



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOMEDICINA

**“AUTOFAGIA Y NECROSIS DE CÉLULAS DE SCHWANN COMO MECANISMOS
DE MUERTE CELULAR POR *Acanthamoeba*”**

TESIS

(POR ARTÍCULO CIENTÍFICO)

**“SCHWANN CELL AUTOPHAGY AND NECROSIS AS MECHANISMS OF CELL
DEATH BY *Acanthamoeba*”**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ISMAEL CASTELAN RAMÍREZ

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARITZA AURELIA OMAÑA MOLINA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. MARIA ROSA ÁVILA COSTA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

DRA. VERÓNICA ANAYA MARTÍNEZ
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD, UNIVERSIDAD ANÁHUAC.

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, OCTUBRE, 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOMEDICINA

**“AUTOFAGIA Y NECROSIS DE CÉLULAS DE SCHWANN COMO MECANISMOS
DE MUERTE CELULAR POR *Acanthamoeba*”**

TESIS

(POR ARTÍCULO CIENTÍFICO)

**“SCHWANN CELL AUTOPHAGY AND NECROSIS AS MECHANISMS OF CELL
DEATH BY *Acanthamoeba*”**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ISMAEL CASTELAN RAMÍREZ

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARITZA AURELIA OMAÑA MOLINA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. MARIA ROSA ÁVILA COSTA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

DRA. VERÓNICA ANAYA MARTÍNEZ
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD, UNIVERSIDAD ANÁHUAC.

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, 2020.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/Folio de la Coord./2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **10 de agosto de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del alumno **CASTELÁN RAMÍREZ ISMAEL** con número de cuenta **309113595** por la modalidad de graduación de tesis por artículo científico titulado: **"Schwann cell autophagy and necrosis as mechanisms of cell death by *Acanthamoeba*"**, que es producto del proyecto realizado en la maestría que lleva por título: **"Autofagia y necrosis de células de Schwann como mecanismos de muerte celular por *Acanthamoeba***, ambos realizados bajo la dirección de la **DRA. MARITZA OMAÑA MOLINA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: **DRA. MARCELA ROJAS LEMUS**
Vocal: **DRA. MARIA DEL ROSARIO SÁNCHEZ RODRÍGUEZ**
Secretario: **DRA. MARIA ROSA DE LOURDES ÁVILA COSTA**
Suplente: **M. en C. ELIZABETH RAMÍREZ FLORES**
Suplente: **DRA. NORMA RIVERA FERNÁNDEZ**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 22 de septiembre de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyacacán, C. P. 04510 CDMX
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbio.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por la oportunidad brindada y su invaluable apoyo académico para la realización de mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado a través de la beca número 858867 durante el periodo que tomó la realización de esta tesis.

A mi tutora, la Dra. Maritza Omaña Molina, por su total apoyo en mi formación como investigador, así como para la realización de este proyecto.

A la Dra. Verónica Anaya Martínez y a la Dra. María Rosa Ávila Costa por compartir sus valiosos conocimientos para mejorar este trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A las personas más importantes de mi vida, mis padres Ismael y Guadalupe, por seguir siendo el principal pilar para realizar mis sueños. Su apoyo y amor incondicional siempre serán la motivación para seguir creciendo tanto personal como profesionalmente, ¡Los amo!

A mis hermanos, Miriam, Paola, Ricardo por su total apoyo y comprensión para alcanzar cada meta que me propongo. Sin ustedes no sería lo mismo.

Mis sobrinos, Abraham, Abril, Paula, Daniela, por llegar y hacerme la vida más amena, son mi todo.

Abuelitos, tíos, primos por los momentos de diversión en este camino.

A mis amigos biólogos, Diana, Eli, Tania, Yessica, Rodrigo porque a pesar de los diferentes caminos que tomamos, sé que siguen presentes.

A mis amigos de la gloriosa P4, especialmente a Alma, que después de 10 años seguimos siendo cómplices y apoyándonos en cada locura.

A los más fiesteros del mundo, pero a la vez con los que sé que también puedo contar en los malos y difíciles momentos, Adriana, Gisela, Alberto, Eduardo, que lo que el cine unió, la música “moderna” lo una aún más.

A mis compañeros de laboratorio por hacer amena la estadía.

A mi tutora, la Dra. Maritza Omaña, por continuar guiándome en este hermoso mundo de las amibas, además de sus buenos consejos como amiga.

Al laboratorio 1 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINEVESTAV-IPN por su apoyo para la realización de este trabajo, especialmente a la Biol. Liz y la Dra. Bibiana Chávez, muchas gracias por sus consejos y apoyo, en verdad aprendí muchísimo.

A mi comité tutorial, la Dra. Verónica Anaya y la Dra. María Rosa Ávila, por todo su compromiso, consejos y sabiduría para mejorar cada aspecto de este trabajo.

A mi amada UNAM, que desde bachillerato me ha brindado todo el apoyo para realizar mis sueños y superarme profesionalmente.

A todos y cada uno de los participantes de este proyecto, muchas gracias por su apoyo.

¡GRACIAS!

DEDICATORIA

A mis padres con todo el amor y respeto...

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN	7
OBJETIVO	9
ARTÍCULO PUBLICADO	10
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIÓN	30
REFERENCIAS	31

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

EAG: Encefalitis amibiana granulomatosa

SNC: Sistema nervioso central

CS: Células de Schwann

MEB: Microscopía electrónica de barrido

MET: Microscopía electrónica de transmisión

MC: Microscopía confocal

AVL: Amibas de vida libre

QA: Queratitis amibiana

SNP: Sistema nervioso periférico

MDCK: Madin–Darby Canine Kidney cell

RESUMEN

Las amibas del género *Acanthamoeba* son los agentes etiológicos de la encefalitis amibiana granulomatosa (EAG). Recientemente a través de un modelo *in vivo* de EAG, se inmunolocalizaron trofozoítos de *Acanthamoeba* en contacto con células del sistema nervioso periférico (SNP), las células de Schwann (CS). En este estudio, se analizó *in vitro* los eventos morfológicos (1, 2, 3 y 4 h) de la interacción de trofozoítos de *A. culbertsoni* (ATCC 30171) con células de Schwann de *Rattus norvegicus* (ATCC CRL-2941). Las muestras se procesaron para microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET), así como para microscopía confocal (MC). Después de una hora de interacción, se observaron amibas adheridas a los cultivos de CS emitiendo estructuras estrechas y alargadas semejantes a ventosas, asociadas con canales microfagocíticos. Además, se observaron organelos edematosos característicos de necrosis y cuerpos multi-vesiculares y multi-laminares que muestran procesos autofágicos. A las 2 h, las amibas migraron por debajo de las células del cultivo, en donde la necrosis y la autofagia persistieron. A las 3 y 4 h, extensas áreas líticas fueron evidentes. A través de MC, se confirmó la muerte celular por necrosis en las células de Schwann. En este trabajo se reporta por primera vez la inducción de procesos autofágicos y necróticos en las células del sistema nervioso periférico, asociados en parte con los mecanismos patogénicos dependientes de contacto de los trofozoítos de *A. culbertsoni*.

ABSTRACT

Amoebae of the genus *Acanthamoeba* are etiological agents of granulomatous amoebic encephalitis (GAE). Recently, through an *in vivo* GAE model, *Acanthamoeba* trophozoites were immunolocalized in contact with the peripheral nervous system (PNS) cells—Schwann cells (SC). In this study, we analyzed in greater detail the *in vitro* early morphological events (1, 2, 3, and 4 h) during the interaction of *A. culbertsoni* trophozoites (ATCC 30171) with SC from *Rattus norvegicus* (ATCC CRL-2941). Samples were processed for scanning and transmission electron microscopy as well as confocal microscopy. After 1 h of interaction, amoebae were observed to be adhered to the SC cultures, emitting sucker-like structures associated with micro-phagocytic channels. In addition, evidence of necrosis was identified since edematous organelles as well as multivesicular and multilamellar bodies characteristics of autophagy were detected. At 2 h, trophozoites migrated beneath the SC culture in which necrosis and autophagy persisted. By 3 and 4 h, extensive lytic zones were observed. SC necrosis was confirmed by confocal microscopy. We reported for the first time the induction of autophagic and necrotic processes in PNS cells, associated in part with the contact-dependent pathogenic mechanisms of *A. culbertsoni* trophozoites.

INTRODUCCIÓN

Las amibas son un grupo de eucariontes unicelulares morfológicamente diverso, las cuales comparten la habilidad de emitir pseudópodos, permitiendo el movimiento y alimentación por fagocitosis. La biodiversidad de los organismos ameboideos es enorme y generalmente son los protozoos más comunes en el mundo. La mayoría de las amibas tienen una distribución cosmopolita en el medio ambiente, muchas de ellas se adaptan a ambientes extremos con altas temperaturas, altas salinidades y otras tensiones. Algunas amibas son estrictamente parásitas y no pueden vivir sin un huésped como *Entamoeba histolytica* que causa principalmente infecciones del tracto intestinal y otras que principalmente son de vida libre, sin embargo, al entrar en contacto con algún huésped pueden causar infecciones graves y eventualmente fatales (Walochnick, 2018).

AMIBAS DE VIDA LIBRE

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoos cosmopolitas que habitan ambientes húmedos como el suelo y el agua, aunque también se pueden encontrar en el aire, vehículo que utilizan como medio de dispersión. En los ecosistemas acuáticos desempeñan un papel muy importante en el mantenimiento del flujo de energía y el reciclado de los nutrientes. Su eficiencia en el uso de los recursos los convierte en un enlace fundamental entre los organismos desintegradores y aquellos pertenecientes a niveles tróficos superiores (Bonilla *et al.*, 2004; Kalra *et al.*, 2019).

A las AVL también se les conoce como amibas anfizoicas porque tienen la dualidad tanto de vivir libremente en la naturaleza, como la capacidad parasitar e inducir enfermedades en el ser humano y en algunos animales. De las más de 100 especies de AVL, sólo algunas del género *Acanthamoeba*, y las especies *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* y *Sappinea pedata* son conocidas por ser anfizoicas (Page, 1976;1988; Visvesvara, 2013).

El estudio de todas las amibas anfizoicas es de vital importancia, sin embargo, debido su gran distribución ambiental, las especies de amibas del género

Acanthamoeba representan una amenaza mayor para la salud y la vida humana, especialmente para las personas con un nivel de inmunidad deteriorado (Kot *et al.*, 2018).

Acanthamoeba

Las amibas del género *Acanthamoeba* son microorganismos aerobios, lo cual les permite completar su ciclo biológico en el medio ambiente, alternándose en dos estadios: la forma activa que se alimenta y reproduce por fisión binaria (mitosis), llamada “trofozoíto” y una forma inactiva de resistencia, llamada “quiste” (Gallegos-Neyra, *et al.*, 2014; Cabello-Vílchez, 2015).

La morfología del trofozoíto varía en tamaño de 25 a 40 μm según la especie, se caracteriza por tener un núcleo con nucleolo central, una vacuola contráctil simple y numerosas vacuolas digestivas (Figura 1). Emiten dos tipos de pseudópodos: uno hialino y de gran amplitud llamado lobópodo, así como finas proyecciones a lo largo del cuerpo ameboideo, llamados acantópodos. La función de estos pseudópodos no sólo es la locomoción sino también la captación de alimentos y adherencia a los diversos tipos de superficies (Marciano-Cabral y Cabral 2003; Trabelsi, *et al.*, 2012; Visvesvara, 2013; Kot *et al.*, 2018).

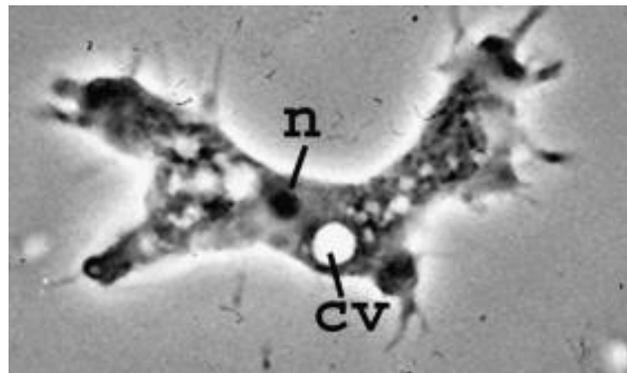


Figura 1. *Acanthamoeba* spp. Trofozoíto. **N:** Núcleo, **CV:** Vacuola contráctil (Tomado de Visvesvara *et al.*, 2007).

