm$ 1.9	6.4 $\pm$ 1.9
<b>Isoleucina</b>	1.1 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.5
<b>Serina</b>	14.4 $\pm$ 4.2	26.4 $\pm$ 13.0
<b>Treonina</b>	5.4 $\pm$ 1.2	8.4 $\pm$ 3.6
<b>Metionina</b>	2.4 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.1
<b>Asparagina</b>	1.4 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.7
<b>Glutamina</b>	42.1 $\pm$ 6.8	25.4 $\pm$ 6.3
<b>Prolina</b>	8.4 $\pm$ 1.4	6.7 $\pm$ 1.5
<b>Fenilalanina</b>	10.7 $\pm$ 1.9	5.7 $\pm$ 1.5
<b>Tirosina</b>	1.3 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.5
<b>Triptófano</b>	7.1 $\pm$ 0.7	6.6 $\pm$ 1.0
<b>Aspartato</b>	13.2 $\pm$ 4.5	18.2 $\pm$ 11.6
<b>Ácido glutámico</b>	30.2 $\pm$ 4.8	20.9 $\pm$ 4.8
<b>Lisina</b>	5.7 $\pm$ 1.2	3.5 $\pm$ 1.2
<b>Arginina</b>	18.7 $\pm$ 1.6	14.4 $\pm$ 2.5
<b>Histidina</b>	1.9 $\pm$ 0.7	3.2 $\pm$ 1.9
<b>Citrulina</b>	10.1 $\pm$ 0.8	8.2 $\pm$ 1.5

<b>Ornitina</b>	3.3+/- 1.1	7.1+/- 3.0
<b>Cistina</b>	1.0+/- 0.2	0.6+/- 0.2
<b>Taurina</b>	195.1+/- 26.9	100.1+/-18.7

**Cuadro 2.** Concentración de aminoácidos en lágrima basal y lágrima refleja en individuos sanos, destacando la concentración de taurina como la más abundante (Nakatsukasa *et al.*, 2011).

Desde que se aisló por primera vez en 1827, se han estudiado los efectos y propiedades de la taurina en el ser humano, siendo los mecanismos de citoprotección los más referidos. Son numerosas las propiedades de la taurina a nivel sistémico: como neurotransmisor y osmorregulador, antioxidante y su participación en el desarrollo visual y neuronal, así como en procesos metabólicos e inflamatorios (Bucolo *et al.*, 2018). La disminución de taurina a nivel sistémico ha sido relacionada con diversas patologías y se ha sugerido su uso terapéutico en enfermedades como diabetes, artritis reumatoide, hipertensión, enfermedades cardiacas, epilepsia y enfermedad de Parkinson entre otras (Marcinkiewicz y Kontny, 2012; Schaffer y Kim, 2018). A nivel ocular se ha sugerido para el tratamiento de ojo seco (Rusciano, *et al.*, 2016).

Algunas funciones de la taurina a nivel sistémico se describen a continuación:

**Sistema cardiovascular.** Actúa disminuyendo arritmias ventriculares (Franconi F, *et al.*, 1985), disminuye la hipertensión arterial (Abe M, *et al.*, 1987) y tiene efectos anti aterogénicos en pacientes con insuficiencia cardiaca crónica (Ahmadian, *et al.*, 2017).

**Hígado.** Conjugua ácidos biliares para facilitar la absorción de lípidos por el intestino (Schaffer *et al.*, 2016)

**Sistema nervioso central.** Protege las neuronas en el accidente cerebrovascular y la enfermedad de Alzheimer (Prentice *et al.*, 2015), disminuye las convulsiones al unirse con el receptor GABAA (L'Amoreaux *et al.*, 2010), actuando como

inhibidor agonista de GABAA, GABAB y glicina (Albrecht y Schousboe, 2005). Se han reportado posibles receptores de taurina principalmente en médula espinal de ranas y ratones (Kudo *et al.*, 1988; Mathers *et al.*, 1989).

**Retina.** La deficiencia de taurina en la retina, induce la pérdida de fotorreceptores y células ganglionares (Schmidt *et al.*, 1976). Se ha sugerido la terapia con taurina para prevenir su degeneración (Froger *et al.*, 2014).

**Metabolismo.** Previene la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la apoptosis (Ricci *et al.*, 2008, Shetewy *et al.*, 2016).

**Expresión genética.** Induce la longevidad y su deficiencia está asociada al envejecimiento en tejido músculo esquelético, corazón, hígado y piel (Ito *et al.*, 2014).

## **9 Taurina en la superficie ocular**

Se sabe que en procesos inflamatorios las células del sistema inmune producen especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales producen estrés oxidativo y muerte celular. Se ha demostrado que la taurina es un inhibidor de la generación de ROS (Marcinkiewicz y Kontny, 2012), y que es capaz de proteger la superficie ocular de su efecto (Bucolo *et al.*, 2018).

Como osmoregulador posee propiedades lipofóbicas, por lo cual es capaz de mantener un equilibrio entre gradientes de concentración intra y extracelulares (Huxtable, 1992). En combinación con hialuronato de Sodio, se ha demostrado que protege las células del epitelio corneal y mantiene la presión osmótica estable y el volumen lagrimal (Bucolo *et al.*, 2018).

## **10 Inmunidad Ocular ante la infección por *Acanthamoeba***

El papel de los anticuerpos en la infección por *Acanthamoeba* no se ha logrado esclarecer totalmente, pero se ha demostrado que pueden prevenir su adhesión a las células blanco, inhibir su movilidad y neutralizar algunos de sus factores citotóxicos. Se han realizado estudios donde se ha comprobado que la IgA presente en la lágrima, es capaz de prevenir la QA, inhibiendo la adhesión del parásito al epitelio corneal, pero no afecta su viabilidad una vez que se ha iniciado la infección (Alizadeh *et al.*, 2001). Estudios demuestran que la lágrima de

individuos sanos contiene anticuerpos anti-*Acanthamoeba* y que los niveles de estos anticuerpos se encuentran disminuidos en pacientes con QA (Niederhorn *et al.*, 2002).

La primera respuesta del huésped cuando ha iniciado la infección por *Acanthamoeba*, es la migración de células inflamatorias hacia la zona afectada como neutrófilos y macrófagos, se ha demostrado que los macrófagos pueden jugar un papel más importante que los neutrófilos, ya que han sido encontrados frecuentemente en tejidos que contienen quistes de *Acanthamoeba* (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

Así mismo, Tomita *et al.*, (2017) realizaron ensayos con lactoferrina y *Acanthamoeba*, demostrando su capacidad amebicida solo en su fase trófica, sin embargo, se ha comprobado que la actividad de la lisozima y la lactoferrina no impide la unión de *Acanthamoeba* al epitelio corneal (Alsam *et al.*, 2008).

Hasta el momento se desconoce el papel que juega la taurina ante la invasión por *Acanthamoeba* en la superficie ocular.

## **11 Justificación**

Las amibas anfitróficas del género *Acanthamoeba* son agentes causales de patologías para el ser humano y diversos animales, entre las que destaca la queratitis amibiana, una infección corneal de curso crónico para la que hasta el momento no existe un tratamiento óptimo para erradicarla.

Estudios *in vitro* de los mecanismos de patogenicidad de estas amibas en la córnea ha revelado que son capaces de adherirse, migrar hacia las uniones celulares, penetrar a través de éstas y desestabilizar la superficie corneal. No obstante, es importante ahora determinar y entender el papel que juegan elementos presentes en la lágrima en este proceso y en particular el papel de la taurina.

Por lo anterior es conveniente llevar a cabo estudios *ex vivo* que permitan determinar cómo influye este aminoácido sobre los mecanismos de patogenicidad de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*; una de las especies más frecuentemente aisladas de casos de QA.

## 12 Hipótesis

La taurina por sus propiedades de citoprotección, disminuye la adherencia de los trofozoítos de *A. castellanii* al tejido corneal minimizando los mecanismos de patogenicidad de esta amiba.

## 13 Objetivo general

Describir el efecto de la Taurina sobre los mecanismos de patogenicidad dependientes de contacto de trofozoítos de *A. castellanii* en el modelo *ex vivo* de queratitis amibiana.

### 13.1 Objetivos específicos

- Aumentar la virulencia de las amibas en estudio mediante la generación de infección en ratón y recuperación a cultivo axénico.
- Determinar el efecto de la taurina sobre córneas de hámster interaccionadas *ex vivo* con trofozoítos de *A. castellanii* en tiempos tempranos de interacción 3 y 6 h.
- Describir a través de microscopía electrónica de barrido el efecto de la taurina sobre los mecanismos de patogenicidad (adherencia, migración, penetración y fagocitosis) de trofozoítos de *A. castellanii* sobre córneas de hámster dorado de Siria (*Mesocricetus auratus*).
- Cuantificar los trofozoítos adheridos a las córneas de hámster en las diferentes condiciones y tiempos de interacción.