Como resultado de condiciones ambientales desfavorables, el trofozoíto puede transformarse en un quiste (Figura 2) que puede mantener latente sus propiedades patogénicas por periodos prolongados (24 años) (Mazur *et al.*, 1995). Dependiendo de la especie, los quistes varían de tamaño de 10 a 29 μm , tienen

una forma redondeada o poligonal y están conformados por una doble capa: la parte externa fuertemente plegada (exoquiste) y la parte interna lisa (endoquiste) en forma de estrella o poligonal y unos poros u ostiolos en el cruce del exoquiste y el endoquiste formando un opérculo que, cuando las condiciones ambientales son favorables, el trofozoíto emerge a través de el (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Visvesvara *et al.*, 2011; Trabelsi *et al.*, 2012; Cabello-Vílchez, 2015; Kot *et al.*, 2018).

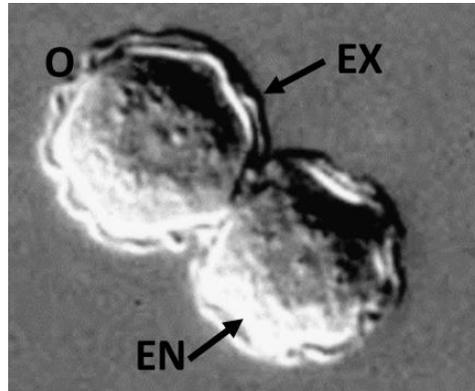


Figura 2: Quiste de *Acanthamoeba* spp. **EX:** Exoquiste. **EN:** Endoquiste. **O:** Opérculo. (Tomado de Visvesvara *et al.*, 2007).

IMPORTANCIA CLÍNICA

Las amibas del género *Acanthamoeba* pueden completar su ciclo de vida en el medio ambiente, sin embargo, cuando las condiciones son idóneas, pueden ser agentes causales de queratitis amibiana (QA) una enfermedad de la córnea que amenaza la vista y de la encefalitis amibiana granulomatosa, una enfermedad fatal del sistema nervioso central (SNC) (Figura 3) (Culbertson, 1961; Nagington *et al.*, 1974; Jones *et al.*, 1975; Martínez y Visvesara, 1997).

QUERATITIS AMIBIANA

La queratitis amibiana es una infección de la córnea que ocurre principalmente en individuos inmunocompetentes con historial previo de uso de lentes de contacto. Se caracteriza por inflamación de la córnea, dolor ocular severo y fotofobia. Si el tratamiento no es el adecuado, puede dar lugar a una cicatriz vascularizada dentro de una córnea delgada, causando problemas de visión o perforación de la córnea y pérdida del ojo. QA es regularmente mal diagnosticada

como queratitis viral o fúngica, provocando un retraso en la implementación de la terapia apropiada para eliminar las amibas (Jones *et al.*, 1975; Stehr-Green *et al.*, 1989; Seal, 2003).

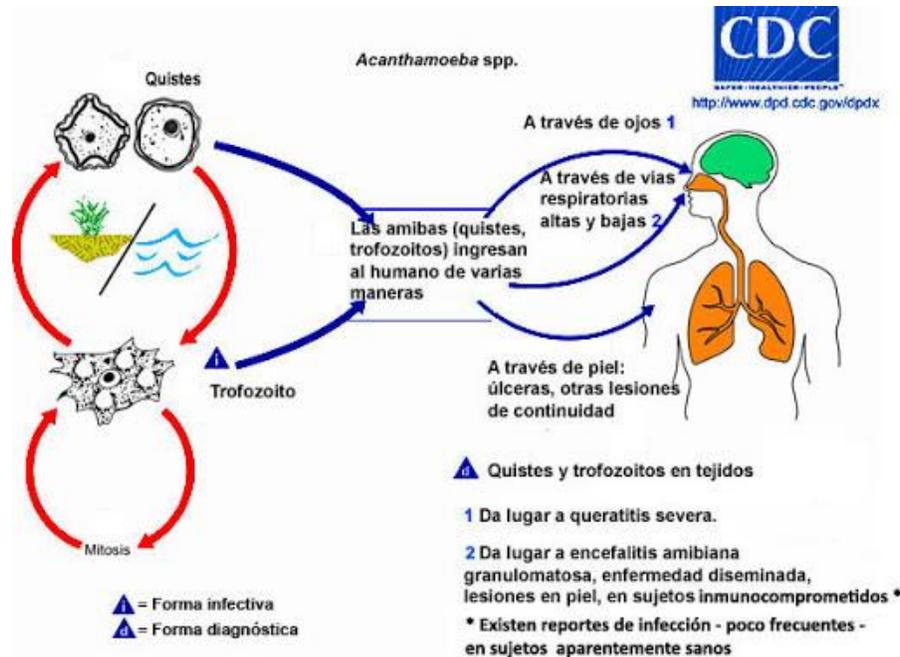


Figura 3: Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp. (Tomado de Gómez Marín, 2010).

ENCEFALITIS AMIBIANA GRANULOMATOSA

La encefalitis amibiana granulomatosa es una enfermedad que se caracteriza por una infección crónica del SNC; Los signos clínicos incluyen cambios de personalidad, dolor de cabeza, fiebre, náuseas, vomito, letargo, diplopía, hemiparesia, convulsiones, coma y muerte. Es importante mencionar que la EAG se puede confundir con leptomeningitis bacteriana, tuberculosis o meningitis viral (Martinez y Visvesvara, 1997; Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Schuster y Visvesvara, 2004;2007; Khan, 2006; Visvesvara y Maguire, 2006; Visvesvara *et al.*, 2007).

La EAG generalmente se asocia con pacientes con enfermedades subyacentes como: tumores malignos (Feingold *et al.*, 1998), lupus eritematoso sistémico (Grunnet *et al.*, 1981; Koide *et al.*, 1998), diabetes (Harwood *et al.*, 1988), fallas renales, cirrosis, tuberculosis, úlceras de piel, Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) enfermedad de Hodgkin (Jager y Stamm, 1972; Willaert *et al.*, 1978;

Martínez, 1982; Martínez y Visvesvara, 1997; Steinberg *et al.*, 2002). Contribuyen también el abuso de drogas, alcoholismo, tratamiento de esteroides, quimioterapia, radioterapia y trasplantes de órganos que predisponen a adquirir la infección (Martínez y Janitschke, 1985; Anderlini *et al.*, 1994; Sell *et al.*, 1997). Aunque la susceptibilidad de la infección está asociada con individuos inmunosuprimidos y condiciones debilitantes, se han reportado casos de EAG por *Acanthamoeba* en niños y adultos inmunocompetentes (Bhagwandeem *et al.*, 1975; Ringsted *et al.*, 1976; Ofori-Kwakye *et al.*, 1986; Sangruchi *et al.*, 1994; Singhal *et al.*, 2001).

Varias líneas de evidencia sugieren que las amibas invaden los pulmones / piel y obtienen acceso al espacio intravascular, seguido de diseminación hematogena, lo que lleva a interacciones con la barrera hematoencefálica y finalmente invaden el SNC para inducir la enfermedad; así mismo, también es aceptado que la llegada al SNC es a través del neuroepitelio olfativo (Baig y Khan, 2015; Omaña-Molina *et al.*, 2017). La transmigración de *Acanthamoeba* en los sitios de la barrera hematoencefálica hacia el SNC se da a través de la disrupción de las uniones estrechas presentes entre las células para después iniciar procesos fagocíticos (Khan, 2007).

EPIDEMIOLOGIA

De acuerdo con Kalra y colaboradores (2019), entre 1990 y 2018 se habían reportado tan solo 69 casos de encefalitis amibiana granulomatosa a nivel mundial, uno de ellos en México. Así mismo Hernández-Martínez y colaboradores (2019) mencionan que en México sólo se han reportado dos casos de EAG y uno de ellos en combinación con *Aspergillus* sp.

Las bajas cifras de reportes, probablemente se deba a problemas de diagnóstico, por lo cual la infección puede que se encuentre subdiagnosticada.

JUSTIFICACIÓN

Aunque el tropismo de las amibas es principalmente a las células del SNC, recientemente a través de un modelo *in vivo* de EAG se han observado trofozoítos de *Acanthamoeba* en contacto con CS aparentemente sin daño citopático (Omaña-Molina *et al.*, 2017). Como es sabido, las células de Schwann son las células gliales

del SNP. Además de su papel bien establecido en la producción de las vainas de mielina alrededor de los axones periféricos, también influyen en la conducción del impulso a lo largo de los axones y proporcionan soporte trófico para la reparación y regeneración de los nervios (Ferdoushi *et al.*, 2019). Sin embargo, se desconoce si las células del SNP pueden ser células blanco para las amibas. Por esa razón, es necesario determinar los mecanismos de patogenicidad que estas amibas llevan a cabo en las CS.

OBJETIVO

En este trabajo se expone la descripción ultraestructural *in vitro* del efecto citopático durante la interacción de los trofozoítos de *Acanthamoeba culbertsoni* con las células de Schwann.



Article

Schwann Cell Autophagy and Necrosis as Mechanisms of Cell Death by *Acanthamoeba*

Ismael Castelan-Ramírez ^{1,2}, Lizbeth Salazar-Villatoro ³, Bibiana Chávez-Munguía ³, Citlaltepelt Salinas-Lara ^{4,5}, Carlos Sánchez-Garibay ⁴, Catalina Flores-Maldonado ⁴, Dolores Hernández-Martínez ², Verónica Anaya-Martínez ⁷, María Rosa Ávila-Costa ⁸, Adolfo René Méndez-Cruz ⁹ and Maritza Omaña-Molina ^{2,*}

- ¹ Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Av. Ciudad Universitaria 3000, Coyoacán P.C. 04510, Ciudad de México, México; ismaelc40@gmail.com
- ² Laboratorio de Amibas Anfibias, Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI), Medicina, UNAM, Tlalnepantla 54090, Estado de México, México; alol_madole@yahoo.com.mx
- ³ Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-IPN, Ciudad de México 07360, México; bioagam@hotmail.com (L.S.-V.); bchavez@cinvestav.mx (B.C.-M.)
- ⁴ Departamento de Neuropatología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, Ciudad de México 14269, México; dsalaf9@hotmail.com (C.S.-L.); carlos.s.garibay@live.com.mx (C.S.-G.)
- ⁵ Laboratorio de Histología y Patología, FESI, Medicina, UNAM, Tlalnepantla 54090, México
- ⁶ Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV-IPN, Ciudad de México 07360, México; ceflores@fisio.cinvestav.mx
- ⁷ Centro de Investigación en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Anáhuac, Huixquilucan C.P. 52786, Estado de México, México; anayamtz@yahoo.com.mx
- ⁸ Departamento de Neurociencia, FESI, UNAM, Tlalnepantla 54090, México; nigraizo@unam.mx
- ⁹ Laboratorio de Inmunología, FESI, UNAM, Tlalnepantla 54090, México; renemen@gmail.com
- * Correspondence: maritzaomanam@yahoo.com.mx; Tel.: +55-55-6122-6919

Received: 30 April 2020; Accepted: 7 June 2020; Published: 9 June 2020

Abstract: Amoebae of the genus *Acanthamoeba* are etiological agents of granulomatous amoebic encephalitis (GAE). Recently, through an in vivo GAE model, *Acanthamoeba* trophozoites were immunolocalized in contact with the peripheral nervous system (PNS) cells—Schwann cells (SC). In this study, we analyzed in greater detail the in vitro early morphological events (1, 2, 3, and 4 h) during the interaction of *A. culbertsoni* trophozoites (ATCC 30171) with SC from *Rattus norvegicus* (ATCC CRL-2941). Samples were processed for scanning and transmission electron microscopy as well as confocal microscopy. After 1 h of interaction, amoebae were observed to be adhered to the SC cultures, emitting sucker-like structures associated with micro-phagocytic channels. In addition, evidence of necrosis was identified since edematous organelles as well as multivesicular and multilamellar bodies characteristics of autophagy were detected. At 2 h, trophozoites migrated beneath the SC culture in which necrosis and autophagy persisted. By 3 and 4 h, extensive lytic zones were observed. SC necrosis was confirmed by confocal microscopy. We reported for the first time the induction of autophagic and necrotic processes in PNS cells, associated in part with the contact-dependent pathogenic mechanisms of *A. culbertsoni* trophozoites.