## 14 Metodología

### 14.1 Cultivo Amibiano

Se trabajó con trofozoítos de la especie *A. castellanii*, aislada de un caso de QA de un paciente usuario de lente de contacto blando. Las amibas fueron cultivadas axénicamente en medio Bactocacitona al 2%, enriquecido con suero bovino al 10% y antibiótico (estreptomomicina/penicilina 0.1%), a 30 °C.

Los ensayos se llevaron a cabo cosechando las amibas en fase exponencial de crecimiento (72 h), colocándolas en hielo por 6 min para facilitar su desprendimiento, posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min, finalmente se ajustó el volumen de medio de cultivo para concentrar las amibas acorde a los de cada ensayo.

#### **14.2 Animales de experimentación**

Se utilizaron ratones BALB/c machos de tres semanas de edad, libres de infecciones para realizar ensayos de aumento de virulencia a través de inoculaciones intranasales de trofozoítos de *A. castellanii*.

Para el modelo *ex vivo* de queratitis amibiana se utilizaron hámsters dorados de Siria (*Mesocricetus auratus*) adultos jóvenes con un peso aproximado de 120-130g, libres de patógenos, adquiridos en el bioterio del CINVESTAV del Instituto Politécnico Nacional.

Todos los animales fueron manipulados conforme a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, que indica las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

#### **14.3 Aumento de la virulencia de *Acanthamoeba castellanii***

Con el propósito de aumentar la virulencia de la cepa en estudio, se realizaron inoculaciones intranasales en grupos de 5 ratones BALB/c. Debido a que las amibas han sido cultivadas en el laboratorio varios meses previos a la realización de los ensayos, su virulencia puede verse atenuada a pesar de ser una cepa potencialmente patógena.

Los ratones se anestesiaron ligeramente con vapores de isofluorán, para permitir su manipulación. Se llevó a cabo la inoculación intranasal con trofozoítos de *A. castellanii* ( $1 \times 10^6$  trofozoítos/20 $\mu$ l de medio de cultivo), manteniendo al ratón con la nariz ligeramente hacia arriba (Culbertson, 1959) (Fig. 5). Se dio seguimiento al comportamiento y manifestaciones de la infección amibiana durante 21 días, observando y anotando los cambios en cada ratón como disminución de movimiento o respiración agitada. Los ratones que no murieron durante el lapso de 21 días, fueron sacrificados, se procesaron los órganos con la finalidad de

recuperar las amibas, extrayendo cerebro, hígado, pulmón y riñón en cajas de Petri con agar no nutritivo enriquecido con *Enterobacter aerogenes* (NNE) (inactivada por calor), posteriormente se axenizaron en medio bactocacitona (digestión pancreática de caseína, Becton-Dickinson, Sparks, MD). Este procedimiento se llevó a cabo dos veces (John y Howard, 1993). Las amibas recuperadas fueron utilizadas en los ensayos subsecuentes.



**Fig.5** Inoculación intranasal de  $1 \times 10^6$  trofozoítos de *A. castellanii* en ratón BALB/c con ayuda de una micropipeta.

#### **14.4 Estrategia experimental**

Para evaluar el papel de la taurina sobre los trofozoítos de *A. castellanii*, se conformaron cinco grupos, los cuales se detallan a continuación:

**Grupo a)** Córneas + medio de cultivo amibiano + Taurina (200  $\mu$ M). Grupo control

**Grupo b)** Córneas + medio de cultivo amibiano + *A. castellanii* ( $2.5 \times 10^5$  trofozoítos). Grupo control.

**Grupo c)** Córneas + taurina (200  $\mu$ M) interaccionando 15 minutos, antes de adicionar trofozoítos de *A. castellanii* ( $2.5 \times 10^5$  trofozoítos/medio de cultivo); con el propósito de determinar si la taurina protege las células del epitelio corneal ante la invasión amibiana.

**Grupo d)** Trofozoítos de *A. castellanii* ( $2.5 \times 10^5$  trofozoítos/medio de cultivo) interaccionados 15 min con Taurina (200  $\mu$ M) antes de colocarlos sobre la córnea, con la finalidad de evaluar si la taurina tiene algún efecto sobre los trofozoítos para impedir su adherencia al epitelio corneal.

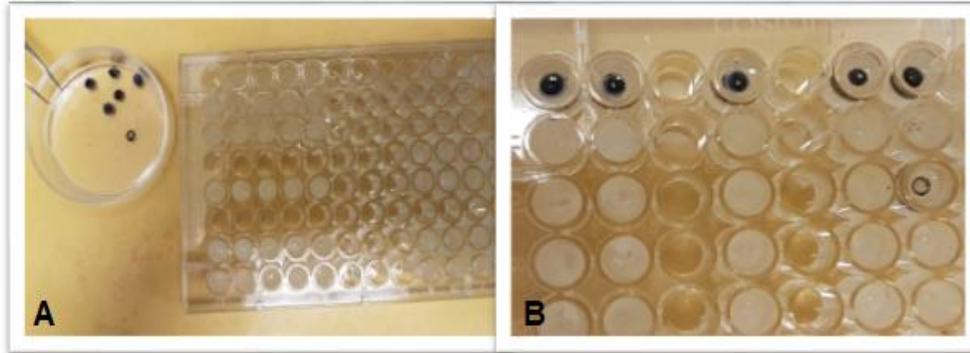
**Grupo e)** Córneas + *A. castellanii* ( $2.5 \times 10^5$  trofozoítos/medio de cultivo) interaccionadas durante 15 minutos. Posteriormente se agregó taurina (200  $\mu$ M), con la finalidad de determinar si la taurina tiene algún efecto sobre los trofozoítos aun cuando ya se han adherido al epitelio corneal.

En todos los casos el volumen final fue de 150  $\mu$ l por cada pozo.

#### **14.5 Obtención del tejido corneal**

Los hámsteres se anestesiaron con pentobarbital sódico (Anestesal) a una dilución de 1:10 en solución salina isotónica estéril y se les practicó punción cardiaca para evitar sangrado al remover el tejido corneal. Las córneas se obtuvieron mediante un procedimiento quirúrgico realizando un corte en la periferia dejando un anillo de esclera para poder manipularlas de esta zona y dejar el tejido corneal intacto. El cristalino no fue retirado hasta que las córneas se fijaron para asegurar la integridad y curvatura de las mismas (Omaña-Molina et al., 2004).

Las muestras recién obtenidas (rodetes esclerocorneales) se colocaron en placas de cultivo de 96 pozos y se mantuvieron en solución salina para su conservación hasta realizar las interacciones con o sin taurina (Fig. 6).



**Fig. 6.** A) Rodetes esclerocorneales en caja de Petri, lavado en solución salina. B) Colocación de muestras en placa de 96 pozos.

Los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo a la estrategia experimental propuesta en el punto **14.4**, considerando dos tiempos de interacción: 3 y 6 h.

#### **14.6 Procesamiento de las muestras**

Todas las muestras se incubaron a 37 °C, posteriormente se fijaron con glutaraldehído al 2.5% (disuelto en cacodilato de Na al 0.1M) durante una hora y colocaron a 4 °C durante 12 h. Se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70-100%) y se secó a punto crítico con CO<sub>2</sub> líquido. Cada una de las muestras se colocó en porta especímenes previamente etiquetados y se recubrieron con una fina capa de oro (30 nm) en un dispositivo de pulverización iónica, para ser observadas en un microscopio electrónico de barrido Jeol-JSM 7100F (análisis cualitativo).

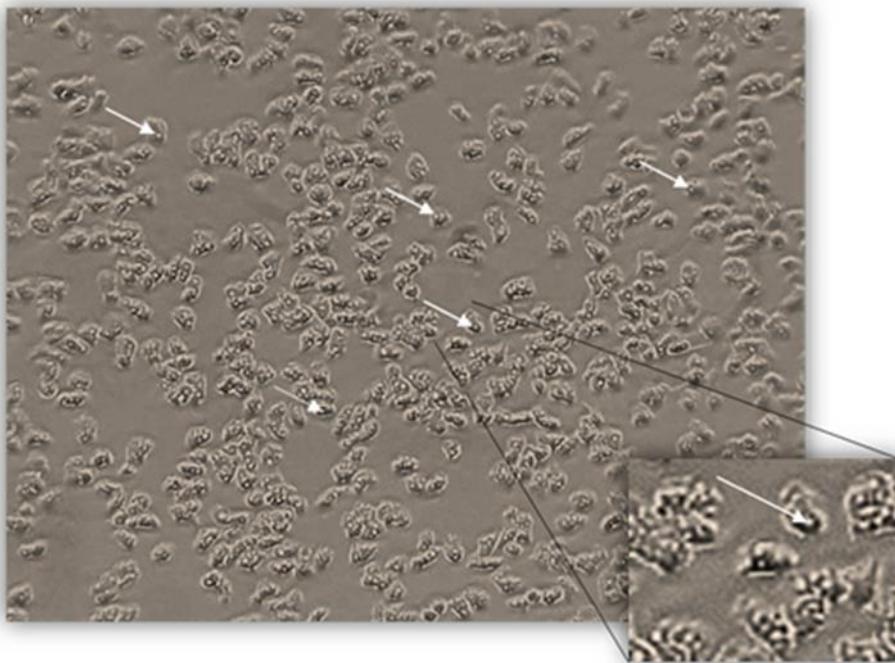
#### **14.7 Análisis cuantitativo**

A partir de las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido se realizó el conteo de los trofozoítos adheridos a las córneas de hámster de cada grupo experimental en tres zonas con igual magnificación 300x. Se obtuvo la media aritmética de amibas adheridas a las córneas de hámster y se realizó un análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ .

## 15 Resultados

### 15.1 Cultivo amibiano

De acuerdo con la metodología propuesta, las amibas fueron cultivadas axénicamente en medio bactocacitona al 2%, enriquecido con suero bovino al 10% y antibiótico (estreptomomicina/penicilina 0.1%), a una temperatura óptima de 30 °C. Se cosecharon en fase exponencial de crecimiento (72 h), con una población 100% trófica (Fig. 7).



**Fig. 7.** Microscopía de luz. Se observan trofozoítos en condiciones óptimas de crecimiento (Fase logarítmica a las 72 h), en la mayoría de ellos sobresale su vacuola contráctil (flechas).

### 15.2 Reactivación de la virulencia de *Acanthamoeba castellanii*

Se reactivó la virulencia de la cepa en estudio mediante dos pases en ratones BALB/c realizando inoculaciones intranasales con trofozoítos de *A. castellanii*. En cada uno de los ensayos, 3 de 5 ratones infectados murieron en lapsos de 10 y 11 días post inoculación (tabla 1), los que no murieron al cabo de 21 días fueron sacrificados. La cepa se recuperó de cerebro y pulmón en todos los ratones, se

axenizó en medio bactocacitona de acuerdo con la metodología y fue utilizada posteriormente para realizar interacciones en córneas de hámster.

Inoculaciones intranasales	Porcentaje de mortalidad de ratones BALB-c	Recuperación de amibas (órganos)
1er grupo (5 ratones)	60%	Pulmón y cerebro
2do grupo (5 ratones)	60%	Pulmón y cerebro

**Tabla 1.** Porcentaje de ratones infectados que murieron antes de 21 días en cada uno de los ensayos, así como los órganos de los que se recuperaron las amibas.

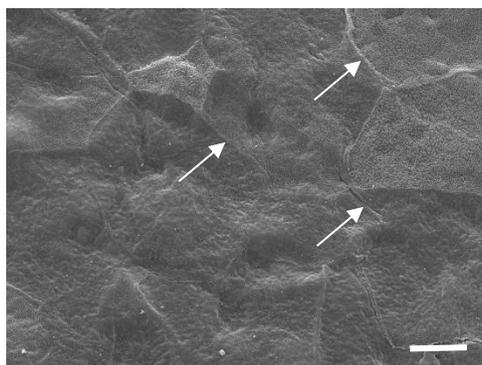
### 15.3 Análisis cualitativo de la interacción de trofozoítos de *A. castellanii* y taurina sobre las córneas de hámster

De acuerdo con el esquema de interacción, se tomaron en cuenta dos tiempos (3 y 6 h). Las muestras se procesaron acorde a la técnica propuesta de microscopía electrónica de barrido.

Debido a que los resultados en ambos tiempos fueron muy similares, se describen a continuación de manera indistinta:

#### Grupo a) Córneas + Taurina. Grupo control

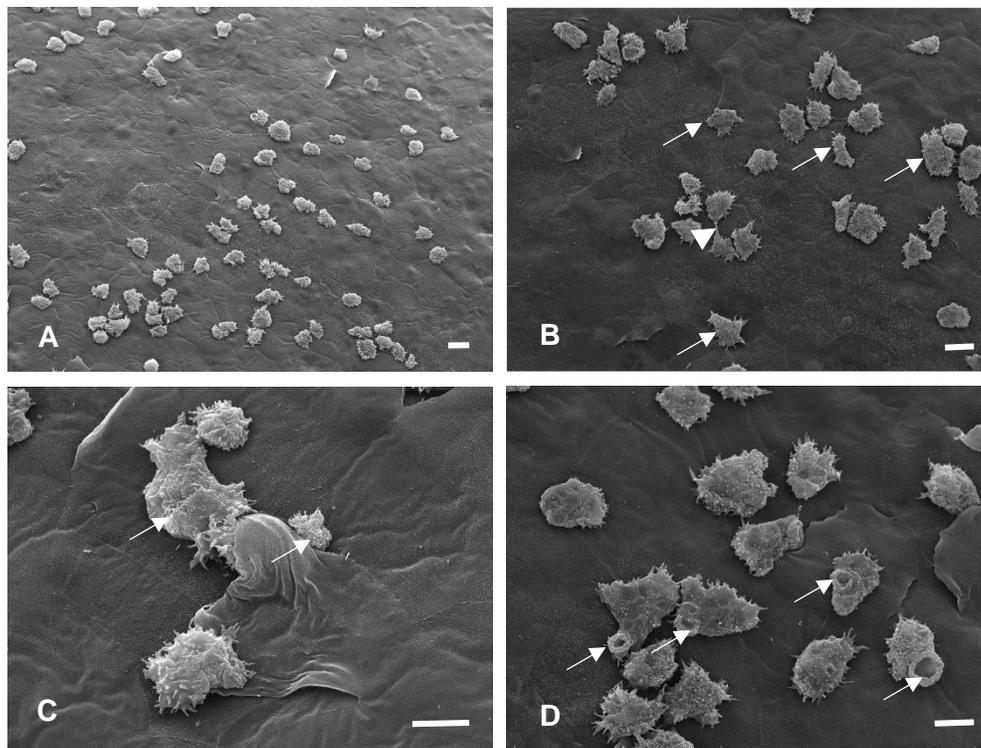
En este grupo se observó la estructura clásica de la superficie corneal; los bordes entre una célula y otra estaban bien delimitados, sin zonas de desepitelización o abrasión (Fig. 8).



**Fig. 8.** Microscopía electrónica de barrido. Córnea control, interaccionada con medio de cultivo amibiano + taurina. Se observa el epitelio intacto, estructura celular sin daño y uniones celulares bien definidas (flechas) (barra=10  $\mu$ m).

**Grupo b) Córneas + *A. castellanii*. Grupo control.**

En aquellas córneas control interaccionadas con medio de cultivo + trofozoítos, se observaron amibas en óptimas condiciones adheridas al epitelio (Fig. 9 A); algunas de estas ubicadas sobre las uniones celulares (flechas) y otras en aparente división celular (Fig. 9 B). En otras zonas se observaron trofozoítos emitiendo bocas fagocíticas (Fig. 9 C) y escasos trofozoítos comenzaron a penetrar entre espacios intercelulares, desprendiendo y fagocitando células superficiales (Fig. 9 D).

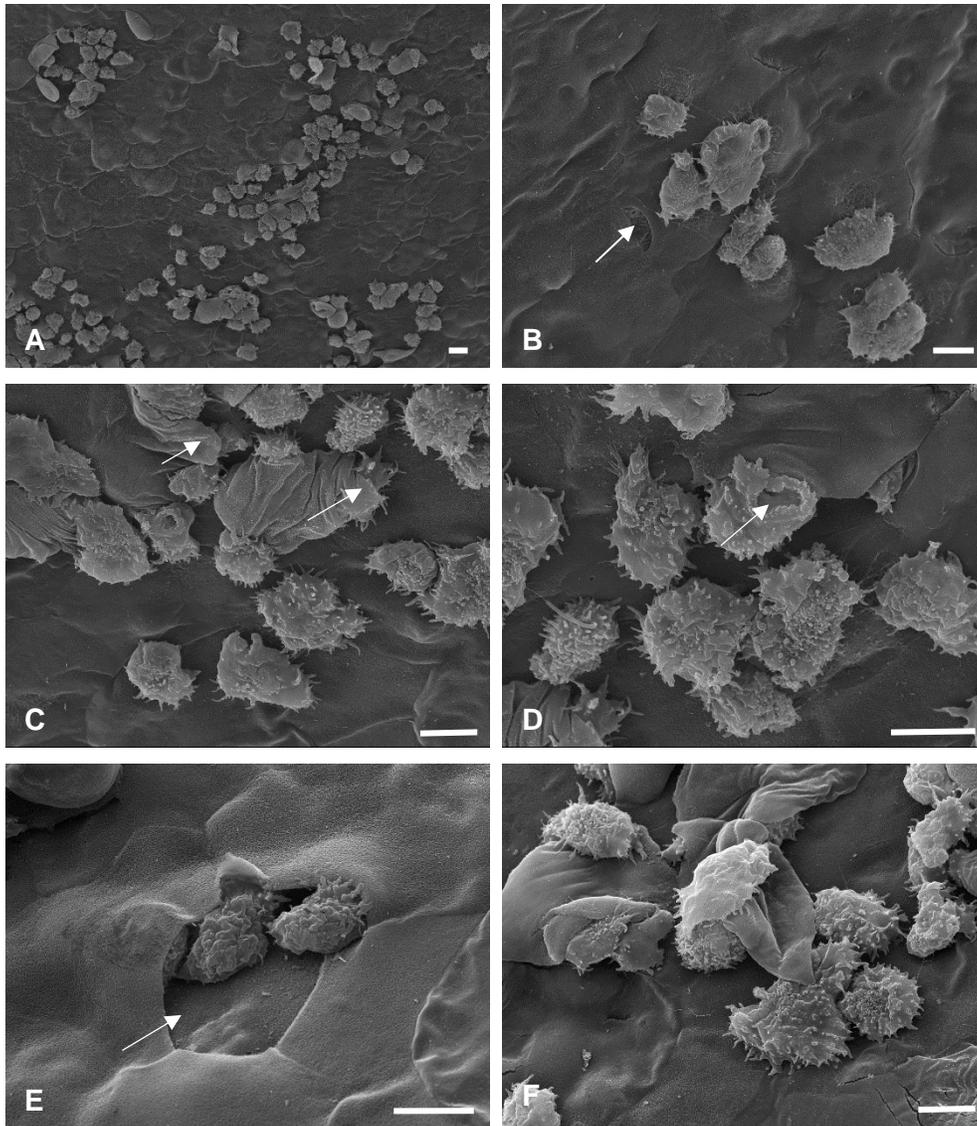


**Fig. 9.** Microscopía electrónica de barrido. **Grupo B)** (control) A) Se observan trofozoítos adheridos a la superficie corneal (barra=100  $\mu$ m). B) algunos se encuentran ubicados sobre las uniones celulares (flechas), las amibas se

encuentran en óptimas condiciones, incluso se observa posible división celular (cabeza de flecha) (barra=10µm).C) Trofozoítos penetrando entre células superficiales del epitelio (flechas) (barra=10 µm). D) Se observa emisión de diversas bocas fagocíticas (flechas) (barra= 10 µm).

**Grupo c) Córneas + taurina interaccionando 15 minutos, antes de adicionar trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii***

En este grupo se observaron abundantes trofozoítos sobre la superficie corneal en comparación con las córneas control (Fig. 10 A vs Fig. 9 A), los cuales en distintas zonas de la córnea penetraron entre uniones celulares y fagocitaron células del epitelio. Se observó daño en zonas adyacentes a las uniones celulares, posiblemente ocasionado por trofozoítos (Fig. 10 B). En algunas zonas se observaron protuberancias que corresponden a la invasión de numerosos trofozoítos dentro de las primeras capas del epitelio corneal. (Fig. 10 C). Algunos trofozoítos se observaron penetrando entre células corneales, fagocitando células superficiales y desarrollando eventualmente bocas fagocíticas (Fig. 10 D) y en algunas zonas se sugiere la fagocitosis de la primera capa celular por trofozoítos, ya que se observan zonas desprovistas de células y células desprendidas, denotando pérdida de la arquitectura corneal (Fig. 10 E-F).



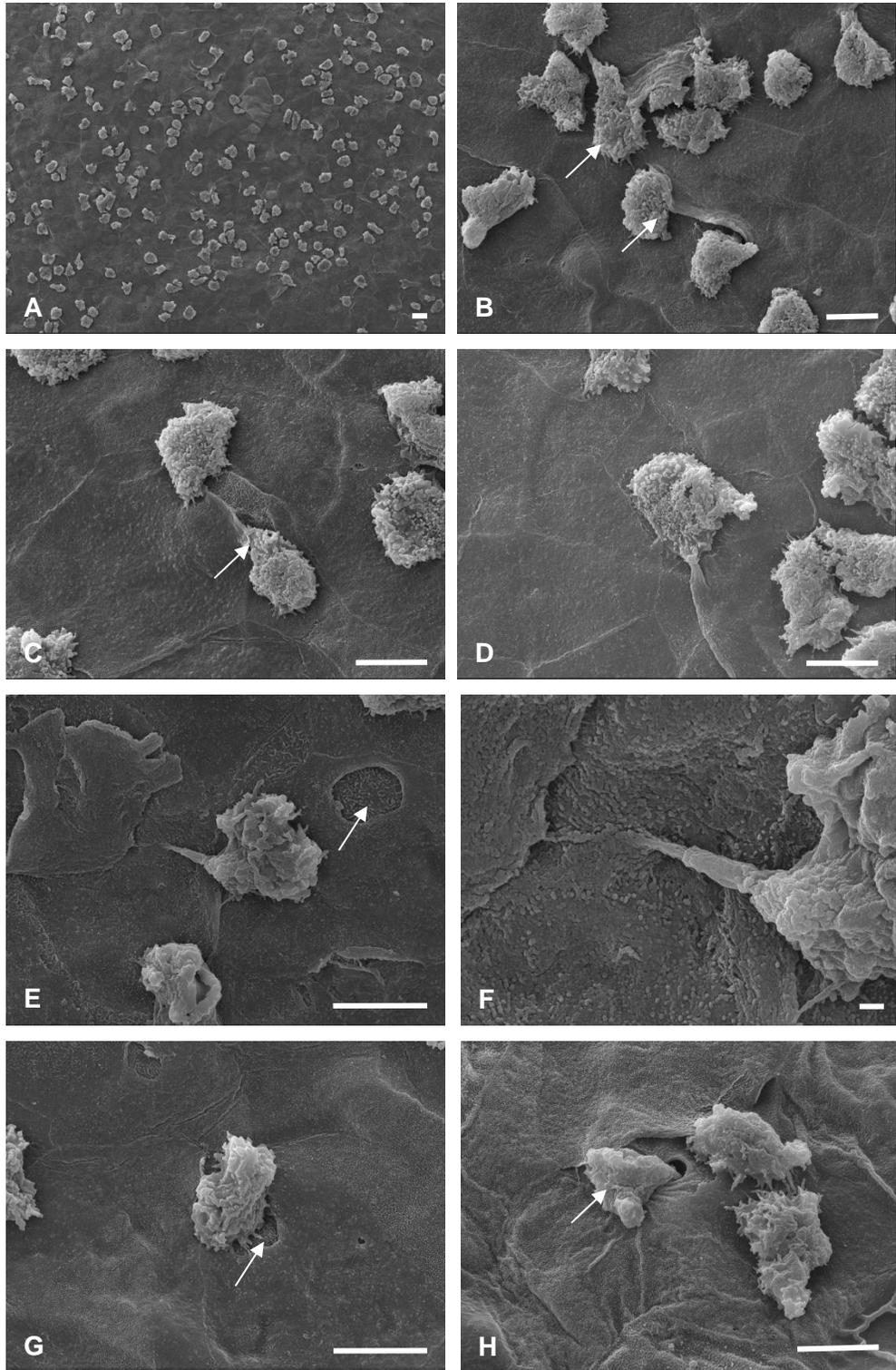
**Fig. 10** Microscopía electrónica de barrido. **Grupo C.** Córneas + taurina interaccionando 15 minutos, antes de adicionar trofozoítos de *A. castellanii*. (A) Se observan abundantes trofozoítos adheridos al epitelio corneal respecto a grupos control (barra=100  $\mu$ m). (B) Se observan trofozoítos sobre el epitelio y una zona de abrasión en célula epitelial (flecha) (barra=10  $\mu$ m). (C) Algunos trofozoítos se encuentran penetrando por debajo de células superficiales formando elevaciones (flechas) (barra=10  $\mu$ m). (D) Trofozoítos penetrando entre capas superficiales de la córnea y emitiendo bocas fagocíticas. (E) Algunos trofozoítos se observan por debajo de la primera capa celular. Se observa un espacio vacío que sugiere la ausencia de una célula epitelial completa (flecha) (barra=10  $\mu$ m). (F) La pérdida de

la arquitectura corneal es evidente, ya que las amibas se observan penetrando y fagocitando células ya desprendidas del epitelio corneal (barra=10  $\mu\text{m}$ ).

**Grupo d) Trofozoítos de *A. castellanii* interaccionados 15 min con Taurina antes de adicionarlos a la córnea**

En este grupo experimental, abundantes trofozoítos con respecto a grupos controles se adhirieron a la superficie corneal, los cuales se encontraban en condiciones óptimas, emitiendo los acantópodos característicos del género (flechas) (Fig. 11 A y B). Las amibas se observaron adheridas, ubicadas sobre uniones celulares, algunas penetrando a través de estas, así como emitiendo bocas fagocíticas o amebostomas, y fagocitando células epiteliales recién desprendidas (Fig. 11 C y D).

Es importante resaltar que algunas amibas se observaron ocasionando daño en zonas adyacentes y alejadas de las uniones celulares, sitio donde usualmente se ha observado que inician la invasión las amibas, lo cual no corresponde a los mecanismos de patogenicidad descritos anteriormente (Fig. 11 E, F, G). Las amibas no solo emitieron bocas fagocíticas o amebostomas anchos y cortos, sino que también emitieron amebostomas semejantes a tubos (Fig. 11 F).Fig. 11 H).