Keywords: *Acanthamoeba*; Schwann cell; autophagy; cell death; necrosis; cytopathic effect

1. Introduction

Free-living amoebae (FLA) of the genus *Acanthamoeba* are cosmopolitan protozoans commonly found in natural environments, they play a significant ecological role in controlling bacterial populations. Some species of this genus, in addition to being ecologically relevant, are also important in the medical field, due to their ability to exist as free-living organisms and as parasites, becoming a

threat to the health and life of the hosts [1,2]. In the cornea, *Acanthamoeba* are etiological agents of *Acanthamoeba keratitis* (AK), a painful, vision-threatening infection occurring primarily in immunocompetent persons and contact lens users [3]. In the central nervous system (CNS), they are etiological agents of *granulomatous amoebic encephalitis* (GAE), which mostly occurs in people with metabolic, physiological, and immunological disorders, reporting greater than 90% mortality. GAE infection is characterized by a chronic protracted slowly progressive CNS, which also may involve the lungs and skin [2,4].

Clinical studies based in post-mortem tissues suggest that CNS invasion by *Acanthamoeba* trophozoites occurs by dissemination through blood flow from the primary site of infection. The primary *Acanthamoeba* site of infection can be the respiratory tract, where amoebae reach the olfactory neuroepithelium, leading to interactions with the blood-brain barrier and, finally, CNS invasion [2,5,6]. Moreover, through in vivo experimental models, blood flow dissemination of amoebae inoculated in the peritoneum [7] or intranasal route of healthy [4] and diabetic mice [8] has been reported.

In vitro experiments have been implemented in order to describe the cytopathic effect of *Acanthamoeba* in different targets, such as human corneal tissue [9], hamster corneal cells, Madin-Darby Canine Kidney cells (MDCK) [10,11], nervous cells such as neuroblastoma cells [12–14], microglial cells [15–17], and brain microvascular endothelial cells [6,18]. Pathogens penetrate either through the cell (transcellular route) or between the cells (paracellular route) [19]. We have reported that *Acanthamoeba* target tissue invasion occurs via paracellular route by targeting the tight junctions [9].

Recently, we described, by histological and immunohistochemical techniques, the early morphological events (24–96 h) during the invasion of *A. castellanii* and *A. culbertsoni* in a murine GAE model in healthy and diabetic mice, showing that trophozoites adhere to the respiratory and olfactory epithelium near the nasal turbinates, penetrating the tissue between the cellular junctions to subsequently invade the olfactory nerve bundles, Schwann cells (SC), and the base of the epineurium, with the absence of an inflammatory infiltrate, and without causing evident tissue damage. Subsequently, trophozoites invade the olfactory bulb and white matter in the central subcortical cortex of the brain, reaffirming the idea that contact-dependent mechanisms are relevant to amoebae of the *Acanthamoeba* genus, regardless of the site of invasion [4,8].

We now consider it necessary to understand the pathogenic mechanisms that these amoebae carry out on SC, which envelop the nerve sheaths in the peripheral nervous system (PNS), providing myelin that protects these structures and facilitates nerve impulse [20]. Damage to SC involves atrophy and destruction of the nerve, consequently losing motor skills, sensation, or both. With this purpose in mind, we carried out the in vitro coinubation of *Acanthamoeba culbertsoni* trophozoites with SC, in order to describe, through scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscopy as well as confocal microscopy (CM), the early events that take place during the interaction of these amoebae with SC, highlighting the importance of the contact-dependent mechanisms that cause damage to PNS cells and their possible impact on the pathophysiology of infection.

2. Results

2.1. Reactivation of *A. culbertsoni* Virulence

Reactivation of virulence was carried out through one intranasal passage of trophozoites in BALB/c mice; 40% of the inoculated mice died on the seventh day and the amoebae were recovered from the brain and the lungs. At day 21 post-infection, the surviving mice were sacrificed following the ethical protocol for handling laboratory animals. Amoebae were recovered only from the lungs (Table 1). Interactions with SC were carried out with amoebae recovered from the brains of the dead mice on the seventh day.

Table 1. Amoebic recovery in organs.

Mice	Day of Death (d)/Sacrifice (s)	Organs	
		Brain	Lungs
1	7 (d)	+	+
2	7 (d)	+	+
3	21 (s)	-	+
4	21 (s)	-	+
5	21 (s)	-	+

(+) Recovery (-) No recovery.

2.2. Schwann Cell Culture

By SEM it was observed that control SC incubated during 4 h in a proportion 3:1 of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM):Bacto Casitone were confluent with a regular structure. Through TEM, typical organelles of eukaryotic cells and the formation of desmosome adherent junctions were observed (Figure 1). It is important to mention that the SC in study do not present tight junctions.

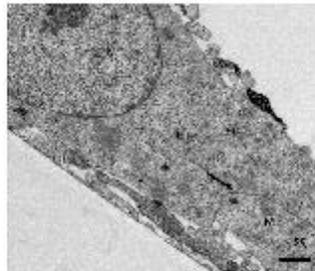


Figure 1. Transmission electron microscopy of the Schwann cells (SC) culture. SC have desmosome adherent junctions (arrow) as well as typical organelles of eukaryotic cells. N: Nucleus. RER: rough endoplasmic reticulum. M: Mitochondria. Bar = 5 μ m.

2.3. Analysis of the Interaction of *A. culbertsoni* Trophozoites with SC through SEM

By SEM, during the analysis of control SC cultures, no evidence of morphological alterations was observed. SC monolayer was confluent, and no evidence of damage, ulceration, pitting, or any other defects were detected (Figure 2A). During the interaction between *A. culbertsoni* trophozoites with SC, amoebae adhered to the monolayer from an early timepoint, emitting cytoplasmic extensions (Figure 2B) and producing cytopathic effect on the SC. After 2 h of interaction, it was even possible to observe the trophozoites cell division process (Figure 2C); lytic zones were evident, indicating a cytolytic effect of trophozoites on the SC. *A. culbertsoni* migrated beneath the SC, exposing the underlying substrate (Figure 2D). During all the interaction times analyzed, the amoebae emitted acanthopods and thin sucker-like structures in intimate contact with the SC, suggesting a phagocytic process. Similar projections have been reported by Gonzalez-Robles et al. [21] in *A. castellanii* and by Marciano-Cabral and Cabral [22] in *Naegleria fowleri*. Moreover, at 2 h it was possible to detect amoebae emitting more than one cytoplasmic extension of this type in contact with SC (Figure 2E).

At 3 h post-interaction, amoebae in contact with the SC cytoplasmic prolongations were observed, persisting the phagocytic process (Figure 2F); trophozoites were also located in areas close to the substrate in which culture damage was evident (Figure 2G). Finally, after 4 h of interaction, extensive lytic areas were visualized (Figure 2H).

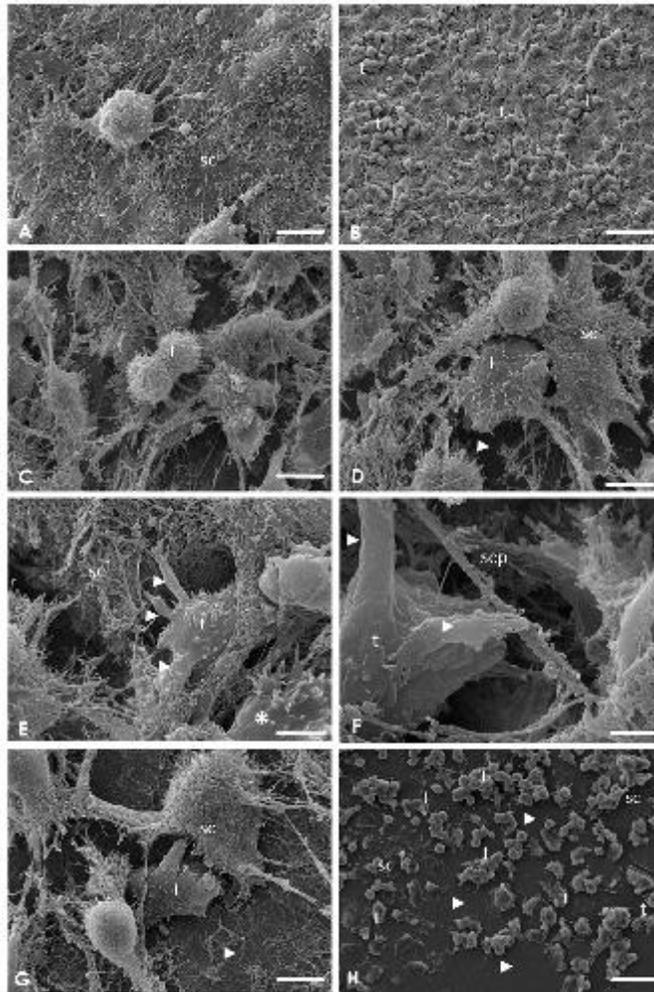


Figure 2. Scanning electron micrographs of the interaction of *A. culbertsoni* trophozoites with Schwann cells (SC) at different point times (1, 2, 3, and 4 h). (A) No morphological evidence of damage was observed in the control culture. Bar = 10 μm . (B) After 1 h of co-incubation, trophozoites (t) were observed to be adhered to the SC surface without cell damage. Bar = 10 μm . (C–E) After 2 h of co-incubation. (C) Trophozoite (t) in suggestive cell division. Bar = 10 μm (D) Trophozoites (t) were observed migrating beneath the SC cultures, evidencing the substrate (arrowhead). Bars = 10 μm . (E) Trophozoite (t) in contact with SC emitting sucker-like structures (arrowheads). A trophozoite migrating (asterisk) with its typical acanthopods was also observed. Bar = 1 μm . (F–G) After 3 h of co-incubation. (F) Amoebae were not only in contact with the cell body but were also in contact with the cytoplasmic prolongations of SC (scp) by sucker-like structures (arrowhead). Bar = 1 μm . (G) Trophozoites (t) in areas close to the substrate. Culture damage was evident (arrowhead). Bar = 1 μm . (H) After 4 h of co-incubation, Extensive lytic zones (arrowhead) were observed in SC cultures by *Acanthamoeba* trophozoites (t). Bar = 10 μm .

2.4. Analysis of the Interaction of *A. culbertsoni* Trophozoites with SC through TEM

Results obtained by SEM were corroborated by TEM. As expected, control cultures cells were observed in optimal conditions, highlighting the presence of desmosome adherent junctions (Figure 3A). In the experimental cultures, since the first hour post-interaction, trophozoites were observed in intimate contact with SC through acanthopodium, suggesting the formation of endocytic structures (Figures 3B–D). Trophozoites frequently were observed in contact with SC at least in two zones (Figure 3D). Moreover, in one of them, it was possible to observe a micro-phagocytic channel, visualizing the content that was directed towards the digestive vacuole (Figure 3E).