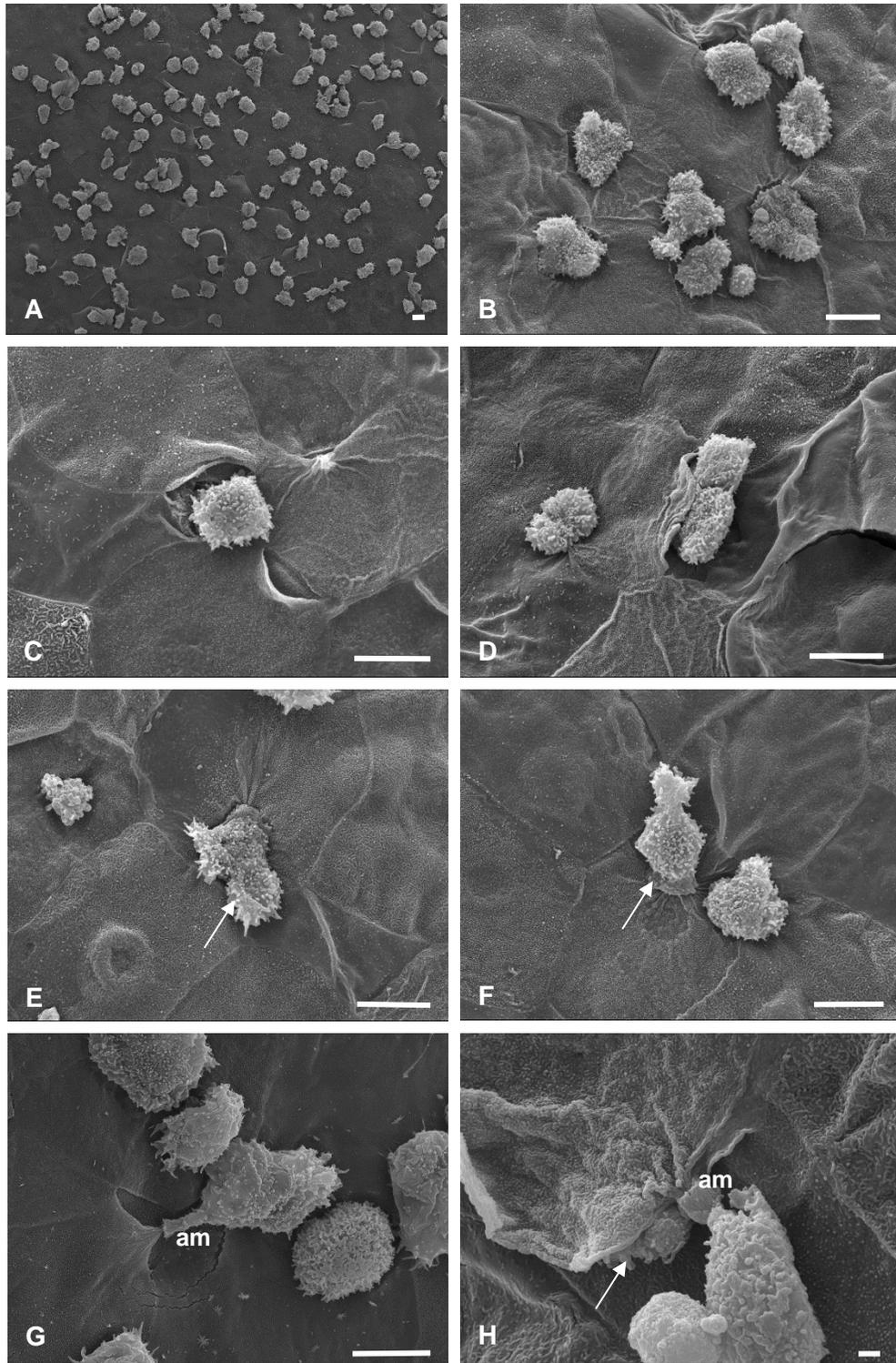


**Fig. 11.** Microscopía electrónica de barrido. **Grupo d)** Trofozoítos + taurina interaccionados 15 minutos antes de adicionarlos la córnea de hámster. A) Se

observan abundantes trofozoítos adheridos a la córnea de hámster (barra=100  $\mu\text{m}$ ). B-C) Trofozoítos penetrando entre uniones celulares (flechas) y fagocitando células desprendidas del epitelio corneal. D) Se observa la emisión de boca fagocítica o amebostoma en trofozoíto (barra=10  $\mu\text{m}$ ). E-F) Amibas fagocitando células corneales, se observa zona de abrasión alejada de uniones celulares (flecha) (E-barra=10  $\mu\text{m}$ ) (F-barra=1  $\mu\text{m}$ ). G) Trofozoíto ocasionando daño, alejado de uniones celulares (flecha) (barra=10  $\mu\text{m}$ ). H) Trofozoíto penetrando hacia capas más profundas de la córnea (flecha) (barra=10  $\mu\text{m}$ ).

**Grupo e) Córneas + *A. castellanii* interaccionadas durante 15 minutos. Posteriormente se agregó taurina**

En el tercer grupo experimental, también se pudieron observar abundantes trofozoítos adheridos al epitelio corneal (Fig. 12 A-B). Algunos más se observaron penetrando por acción mecánica y o enzimática entre uniones intercelulares y fagocitando células epiteliales de acuerdo a los mecanismos de patogenicidad antes descritos (Fig. 12 C-D). En este grupo observamos también trofozoítos ocasionando daño a las células del epitelio sin necesidad de abrirse paso entre las uniones celulares, el cual, es un comportamiento inusual en estos protozoos (Fig. 12 E-F) y al igual que en el segundo grupo experimental se observa el desarrollo de diversos amebostomas mediante los cuales las amibas fagocitan células corneales (Fig. 12 G-H).



**Fig. 12** Microscopía electrónica de barrido. **Grupo e)** Interacción de *A. castellanii* con córneas de hámster adicionando taurina 15 minutos después de colocar las

amibas. A-B) Diversos trofozoítos adheridos al epitelio corneal (A-barra=100  $\mu\text{m}$ ) (B-barra=10  $\mu\text{m}$ ). C-D) Se observan trofozoítos penetrando entre uniones celulares por acción mecánica y/o enzimática (barra=10  $\mu\text{m}$ ). E-F) Actividad amibiana evidente, se observan trofozoítos fagocitando células corneales en zonas alejadas de las uniones celulares que aún no han sido desprendidas (flechas) (barra=10  $\mu\text{m}$ ).G) Trofozoíto fagocitando célula epitelial mediante amebostoma (am) (barra=10  $\mu\text{m}$ ). H) Amiba introduciéndose bajo una capa celular superficial formando una elevación (flecha) (barra=1  $\mu\text{m}$ ). Se observa un trofozoíto fagocitando tejido corneal mediante amebostoma (am) (barra=1  $\mu\text{m}$ ).

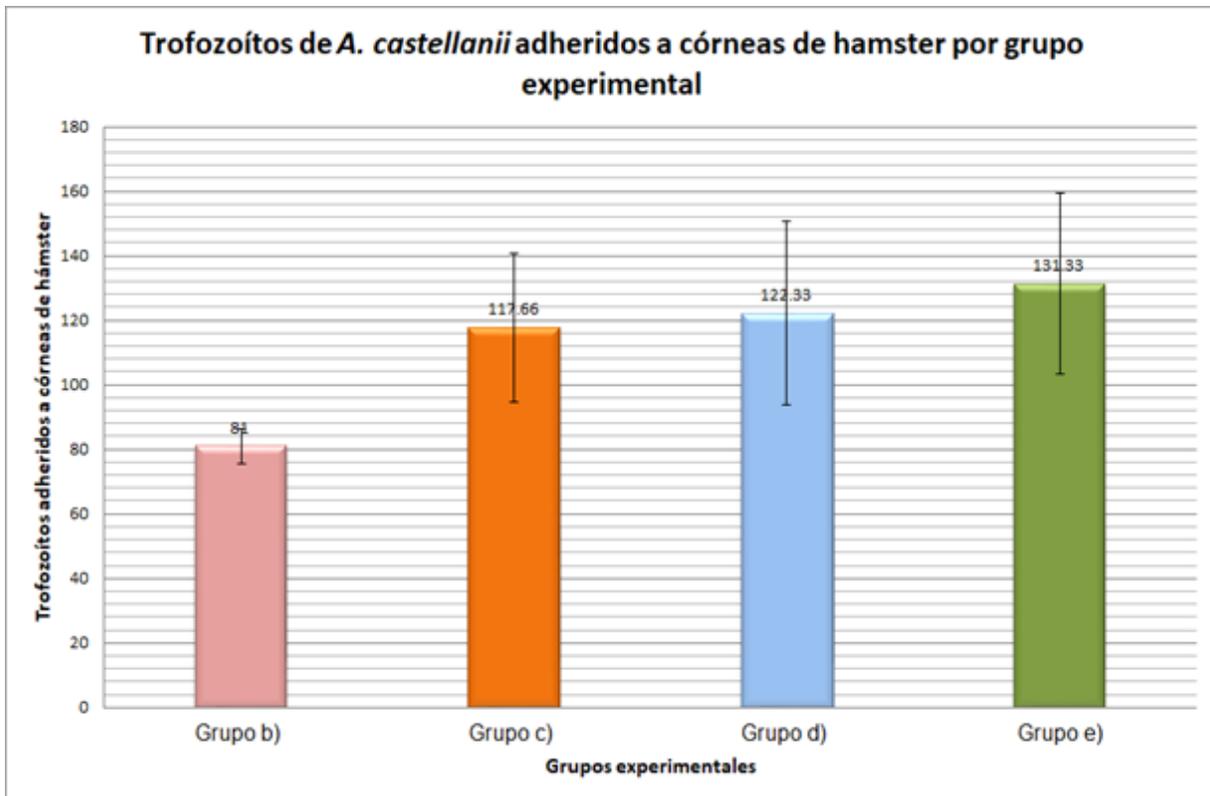
### 15.3.2 Análisis cuantitativo de trofozoítos adheridos a las córneas de hámster

Los resultados del análisis cuantitativo de los trofozoítos adheridos en diferentes zonas de las córneas se desglosan en la tabla 2 y gráfica 1, donde se observa la mayor cantidad de amibas adheridas en los grupos experimentales d) y e), con una media aritmética de 122.33 y 131.33 respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) indican que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la adherencia de trofozoítos a las córneas de hámster entre los diferentes grupos, excepto entre los grupos b y e, lo que indica una mayor adherencia de trofozoítos donde se interaccionaron corneas de hámster con *A. castellanii* y 15 minutos después se adicionó taurina.