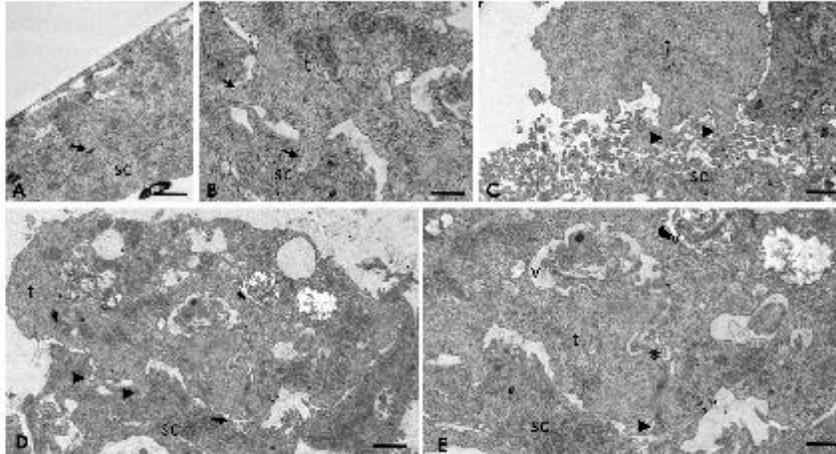


Figure 3. Transmission electron micrographs of the interaction of *A. culbertsoni* trophozoites with Schwann cells (SC) at 1 h. (A) Control. SC were maintained in culture medium without amoebae for 4 h. No morphological evidence of damage was observed. Adherent junctions (arrow), an important feature of SC cultures, were observed. Bar = 2 μm . (B) After 1 h of interaction, amoebae were observed in intimate contact with a SC through an acanthopodium (arrows), suggesting the formation of endocytic structures. Bar = 2 μm . (C) The formation of probable endocytic structures (arrowhead) was a frequent phenomenon. Bar = 5 μm . (D) *A. culbertsoni* contacted SC in different areas (arrowhead and arrow); in addition, a trophozoite ingesting portions of a SC (arrow) was observed. Bar = 5 μm . (E) Higher magnification of the phagocytic process (arrowhead) in which cytoplasmic material reaches the digestive vacuoles (V) through a micro-phagocytic channel (asterisk). Bar = 2 μm .

The presence of adherent junctions was frequently observed on the SC (Figure 4A). In addition, ultrastructural changes in the Golgi apparatus (Figure 4B), as well as lipofuscin granules (Figure 4C) and multilamellar and multivesicular bodies on the SC (Figure 4D), were evident.

After 2 h post-interaction, ultrastructural alterations in the rough endoplasmic reticulum (Figure 5A) and mitochondria (Figure 5B) were observed. Multilamellar bodies with the characteristic double membrane persisted (Figure 5C), as well as with a single membrane (Figure 5D). After 3 h post-interaction, processing of the samples by TEM was not possible, due to the extensive lytic zone caused by the amoebae to the SC cultures.

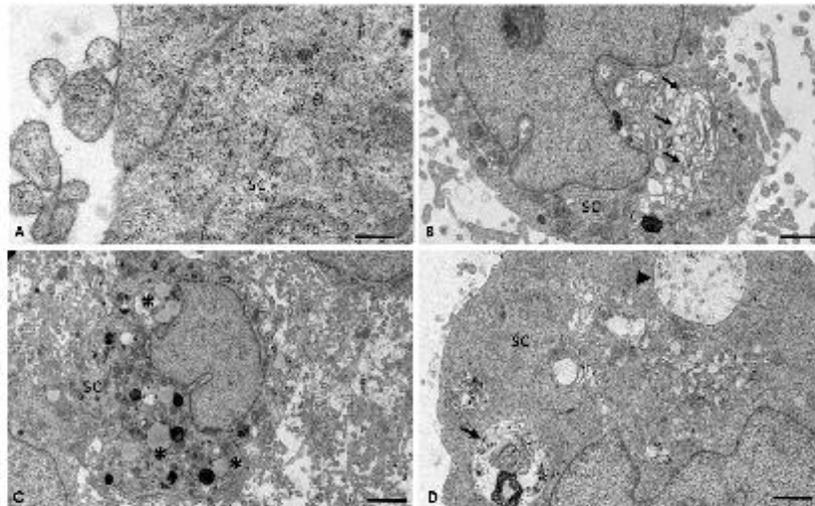


Figure 4. *A. culbertsoni* induces cell death on Schwann cells (SC) after 1 h of interaction. (A) Control. No morphological evidence of damage was observed. Bar = 1 μ m. (B) Ultrastructural alteration of the Golgi apparatus (arrows) on SC due to edema, suggesting cell death by necrosis. Bar = 5 μ m. (C) Lipofuscin granules (asterisks). Bar = 2 μ m. (D) Multilamellar (arrow) and multivesicular (arrowhead) bodies, suggesting autophagy process. Bar = 2 μ m.

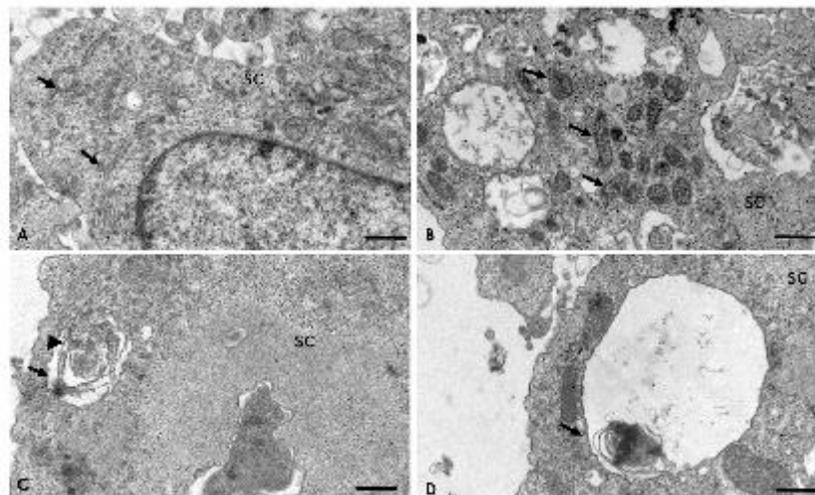


Figure 5. Interaction of *A. culbertsoni* and Schwann cells (SC) after 2 h of interaction. (A, B) Ultrastructural alterations in organelles of SC were frequently observed (arrows) in the rough endoplasmic reticulum (A) and mitochondria (B). (C, D) Multilamellar bodies with cytoplasmic material (arrows) persisted. In electron micrograph (C), a double membrane (arrowhead) is evident, characteristic of these structures. Bars = 2 μ m.

2.5. *A. culbertsoni* Induces Necrosis but Not Apoptosis in SC

To determine if *A. culbertsoni* was able to induce apoptosis or necrosis in SC, we carried out amoebae–SC interactions, which were stained with Annexin V/propidium iodide and analyzed by CM. In the early stages of apoptosis, phosphatidylserine is exposed on the outer face of the plasma membrane. Experimentally, this is recognized and stained in green by Annexin V-FITC. In contrast, in necrotic processes the plasma membrane is seriously damaged, allowing the passage of dyes, such as propidium iodide, which stains the nucleus. Cultures in Figure 6 were negative to Annexin V staining in all assays; however, red staining was positive, increasing as the interaction time with the amoebae increases. These results suggest that *A. culbertsoni* induces necrosis but not apoptosis on SC.

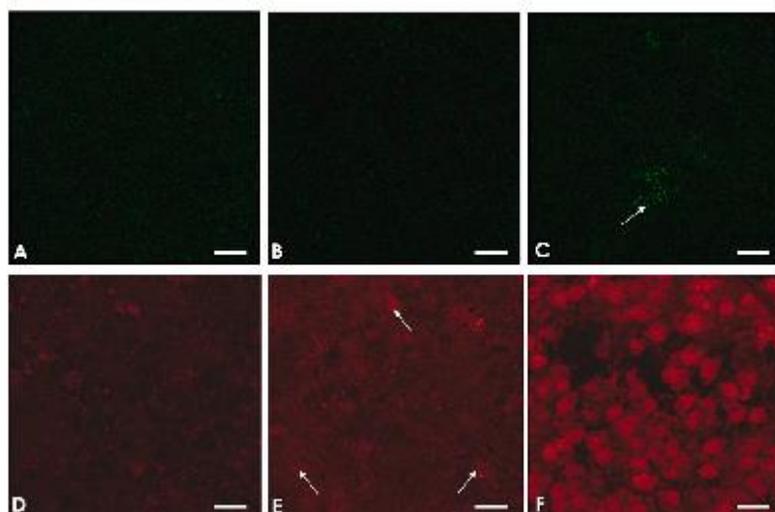


Figure 6. *A. culbertsoni* induces necrosis but not apoptosis on Schwann cells (SC). (A) Fluoresceinated Annexin V-FITC staining shows no signal on SC control cultures, (B) nor in those SC that interacted with *A. culbertsoni* for 1.5 h. (C) Staining of an apoptotic SC (arrow). (D) SC control do not show stained nuclei with propidium iodide. (E) Red-stained nuclei begin to appear (arrows) after 1 h of interaction with *A. culbertsoni* trophozoites. (F) After 1.5 h of interaction, abundant and clearly defined nuclei stained in red are observed. The results suggest that *A. culbertsoni* trophozoites induce necrotic processes in SC. Bars = 15 μ m.

3. Discussion

Amoebae of the genus *Acanthamoeba* are ecologically and clinically relevant. Its potential to cause AK, skin infections, and mostly fatal infections in the CNS, such as GAE among susceptible human populations, has been recognized [2].

The pathogenesis of infections caused by *Acanthamoeba* is complex and not well understood. Several authors have carried out studies to describe the pathogenic mechanisms of these protozoa in different tissues and cell lines, such as MDCK cells [11], corneal tissue [10], neuroblastoma cells [12,13], microglial cells [15–17], and brain microvascular endothelial cells [6,18]; however, until now, no reports about the invasion mechanisms that these amoebae carry out in PNS cells, particularly in SC, have been published. Knowledge about the pathogenic mechanisms that these amoebae carry out in different cells is useful to improve the diagnostic and therapeutic methods to treat the various pathologies.

The strain in study, *A. culbertsoni* (ATCC® 30171™), was the first FLA to be reported as a pathogenic amoeba for mammals [23]; for that reason we considered it important to reactivate its virulence in order to maintain the strain in optimal conditions. *A. culbertsoni* has shown a 40% virulence in BALB/c mice seven days post-inoculation, similar to that reported in *Naegleria fowleri* infections, a highly virulent amoeba [3]. In our study, the pathogenic and invasive capacity of *A. culbertsoni* was confirmed since the trophozoites migrated to the CNS in as soon as a few days, causing mice death, which was reaffirmed once the interactions were carried out.

During the interaction of amoebae with SC, by SEM it was observed that trophozoites cause mainly cytopathic damage through contact-dependent mechanisms, initiating with adhesion, and then followed by migration to below the monolayer, emission of sucker-like structures—leading to the phagocytosis process—and finally inducing cell death. This mechanism is similar to those reported in hamster and human corneal tissue [9,10], MDCK cells [11], as well as an in vivo GAE model [4], suggesting that *Acanthamoeba* perform similar pathogenic mechanisms regardless of the target tissue that they invade; indeed, we have reported that the phagocytosis process has been observed after trophozoites have migrated through the cellular junctions and invaded deeper areas of the corneal tissue or below the MDCK cell monolayer [9–11]. In spite of this, we also considered that amoebae carry out specific processes depending on the environment in which the amoebae are located, since during the interaction of *A. culbertsoni* with SC, trophozoites migrated and simultaneously caused damage to cells and induce the destruction of the monolayer in less than 4 h, probably because SC cultivated in vitro did not produce tight junctions that could facilitate the invasion and phagocytosis process. In vivo, it has been observed that these cells form autotypic tight junctions [24].

As part of the damage mechanisms, the emission of sucker-like structures is a common feature on amoebae surfaces, which carries out the phagocytosis process by pinching off small portions of the surface of the target cell [21], similar to that performed by *Naegleria fowleri*, where the phagocytosis process happens in a “piecemeal manner” [22]. Likewise, John et al. [25] argued that the number of emitted endocytic structures correlates with the virulence of this protozoa, which is in agreement with our results, since the majority of trophozoites projected more than one sucker-like structure in contact with target cells and its prolongations.