Grupos	Media aritmética	Desviación estándar
Grupo b	81	5.56
Grupo c	117.66	23.15
Grupo d	122.33	28.36
Grupo e	131.33	28.21

**Tabla 2.** Trofozoítos de *A. castellanii* adheridos a córneas de hámster dorado de Siria en los 4 grupos experimentales.



**Gráfica 1.** Trofozoítos de *A. castellanii* adheridos a la córnea de hámster por grupo experimental. Las córneas interaccionadas con taurina denotan un aumento en el número de trofozoítos adheridos.

## 16 Discusión

La queratitis por *Acanthamoeba* es una infección ocular de difícil diagnóstico y resolución que puede ocasionar daños irreversibles a la visión si no es tratada oportunamente. Se asocia principalmente al uso de lentes de contacto, higiene deficiente de los mismos, así como al contacto con aguas contaminadas con esta amiba de vida libre.

Ante la invasión corneal por *Acanthamoeba* o cualquier otro patógeno que intenta colonizar la superficie ocular, existen mecanismos de defensa del hospedero, incluyendo los componentes de la lágrima. Se ha demostrado que la IgA impide la adherencia del parásito, pero no tiene ningún efecto durante el curso de la infección una vez que se ha iniciado (Alizadeh *et al.*, 2001), de igual manera se ha

demostrado que la IgA secretora actúa eficazmente ante la adherencia y sirve como quimiotáctico para los neutrófilos (Campos-Rodríguez *et al.*, 2004), los cuales en conjunto con los macrófagos pueden migrar a las áreas específicas de infección y provocar la lisis de las amibas. No obstante, *Acanthamoeba* puede degradar la IgG y la IgA humanas mediante la secreción de serina proteasas (Kong *et al.*, 2000).

En nuestro estudio utilizamos una cepa de *A. castellanii* proveniente de un caso clínico. Esta especie es una de las más frecuentemente aisladas en casos de QA (Siddiqui y Khan, 2012). Para asegurarnos de que las amibas utilizadas en nuestro estudio estuvieran en óptimas condiciones, fue necesario aumentar su virulencia debido a que éste aislado había permanecido en cultivo axénico por largo tiempo (6 meses) (Mazur y Hadas, 1994). La virulencia se incrementó produciendo la infección en ratón y posterior aislamiento de las amibas para su cultivo axénico, es decir, en condiciones similares que cuando se aislaron del caso de QA (Im *et al.*, 1999; Mazur y Hadas, 1994). El incremento en la virulencia de la cepa recuperada del ratón se comprobó debido a que causó la muerte del 60% de los animales de experimentación en los primeros 11 días post inoculación.

En general, se considera que la lágrima es un elemento protector de la superficie ocular. Debido a que como ya se mencionó, en lágrima se encuentra una alta concentración del aminoácido taurina (0.4 a 5.7 mM) (Chen-Zhuo *et al.*, 2000). Enfocamos nuestro estudio en analizar la influencia que la taurina puede ejercer en el proceso de infección durante la QA en el modelo de hámster dorado de Siria (*Mesocricetus auratus*). Estudios previos han descrito los eventos morfológicos tempranos de la invasión de las amibas en la superficie corneal, haciendo inferencias sobre lo que sucede en la córnea humana durante la invasión por *Acanthamoeba*. Hasta el momento se sabe que los trofozoítos son capaces de adherirse a la córnea, migrar hacia uniones celulares y penetrar por acción mecánica y/o enzimática entre células del tejido corneal, fagocitando células desprendidas y desarrollando eventualmente bocas fagocíticas (González-Robles *et al.*, 2006; Omaña Molina *et al.*, 2010; Omaña Molina *et al.*, 2013). Sin embargo,

no se ha analizado el papel que la lágrima o alguno de sus componentes, como lo es el aminoácido taurina pudieran tener en el proceso de invasión.

Se ha reportado la presencia de 23 aminoácidos en la lágrima humana, siendo la taurina el aminoácido libre más abundante (Chen-Zhuo *et al.*, 2000). La falta o disminución de éste, tanto a nivel ocular como sistémico se asocia con patologías como degeneración de células fotorreceptoras en la retina (Schmidt *et al.*, 1976), enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular (Prentice *et al.*, 2015), entre otras. De igual manera se ha comprobado que la taurina posee propiedades citoprotectoras, como antioxidante, osmoregulador y neurotransmisor (Bucolo *et al.*, 2018), sin embargo, no se había estudiado su efecto sobre la superficie ocular, principalmente en su papel como agente protector ante la invasión de parásitos como las amibas del género *Acanthamoeba*, causantes de queratitis amibiana. En el año 2008 Fürnkranz *et al.* realizaron estudios con N- Clorotaurina; derivado de la taurina, demostrando su efectividad amebicida, aunque, la forma química de la taurina difiere de la utilizada en dicho estudio.

En este trabajo se llevaron a cabo interacciones con trofozoítos de *A. castellanii* y taurina sobre córneas de hámster dorado de Siria, con la finalidad de determinar el efecto de este aminoácido ante la invasión amibiana sobre la córnea. Se tomaron en cuenta dos tiempos de interacción de 3 y 6 horas con tres grupos experimentales con resultados muy similares, lo que indica que el proceso de invasión no varía en el lapso de tiempo evaluado, ya que se observó mediante microscopía electrónica de barrido tanto a 3 como a 6 horas, que las amibas que interactuaron con la taurina, invadieron la córnea; se ubicaron no solo entre o sobre las uniones celulares del epitelio corneal, sino que se adhirieron en la superficie de las células del epitelio. Cuando penetraron, formaron elevaciones bajo las capas más superficiales de la córnea. Cabe destacar que se observó un mayor número de amibas adheridas al epitelio corneal en los grupos interaccionados con taurina en comparación con los grupos control en todos los tiempos experimentales (Gráfica 1), a pesar de que las diferencias no fueron estadísticamente significativas, se observó una tendencia de incremento de la

adherencia, principalmente en el grupo E, es decir, al interaccionar trofozoítos de *A. castellanii* sobre la córnea y 15 minutos después agregar taurina.

En todos los grupos estudiados se observaron amibas destruyendo las capas superficiales del epitelio corneal por efecto mecánico y/o enzimático, así como a través de la fagocitosis de las células descamadas. Estos resultados concuerdan con los descritos en estudios previos sobre los mecanismos de patogenicidad de *A. castellanii* (González-Robles *et al.*, 2006; Omaña-Molina *et al.*, 2010). Sin embargo, es importante destacar que en ensayos donde los trofozoítos se incubaron previamente con la taurina, se observaron amibas ocasionando daño en zonas alejadas de las uniones celulares, lo que representa un comportamiento inusual en estos protozoos. Este mecanismo de daño se observó principalmente en los grupos D y E. En estos trofozoítos frecuentemente se observó la formación de amebostomas, lo que sugiere que la taurina podría estar estimulando a los trofozoítos para fagocitar y consecuentemente, exacerbando los procesos de invasión y destrucción del epitelio corneal.

En resumen, las principales diferencias encontradas en los grupos experimentales (C, D y E), con respecto del control fueron: un mayor número de trofozoítos adheridos al epitelio corneal, zonas más extensas de daño con células epiteliales desprendidas y un mayor número de trofozoítos penetrando por debajo de las capas más superficiales del epitelio. También se observaron signos de fagocitosis en algunas zonas alejadas de las uniones celulares, así como trofozoítos desarrollando amebostomas lo que sugiere una alta actividad fagocítica.

## **17 Conclusiones**

Nuestras observaciones mostraron que la taurina per se, no provoca cambios morfológicos sobre la superficie corneal ni sobre los trofozoítos de la cepa en estudio. Así mismo tampoco inhibe o impide la adherencia de los trofozoítos pre incubados con este aminoácido y tampoco favorece el desprendimiento de aquellos trofozoítos adheridos previamente.