Moreover, by TEM it was possible to observe the formation of a micro-phagocytic channel that carries the cellular content of the target cell to the digestive vacuoles. Similar channels to those described in our work have been reported in other protozoa, such as *Entamoeba histolytica* [26], *Trichomonas vaginalis* [27], as well as *Acanthamoeba castellanii* [21]. Pettit et al. [13] reported in *A. culbertsoni* the presence of these structures associated with a food cup. In our work, the formation of micro-phagocytic channels was observed within small endocytic projections (sucker-like structures) in intimate contact with the SC, through which they ingested portions of these cells. It is important to underline that amoebae of the genus *Acanthamoeba* produce different forms of cytoplasmic extensions to phagocytize as part of the damage mechanisms to target cells [10,21]. Although, in our study, we observed that amoebae emitted only one type of endocytic structure, the sucker-like structure; it is not discarded that the amoeba under study can emit other endocytic projections since it has the ability to rearrange its cytoskeleton, which has also been reported in other species of the genus [28].

Moreover, simultaneous contact of various endocytic structures on a target cell may accelerate the cell death process. Therefore, during SC phagocytosis, trophozoites could modify the permeability of the cell's plasma membrane causing organelles edema [29], inducing cell death by necrosis; this was confirmed by TEM, since endoplasmic reticulum and mitochondria edema were documented after in vitro interaction with *A. culbertsoni*. Based on these results we suggest that the amoebae in our study induced death through necrosis of the SC.

Similarly, during the analysis of images obtained by TEM, autophagic structures, such as multilamellar bodies or autophagosomes and lipofuscin granules, were observed on SC incubated with *A. culbertsoni*. Autophagy was probably a consequence of the persistent stress exerted during the interaction of trophozoites with these PNS cells. According to Yonekawa and Thorburn [30],

autophagosomes are indicators of survival mechanisms through induction of autophagy and when this effort fails, cell death occurs. It is also considered that lipofuscin granules formation is the result of aggregates of undigested cellular materials by the autophagy process [31,32].

Apoptosis has so far been the best-described programmed cell death; however, recently autophagy has been proposed as another type of active or programmed cell death, characterized by the presence of autophagosomes or multilamellar bodies [30], which were observed in the SC in our study.

Simple autophagy or macro-autophagy is characterized by the presence of multilamellar bodies; besides, micro-autophagy lysosomes sequester portions of the cytoplasm, creating multivesicular bodies [30,33]. Multivesicular bodies are also considered a kind of late endosome that participates as an intermediary in the macro-autophagic process [34]. In our study, it was possible to observe multivesicular bodies, suggesting that regardless of whether it is micro or macro-autophagy, the SC dies as a consequence of this process.

Although Martinet et al. [35] argue that the ideal methods for monitoring autophagy in tissue do not exist, confocal microscopy and various molecular techniques have become the leading approaches to study autophagy in many different settings, even though they often fail to provide firm conclusions if not combined with TEM. Indeed, the authors highlight that electron microscopy is still "vital" to confirm and verify results obtained by other methods, in order to provide novel knowledge that would not have been obtained by any other experimental approaches [36]. It is important to implement subsequent studies to further demonstrate autophagy induction by the *Acanthamoeba* genus on SC as well as other target cells, including corneal, skin, and nervous cell lineages.

Even though it has been reported that *Acanthamoeba* is able to cause cell death through apoptotic [12,13,37–39] and necrosis mechanisms [13,15], until now it had not been reported that amoebae induce autophagic cell death.

Due to the TEM technique sometimes not detect the early stages of the apoptotic process [40,41], added to the fact that there was the antecedent of apoptosis induction by *Acanthamoeba*, we analyzed if the SC that interacted with trophozoites showed early apoptosis. As exposed in the methodology, the amoebae were interacted with SC at different timepoints and stained with Annexin V/propidium iodide and analyzed under a confocal microscope. According to the TEM analysis, we did not detect apoptosis in the SC; however, the time-dependent necrotic process was confirmed in control samples.

Pettit et al. [13] reported that *Acanthamoeba culbertsoni* (the same strain as in this study) was able to induce necrosis as well as apoptosis in murine neuroblastoma cells due to different cytolytic factors produced by the amoeba. In our results, probably the number of prolongations emitted by the amoeba during the phagocytic process on the SC may be relevant in the way amoebae induce cell death. We suggest that if a single prolongation is in contact with the target cell, the SC, in an attempt to survive, initiate the autophagy processes; however, if phagocytosis persists, the cells fail in their attempt to survive and die in this way. On the other hand, if several prolongations are phagocytizing the same cell, the cell membrane is compromised, leading to necrosis.

In previous studies, we have described the pathogenic mechanism of different species in the *Acanthamoeba* genus, both in in vitro [9,10] and in vivo [4,8] models. The mechanisms of invasion have been characterized mainly as contact dependent. In this process, it was confirmed that organisms with primary diseases, such as diabetes, are more susceptible to systemic invasion by *Acanthamoeba*. Even by histological and immunohistochemical techniques it was possible to observe immunolocalized trophozoites in contact with the SC surrounding the olfactory nerve bundles, without apparent histopathological changes [8]. However, even though the trophozoites were in contact with the SC, it was not possible to describe in more detail the interaction between the amoebae and PNS cells. In this work, through more precise techniques such as TEM and SEM, we can suggest that SC are a target cell for amoebae. In fact, after *Acanthamoeba* trophozoites cross the olfactory epithelium, one might think that the SC would be one of the first target cells of *Acanthamoeba*, invading, phagocytizing, and inducing cell death by necrotic and autophagic processes, to disable its protective function in the olfactory nerves bundles, invade them, and thus accelerate their migration

through the olfactory bulb to the CNS and develop GAE, which would help explain damage to the motor functions of the body and could probably aggravate some symptoms of GAE, such as hemiparesis.

Through results shown in this study, it is probable that during the interaction of *Acanthamoeba culbertsoni* with SC, these PNS cells exert tropism on these amoebae, similar to what was reported for *Mycobacterium leprae*, *Trypanosoma cruzi*, and the Herpes Simplex virus [42].

4. Conclusions

In summary, this is the first study in which the in vitro cytopathic effect produced by *A. culbertsoni* in SC is reported. This interaction is characterized mainly by contact-dependent mechanisms, including the intimate contact and phagocytosis of the SC by trophozoites through the emission of cytoplasmic projections, such as “sucker-like structures”. During this interaction, it is suggested that the SC die by autophagic or necrotic mechanisms. These processes are important within the pathogenicity mechanisms of *A. culbertsoni*, and which may be useful to better understand the invasion of these amoebae into the CNS and other organs, in order to improve the diagnostic and therapeutic methods to fight these infections.

5. Materials and Methods

5.1. Amoeba Strain

The *Acanthamoeba culbertsoni* (ATCC® 30171™) strain was grown and maintained in axenic culture in 2% Bacto Casitone medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest-S165H-500) and 1% antibiotic (Penicillin-Streptomycin). Trophozoites were incubated at 30 °C on 25 cm² cell culture flasks.

5.2. Reactivation of *A. culbertsoni* Virulence

Intranasal inoculation in mice was carried out in order to reactivate amoeba virulence. First, trophozoites were harvested at the end of the logarithmic growth phase by chilling at 4 °C and concentrated by centrifugation for 5 min at 2500 rpm; the pellet was adjusted to obtain 1×10^6 trophozoites in 20 µL of fresh Bacto Casitone medium (without fetal bovine serum and antibiotic). After that, five male BALB/c mice (3 weeks old) were anesthetized and inoculated into the nostrils, according to Culbertson et al. [43]. For 21 days, mice were fed ad libitum and monitored daily to observe some signs of infection. If mice did not develop infection or did not die after this time, they were sacrificed. Then, the brain, liver, lungs, and kidneys were placed on agar plates with non-nutritive enriched medium (NNE) to recover the amoebae. Finally, trophozoites recovered were axenized in Bacto Casitone medium in order to use in subsequent assays. At the same time, a group of five mice was inoculated with culture medium without amoebae as the control group. Experimental animals were manipulated in accordance with approved standard project number 174, for the reactivation of amphizoic amoebae virulence, supported by the Official Mexican Standard NOM-062-ZOO-1999, of technical specifications for the production, care, and use of laboratory animals, based on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published in the Official Journal of the Federation (Mexico) 2001. Experimental animals were kept at the FESI General Bioterium in microisolator systems, with a temperature-controlled environment, a light-dark cycle of 12:12, adequate food, and enough space for growth in optimal conditions.

5.3. Schwann Cells Culture

Schwann cells S16 (ATCC® CRL-2941™) from sciatic nerve of *Rattus norvegicus* were grown and maintained on 25 cm² cell culture flasks (Corning, Corning Incorporated, NY, USA) in DMEM (Sigma - D5648) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics (Penicillin-Streptomycin). SC were incubated in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. The cell culture flasks were previously treated

with Poly-L-lysine (Sigma-P9155) at least for 2 h. Previously to the final assays, initial experiments were performed to determine optimal in vitro cell conditions.

5.4. Interaction of *A. culbertsoni* Trophozoites with Schwann Cell

Interactions were carried out in a ratio 2:1 (SC: amoeba) under the same conditions in a mixture of DMEM:Bacto Casitone (serum and antibiotics free) in a 3:1 proportion. SC were washed three times for 5 min with 1x phosphate buffered saline (PBS), trypsinized for 15 min, and concentrated by centrifugation for 3 min at 1500 rpm; the pellet was adjusted to obtain $4.5 \times 10^6/500 \mu\text{L}$ fresh medium. SC were transferred to round plastic cover slips of 13 mm (previously treated with Poly-L-lysine and Collagen type IV (Sigma - C0543)) placed in 24-well styrene plates to perform the description by SEM. A similar process was carried out for TEM: the pellet was adjusted to obtain $1.25 \times 10^6/500 \mu\text{L}$ fresh medium and transferred to petri dishes of 35 mm x 10 mm (treated in the same way as the cover slips). Cultures were maintained in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C, and after 48 h the cells were confluent. Then, cell cultures were incubated with *A. culbertsoni* trophozoites (harvested as previously described) at different times (1, 2, 3, and 4 h). The control culture was processed under the same conditions without amoebae at a longer interaction time of 4 h.

5.5. Scanning Electron Microscopy

After interaction, the medium was removed from the samples and then were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer at room temperature for 1 h. Samples were dehydrated with increasing concentrations of ethanol. Then the critical point was dried with liquid CO₂ using a Samdri 780 apparatus (Tousimis Corp., Rockville, MD, USA) and coated with a thin layer (30 nm) of gold in an ion-sputtering device (JEOL, JFC-1100). Specimens were examined with a field-emission JEOL-JSM 7100F scanning electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

5.6. Transmission Electron Microscopy

After co-incubation, the medium was removed from the samples and then was fixed with 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M cacodylate buffer, at room temperature, and post-fixed with 1% osmium tetroxide as well as dehydrated with increasing concentrations of ethanol. Samples were transferred to propylene oxide, later to a mixture of propylene oxide/epoxy resin—(1/1), (2/1), and (3/1)—and embedded in epoxy resins. Ultra-thin sections (60 nm) were obtained and stained with uranyl acetate and lead citrate. Finally, sections were observed in a JEOL JEM-1011 transmission electron microscope (JEOL Ltd. Tokyo, Japan).

5.7. Confocal Microscopy

To determine apoptosis, an Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma-APOAF) was used. After co-incubation (in the same way as SEM), the samples were fixed with 4% paraformaldehyde for 1 h, at 37 °C at 0.5, 1, and 1.5 h. Briefly, kit instructions were followed and all samples were analyzed on a confocal laser scanning microscope (Leica, TCS SP8). As a positive control of apoptosis, the SC culture was treated with 0.8 mM H₂O₂ for 1.5 h [44]. The control culture was processed under the same conditions without amoebae at the longer interaction time.