En este estudio, se observó que la invasión de trofozoítos en las córneas interaccionadas con taurina fue mayor en comparación con las córneas control. Se observó una tendencia de incremento de la adherencia, un efecto citopático mayor al que usualmente provocan estas amibas en la córnea, ya que no fue necesario que los trofozoítos migraran a los espacios intercelulares y para iniciar la invasión y destrucción del tejido corneal, como usualmente se ha observado y descrito en trabajos anteriores; las amibas fueron capaces de inducir un efecto citopático en cualquier zona del epitelio corneal, así mismo se observó un aumento de la fagocitosis y emisión de amebostomas, sin que previamente las amibas indujeran el desprendimiento de las células blancas, lo que sugiere que la taurina en concentraciones fisiológicas y sin la presencia de otros componentes de la lágrima, favorece la adhesión y los mecanismos de patogenicidad de las amibas sobre la superficie corneal, contrario a la idea del papel citoprotector de la taurina.

## **18 Perspectivas**

Analizar el papel que pudieran tener otros componentes de la lágrima ya sea, protegiendo la superficie ocular o favoreciendo los mecanismos de patogenicidad de *A. castellanii*.

## 19 Bibliografía

- Ahmadian M., Roshan VD., Aslani E. y Stannard SR. 2017. Taurine supplementation has antiatherogenic and anti-inflammatory effects before and after incremental exercise in heart failure. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 11(7):185-194
- Albrecht J. y Schousboe A. 2005. Taurine interaction with neurotransmitter receptors in the CNS: An Update. *Neurochemical Research.* 30(12):1615–1621
- Alizadeh H., Apte S., El-Agha MS., Li L., Hurt M., Howard K., Cavanagh HD., McCulley JP. y Niederkorn JY. 2001. Tear IgA and serum IgG antibodies against *Acanthamoeba* in patients with *Acanthamoeba* keratitis. *Córnea* 20(6):622–627
- Alsam S., Jeong SR., Dudley R., Khan NA. 2008. Role of human tear fluid in *Acanthamoeba* interactions with the human corneal epithelial cells. *International Journal of Medical Microbiology* 298:329–336
- Barker J. y Brown MR. 1994. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* 140:1253-1 259
- Bowers B. y Korn ED. 1969. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff Strain). *The Journal of Cell Biology.*41 (3): 786-805
- Brown TJ., Cursons RT., y Keys EA. 1982. Amoebae from Antarctic soil and water. *Applied and Environmental Microbiology.* 44 (2):491-3
- Bucolo C, Fidilio A, Platania CBM, Geraci F, Lazzara F y Drago F. 2018. Antioxidant and osmoprotecting activity of taurine in dry eye models. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics.*34 (1-2):188-194
- Campos-Rodríguez R., Oliver-Aguillón G., Vega-Pérez L., Jarillo-Luna A., Hernández-Martínez D., Rojas-Hernández S., Rodríguez-Monroy MA., Rivera-Aguilar V., y González-Robles A. 2004. Human IgA inhibits adherence of *Acanthamoeba polyphaga* to epithelial cells and contact lenses. *Can. J. Microbiol.* 50:711–718

- Chávez-Munguía B., Omaña-Molina M., González-Lázaro M., González-Robles A., Bonilla P. y Martínez-Palomo A. 2005. Ultrastructural study of encystation and excystation in *Acanthamoeba castellanii*. *J Eukaryot Microbiol.* 52(2):153-8
- Chen HB., Yamabayashi S., Ou B., Tanaka Y., Ohno S., y Tsukahara S. 1997. Structure and composition of rat precorneal tear film a study by an *In vivo* cryofixation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 38 (2): 381-7
- Chen-Zhuo L., Murube J., Latorre A. y Martín-Del Río R. 2000. The presence of high amounts of amino acid taurine in human tears. *Arch. Soc. Canar. Oftal.* 11: 11-12
- Clarke DW., Alizadeh H., y Niederkorn JY. 2005. Failure of *Acanthamoeba castellanii* to produce intraocular infections. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*46(7): 2472-8
- Corsaro D., Walochnik J., Köhler M. y 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
- Culbertson CG, Smith JW, Cohen HK. y Minner JR. 1959. Experimental infection of mice and monkeys y *Acanthamoeba*. *The American Journal of Pathology.* 35 (1): 185–197
- Dart JK., Saw VP., y Kilvington S. 2009. *Acanthamoeba* keratitis: Diagnosis and treatment update 2009. *Am J Ophthalmol*; 148:487–499
- Davis MJ., Packo KH., Epstein RJ., Grostern RJ. y Cohen JA. 2010. *Acanthamoeba* endophthalmitis following penetrating keratoplasty for *Acanthamoeba* keratitis. *Arch Ophthalmol.* 128 (4): 505-6
- Decavel C. y Hatton GI. Taurine Immunoreactivity in the rat supraoptic nucleus: Prominent localization in glial cells. 1995. *The Journal Of Comparative Neurology.* 354 (1): 13-26
- Flanagan JL. y Willcox, MD. 2009. Role of lactoferrin in the tear film. *Biochimie.* 91 (1): 35-43

- Fleming A. Bacteriolytic element found in tissues and secretions. 1922. Royal Society of London.93 (653): 306-317
- Fowler M. y Carter RF. 1965. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. Brit. Med. J. 2, 740-742
- Franconi F., Stendardi I., Failli P., Matucci R., Baccaro C., Montorsi L., Bandinelli R. y Giotti A. 1985.The protective effects of taurine on hypoxia (performed in the absence of glucose) and on reoxygenation (in the presence of glucose) in guinea-pig heart. Biochemical Pharmacology. 34 (15), 2611-2615
- Froger N., Moutsimilli L., Cadetti L., Jammoul F., Gauche D., Rosolen SG., Neveux N., Cynober L., Sahel JA., Picaud S. 2014.Taurine: The comeback of a nutraceutical in the prevention of retinal degenerations. Progress in retinal and eye research 41: 44-63
- Garg A., Donnenfeld E., Sheppard J. 2008. Ojo Seco y otros Trastornos de la Superficie Ocular. Ed. Médica Panamericana. Pág. 9
- Gelman BB., Rauf. SJ., Nader R., Popov V., Borkowski., Chaljuf., Nauta HW., Visvesvara GS. 2001.Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. JAMA; 285 (19): 2450-1
- González-Robles A., Castañón G., Cristóbal-Ramos AR., Lázaro-Haller A., Omaña-Molina M., Bonilla P., Martínez-Palomo A. 2006. *Acanthamoeba castellanii*: Structural basis of the cytopathic mechanisms. Experimental Parasitology. 114 (3): 133-40
- Gopinathan U., Sharma S., Garg P., Rao GN. 2009. Review of epidemiological features, microbiological diagnosis and treatment outcome of microbial keratitis: Experience of over a decade. Indian J Ophthalmol. 57 (4): 273-9
- Hankiewicz J. y Swierczek E. 1974. Lysozyme in human body fluids. Clinica Chimica Acta. 57 (3): 205-9
- Hernández-Galilea E., Juan-Marcos L. 2013. Fundamentos de oftalmología: Para Grados Biosanitarios en Enfermería Óptica y Optometría. Terapia ocupacional. Ediciones Universidad de Salamanca.87 (51)

- Hernández-Martínez D., Reyes-Batlle M., Castelan-Ramírez I., Hernández-Olmos P., Vanzzini-Zago V., Ramírez-Flores E., Sifaoui I., Piñero JE., Lorenzo-Morales J. y Omaña-Molina M. 2019. Evaluation of the sensitivity to chlorhexidine, voriconazole and itraconazole of T4 genotype *Acanthamoeba* isolated from Mexico. 197: 29-35
- Huxtable RJ. 1992. Physiological actions of taurine. *Physiological Reviews*. 72 (1): 101-63
- Im, KI., Park KM., Yong TS., Hong YP. y Kim TE. 1999. Upregulated expression of the cDNA fragment possibly related to the virulence of *Acanthamoeba culbertsoni*. *Korean J. Parasitol.* 37 (4): 257-63
- Ito T., Miyazaki N., Schaffer S., Azuma J. 2015. Potential Anti-aging role of taurine via proper protein folding: A study from taurine transporter knockout mouse. *Advances in experimental medicine and biology*. 803: 481-7
- Jager BV. y Stamm WP. 1972. Brain abscesses caused by free living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *The Lancet*. 2 (7791): 1343-5
- Jong CJ., Azuma J., Schaffer S. 2012. Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production. *Amino Acids*. 42 (6): 2223-32
- Knop E. y Knop N. 2005. The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. *J. Anat.* 206 (3): 271-85
- Kong HH., Kim TH, y Chung DI. 2000. Purification and characterization of a secretory serine proteinase of *Acanthamoeba healyi* isolated from GAE. *J. Parasitol.* 86 (1): 12-7.
- Król-Turmińska K. y Olender A. 2017. Human infections caused by free-living amoebae. *Ann Agric Environ Med*. 24 (2): 254-260
- Kudo Y., Akiyoshi E. y Akagi H. 1988. Identification of two taurine receptor subtypes on the primary afferent terminal of frog spinal cord. *Br. J. Pharmacol.* 94 (4): 1051-6
- Lorenzo-Morales J., Khan NA., y Walochnik J. 2015. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*. 22: 10