Author Contributions: Conceptualization, I.C.-R., L.S.-V., M.O.-M. and C.S.-L.; funding acquisition, M.O.-M.; investigation, I.C.-R., L.S.-V., B.C.-M., V.A.-M., M.R.A.-C. and M.O.-M.; methodology, I.C.-R., L.S.-V. and C.S.-G.; resources, M.O.-M., B.C.-M., C.S.-L., C.S.-G., C.F.-M. and A.R.M.-C.; supervision, B.C.-M., C.S.-L., C.F.-M., D.H.-M., V.A.-M., M.R.A.-C., A.R.M.-C. and M.O.-M.; visualization, I.C.-R., B.C.-M., C.F.-M. and M.O.-M.; writing—original draft, I.C.-R., M.O.-M. and D.H.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The first author thanks to the Posgrado en Ciencias Biológicas (Biomedicina), UNAM, for the support in his formation, as well as CONACYT for scholarship number 858867. The present manuscript is a requirement to obtain first author master's degree.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Bursle, E.; Robson, J. Free living amoebae and human disease. *Microbiol. Aust.* **2016**, *37*, 20–24, doi:10.1071/MA16009.
- Kalra, S.K.; Sharma, P.; Shyam, K.; Tejan, N.; Ghoshal, U. *Acanthamoeba* and its pathogenic role in Granulomatous Amebic Encephalitis. *Exp. Parasitol.* **2019**, *208*, 107788, doi:10.1016/j.exppara.2019.107788.
- Visvesvara, G.S. Infections with free-living amoebae. *Hand. Clin. Neurol.* **2013**, *114*, 153–168, doi:10.1016/B978-0-444-53490-3.00010-8.
- Omaña-Molina, M.; Hernández-Martínez, D.; Sánchez-Rocha, R.; Cárdenas-Lemus, U.; Salinas-Lara, C.; Méndez-Cruz, A.R.; Colín-Barenque, L.; Aley-Medina, P.; Espinosa-Villanueva, J.; Moreno-Fierros, L.; et al. 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.* **2017**, *116*, 725–733, doi:10.1007/s00436-016-5338-1.
- Ferrante, A. Free-living amoebae: Pathogenicity and immunity. *Parasite Immunol.* **1991**, *13*, 31–47, doi:10.1111/j.1365-3024.1991.tb00261.x.
- Khan, N.A.; Siddiqui, R. *Acanthamoeba* affects the integrity of human brain microvascular endothelial cells and degrades the tight junction proteins. *Int. J. Parasitol.* **2009**, *39*, 1611–1616, doi:10.1016/j.ijpara.2009.06.004.
- Alves, D.S.; Moraes, A.S.; Alves, L.M.; Gurgel-Gonçalves, R.; Lino Junior, R.S.; Cuba-Cuba, C.A.; Vinaud, M.C. Experimental infection of T4 *Acanthamoeba* genotype determines the pathogenic potential. *Parasitol. Res.* **2016**, *115*, 3435–3440, doi:10.1007/s00436-016-5105-3.
- Omaña-Molina, M.; Sánchez-Rocha, R.; Hernández-Martínez, D.; Romero-Grijalva, M.; Salinas-Lara, C.; Rodríguez-Sosa, M.; Juárez-Avelar, I.; Salazar-Villatoro, L.; González-Robles, A.; Méndez-Cruz, A.R.; et al. Type 2 diabetes mellitus BALB/c mice are more susceptible to granulomatous amoebic encephalitis: Immunohistochemical study. *Exp. Parasitol.* **2017**, *183*, 150–159, doi:10.1016/j.exppara.2017.09.001.
- Omaña-Molina, M.; González-Robles, A.; Salazar-Villatoro, L.I.; Cristóbal-Ramos, A.R.; González-Lázaro, M.; Salinas-Moreno, E.; Méndez-Cruz, R.; Sánchez-Cornejo, M.; De la Torre-González, E.; Martínez-Palomo, A. *Acanthamoeba castellanii*: Morphological analysis of the interaction with human cornea. *Exp. Parasitol.* **2010**, *126*, 73–78, doi:10.1016/j.exppara.2010.02.004.
- Omaña-Molina, M.; González-Robles, A.; Salazar-Villatoro, L.I.; Lorenzo-Morales, J.; Cristóbal-Ramos, A.R.; Hernández-Ramírez, V.I.; Talamás-Rohana, P.; Méndez Cruz, A.R.; Martínez-Palomo, A. Reevaluating the Role of *Acanthamoeba* Proteases in Tissue Invasion: Observation of Cytopathogenic Mechanisms on MDCK Cell Monolayers and Hamster Corneal Cells. *Biomed. Res. Int.* **2013**, *2013*, 1–13, doi:10.1155/2013/461329.
- Flores-Maldonado, C.; González-Robles, A.; Salazar-Villatoro, L.; Omaña-Molina, M.; Gallardo, J.M.; González-Lázaro, M.; Hernández-Ramírez, V.I.; Talamás-Rohana, P.; Lorenzo-Morales, J.; Martínez-Palomo, A. *Acanthamoeba* (T4) trophozoites cross the MDCK epithelium without cell damage but increase paracellular permeability and transepithelial resistance by modifying tight junction composition. *Exp. Parasitol.* **2017**, *183*, 69–75, doi:10.1016/j.exppara.2017.10.013.
- Alizadeh, H.; Fidler, M.S.; McCulley, J.P.; Niederkorn, J.Y. Apoptosis as a mechanism of cytolysis of tumor cells by a pathogenic Free-Living Amoeba. *Infect. Immun.* **1994**, *62*, 1298–1303.
- Pettit, D.A.; Williamson, J.; Cabral, G.A.; Marciano-Cabral, F. *In vitro* destruction of nerve cell cultures by *Acanthamoeba* spp.: A transmission and scanning electron microscopy study. *J. Parasitol.* **1996**, *82*, 769–777.
- Chusattayanond, A.D.; Boonslip, S.; Kasisit, J.; Boonmee, A.; Warit, S. Thai *Acanthamoeba* isolate (T4) induced apoptotic death in neuroblastoma cells via the Bax-mediated pathway. *Parasitol. Int.* **2010**, *59*, 512–516, doi:10.1016/j.parint.2010.06.007.
- Shin, H.J.; Cho, M.S.; Jung, S.Y.; Kim, H.I.; Park, S.; Seo, J.H.; Yoo, J.C.; Im, K.I. Cytopathic changes in rat microglial cells induced by pathogenic *Acanthamoeba culbertsoni*: Morphology and cytokine release. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2001**, *8*, 837–840, doi:10.1128/CDLI8.4.837-840.2001.
- Shin, H.J.; Cho, M.S.; Kim, H.I.; Lee, M.; Park, S.; Sohn, S.; Im, K.I. Apoptosis of primary-culture rat microglial cells induced by pathogenic *Acanthamoeba* spp. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2000**, *7*, 510–514, doi:10.1128/cdli.7.3.510-514.2000.

17. Marciano-Cabral, F.; Ludwick, C.; Puffenbarger, R.A.; Cabral, G.A. Differential stimulation of microglial pro-inflammatory cytokines by *Acanthamoeba culbertsoni* versus *Acanthamoeba castellanii*. *Eukaryot. Microbiol.* **2004**, *51*, 462–469, doi:10.1111/j.1550-7408.2004.tb00398.x.
18. Alsam, S.; Kim, K.S.; Stins, M.; Rivas, A.O.; Sissons, J.; Khan, N.A. *Acanthamoeba* interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Microb. Pathog.* **2003**, *35*, 235–241, doi:10.1016/j.micpath.2003.07.001.
19. Khan, N.A. *Acanthamoeba* invasion of the central nervous system. *Int. J. Parasitol.* **2007**, *37*, 131–138, doi:10.1016/j.ijpara.2006.11.010.
20. Ferdoushi, A.; Li, X.; Jamaluddin, M.F.B.; Hondermarck, H. Proteomic Profile of Human Schwann Cells. *Proteomics* **2019**, *20*, e1900294, doi:10.1002/pmic.201900294.
21. González-Robles, A.; González-Lázaro, M.; Omaña-Molina, M.; Martínez-Palomo, A. *Acanthamoeba castellanii*: Endocytic Structures Involved in the Ingestion of Diverse Target Elements. *Acta Protozool.* **2009**, *48*, 327–332.
22. Marciano-Cabral, F.; Cabral, G. The immune response to *Naegleria fowleri* amoebae and pathogenesis of infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2007**, *51*, 243–259, doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00332.x.
23. Culbertson, C.G.; Smith, J.W.; Minner, J.R. *Acanthamoeba*: Observations on animal pathogenicity. *Science* **1958**, *127*, 1506.
24. Arroyo, E.J.; Scherer, S.S. The molecular organization of myelinating Schwann cells. In *The biology of Schwann Cells: Development, Differentiation and Immunomodulation*, 1st ed.; Armati, P., Ed.; Cambridge University Press: New York, NY, USA, 2007; pp. 37–54.
25. John, D.T.; Cole, T.B.; Marciano-Cabral, F. Sucker-Like Structures on the Pathogenic Amoeba *Naegleria fowleri*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1984**, *47*, 12–14.
26. Martínez-Palomo, A.; González-Robles, A.; Chávez, B.; Orozco, E.; Fernández-Castelo, S.; Cervantes, A. Structural bases of the cytolytic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J. Protozool.* **1985**, *32*, 166–175, doi:10.1111/j.1550-7408.1985.tb03033.x.
27. González-Robles, A.; Lázaro-Haller, A.G.; Espinoza-Cantellano, M.; Anaya-Vázquez, F.; Martínez-Palomo, A. *Trichomonas vaginalis*: Ultrastructural bases of the cytopathic effect. *J. Eukaryot. Microbiol.* **1995**, *42*, 641–651, doi:10.1111/j.1550-7408.1995.tb05921.x.
28. Betanzos, A.; Bañuelos, C.; Orozco, E. Host Invasion by Pathogenic Amoebae: Epithelial Disruption by Parasite Proteins. *Genes* **2019**, *10*, 1–32, doi:10.3390/genes10080618.
29. Burattini, S.; Falcieri, E. Analysis of cell death by electron microscopy. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *1004*, 77–89, doi:10.1007/978-1-62703-383-1_7.
30. Yonekawa, T.; Thorburn, A. Autophagy and Cell Death. *Essays Biochem.* **2013**, *55*, 105–117, doi:10.1042/bse0550105.
31. Höhn, A.; Grune, T. Lipofuscin: Formation, effects and role of macroautophagy. *Redox Biol.* **2013**, *1*, 140–144, doi:10.1016/j.redox.2013.01.006.
32. Di Guardo, G. Lipofuscin, lipofuscin-like pigments and autofluorescence. *Eur. J. Histochem.* **2015**, *59*, 72–73, doi:10.4081/ejh.2015.2485.
33. Eskelinen, E.L. Autophagy: Supporting cellular and organismal homeostasis by self-eating. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2019**, *111*, 1–10, doi:10.1016/j.biocel.2019.03.010.
34. Eskelinen, E.L. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* **2005**, *1*, 1–10, doi:10.4161/auto.1.1.1270.
35. Martinet, W.; Timmermans, J.P.; De Meyer, G.R. Methods to assess autophagy *in situ*—transmission electron microscopy versus immunohistochemistry. *Methods Enzymol.* **2014**, *543*, 89–114, doi:10.1016/B978-0-12-801329-8.00005-2.
36. Eskelinen, E.L.; Reggiori, F.; Baba, M.; Kovacs, A.L.; Seglen, P.O. Seeing is believing: The impact of electron microscopy on autophagy research. *Autophagy* **2011**, *7*, 935–956, doi:10.4161/auto.7.9.15760.
37. Zheng, X.; Uno, T.; Goto, T.; Zhang, W.; Hill, J.M.; Ohashi, Y. Pathogenic *Acanthamoeba* induces apoptosis of human corneal epithelial cells. *Jpn. J. Ophthalmol.* **2004**, *48*, 23–29, doi:10.1007/s10384-003-0018-y.
38. Sissons, J.; Kim, K.S.; Stins, M.; Jayasekera, S.; Alsam, S.; Khan, N.A. *Acanthamoeba castellanii* induces host cell death via Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 2704–2708, doi:10.1128/IAI73.5.2704-2708.2005.
39. Takaoka-Sugihara, N.; Yamagami, S.; Yokoo, S.; Matsubara, M.; Yagita, K. Cytopathic effect of *Acanthamoeba* on human corneal fibroblasts. *Mol. Vis.* **2012**, *18*, 2221–2228.

40. Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 495–516, doi:10.1080/01926230701320337.
41. Huerta, S.; Goulet, E.J.; Huerta-Yepez, S.; Livingston, E.H. Screening and detection of apoptosis. *J. Surg. Res.* **2007**, *139*, 143–156, doi:10.1016/j.jss.2006.07.034.
42. Neal, J.W.; Gasque, P. The role of primary infection of Schwann cells in the aetiology of infective inflammatory neuropathies. *J. Infect.* **2016**, *73*, 402–418, doi:10.1016/j.jinf.2016.08.006.
43. Culbertson, C.G.; Smith, J.W.; Cohen, H.K.; Minner, J.R. Experimental Infection of Mice and Monkeys by *Acanthamoeba*. *Am. J. Pathol.* **1959**, *35*, 185–197.
44. Luo, X.; Chen, B.; Zheng, R.; Lin, P.; Li, J.; Chen, H. Hydrogen peroxide induces apoptosis through the mitochondrial pathway in rat Schwann cells. *Neurosci. Lett.* **2010**, *485*, 60–64, doi:10.1016/j.neulet.2010.08.063.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DISCUSIÓN

Las amibas del género *Acanthamoeba* son ecológica y clínicamente relevantes. Se ha reconocido que tienen gran potencial para causar QA, infecciones cutáneas y principalmente infecciones fatales en el SNC, como la encefalitis amibiana granulomatosa (Kalra *et al.*, 2019).

La patogénesis de las infecciones causadas por *Acanthamoeba* es compleja y está muy poco investigada. Varios autores han llevado a cabo estudios para describir los mecanismos de patogenicidad de estos protozoos en diferentes tejidos y líneas celulares como las células MDCK (Flores-Maldonado *et al.*, 2017) tejido corneal (Omaña-Molina *et al.*, 2010) células de neuroblastoma (Alizadeh *et al.*, 1994; Dove-Pettit *et al.*, 1996) células microgliales (Shin *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2001; Marciano-Cabral *et al.*, 2004) y células endoteliales microvasculares cerebrales (Alsam *et al.*, 2003; Khan y Siddiqui, 2009), sin embargo, hasta ahora, no se habían publicado informes sobre los mecanismos de invasión que estas amibas llevan a cabo en las células del SNP, particularmente en las células de Schwann. El conocimiento sobre los mecanismos de patogenicidad que estas amibas llevan a cabo en diferentes células es útil para mejorar los métodos de diagnóstico y terapéuticos para tratar las patologías.

La cepa en estudio, *A. culbertsoni* (ATCC® 30171™) fue la primera amiba de vida libre en ser reportada como patógena para mamíferos (Culbertson *et al.*, 1958), por esta razón, se consideró importante reactivar su virulencia para mantener la cepa en condiciones óptimas. *A. culbertsoni* mostró un porcentaje de virulencia del 40% en ratones BALB/c en un periodo de 7 días post-inoculación, tiempo similar al reportado en las infecciones por *Naegleria fowleri* (Visvesvara, 2013). En este estudio, se confirmó la capacidad patógena e invasiva de *A. culbertsoni*, ya que los trofozoítos migraron al SNC en pocos días, causando la muerte de los ratones, lo que se reafirmó una vez que se llevaron a cabo las interacciones.

Durante la interacción de las amibas con las CS, por MEB se observó que los trofozoítos causan daño citopático a las CS a través de mecanismos dependientes de contacto, que comienzan con la adhesión y migración por debajo de la monocapa, emitiendo estructuras estrechas y alargadas similares a ventosas para

llevar a cabo el proceso de fagocitosis y finalmente inducir la muerte celular. Este mecanismo es similar al reportado en tejido corneal de hámster y humano (Omaña-Molina *et al.*, 2010) y en células MDCK (Flores-Maldonado *et al.*, 2017), así como en el modelo *in vivo* de EAG (Omaña-Molina *et al.*, 2017), sugiriendo que *Acanthamoeba* muestra similares mecanismos de patogenicidad sin importar el tejido blanco que se invade. Se ha reportado que los procesos de fagocitosis se observan una vez que los trofozoítos migran a través de las uniones celulares e invaden áreas más profundas del tejido corneal o por debajo de la monocapa de células MDCK (Omaña-Molina *et al.*, 2010; 2013; Flores-Maldonado; 2017), por lo cual se podría considerar que las amibas también llevan mecanismos específicos dependiendo del ambiente en el cual se encuentren, debido a que durante la interacción de *A. culbertsoni* con CS los trofozoítos migraron y simultáneamente causaron daño a las células que inducía a la destrucción de la monocapa en menos de 4 h, probablemente porque las CS cultivadas *in vitro*, no producen uniones estrechas lo cual facilita los procesos invasivos y de fagocitosis. *In vivo*, se ha observado que las SC forman uniones estrechas autotípicas (Arroyo y Scherer, 2007).

Como parte los mecanismos de daño, la emisión de estructuras estrechas y alargadas similares a ventosas es una característica común en la superficie de las amibas, las cuales se ha reportado que llevan a cabo el proceso de fagocitosis al “pellizcar” pequeñas porciones de la superficie de la célula blanco (González-Robles *et al.*, 2009), similar a lo reportado en *Naegleria fowleri* donde llevan a cabo el proceso fagocítico por ingestión fragmentaria (Marciano-Cabral y Cabral, 2007). Del mismo modo, John y colaboradores (1984) mencionan que el número de estructuras endocíticas proyectadas por la amiba está relacionado con la virulencia de estos protozoos, ya que las cepas no patógenas carecían de ellos. Esto coincide con nuestros resultados, ya que un solo trofozoíto puede proyectar más de una estructura endocítica en contacto con las células blanco y sus prolongaciones.

Así mismo, por MET es posible observar la formación de canales microfagocíticos que transporta contenido celular de la célula blanco a vacuolas digestivas. Se han observado canales similares a los descritos en este trabajo en

otros protozoos como *Entamoeba histolytica* (Martínez-Palomo *et al.*, 1985), *Trichomonas vaginalis* (González-Robles *et al.*, 1995), así como en *Acanthamoeba castellanii* (González-Robles *et al.*, 2009). Pettit y colaboradores (1996) reportaron en *A. culbertsoni* la presencia de estas estructuras asociadas a “food-cups”. En este trabajo, la formación de los canales microfagocíticos fue observado dentro de pequeñas proyecciones endocíticas en íntimo contacto con las SC. Es importante mencionar que las amibas del género *Acanthamoeba* producen diferentes formas de estructuras fagocíticas como parte los mecanismos de patogenicidad a las células blanco (González-Robles *et al.*, 2009; Omaña-Molina *et al.*, 2013). Aunque en nuestros resultados solo vimos una forma única de estructura fagocítica, no se descarta que la amiba en estudio pueda producir otra forma debido a los reordenamientos citoesqueléticos mediados por actina reportados durante el proceso fagocítico por *Acanthamoeba* (Betanzos *et al.*, 2019).

Contactos simultáneos de varias estructuras endocíticas en las células blanco pueden acelerar los procesos de muerte celular. Durante la fagocitosis de las CS por las amibas, los trofozoítos pudieron modificar la permeabilidad de la membrana plasmática de las células, causando edematización de los organelos (Burattini y Falcieri, 2013), induciendo la muerte celular por necrosis. Lo anterior fue confirmado por las imágenes obtenidas por MET, donde se observó edema en el retículo endoplásmico y mitocondrias después de la interacción *in vitro* de *A. culbertsoni* con CS.

Así mismo, por MET, se observaron estructuras autofágicas tales como cuerpos multilaminares o autofagosomas y gránulos de lipofuscina en CS expuestas a *A. culbertsoni*. Es probable que la autofagia fuera la respuesta de las CS al estrés constante inducido por las amibas. De acuerdo con Yonekawa y Thorburn (2013), los autofagosomas son indicadores de mecanismos de supervivencia a través de los procesos fagocíticos y cuando este esfuerzo falla, se produce la muerte celular. También se considera que la formación de gránulos de lipofuscina es el resultado de agregados de materiales celulares no digeridos por el proceso de autofagia (Höhn y Grune, 2013, Di Guardo, 2015).

La apoptosis ha sido la muerte celular programada mejor descrita, sin embargo, recientemente se ha propuesto a la autofagia como otro tipo de muerte celular activa o programada, caracterizada por la presencia de autofagosomas o cuerpos multilaminares (Yonekawa y Thorburn, 2013), estas estructuras estaban presentes en las CS que interactuaban con trofozoítos.

La autofagia simple o macro-autofagia se caracteriza por cuerpos multilaminares, mientras que en la micro-autofagia los lisosomas secuestran una porción de citoplasma, creando cuerpos multivesiculares (Yonekawa y Thorburn, 2013; Eskelinen, 2019). Por otro lado, los cuerpos multivesiculares también se consideran como un tipo de endosoma tardío que participa como intermediario en el proceso macro-autofágico (Eskelinen, 2005). En nuestros resultados, fue posible observar cuerpos multivesiculares que, independientemente de la ruta que tome, indicaría que la célula está en un proceso autofágico debido a las condiciones adversas establecidas por los trofozoítos y por lo cual la CS puede tener muerte celular debido a este proceso.

Aunque Martinet y colaboradores (2014) argumentan que los métodos ideales para monitorear la autofagia no existen, la microscopía confocal y varias técnicas moleculares se han convertido en el principal enfoque para estudiar la autofagia en muchos entornos diferentes, sin embargo, a menudo no pueden proporcionar conclusiones firmes si no se combina con MET. De hecho, los autores destacan que la microscopía electrónica sigue siendo "vital" para confirmar y verificar los resultados obtenidos por otros métodos, a fin de proporcionar nuevo conocimiento que no habría sido obtenido por ningún otro enfoque experimental (Eskelinen *et al.*, 2011). Es importante implementar estudios posteriores para demostrar aún más la inducción de autofagia por parte de amibas del género *Acanthamoeba* en CS, así como en otras células blanco, incluidas las células de la córnea, la piel y las células nerviosas.

Anteriormente se había reportado que las amibas del género *Acanthamoeba* causan la muerte celular a través de apoptosis (Alizadeh *et al.*, 1994; Dove-Pettit *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 2004; Sissons *et al.*, 2005; Takaoka-Sugihara *et al.*, 2012) y

necrosis (Dove-Pettit *et al.*, 1996; Shin *et al.*, 2001), sin embargo, hasta ahora no se había reportado que las amibas indujeran muerte celular por procesos autofágicos. Por otro lado, dado que la técnica MET a veces no detecta etapas tempranas del proceso apoptótico (Elmore, 2007; Huerta *et al.*, 2007) y con los antecedentes donde las amibas del género *Acanthamoeba* producen apoptosis, se analizó si las CS expuestas a trofozoítos muestran apoptosis temprana. Las CS se expusieron a las amibas en diferentes tiempos, se tiñeron con anexina V / yoduro de propidio y se analizaron bajo el microscopio confocal. Así como en MET, no se detectó apoptosis en las CS, sin embargo, se confirmó el proceso necrótico, el cual es dependiente de tiempo.

Dove Pettit y colaboradores en 1996, reportaron que *Acanthamoeba culbertsoni* (la misma cepa utilizada en este estudio) es capaz de inducir necrosis y apoptosis en células de neuroblastoma murino debido a diferentes factores citolíticos producidos por la amiba. En nuestros resultados, probablemente el número de prolongaciones emitidas por la amiba durante el proceso fagocítico en las CS puede ser relevante en la forma de muerte celular. Si una sola prolongación está en contacto con la célula blanco, la CS en un intento por sobrevivir, inicia procesos de autofagia, sin embargo, si la fagocitosis persiste, las células fallan en su intento de sobrevivir y mueren de esta manera. Por otro lado, si varias prolongaciones están fagocitando la misma célula, la membrana celular se ve comprometida y conduce a la necrosis.

En estudios anteriores, se ha descrito los mecanismos de patogenicidad de diferentes especies del género *Acanthamoeba*, tanto en modelos *in vivo* (Omaña-Molina *et al.*, 2017) como *in vitro* (Omaña-Molina *et al.*, 2010; 2013). Los mecanismos de invasión se han caracterizado principalmente por ser dependientes de contacto. En estos estudios, se ha confirmado que los organismos con enfermedades primarias, como la diabetes, son más susceptibles a la invasión sistémica por *Acanthamoeba*. Incluso por medio de técnicas histológicas e inmunohistoquímicas, es posible observar a trofozoítos en contacto con CS que envuelven los paquetes de nervios olfatorios, sin aparentes cambios histopatológicos (Omaña-Molina, *et al.*, 2017). Sin embargo, aunque los trofozoítos

estaban en contacto con las CS, no fue posible describir en detalle la interacción entre las amibas y las células del SNP. En este trabajo, a través de técnicas más precisas como MET y MEB, se puede sugerir que las CS son células blanco para las amibas. De hecho, se pensaría que después de que los trofozoítos de *Acanthamoeba* cruzan el epitelio olfatorio, las CS podrían ser una de las primeras células blanco de las amibas. Este proceso podría iniciar con la invasión, la fagocitosis y la inducción de muerte celular por procesos necróticos o procesos autofágicos, para desestabilizar su función protectora de los nervios olfatorios, invadirlos y acelerar el proceso de migración hacia el SNC y desarrollar EAG. Lo anterior ayudaría a explicar el daño a las funciones motoras del cuerpo y probablemente agravar algunos síntomas de la EAG, como la hemiparesis.

A través de los resultados mostrados en este estudio, es probable que durante la interacción de *Acanthamoeba culbertsoni* con CS, estas células ejerzan tropismo en las amibas, similar a lo reportado en *Mycobacterium leprae*, *Trypanosoma cruzi* y Herpes Simplex virus (Neal y Gasque, 2016).

CONCLUSIÓN

Este es el primer estudio en el que se reporta el efecto citopático *in vitro* producido por *A. culbertsoni* en CS. Esta interacción se caracteriza principalmente por mecanismos dependientes de contacto, incluyendo la fagocitosis de las CS por los trofozoítos a través de la emisión de proyecciones citoplasmáticas estrechas y a largadas similares a ventosas. Durante esta interacción, se sugiere que las CS pueden morir por mecanismos autofágicos o necróticos. Estos procesos son importantes dentro de los mecanismos de patogenicidad de *A. culbertsoni* ya que pueden ser útiles para comprender mejor la invasión de estas amibas al SNC y a otros órganos, a fin de mejorar los métodos de diagnóstico y terapéuticos para combatir estas infecciones.

REFERENCIAS

Anderlini, P., Przepiorka, D., Luna, M., Langford, L., Andreeff, M., Claxton, D. y Deisseroth, A. B. 1994. *Acanthamoeba* meningoencephalitis after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 14:459-461.

Bhagwandeem, S. B., Carter, R. F., Naik, K. G. y Levitt, D. 1975. A case of hartmannellid amebic meningoencephalitis in Zambia. *Am. J. Clin. Pathol.* 63:483–492. DOI:10.1093/ajcp/63.4.483

Baig, A. M., Khan, N. A. 2015. A proposed cascade of vascular events leading to granulomatous amoebic encephalitis. *Microb, Pathog.* 88:48-51. DOI:10.1016/j.micpath.2015.08.005

Bonilla, P., Ramírez, E., Ortiz, R. y Eslava, C. 2004. La ecología de las amibas patógenas de vida libre en ambientes acuáticos. En: Rosas, I., Cravioto, A. y Ezcurra, E. (Eds.). *Microbiología ambiental*. Instituto Nacional de Ecología, UNAM. México. Pp. 67-81.

Cabello-Vílchez, A. M. 2015. *Acanthamoeba* spp. an opportunistic agent human infections. *Revista de Investigación de la Universidad Norbert Wiener.* 4:11-32.

Culbertson, G. C. 1961. Pathogenic *Acanthamoeba* (*Hartmannella*). *Am. J. Clin. Pathol.* 35:195-202.

Feingold, J. M., Abraham, J., Bilgrami, S., Ngo, N., Edwards, G. S. y Tutschka, P. J. 1998. *Acanthamoeba* meningoencephalitis following autologous peripheral stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 22:297-300. DOI:10.1038/sj.bmt.1701320

Gallegos-Neyra, E. M., Lugo-Vázquez, A., Calderón-Vega, A., Sánchez-Rodríguez, M. y Mayén-Estrada, R. 2014. Biodiversidad de protistas amébidos de vida libre en México. *Rev. Mex. Biodiv.* 85:10-25. DOI:10.7550/rmb.33691

Gómez M., J.E. 2010. *Protozoología Médica*. Bogotá: Manual Moderno. Pp. 173-83.

Grunnet, M. L., Cannon, G. H. y Kushner, J. P. 1981. Fulminant amebic meningoencephalitis due to *Acanthamoeba*. *Neurology.* 31:174-176. DOI:10.1212/wnl.31.2.174

Harwood, C. R., Rich, G. E., McAleer, R. y Cherian, G. 1988. Isolation of *Acanthamoeba* from a cerebral abscess. *Med. J. Aust.* 148:47-49.

Hernández-Martínez, D., Reyes-Batlle, M., Castelan-Ramírez, I., Hernández-Olmos, P., Vazzini-Zago, V., Ramírez-Flores, E., Sifaoui, I., Piñero, J. E., Lorenzo-Morales, J. y Omaña-Molina, M. (2019). Evaluation of the sensitivity to chlorhexidine, voriconazole and itraconazole of T4 genotype *Acanthamoeba* isolated from Mexico. *Experimental Parasitology.* 197:29-35.

Jager, B. V. y Stamm, W. P. 1972. Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *Lancet* ii:1343-1345. DOI:10.1016/s0140-6736(72)92781-x

Jones, B. R., Visvesvara, G. S. y Robinson, N. M. 1975. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveítis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans Ophthalmol. Soc. UK.* 95:221-232.

Khan, N. A. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol. Rev.* 30:564-595. DOI:10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x

Khan, N. A. 2007. *Acanthamoeba* invasion of the central nervous system. *Int. J. Parasitol.* 37:131-138. DOI:10.1016/j.ijpara.2006.11.010

Koide, J., Okusawa, E., Ito, T., Mori, S., Takeuchi, T., Itoyama, S. y Abe, T. 1998. Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a patient with systemic lupus erythematosus. *Clin. Rheumatol.* 17(4):329-332. DOI:10.1007/BF01451015.

Martinez, A. J. 1982. Acanthamoebiasis and immunosuppression. Case report. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 41:548-557. DOI:10.1097/00005072-198209000-00007

Martinez, A. J. y Janitschke K. 1985. *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism: a review. *Infection* 13:251-256. DOI:10.1007/BF01645432

Martínez, A. J. y Visvesvara, G. S. 1997. Free-Living amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.* 7:583-598. DOI:10.1111/j.1750-3639.1997.tb01076.x

- Mazur, T., Hadas, E. e Iwanicka, I. 1995. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop. Med. Parasitol.* 46(2): 106-8.
- Nagington, J., Watson, P. G., Playfair, T. J., McGill, J., Jones, B. R. y Steel, A. D. 1974. Amoebic infection of the eye. *Lancet* ii:1537-1540. DOI:10.1016/s0140-6736(74)90285-2
- Ofori-Kwakye, S. K., Sidebottom, D. G., Herbert, J., Fischer, E. G. y Visvesvara, G. S. 1986. Granulomatous brain tumor caused by *Acanthamoeba*. Case report. *J. Neurosurg.* 64:505–509. DOI:10.3171/jns.1986.64.3.0505
- Omaña-Molina, M., Hernández-Martínez, D., Sanchez-Rocha, R., Cardenas-Lemus, U., Salinas-Lara, C., Mendez-Cruz, A. R., Colin-Barenque, L., Aley-Medina, P., Espinosa-Villanueva, J., Moreno-Fierros, L. y Lorenzo-Morales, J. 2017. *In Vivo* CNS Infection Model of *Acanthamoeba* Genotype T4: The Early Stages of Infection Lack Presence of Host Inflammatory Response and Are a Slow and Contact-Dependent Process. *Parasitol. Res.* 116(2):725-733. DOI:10.1007/s00436-016-5338-1
- Page, F. C. 1976. *An illustrated key to freshwater and soil Amoebae with notes on cultivation and Ecology.* Freshwater Biol. Assoc. Ambleside. Cumbria, England, Pp. 155.
- Page, F. C. 1988. *A new key to freshwater and soil gymnamoebae: with instructions for culture.* Freshwater Biol. Assoc. Cumbria, UK, Pp. 122.
- Ringsted, J., Jager, B. V., Suk, D. y Visvesvara, G. S. 1976. Probable *Acanthamoeba* meningoencephalitis in a Korean child. *Am. J. Clin. Pathol.* 66:723–730. DOI:10.1093/ajcp/66.4.723
- Sangruchi, T., Martinez, A. J. y Visvesvara, G. S. 1994. Spontaneous granulomatous amebic encephalitis: report of four cases from Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 25:309–313.

Schuster, F. L. y Visvesvara, G. S. 2004. Free-living amoeba as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int. J. Parasitol.* 34:1001-1027. DOI:10.1016/j.ijpara.2004.06.004

Seal, D. V. 2003. *Acanthamoeba* keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye (Lond)* 17(8):893-905. DOI:10.1038/sj.eye.6700563

Sell, J. J., Rupp, F. W. y Orrison Jr, W. W. 1997. Granulomatous amebic encephalitis caused by *Acanthamoeba*. *Neuroradiology.* 39(6):434-436. DOI:10.1007/s002340050440

Singhal, T., Bajpai, A., Kalra, V., Kabra, S. K., Samantaray, J. C., Satpathy, G. y Gupta, A. K. 2001. Successful treatment of *Acanthamoeba* meningitis with combination oral antimicrobials. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 20(6):623-627. DOI:10.1097/00006454-200106000-00016

Stehr-Green, J. K., Bailey, T. M. y Visvesvara, G. S. 1989. The epidemiology of *Acanthamoeba* Keratitis in the United States. *Am J Ophthalmol* 107(4):331-336. DOI:10.1016/0002-9394(89)90654-5

Steinberg, J. P., Galindo, R. L., Kraus, E. S. y Ghanem, K. G. 2002. Disseminated acanthamebiasis in a renal transplant recipient with osteomyelitis and cutaneous lesions: case report and literature review. *Clin. Infec. Dis.* 35(5):E43-E49. DOI:10.1086/341973

Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F. y Ayadi, A. 2012. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathol. Biol.* 60(6):399-405. DOI:10.1016/j.patbio.2012.03.002

Visvesvara, G. S. y Maguire, J. H. 2006. Pathogenic and opportunistic free-living amebas: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. En: Guerrant, R. L., Walker, D. H. y Weller, P. F. (Eds.). *Tropical infectious diseases: Principles, Pathogens & Practice*. Vol. 2. Churchill Livingstone (Elsevier), Philadelphia. Pp. 1114-1125.

Visvesvara, G. S., Moura, H., Schuster, F. L. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50:1-26. DOI:10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x

Visvesvara, G. S., Roy, S. L. Maguire, J. H. 2011. Pathogenic and opportunistic Free-Living Amebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia pedata*. En: Guerrant, R. L., Walker, D. H. y Weller, P. F. (Eds.). *Tropical infectious Diseases: Principles, pathogens and practice*. Hardcover. Pp. 707-713.

Visvesvara, G. S. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae. En: Murray, P. R. y Baron, E. J. (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington, DC. Pp. 2082-2091.

Walochnik, J. 2018. Amoebae. En: Florin-Christensen, M y Schnittger L. (Eds.). *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets*. Springer, Cham. Pp. 389-412. DOI:https://doi.org/10.1007/978-3-319-70132-5_15

Willaert, E., Stevens, A. R. y Tyndall, G. R. 1978. Retrospective identification of *Acanthamoeba culbertsoni* in a case of amoebic meningoencephalitis. *J. Clin. Pathol.* 31:717-720. DOI:10.1136/jcp.31.8.717