- Marciano-Cabral F. y Cabral G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical microbiology reviews*. 16 (2): 273-307
- Marcinkiewicz J. y Kontny E. 2014. Taurine and inflammatory diseases. *Amino Acids*. 46 (1): 7-20
- Martinez AJ., y Visvesvara GS. 1997. Free-living, Amphizoic and opportunistic amebas. *Brain pathology*. 7 (1): 583-98
- Mathers DA., Grewal A., y Wang YH. 1989. Membrane channels activated by taurine in cultured mouse spinal cord neurons. *Neuroscience Letters*. 98 (2): 229-33
- Maycock NJ. y Jayaswal R. 2016. Update on *Acanthamoeba* Keratitis: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. *Cornea*. 35 (5): 713-20
- Mazur T. y Hadás E. 1994. The effect of the passages of *Acanthamoeba* strains through mice tissues on their virulence and its biochemical markers. *Parasitol. Res.* 80 (5): 431-4
- Mcdermott AM. 2013. Antimicrobial compounds in tears. *Eye Res.* 117: 53-61
- Mergeryan H. 1991. The Prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment. *Reviews of infectious diseases*. 13 Supl 5: S390-1
- Moshari A., McLean IW., Dodds MT., Damiano RE. y McEvoy PL. 2001. Chorioretinitis after keratitis caused by *Acanthamoeba*. *Ophthalmology*. 108 (12): 2232-6
- Nagington J., Watson PG., Playfair TJ., Barrie J., Jones BR. y Steele AD. 1974. Amoebic infection of the eye. *The Lancet*. 2 (7896): 1537-40
- Nakatsukasa M., Sotozono., Shimbo K., Ono N., Miyano H., Okano A., Hamuro J. y Kinoshita S. 2011. Amino acid profiles in human tear fluids analyzed by high-performance liquid chromatography and electrospray Ionization tandem mass spectrometry. *Am J Ophthalmol*. 151 (5): 799-808
- Omaña-Molina M., González-Robles A., Salazar-Villatoro LI., Cristóbal-Ramos AR., González-Lázaro M., Salinas-Moreno E., Méndez-Cruz R., Sánchez-Cornejo M., De la Torre-González E. y Martínez-Palomo A. 2010. *Acanthamoeba castellanii*: Morphological analysis of the interaction with human cornea. *Experimental Parasitology*. 126 (1): 73-8

- Omaña-Molina M., Vanzzini-Zago V., Hernández-Martínez D., Gonzalez-Robles A., Salazar-Villatoro L., Ramírez-Flores E., Oregon-Miranda E., Lorenzo-Morales J. y Martínez-Palomo A. 2016. *Acanthamoeba* genotypes T3 and T4 as causative agents of amoebic keratitis in México. *Parasitol Res.* 115 (2): 873-8
- Omaña-Molina, M., Navarro-García F., González-Robles A., Serrano-Luna Jde J., Campos-Rodríguez R., Martínez-Palomo A., Tsutsumi V. y Mineko S. 2004. Induction of morphological and electrophysiological changes in hamster cornea after *In vitro* interaction with trophozoites of *Acanthamoeba* spp. *Infection and Immunity.* 72 (6): 3245-51
- Page FC. 1967. Taxonomic Criteria for Limax Amoebae, with Descriptions of 3 New Species of *Hartmannella* and 3 of *Vahlkampfia*. *J. Protozool.* 14 ( 3 ): 499-521
- Park JS., Simpson AG., Brown S. y Cho BC. 2009. Ultrastructure and molecular phylogeny of two *Heterolobosean* amoebae, *euplaesiobystra hypersalinica* gen. et sp. nov. and *Tulamoeba peronaphora* gen. et sp. nov., isolated from an Extremely Hypersaline Habitat. *Protist.* 160 (2): 265-83
- Pérez-Irezábal J., Martínez I., Isasa P. y Barrón J. 2006. Queratitis por *Acanthamoeba*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 24 Supl 1:46-52
- Prentice H., Modi JP. y Wu JY. 2015. Mechanisms of neuronal protection against excitotoxicity, endoplasmic reticulum stress, and mitochondrial dysfunction in stroke and neurodegenerative diseases. Hindawi Publishing Corporation *oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2015: 964518
- Preston TM., Richards H. y Wotton RS. 2001. Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water-air interface of ponds. *FEMS Microbiology Letters.* 194 (2): 143-7
- Qu XD y Lehrer RI. 1998. Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. *Infection and Immunity.* 66 (6): 2791-7
- Redl B. 2000. Human tear lipocalin. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1482 (1-2): 241-8

- Ricci L., Valoti M., Sgaragli G. y Frosini M. 2009. Protection by taurine of rat brain cortical slices against oxygen glucose deprivation- and reoxygenation-induced damage. *European Journal of Pharmacology*. 621 (1-3): 26-32
- Rikimaru M., Ohsawa Y., Wolf AM., Nishimaki K., Ichimiya H., Kamimura N., Nishimatsu S., Ohta S. y Sunada Y. Taurine ameliorates impaired the mitochondrial function and prevents stroke-like episodes in patients with MELAS. 2012. *Intern Med*. 51 (24): 3351-7
- Ripps H. y Shen W. 2012. Review: Taurine: A “very essential” amino acid. *Molecular Vision*. 18: 2673-86
- Rusciano D., Roszkowska AM., Gagliano C., y Pezzino S. 2016. Free amino acids: an innovative treatment for ocular surface disease. *European Journal of Pharmacology*. 787: 9-19
- Sack RA., Nunes I., Beaton A. y Morris C. 2001. Host-Defense Mechanism of the ocular surfaces. *Bioscience Reports*. 21 (4): 463-80
- Sawyer TK. y Griffin JL. 1975. A Proposed new family, *Acanthamoebidae* N. Fam. (Order Amoebida), or certain cyst-forming filose amoebae. *Rans. Amer. Micros. Soc.* 94(1)93-98
- Schaffer S. y Kim HW. 2018. Effects and mechanisms of taurine as a therapeutic agent. *Biomol Ther*. 26 (3): 225-241
- Schaffer SW., Jong CJ., Ito T., Azuma J. 2014. Role of taurine in the pathologies of MELAS and MERRF. *Amino Acids*. 46 (1): 47-56
- Schmidt SY., Berson EL., y Hayes KC. 1976. Retinal degeneration in cats fed casein taurine deficiency. *Investigative Ophthalmology*. 15 (1): 47-52
- Schroeder JM., Booton GC., Hay J, Niszl IA., Seal DV., Markus MB., Fuerst PA. y Byers TJ. 2001. Use of subgenomic 18s ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *Journal Of Clinical Microbiology*. 39 (5): 1903-11
- Shetewy A., Shimada-Takaura K., Warner D., Jong CJ., Mehdi AB., Alexeyev M., Takahashi K., Schaffer SW. 2016. Mitochondrial defects associated with b-

- alanine toxicity: relevance to hyper-beta-alaninemia. *Mol Cell Biochem.* 416 (1-2):11-22
- Siddiqui R. y Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. 2012. *Parasites & Vectors*, 5:6
- Siddiqui R., Lakhundi S., Iqbal J. y Khan NA. 2016. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on biological properties of *Acanthamoeba castellanii* belonging to the T4 genotype. *Experimental Parasitology.* 168: 45-50
- Tomita M., Wakabayashi H., Shin K., Yamauchi K., Yaeshima T. y Iwatsuki K. 2009. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie.* 91 (1): 52-7
- Torras J. y Moreno S. Lágrimas artificiales. 2006. *Annals d'Oftalmologia.* 14(2):70-84
- Tzu-Yu., Yun-Chen C. y Chih-Chien H. 2017. Rapid resolution of stromal keratitis with the assistance of oral voriconazole in resistant acanthamoeba keratitis. *Taiwan J Ophthalmol.* 7(4): 224–226
- Vanzzini-Zago V., Ramos-Betancourt N., Omaña-Molina M. y Rodríguez A. Aminoglicoside/Imidazole in the Treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *J Ophthalmol Clin Res.* 2 (2) 1-4
- Visvesvara GS. Infections with free-living amebae. 2013. *Handbook of clinical neurology.* 114: 153-68
- Visvesvara GS. y Schuster FL. 2008. Opportunistic free-living amebae, Part I. *Clinical Microbiology Newsletter* 30:20
- Visvesvara GS., Martinez AJ., Schuster FL., Leitch GJ., Wallace SV., Sawyers TK. y Anderson M. 1990. Leptomyxid Ameba, a new agent of amebic meningoencephalitis in humans and animals. *Journal of Clinical Microbiology.* 28 (12): 2750-6
- Willcox MD., Morris CA, Thakur A., Sack RA., Wickson J. y Boef W. 1997. Complement and complement regulatory proteins in human tears. *Investigative ophthalmology & visual science.* 38 (1): 1-8